На правах рукописи

СЕМЕРИКОВА Светлана Александровна

ПОПУЛЯЦИОННО-ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ВИДОВ ПИХТ (*ABIES* MILL., PINACEAE) СЕВЕРО-ВОСТОКА ЕВРАЗИИ

03.00.05 – ботаника

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Екатеринбург - 2008

Работа выполнена в Институте экологии растений и животных Уральского отделения Российской Академии Наук.

Научный руководитель – доктор биологических наук
Семериков Владимир Леонидович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Санников Станислав Николаевич,
Ботанический сад УрО РАН,

кандидат биологических наук, доцент
Кутлунина Наталья Анатольевна,
Уральский государственный университет им. А.М. Горького

Ведущая организация – Марийский государственный университет

Защита состоится «25» ноября 2008 г. в 13 часов 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; адрес сайта Института: http://www.ipae.uran.ru
E-mail: common@ipae.uran.ru

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

Автореферат разослан «20» октября 2008 г.

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

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Представители рода *Abies* являются ключевыми элементами темнохвойных лесов Дальнего Востока, Сибири, Урала и северо-востока Европейской России. Их генетическая изменчивость сформировалась как продукт взаимодействия ряда эволюционных факторов, среди которых важную роль играли циклические сокращения и расширения ареалов, пути миграций и вторичные контакты родственных видов.

Рассматриваемые в работе виды *Abies* существенно различаются по величине и истории формирования ареалов. Пихта сибирская (*Abies sibirica* Ledeb.) имеет наибольший среди видов пихт ареал, при этом вид остается наименее изученным из основных лесообразующих хвойных России. Решение задач внутривидовой систематики и систематики на уровне близких видов особенно актуально для пихт Дальнего Востока.

Предыдущие генетические исследования некоторых видов пихт (*A. sibirica, A. nephrolepis, A. sachalinensis*), проведенныё с помощью аллозимных маркеров, охватывали лишь часть их ареала (Экарт, 2006; Потенко, 2004), либо основывались на ограниченном материале (Гончаренко, Падутов, 1995; Гончаренко, Савицкий, 2000). Для выявления факторов, влияющих на популяционно-генетическую структуру, на пути формирования современных популяций, а также для решения задач систематики необходимы сравнительные исследования этих видов с использованием репрезентативных выборок, представляющих основные части ареалов видов, с привлечением различных типов генетических маркеров.

Особенно важным для проблемы сохранения биоразнообразия является изучение состояния генофонда редких видов, таких, как камчатский эндемик пихта изящная *A. gracilis* Kom.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось изучение величины и структуры генетической изменчивости пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.), пихт белокорой (*A. nephrolepis* (Trautv.) Maxim.) и сахалинской (*A. sachalinensis* Fr. Schmidt), определение родственных связей между ними, а также с другими североазиатскими видами пихт – *A. holophylla* Maxim. и *A. gracilis* Kom.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать аллозимную изменчивость и изменчивость хлоропластных микросателлитных локусов в популяциях рассматриваемых видов пихт.

2. Определить и сравнить параметры внутрипопуляционной изменчивости видов пихт по двум типам генетических маркеров, величину и географическую структуру внутривидовой генетической дифференциации популяций пихт сибирской, белокорой и сахалинской.

3. Определить степень межвидовой генетической дифференциации и родственные связи между североазиатскими видами пихт.

4. Выявить следы динамики ареалов, миграционных процессов и межвидовых гибридизаций прошлого в современной величине и структуре генетической изменчивости изучаемых видов.

Научная новизна. Впервые с использованием аллозимных маркеров исследованы внутривидовое разнообразие и дифференциация популяций пихты сибирской на протяжении всего ареала. Проведено изучение дифференциации популяций пихты сахалинской на всем протяжении российской части ареала вида, и впервые с использованием аллозимных маркеров показано существование гибридной зоны пихт белокорой и сахалинской на о. Сахалин. Впервые изучена изменчивость хлоропластных микросателлитных локусов у пяти североазиатских видов пихт. Впервые с помощью генетических маркеров проведено исследование популяции пихты изящной на Камчатке. Впервые выполнено сравнительное популяционно-таксономическое исследование видов пихт с использованием двух типов генетических маркеров.

Практическое значение. Полученные данные о генетическом разнообразии и внутривидовой подразделённости пихты сибирской и дальневосточных видов пихт может послужить основой для разработки программ по сохранению биологического разнообразия данных видов. Результаты изучения изменчивости двух типов генетических маркеров могут быть использованы для дальнейших популяционно-таксономических исследований различных видов пихт.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Пихта сибирская в пределах ареала имеет невысокое разнообразие по различным типам молекулярных маркеров и характеризуется значительной, исторически обусловленной дифференциацией популяций отдельных частей ареала.

2. Географическая структура генетической изменчивости пихт сахалинской и белокорой предполагает существование на Сахалине зоны интрогрессивной гибридизации этих двух видов.

3. Особенности изменчивости ядерных и цитоплазматических маркеров пихты изящной подтверждают её видовой статус и характеризуют процесс генетического обеднения единственной популяции этого вида.

4. Особенности внутривидового разнообразия и дифференциации популяций исследуемых видов пихт связаны с их историей, включая прошлые события вымирания, реколонизации и гибридных контактов родственных видов.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на межрегиональной научно-практической конференции «Горные экосистемы Южной Сибири: изучение, охрана, рациональное природопользование» (Барнаул, 2005); на IX Всероссийском популяционном семинаре «Особь и популяция – стратегия жизни» (Уфа, 2006); на Международной конференции «Лесные экосистемы Северо-Восточной Азии и их динамика» (Владивосток, 2006); на 1-ом Международном совещании по сохранению лесных генетических ресурсов в Сибири (Барнаул, 2007); на международном симпозиуме “Modern achievement in population, evolutionary and ecological genetics” Vladivostok, Russia, 2007.

Публикации. По материалам исследований опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 в журналах, рекомендованных ВАК.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, шести глав, выводов, списка литературы, включающего 284 наименования, из которых 130 на иностранных языках, и приложений. Объем работы 220 страниц,

основное содержание изложено на 154 страницах компьютерного текста, содержит 23 таблицы и 24 рисунка. В приложения внесены 9 таблиц и 3 рисунка.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биологические особенности рода *Abies*. Систематика и история формирования ареалов изучаемых видов пихт. В разделе дается подробная характеристика географического распространения, таксономического положения, морфологических и экологических особенностей пяти видов пихт, произрастающих на территории России, в Сибири, на Дальнем Востоке и на Камчатке (Комаров, 1901; Толмачев, 1956; Турков, Шамшин, 1963; Маценко, 1964; Воробьев, 1968; Liu, 1972; Бобров, 1978; Раскатов, Науменко, 1978; Науменко, 1981; Пихта, 1986; Farjon, Rushforth, 1989; Нешатаева, Фет, 1994; Недолужко, 1995; Коропачинский, Встовская, 2002; Урусов, 2002; Крестов, Верхолат, 2003; Orlova, Firsov, 2004; Nakamura, Krestov, 2005; и др.). Рассмотрены работы, касающиеся исследования морфологической изменчивости данных видов (Крылов, 1961; Бухтеева, 1963; Киргизов, 1974; Урусов, 1988; Ветрова, 1992; Кокорин, Милютин, 2003; и др.). Дан обзор естественной межвидовой гибридизации *Abies*. Анализируется история формирования ареалов изучаемых видов. Отмечается, что вопросы систематики видов пихт, произрастающих на Сахалине, Курилах и Камчатке, до сих пор остаются невыясненными.

1.2. Использование изоферментных маркеров в изучении внутривидовой и межвидовой дифференциации видов рода *Abies*. В подглаве детально рассматриваются работы по генетическому разнообразию, внутри- и межвидовой дифференциации различных представителей рода *Abies* (Jacobs et al., 1984; Fady, Conkle, 1993; Nagasaka et al., 1997; Suyama et al., 1997; Scaltsoyiannes et al., 1999; Гончаренко,1999; Гончаренко, Савицкий, 2000; Aguirre-Planter et al., 2000; Shea, Furnier, 2002; Потенко, 2004; Экарт, 2006; Экарт, Ларионова, 2006; и др.).

1.3. Применение маркеров ДНК для изучения систематики, филогении и филогеографии *Abies*. Раздел посвящен характеристике некоторых маркеров ДНК, применяемых в популяционной генетике хвойных. Подробно рассматриваются уровни полиморфизма хлоропластных микросателлитов (cpSSR) у хвойных и перспективность использования cpSSR маркеров в исследовании динамики популяций и филогеографии видов рода *Abies*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Видовой состав, местоположение и характеристика выборок

В разделе приведены характеристики изученных популяций пяти видов пихт. У пихты сибирской изучена 41 выборка из естественных популяций, представляющих основные части ареала вида, включая как горные, так и равнинные районы (рис. 1; табл. 1). Пять популяций пихты белокорой исследованы в российской части ареала вида. Пихта сахалинская представлена 12 выборками на о-вах Сахалин и Кунашир. На Сахалине выборки происходили из разных ботанико-географических районов острова. Выборка 25 деревьев *A. gracilis* получена из рощи в Кроноцком заповеднике (полуостров Камчатка). Выборка *A. holophylla* была собрана в окр. г. Владивостока (рис.1; табл.2).

2.2. Материалы и методы, использованные в анализе изменчивости аллозимных локусов. Изучение аллозимного полиморфизма видов пихт проводилось с применением электрофореза в полиакриламидном геле. Подготовка проб и электрофорез белков осуществлялись в соответствии с методикой (Shurkhal et al., 1992). Для экстракции ферментов 200 мг почек и/или хвои растирались в 1 мл экстрагирующего буфера. Образцы электрофоретически разделяли в 6.4 % полиакриламидном геле в вертикальных камерах с использованием трис-ЭДТА-боратной буферной системы (pH 8.0) (Peackok et al., 1965). Гистохимическое окрашивание ферментов проводилось по стандартным методикам (Harris, Hopkinson, 1976; Генетика изоферментов, 1977; Hillis et al., 1996), с незначительными изменениями. Локусы и аллели обозначали по Ф. Айала (1984).

