На правах рукописи

Семериков Владимир Леонидович

ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ СИСТЕМАТИКА ВИДОВ *LARIX* MILL.

03.00.05 – ботаника

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Екатеринбург – 2007

Работа выполнена в Институте экологии растений и животных Уральского отделения РАН

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Махнев Африкан Кузьмич

доктор биологических наук,
профессор
Мухин Виктор Андреевич

доктор биологических наук
Путенихин Валерий Петрович

Ведущая организация - **Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН**

Защита состоится «___»_____2007 г. в час. на заседании диссертационного совета Д 004.005.01 при Институте экологии растений и животных УрО РАН по адресу:
620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202
Fax: 8 (343) 260-82-56
E-mail: common@ipae.uran.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института экологии растений и животных УрО РАН

Автореферат разослан «___»_____2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук М.Г.Нифонтова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. История биоты является важнейшей целью эволюционной науки. Изучение эволюционных преобразований живых организмов неотделимо от изучения динамики ландшафтов, климата и всей географической обстановки, в которой происходят эти преобразования. На протяжении всего четвертичного периода умеренные широты находятся под воздействием климатических циклов оледенений и межледниковий. Эти флуктуации сильнейшим образом влияют на расположение ареалов и демографию видов животных и растений, что оставляет отпечаток на структуре их генетической изменчивости. Благодаря этому анализ генетической изменчивости того или иного вида даёт возможность получения информации о его прошлом и прошлом вмещающих его ландшафтов. Исследования ряда представителей европейской и североамериканской биот выявили особенности структуры генетической изменчивости этих видов, указывающие на расположение ледниковых рефугиумов - районов, где теплолюбивые виды скрывались в холодные эпохи, и на пути их расселения из этих рефугиумов в послеледниковое время (Comparative phylogeography..., 1998; Hewitt, 2000). Результаты этих исследований дополняют данные палеогеографии, полученные с помощью стратиграфии, палинологии, палеозоологии и климатологии, что важно в связи с присущими последним методам ограничениями, главное из которых – неполнота данных. В отличие от Западной Европы и Северной Америки, палеогеография востока Северной Евразии и биогеография видов животных и растений этой области исследована недостаточно. В настоящей работе я представляю результаты изучения структуры генетической изменчивости представителей рода *Larix* – важных элементов бореальных лесов Евразии и Северной Америки.

Цели и задачи работы. Перед исследованием были поставлены следующие задачи:

1. Оценить величину и структуру изменчивости маркеров ядерного, хлоропластного и митохондриального геномов у наиболее распространенных видов *Larix*.

2. Проверить гипотезу о подразделенности сибирской лиственницы на две географические расы – западную (*L. sukaczewii* Dyl.) и восточную (*L. sibirica* Ldb.).

3. Определить возможные области расположения ледниковых рефугиумов лиственницы сибирской и пути её расселения по современному ареалу.

4. Исследовать характер генетического взаимодействия лиственниц сибирской и даурской (*L. gmelinii* Rupr.) и особенности генетических потоков, связанных с переносом пыльцы и семян в зоне интрогрессивной гибридизации этих видов.

5. Исследовать генетическую структуру восточно-сибирских и дальневосточных лиственниц, определить генетические взаимоотношения отдельных видов, проверить гипотезу о гибридном происхождении некоторых дальневосточных популяций.

6. Изучить филогению видов *Larix*, подтвердить или опровергнуть гипотезу о конфликте филогенетических реконструкций, основанных на хлоропластной и ядерной ДНК.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Подобно многим ветроопыляемым видам растений, имеющим большие размеры популяций и протяженные ареалы, лиственницы характеризуются значительной внутрипопуляционной изменчивостью и невысокой долей межпопуляционного внутривидового разнообразия по ядерным генетическим маркерам. В то же время по цитоплазматическим маркерам внутрипопуляционная изменчивость может быть снижена, а доля межпопуляционного разнообразия увеличена, по сравнению с ядерными маркерами.

2. Характер дифференциации популяций лиственницы сибирской по ядерным, хлоропластным и митохондриальным генетическим маркерам подтверждает самостоятельность её западной расы – лиственницы Сукачева, а генетические отношения митохондриальных гаплотипов лиственниц сибирской и Сукачева указывают на происхождение последней от сибирской лиственницы.

3. Географическое распределение митохондриальных гаплотипов у лиственницы сибирской позволяет делать выводы о расположении рефугиумов лесной растительности во время последнего оледенения. Выделяются области, населенные популяциями, имеющими относительно однородные частоты митохондриальных гаплотипов:

- Урал и прилегающие территории Западной Сибири,
- Алтай и Тянь-Шань,
- район, примыкающий к южной оконечности Байкала,
- оставшаяся часть ареала сибирской лиственницы.

Наличие этих группировок популяций, вероятно, обусловлено их индивидуальным происхождением из отдельных популяций – рефугиумов. В частности, единство пула митохондриальных гаплотипов севера Сибири и саянских популяций может быть объяснено расселением лиственницы в послеледниковое время из горных рефугиумов юга Сибири, а сходство популяций Алтая и Тянь-Шаня позволяет предполагать их общее послеледниковое происхождение.

4. Асимметрия в пространственном распределении ядерных видоспецифичных маркеров, митохондриальных и хлоропластных гаплотипов в зоне интрогрессивной гибридизации лиственниц сибирской и даурской подтверждает вывод о вытеснении первого вида вторым.

5. В гибридной популяции обнаружены гаплотипы, возникшие путем рекомбинации митохондриальных гаплотипов сибирской и даурской лиственниц.

6. Структура изменчивости митохондриальной и ядерной ДНК проливает свет на взаимоотношения сибирских и дальневосточных лиственниц: митохондриальные гаплотипы ольгинской лиственницы являются предковыми по отношению к гаплотипам сибирской, даурской и камчатской (*L. kamtschatica* (Rupr.) Carr.) лиственниц. На Дальнем Востоке имеется зона интрогрессивной гибридизации лиственниц даурской и ольгинской. Гибридные популяции имели промежуточные по отношению к родительским видам значения частот аллозимных локусов, у них были специфичные митохондриальные гаплотипы,

предположительно являющиеся продуктами рекомбинации гаплотипов родительских видов. В то же время подтверждается генетическая самостоятельность популяций юга Сахалина (*L. kamtschatica*) и популяции окрестностей г. Магадана (*L. ochotensis* Kolesn.).

7. Филогенетические реконструкции рода *Larix*, основанные на изменчивости ядерной ДНК и хлоропластной ДНК, были не конгруэнтны в отношении позиции лиственницы сибирской. В остальном обе реконструкции соответствуют друг другу и позволяют сделать выводы об истории происхождения современных таксонов.

Научная новизна. В работе впервые получены сравнимые данные по аллозимной изменчивости у большинства видов лиственниц. Впервые изучена структура изменчивости хлоропластной, митохондриальной и ядерной ДНК видов *Larix*. Впервые для популяционных исследований лиственниц применены такие молекулярные маркеры, как RFLP (полиморфизм длин рестриктных фрагментов) с использованием метода Саузерн-блот, PCR-RFLP (рестриктный анализ ПЦР-продукта), анализ хлоропластных микросателлитных локусов, AFLP (полиморфизм длин амплифицированных фрагментов). Впервые найдено генетическое подтверждение существования западной расы сибирской лиственницы – лиственницы Сукачева (*L. sukaczewii*). Впервые с помощью генетических маркеров трёх геномов – ядерного, хлоропластного и митохондриального - изучены популяции в зоне интрогрессивной гибридизации лиственниц сибирской и даурской. Впервые получено генетическое подтверждение интрогрессивной гибридизации между лиственницами Дальнего Востока и Восточной Сибири и гибридного происхождения некоторых ранее выделенных таксонов. Впервые для хлоропластного и ядерного геномов получены филогенетические реконструкции рода *Larix*, имеющие высокое разрешение. Впервые для филогенетических реконструкции лиственниц использованы маркеры AFLP и PCR-RFLP.

Практическое значение. Результаты исследований имеют важное значение для разработки программ по сохранению генетического разнообразия лесообразующих видов, поскольку выявляют исторически обособленные, уникальные группы популяций, нуждающиеся в сохранении их генетической самобытности. Результаты исследований могут быть использованы в ВУЗах для преподавания ботаники, популяционной генетики, экологии, биогеографии и лесоведения.

Апробация работы. Основные результаты и положения работы были представлены и обсуждались на семи научных конференциях:

Трёх международных: « “*Larix*-98” IUFRO International Symposium», Красноярск, Россия, 1998; “Dynamics and Conservation of Genetic Diversity in Forest Ecosystems”, Strasbourg, France, 2002; международная конференция «Лесные экосистемы Северо-Восточной Азии и их динамика», Владивосток, Россия, 2006;

Четырёх всероссийских: «Вид и его продуктивность в ареале», VI совещание по программе ЮНЕСКО "Человек и биосфера", С.-Петербург, 1993; «Жизнь популяций в гетерогенной среде», 2 Всерос. популяц. семинар, Йош-

кар-Ола, 1998; «Структурно-функциональная организация и динамика лесов» всерос. конф., посвящ. 60-летию Ин-та леса им. В. Н. Сукачева и 70-летию образования Краснояр. края, Красноярск, 2004; IX популяционный семинар, Уфа, 2006.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 256 страницах, состоит из введения, шести глав, заключения, списка литературы (377 наименований, в том числе 296 на иностранных языках), иллюстрирована 20 рисунками, содержит 22 таблицы.

Глава 1. ИЗУЧЕНИЕ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИСТОРИИ ВИДОВ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

1.1. Послеледниковая реколонизация Северной Евразии лесными видами и её генетические эффекты. Климату Земли характерны значительные циклические колебания с периодами порядка 100 000 лет, обусловленные особенностями орбитального движения планеты (Bennett, 1997). В ходе последнего ледникового максимума около 18 000 лет назад значительная часть Северной Америки, Скандинавия и часть шельфа северных морей были заняты покровными ледниками, и даже территории, удаленные от края ледника, имели суровые условия, не пригодные для существования растительности современного облика. Только вокруг Средиземного моря (Huntley, Birks, 1983; Comparative phylogeography…, 1998; Hewitt, 1999), в Карпатах, на северном побережье Черного моря, на Кавказе, на Южном Урале, в Монголии, на юге Дальнего Востока климатические условия позволяли сохраняться рефугиумам древесной растительности (Last glacial maximum..., 2000).

Опосредованная ледниковыми циклами, длительно-периодическая динамика популяций теплолюбивых видов имеет вполне определенные последствия для их генетической структуры. В ходе ледниковых фаз дрейф генов в изолированных, малочисленных популяциях рефугиумов приводит к накоплению генетических различий между ледниковыми популяциями. В межледниковые фазы виды расселяются из рефугиумов, и генетические потоки постепенно выравнивают эти различия, но при этом возникают новые неоднородности в пространственном распределении генетической изменчивости, обусловленные эффектом основателя, сопровождавшем процесс расселения (Colonisation..., 1997; Clark, 1998). Характер генетической изменчивости и её пространственное распределение может служить источником информации о демографическом прошлом того или иного вида – расположении ледниковых рефугиумов, времени начала популяционного роста, путях послеледникового расселения вида и т.д. Многочисленные исследования генетической изменчивости представителей умеренной биоты Европы выявили характерные черты в географическом распределении изменчивости, указывающие на расселение видов из ледниковых рефугиумов (Hewitt, 1999; Comparative phylogeography… 1998). Таким образом, резуль-

таты молекулярно-генетических исследований дополняют данные палинологии, биостратиграфии, палеозоологии в палеогеографии.

1.2. Популяционные эффекты гибридизации у растений и их изучение. Гибридизация между родственными видами и между исторически обособившимися внутривидовыми подразделениями представляет собой частое явление в жизни растений, имеющее разнообразные эволюционные и популяционно-генетические эффекты. Интрогрессия, при которой обеспечивается перенос генов между видами, продуцирует новые генные комбинации и, соответственно, расширяет поле деятельности естественного отбора (Avis, 1994). При гибридизации также могут возникать виды, репродуктивно изолированные от родительских и способные существовать независимо (Grant, 1989).

1.3. Молекулярные маркеры, используемые в популяционно-генетических и филогенетических исследованиях растений. Точность пространственно-временных реконструкций определяется разрешением метода в отношении географической структуры и филогении. Географическое разрешение обусловлено величиной генетических потоков, сопутствующих используемым маркерам – меньшая величина генетических потоков определяет лучшее географическое разрешение маркеров, при том что наследуемость маркера по линии одного пола улучшает возможности филогенетических реконструкций. В связи с этим унипарентально наследуемая хлоропластная ДНК имеет особую ценность в филогеографических исследованиях большинства покрытосеменных растений. В отличие от них, у видов сем. Pinaceae митохондриальная ДНК наследуется по материнской линии, а хлоропластная – по отцовской. Митохондриальная ДНК успешно используется для выявления прошлых колонизационных процессов у многих видов хвойных (например, Direct and indirect..., 1998; Tsumura, Suyama 1998; Wu et al. 1998; Latta, Mitton 1999; Mitton et al., 2000; Patterns in variation..., 2000; Haplotype variation..., 2001; Tandem repeats..., 2001; Richardson et al., 2002; Maternal lineages..., 2002; Burban, Petit, 2003; Johansen, Latta, 2003; Genetic diversity of nuclear..., 2003; Jaramillo-Correa et al., 2004; A mitochondrial DNA..., 2005). Поскольку генетические потоки по митохондриальной ДНК у Pinaceae опосредованы переносом относительно малоподвижных семян, митохондриальные маркеры позволяют более эффективно, чем хлоропластные и ядерные маркеры, выявлять прошлые колонизационные процессы. Однако, в силу низкой скорости точковых мутаций мтДНК и её склонности к внутримолекулярным рекомбинациям (Newton, 1988; Palmer, 1992), хлоропластная ДНК (хлДНК) может быть хорошей альтернативой при выборе маркеров филогеографических исследований, благодаря наличию высокоизменчивых хлоропластных микросателлитных локусов (A set of primers…, 1996).

Хотя цитоплазматические маркеры и являются во многих отношениях идеальными для изучения филогеографии растений, следует учитывать то обстоятельство, что ДНК цитоплазматического генома представляет собой один локус, независимо от того, как много маркеров анализируется. Это означает, что для получения надежных выводов об истории популяции необходимо иметь большое количество несцепленных маркеров, что возможно только при использовании ядерных маркеров (Nordborg, 2001). В их числе, помимо аллозимов,

для популяционно-генетических и филогеографических исследований широко применяются ядерные микросателлиты и AFLP (полиморфизм длин амплифицированных фрагментов).

ГЛАВА 2. ВИДЫ *LARIX* И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ИЗМЕНЧИВОСТИ

2.1. Ареалы и систематика видов лиственниц. Род *Larix* Mill. (Pinaceae) включает около 15 видов листопадных хвойных деревьев, входящих в состав широтного и высотного пояса таёжных лесов Северного Полушария (Рис. 1). Морфологическому разнообразию и систематике лиственниц посвящен целый ряд работ: Patschke, 1913; Szafer, 1913; Сукачев, 1924, 1931; Pilger, 1926; Ostenfeld, Syrach-Larsen, 1930; Колесников, 1946; Дылис, 1947, 1959, 1961; Бобров, 1972; Круклис, Милютин, 1977; Абаимов, Коропачинский, 1984; Farjon, 1990; Путенихин и др., 2004. Род традиционно разделяют на основании признака соотношения длин кроющих и семенных чешуй женских шишек на две секции *Multiseriales* и *Pauciseriales* (Patschke, 1913). Кроющие чешуи лиственниц секции *Multiseriales* превышают по длине семенные чешуи, а у лиственниц секции *Pauciseriales* нет. Виды обоих секций присутствуют как в Северной Америке, так и в Евразии, но *Multiseriales* обитают в более низких широтах (26° -36° с.ш..) по сравнению с видами *Pauciseriales* (35° -73° с.ш..). Отсутствие у видов лиственниц репродуктивных барьеров, как полагает Е.Г.Бобров (1972), определяет широкое распространение на значительной части русского Дальнего Востока и в северо-восточном Китае гибридов лиственниц ольгинской, даурской, Каяндера (*L. cajanderi*) и камчатской, которые, благодаря гибридизации, образуют множество морфологически различных форм, описанных В.Н.Сукачевым (1931), Б.П.Колесниковым (1946) и Н.В.Дылисом (1961): *L. maritima* Sukacz., *L. lubarskii* Sukacz., *L. ochotensis* Kolesn., *L. middendorfii* Kolesn., *L. amurensis* Kolesn., *L. komarovii* Kolesn.

Опубликованные работы по филогении *Larix* с использованием анализа хлоропластной ДНК (Interspecific relationship…, 1995; Qian et al., 1995; Wei, Wang, 2003; Species-diagnostic markers…, 2005) давали довольно неожиданные результаты, хотя и не имели достаточной статистической поддержки клад. В частности, секции *Pauciseriales* и *Multiseriales* оказались парафилетичными. Выявлялось три основные клады – лиственницы Северной Евразии, Америки и Южной Азии. *L. sibirica* не входила в состав североевроазиатской клады, и её филогенетическое положение было неопределенным. Анализ филогении с использованием последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера рибосомальной ДНК (ITS) (Gernandt, Liston, 1999; Wei, Wang, 2004a) делит род на евроазиатскую и американскую группы видов с подразделением евроазиатской клады на североевразиатскую и южноазиатскую субклады, и включает *L. sibirica* в североевроазиатскую субкладу.

