

УДК 575.174.015.3:582.675.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ IRAP-МЕТОДА ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ РЕСУРСНЫХ И РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

© 2010 г. С. В. Боронникова¹, Р. Н. Календарь²

¹ Пермский государственный университет, кафедра ботаники и генетики растений, Пермь 614990;
e-mail: SVBoronnikova@yandex.ru

² Университет Хельсинки, Институт биотехнологии, Хельсинки 00014;
Южный биотехнологический центр, Одесса 650036;
e-mail: ruslan.kalendar@helsinki.fi

Поступила в редакцию 04.12.2008 г.

Видоспецифичные LTR-ретротранспозоны были впервые клонированы у пяти редких реликтовых лекарственных видов растений Пермского края. Последовательности LTR-ретротранспозонов были использованы для ПЦР-анализа, основанного на амплификации между повторяющимися последовательностями из LTR или другими участками ретротранспозонов (IRAP). Генетическая изменчивость изучена у шести популяций редкого реликтового вида растений *Adonis vernalis* L. с использованием IRAP-метода; проанализировано 125 полиморфных IRAP-маркеров. Определены показатели полиморфизма ДНК и генетического разнообразия популяций *A. vernalis*.

Мобильные генетические элементы являются обязательным компонентом генома эукариот. Барбара Мак Клинтон установила, что в геноме кукурузы имеется множество перемещающихся элементов [1]. ДНК мобильных элементов у дрозофилы была выделена и клонирована группами Г.П. Георгиева и В.А. Гвоздева в СССР и Д. Хогнесса в США [2]. В настоящее время активно изучаются различные типы мобильных элементов, в том числе и ретротранспозоны, механизмы их транспозиции, роль в геноме, системы генетической нестабильности [3–5].

Ретротранспозоны используют как промежуточный этап жизненного цикла копирование своей РНК с помощью обратной транскрипции в ДНК-копию, которая встраивается в ДНК хозяина с помощью интегразы [6,7]. Последовательности ретротранспозонов несут регуляторные сайты (промоторы), опознаваемые ядерными факторами инициализации транскрипции для синтеза РНК — полимеразы II и III. Большая часть последовательностей ретротранспозонов инактивирована мутациями и транскрибируется только частично. У разных видов конкретные ретротранспозоны могут быть полностью неактивными, редко активными или постоянно активными [4]. В некоторых случаях число копий ретротранспозонов может составлять до 90% ядерного генома [6].

Последовательности LTR-ретротранспозонов используются для выявления полиморфизма между исследуемыми формами одного вида с помощью ПЦР-фингерпринта — IRAP, REMAP и SSAP методами [8–10]. В Alu-PCR (SINE-PCR)

используются участки между короткими ретротранспозонами без LTR — SINEs (Short Interspersed Elements) [11, 12].

IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) — метод амплификации геномной ДНК между близкорасположенными последовательностями ретротранспозонов [8, 9, 13]. Продукт ПЦР-амплификации геномной ДНК является стабильным генетическим IRAP-маркером. Полиморфизм в данном случае обусловлен либо мутацией в участке связывания праймера, либо уникальным биологическим процессом — ретротранспозицией, в результате встраивания ретротранспозона в новый участок геномной ДНК без потери первоначального участка.

Цель настоящей работы — разработка метода IRAP для пяти редких реликтовых видов растений Пермского края посредством клонирования участков геномной ДНК, содержащих LTR-ретротранспозоны, и последующим подбором к ним праймеров; использование праймеров из ретротранспозонов для ПЦР-фингерпринта и генетического анализа полиморфизма шести популяций редкого реликтового вида *A. vernalis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследований были избраны пять редких реликтовых распространенных в Пермском крае видов растений, имеющих декоративное и лекарственное значение: *Adonis vernalis* L. и *Adonis sibirica* Patr. ex Ledeb. из семейства Ranunculaceae, *Paeonia anomala* L. из се-