На основании аллозимных фенотипов устанавливали соответствующие им генотипы. С использованием программы BIOSIS-2 (Swofford, Selander, 1981) вычислялись частоты аллелей и стандартные параметры генетической изменчивости: среднее число аллелей на локус (A), процент полиморфных локусов при 100% (P_{100}) и 95% (P_{95}) критериях полиморфности, средняя наблюдаемая (H_o) и ожидаемая из равновесия Харди-Вайнберга (H_e) гетерозиготность. Тесты на соответствие наблюдаемого генотипического распределения ожидаемому из соотношения Харди-Вайнберга и тест на гетерогенность изученных популяций по частотам аллелей осуществлялись с помощью алгоритмов, предусмотренных в пакете программ GENEPOP, ver 1.2. (Raymond, Rousset, 1995). Коэффициент инбридинга F в популяциях вычислялся как (H_e - H_o)/ H_e. Для анализа структуры и степени подразделённости популяций видов пихт использовались F-статистики Райта (Wright, 1965). Индексы фиксации Райта F_{IT}, F_{IS}, F_{ST} (Nei, 1977), в том числе по иерархической схеме, и генетические дистанции Неи (D) между популяциями (Nei,1978) были рассчитаны с использованием программы BIOSYS-2. Матрицы значений D были использованы проведения кластерного анализа методом невзвешенных парногрупповых средних (UPGMA) (Sneath, Sokal, 1973), а также для ординации популяций с применением анализа главных координат в программе NTSYS-pc (Rohlf, 1998). Для анализа связи между географическими и генетическими расстояниями использовался тест Мантела (Mantel, 1967; Sokal, Rohlf, 1994) в программе NTSYS-pc.

2.3. Материалы и методы, использованные в анализе изменчивости хлоропластной ДНК с помощью микросателлитных локусов. Изменчивость хлоропластных микросателлитных (cpSSR) локусов была изучена в 32 выборках *A. sibirica* (см. указанные в табл. 1; выборки №39- 41 обозначены на рис. 1).

Исследованы 4 выборки *A. nephrolepis* (табл. 2, кроме №3`) и 11 выборок *A. sachalinensis* (кроме №17`), а также *A. gracilis* и *A. holophylla.* Во всех выборках дальневосточных видов и в 31 выборке пихты сибирской (табл. 1) ранее проводился аллозимный анализ с использованием тех же особей.

Выделение ДНК проводилось с помощью метода CTAB (A genetic linkage..., 1996). Для этого использовали твердый осадок, образовавшийся в результате центрифугирования при экстракции белков для аллозимного анализа из хвои и почек. Из 10 пар олигонуклеотидных праймеров, разработанных Дж. Вендрамином с соавт. (A set of primers..., 1996) на основе полного сиквенса

Таблица 1. Географические координаты 38 популяций пихты сибирской *Abies sibirica* и значения показателей генетического разнообразия, вычисленные на основании частот аллелей 15 аллозимных локусов

№	Популяции	Координаты с.ш. в.д.	*n*	*A*	P_{100}, %	H_o	H_e	F
1*	Печора	65°07'/ 57°06'	12.0	1.33	20	0.078 ± 0.043	0.087 ± 0.047	0.103
2*	Манья	64°30'/ 60°50'	38.7	1.33	20	0.101 ± 0.055	0.089 ± 0.049	-0.135
3*	Печоро-Илыч. з.	61°50'/ 57°00'	48.6	1.33	20	0.078 ± 0.045	0.090 ± 0.052	0.133
4*	Денежкин Кам.	60°09'/ 59°57'	28.6	1.33	20	0.077 ± 0.048	0.083 ± 0.052	0.072
5*	Конжак. Камень	59°40'/ 59°10'	49.6	1.33	20	0.072 ± 0.046	0.084 ± 0.053	0.143
6*	Кушва	58°18'/ 59°41'	36.4	1.27	13.3	0.068 ± 0.048	0.066 ± 0.048	-0.030
7*	Хомутовка	56°48'/ 59°57'	47.6	1.33	20	0.068 ± 0.058	0.066 ± 0.055	-0.030
8*	Чусовой	57°17'/ 57°49'	40,9	1.33	20	0.076 ± 0.052	0.075 ± 0.051	-0.013
9*	Вятка	58°36'/ 49°38'	47.8	1.33	20	0.066 ± 0.043	0.068 ± 0.045	0.029
10*	Йошкар-Ола	56°42'/ 47°55'	47.1	1.33	20	0.067 ± 0.044	0.077 ± 0.051	0.130
11*	Сим	54°59'/ 57°41'	76.1	1.27	13.3	0.072 ± 0.049	0.071 ± 0.049	-0.014
12*	Инзер	54°14'/ 57°35'	47.9	1.27	13.3	0.071 ± 0.051	0.066 ± 0.047	-0.076
13*	Октябрьское	62°27'/ 66°03'	49.8	1.33	20	0.077 ± 0.050	0.082 ± 0.053	0.061
14*	Ханты-Мансийск	61°01'/ 69°02'	50.7	1.33	20	0.083 ± 0.054	0.073 ± 0.048	-0.137
15*	Тобольск	58°09'/ 68°15'	48.7	1.33	20	0.069 ± 0.045	0.072 ± 0.047	0.042
16	Салым	60°09'/ 71°29'	48.0	1.33	20	0.068 ± 0.045	0.075 ± 0.048	0.093
17	Почекуйка	61°15'/ 73°30'	47.8	1.27	13.3	0.066 ± 0.045	0.072 ± 0.049	0.083
18*	Ноябрьск	63°04'/ 75°10'	48.0	1.40	20	0.072 ± 0.046	0.076 ± 0.049	0.053
19	Высокий	61°10'/ 75°58'	47.9	1.33	20	0.062 ± 0.039	0.068 ± 0.044	0.088
20	Каргасок	58°55'/ 80°40'	47.9	1.33	20	0.083 ± 0.051	0.078 ± 0.048	-0.064
21	Бакчар	57°'01/ 82°21'	48.0	1.33	20	0.058 ± 0.039	0.065 ± 0.044	0.108
22	Тегульдет	57°19'/ 88°12'	48.0	1.33	20	0.093 ± 0.060	0.083 ± 0.053	-0.120
23*	Туруханск	65°48'/ 87°59'	48.0	1.33	20	0.086 ± 0.050	0.088 ± 0.051	0.023
24	Бор	61°36'/ 90°02'	47.8	1.33	20	0.092 ± 0.052	0.088 ± 0.050	-0.045
25*	Ярцево	60°14'/ 90°15'	48.0	1.33	20	0.081 ± 0.050	0.075 ± 0.047	-0.080
26	Енисейск	58°26'/ 92°09'	48.0	1.33	20	0.081 ± 0.052	0.079 ± 0.051	-0.025
27*	Колывань	51°15'/ 82°34'	54.4	1.27	13.3	0.057 ± 0.039	0.071 ± 0.049	0.197
28*	Карасук	51°58'/ 85°57'	49.7	1.33	20	0.080 ± 0.050	0.088 ± 0.055	0.091
29*	Артыбаш	51°48'/ 87°15'	45.9	1.40	20	0.080 ± 0.053	0.086 ± 0.054	0.070
30*	Салаир	53°35'/ 85°50'	48.8	1.33	20	0.081 ± 0.052	0.082 ± 0.053	0.012
31*	Кемерово	55°40'/ 86°05'	93.5	1.33	20	0.074 ± 0.050	0.077 ± 0.052	0.039
32	Мыски	53°40'/ 87°45'	49.6	1.33	20	0.076 ± 0.044	0.088 ± 0.053	0.136
33*	Дивногорск	55°55'/ 92°30'	48.8	1.33	20	0.093 ± 0.053	0.094 ± 0.054	0.011
34*	Танзыбей	53°07'/ 92°56'	51.3	1.33	20	0.086 ± 0.052	0.090 ± 0.055	0.044
35*	Тайшет	55°57'/ 98°00'	44.0	1.33	20	0.091 ± 0.057	0.093 ± 0.054	0.022
36*	Слюдянка	51°38'/ 103°42'	76.7	1.33	20	0.102 ± 0.055	0.097 ± 0.053	-0.052
37*	Улан-Удэ	51°50'/ 107°36'	37.1	1.33	20	0.077 ± 0.042	0.087 ± 0.047	0.115
38*	Сохондинский	49°30'/ 111°00'	40.0	1.33	20	0.097 ± 0.052	0.090 ± 0.048	-0.078
	в целом		1837.7	1.47	20			
	Среднее		48.4 ±12.6	1.33 ±0.03	18.9	0.078 ± 0.011	0.080 ± 0.009	0.025

Примечания: * – в выборках, кроме аллозимного анализа, проведен анализ изменчивости хлоропластных микросателлитов; *n* – средний размер выборки на локус, *A* – среднее число аллелей на локус, P_{95} и P_{100} – процент полиморфных локусов при 95% и 100% критериях полиморфизма, H_o – средняя наблюдаемая гетерозиготность, H_e – средняя ожидаемая гетерозиготность, F – коэффициент инбридинга в популяции

Таблица 2. Значения основных показателей генетической изменчивости в популяциях пихт белокорой, сахалинской, изящной и цельнолистной, вычисленные на основании частот аллелей 11 аллозимных локусов