Недостаток уровня разрешения полученных филогенетических реконструкций и противоречия между хлоропластными и ядерными данными потребовали дополнительных исследований молекулярной систематики рода *Larix* с использованием изменчивости ядерного и хлоропластных геномов.

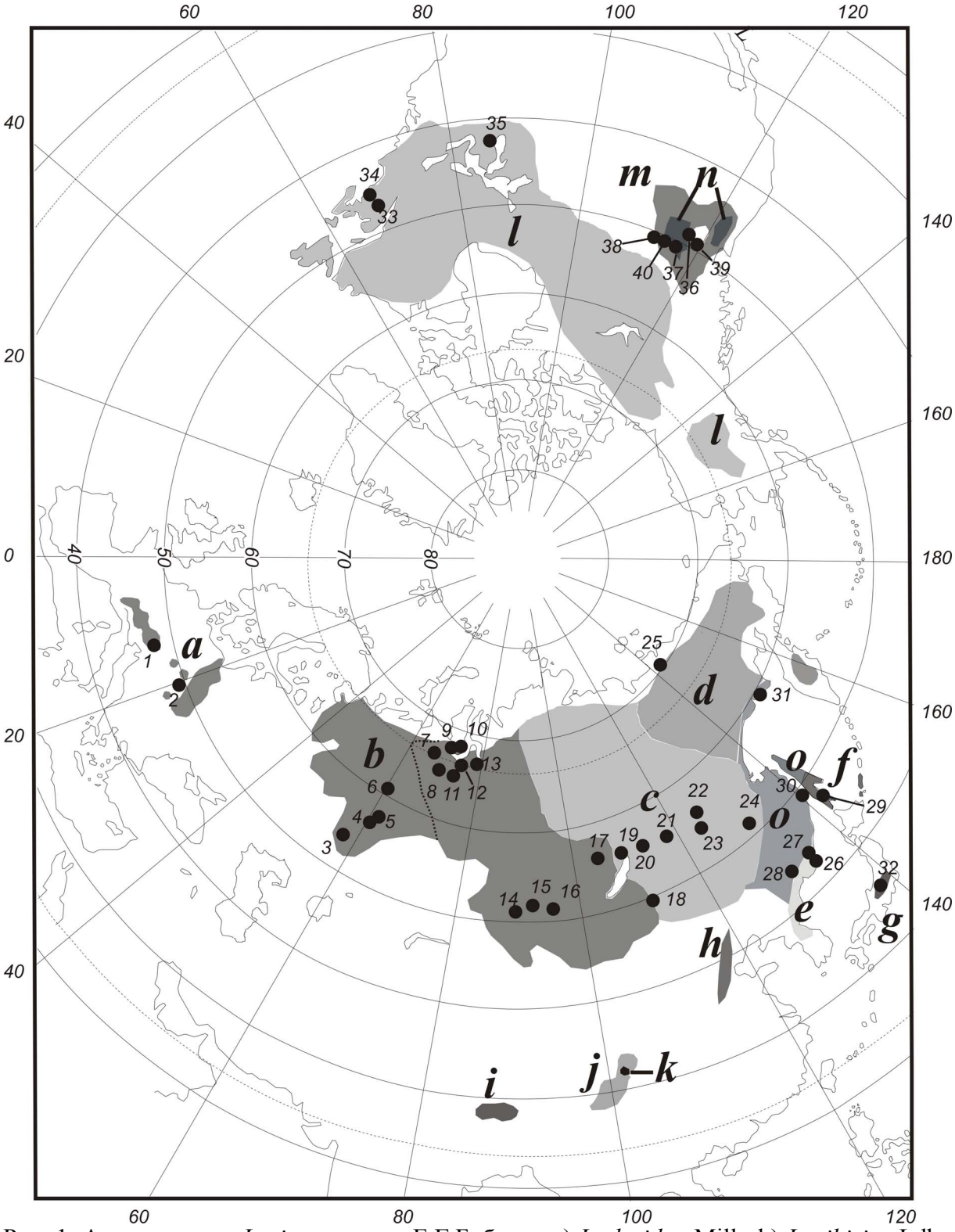

Рис. 1. Ареалы видов *Larix*, согласно Е.Г.Боброву a) *L. decidua* Mill.; b) *L. sibirica* Ldb.; c) *L. gmelinii* Rupr.; d) *L. cajanderi* Mayr; e) *L. olgensis* A.Henry; f) *L. kamtschatica* (Rupr.) Carr.; g) *L. leptolepis* Sieb. et Zucc.; h) *L. principis-rupprechtii* Mayr; i) *L. griffithiana* (Lindl. et Gord.) Carr.; j) *L. potaninii* Batal.; k) *L. mastersiana* Rehd. et Wils.; l) *L. laricina* (Du Roi) C. Koch; m) *L. occidentalis* Nutt.; n) *L. lyallii* Parl.; k) гибриды *L. gmelinii, L. cajanderi, L. olgensis* и *L. kamtschatica*. Пунктирной линией проведена примерная граница ареалов западной расы *L. sibirica* - (*L. sukaczewii* Dyl.) и восточной. Цифрами отмечены изученные популяции.

2.2. Геологическая история лиственниц. Самые ранние находки лиственниц были обнаружены в эоценовых отложениях острова Аксель-Хейберг в канадском арктическом архипелаге (LePage, Basinger, 1995) и в Айдахо (Axelrod, 1998; Erwin, Schorn, 2005). В олигоцене лиственница всё ещё редка. Она отмечалась на Камчатке (Гладенков и др., 1991), на Урале (Дорофеев, 1970) и в отложениях бух. Сизиман в Хабаровском крае (Блохина, 1985). В связи с активизацией орогенеза, в миоцене климатическая обстановка существенно изменилась. В умеренном поясе Северного Полушария неогеновое похолодание привело к сокращению обилия видов Taxodiaceae и началу господства Pinaceae (Толмачев, 1954; The Geobiology..., 2005). С миоцена *Larix* встречается во многих местах Северной Евразии, включая Западную Европу, Урал, Восточную Сибирь, Камчатку, Японию (Криштофович, 1934; Macko, 1957; Tanai, Onoe, 1961; Gaussen, 1966; Дорофеев, 1969,1970,1972; Ахметьев, 1973; Бобров, 1978; Блохина, 1984, 1985; Пименов, 1986, 1990; LePage, Basinger, 1995) и Северную Америку (Wolfe, 1964; Axelrod, 1964, 1991; Matthews, Ovenden,1990).

Изучение позднетретичных флор северо-востока Азии (Васьковский, 1959; Дорофеев, 1969) обнаружило их явное сходство с современными умеренными флорами Северной Америки и Японии, благодаря присутствию в них ряда американских и японских видов сосен, елей, тсуги, ореха серого. Лиственница, найденная среди этих экзотических видов, была определена как *L. omoloica* Dorof. = *L. occidentalis* Nutt. foss. – вид, ныне распространенный в горах запада Северной Америки. Это позволяет предполагать, что ещё в плиоцене сохранялись условия для миграций и генетических обменов между популяциями лиственниц Евразии и Северной Америки. Дальнейшее похолодание привело к разрыву единой зоны бореальных лесов и возникновению барьера между её азиатской и американской частями. Оценки времени дивергенции между родственными видами – представителями умеренной флоры Восточной Азии и Северной Америки, сделанные на основе последовательностей фрагментов хлоропластной ДНК (Timing..., 2000), варьируют от середины до конца третичного периода. Учитывая то обстоятельство, что лиственницы являются более холодостойкими растениями по сравнению с включенными в указанный обзор видами, можно полагать, что дивергенция американских и евроазиатских лиственниц произошла в конце третичного периода. С начала плейстоцена (Васьковский, 1959) лиственницы северо-востока Сибири уже имели облик, близкий современным сибирским видам.

Лиственница сибирская (или возможно её предок) присутствовала на северо-востоке Сибири до второго межледниковья, а в более позднее время там отмечалась только даурская (*L. gmelinii*) лиственница (Васьковский, 1959; Дылис, 1961). В своих публикациях Дылис (1947, 1959, 1961), отмечая палеонтологические свидетельства восточносибирского происхождения сибирской лиственницы и её последующего замещения лиственницей типа *L. gmelinii*, приводит данные по современной границе между этими двумя видами лиственниц. Он указывает на ряд фактов, свидетельствующих о прогрессирующем вытеснение даурской лиственницей лиственницы сибирской.

2.3. Фенотипическая изменчивость лиственниц. Изучение фенотипической изменчивости сибирских и дальневосточных видов лиственниц (Колесников, 1946; Дылис, 1947, 1959, 1961; Круклис, Милютин, 1977; Путенихин и др., 2004) выявило некоторые черты географической структуры популяций этих видов и позволило сформулировать ряд гипотез, касающихся истории, систематики, эволюции этих видов, гибридных процессов, происходящих в зонах контактов ареалов видов и долговременных трендов в их фитоценотических позициях.

Опираясь на огромный массив данных по изменчивости морфометрических признаков генеративных и вегетативных органов образцов лиственницы сибирской, собранных практически со всего ареала, Н.В.Дылис (1947) исследовал географические закономерности этой изменчивости. Была показана дифференциация сибирской лиственницы на западную (*L. sukaczewii*) и восточную (*L. sibirica*) географические расы и очерчены их границы (Дылис, 1947). Также на основе изучения пространственного распределения видоспецифических морфологических признаков была подробно исследована зона интрогрессивной гибридизации между даурской и сибирской лиственницами, и изучен характер изменчивости признаков внутри неё (Дылис, 1959; Круклис, Милютин, 1977).

Было изучено многообразие морфологических форм лиственниц Восточной Сибири и Дальнего Востока (Колесников, 1946; Дылис, 1961). Показано, что наибольшей величины оно достигает на юге Дальнего Востока и вдоль побережья Японского и Охотского морей. Эти работы, благодаря большому фактическому материалу, позволили описать границы распространения бесспорных видов – лиственниц даурской, ольгинской и камчатской, выявить внутривидовую структуру отдельных видов, высказать предположение о генетической самостоятельности лиственницы охотского побережья (Колесников, 1946), сформулировать гипотезу о роли интрогрессивной гибридизации в формировании структуры изменчивости дальневосточных лиственниц.

2.4. Изучение генетической изменчивости лиственниц с применением молекулярных и кариологических методов. Молекулярные исследования видов лиственниц с целью оценки генетической изменчивости, изучения популяционной структуры, гибридогенных процессов и филогенетических реконструкций проводились с конца 80-х годов в России и за рубежом.

Наиболее многочисленны были исследования аллозимного полиморфизма (Cheliak et al., 1988; Аллозимный полиморфизм..., 1989; Lewandowski, Mejnartowicz, 1991a, 1991c; Liu, Knowles, 1991; Ying, Morgenstern, 1991; Maier, 1992; Семериков, Матвеев, 1995; Study of natural..., 1995; Потенко, Разумов, 1996; Генетическая структура уральских..., 1998; Semerikov et al., 1999; Semerikov, Lascoux, 1999; Zhao et al., 2001; Путенихин и др., 2004; Ларионова и др., 2004; и др.). Относительно недавно для популяционно-генетических исследований лиственниц стали применяться методы, учитывающие изменчивость ДНК: RAPD (random amplified polymorphic DNAs – случайно амплифицированные изменчивые фрагменты ДНК) (Генетическая изменчивость..., 2004). Khasa et al. (Isolation… 2000) и Isoda, Watanabe (2006) разработали 14 и 19 ядерных микросателлитных маркеров для *L. kaempferi* (Lamb.) Sarg. и *L. lyallii*, соответственно. Ряд работ было направлено на изучение у видов лиственниц изменчи-

вости рибосомальной ДНК (Gernand, Liston, 1999; Wei et al., 2003; Wei, Wang, 2004a), изменчивости последовательностей гена 4-кумарат: коэнзим А лигаза (Wei, Wang, 2004b). Wei и Wang (2003) изучали филогенетические отношения видов *Larix* на основании сиквенса фрагмента trnT-trnF.

Глава 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Материалы и методы, использованные при изучении генетической изменчивости видов *Larix* с помощью аллозимного анализа. На Рис. 1. представлены изученные виды, число популяций и их местоположение. В 40 популяциях было проанализировано по 30-50 отдельных растений. Использовано 12 ферментных систем и идентифицировано 16 аллозимных локусов. Белки электрофоретически разделяли в полиакриламидном геле с использованием трис-ЭДТА-боратной буферной системе (pH 8.0). Данные анализировались с использованием программ BIOSIS-2 (Swofford, Selander, 1981), NTSYS-pc (Rohlf, 1998), GENEPOP(version 2; Raymond, Rousset 1995), Fstat (version 1.2; Goudet, 1995), PHYLIP (Felsenstein, 1993).

3.2. Материалы и методы, использованные при изучении генетической изменчивости *Larix* на видовом уровне с помощью анализа ДНК. Популяции видов *Larix* были представлены образцами хвои и семян (Рис. 2). Собранная хвоя первоначально хранилась в жидком азоте, а затем при -70°С. ДНК выделяли из 0.2-0.5g хвои в соответствии с протоколом (A genetic linkage map..., 1996), с небольшими модификациями. После измерения концентрации ДНК с помощью флуорометра (Hoefer DyNaQuant 200) были приготовлены образцы ДНК с концентрацией 10нг/мкл в буфере TE0.1. (10mM трис-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA).

3.2.1. Материалы и методы, использованные в анализе генетической изменчивости с помощью AFLP. Протокол AFLP (AFLP…, 1995) включал пять этапов: 1) Рестрикция ДНК двумя рестриктазами - *Eco*RI и *Mse*I с одновременным лигированием адаптеров. Адаптер Eco состоял из двух олигонуклеотидов: EI-ol.1 – CTCGTAGACTGCGTACC и EI-ol.2 AATTGGTACGCAGTC. Адаптер Mse состоял из MseI-ol.1 GACGATGAGTCCTGAG и MseI-ol.2 TACTCAGGACTCAT. 2) ПЦР амплификация получившихся фрагментов с помощью преселективных праймеров, несущих два селектирующих нуклеотида Eco-pre AGACTGCGTACCAATTC+AC и MseI-pre GATGAGTCCTGAGTAA+CC.

3) Амплификация разбавленных продуктов с помощью трёх пар селективных праймеров Eco+ACG, Mse+CCTC; Eco+ACG, Mse+CCAC; Eco+ACG, Mse+CCCA. Праймер Eco был радиоактивно меченым с помощью γ33P ATP.

4) Электрофоретическое разделение фрагментов в денатурирующем 6% полиакриламидном геле.

5) Радиоавтография геля. В результате интерпретации радиоавтографов была получена матрица бинарных признаков присутствия-отсутствия фрагментов у каждого индивидуума размером 188 фрагментов на 361 индивидуум. Дальнейший анализ проводился с помощью программы GenAlEx 6 (Peakall,

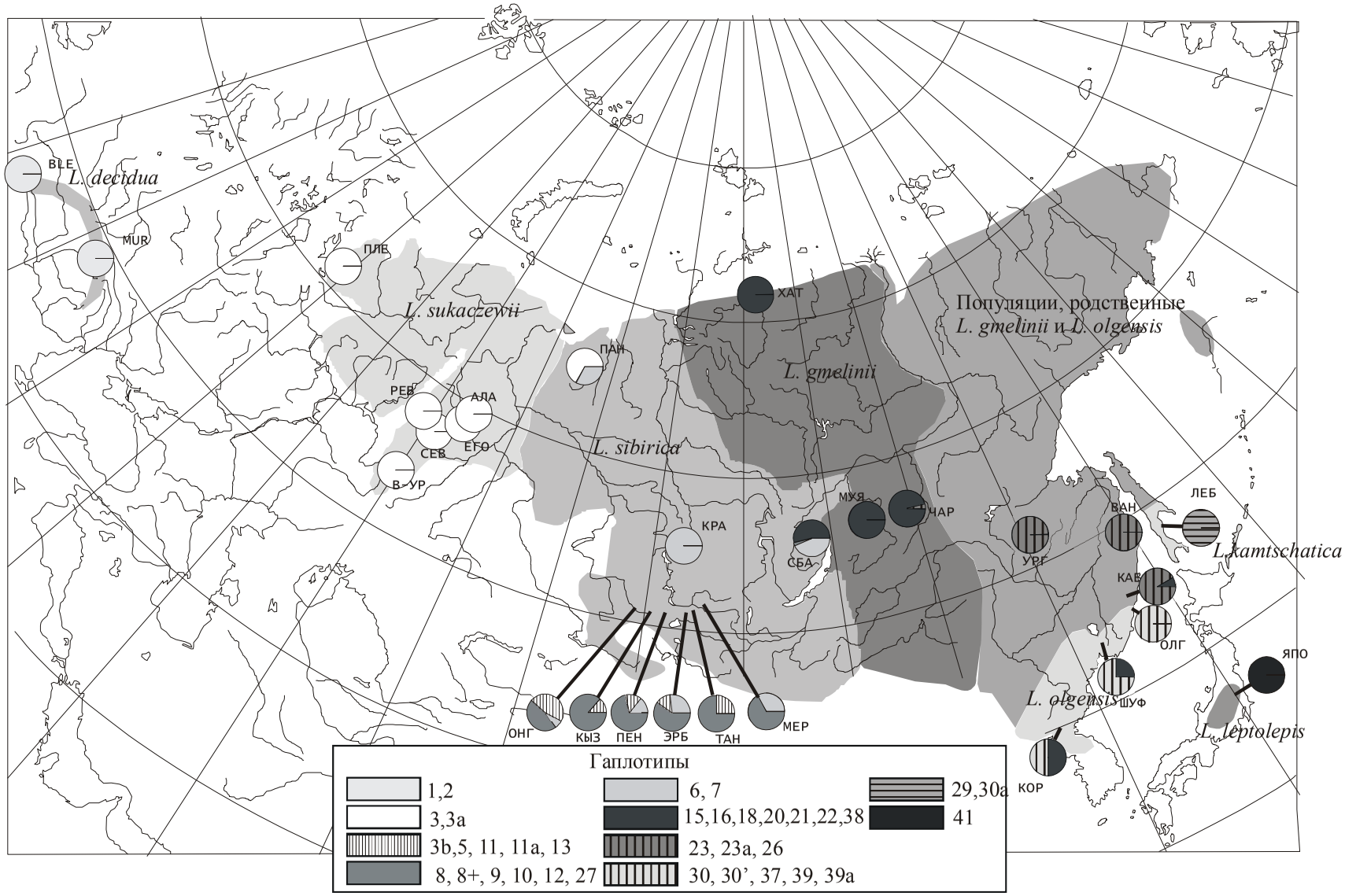

Рис. 2. Ареалы видов *Larix* в Северной Евразии и расположение выборок, изученных с помощью AFLP, хлоропластных микросателлитных локусов и маркеров митохондриальной ДНК, основанных на методике ПДРФ-Саузерн-блот (шесть комбинаций проба/энзим) и методике ПЦР-ПДРФ (три ПЦР фрагмента). Представлены также частоты митохондриальных гаплотипов в популяциях (круговые диаграммы)

Smouse, 2005), NTSYS-pc v. 2.02h (Rohlf, 1998) и PHYLIP (ver. 3.6. http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html, Felsenstein, 1993). Для популяционных сравнений применялся PCA, использующий генетические дистанции *D* (Nei, 1972), вычисленные на основании частот фрагментов в популяциях. Использовалась также кластеризация популяций с помощью метода невзвешенных парно-групповых средних (UPGMA).