мейства *Raeoniaceae*, *Adenophora lilifolia* (L.) A. DC. из семейства *Campanulaceae*, *Digitalis grandiflora* Mill. из семейства *Scrophulariaceae*, с категорией угрожаемого состояния 3 (R) – редкий вид [14]. Для анализа молекулярно-генетического полиморфизма ДНК были собраны листья с 30 случайно выбранных растений каждого вида на расстоянии от 30 до 50 м друг от друга. Для выделения ДНК использовали методику А.М. Торреса и др. [15] с незначительными модификациями. Изучение популяционной структуры и молекулярно-генетический анализ пяти редких видов растений проведены с 1994 по 2009 г. в молекулярно-генетической лаборатории кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного университета; клонирование, секвенирование последовательностей ДНК, подбор LTR-праймеров и выявление их эффективности проведены в лаборатории геномики растений Института биотехнологии Университета Хельсинки. Последовательности ретротранспозонов амплифицированы из геномной ДНК с помощью метода универсальных праймеров ретротранспозонов [16]. Экстракцию фрагмента ДНК из агарозного геля проводили по протоколу фирмы “QIAGEN”, а лигирование фрагментов ДНК – с pGEM-T (“Promega”) плазмидным T-вектором. Плазмидную ДНК трансформировали в клетки *E. coli* штамма JM109. Клетки, несущие плазмиду со вставкой фрагмента чужеродной ДНК, были выявлены путем бело-синей селекции на среде с ампициллином, X-Gal и IPTG. Проверка положительных колоний на наличие клонированных ПЦР-продуктов проведена с помощью ПЦР с универсальными рUC-праймерами (M13 прямым и обратным). Секвенирование последовательностей ДНК проведено с использованием капиллярного секвенатора ABI3700 (“Applied Biosystems”). Клонирование целой последовательности ретротранспозона проводилось с помощью инвертированной ПЦР с протяженным синтезом, с использованием близкорасположенных LTR-праймеров, ориентированных в противоположные стороны. Получаемый продукт амплификации содержит обе последовательности LTR и полную центральную последовательность ретротранспозона. Амплификация проводилась при высокой температуре отжига – двухступенчатая ПЦР (95°C 30 с, денатурация, 68°C 4 мин отжиг праймера и синтез одновременно) в течение 15 циклов, с использованием Phusion DNA Polymerase (“Finnzymes”). Клонирование длинных продуктов амплификации проводили, как в случае с короткими продуктами ПЦР, в pGEM-T векторе, предварительно подготовив продукт амплификации для лигирования, добавив к “тупым” концам по dT на 3'-концы, с помощью *Taq*-полимеразы. В соответствии с консервативными участками LTR-ретротранспозонов в различных ориентациях были

разработаны праймеры с использованием программы FastPCR [17]. Для IRAP-анализа пяти редких видов Урала синтезированы 70 праймеров в “MWG Biotech AG”.

Для апробации выявленных IRAP-маркеров избран перспективный для лечения сердечно-сосудистых заболеваний редкий вид *A. vernalis*, содержащий сердечные гликозиды, не обладающие кумулятивным эффектом и не накапливающиеся в сердечной мышце [18]. Исследованы шесть популяций *A. vernalis*, расположенных в островной Кунгурской лесостепи на расстоянии не менее 20 км друг от друга. Самая северная популяция (вторая Av2) находится на Спасской горе в Кунгурском районе и удалена от ближайшей популяции на 45 км. В северной части Кунгурской лесостепи в Ординском районе располагаются первая (Av1) и третья (Av3) популяции. В центральной части островной Кунгурской лесостепи в Октябрьском районе находятся четвертая (Av4), пятая (Av5) и шестая (Av6) популяции.