№	Название видов и популяций	Координаты с.ш.	Координаты в.д.	n	A	P_{95}, %	P_{100}, %	H_o	H_e	F
	A. nephrolepis									
1`	Облучье	49°00'	131°05'	47.8	1.4±0.2	18.2	27.3	0.090±0.057	0.093±0.059	0.032
2`	Бычиха	48°18'	134°45'	47.1	1.5±0.2	18.2	45.5	0.070±0.039	0.086±0.051	0.186
3`	Архиповка	43°44'	133°52'	29.3	1.3±0.2	18.2	18.2	0.067±0.045	0.089±0.060	0.247*
4`	Владивосток	43°16'	132°03'	22.0	1.3±0.1	18.2	27.3	0.074±0.047	0.083±0.052	0.108
5`	Кедровая падь	43°02'	131°32'	21.0	1.4±0.2	18.2	27.3	0.056±0.039	0.062±0.046	0.097
	в целом			167.2	1.8±0.3	18.2	54.5			
	среднее для *A. nephrolepis*			33.4 ±13.2	1.4±0.1	18.2	29.1	0.071±0.012	0.083±0.012	0.145*
	A. sachalinensis									
6`	Оха	53°34'	142°56'	18.5	1.5±0.2	27.3	45.5	0.099±0.048	0.101±0.049	0.020
7`	Ноглики	51°50'	143°00'	20.5	1.3±0.1	27.3	27.3	0.129±0.067	0.108±0.056	-0.194
8`	Тымовское	50°44'	142°43'	18.5	1.5±0.2	36.4	45.5	0.090±0.035	0.100±0.042	0.100
9`	Известковый	49°57'	143°23'	57.1	1.6±0.2	45.5	54.5	0.115±0.045	0.109±0.040	-0.055
10`	Макаров	48°39'	142°51'	37.0	1.6±0.2	36.7	63.6	0.076±0.028	0.078±0.028	0.026
11`	Южно-Сахалинск	47°00'	142°47'	33.7	1.7±0.2	27.3	63.6	0.100±0.042	0.091±0.037	-0.099
12`	Охотское	46°50'	143°10'	17.6	1.5±0.2	36.4	54.5	0.109±0.046	0.108±0.046	-0.009
13`	Озёрский	46°40'	143°10'	19.7	1.6±0.2	27.3	54.5	0.101±0.050	0.093±0.046	-0.086
14`	Невельск	46°40'	141°52'	37.6	1.5±0.2	27.3	36.4	0.084±0.052	0.076±0.044	-0.105
15`	Южно-Курильск	44°01'	145°52'	19.1	1.6±0.2	364	54.5	0.095±0.035	0.101±0.035	0.059
16`	Третьяково	44°00'	145°39'	22.5	1.6±0.2	36.4	54.5	0.088±0.032	0.086±0.032	-0.023
17`	Столбчатый	44°01'	145°42'	22.4	1.8±0.2	45.5	63.6	0.106±0.034	0.109±0.034	0.028
	в целом			324.2	2.2±0.3	54.5	72.7			
	среднее для *A. sachalinensis*			27.0 ±12.0	1.6±0.1	34.1	51.5	0.099±0.014	0.097±0.012	-0.021
18`	*A. gracilis* Кроноцкий з-к	54°07'	159°59'	25.0	1.4±0.2	36.4	36.4	0.102±0.045	0.135±0.059	0.244*
19`	*A. holophylla* Владивосток-2	43°10'	132°00'	20.9	1.3±0.1	27.3	27.3	0.097±0.051	0.117±0.061	0.170
	A. sibirica[a], 38 выборок (табл.1)			48.2	1.48	26.1	27.3	0.107±0.015	0.109±0.012	0.025*

Примечания: * - значимо на уровне $P<0.05$; [a] - значения посчитаны по 11 локусам.

хлоропластного генома сосны Тунберга (*Pinus thunbergii*), изменчивыми и устойчиво амплифицируемыми у *A. sibirica* были признаны локусы Pt71936 и Pt30204, которые использовались в дальнейшем. После проведения ПЦР-реакции амплифицированные фрагменты разделялись в 6% полиакриламидном денатурирующем геле и выявлялись посредством серебряного окрашивания. Варианты размеров (аллели) хлоропластных микросателлитных фрагментов ти-

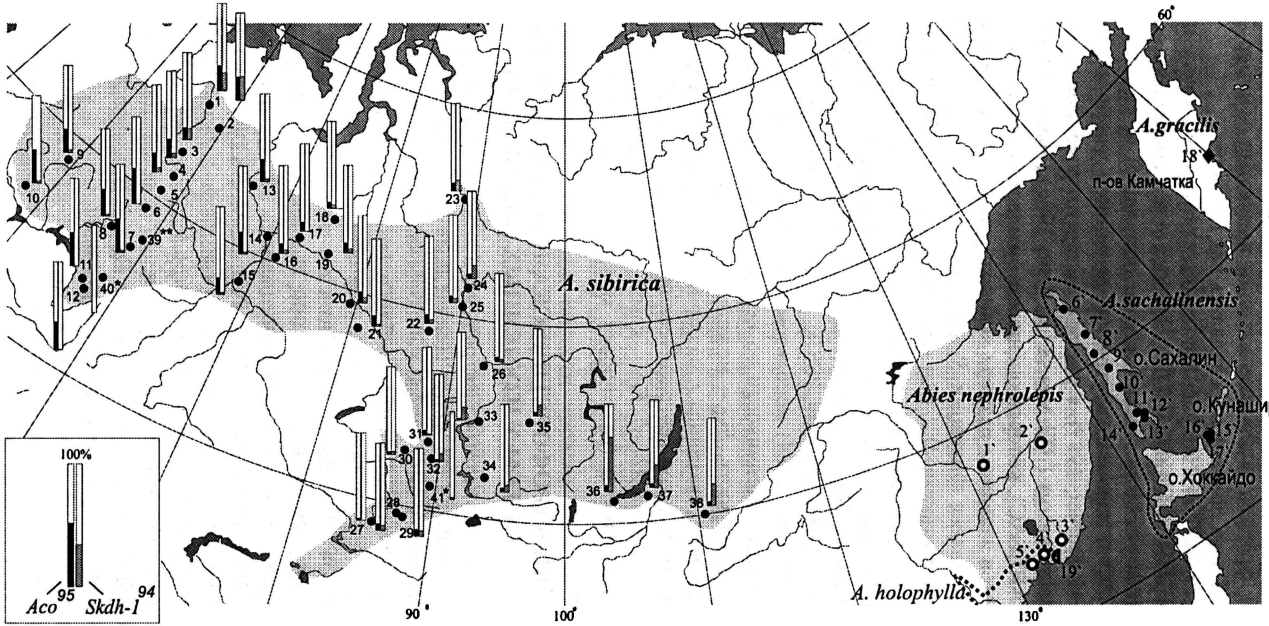

Рис.1. Ареалы изученных видов ***Abies*** и расположение выборок, изученных с помощью аллозимного анализа и анализа изменчивости хлоропластных микросателлитных локусов (обозначение в тексте). На столбчатых диаграммах показано распределением частот аллеля *Aco*^{95} (левый столбец) и аллеля *Skdh*^{94} (правый столбец) в выборках пихты сибирской. * - в выборках отсутствуют данные по локусу *Aco*. ** - отсутствуют данные аллозимного анализа.

пировались визуально. Наиболее короткому варианту в данном локусе присваивался номер 1, фрагменту длиннее на один нуклеотид – номер 2, и т.д. Комбинация аллелей двух локусов определялась как гаплотип.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием пакета программ Arlequine v.2.0 (Schneider et al., 2000). При оценке изменчивости хлоропластных гаплотипов внутри популяций вычислялось общее число гаплотипов (N_o) и параметр внутрипопуляционной изменчивости H (индекс разнообразия Неи) (Nei, 1987), а также стандартизированное разнообразие гаплотипов в популяции r (g)-1 (El Mousadik, Petit, 1996) (вычисленное с помощью программы RAREFAC), которое оценивает ожидаемое число гаплотипов в данной популяции при заданном размере выборки, установленное в данном исследовании как 18. Индекс фиксации R_{ST} вычислялся с учётом генетических дистанций между гаплотипами D_{sh}^2 (An evaluation of ..., 1995). Межпопуляционные парные R_{ST} и G_{ST} (аналог R_{ST}, вычисленный без учёта дистанции между гаплотипами) использовались в качестве межпопуляционных генетических дистанций. Сравнение R_{ST} и G_{ST} осуществлялось посредством алгоритма (Pons, Petit, 1996) и программы PermutCPSSR. Анализ молекулярной вариации AMOVA (Weir, Cockerham, 1984) использовался при изучении 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 (внутри географических групп популяций у *A. sibirica*; или внутри таксонов – видов *Abies*), F_{CT} – компонента изменчивости, связанная с межгрупповыми различиями (различиями между группами популяций, или между видами *Abies*).

ГЛАВА 3. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ АЛЛОЗИМНЫХ СИСТЕМ У ИЗУЧЕННЫХ ВИДОВ *ABIES*

В главе приводятся результаты электрофоретического анализа ферментных систем, изученных у пяти видов *Abies*. Полученные результаты по характеру аллозимной изменчивости у пихт (число наблюдаемых зон активности ферментов, число аллелей у аналогичных видов) в большинстве случаев хорошо согласовывались с данными других авторов. Характер наследования изоферментных систем у разных видов *Abies* ранее описывался в ряде работ (Neale, Adams, 1981; Hussendorfer et al., 1995; Гончаренко, 1999; Потенко, 2004; Экарт, 2006).

В анализе популяций *A. sibirica* использовалось 12 ферментных систем (ACO, ADH, FDH, GDH, GOT, IDH, 6-PGD, PGI, PGM, SKDH, SOD, β–GAL). Хорошо идентифицируется три полиморфных (*Aco, Skdh-1, Pgm-2*) и 12 мономорфных (*Got-1* и *Got-2, Pgi-1* и *Pgi-2, Pgm-1, 6-pgd-2, Fdh, Adh, Gdh, Idh, Sod, β-gal*) локусов. В полиморфных локусах выявлено 10 аллелей. Два аллеля присутствуют в локусе *Skdh-1* и три аллеля в локусе *Pgm-2*. В локусе *Aco* три аллеля встречались во всех выборках, два являлись редкими.

В анализе популяций *A. nephrolepis*, *A. sachalinensis, A. holophylla* и *A. gracilis* использовались 11 локусов, кодирующих восемь ферментных систем (ACO, ADH, GOT, 6-PGD, PGI, PGM, SKDH, β–GAL). Из них 9 локусов было

полиморфными (*Aco, Skdh-1, Pgm-1* и *Pgm-2, Pgi-1* и *Pgi-2, Got-1, 6-pgd-2, Adh*), два локуса являлись мономорфными (*Got-2* и *β-gal*). В полиморфных локусах в популяциях четырёх дальневосточных видов обнаружено 25 аллелей.