3.2.2. Материалы и методы, использованные в анализе изменчивости хлоропластной ДНК с помощью микросателлитных локусов. Были оценены возможности амплификации и полиморфизм у *Larix* для следующих пар праймеров хлоропластных микросателлитных локусов: Pt9383, Pt15169, Pt26081, Pt30204, Pt36480, Pt41093, Pt45002, Pt48210, Pt51873, Pt63718, Pt71936, Pt87268 и Pt110048, разработанных на основе полного сиквенса хлоропластного генома сосны Тунберга (*Pinus thunbergii*) (A set of primers..., 1996). Изменчивыми и устойчиво амплифицируемыми были признаны Pt9383, Pt26081 и Pt30204. Продукты ПЦР-амплификации микросателлитных фрагментов разделялись в 6% полиакриламидном денатурирующем геле и выявлялись посредством серебряного окрашивания.

Четвертый микросателлитный локус был получен путем разделения на полиакриламидном геле и серебряного окрашивания продукта рестриктной реакции с помощью рестриктазы *Hpa*II фрагмента trnL-trnV (Parducci, Szmidt, 1999). Микросателлит содержался в одном из рестриктных фрагментов.

При интерпретации размерных вариантов микросателлитов наиболее короткому из фрагментов присваивался номер 1, фрагменту длиннее на один нуклеотид – номер 2, и т.д. Каждая комбинация вариантов размеров четырёх анализируемых микросателлитов интерпретировалась как гаплотип.

Статистическая обработка полученных результатов анализа осуществлялась с использованием пакета программ Arlequine 2.000 (Shneider et al., 2000). Для каждой популяции вычислялись число гаплотипов и параметр внутрипопуляционной изменчивости $H = \frac{n}{n-1}\left(1 - \sum_{i=1}^{k} p_i^2\right)$, где n – размер выборки, k – число гаплотипов, и p_i - частота i-го гаплотипа в популяции (Nei, 1987). Анализ молекулярной вариации AMOVA (Weir, Cockerham, 1984) использовался для изучения распределения суммарной генетической изменчивости по иерархическим уровням: F_{IS} – внутрипопуляционная изменчивость, F_{ST} – межпопуляционная изменчивость, F_{SC} – компонента изменчивости, связанная с различием популяций внутри априорно сформированных групп (в данном случае – таксонов), F_{CT} – компонента изменчивости, связанная с межгрупповыми различиями (различиями между таксонами). Статистическая значимость индексов фиксации оценивалась с помощью непараметрического подхода (Excoffier et al., 1992).

При вычислении *F*-статистик помимо частот гаплотипов учитывалось генетическое расстояние между гаплотипами, в качестве меры которой использовалась сумма квадратов разниц в числе повторов по всем четырем микросателлитам (Slatkin, 1995). Информация о числе повторов также использовалась для вычисления парных R_{ST}. Парные F_{ST} использовались в качестве межпопуляционных генетических дистанций. На их основе осуществлялась ординация попу-

ляций посредством анализа главных координат (PCA) с использованием NTSYS-pc (Rohlf, 1998).

3.2.3. Методы, использованные в анализе изменчивости митохондриальной ДНК с помощью методик Саузерн-блот и ПЦР-ПДРФ. Порции по 3-5мкг ДНК расщеплялись по отдельности рестриктазами *Eco*RV, *Bam*HI, *Hind* III and *Dra* I согласно протоколу производителя (Fermentas). Рестриктные фрагменты разделялись при 1.5V/cm в 0.8% агарозном геле в течение 12 часов в 1X буфере TAE. После электрофореза ДНК переносилась на нейлоновую мембрану HybondN+ с помощью щелочного метода. Пробы (зонды) митохондриальной ДНК готовились посредством ПЦР из геномной ДНК *Larix* с использованием пар «универсальных» праймеров. Они включали: второй интрон гена NAD1 (nad1(B-C)), (Demesure et al., 1995), третий интрон гена NAD4 (nad4(3c-4r)), первый и четвертый интроны гена NAD5 (nad5(1-2) и nad5(4-5)) (Dumolin-Lapègue et al., 1997), кодирующие последовательности генов COXI и COXIII (Tsumura, Suyama, 1998), ATP1, ATP6, COB, NAD3 и RPS14 (Wu et al., 1998).После гибридизации с меченной ^{32}P пробой мембраны экспозировались с рентгеновской пленкой для получения радиоавтографа.

В качестве дополнительных митохондриальных маркеров были использованы два митохондриальных генных интрона, ПЦР - амплифицируемых посредством «универсальных» праймеров - nad5(1-2) (Universal primers..., 1991) и nad4(3c-4r) (Dumolin-Lapégue et al., 1997), и маркер UBC460 (RAPD-derived..., 2006).

3.2.4. Материалы и методы, использованные при изучении структуры популяций лиственницы сибирской с помощью анализа изменчивости митохондриальной ДНК (посредством вновь разработанных маркеров). Выборки 3-30 растений были проанализированы в 99 популяциях лиственницы сибирской и гибридов лиственниц сибирской и даурской. Для сравнения взяты две популяции лиственницы европейской (*L. decidua*). Материал происходил из нескольких источников: из коллекций, использованных при изучении изменчивости видов *Larix* с помощью AFLP, хлоропластных микросателлитов и маркеров митохондриальной ДНК, а также из географических культур Воронежского лесотехнического университета (Дерюжкин, 1970), из географических культур стационара «Погорельский Бор» Института Леса СО РАН (Ирошников, 1977), а также из сборов в природных популяциях (Рис. 3). Для разработки маркеров митохондриальной ДНК у *Larix* (RAPD-derived..., 2006), основанных на ПЦР, было использовано то обстоятельство, что эксперименты с RAPD (случайно амплифицируемые изменчивые фрагменты ДНК) часто дают фрагменты митохондриального происхождения (Mitochondrial DNA..., 1995). Мы учитывали корреляцию между RAPD –фенотипами и основанными на методе Саузерн-блот митохондриальными генотипами (Глава 4) деревьев лиственницы в гибридной популяции «Северобайкальск». По результатам анализа отбирались фрагменты, присутствующие в продукте ПЦР особей, имеющих гаплотип *L. sibirica*, и отсутствующие у особей с гаплотипом *L. gmelinii*, или наоборот. Было отобрано четыре RAPD праймера, продуцирующих такие фрагменты: UBC460, OPB11, OPC8 и OPR11. Фрагменты были клонированы и секвенированы. Далее

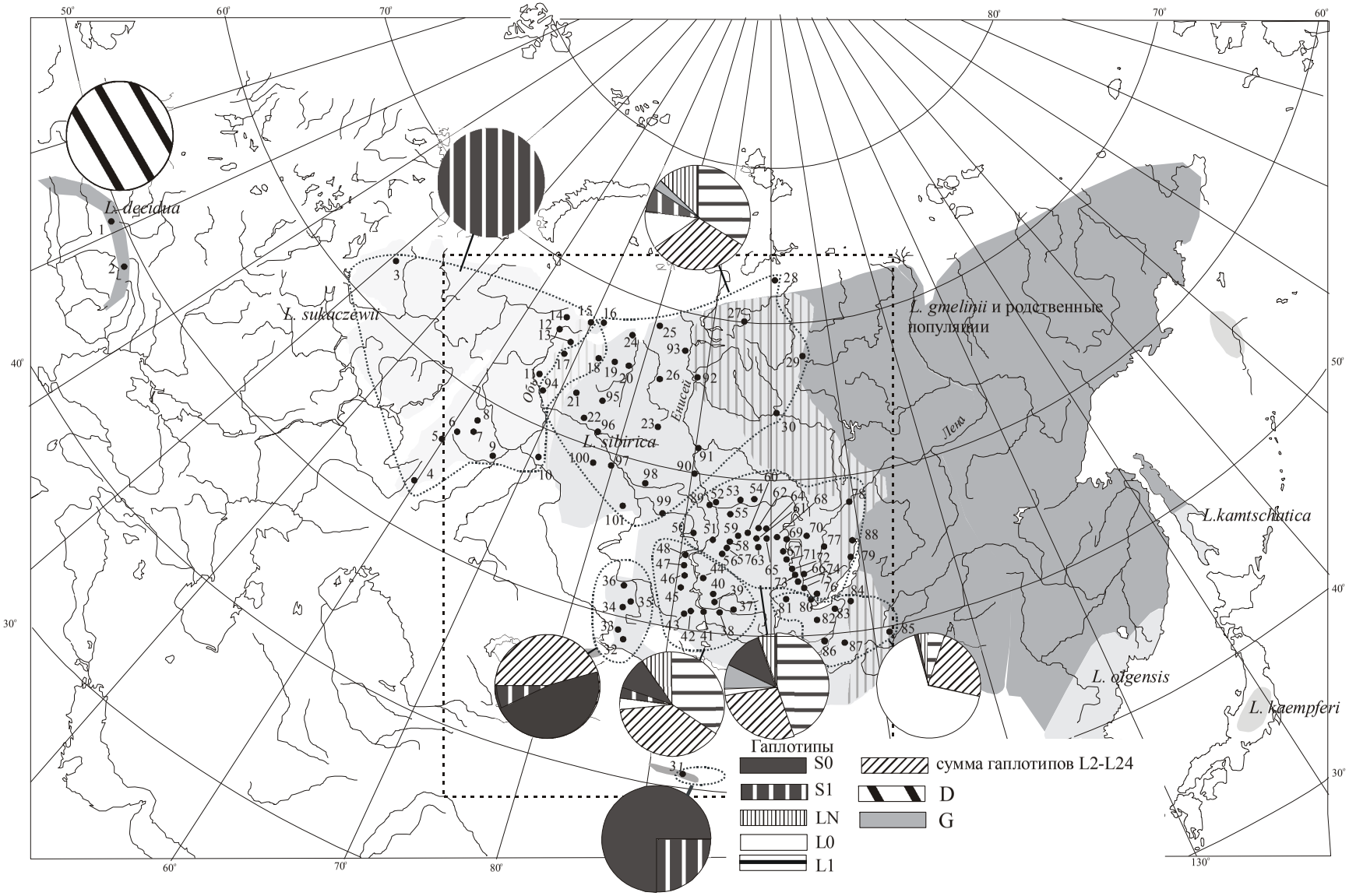

Рис. 3. Ареалы видов *Larix*, расположение проанализированных выборок и частоты митохондриальных гаплотипов в выделенных пунктирной линией районах (указаны в виде круговых диаграмм). Штриховой заливкой обозначена предполагаемая зона интрогрессивной гибридизации (*L. sibirica* x *L. gmelinii*) и зона контакта западной и восточной расы *L. sibirica.* Прямоугольником обозначен район, представленный на Рис. 10.

с помощью метода обратной ПЦР (Sambrook et al., 1989) были охарактеризованы их фланкирующие области и разработаны новые, специфичные праймеры, позволяющие амплифицировать более длинные изменчивые участки митохондриальныой ДНК: UBC460 (5'- AACCTAGAGCCAACAGCAGCACCT-3' и 5'-CCCAACTTCCTCGAAAGCAGATG-3'), R11 (5'-CATCCCGTCGCTTGTTTAAT-3' и 5'-CCGGTTGGCACCTAAATAGA-3'), C8 (5'-GGATCGTAGCGTGGGAACTA-3' и 5'-AGGGAACTTGTGAACGTTGG-3'). Кроме вновь разработанных, в последующем анализе применялись два митохондриальных маркера nad5(1-2) и nad4(3c-4r) (Dumolin-Lapegue et al., 1997).

Изучение пространственной структуры изменчивости mtDNA лиственницы в пределах ценопопуляции проводилось на трансекте из 57 деревьев с расстоянием около 50 м одно от другого, заложенной вблизи пос. Туруханск.

3.3 Материалы и методы, использованные в анализе филогении видов *Larix*. Хвоя и семена были собраны у большинства видов *Larix* (Рис. 1) и у *Pseudotsuga menziesii*. Двадцать четыре фрагмента хлоропластной ДНК амплифицировались с использованием десяти опубликованных универсальных хлоропластных праймеров (Universal primers..., 1991; Démesure et al., 1995; Dumolin-Lapégue et al., 1997; Parducci, Szmidt, 1999). Кроме того, 14 пар праймеров были разработаны заново на основе опубликованной полной последовательности хлоропластных геномов сосны Тунберга (Loss of all ndh genes..., 1994), или созданы путем модификации существующих праймеров, взятых из работ: Demesure et al., (1995), Morton, Clegg, (1993), или неопубликованных, взятых с сайта http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/cpdna.html). Последовательности праймеров и детали режима ПЦР указаны в Табл. 1. От 7 до 10 рестриктаз (из списка: *Alu*I, *Hae*III, *Hinf*I, *Hpa*II, *Mbo*I, *Rsa*I, *Sf13I*, *Asp*LEI, *Asp*S9I, *Mse*I, *Taq*I) было использовано для анализа каждого из ПЦР фрагментов. Продукты рестрикции разделялись в 6% полиакриламидном денатурирующем геле в течение 5000 вольт-часов с последующим «серебряным окрашиванием».

Хлоропластные данные анализировались с помощью программы PHYLIP 3.63 (Felsenstein, 2004) и методов MP и NJ.

Для анализа AFLP, использованного в филогенетическом исследовании, было взято 6 комбинаций селективных праймеров: *Eco* ACG × *Mse* CCTC, CCAC, CCGC, CCCA, CCTG, CCAG. AFLP данные были представлены в виде матрицы присутствия/отсутствия (1/0) и далее анализировались с помощью программы Treecon (Van de Peer, De Wachter, 1994). Для всех пар проанализированных индивидов вычислялась генетическая дистанция (Genetic diversity…, 1995) $GDxy = \frac{N_x + N_y}{N_x + N_y + N_{xy}}$, где N_x –число «бэндов», имеющихся у индивидума *x*, но отсутствующих у индивидуума *y*, N_y – то же самое для индивида *y*, и N_{xy} – число бэндов, общих для обоих индивидов. Для построения дерева использовался метод NJ, а статистическая поддержка оценивалась с помощью "bootstrap" и 1000 репликаций матрицы данных.

Таблица 1.

Фрагменты хлоропластной ДНК, использованные для филогенетического исследования *Larix*. Приведены: положение праймеров в хлоропластном геноме *P. thunbergii*; кодирующая область, в которой расположен сайт праймера; последовательность праймера; предполагаемый размер фрагмента; температура отжига °C.