Реакционная смесь объемом 25 мкл для ПЦР IRAP-методом содержала: 25 нг ДНК, 1x ПЦР-буфер (20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄), 0.2 мкМ праймер, 0.2 mM dNTP, 1 U *Taq*-полимеразы FirePol (“Solis BioDyne”), 0.04 U *pfu*-полимеразы (“Fermentas”) и 5 мкл геномной ДНК. Амплификация была выполнена в PTC-100 термоциклере (“Bio-Rad”) или MasterCycler (“Eppendorf”) в 0.2 мл пробирках или 96-луночных планках. Амплификацию ДНК проводили по следующей программе: предварительная денатурация 95°C, 3 мин; 32 цикла 95°C, 20 с; 60°C отжига, 1 мин; 68°C, 1 мин. Последний цикл элонгации длился 5 мин при 68°C. Температура отжига в зависимости от G/C-состава праймеров варьировала от 55 до 68°C. Амплифицированные продукты ПЦР были анализированы электрофорезом в 1.6%-ном агарозном геле (“RESolute Wide Range”, “BIOzym”) и визуализированы этидием бромистым. Гели были отсканированы в Университете Хельсинки на сканере FLA-5100 (“Fuji”) или в Пермском государственном университете в системе Gel-DocXRW (“Bio-Rad”). Для определения длины фрагментов ДНК использовали молекулярный маркер 100 bp + 1.5 + 3 Kb DNA Ladder (“ООО-СибЭнзим-М”, Москва). Определение длин фрагментов проводилось с использованием программы Quantity One в системе Gel Doc XR (“Bio-Rad”). Эффективность выявления полиморфизма ДНК рассчитана для пяти исследованных видов в соответствии со шкалой 1–5: от низкой (1) до высокой (5). Для описания генетической структуры подразделенной популяции были использованы следующие параметры: ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_T) во всей популяции, как мера общего генного разнообразия; ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_S) в субпопуляции, как мера