ГЛАВА 4. АЛЛОЗИМНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ

4.1. Внутрипопуляционная изменчивость пихты сибирской.

У *A. sibirica* по всем системам было проанализировано 38 выборок (табл. 1). Все изученные популяции демонстрируют невысокий уровень генетического разнообразия. Ожидаемая гетерозиготность H_e в популяциях *A. sibirica* варьирует от 0.065 до 0.097, в среднем составляя 0.080. Доля полиморфных локусов при 100%-ном критерии полиморфности P_{100} изменяется в популяциях от 13.3% до 20% (в среднем 18.9%), среднее число аллелей на локус *A* составляет 1.33. Показатели аллозимной изменчивости в пределах ареала варьируют незначительно. Более высокие значения характерны для популяций пихты сибирской из Прибайкалья и Забайкалья, Северного и Приполярного Урала, Восточного Саяна, несколько меньшие – в Средней Сибири и Восточном Алтае, Кузнецком Алатау. Снижение изменчивости наблюдается в популяциях Западной Сибири, на Южном и Среднем Урале (табл. 1).

Найденная изменчивость оказались меньше значений, указанных для других видов хвойных, распространенных в Сибири: для *Picea obovata* (A = 2.4, P_{95} = 61.5%, H_e = 21.3%) (Krutovskii, Bergmann, 1995), *Larix sibirica* (A = 1.9, P_{99} = 62.2%, H_e = 15.9%) (Semerikov et al., 1999), *Pinus sylvestris* (A = 2.2, P_{99} = 68.9%, H_e=25.5%) (Санников, Петрова, 2003), *P. sibirica* (A = 1.8, P_{95} = 46.2%, H_e = 15.8%) (Политов, 2007). По результатам А.К. Экарта (2006), у *Abies sibirica* в Красноярском крае и Томской области уровень аллозимного полиморфизма также является низким (A = 1.15-1.30, P_{99} = 10-25%, H_e = 4.8-7.2%). Таким образом, пихту сибирскую, несмотря на занимаемый обширный ареал, можно определить как вид с невысокой степенью аллозимного полиморфизма.

В среднем в изученных популяциях пихты сибирской наблюдается очень слабый дефицит гетерозигот (F = 0.025; F_{IS} = 0.013), наблюдаемое генотипическое распределение соответствует ожидаемому из соотношения Харди-Вайнберга во всех изученных географических регионах.

4.2. Межпопуляционная гетерогенность и пространственная дифференциация пихты сибирской по аллозимным локусам. Значения коэффициентов инбридинга особи относительно популяции (F_{IS}), инбридинга особи относительно вида (F_{IT}) и инбридинга популяции относительно вида (F_{ST}) приведены в таблице 3. Коэффициент F_{IS} у всех локусов имеет положительное значение и в среднем составляет 0.013. Показатель подразделённости популяций F_{ST} равен 0.093, то есть 90.7% аллозимной изменчивости у пихты сибирской относится к внутрипопуляционной, а 9.3% приходится на межпопуляционную. Наибольший вклад в дифференциацию популяций вносит локус *Skdh*-1, несколько меньше – локус *Aco*, локус *Pgm-2* – менее значительный. Тем не менее даже для *Pgm-2* на межпопуляционные различия по всему ареалу приходится 6.9%.

Полученное нами для *Abies sibirica* значение F_{ST} = 9.3% оказалось близко к

Таблица 3. Значения *F*- статистик Райта и результаты теста на гетерогенность аллельных частот аллозимных локусов в популяциях изученных видов пихт

Локус	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	*P*
		A. sibirica		
Pgm-2	0.020	0.088	0.069	<0.00001***
Skdh-1	0.033	0.179	0.151	<0.00001***
Aco	0.002	0.102	0.100	<0.00001***
Среднее	**0.013**	**0.105**	**0.093**	<0.00001***
		A. nephrolepis		
Pgm-2	0.1902	0.2168	0.0329	0.02309*
Skdh-1	0.0576	0.1155	0.0614	0.00128**
Aco	-0.0238	-0.0058	0.0176	0.19281
Pgm-1	-0.0105	-0.0029	0.0075	0.62844
Got-1	-0.0112	-0.0032	0.0079	0.65719
6-Pgd-2	-0.0286	-0.0144	0.0138	0.54409
Среднее	**0.1220**	**0.1605**	**0.0438**	0.00535**
		A. sachalinensis		
Pgm-2	-0.0290	0.0850	0.1110	<0.00001***
Skdh-1	-0.1480	0.0070	0.1350	<0.00001***
Aco	-0.0230	-0.0020	0.0210	0.23182
Pgm-1	-0.0610	-0.0260	0.0330	0.00024***
Got-1	-0.0060	0.0410	0.0470	0.00442**
Pgi-1	-0.0930	-0.0230	0.1070	0.00002***
Pgi-2	-0.0020	0.0470	0.0500	0.11676
6-Pgd-2	-0.0730	-0.0270	0.0430	0.12147
Среднее	**-0.0510**	**0.0370**	**0.0830**	<0.00001***

Примечание: уровни значимости отличия F_{ST} от нуля: * P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

оценкам, приводимым для других видов хвойных, имеющих ареалы, близкие к ареалу пихты сибирской: *Pinus sibirica* – 7-10% для всего ареала (Политов, 2007), *Larix sibirica* в широком смысле – 7.9% (Semerikov et al., 1999).

Генетические расстояния *D* (Nei, 1978) между выборками, рассчитанные по частотам аллелей 15 аллозимных локусов, колеблются от 0 до 0.049, составляя в среднем 0.008. Согласно тесту Мантела, значения *D* достоверно коррелируют с географическими расстояниями на всем ареале (r=0.4488, P=0.002). На основе значений генетических дистанций с учётом географического положения выделяется несколько групп популяций пихты сибирской, обособленных по частотам аллелей аллозимных локусов. Дифференциацию выборок и генетические связи между ними иллюстрируют построенные на основе матрицы генетических дистанций ординация популяций (рис.2) и UPGMA-дендрограмма (рис. 3).

Прослеживается обособление уральских популяций, которые, в свою очередь, разделяются на две достаточно удалённые группы. Первая включает очень близкие между собой выборки Южного, Среднего Урала и европейской части России (№6-12). Подразделённость популяций в этой группе низкая (F_{ST}= 0.014, достоверно не отличается от нуля). Вторая группа объединяет

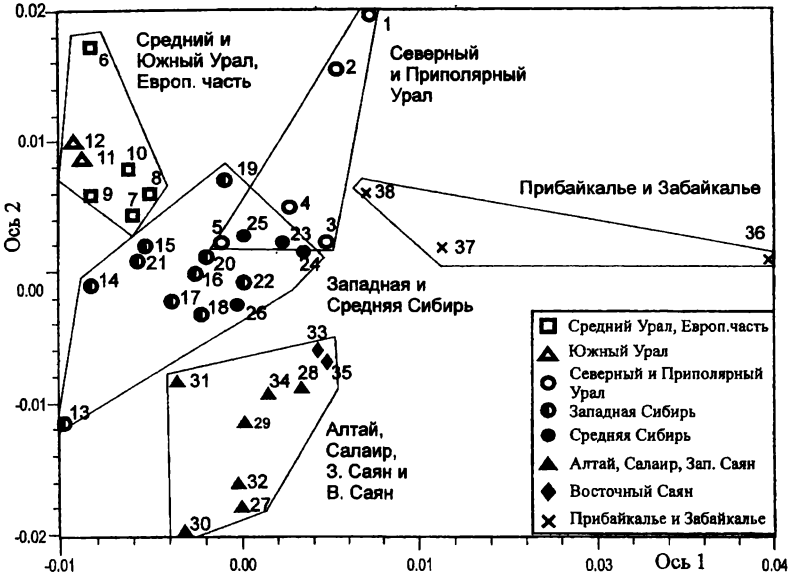

Рис. 2. Ординация 38 популяций пихты сибирской *A. sibirica*, построенная с помощью анализа главных координат и NTSYS-pc на основе матрицы генетических расстояний *D*, Nei (1978)

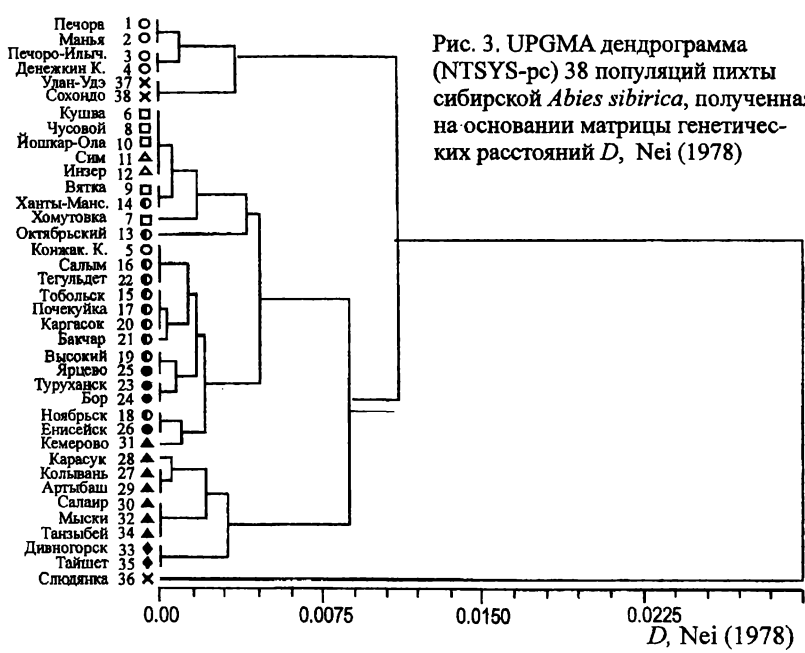

Рис. 3. UPGMA дендрограмма (NTSYS-pc) 38 популяций пихты сибирской *Abies sibirica*, полученная на основании матрицы генетических расстояний *D*, Nei (1978)

Северный и Приполярный Урал (№1-5, F_{ST} =0.031). Выборка с г. Конжаковский Камень (№ 5, Северный Урал) занимает промежуточное положение между выборками Среднего и Северного Урала как географически, так и по значениям генетических дистанций.