Фрагмент хлоропл. ДНК	Прай-мер	Положение праймера в послед. хлоропл. генома *P. thunbergii*	Коди-рующая послед.	Последовательность праймера	Раз-мер фраг-мента	T_{ann} °C
1	2	3	*4*	5	6	7
TF[4]	1	69214	*trn*T	CATTACAAATGCGATGCTCT	1476	45
	2	67738	*trn*F	ATTTGAACTGGTGACACGAG		
KQ[5]	1	4043	*trn* K2	TAAAAGCCGAGTACTCTACCGTTG	2590	46
	2	6633	*trn*Q	CTATTCGGAGGTTCGAATCCTTCC		
K1K2[1]	1	1507	*trn*K	GGGTTGCCCGGGACTCGAAC	2559	60
	2	4066	*trn*K	CAACGGTAGAGTACTCGGCTTTTA		
DC[1]	1	26429	*trn*C	CCAGTTCAAATCTGGGTGTC	2042	56
	2	28471	*trn*D	GGGATTGTAGTTCAATTGGT		
LV[6]	1	106059	*trn*L	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	2333	50
	2	108292	*trn*V	TTGACATGGTGGAAGTCATCA		
rpl20trnW[6]	1	31301	*rpl*20	TTTTCGAACTGCTAACCAACG	2190	49
	2	33491	*trn*W	ACCTACGGCATCAGGTTTTG		
psbD16S[6]	1	82479	*psb*D	CCACAAAAACGAAACGGTCT	2083	49
	2	84562	16S	ACTAACTAATCAGACGCGAGCC		
rpoC1[6]	1	20022	*rpo*C1	TCGATTGAAACGAGTACGACC	2853	49
	2	22875	*rpo*B	CACTGGAGGGCCAATACCTA		
CS[1]	1	81491	*psb*C	GGTCGTGACCAAGAAACCAC	1560	56
	2	79931	*trn*S	GGTTCGAATCCCTCTCTCTC		
ST[1]	1	70465	*trn*S	CGAGGGTTCGAATCCCTCTC	1270	54
	2	69195	*trn*T	AGAGCATCGCATTTGTAATG		
RF	1	9880	*trn*R	GCGTCCATCGTCTAATGGAT	2075	55
	2	11954	*atp*F	GGAAATGATAGCGGACGAAA		
FI	1	11802	*atp*F	TGGTCAAATGCTCTTTGCTG	2837	59
	2	14638	*atp*I	CAGGTGCTCTTCTTCCTTGG		
IC2	1	14619	*atp*I	CCAAGGAAGAAGAGCACCTG	2604	55
	2	17222	*rpo*C2	TGCAGGAACATCATTTCCAA		
WF	1	33476	trnW	ACCTGATGCCGTAGGTTCAA	2136	55
	2	35611	*psb*F	AACGGCCAACCATCTAACTG		
FA	1	35642	*psb*F	TTGGGATCAATATCGGCAAT	2287	55
	2	37928	*pet*A	TGCACAGCAGGGTTATGAAA		
Aorf184	1	37910	*pet*A	TTCATAACCCTGCTGTGCAA	1871	55
	2	39780	ORF184	GAACAGAAAGCCGCTGAATC		
IF	1	65940	*trn*I	CATCCAGCAGGAATTGAACC	1857	55
	2	67796	*trn*F	CCGGGATAGCTCAGTTGGTA		
16SA	1	85756	16S RNA	GAAGGCTGGGCTAGTGACTG	2446	62
	2	88201	*trn*A	GAGATAAGCGGACTCGAACC		
4.5SChiL	1	91331	4.5S RNA	GGCATCCTAACAGACCGAGA	1988	55

Продолжение таблицы 1

1	2	3	*4*	5	6	7
	2	93318	chiL	AAACCTCCACAGACCACGTC		
HK[1]	1	119000	*trn*H	ACGGGAATTGAACCCGCGCG	1614	50
	2	1521	*trn*K	CCGACGAGCTCCGGGTTCGA		
QR[2]	1	6605	*trn*Q	GGGACGGAAGGATTCGAACC	3349	59
	2	9932	*trn*R	ATTACGTCCAATAGGATTTGAA		
rbcLV[2]	1	44448	*rbc*L	GCTTTAGTCTCTGTTT**T**TGG	3585	55
	2	48013	*trn*V	CGAACCGTAGACCTTCTCGG		
IL[3]	1	40826	*psa*I	GTAATTGCCGGAAGTAATAAGC	2445	59
	2	43239	*rbc*L	TTTGGTGGGGGAACTTTGGGACAT CCTTGGGG		
CT[2]	1	80627	*psb*C	GAGCTTGAGAGGCTTCTGGG	3313	59
	2	83920	*trn*T	GCCCTTTTAACTCAGTGGTA		

[1] Demesure et al., 1995; [2] неопубликовано; [3] Morton, Clegg, 1993; [4] Universal primers..., 1991; [5]Dumolin-Lapegue et al., 1997; [6] Parducci, Szmidt, 1999

Глава 4. ВНУТРИ – И МЕЖВИДОВАЯ СТРУКТУРА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ЯДЕРНОГО, ХЛОРОПЛАСТНОГО И МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМОВ ЛИСТВЕННИЦ СЕВЕРНОЙ ЕВРАЗИИ И СЕВЕРНОЙ АМЕРИКИ, ЕЁ СВЯЗЬ С ПРОШЛОЙ И СОВРЕМЕННОЙ ДИНАМИКОЙ ПОПУЛЯЦИЙ

4.1. Структура изменчивости ядерных кодоминантных маркеров (аллозимные локусы) видов *Larix*. Имеется тенденция к снижению генетической изменчивости у видов, имеющих ограниченные ареалы, таких, как лиственницы ольгинская и субальпийская (*L. lyallii*) (H_{exp} =0.088 и 0.094, соответственно), хотя вид, также имеющий ограниченный ареал – лиственница европейская - имела одни из наивысших значений этих параметров: ожидаемая гетерозиготность в двух популяциях была H_{exp} =0.134 и 0.194, соответственно. В то же время *L. laricina*, хотя и имеет один из наибольших среди изученных лиственниц размер ареала, тем не менее, характеризуется весьма невысокой изменчивостью (H_{exp} = 0.048-0.100).

Довольно сходные значения параметров полиморфизма (среднее число аллелей, процент полиморфных локусов, наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности) обнаружены у евроазиатских видов и американской *L. occidentalis* (Табл. 2).

Статистически значимый недостаток гетерозигот (P<0.05) найден в локусах *G6pdh, Skdh, Pgm-A, Pgm-B, Sod-A* и *F-Est* (глобальный тест по всем популяциям). Избыток гетерозигот при этом не обнаружен ни в одном локусе. Обобщенные тесты по всем локусам также обнаружили недостаток гетерозигот во многих популяциях. Ясно выражены межвидовые различия в уровне межпопуляционной дифференциации: большие значения F_{ST} обнаружены у *L. occidentalis* и у *L. sibirica* в широком смысле (0.100 и 0.079), и гораздо меньшие у *L. laricina, L. sukaczewii* и *L. gmelinii* (0.026, 0.039 и 0.021 соответственно). UPGMA – дендрограмма (Рис. 4), построенная на основе частот аллелей выборок североевроазиатских лиственниц, иллюстрирует

сходство между ними. Наиболее дивергировавшими таксонами являются лиственницы японская (*L. leptolepis*), европейская и камчатская. Оставшиеся выборки разбиваются на ряд групп:

- западные выборки лиственницы сибирской
- восточные выборки лиственницы сибирской
- выборки лиственницы ольгинской и другие выборки континентальной части юга Дальнего Востока
- выборки даурской лиственницы
- выборка окрестностей г. Магадана

Сходство популяций лиственницы сибирской севера Западной Сибири с популяциями юга Сибири и сходство популяций Полярного Урала и Нижней

Таблица 2.

Средний размер выборки на локус, среднее число аллелей на локус (*A*), доля полиморфных локусов (*P*), наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности (H_{obs} и H_{exp}) в 14 таксонах (40 популяций) *Larix*, проанализированых по локусам *Got-A, Got-B, Dia, Pgi-A, Pgi-B, G6pdh, 6-Pgd, Skdh, Pgm-A Pgm-B, Sod-A, Sod-B, Est-F, Idh, Gdh,* за исключением *L. laricina*, для которой отсутствуют данные по *G6pdh*. У *L. laricina, L. occidentalis и L. lyallii* дополнительно проанализирован *Fdh*.

Таксоны	Колич. выбор.	Средние значения				
		Объем выборки	*A*	*P**	H_{obs}	H_{exp}*
L. decidua	2	58.8	2.2	53.3	0.157	0.164
L. sukaczewii	7	51.5	1.9	60.0	0.151	0.161
L. sibirica	8	45.8	2.0	64.2	0.149	0.158
L. x *czekanovskii*	1	32.6	2.1	73.3	0.147	0.167
L. gmelinii	6	46.8	2.2	65.6	0.154	0.158
L. cajanderi	1	34.8	2.0	53.3	0.126	0.120
L. olgensis	3	49.3	1.8	55.6	0.099	0.098
L. kamtchatica	1	49.8	1.8	73.3	0.160	0.160
L. amurensis	1	44.4	2.3	66.7	0.160	0.178
L. ochotensis	1	47.6	2.1	66.7	0.155	0.181
L. leptolepis	1	50.8	1.8	53.3	0.117	0.133
L. laricina	3	40.6	1.6	40.0	0.076	0.076
L. occidentalis	4	46.0	1.6	43.8	0.124	0.150
L. lyallii	1	29.0	1.4	37.5	0.082	0.094

* локус считается полиморфным, если обнаружено более одного аллеля.
** Ожидаемая гетерозиготность при условии соблюдения Харди-Вайнберга. Несмещенные оценки (Nei, 1987)

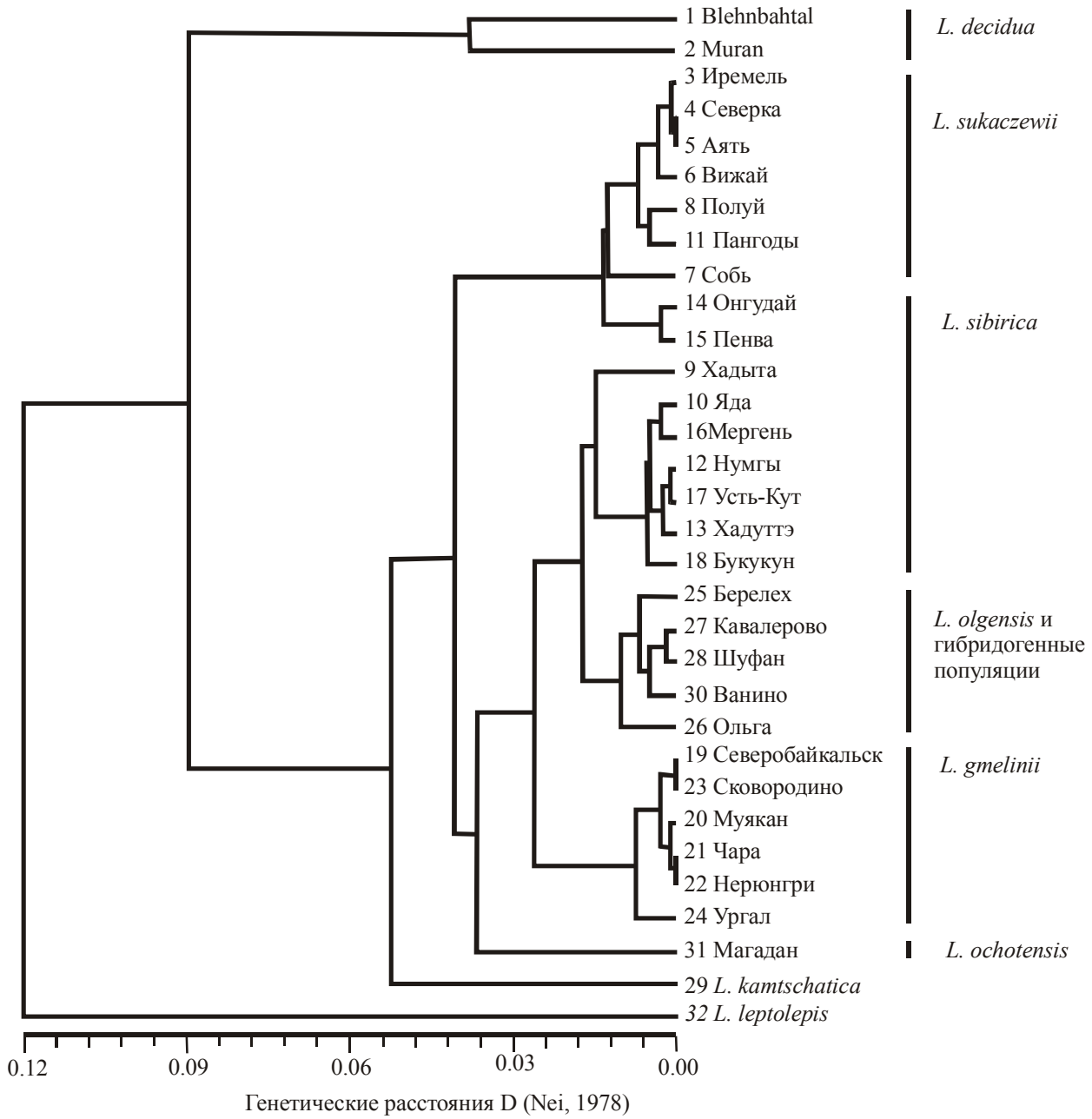

Рис. 4. UPGMA дендрограмма 32 евроазиатских популяций *Larix,* полученная на основании частот аллелей 15 аллозимных локусов и генетических расстояний Неи, D (Nei, 1987).

Оби с популяциями Среднего и Южного Урала, выявляемое по всем типам генетических маркеров, указывает на преобладание миграций юг - север (вероятно, происходивших в послеледниковое время) над миграциями восток - запад, имевших место значительно раньше.

Эти результаты подтверждают выводы Н.В.Дылиса о диффренциации сибирской лиственницы на два таксона – лиственницу Сукачева и лиственницу сибирскую. Подтверждается также генетическая индивидуальность ольгинской лиственницы, а также чрезвычайная близость к ней других дальневосточных популяций, за исключением популяций юга Сахалина (лиственница камчатская) и лиственницы охотского побережья (лиственница охотская в терминах Б.П.Колесникова).

Ординация изученных выборок с помощью **PCA** (Рис. 5) дополняет эти выводы:

- популяции 8, 9, 11 (Полуй, Хадыта и Пангоды) имеют промежуточные значения частот, что свидетельствует об их гибридном происхождении
- популяция 18 (Букукун) является гибридом лиственниц сибирской и даурской, что подтверждается её промежуточным положением на скаттерплоте
- поп. 14 и 15 (Алтай и Западная Тува) тяготеют к лиственнице Сукачева
- поп. 25 и 30 (Индигирка и порт Ванино) являются промежуточными между даурской и ольгинской лиственницами. Это подтверждает выводы, сделанные Колесниковым, Дылисом и Бобровым на основе изучения изменчивости морфологических признаков, что на Дальнем Востоке располагается обширная зона интрогрессивной гибридизации лиственниц ольгинской и даурской.

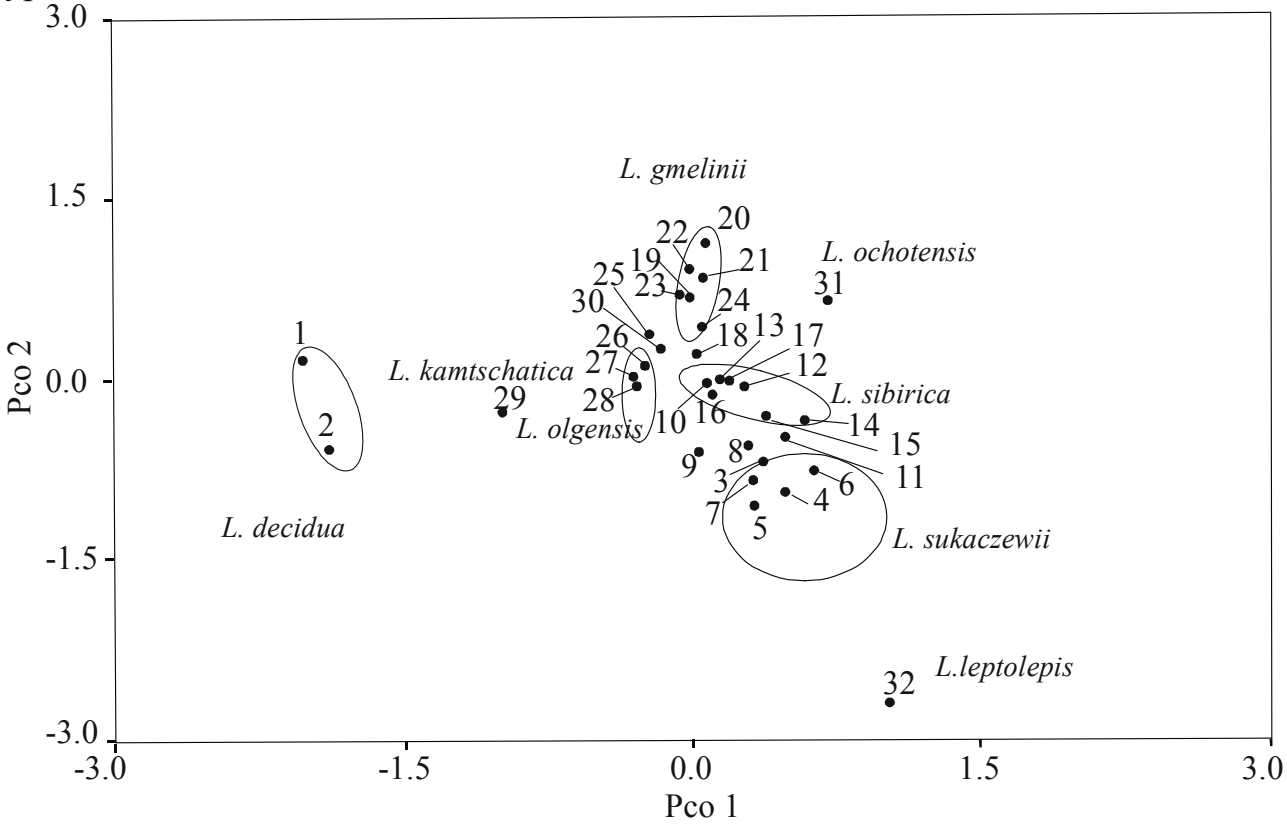

Рис. 5 Ординация 32 популяций *Larix*, построенная с помощью многомерного шкалирования и матрицы генетических расстояний D (см. текст). Номера популяций соответствуют указанным на рис. 1.