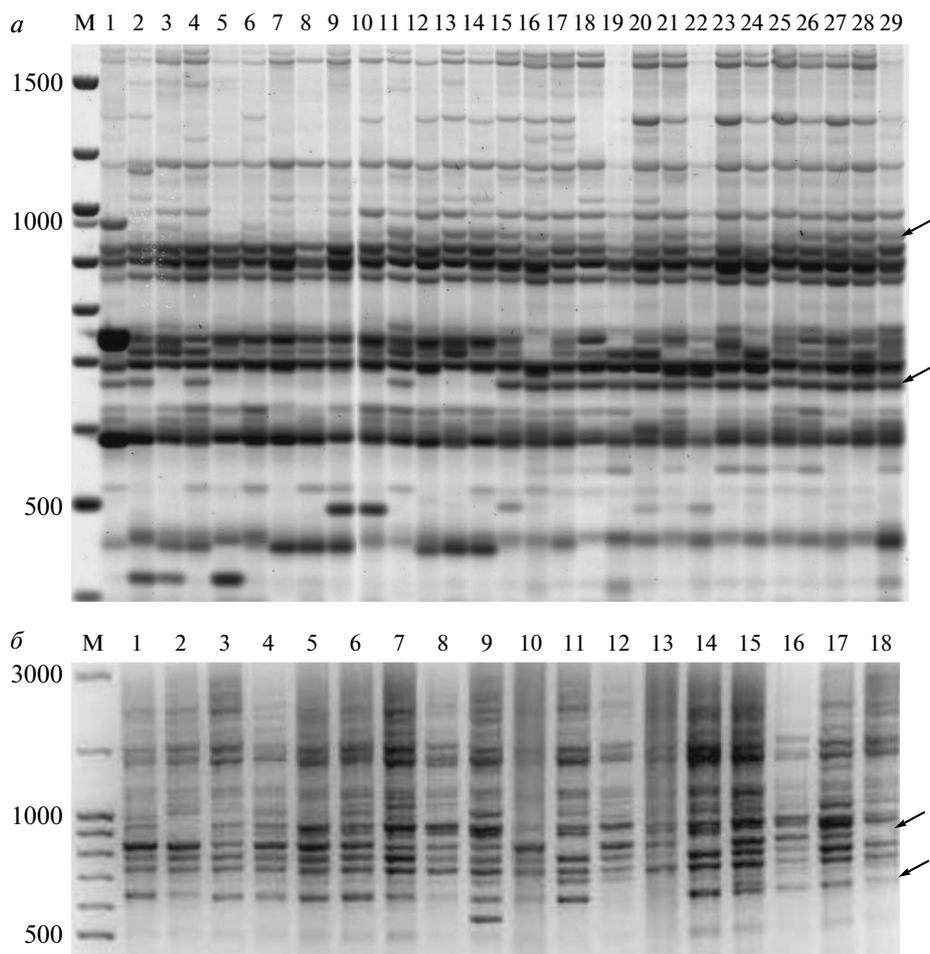


Рис. 1. IRAP-спектры *A. vernalis*: *a* – популяции *Av5* с праймером 2079 (5'-AGGTGGGCGCCA-3'), в результате использования метода универсальных праймеров ретротранспозонов; *б* – популяции *Av6* с праймером 2204. Цифрами обозначены номера проб; М – молекулярный маркер; стрелками указаны некоторые полиморфные фрагменты ДНК. Представлена часть спектров.

ее внутривидового разнообразия; доля межпопуляционного генетического разнообразия в общем разнообразии, или показатель подразделенности популяций (G_{ST}) [19]. Компьютерный анализ полученных данных проведен с использованием программы POPGENE1.31 и с помощью специализированного макроса GenAlEx6 для MS-Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данной работе для амплификации последовательностей ретротранспозонов из геномной ДНК использован (рис. 1, *a*) оригинальный метод универсальных праймеров ретротранспозонов [16], который включает амплификацию между сайтами tRNA связывания праймера (PBS), выявленными в центральной части всех ретротранспозонов. Последовательность PBS-участка следует сразу же после нескольких нуклеотидов после первого LTR. Нами были выявлены предполагаемые

участки LTR и методом выравнивания ДНК-последовательностей были найдены консервативные участки, на которых производился подбор консервативных LTR-праймеров. Полную последовательность LTR-ретротранспозона выявляли с помощью инвертированной амплификации с праймерами к выявленному LTR-участку. Некоторые нуклеотидные последовательности фрагментов LTR-ретротранспозонов для исследуемых видов растений Пермского края были размещены в базе данных NCBI под номерами: EF191000–EF191012 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Для IRAP-анализа пяти редких реликтовых видов растений подобраны 70 LTR-праймеров [20] к предполагаемым LTR-последовательностям. Каждый праймер индивидуально был анализирован в ПЦР (IRAP) с геномной ДНК исследуемых видов. В результате этого анализа были выявлены эффективные праймеры (табл. 1) и установлена их видовая специфичность.

Таблица 1. Праймеры из LTR-последовательностей ретротранспозонов исследуемых видов