Девять выборок юго-восточной части ареала – из горных районов Южной Сибири: Алтая, Салаира, Кузнецкий Алатау, Западного и Восточного Саяна (№28-35) – на ординации также образуют достаточно обособленную группу (F_{ST} =0.031). Из них две популяции Восточного Саяна (Дивногорск и Тайшет) тяготеют к байкальским и енисейским равнинным популяциям, что отражает их положение на ординации. Почти все популяции Южной Сибири группируются в один кластер, за исключением выборки Кемерово (№31), которая близка к западносибирским популяциям.

Выборки из Западной и Средней Сибири по частотам аллелей и, соответственно, на ординации занимают промежуточное между другими группами положение. На равнинной части Сибири имеется небольшая географическая подразделённость, в основном с запада на восток. Выборки из Западной Сибири (особенно из бассейна Иртыша) по частотам аллозимных локусов близки к Среднему Уралу. На дендрограмме почти все популяции Западной и Средней Сибири оказываются в одном слабодифференцированном кластере (рис. 3). Значение F_{ST} в данной группе = 0.033.

Между популяциями Прибайкалья и Забайкалья подразделённость выше, чем в других группах (F_{ST} = 0.046). В Забайкалье между Улан-Удэ и Сохондо (№37-38) практически нет дифференциации, дистанции с выборкой Слюдянка (№36) из Хамар-Дабана гораздо выше. На ординации Слюдянка ближе всего располагается к забайкальским выборкам (рис. 2). На дендрограмме данная популяция оказывается наиболее дивергентной (рис. 3). Выборки Забайкалья объединяются в один кластер с североуральскими популяциями.

В таблице 4 представлены генетические дистанции внутри- и между выделенными нами географическими группами популяций пихты сибирской. Внутри отдельных географических областей многие выборки слабо дифференцируются между собой, демонстрируя близкие к нулю генетические дистанции (0.001-0.002 во всех группах, кроме байкальских популяций). Дистанции между географическими группами популяций в среднем на порядок выше, однако степень дифференциации между отдельными группами значительно варьирует. Низкие различия наблюдаются между группой сибирских равнинных популяций, и группой южно- и среднеуральских популяций (в среднем 0.004), а также с южносибирской группой (0.006). Высокие дистанции с другими группами характерны для байкальских популяций. Максимальная дифференциация выражена между выборками байкальского региона и популяциями пихты южно- и среднеуральской географической группы (0.028), что отражает значительную географическую удаленность этих регионов.

Иерархический анализ распределения генетической изменчивости внутри и между выделенными группами популяций *A. sibirica*, проведенный с помощью *F* – статистик, показал, что при общей доле межвыборочной изменчивости 8.2%

Таблица 4. Средние значения межпопуляционных генетических дистанций *D* (Nei, 1978) внутри и между выделенными географическими группами популяций пихты сибирской. Амплитуды колебаний приведены в скобках.

Группы	N*	1	2	3	4	5
1. Сев., Приполярный Урал	5	0.002 (0.000-0.007)				
2. Средний, Южный Урал, Европ. часть	7	0.010 (0.001-0.019)	0.001 (0.000-0.003)			
3. Западная и Средняя Сибирь	14	0.008 (0.000-0.025)	0.004 (0.000-0.010)	0.002 (0.000-0.011)		
4. Южная Сибирь	9	0.009 (0.002-0.024)	0.013 (0.005-0.021)	0.006 (0.000-0.016)	0.002 (0.000-0.009)	
5. Прибайкалье и Забайкалье	3	0.010 (0.002-0.033)	0.028 (0.012-0.049)	0.019 (0.001-0.049)	0.018 (0.003-0.039)	0.006 (0.000-0.011)

Примечания: посчитано по 15 аллозимным локусам, *- N – число изученных популяций

на изменчивость между выделенными пятью группами (F_{CT}) приходится 6.1%, в то время как всего 2.3% всей изменчивости приходится на различия между популяциями внутри данных групп (F_{SC}). То есть большая часть межпопуляционной аллозимной изменчивости соответствует различиям между географическими группами популяций пихты сибирской.

4.3. Частоты аллелей полиморфных локусов в природных популяциях пихты сибирской и клинальная изменчивость в пределах ареала. Результаты проведённого теста на гетерогенность частот (табл. 3) показали достоверную вариацию аллельных частот между популяциями *A. sibirica* по трем полиморфным аллозимным локусам с высокой степенью достоверности. По всем трем локусам (*Aco*, *Skdh-1*, в меньшей степени *Pgm*-1) в пределах ареала пихты сибирской наблюдалась географическая, в том числе клинальная изменчивость.

В локусе *Aco* прослеживается выраженная географическая динамика частот трёх аллелей. Наиболее показательно изменяется частота аллеля Aco^{95}, для которого характерна клинальная изменчивость с западной части ареала на восток (рис. 1): самая высокая частота этого аллеля, составляющая в среднем 30%, наблюдается в восточноевропейских и уральских популяциях. Далее на восток наблюдается постепенное снижение его частоты, и в байкальских популяциях она составляет в среднем 5%.

Значительная дифференциация популяций выявлена по частотам двух аллелей локуса *Skdh-1*, почти во всех частях ареала пихты сибирской наблюдается клинальная изменчивость по данным аллелям. Частота аллеля $Skdh\text{-}1^{94}$ меняется от значений, близких к нулю, на Среднем, Южном Урале и на Алтае, до 56% в Прибайкалье (Слюдянка, №36). При этом повышенные частоты этого аллеля наблюдаются на Приполярном и Северном Урале, в Восточном Саяне, в нижнем течении р. Енисей, и особенно в Прибайкалье и Забайкалье (рис. 1).

Выделение на основании частот аллелей аллозимных локусов нескольких географически обособленных групп популяций пихты сибирской указывает на возможность существования во время последнего ледникового максимума нескольких рефугиумов пихты. Сопоставление наших данных с палеоботаниче-

скими материалами позволяет сделать некоторые заключения, касающиеся истории вида в позднем плейстоцене и голоцене, и подтверждает наличие таких рефугиумов на Урале, в Южной Сибири и в Прибайкалье.

Специфика аллельного состава аллозимных локусов (особенно высокая частота аллеля Aco^{95}) в популяциях пихты на Урале, отделяющая уральские группы популяций от других частей ареала пихты сибирской, говорит о длительном сохранении и обособлении популяций пихты в этом регионе, что подтверждает мнение о существовании рефугиума темнохвойной растительности, в том числе пихты, на Южном и Среднем Урале. Очевидная идентичность восточноевропейских популяции пихты со средне- и южноуральскими указывает на недавнее (голоценовое) расселение пихты с Урала на Русскую равнину.

Обособление приполярно- и североуральских популяций от средне- и южноуральских ставит вопрос об их происхождении. Повышенная частота аллеля Aco^{95} свидетельствует о вкладе в их формирование южноуральского рефугиума пихты. В то же время высокая частота аллеля $Skdh\text{-}1^{94}$ заставляет предполагать участие и байкальского рефугиума (только в Прибайкалье частота этого аллеля достаточно велика).

ГЛАВА 5. АЛЛОЗИМНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ, ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ И ПРОЦЕССЫ ГИБРИДИЗАЦИИ У ВИДОВ ПИХТ БЕЛОКОРОЙ, САХАЛИНСКОЙ, ИЗЯЩНОЙ И ЦЕЛЬНОЛИСТНОЙ

5.1. Внутрипопуляционное разнообразие. Для дальневосточных видов пихт показатели аллозимного полиморфизма были рассчитаны на основании аллельных частот 11 локусов (табл. 2). Девять локусов были полиморфны хотя бы в одной популяции. Локус *Adh* был изменчив (два аллеля) только у *A. holophylla*. Локус *Aco* мономорфен везде, кроме двух популяций *A.nephrolepis* и одной *A. sachalinensis* (два аллеля). *6-Pgd-2* был малоизменчив с тремя аллелями у *A. nephrolepis* и *A. sachalinensis,* и высоко изменчив у *A. holophylla* и *A. gracilis* (два аллеля). Локусы *Pgi-1* и *Pgi*-2 были мономорфны у *A. holophylla, A. nephrolepis* и у *A. sachalinensis* на севере Сахалина, и изменчивы на юге Сахалина (два и три аллеля соответственно), *Pgi*-2 был также изменчив у *A. gracilis*. Локус *Pgm-1* являлся слабополиморфным у *A. nephrolepis* (два аллеля) и *A. sachalinensis* (4 аллеля), и изменчивым у *A. holophylla* (2 аллеля). Локусы *Skdh-1* (3 аллеля) и *Pgm-2* (3 аллеля) были более изменчивы у *A. nephrolepis* и *A. sachalinensis* на севере Сахалина по сравнению с южным Сахалином, по два аллеля обнаружено у *A. gracilis*. Локус *Got-1* был полиморфным у *A. sachalinensis* (три аллеля).

Значения полиморфизма в среднем для 12 выборок *A. sachalinensis* (A = 1.57, P_{100} = 51.5 %, H_e = 0.097) оказались выше, чем в пяти выборках *A. nephrolepis* (среднее A = 1.38, P_{100}= 29.1%, H_e= 0.083). При сравнительно невысоких значениях гетерозиготности в популяциях, у пихт белокорой и сахалинской обнаружено больше изменчивых локусов (P_{100} в целом 54.5% и 72.7% соответственно) и большее число аллелей, чем у пихты сибирской.

У *A. sachalinensis* и *A. holophylla* не выявлено отклонения от распределения Харди-Вайнберга. У *A. nephrolepis* был обнаружен значимый дефицит гетерозигот (F=0.145; P=0.0133), однако достоверное отклонение выявлено только в од-

ной выборке Архиповка (№ 4`), и по локусу *Pgm-2* в целом для вида.