Значительное сходство между собой популяций континентальной части Дальнего Востока заставляет считать, что выделение множества морфологических форм на Дальнем Востоке в качестве отдельных видов является чрезмерным, и можно признать оправданным выделение в качестве видов лиственниц ольгинской, камчатской, охотской и даурской.

Генетические различия между *L. ochotensis* (Магадан) и группой таксонов *L. olgensis*, *L. gmelinii*, *L. cajanderi* определяются главным образом разницей в частоте единственного аллеля (*Pgi-B* ^{79}) (50% в популяции Магадана (№ 31) и менее 13% во всех других популяциях), что позволяет предполагать близкое родство *L. ochotensis* с указанной группой. Как иллюстрирует дендрограмма UPGMA (Рис. 4) и ординация с помощью многомерного шкалирования (Рис. 5), оценки генетических дистанций Неи и выводы классической систематики (Бобров, 1972) приводят к сходным выводам относительно близкого родства дальневосточных видов. И, наконец, генетические различия между сахалинской *L. kamtschatica* и японской *L. leptolepis* оказались значительно больше, чем между *L. kamtschatica* и континентальными таксонами *L. cajanderi*, *L. ochotensis* и *L. amurensis* (Рис. 5), подтверждая более существенное генетическое влияние на сахалинские популяции генетических потоков континентального происхождения по сравнению с возможным влиянием японской лиственницы.

4.2. Анализ генетической изменчивости видов *Larix* с помощью маркеров AFLP. Было проанализировано 29 популяций: 2 популяции *L. decidua*, 6 популяций *L. sukaczewii*, 9 популяций *L. sibirica,* 1 популяция гибридов *L. sibirica* x *L. gmelinii,* 4 популяции *L. gmelinii,* 1 популяция *L. amurensis,* 1 популяция *L. kamtschatica ,* 4 популяции *L. olgensis,* 1 популяция *L. leptolepis.* Из 188 фрагментов AFLP 175 были полиморфны. Распределение выборок в пространстве трёх главных координат**,** полученное на основе частот фрагментов и генетических дистанций Nei (1978) (Рис. 6), отражает их видовую принадлежность. Основные таксоны отчётливо разделяются между собой: *L. sukaczewii, L. sibirica, L. decidua;* и группа восточно-сибирских и дальневосточных популяций (*L. gmelinii, L. olgensis, L. kamtschatica* и *L. amurensis* в совокупности) и *L. leptolepis.*

Популяция Пангоды занимает промежуточное положение между *L. sukaczewii* и *L. sibirica*. Аналогично, популяция Северобайкальск, хотя и находится в восточно-сибирской группе, однако имеет отчетливое уклонение в направлении кластера *L. sibirica*. Как и в случае аллозимных данных, эти результаты отражают принадлежность указанных популяций к зонам вторичного контакта лиственниц Сукачева - сибирской и сибирской – даурской соответственно. UPGMA – дендрограмма (Рис. 7) указывает на наличие естественных групп: *L. sibirica– L. sukaczewii,* и видов Восточной Сибири и русского Дальнего Востока, что, хотя частично и противоречит аллозимным данным, но более объяснимо с точки зрения географического расположения видов. Неожиданным, в сравнении с аллозимными данными, представляется также базальное положение *L. sibirica – L. sukaczewii* в отношении группы, образованной *L. leptolepis* и другими дальневосточными таксонами. С высокой статистической поддержкой (94%) континентальные популяции образуют монофилетическую группу (*L. amurensis, L. gmelinii, L. olgensis*), однако *L. gmelinii* и *L. olgensis* являются парафилетичными в отношении друг к другу. Популяция *L. olgensis* Кавалерово входит в группу, сформированную в основном популяциями даурской лиственницы, что можно рассматривать как

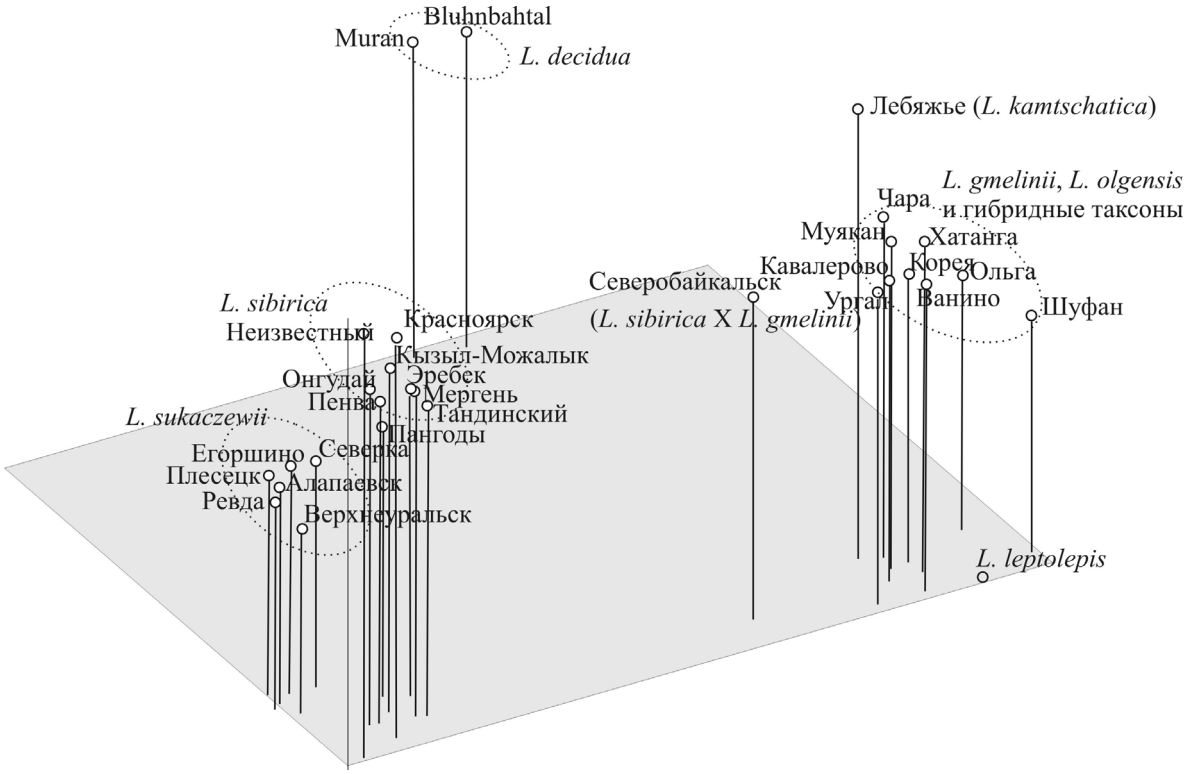

Рис. 6 Ординация изученных популяций *Larix* с помощью генетических дистанций M.Nei, 1978, вычисленных на основании частот аллелей AFLP локусов и анализа главных координат.

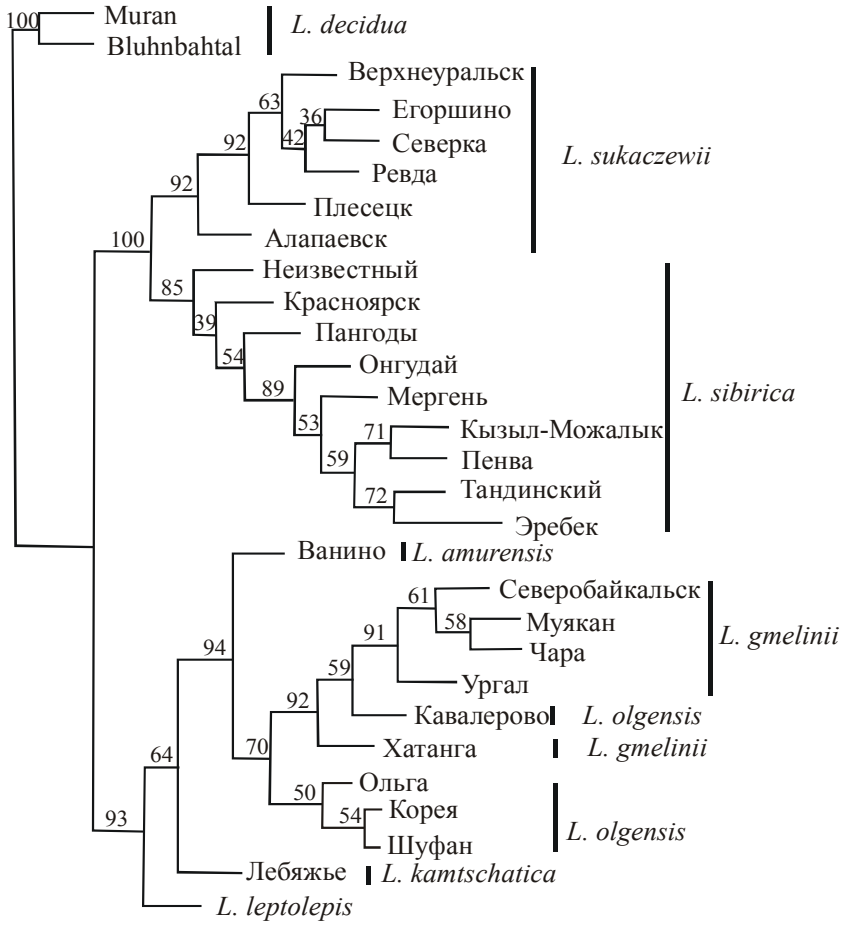

Рис. 7 Консенсус-дерево, созданное на основе 1000 UPGMA дендрограмм, построенных для 1000 “бутстрап” репликаций матрицы частот аллелей 188 AFLP фрагментов. Числа при точках ветвления указывают на статистическую поддержку данного кластера.

свидетельство гибридного влияния на популяцию Кавалерово даурской лиственницы. Популяционные сравнения, основанные на частотах фрагментов (Рис. 7), указывают на наличие комплекса слабо дифференцированных популяций лиственниц даурской и ольгинской. Наметившееся обособление кластера *L. olgensis* (популяции Ольга и Шуфан) и кластера западной расы даурской лиственницы («Муякан», «Чара», «Хатанга») может быть интерпретировано либо как указание на процесс дивергентного видообразования, либо как признак вторичного контакта и гибридного поглощения одного из видов. Ординация популяций *Larix* подтверждает генетическую самостоятельность сахалинской *L. kamtschatica*, и её более близкое родство с группой *L. gmelinii* – *L. olgensis* по сравнению с японской *L. leptolepis*.

4.3. Результаты изучения изменчивости хлоропластной ДНК с помощью микросателлитных локусов. Двадцать девять популяций *Larix* были проанализированы с помощью четырёх микросателлитных локусов. Генетическая изменчивость была весьма неравномерно распределена по популяциям. Большинство популяций изученных видов лиственниц характеризуются высоким уровнем внутрипопуляционной изменчивости в хлоропластных микросателлитных фрагментах, варьирующим от 0.42 до 1.00. Исключение составляют две популяции – Muran (*L. decidua*) из Словакии (H=0.00) и популяция японской лиственницы *L. leptolepis* (H=0.25). Низкая изменчивость, вероятно, обусловлена небольшим размером и, в целом, маргинальным характером ареалов этих видов.

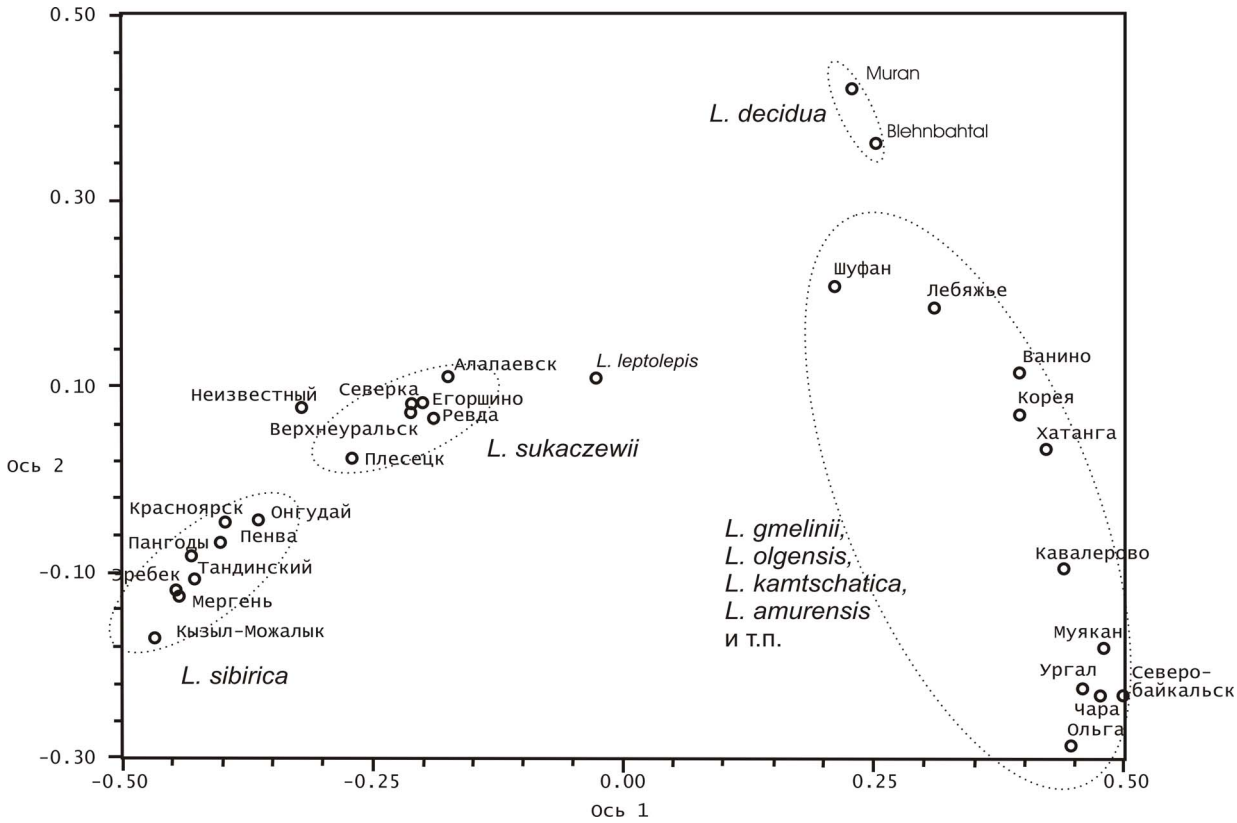

Рис. 8. Ординация популяций *Larix* на основании частот хлоропластных гаплотипов, выявленных с помощью четырёх микросателлитных локусов.

На Рис. 8 отражены генетические взаимоотношения популяций лиственницы по хлоропластным микросателлитным локусам. Популяции лиственниц европейской, Сукачева, сибирской и даурской образуют отдельные компактные кластеры, за исключением популяции Хатанга, что может быть вызвано малым объемом выборки. Популяции дальневосточных таксонов образуют диффузную группу вокруг кластера даурской лиственницы. Такой характер изменчивости в дальневосточных популяциях, отчасти, может являться артефактом небольшого размера выборок. Тем не менее, можно сделать ряд заключений. Во-первых, набор гаплотипов и их частоты в популяциях Ольга и Кавалерово (*L. olgensis*) весьма близок к таковым в популяциях типичной *L. gmelinii*. Это заставляет предполагать, что генетическое влияние даурской лиственницы на дальневосточные популяции очень велико, и затрагивает даже популяции «типичной» *L. olgensis*, что объясняет чрезвычайное сходство дальневосточных популяций и популяций *L. gmelinii* по ядерным маркерам (по данным AFLP).

Во-вторых, некоторые популяции Дальнего Востока (Корея, Шуфан, Ванино и *L. kamtschatica*) имеют определенное сходство друг с другом (Рис.8), при заметном отличии от «типичной» даурской лиственницы. Как мне представляется, эти популяции являются генетическим реликтом эпохи, предшествующей активной экспансии даурской лиственницы на восток, когда на юге Дальнего Востока обитал вид, предковый *L. olgensis* и *L. kamtschatica*.

Обращает на себя внимание отсутствие проявления «гибридности» в составе хлоропластных гаплотипов в популяции Северобайкальск: в ней были обнаружены только гаплотипы, свойственные даурской лиственнице, и отсутствовали гаплотипы сибирской лиственницы. В популяции, переходной по отношению к лиственницам Сукачева и сибирской (гибридность показана на основании аллозимных данных и AFLP), были обнаружены хлоропластные гаплотипы только одного таксона – *L. sibirica*.