№	Последовательности LTR-праймеров (5' → 3')	Источник LTR	<i>Adonis vernalis</i> , <i>A. sibirica</i>	<i>Digitalis grandiflora</i>	<i>Paeonia anomala</i>	<i>Adenophora lilifolia</i>
2156	ACAAGTTGTCCAAGGGCTTTCCCTC	<i>Adenophora lilifolia</i>	2	1		5
2157	AGGTGGGCGCCAAACTGTTTTGG	<i>Adenophora lilifolia</i>	2			4
2194	CTACTGATCATGATGCCGCTG	<i>Adenophora lilifolia</i>	1			2
2196	CCGGCGAGTTCAGCATGTCCG	<i>Adenophora lilifolia</i>	1			4
2175	TTAGACCCGGAACCGCCGTG	<i>Adonis sibirica</i>	4	1	2	
2209	AATGGTCAAGAGTGGAGAGGAC	<i>Adonis sibirica</i>	2			1
2211	GTTGGAGTGTATAGTCCCACATCG	<i>Adonis sibirica</i>	3			
2149	GTAGTTTCGGGTTCGGAATTGCA	<i>Adonis vernalis</i>	2	1		
2197	GAAGTACCGATTTACTTCCGTGTA	<i>Adonis vernalis</i>	4			
2198	ATCCTTCGCGTAGATCAAGCGCCA	<i>Adonis vernalis</i>	4			
2200	ATGTGACAGTCGACTAACCAC	<i>Adonis vernalis</i>	3			
2201	CCTAGGTGGTTAGTCGACTGTCAC	<i>Adonis vernalis</i>	5			
2202	TGGCGCTTGATCTACGCGAAGGA	<i>Adonis vernalis</i>	5			
2203	ATCCACAACCTGGACGTTTGCTG	<i>Adonis vernalis</i>	3			1
2204	AACTTGATCCAGATCATCTCC	<i>Adonis vernalis</i>	4			
2155	AGCTTGATATCCCCGCCCGGTCAA	<i>Digitalis grandiflora</i>		5		1
2158	CCATCGGGTCCGGGCAATATCG	<i>Digitalis grandiflora</i>		4		1
2159	AGCGAATCAACAGGGGCTGCCCGA	<i>Digitalis grandiflora</i>	2	3		3
2183	TTGCAAATACCAGTGGCGGGTCCGT	<i>Digitalis grandiflora</i>	2	2		
2185	AATCCACAACCGCTAGTGGCG	<i>Digitalis grandiflora</i>		4		1
2186	CGGTTTAGAACGCCACAAATGG	<i>Digitalis grandiflora</i>		4		
2152	AGTGAGCATGGAGCGGACAAGC	<i>Paeonia anomala</i>	2		4	4
2153	ATCTTTTGAGACCAAGCTTCCGTC	<i>Paeonia anomala</i>			2	1
2164	GTGTCTCCAGTCAAAGCGGACAA	<i>Paeonia anomala</i>		3		
2165	GTTCTCCTACTAGCCGATGTGGGA	<i>Paeonia anomala</i>		1		2
2187	TGATTCCTAAGCATGGTACAAC	<i>Paeonia anomala</i>				3
2216	TACTATGTGAACGGGTCTGGGCTG	<i>Paeonia anomala</i>		1	4	3

Примечание. Не представлены праймеры с низкой эффективностью (только 1 или только 2).

Для молекулярно-генетического анализа шести популяций *A. vernalis* отобраны пять наиболее информативных LTR-праймеров (табл. 2). При анализе фрагментов ДНК, амплифицированных в результате ПЦР с пятью LTR-праймерами в шести изученных популяциях *A. vernalis*, выявлено 127 фрагментов ДНК, 118 из которых были полиморфными. Число амплифицированных фрагментов ДНК в общей выборке растений варьировало в зависимости от праймера от 19 (2202) до 31 (2197). В среднем при IRAP-анализе один праймер инициировал у *A. vernalis* синтез 25 фрагментов ДНК. Число полиморфных фрагментов в суммарной выборке растений *A. vernalis* варьировало от 17 до 30, а их размеры – от 190 до 2500 пн (рис. 1,б, табл. 2). Результаты анализа полиморфизма ДНК, выполненного в двух географически отдаленных лабораториях, идентичны.

Доля полиморфных локусов (P_{95}) в суммарной выборке в зависимости от LTR-праймера колебалась от 86 до 96% и на выборку составила 93% (табл. 2). Уровень полиморфизма амплифицированных фрагментов ДНК *A. vernalis*, полученных в результате ПЦР с пятью LTR-праймерами, колебался от 54% в *Av4* до 77% в *Av5* и *Av6*.

Ожидаемая гетерозиготность по локусам (H_E) в общей выборке *A. vernalis* составила 0.291. Этот показатель наиболее высок в *Av5* ($H_E = 0.270$), а самое низкое его значение отмечено в *Av1* ($H_E = 0.177$) (рис. 2). Абсолютное число аллелей на локус (n_a) (в нашем случае на фрагмент ДНК) в общей выборке *A. vernalis* составило 1.992, а эффективное число аллелей на локус (n_e) – 1.497. Максимальны оба параметра в *Av5* ($n_a = 1.859$, $n_e = 1.445$), а минимальны – в *Av1* ($n_a = 1.617$, $n_e = 1.281$).