У *A. gracilis* при невысоких, по сравнению с *A. sachalinensis*, значениях полиморфизма (A=1.4, P_{100}=36.4%), в четырех полиморфных локусах изменчивость высокая, и значения гетерозиготности достаточно большие (H_o= 0.102, H_e=0.135). Обнаруженный достоверный недостаток гетерозигот в выборке *A. gracilis* (P=0.0292, значимый по трем локусам), максимальный среди исследованных нами популяций пихт, и его возможные причины требуют дальнейшего изучения для выработки рекомендаций по сохранению генофонда *A. gracilis*.

5.2. Межпопуляционная дифференциация пихт белокорой и сахалинской. Подразделенность 12 изученных популяций *A. sachalinensis* (F_{ST} =0.083) оказалась заметно выше, чем пяти популяций *A. nephrolepis* (F_{ST} =0.0438) (табл.3). Среднее значение генетических дистанций между популяциями у *A. sachalinensis* (D = 0.008) также выше, чем у *A. nephrolepis* (D = 0.005).

Генетические дистанции между популяциями *A. sachalinensis*, согласно тесту Мантела, достоверно коррелируют с географическими расстояниями между ними (P = 0.012). Наибольшие различия наблюдаются между выборками северного и южного Сахалина (дистанции от 0.024 до 0.034).

Генетические отношения *A. nephrolepis* и *A. sachalinensis* иллюстрируют построенные на основе генетических дистанций D ординация популяций и UPGMA – дендрограмма (рис. 4, 5). На дендрограмме популяции северной части Сахалина (Оха, Ноглики, Тымовское) объединяются в один кластер с популяциями *A. nephrolepis*, а другой кластер составляют выборки южного Сахалина и о. Кунашир. На ординации выявляется постепенный переход между континентальными популяциями *A. nephrolepis*, и *A. sachalinensis* северного, среднего и южного Сахалина. Частоты большинства локусов, по которым наблюдаются значительные различия между *A. nephrolepis* и *A. sachalinensis* (*Pgm-2, Skdh-1, Pgm-1, Pgi-1, Pgi*-2), демонстрируют клинальную изменчивость в ряду популяций: континент – северный Сахалин – южный Сахалин и Кунашир.

Обнаруженная структура изменчивости наиболее соответствует гипотезе интрогрессивной гибридизации континентальной пихты белокорой с популяциями пихты юга Сахалина, Курил и Хоккайдо. От северного к южному Сахалину наблюдается постепенный переходный ряд аллозимной изменчивости между популяциями: генетические дистанции между двумя соседними выборками не превышают 0.005. Прослеживается тенденция к увеличению изменчивости в выборках центрального Сахалина и к снижению разнообразия на севере острова, а также в самых южных изученных на Сахалине популяциях. Показателен в этом отношении Невельск (№14`, Крильонский р-он), где отсутствует изменчивость в полиморфных на континенте локусах *Skdh-1*, *Pgm-2*, и, таким образом, влияние гибридизации минимально. Между собой выборки из южных и центральных районов Сахалина очень близки, и наши данные не поддерживают точку зрения о сосуществовании на Сахалине и Курилах двух видов – пихты сахалинской и пихты Майра (*A. mayriana* (Miyabe et Kudo) Miyabe et Kudo.).

Гибридное происхождение популяций пихты на Сахалине позволяет объяснить повышенное морфологическое разнообразие в популяциях пихты из центрального и южного Сахалина и с о-ва Кунашир. Полученные результаты

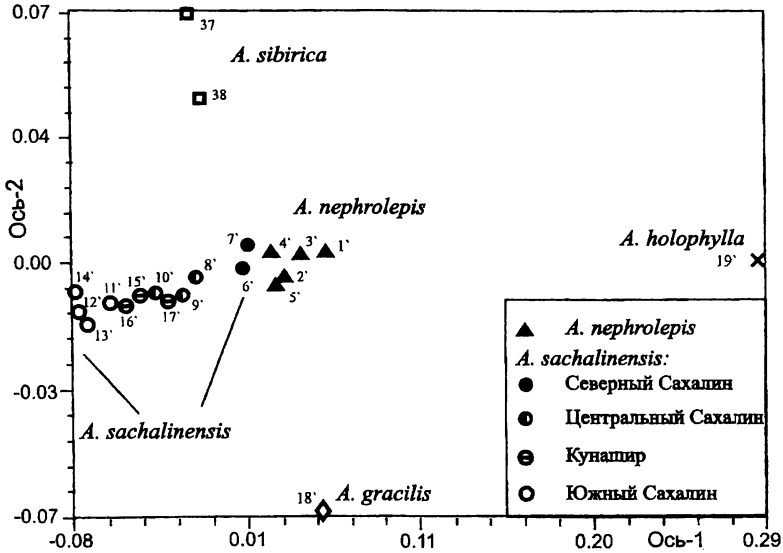

Рис. 4. Ординация изученных популяций *A. nephrolepis*, *A. sachalinensis*, *A. gracilis*, *A. holophylla* и двух популяций *A. sibirica*, построенная с помощью анализа главных координат на основании матрицы генетических расстояний *D*, Nei (1978)

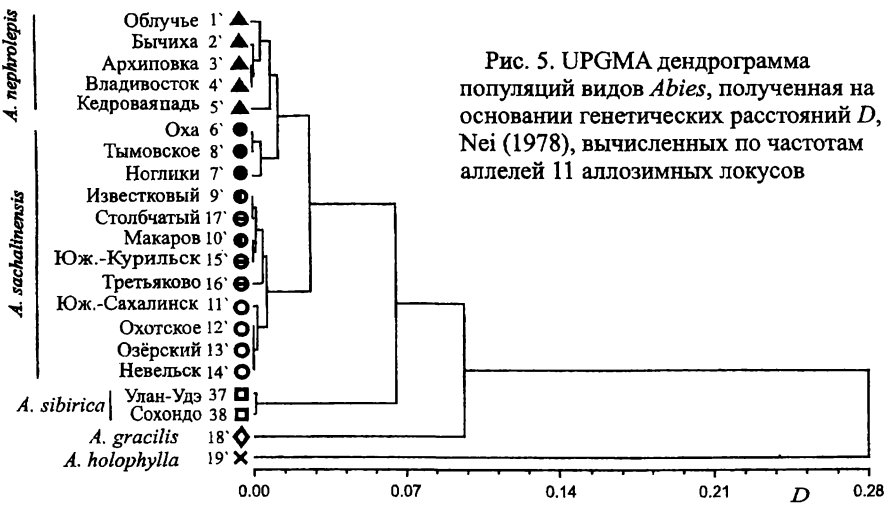

Рис. 5. UPGMA дендрограмма популяций видов *Abies*, полученная на основании генетических расстояний *D*, Nei (1978), вычисленных по частотам аллелей 11 аллозимных локусов

хорошо согласуются с данными морфологической изменчивости популяций сахалинской пихты (Бухтеева, 1963) и результатами изучения маркеров митохондриальной ДНК (Семериков и др., 2007; Semerikova, Semerikov, 2007).

Структура аллозимной изменчивости популяций пихты на Сахалине объ-

ясняется историей заселения лесной темнохвойной растительностью Сахалина с континента и с Хоккайдо через существовавшие мосты суши в ходе климатических флуктуаций плейстоцена (Голубева, Караулова, 1983; Igarashi, 1993; Крестов и др., 2004; и др.). Присутствие на севере Сахалина популяций пихты, генетически сходных с *A. nephrolepis*, говорит о происходившем в начале голоцена заселении северной и центральной части Сахалина с материка.

5.3. Генетические взаимоотношения изученных видов пихт.

Анализ межвидового сравнения пяти видов пихт, включая *A. sibirica*, проводился по 11 аллозимным локусам. В таблице 5 представлена матрица генетических дистанций *D* между популяциями пяти видов *Abies*.

Наиболее дивергирована от других изученных видов пихт *A. holophylla* – дальнеродственный вид пихты секции *Momi* (Farjon, Rushforth, 1989).

A. sachalinensis и *A. nephrolepis* представляют собой наиболее близкие виды, однако диапазон дистанций между популяциями двух видов достаточно велик (*D* варьирует от 0.003 до 0.067). Иерархический анализ распределения генетической изменчивости у *A. nephrolepis* и *A. sachalinensis* обнаружил, что в общей доле межвыборочной изменчивости 13.2% доля, соответствующая различиям между популяциями внутри видов (F_{SC}), равна 6.6%, на различия между видами (F_{CT}) приходится лишь 7% всей изменчивости.

Близость пихт белокорой и сахалинской отмечалась ранее в работах, посвященных анализу аллозимной изменчивости данных видов (Гончаренко, Падутов, 1995; Гончаренко, Савицкий, 2000; Потенко, 2004). Отсутствие в предыдущих исследованиях выборок из центральной и северной частей Сахалина не позволяло выявить существенных различий между популяциями *A. sachalinensis* и близости популяций пихты северного Сахалина к *A. nephrolepis*.

Одной из основных причин низких в среднем дистанций между двумя видами является интрогрессивная гибридизация в популяциях *A. sachalinensis*. Генетические дистанции *A. nephrolepis* только с южным Сахалином (с выбор-

Таблица 5. Средние значения межпопуляционных генетических дистанций *D* (Nei, 1978) внутри и между изученными видами *Abies*. Амплитуды колебаний приведены в скобках.

Виды	N*	1	2	3	4	5
1. *A. nephrolepis*	5	0.005 (0.000-0.011)				
2. *A. sachalinensis*	12	0.028 (0.003-0.067)	0.008 (0.000-0.034)			
3. *A. gracilis*	1	0.072 (0.063-0.081)	0.101 (0.081-0.131)			
4. *A. holophylla*	1	0.204 (0.167-0.224)	0.320 (0.244-0.372)	0.211		
5. *A. sibirica*	38	0.043 (0.017-0.093)	0.046 (0.016-0.143)	0.124 (0.095-0.178)	0.325 (0.246-0.372)	0.011 (0.000-0.070)

Примечание: посчитано по 11 аллозимным локусам, * - N– число изученных популяций

ками №11`-14`) оказались достаточно большими (D = 0.043) и сопоставимыми со значениями дистанций между видами *A. nephrolepis* – *A. sibirica* и *A. sachalinensis* – *A. sibirica*. Таким образом, популяции *A. sachalinensis* южной части Сахалина и о. Кунашир имеют определенные отличия как от пихты белокорой, так и от популяций пихты северного Сахалина, что подтверждает важность охраны генетического потенциала южных популяций пихты сахалинской.