4.4. Результаты анализа изменчивости митохондриальной ДНК в популяциях североевроазиатских видов *Larix*, проведенного с использованием методик Саузерн-блот и ПЦР-ПДРФ. Сравнение с данными по хлоропластному и ядерному геномам. Анализ изменчивости девяти митохондриальных маркеров, соответствующих двенадцати митохондриальным локусам, выявил 36 гаплотипов. Дерево минимальной длины митохондриальных гаплотипов (Рис. 9) состоит из трех основных ветвей:

- ветвь, состоящая из гаплотипов даурской лиственницы и части гаплотипов лиственниц, родственных ольгинской и даурской (№ 15, 16,18, 20, 21, 22, 23, 38, 26)

- две значительно обособленные ветви гаплотипов лиственницы сибирской; первая из них включает только гаплотипы сибирской лиственницы (№ 6, 7, 8, 9, 10, 8+, 12, 27), вторая включает помимо гаплотипов сибирской лиственницы (№ 3b, 5, 11, 11a, 13), два гаплотипа лиственницы Сукачева (№ 3 и 3a). Все три ветви соединяются между собой через группу гаплотипов ольгинской лиственницы: 30, 30’, 37, 39, 39a, к которым примыкают гаплотипы камчатской (№29, 30a), японской (№41) лиственниц, и гаплотип

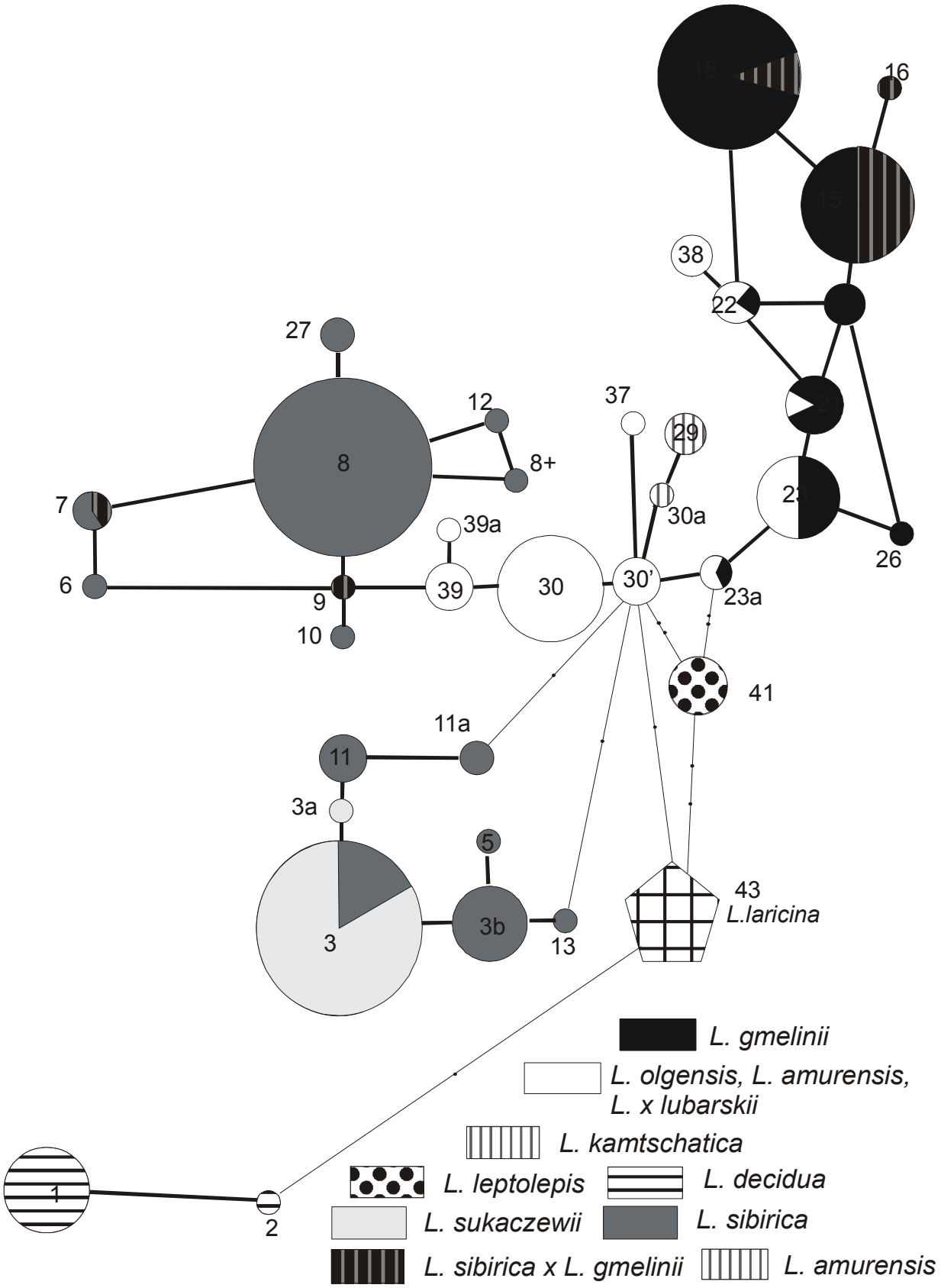

Рис. 9. Дерево минимальной длины митохондриальных гаплотипов евроазиатских видов лиственниц. Гаплотипы были определены на основе изменчивости 9 изменчивых маркеров, основанных на методе Саузерн-блот и ПЦР-ПДРФ. Диаметр диаграммы пропорционален частоте соответствующего гаплотипа. Цвет диаграмм соответствует таксономической принадлежности гаплотипа.

единственного индивида *L. laricina* (№43). Позиция гаплотипов европейской лиственницы (№1 и 2) довольно неопределенна, и гаплотип 2 оказывается наиболее близким к гаплотипу американской *L. laricina*. Дерево минимальной длины указывает на независимое происхождение митотипов сибирской, даурской и камчатской лиственниц от митотипов ольгинской лиственницы. Если филогенетическая близость ольгинской лиственницы и лиственниц даурской и камчатской представляется правдоподобной с учетом их географического соседства, то близкое родство ольгинской и сибирской лиственниц на первый взгляд не выглядит логичным, если иметь в виду отсутствие общих границ между этими видами. Однако, учитывая значительное морфологическое сходство *L. sibirica* и *L. olgensis*, а также некоторые, хотя и отрывочные сведения о геологической истории лиственниц в Северо-Восточной Азии, это родство представляется вполне очевидным (Дылис, 1961). Нахождение двух гаплотипов лиственницы Сукачева (№3 и 3а) внутри одной из двух группы многочисленных гаплотипов сибирской лиственницы заставляет предполагать недавнее отделение *L. sukaczewii* от *L. sibirica*, причем почти полный мономорфизм *L. sukaczewii* указывает на сильные “bottleneck” в её истории. Митохондриальные данные, как и данные по ядерным и хлоропластным маркерам, подтверждают самостоятельность лиственницы Сукачева.

Распределение митохондриальных гаплотипов между видами. Подобно структуре изменчивости ядерных и хлоропластных маркеров, распределение гаплотипов митохондриальной ДНК определяется таксономической принадлежностью рассматриваемых популяций. Число гаплотипов сильно варьировало от вида к виду: от одного или двух (при явном доминировании одного) у «маргинальных» видов – лиственниц европейской, Сукачева и японской, до пятнадцати у сибирской лиственницы (Рис. 2, 9). Примечательно, что при сходных уровнях внутрипопуляционной изменчивости по маркерам ядерного генома (аллозимы и AFLP), у изученных видов и популяций наблюдаются резкие различия по цитоплазматическим маркерам (хлоропластные микросателлиты и митохондриальная ДНК). Интересно, что лиственница Сукачева оказалась в числе «маргинальных» видов, с почти полным отсутствием внутривидовой изменчивости, при том, что ядерная изменчивость и изменчивость хлоропластных маркеров у этого вида близка к наблюдаемой у сибирской лиственницы, и также при том, что оба эти вида имеют сходные по размеру ареалы. Примечательно, что оба вида нигде не имеют общих гаплотипов, за исключением предположительно гибридной популяции Пангоды. Помимо гаплотипа 3, специфичного для лиственницы Сукачева, эта популяция содержит также гаплотипы 6 и 7, распространенные у лиственницы сибирской. Кроме митохондриальной ДНК, маркеры хлоропластной ДНК, AFLP и аллозимы также указывают на гибридную природу популяции Пангоды. Гаплотип 8, наиболее частый на Алтае и в Туве, отсутствует повсеместно к северу от Саян – в «Красноярске», в «Пангодах» и в «Северобайкальске», где доминируют гаплотипы 6 и 7, относительно редкие в горных популяциях Алтая и Тувы (Рис. 2). Эти отличия ставят под сомнение участие популяций горных районов Тувы и Алтая в заселении севера Сибири.

Лиственница даурская и лиственница ольгинская (рассматривая в качестве таковой все изученные популяции юга Приморья и Кореи), помимо видоспецифичных, имеют несколько общих гаплотипов. Гаплотипы 15, 18, 20, 26 специфичны для даурской лиственницы, гаплотипы 30, 30’, 37, 38, 39, 39а специфичны для ольгинской лиственницы. Гаплотипы 21, 22, 23 и 23а являются общими для обоих видов, причем гаплотипы 21, 23 и 23а доминируют у популяций, географически промежуточных для ареалов ольгинской и даурской лиственниц – «Ургал», «Кавалерово» и «Ванино» (Рис. 2). Кроме того, эти гаплотипы являются генетически промежуточными по отношению к гаплотипам, типичным для даурской и ольгинской лиственниц (Рис. 9). Это может означать, что данные гаплотипы являются продуктом рекомбинации митохондриальной ДНК лиственниц ольгинской и даурской, подтверждая гипотезу о широком развитии на Дальнем Востоке гибридных процессов между лиственницами даурской, ольгинской и камчатской. В то же время, поскольку рекомбинация между линиями митохондриальной ДНК является явлением редким, то высокая частота рекомбинантных гаплотипов означает длительную историю гибридного взаимодействия между лиственницами на Дальнем Востоке.

На южном Сахалине были найдены эндемичные гаплотипы 30а и 29 (Рис. 2), генетически близкие к гаплотипам ольгинской лиственницы, свидетельствующие как о близком родстве ольгинской и камчатской лиственниц, так и об их заметной дивергенции.

Гибридизация лиственницы сибирской и лиственницы даурской

Как генетическая изменчивость в популяции Северобайкальск, так и её географическое положение в зоне контакта *L. sibirica* и *L. gmelinii* (Дылис, 1959; Круклис, Милютин, 1977) указывают на то, что она состоит из гибридов. Здесь были обнаружены как гаплотипы, специфичные для сибирской лиственницы (№ 7, 9 – 15 штук), так и даурской (№ 15, 18 – 16 штук) (Рис. 2). Кроме этих гаплотипов там же найден гаплотип 16, который сочетает признаки обоих видов. Имеется до 8 признаков (комбинаций проба/энзим), по которым гаплотипы сибирской лиственницы отличаются от гаплотипов даурской лиственницы. В их числе по трем признакам имеются фиксированные различия, и по 5 признакам различия не фиксированы. Гаплотип 16 по большинству признаков может быть классифицирован как гаплотип даурской лиственницы, но по комбинации *Dra*I/atpI он имеет признак сибирской лиственницы – наличие фрагмента 4000 bp.

Данный факт указывает, вероятно, на рекомбинантное происхождение этого гаплотипа, которое могло произойти благодаря проникновению в зародышевый мешок при оплодотворении отцовских митохондрий и последующей гетероплазмии – сосуществованию двух линий митохондриальной ДНК в одном организме.

В отношении ядерных маркеров гибридная природа популяции Северобайкальск выражена не столь ярко (см. результаты аллозимного анализа и AFLP): можно лишь говорить о небольшом уклонении частот аллелей в на-

правлении сибирской лиственницы. Хлоропластные гаплотипы сибирской лиственницы в этой популяции и вовсе не были обнаружены.

Структура генетической изменчивости лиственниц Северной Евразии по ядерным, хлоропластным и митохондриальным генетическим маркерам. Анализ распределения генетической изменчивости AMOVA у видов евроазиатских лиственниц, проведенный с помощью четырёх наборов генетических маркеров – аллозимов, AFLP, хлоропластных микросателлитов и маркеров митохондриальной ДНК - и с использованием близких или идентичных наборов популяций и особей, позволяет сделать некоторые обобщения.

Сравнение параметров генетической изменчивости этих четырёх видов маркеров в иерархической схеме «индивидум - популяция – таксон – всего» (Табл. 3) показывает, что *F*-статистика, соответствующая уровню «популяция – таксон», весьма близка у аллозимов, маркеров AFLP и хлоропластных микросателлитов и составляет 6.6% – 8.4%, при том, что у митохондриальных маркеров она в несколько раз больше (46%). Невысокие уровни межпопуляционной дифференциации в пределах таксонов по аллозимам, AFLP и хлоропластными маркерами обусловлены сопряженностью соответствующих генетических потоков с переносом пыльцы, высокая подвижность которой эффективно нивелирует результаты действия генетического дрейфа. Соответственно, большие межпопуляционные различия по митохондриальным маркерам определяются сравнительно малой подвижностью семян.

Значительно большие уровни дифференциации таксонов по хлоропластным микросателлитам и по митохондриальной ДНК, по сравнению с ядерными маркерами, могут быть обусловлены сниженным для цитоплазматических маркеров эффективным размером популяции, что определяет более выраженное действие дрейфа генов (Mitton, 1993). Более высокие уровни дифференциации таксонов по AFLP по сравнению с аллозимами могут быть следствием некодирующей природы ДНК у фрагментов AFLP.

Таблица 3

Результаты AMOVA для популяций *Larix* по четырём видам данных: аллозимы, AFLP, хлоропластные микросателлиты и митохондриальные маркеры. Иерархическая схема включает два промежуточных уровня (популяция, таксон). Представлено пять таксонов: *L. decidua, L. sukaczewii, L. sibirica, L. gmelinii* плюс родственные таксоны, *L. leptolepis*.

Компонента изменчивости	Аллозимы	AFLP	хлоропластные микросателлиты	митохондриальные маркеры
$F_{\text{популяция - таксон}}$	0.082	0.084	0.0656	0.4600
$F_{\text{таксон – всего}}$	0.114	0.302	0.7252	0.5629
$F_{\text{популяция – всего}}$	0.186	0.360	0.7433	0.7640

Глава 5. СТРУКТУРА ИЗМЕНЧИВОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК И ПОСЛЕЛЕДНИКОВАЯ ИСТОРИЯ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ (*LARIX SIBIRICA* LEDEB.)

В главе рассматриваются результаты изучения изменчивости митохондриальной ДНК, проведенные с помощью методики ПЦР – ПДРФ в популяциях лиственницы сибирской с целью получения информации об истории вида в позднем плейстоцене, расположении ледниковых рефугиумов и о путях реколонизации современного ареала.

5.1. Генетическая изменчивость.
Митохондриальные гаплотипы (митотипы) были определены на основании изменчивости пяти локусов: nad5(1-2), nad4(3c-4r), UBC460, R11 и C8. Изменчивость в nad5(1-2) и в UBC460 определяется наличием/отсутствием инсерции 4 п.н. и около 500 п.н., соответственно. Изменчивость в nad4(3c-4r) определяется мутацией сайта рестрикции *Hinf*I, изменчивость в C8 определяется наличием/отсутствием ПЦР продукта. R11 локус был наиболее полиморфным: помимо «нуль-аллеля» (отсутствие ПЦР продукта), обнаружено 23 варианта длины фрагмента, обусловленные наличием внутри фрагмента минисателлита – последовательности, состоящей из 31 нуклеотида: 5’CTTGACCAAAGGGAGGGCAAGGAAAGGCTTG-3’ и повторяющегося от нуля (минисателлит отсутствует в пределах фрагмента) до 24 раз. Кроме того, был найден аллель с измененной последовательностью мотива минисателлита.

Комбинации генотипов этих маркеров дали у лиственниц Северной Евразии 32 гаплотипа. Среди них у лиственницы сибирской было обнаружено 27 гаплотипов. Гаплотипы D и G встречались, соответственно, у европейской и даурской лиственниц. Гаплотип G встречался также в некоторых популяциях гибридов *L. sibirica* и *L. gmelinii*. У лиственниц сибирской и Сукачева найдены гаплотипы S0, S1, LN и гаплотипы L0, L1,… L24, имеющие разную длину фрагмента R11.

5.2. Изменчивость в маргинальных популяциях. Наблюдается тенденция к снижению изменчивости митохондриальной ДНК в маргинальных популяциях лиственницы сибирской, включая популяции полярной границы леса, популяции находящиеся на границе двух видов и популяцию Тянь-Шань. Это может быть обусловлено эффектом основателя при расселении лиственницы и локальными событиями “bottleneck”.

5.3. Пространственное распределение гаплотипов внутри популяции.
Анализ распределения митохондриальных гаплотипов вдоль трансекты в популяции Туруханск обнаруживает пространственные неоднородности, обусловленные наличием групп деревьев, родственных друг другу по материнской линии, а также ограниченной дальностью распространения семян. Размер таких групп составляет 50-100 метров, из чего следует, что оптимальное расстояние между деревьями при взятии репрезентативной выборки для оценки частот митохондриальных гаплотипов должно превышать 100 метров.