Таблица 2. Анализ полиморфизма ДНК популяций *Adonis vernalis* L. с использованием IRAP-метода

IRAP-праймеры	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Размеры фрагментов ДНК, пн	Число (частота) полиморфных фрагментов в популяциях						Число учитываемых фрагментов ДНК в общей выборке	Число (частота) полиморфных фрагментов ДНК в общей выборке
			Av1	Av2	Av3	Av4	Av5	Av6		
2175	TTAGACCCG-GAACCGCCGTG	190–2400	16 0.695	13 0.542	18 0.783	18 0.783	19 0.792	22 0.917	24	23 0.958
2198	ATCCTTCGCGTA-GATCAAGCGCCA	310–2470	18 0.600	16 0.533	18 0.600	22 0.733	18 0.600	21 0.700	30	26 0.867
2202	TGGCGCTTGATC-TACGCGAAGGA	300–1650	11 0.579	11 0.579	11 0.579	10 0.526	14 0.737	16 0.842	19	17 0.895
2200	ATGTGACAGTC-GACTAACCAC	360–2500	16 0.696	14 0.609	13 0.565	7 0.304	16 0.696	18 0.783	23	22 0.956
2197	GAAGTACCGATT-TACTTCCGTGTA	340–2430	13 0.419	28 0.983	20 0.645	12 0.387	31 0.969	21 0.677	31	30 0.68
Всего			74 0.583	82 0.646	80 0.630	69 0.543	98 0.772	98 0.772	127	118 0.929

Примечание. Обозначения популяций даны в тексте.

Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов на подразделенную популяцию *A. vernalis* (H_T), определенная на основании полиморфизма ПЦР-фрагментов в общей популяции, равна 0.305, а в субпопуляциях (H_S) – 0.225. Таким образом, ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в субпопуляциях *A. vernalis* ниже, чем в общей популяции. Коэффициент подразделенности популяций (G_{ST}) показывает, что на межпопуляционную компоненту генетического разнообразия *A. vernalis* приходится 26%. Изученные популяции редкого реликтового вида растений *A. vernalis* сильно дифференцированы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Последовательности ретротранспозонов геномов эукариот интересны с эволюционной точки зрения. В некоторых случаях суммарное количество всех ретротранспозонов (с LTR и без LTR) может составлять до 90% ядерного генома растений или животных [6, 7]. Ретротранспозоны нашли свое применение в генетическом анализе с использованием разных методов ДНК-фингерпринта – гибридизации на мембране или в ПЦР [8, 10]. При наличии секвенированных последовательностей ретротранспозонов можно подобрать

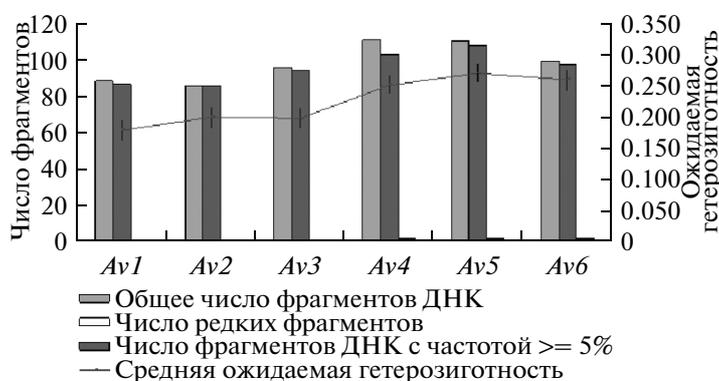


Рис. 2. Параметры генетического разнообразия шести популяций *A. vernalis*.