Достаточно близким видом к комплексу *A. neprolepis* - *A. sachalinensis* оказалась пихта сибирская. Генетические дистанции *A. sibirica* с этими видами в несколько раз ниже, чем с *A. holophylla* (табл. 5). Существенные отличия между *A. sibirica* и пихтами белокорой и сахалинской наблюдались по составу аллелей аллозимных локусов *Aco* и *Pgm-2*.

Пихта изящная *A. gracilis* имеет определенно видовой ранг. Генетические дистанции с другими видами пихт соответствуют межвидовым значениям (табл. 5). На ординации (рис. 4) *A. gracilis* оказывается ближе к комплексу *A. sachalinensis* – *A. nephrolepis*, чем к пихте сибирской. Все аллели, обнаруженные в популяции *A. gracilis*, присутствуют у этих дальневосточных видов пихт. Пихта изящная значительно отличается от *A. neprolepis* и *A. sachalinensis* по частотам аллелей, что обуславливает высокие значения генетических дистанций. Несколько ближе *A. gracilis* оказывается к материковым популяциям, среднее D с *A. nephrolepis* = 0.072. Видовой статус пихты изящной подтверждается также исследованиями биологических особенностей (Науменко, 1981; и др.) и морфологии (Orlova, Firsov, 2004). Палинологические данные (Нейштадт, 1957; Скиба, 1975; и др.) свидетельствуют о широком распространении пихты на полуострове с плиоцена и её произрастании там в межледниковьях плейстоцена. В участках с особым микроклиматом пихта могла сохраняться во время оледенений (Турков, Шамшин, 1963). Камчатскую популяцию пихты нужно рассматривать как реликтовый вид, подобно ели *P. kamtschatkensis* Lacass, что было показано с помощью аллозимных исследований (Потенко, 2004).

ГЛАВА 6. ИЗМЕНЧИВОСТЬ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК У ВИДОВ *ABIES*

6.1. Изменчивость микросателлитных локусов хлоропластной ДНК пихты сибирской. С помощью микросателлитных маркеров хлоропластной ДНК было проанализировано 1312 деревьев из 32 популяций пихты сибирской. У *A. sibirica* в локусе Pt71936 обнаружено шесть аллелей (варианты размеров от 4 до 8). В локусе Pt30204 всего отмечено 11 аллелей (варианты от 3 до 13) (рис. 6).

Оценки разнообразия в популяциях пихты сибирской значительно варьируют. Количество гаплотипов, обнаруженное в разных выборках, изменялось от 7 до 21, внутрипопуляционное разнообразие H – от 0.7495 до 1.000, при среднем значении у *A. sibirica* 0.8720 (табл. 6). Стандартизированное (на 18 особей) число гаплотипов (r_{18}-1) варьировало между популяциями более чем в два раза: от 4.5 до 11.3. Наибольшие значения разнообразия наблюдаются в Южной Сибири (Танзыбей, Тайшет, Таштагол, Дивногорск), в бассейне р. Енисей (Туруханск, Ярцево) и в Забайкалье (Улан-Удэ, Сохондо). Наименьшие значения – на Южном Урале и в Западной Сибири. Выборки Северного и Приполярного Урала были более разнообразны, чем выборки Среднего и Южного Урала.

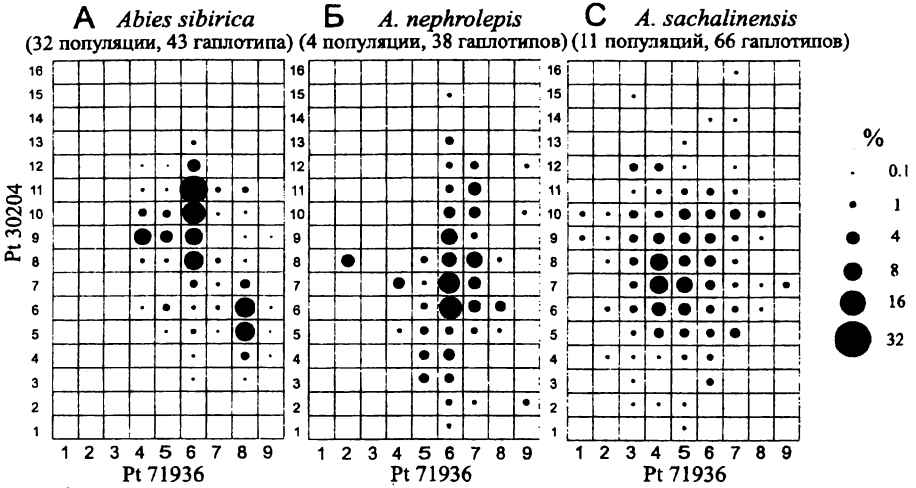

Рис. 6. Распределения частот хлоропластных гаплотипов у пихт сибирской, белокорой и сахалинской. Размещение гаплотипов на диаграмме соответствует их аллельному составу: по горизонтали номера аллелей по локусу Pt71936, по вертикали – по локусу Pt30204. Частоты гаплотипов соответствуют площади кружков.

Всего у *A. sibirica* обнаружено 43 гаплотипа. Рисунок 6,А иллюстрирует относительную частоту гаплотипов в популяциях пихты сибирской. Характерно неравномерное частотное распределение гаплотипов: суммарно на 7 преобладающих вариантов приходится более 74% особей. Большая часть гаплотипов (28 из 43) встречаются в среднем с частотой менее 1%. Более редкие гаплотипы «группируются» вокруг более частых, что указывает на недавнее происхождение первых от последних. Повышенное содержание уникальных и редких гаплотипов характерно для Южной Сибири и Забайкалья. Наименьшее – для Южного и Среднего Урала и Западной Сибири.

По результатам анализа молекулярной изменчивости AMOVA (Weir, Cockerham, 1984), в доле общей изменчивости cpSSR локусов при использовании показателя R_{ST} на межпопуляционную составляющую у *A. sibirica* приходится 8.12%. При использовании G_{ST} (не учитывающего разницу между гаплотипами), на различия между популяциями приходится 4.48%. Поскольку $R_{ST} > G_{ST}$ (P=0.011), то разные, но филогенетически близкие гаплотипы имеют тенденцию сосуществовать совместно. Это значит, что часть гаплотипов возникла уже после образования основных географических групп популяций пихты сибирской.

Географические регионы различаются по характеру распределения cpSSR гаплотипов у *A. sibirica*. Согласно результатам иерархического анализа (AMOVA), доля cpSSR изменчивости, которая приходится на различия между выделенными на основе аллозимного анализа пятью географическими группами популяций *A. sibirica*, составила R_{CT} = 3.57% (P=0.00293), между популяциями внутри групп R_{SC} = 4.72%, при общей доле межвыборочной изменчивости R_{ST} = 8.29%. При использовании показателя G_{ST} на межгрупповые различия

Таблица 6. Показатели полиморфизма двух хлоропластных микросателлитных локусов в популяциях пихт сибирской, белокорой, сахалинской, изящной и цельнолистной

Виды, популяции		n	N_o	N_e	H	R_{18}-1
A. sibirica	среднее	41.0±10.9	12.2±3.2	7.1±2.4	0.8721±0.0507	7.6±1.6
	всего	1312	43			
A. nephrolepis	среднее	35.5±13.9	19.0±7.0	12.5±3.9	0.9418±0.0245	11.1±1.4
	всего	142	38			
A. sachalinensis	среднее	27.7±11.2	18.4±5.7	14.2±4.4	0.9634±0.0193	12.8±1.5
	всего	305	66			
A. gracilis		25	1	1	0	0
A. holophylla		20	11	6.3	0.8842	9.2

Примечания: n – размер выборок, N_o – число гаплотипов в популяции, N_e – эффективное число гаплотипов, H – параметр внутрипопуляционной изменчивости (Nei, 1987), r_{18}-1 – стандартизированное число гаплотипов (на выборку в 18 особей).

приходится 2.21% (P<0.00001), внутри групп между выборками 2.23%. Парные G_{ST} значимо коррелируют с географическими расстояниями (тест Мантела, P=0.0150) и матрицей генетических дистанций D, вычисленных на основании частот аллозимных локусов (P=0.0380), при этом между парными R_{ST} и географическими расстояниями, а также между R_{ST} и D достоверной связи нет. Различия между группами *A. sibirica* при использовании cpSSR маркеров выражены в меньшей степени, чем при использовании аллозимных маркеров.

6.2. Изменчивость микросателлитных локусов хлоропластной ДНК пихт белокорой, сахалинской, изящной и цельнолистной.

В популяциях пихт белокорой и сахалинской все показатели изменчивости микросателлитных локусов были выше, чем в популяциях *A. sibirica* (табл. 6).

В целом у *A. nephrolepis* в локусах Pt71936 и Pt30204 обнаружено 7 и 14 аллелей, в сумме 38 гаплотипов. У *A. sachalinensis* – 9 и 16 аллелей, 66 гаплотипов (рис. 6). Высокое разнообразие наблюдалось во всех выборках *A. sachalinensis* (показатель H варьировал от 0.9238 до 0.9883; r_{18}-1 от 10.0 до 15.2). Для пихты сахалинской характерно правильное распределение частот аллелей и гаплотипов (рис. 6), из 66 гаплотипов только для трёх отмечена частота, превышающая 5%. Дифференциация между выборками *A. sachalinensis* невелика (R_{ST} = 2.39%, P=0.043), что существенно ниже подразделенности, полученной на основании частот аллозимных локусов (F_{ST}=8.3%). Несоответствие в структуре распределения двух типов маркеров на Сахалине может быть обусловлено более интенсивным потоком хлоропластных генов, связанным с переносом пыльцы, по сравнению с потоком ядерных генов (аллозимов), связанных с переносом пыльцы и семян. Распределение хлоропластных гаплотипов на Сахалине могло выровняться при перемешивании потоков пыльцы после изоляции острова от материка.