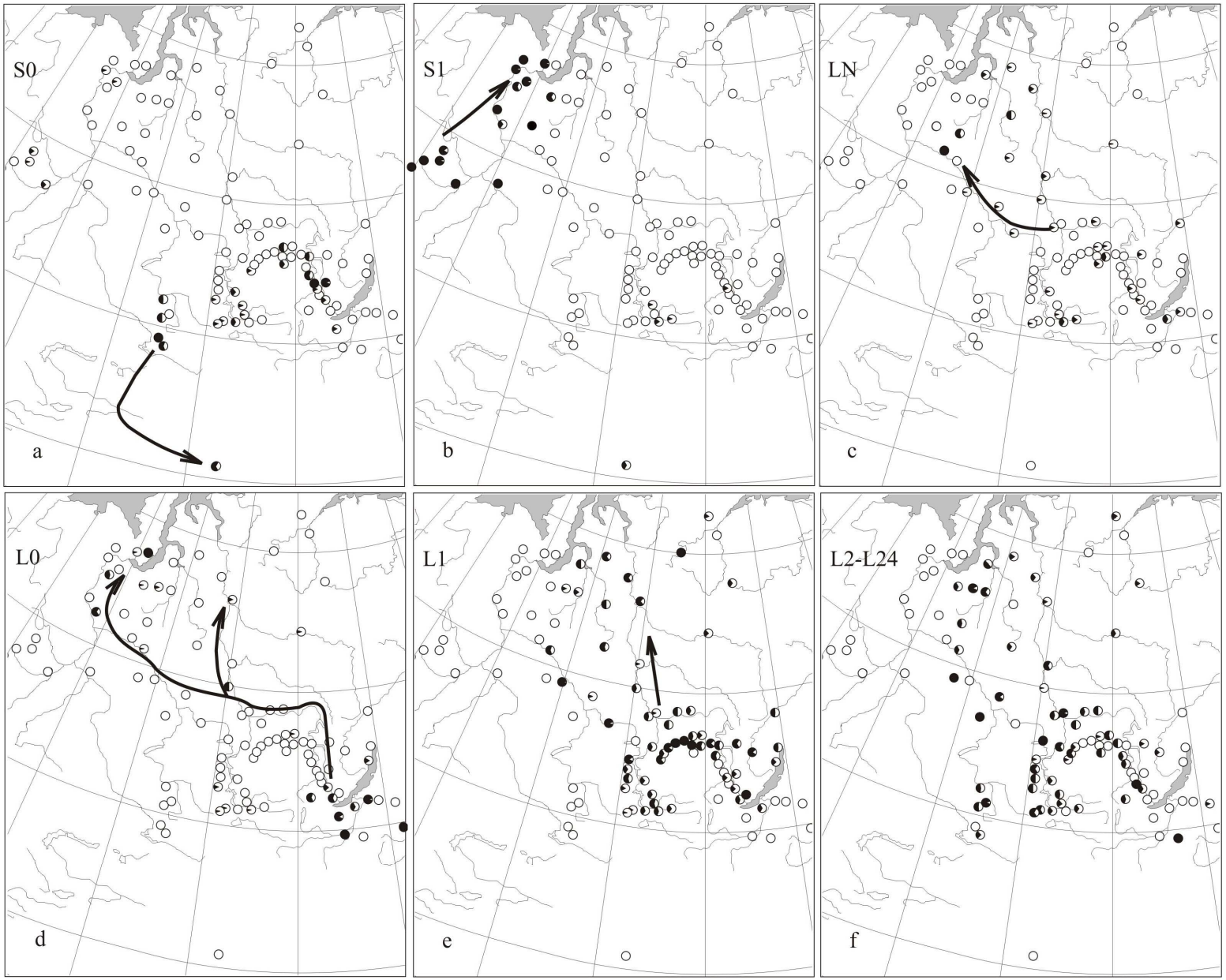
S0
a
S1
b
LN
c
L0
d
L1
e
L2-L24
f

Рис.10. Частоты некоторых митохондриальных гаплотипов, основанных на пяти маркерах (см. текст) в изученных популяциях *L. sukaczewii, L. sibirica* и гибрида *L. sibirica X L. gmelinii* (круговые диаграммы): a) гаплотип S0; b) S1; c) LN; d) L0; e) L1; f) сумма гаплотипов L2, L3,…L24. Представлены также возможные сценарии расселения лиственницы из ледниковых рефугиумов.

5.4. Географическое распределение гаплотипов и историко-географические интерпретации. Большинство гаплотипов распределены географически неравномерно (Рис. 3, 10). Гаплотип S0 рассеян по югу Сибири и по Уралу. Он доминирует в Тянь-Шане и в большинстве популяций Алтая (популяции 31-34 и 36), но отсутствует на севере Сибири. S1 доминирует на Урале, в европейской России и в прилегающих к Уралу районах Западной Сибири. Он также присутствует с невысокой частотой в Тянь-Шане и на юге Сибири. Для лиственницы Сукачева характерны только гаплотипы S1 и S0. Гаплотип LN рассеян по большей части Сибири, но полностью отсутствует на Алтае и в Тянь-Шане. Он имеет высокую частоту в некоторых популяциях Средней Оби (№ 22 и 95) и в некоторых популяциях Саян.

Гаплотип L0 присутствует на большей части Сибири, но полностью отсутствует на Алтае и в Тянь-Шане, и имеет наибольшую частоту в двух областях: вблизи южной оконечности Байкала (популяции 80-86) и в районе Нижней Оби (№ 16, 17 и 94). Наиболее частый гаплотип лиственницы сибирской L1 распространен по всему ареалу вида, за исключением Алтая, Тянь-Шаня и западной части Западной Сибири. Наконец, гаплотипы L2 – L24 имеют низкую частоту и распределены без видимой структуры (Рис. 3, 10).

На основании географического распределения гаплотипов можно выделить по крайней мере четыре группы популяций: (i) Урал, европейская Россия и западная часть Западной Сибири, где преобладает гаплотип S1 (*L. sukaczewii*), (ii) Алтай и Тянь-Шань, где гаплотип S0 имеет высокую частоту, и где отсутствуют гаплотипы LN, L0 и L1, имеющие высокую частоту в других районах Сибири, (iii) область, примыкающая к южной части Байкала, где доминирует гаплотип L0 и (iv) остальная часть Сибири, содержащая все гаплотипы, специфичные для *L. sibirica* (исключая редкий гаплотип L20, обнаруженный только на Алтае). Относительная однородность составов гаплотипов внутри этих групп может быть интерпретирована как результат расселения лиственницы из отдельных источников. Такими источниками могли служить, очевидно, рефугиумы лесной растительности последнего ледникового максимума. Так зона доминирования гаплотипа S1, с центром на Урале (Рис. 10, b), соответствующая ареалу *L. sukaczewii*, вероятно сформировалась в ходе послеледникового расселения из южноуральского ледникового рефугиума. На основании географического распределения гаплотипов можно уточнить границу лиственниц Сукачева и сибирской в районе Нижней Оби. Она идет примерно от устья Иртыша на север по правому берегу Оби, местами отклоняясь далеко на восток. На южном Ямале граница проходит между бассейнами рек Хадыта-Яха и Яда-Яходы-Яха.

Популяции Алтая маркированы высокой частотой гаплотипа S0 и отсутствием гаплотипов LN, L0, L1, которые доминируют в более северных и восточ-

ных районах. Это делает маловероятным участие Алтая в реколонизации лиственницей севера Сибири. В то же время сходство между популяциями Алтая и Восточного Тянь-Шаня, выраженное в высокой частоте гаплотипа S0, позволяет предполагать алтайское происхождение лиственницы в Тянь-Шане. Низкая изменчивость митохондриальной ДНК тянь-шанской лиственницы может быть следствием «эффекта основателя», имевшем место в ходе миграции. Миграции лиственницы между Алтаем и Тянь-Шанем могла иметь место в середине голоцена, поскольку к этому времени относится наибольшее развитие лесов на юго-западе Монголии (Дорофеюк, Тарасов, 2000).

Территория, примыкающая к южной оконечности Байкала, характеризуется повышенной частотой гаплотипа L0, что, очевидно, обусловлено общим происхождением популяций этого района, независимым от происхождения популяций более западных и северных областей, и, возможно, связанным с существованием в этом районе ледникового рефугиума лиственницы.

Наибольшая изменчивость митохондриальной ДНК лиственницы сибирской найдена в бассейне Верхнего Енисея, на Ангаре и Верхней Лене, т.е. в Саянах и их окружении. При этом географическое распределение гаплотипов внутри этого региона относительно однородно. Например, частоты гаплотипов в районе Верхнего Енисея (Западный Саян и Кузнецкий Алатау) и в области Восточного Саяна довольно близки (Рис. 3). Все это, по-видимому, указывает на их общее, относительно недавнее происхождение. В то же время имеющиеся здесь отдельные неоднородности в распределении митотипов, например – высокая частота митотипа S0 в группе соседних популяций в Приангарье (Рис.10, а) - могут означать наличие нескольких, частично изолированных ледниковых популяций (рефугиумов) лиственницы в саянском регионе. Сравнение частот гаплотипов указанного района и севера Сибири (Рис. 3) определенно свидетельствует о главной роли саянских популяций в формировании последних, при возможном участии в этом процессе лиственницы из южного Прибайкалья. Хотя в целом север Сибири имеет явное сходство по частотам гаплотипов с саянскими популяциями, он генетически неоднороден. Так, следует отметить группу популяций в районе Нижней Оби (популяции 16, 17, 94), имеющих повышенную частоту гаплотипа L0 (Рис. 10), что резко отличает их от соседних популяций. Причем, несмотря на широкое распространение этого гаплотипа в Северной Сибири, на юге Сибири его частота почти повсеместно низка, и только в районе южной оконечности Байкала он доминирует. Можно предложить три возможные причины сгущения гаплотипа L0 на Нижней Оби:

1) Эффект основателя, сопутствующий событиям дальнего распространения в ходе послеледникового расселения лиственницы по Западной Сибири.

2) Наличие небольших скрытых (“cryptic”) ледниковых рефугиумов на севере Западной Сибири.

3) Двухстадийная миграция лесной растительности на север Сибири. Первая стадия - быстрая и кратковременная позднеледниковая или раннеголоценовая миграция на север Сибири из Прибайкалья вдоль Ангары, Енисея, Оби и их притоков. Вторая стадия – расселение леса из горных рефугиумов Саян.

Популяции Б. Авам, Ары-Мас, Котуйкан и Тура располагаются далеко в глубине ареала даурской лиственницы (Рис. 3), морфологически сходны с даурской лиственницей и содержат хлоропластные гаплотипы только даурской лиственницы (неопубликованные данные). Тем не менее, они имеют митохондриальные гаплотипы сибирской лиственницы. Причем «Б. Авам» и «Тура» имеют почти исключительно «сибирские» митотипы. Этот факт, в сочетании с результатами изучения аллозимов, AFLP, хлоропластной и митохондриальной ДНК гибридной популяции Северобайкальск (глава 4), указывает на процесс почти повсеместного вытеснения сибирской лиственницы лиственницей даурской. Очевидно, «сибирские» митохондриальные гаплотипы в «Б. Аваме», «Ары-Масе», «Котуйкане» и в «Туре» (№ 27, 28, 29, 30) являются реликтами былого распространения *L. sibirica* в Восточной Сибири.

Глава 6. РЕКОНСТРУКЦИЯ ФИЛОГЕНИИ ВИДОВ *LARIX* НА ОСНОВЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ ХЛОРОПЛАСТНОЙ И ЯДЕРНОЙ ДНК

6.1. Результаты

6.1.1. Изменчивость хлоропластной ДНК. Среди 95 регистрированных признаков, мутаций сайтов рестрикции было 49 штук, инсерций / делеций – 44

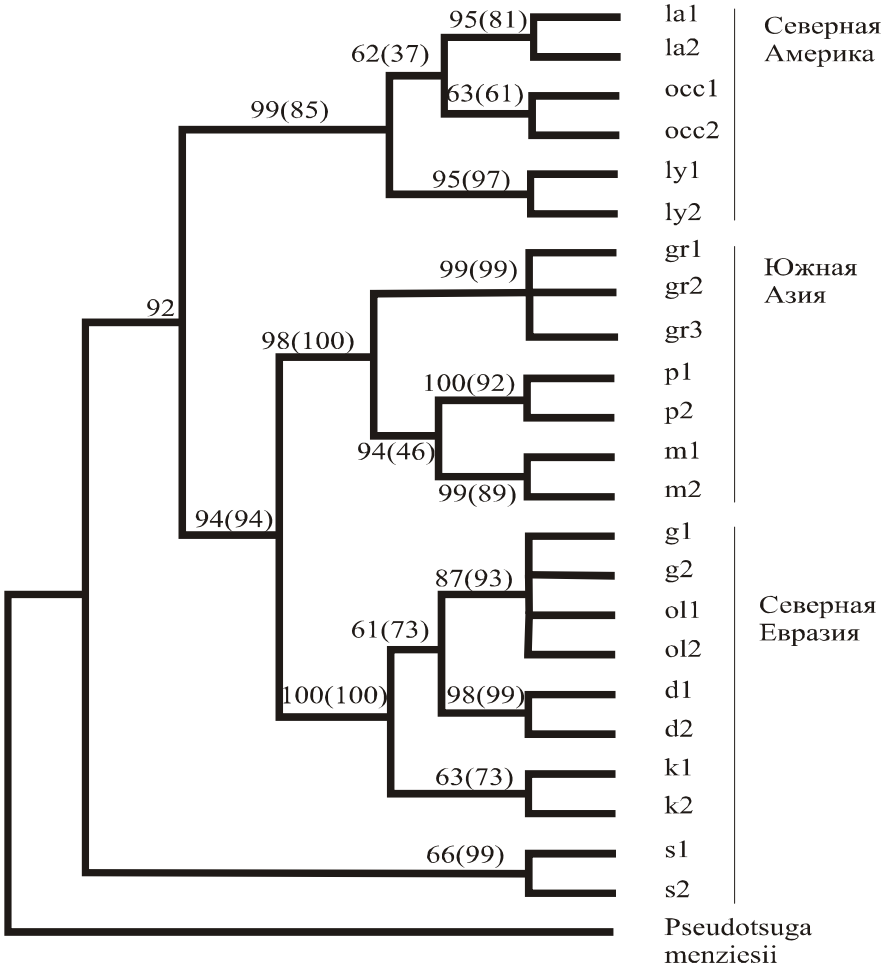

Рис. 11. Филогенетическое дерево *Larix*, построенное с помощью метода наибольшей парсимонии и метода “neighbor-joining”. Бутстрап - значения статистической поддержки MP дерева (для NJ, значения указаны в скобках), получены с помощью 1000 репликаций исходной матрицы. На их основе были вычислены 1000 наиболее “экономных” деревьев и 1000 NJ деревьев, на основании которых были построены два идентичных “консенсус” дерева. Обозначение образцов соответствует первым буквам латинского названия.

штуки и двуцепочечных полиморфизмов – 6 штук. Мутации были распределены неравномерно — большая часть из них располагается либо в группе южноазиатских, либо в группе североевроазиатских видов. 54 изменчивых признака из 95 были парсимонистически информативны. Анализ MP дал одно наиболее парсимонистичное дерево (Рис. 11), идентичное дереву, полученному с помощью анализа NJ.

Филогенетическая реконструкция указывает на *L. sibirica* как на наиболее дивергентный, базальный таксон. Монофилетичная клада оставшихся видов лиственниц состоит из двух сестринских ветвей – ветви американских видов и ветви евроазиатских видов. Американская клада состоит из слабо поддержанной группы *L. laricina – L. occidentalis* и сестринской им *L. lyallii*. В свою очередь, евроазиатские виды состоят из двух сестринских групп – группы южноазиатских и группы североевроазиатских лиственниц. Южноазиатские *L. potaninii* и *L. mastersiana* образуют монофилетичную группу, сестринскую *L. griffithiana*. Североевроазиатские лиственницы, с невысокой поддержкой, делятся на две клады: 1) *L. gmelinii*, *L. olgensis*, *L. decidua* и 2) *L. kaempferi*. Первая из них состоит из *L. gmelinii* и *L. olgensis*, которые с высокой поддержкой образуют группу, сестринскую *L. decidua*.