праймеры к их наиболее консервативным участкам которые можно использовать для ПЦР-фингерпринта. В связи с этим поиск последовательностей ретротранспозонов необходим и перспективен для новых видов. Последовательности ретротранспозонов можно получить с помощью разных подходов, например методом амплификации гена обратной транскриптазы, с последующим клонированием близкорасположенного участка LTR. Другой метод основан на использовании амплификации геномной ДНК с одиночным праймером (или в комбинации с другим праймером), комплементарным PBS-участку. ПЦР-фрагменты, амплифицированные этим методом, содержат инвертируемые PBS-последовательности, сразу за которыми следуют предполагаемые LTR-последовательности [16]. Последовательности разных ретротранспозонов в хромосомной ДНК кластеризуются и “перемешиваются” друг с другом, поэтому существует высокая вероятность нахождения фрагмента LTR при амплификации с праймерами, комплементарными PBS-участку [16].

Анализ разработанных 70 LTR-праймеров показал, что они имеют видовую специфичность, т. е. наблюдается фингерпринт только для конкретного вида, из которого был выделен ретротранспозон. У родственных видов последовательности сходных LTR-ретротранспозонов различаются в соответствии с уровнем родства сравниваемых видов [16]. В связи с этим у близких видов LTR-праймеры, синтезированные для одного вида, могут быть использованы для амплификации ДНК других видов. В геномах растений и животных выявляют все большее количество ретротранспозонов, поэтому потенциальная информативность (количество локусов и их полиморфизм) метода IRAP очень велика [21, 22]. Новые ретротранспозиции в геноме хозяина, в зависимости от своей локализации, могут приводить к изменениям активности генов, индуцировать хромосомные изменения, а также динамически изменять размер хромосом и способствуют рекомбинациям хромосом при кроссинговере [4].

Молекулярно-генетический анализ ДНК с использованием IRAP-метода показал, что самые низкие показатели генетического разнообразия отмечены в первой популяции *A. vernalis* (*Av1*), расположенной в Ординском районе ($P_{95} = 58\%$; $H_E = 0.177$; $n_e = 1.281$), а самые высокие показатели – в *Av5* в Октябрьском районе ($P_{95} = 77\%$; $H_E = 0.270$; $n_e = 1.445$).

ПЦР-метод, в котором используются праймеры из высокоповторяющихся элементов, таких как ретротранспозоны, позволяет эффективно выявлять внутривидовой полиморфизм. С использованием IRAP-метода проведен молекулярно-генетический анализ, изучено генетическое разнообразие как редких реликтовых [23–25], так и ши-

роко распространенных ресурсных видов растений [26], разработана методика молекулярно-генетической идентификации и паспортизации генофондов редких и нуждающихся в охране видов растений [24].

Таким образом, использование ДНК-фингерпринтинга на основе последовательностей ретротранспозонов оказалось эффективным для оценки внутри- и межпопуляционного генетического разнообразия редких видов растений и оценки состояния их генофондов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант РФФИ_урал № 07-04-96032).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McClintok B. Controlling elements and the gene // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1956. V. 21. P. 197–216.
2. Ilyin Y.V., Tchurikov N.A., Ananiev E.V. et al. Studies on the DNA fragments and adjacent sequences // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1978. V. 42. P. 959–969.
3. Любомирская Н.В., Ильин Ю.В. Мобильные генетические элементы эукариот: прошлое, настоящее, будущее // Молекуляр. биология. 1999. Т. 33. № 6. С. 958–968.
4. Kalendar R., Tanskanen J., Immonen S. et al. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 12. P. 6603–6607.
5. Евгеньев М.Б. Мобильные элементы и эволюция генома // Молекуляр. биология. 2007. Т. 41. № 2. С. 234–245.
6. Kumar A., Bennetzen J. Plant retrotransposons // Annual Rev. Genetics. 1999. V. 33. P. 479–532.
7. Wicker T., Sabot F., Hua-Van A. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements // Nature Reviews Genetics. 2007. № 8. P. 973–982.
8. Kalendar R., Grob T., Regina M. et al. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques // Theoretical and Applied Genetics. 1999. V. 98. P. 704–711.
9. Kalendar R., Schulman A.H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // Nature Protocols. 2006. V. 1. № 5. P. 2478–2484.
10. Leigh F., Kalendar R., Lea V. et al. Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques // Mol. Gen. Genomics. 2003. V. 269. P. 464–474.
11. Банникова А.А., Матвеев В.А., Крамеров Д.А. Опыт использования интер-SINE-ПЦР в изучении филогенеза млекопитающих // Генетика. 2002. Т. 38. № 6. С. 853–864.
12. Рябинина Н.Л., Банникова А.А., Шереметьева В.А. и др. Анализ ДНК высших приматов с помощью интер-SINE-ПЦР // Генетика. 2008. Т. 44. № 3. С. 315–322.

13. Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений. 2002. Т. 34. № 4. С. 279–296.
14. Красная книга Пермского края / Под ред. А.И. Шепеля. Пермь: Книжный мир, 2008. 256 с.
15. Torres A.M., Weeden N.F., Martin A. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba* // Theoretical and Applied Genetics. 1993. V. 5. P. 937–945.
16. Kalendar R., Tanskanen J., Antonius-Klemola K. et al. Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 15. P. 5833–5838.
17. Kalendar R., Lee D., Schulman A.H. FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search // Genes, Genomes and Genomics. 2009. V. 3. № 1. <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm>
18. Пошкурлат А.П. Род горчицвет – *Adonis* L. Систематика, распространение, биология. М.: МАИК “Наука/Интерпериодика”, 2000. 199 с.
19. Nei M. Molecular Population Genetics and Evolution. Amsterdam, 1975. 278 p.
20. Календарь Р.Н., Боронникова С.В. Анализ молекулярно-генетического полиморфизма природных популяций редких видов растений Урала с помощью ретротранспозонов // Материалы Четвертого Московского междунар. конгр. “Биотехнология, состояние и перспективы развития”. М.: ЗАО “Экспо–биохим–технологии”, 2007. Ч. 2. С. 121.
21. Boyko E., Kalendar R., Korzun V. et al. A high-density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defense related genes: insights into cereal chromosome structure and function // Plant Molec. Biology. 2002. V. 48. P. 767–790.
22. Baumel A., Ainouch M., Kalendar R. et al. Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* Hubard (Poaceae) // Molec. Biology and Evolution. 2002. V. 19. № 8. P. 1218–1227.
23. Кокаева З.Г., Боронникова С.В., Тихомирова Н.Н. и др. Анализ генетического разнообразия популяционных систем редких и ресурсных видов растений // IY Междунар. науч. конф. “Биотехнология – охране окружающей среды”. М.: Докл. МОИП, 2006. С. 75–79.
24. Боронникова С.В. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация редких и находящихся под угрозой уничтожения видов растений. Пермь: Перм. ун-т, 2008. 120 с.
25. Боронникова С.В. Генетическая паспортизация популяций редких видов растений рода *Adonis* с использованием ISSR- и IRAP-маркеров // Изв. ТСХА, 2009. № 1. С. 83–89.
26. Боронникова С.В., Светлакова Т.Н., Бобошина И.В. Изучение генетического полиморфизма *Populus tremula* L. с использованием ISSR- и IRAP-маркеров // Аграрная Россия. 2009. № 2. С. 20–22.

Using IRAP Markers for Analysis of Genetic Variability in Populations of Resource and Rare Species of Plants

S. V. Boronnikova^a and R. N. Kalendar^b

^a The Perm' State University, Department of Botany and Genetics of Plants, Perm', 614990 Russia
e-mail: SVBoronnikova@yandex.ru

^b University of Helsinki, Institute of Biotechnology, Helsinki, 00014 Finland
e-mail: ruslan.kalendar@helsinki.fi

Species-specific LTR retrotransposons were first cloned in five rare relic species of drug plants located in the Perm' region. Sequences of LTR retrotransposons were used for PCR analysis based on amplification of repeated sequences from LTR or other sites of retrotransposons (IRAP). Genetic diversity was studied in six populations of rare relic species of plants *Adonis vernalis* L. by means of the IRAP method; 125 polymorphic IRAP-markers were analyzed. Parameters for DNA polymorphism and genetic diversity of *A. vernalis* populations were determined.