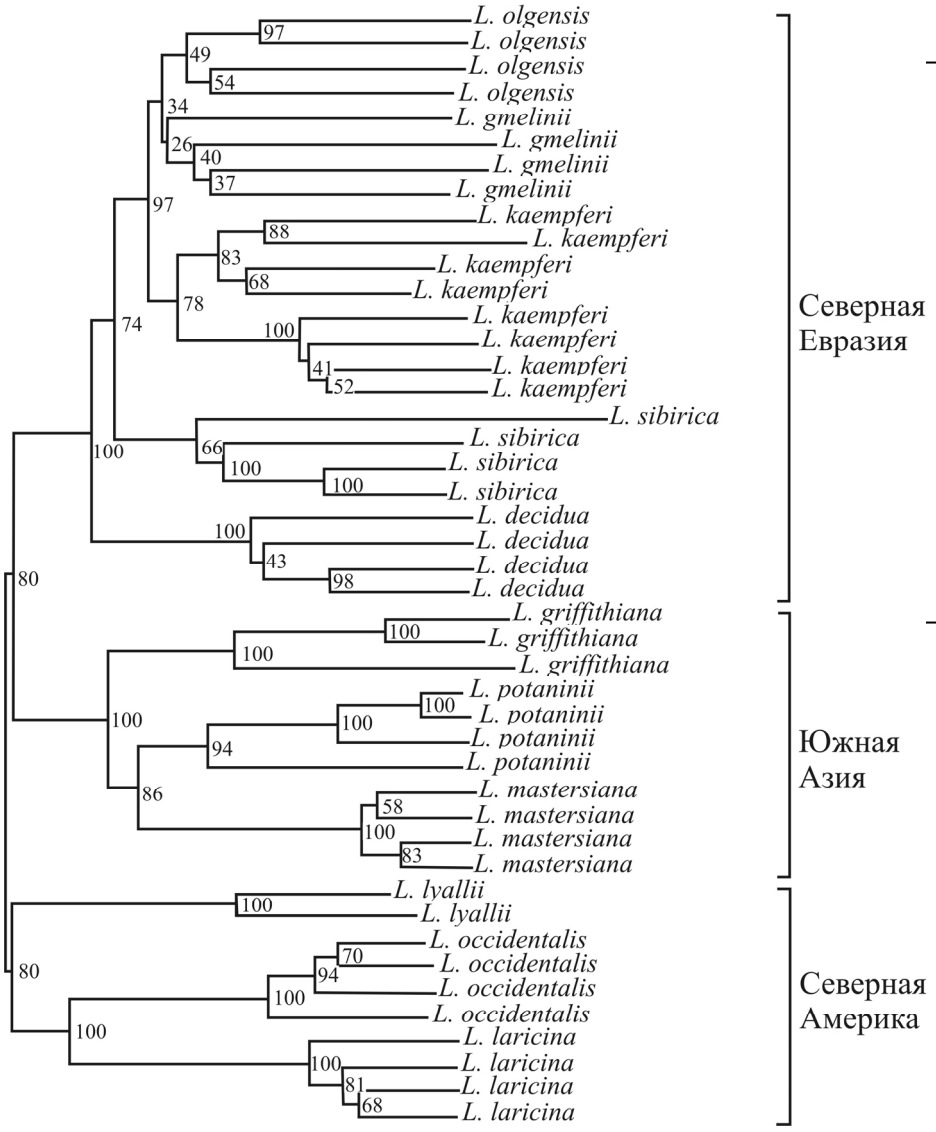

Рис. 12. Филогенетическое дерево *Larix*, построенное на основании AFLP данных и метода “Neighbor-joining” с использованием генетических расстояний Link et al. (1995). Указаны значения bootstrap.

6.1.2. Реконструкция филогении на основании изменчивости фрагментов AFLP. Всего 467 фрагментов было внесено в матрицу данных. Из них 25 «бэндов» были фиксированы и 442 – полиморфны. Основное отличие NJ дерева, использующего данные AFLP (Рис. 12), от дерева, основанного на хлоропластных PCR-RFLP, состоит во включении *L. sibirica* в группу североевроазиатских видов. Кроме того, AFLP- дерево реконструирует несколько отличную от хлоропластного дерева топологию внутри последней группы: *L. decidua* указывается как базальная клада по отношению к остальным видам, а *L. kaempferi* – как клада, сестринская группе *L. gmelinii* и *L. olgensis*. В остальном, топология обоих деревьев конгруэнтна.

6.2. Обсуждение. Неожиданно то, что и хлоропластные данные, и AFLP, хотя и со слабой поддержкой, объединяют *L. laricina* и *L. occidentalis* в группу, сестринскую *L. lyallii*, что противоречит топологии, реконструируемой на основе ITS, демонстрирующей близость *L. occidentalis* и *L. lyallii* и базальность *L. laricina* (Gernandt, Liston, 1999). ITS - топология представляется более логичной, учитывая перекрывание ареалов *L. occidentalis* и *L. lyallii* и их морфологическое сходство. С другой стороны, секвенирование хлоропластного фрагмента trnT-trnF также указало на сходство *L. laricina* и *L. occidentalis* при дивергенции *L. lyallii* (Wei, Wang, 2003). Поскольку в данном случае маркеры ядерной ДНК (ITS и AFLP) дают разные топологии, можно предположить, что противоречие вызвано артефактом одного из исследований и, соответственно, для разрешения конфликта требуются дополнительные данные по ядерной ДНК американских видов.

В пределах североевроазиатской группы ядерные маркеры AFLP и ITS объединяют даурскую, ольгинскую и японскую лиственницы в группу, сестринскую европейской лиственнице, что соответствует географическому расположению этих видов. Как и AFLP, хлоропластные данные объединяют даурскую и ольгинскую лиственницы в монофилетическую группу. Результаты анализа AFLP и анализа хлоропластных микросателлитов в популяциях североевроазиатских видов (глава 4) показывают, что между ольгинской и даурской лиственницами имеются значительные генетические потоки, объясняющие родство этих видов. Географическая близость ареалов ольгинской и японской лиственниц также означает возможность генетических обменов между ними. В отличие от ядерных маркеров, хлоропластные данные объединяют вместе даурскую, ольгинскую и европейскую лиственницы в группу, сестринскую японской, что может быть обусловлено как гомоплазией – вторичной потерей японской лиственницей маркерного сайта рестрикции, так и явлением “lineage sorting”.

Важным результатом анализа ядерной и хлоропластной филогении является подтверждение парафилетичности секций *Pauciseriales* и *Multiseriales*. Тот факт, что виды *Multiseriales* обитают в низких широтах как Америки, так и Азии, заставляет предположить, что длинные кроющие чешуи есть признак, конвергентно приобретенный лиственницами обоих полушарий при проникновении их на юг, как следствие обитания в условиях длинного вегетационного периода и короткого светового дня.

Таким образом, имеется только одно крупное несоответствие между филогенетическими реконструкциями, основанными на ядерных и хлоропластных маркерах – положение *L. sibirica*. 100% бутстрап-поддержка положения *L. sibirica* внутри группы североевроазиатских видов в случае ядерной филогении находится в полном соответствии с географическим положением её ареала. В то же время базальное положение сибирской лиственницы, реконструируемое хлоропластными PCR-RFLP, совпадает с выводами Qian, Ennos (1995). Наиболее вероятной причиной несоответствия двух филогенетических реконструкций может быть захват сибирской лиственницей хлоропластного гаплотипа некоторого древнего, ныне не существующего вида *Larix*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

Генетическое разнообразие на внутривидовом и межвидовом уровнях содержит информацию об истории видов, их популяций и связанных с ними экосистем. Получение этой информации составляет одну из важнейших проблем популяционной и эволюционной биологии. Развитие молекулярно-биологических методов создало возможности анализа генетической изменчивости видов, ускорив прогресс в систематике, экологии и биогеографии живых организмов. Применение молекулярных маркеров к изучению структуры генетической изменчивости видов – ключевых элементов определенных типов ландшафтов - служит инструментом изучения истории этих видов и истории динамики данных ландшафтов.

Представленная работа является попыткой исследования истории видов лиственниц – ключевых элементов таёжной биоты - с помощью анализа структуры внутри и межвидовой изменчивости хлоропластного, митохондриального и ядерного геномов.

В результате проведенного исследования получены следующие выводы:

1. Все изученные виды лиственниц обладают сходным уровнем изменчивости аллозимных локусов, близким к значениям, обнаруженным у большинства других, широко распространенных видов растений. Относительное снижение аллозимной изменчивости наблюдается у некоторых экологически маргинальных видов и популяций.

2. Все изученные виды характеризуются высокой долей внутрипопуляционной аллозимной изменчивости в общей внутривидовой изменчивости и невысокой долей, соответствующей межпопуляционным различиям (<10%), что характерно для структуры аллозимной изменчивости ветроопыляемых видов, имеющих протяженные ареалы.

3. Структура изменчивости ядерных, хлоропластных и митохондриальных генетических маркеров подтверждает самостоятельность западной расы лиственницы сибирской – лиственницы Сукачева.

4. Характер генетических отношений митохондриальных гаплотипов лиственниц сибирской и Сукачева указывает на происхождение последней от сибирской лиственницы, а низкая изменчивость митохондриальной ДНК листвен-

ницы Сукачева свидетельствует о событии сильного сокращения эффективного размера популяции этого таксона в прошлом.

5. Географическое распределение митохондриальных гаплотипов у лиственницы сибирской позволяет делать выводы о расположении рефугиумов лесной растительности во время последнего оледенения. Выделяются области, населенные популяциями, имеющими относительно однородные частоты митохондриальных гаплотипов:

- Урал и прилегающие территории Западной Сибири,
- Алтай и Тянь-Шань,
- район, примыкающий к южной оконечности Байкала,
- оставшаяся часть ареала сибирской лиственницы.

Наличие этих областей, вероятно, обусловлено их индивидуальным происхождением из отдельных популяций – рефугиумов. В частности, единство пула митохондриальных гаплотипов севера Сибири и саянских популяций может быть объяснено расселением лиственницы в послеледниковое время из горных рефугиумов юга Сибири.

6. Существенные различия в наборах митохондриальных гаплотипов севера Сибири и Алтая означают неучастие алтайских популяций в заселении лиственницей севера Сибири, и наоборот, сходство популяций Алтая и Тянь-Шаня позволяет предполагать их общее послеледниковое происхождение.

7. Выделяется две области, маркированные высокой частотой митохондриального гаплотипа L0: район южной оконечности Байкала и район Нижней Оби. Это может означать, что процесс расселения лесной растительности в послеледниковое время был многостадийным, и периоды, благоприятствующие древесным видам, прерывались холодными или аридными интервалами. Возобновление миграций в благоприятных условиях могло осуществляться по измененным маршрутам.

8. На основании анализа изменчивости хлоропластных, митохондриальных и ядерных генетических маркеров, в популяциях гибридов лиственниц сибирской и даурской выявлена асимметричная пространственная структура распределения видоспецифичных маркеров. При этом ядерные и хлоропластные маркеры, специфичные для даурской лиственницы, трансгрессируют в направлении популяций сибирской лиственницы, а митохондриальные маркеры, специфичные для сибирской лиственницы, трансгрессируют в направлении популяций даурской лиственницы. Митохондриальные гаплотипы сибирской лиственницы найдены во многих популяциях даурской лиственницы, располагающихся в сотнях километров от современного ареала сибирской лиственницы, что подтверждает вывод Н.В.Дылиса (1959) о вытеснении даурской лиственницей лиственницы сибирской.

9. В гибридной популяции обнаружены гаплотипы, возникшие путем рекомбинации митохондриальных гаплотипов сибирской и даурской лиственниц.

10. Митохондриальные гаплотипы ольгинской лиственницы являются предковыми по отношению к гаплотипам сибирской, даурской и камчатской лиственниц.

11. Аллозимные и митохондриальные данные подтверждают наличие на Дальнем Востоке зоны интрогрессивной гибридизации лиственниц даурской и ольгинской. Гибридные популяции имели промежуточные по отношению к родительским видам значения частот аллозимных локусов и специфичные митохондриальные гаплотипы, предположительно являющиеся продуктами рекомбинации гаплотипов родительских видов.

12. Подтверждена генетическая обособленность популяций юга Сахалина (*L. kamtschatica*) и популяции окрестностей г. Магадана (*L. ochotensis*).

13. Филогенетические реконструкции рода *Larix*, основанные на изменчивости ядерной ДНК и хлоропластной ДНК, были не конгруэнтны в отношении позиции лиственницы сибирской. В соответствии с филогенией хлоропластной ДНК, сибирская лиственница является базальной по отношению ко всем видам лиственниц, в то время как филогения, основанная на ядерной ДНК, помещает её в группу географически близких ей видов Северной Евразии. Предполагаемая причина указанного конфликта – гибридизация в прошлом сибирской лиственницы с каким-то древним, ныне вымершим таксоном.

14. Обе филогении подтверждают, с высокой статистической поддержкой, деление евразиатской клады на две сестринские группы – североевроазиатскую группу бореальных видов (лиственницы европейская, даурская, ольгинская, японская) и южноазиатскую группу (лиственницы Мастерса, Потанина и Гриффита (*L. mastersiana, L. potaninii* и *L. griffithiana*)). Обе филогении указывают на базальное положение лиственницы субальпийской (*L. lyallii*) в группе американских видов и на базальное положение лиственницы Гриффита в группе южноазиатских видов. В группе североевроазиатских видов означенные филогении имеют несколько различную топологию: согласно хлоропластной ДНК, базальной в данной группе является японская лиственница, а по ядерной ДНК – европейская.

По результатам исследований, представленных в диссертации, опубликованы следующие работы:

Аллозимный полиморфизм лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) / А.В. Шурхал, В.Л.Семериков [и др.] // Генетика. - 1989. - Т. 25, № 10. - С. 1899-1901.

Семериков В. Л. Оценка генетической изменчивости лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ldb.) / В. Л. Семериков // Вид и его продуктивность в ареале : материалы VI совещ.: прогр. ЮНЕСКО "Человек и биосфера" (С.-Петербург, 23-26 нояб. 1993 г.) / ЗИН, РАН [и др.]; [О. А. Скарлато (пред. ред. кол.)].- СПб.: Гидрометеоиздат, 1993.-С. 332-334.

Семериков В. Л. Оценка генетической изменчивости лиственницы сибирской / В. Л. Семериков, А. В. Матвеев // Биота Урала : (Информ. материалы) / ИЭРиЖ, УрО, РАН ; [отв. ред. П. Л. Горчаковский].-Екатеринбург, 1994. - С. 44-45.

Семериков В.Л. Изучение генетической изменчивости лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ldb.) по изоферментным локусам / В.Л.Семериков, А.В.Матвеев // Генетика - 1995. – Т. 31, № 8. - С. 1107-1113.

Семериков В. Л. К истории евроазиатских видов *Larix* секции *Pauciseriales* / В. Л. Семериков // Исследование лесов Урала: Материалы науч. чтений, посвящ. памяти Б. П. Колесникова. - Екатеринбург, 1997. - С. 43-46.

Семериков В. Л. Новые данные по геногеографии *Larix sibirica* Ldb / Семериков В. Л. // Жизнь популяций в гетерогенной среде: [Материалы 2 Всерос. популяц. семинара, 16-20 февр. 1998 г., Йошкар-Ола]. - Йошкар-Ола: Периодика Марий Эл, 1998a. - Ч. 2. - С. 24-25.

Семериков В. Л. Изучение филогенеза лиственниц (*Larix* Mill.) с помощью молекулярных маркеров / Семериков В. Л. // Экология и генетика популяций.- Йошкар-Ола, 1998b.-С. 157-159.

Semerikov V.L. Phylogenetic relationships of some Eurasian and American Larix species inferred from allozyme data / V.L. Semerikov // World Resources for Breeding, Resistance and Utilization. IUFRO Interdivisional Symposium, September 1-5, 1998, Krasnojarsk, Siberia, Russia. – Krasnojarsk: Inst. of Forest, Siberian Branch, Rus. Acad. Sci., 1998 - P. 86

Semerikov V.L. Genetic relationships among Eurasian and American *Larix* species based on allozymes / V.L. Semerikov, M. Lascoux // Heredity. - 1999. – Vol. 83. – P. 62-70.

Semerikov V.L. Intra- and interspecific allozyme variability in Eurasian *Larix* Mill. species / V.L. Semerikov, L.F. Semerikov, M. Lascoux // Heredity. - 1999. - Vol. 82. - P. 193-204.

Semerikov V.L. Nuclear and cytoplasmic variation within and between Eurasian *Larix* (Pinaceae) species / V.L. Semerikov, M. Lascoux // Amer. J. Bot. - 2003. – Vol. 90. - P.1113-1123.

Conflicting phylogenies of *Larix* (Pinaceae) based on cytoplasmic and nuclear DNA / Semerikov V. [et al.] // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2003. – Vol. 27. – P. 173–184.

Катышев А. И. Изучение гибридизации *Larix sibirica* и *Larix gmelini* с использованием митохондриальных и хлоропластных генетических маркеров / А. И. Катышев, В. Л. Семериков, Ю. М. Константинов // Структурно-функциональная организация и динамика лесов: материалы всерос. конф., посвящ. 60-летию Ин-та леса им. В. Н. Сукачева и 70-летию образования Краснояр. края, 1-3 сент. 2004 г., Красноярск /отв. ред. В. А. Ваганов.- Красноярск, 2004.-С. 432-434.

RAPD-derived, PCR-based mitochondrial markers for *Larix* species and their usefulness in phylogeny / Semerikov V. [et al.] // Conservation Genetics. – 2006. – Vol. 7, № 4. – P. 621-625.

Семериков В.Л. Исследование изменчивости митохондриальной ДНК лиственниц Дальнего Востока / В.Л.Семериков, М.А. Полежаева // Лесные экосистемы Северо-Восточной Азии и их динамика: Материалы международной конференции (22-26 августа 2006 г.) – Владивосток: Дальнаука, 2006. - С. 234 – 237.

Семериков В.Л. История и филогения видов *Larix* Mill. / В.Л. Семериков / Особь и популяции – стратегии жизни. Сб. материалов IX всероссийского

популяционного семинара (Уфа, 2 – 6 октября 2006 г.). – Уфа: Издательский дом ООО «Вилли Окслер», 2006. – Ч. 2. – С. 470 – 475.

Семерикова С.А. Генетическая изменчивость и дифференциация популяций пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) по аллозимным локусам / С.А. Семерикова, В.Л. Семериков // Генетика. - 2006. - Т.42, № 6. - С. 783-792.

На разных этапах работы частичная финансовая поддержка осуществлялась РФФИ (гранты 94-04-12282, 04-04-48604, 04-04-96011), ИНТАС (Project 2001-0358), грантом Шведской Академии Наук.

Подписано в печать 18.01.2007г. Формат 60х84 1/16
Усл. печ. л. 2,1. Бумага «Гознак» Тираж 100 экз. Заказ №1

Отпечатано в типографии ООО «ИРА УТК»
620075, г. Екатеринбург, ул. К. Либкнехта, 42, тел. (343) 350-97-24