У *A. nephrolepis* 26 из 38 гаплотипов были общими с *A. sachalinensis*, распределение их менее равномерное (рис. 6). Два вида отличаются частотами общих гаплотипов и отсутствием в популяциях *A. nephrolepis* некоторых гаплоти-

пов из определенной области размеров аллелей. При использовании иерархического подхода на долю cpSSR изменчивости между двумя видами (R_{CT}) приходится 17.68% (P<0.00001), что гораздо выше, чем между популяциями внутри видов R_{SC} =4.18%. Согласно результатам аллозимного анализа, дифференциация между видами была существенно ниже (7% общей изменчивости), что является следствием гибридизации на Сахалине пихт различного происхождения.

Популяции *A. sibirica*, *A. nephrolepis* и *A. sachalinensis* близки по составу хлоропластных аллелей и гаплотипов, что говорит об общности происхождения этих видов. От них по вариантам изменчивости хлоропластных микросателлитов значительно отличается пихта цельнолистная *A. holophylla*, в изученной популяции которой 9 из 11 гаплотипов являются видоспецифичными, характерны другие, большего размера варианты локуса Pt30204 (аллели 14-17 и 19).

При включении в иерархический анализ популяций трех видов *A. sibirica, A. nephrolepis* и *A. sachalinensis* 14.6% общей изменчивости приходится на различия между видами, 5.7% – на различия между популяциями внутри видов. Всего у трёх видов обнаружено 85 гаплотипов. Все аллели двух cpSSR локусов и почти все гаплотипы (36 из 43), найденные в популяциях *A. sibirica*, присутствуют у *A. nephrolepis* и/или *A. sachalinensis*. По составу гаплотипов *A. sibirica* более близка к *A. nephrolepis*. Существенные различия наблюдается в распределении гаплотипов (рис. 6). Для пихты сибирской характерно присутствие практически во всех популяциях небольшого числа преобладающих гаплотипов, значительно реже встречающихся у двух других видов.

Сниженная, по сравнению с *A. nephrolepis* и *A. sachalinensis,* изменчивость хлоропластных микросателлитных локусов у *A. sibirica*, и обнаруженный на протяжении всего ареала пихты сибирской низкий уровень аллозимного полиморфизма свидетельствует о малой эффективной численности популяций, что может быть вызвано эффектом последовательных “бутылочных горлышек” в ходе плейстоценовых климатических флуктуаций.

У пихты изящной *A. gracilis* был обнаружен единственный хлоропластный гаплотип, с аллелями 4/10 в локусах Pt71936/Pt30204, который несли все изученные особи. Данный гаплотип был также найден у *A. sachalinensis* и *A. sibirica*, и являлся у этих видов редким. Так как значительного снижения аллозимной изменчивости в камчатской выборке пихты не было обнаружено, то, вероятно, в данном случае хлоропластные маркеры оказались более чувствительными индикаторами динамики численности популяций, вследствие уменьшенного в два раза, по сравнению с ядерными маркерами, эффективного размера популяций (Birky, 1988). Отсутствие изменчивости в микросателлитных локусах у *A. gracilis* может объясняться относительно недавним сильным сокращением размера популяции пихты на Камчатке.

Аллозимные генетические маркеры более информативны для выявления пространственной структуры изменчивости. С другой стороны, высокоизменчивые хлоропластные микросателлитные маркеры имеют преимущество в исследовании динамики популяций и выявлении сокращения размера популяций.

ВЫВОДЫ

1. Анализ 12 ферментных систем выявил низкий уровень аллозимного разнообразия *Abies sibirica*. В среднем 18.9% локусов были изменчивы, средняя ожидаемая гетерозиготность равна 0.080. Наблюдаемое генотипическое распределение соответствует ожидаемому из соотношения Харди-Вайнберга во всех изученных регионах, однако в целом выявлен слабый дефицит гетерозигот. Обнаружена заметная дифференциация популяций (F_{ST} =9.3%).

2. Географическое распределение частот аллозимных локусов пихты сибирской указывает на существование генетически относительно однородных, но заметно отличающихся между собой групп популяций, занимающих определенные части ареала. Среди них: 1) Европейская часть России, Южный и Средний Урал; 2) Северный и Приполярный Урал, бассейн р. Печоры; 3) горные районы Южной Сибири; 4) Прибайкалье и Забайкалье. Район Западной и Средней Сибири занимает по частотам аллелей промежуточное положение между данными группам, что свидетельствует о послеледниковой реколонизации этого района с участием южносибирских, байкальских и уральских рефугиумов. Большая часть межпопуляционной аллозимной изменчивости *A. sibirica* соответствует различиям между этими географическими группами.

3. У *A. sibirica* наблюдается существование клинальной изменчивости частот аллелей трех аллозимных локусов в пределах ареала, наиболее выраженной по частотам аллелей локуса *Aco* в Сибири, частотам аллелей локуса *Skdh-1* на Урале и в Сибири.

4. Анализ дальневосточных видов пихт по 11 аллозимным локусам выявил наибольшее разнообразие в популяциях *A. sachalinensis* (в целом полиморфно 72.7% локусов, H_e=0.097) и более низкое у *A. nephrolepis* (54.5% локусов, H_e=0.083). Подразделённость популяций *A. nephrolepis* выражена слабо (F_{ST} =0.044). У *A. sachalinensis* дифференциация заметно выше (F_{ST} =0.083). Генетические дистанции *D* между популяциями *A. sachalinensis* отражают их географическое расположение, наибольшие различия наблюдаются между северным и южным Сахалином.

5. На фоне значительного сходства *A. nephrolepis* и *A. sachalinensis* по аллозимным маркерам, выявлен постепенный переход между континентальными популяциями *A. nephrolepis*, популяциями *A. sachalinensis* северного и среднего Сахалина, и популяциями южного Сахалина и о. Кунашир. Для нескольких аллозимных локусов на о. Сахалин наблюдается выраженная клинальная изменчивость. Популяции пихты северного Сахалина более близки к *A. nephrolepis*. Обнаруженная структура изменчивости соответствует гипотезе интрогрессивной гибридизации континентальной пихты белокорой и популяций пихты юга Сахалина, Курил и Хоккайдо.

6. Определён уровень изменчивости двух хлоропластных микросателлитных локусов у *A. sibirica*, *A. nephrolepis*, *A. sachalinensis*, *A. holophylla* и *A. gracilis*. Наиболее высоким уровнем изменчивости хлоропластных локусов из всех проанализированных видов характеризуется *A. sachalinensis*. Равномерное распределение гаплотипов, высокое разнообразие аллелей и гаплотипов находятся в соответствии со слабой дифференциацией популяций *A. sachalinensis* по

хлоропластным маркерам. Можно предположить, что поток генов был большим и непрерывным в истории *A. sachalinensis*, и размер популяций оставался стабильно высоким. По составу хлоропластных гаплотипов популяции *A. sachalinensis* проявляют заметные отличия от материковых популяций *A. nephrolepis*.

7. Различия между географическими группами популяций *A. sibirica* при использовании хлоропластных маркеров выражены в меньшей степени, чем при использовании аллозимных маркеров, что, вероятно, обусловлено спецификой генетических потоков, связанных с хлоропластной и ядерной ДНК. Обнаружена пониженная изменчивость и неравномерное частотное распределение хлоропластных гаплотипов у *A. sibirica*, что может быть свидетельством сильного сокращения популяций в истории вида.

8. Специфика состава аллозимов и гаплотипов хлоропластной ДНК пихты сибирской на Урале свидетельствует о длительном сохранении её популяций в этом районе и наличии в последний ледниковый максимум на Южном и Среднем Урале рефугиума темнохвойной растительности. Особенности частот аллелей аллозимных локусов и хлоропластных гаплотипов в популяциях Северного и Приполярного Урала указывают на вклад в их формирование как популяций пихты Среднего Урала, так и популяций байкальского происхождения.

9. Сравнение изученных видов пихт на основании аллозимных и хлоропластных маркеров показывает, что близким видом к комплексу *A. neprolepis* - *A. sachalinensis* оказалась пихта сибирская *A. sibirica*, что позволяет предполагать недавнюю историю их дивергенции. Генетические дистанции между *A. sibirica* и *A. neprolepis* - *A. sachalinensis* в несколько раз ниже, чем у этих видов с *A. holophylla*.

10. Изученная популяция *A. gracilis*, согласно аллозимным данным, имеет видовой ранг, и является видом, родственным *A. nephrolepis* и *A. sachalinensis*. Снижение аллозимного разнообразия у *A. gracilis* не обнаружено. Выраженный недостаток гетерозигот, установленный в выборке *A. gracilis* (F_{IS}=0.248), может свидетельствовать о повышенном уровне инбридинга в популяции. Обнаруженное отсутствие изменчивости в хлоропластных локусах у пихты изящной может объясняться относительно недавним сильным сокращением размера популяции пихты на Камчатке.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. **Семерикова С.А.** Структура аллозимной изменчивости пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) в пределах ареала // Горные экосистемы Южной Сибири: изучение, охрана, рациональное природопользование: материалы первой межрегион. научно-практич. конф., Барнаул, 14-17 марта 2005г.– Барнаул, 2005. – С.256-259.

2. Семериков В.Л. Структура аллозимной изменчивости пихты сибирской отражает послеледниковую историю вида / В.Л. Семериков, **С.А. Семерикова** // Динамика генофондов растений, животных и человека: отчет. конф. по прогр. фундам. исслед. РАН. – М, 2005.- С.63-64.

3. **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.

4. **Семерикова С.А.** Структура аллозимной изменчивости и генетические связи пихт сахалинской и белокорой // Лесные экосистемы Северо-Восточной Азии и их динамика: материалы междунар. конф., Владивосток, 22-26 авг. 2006. – Владивосток, 2006. – С. 238-241.

5. **Семерикова С.А.** Генетическая изменчивость камчатской пихты *Abies gracilis* Kom. по аллозимным маркерам и хлоропластным SSR / С.А. Семерикова, А.Н. Беркутенко // Лесные экосистемы Северо-Восточной Азии и их динамика: материалы междунар. конф., Владивосток, 22-26 авг. 2006. – Владивосток, 2006. – С. 241-244.

6. **Семерикова С.А.** Генетическая дифференциация популяций пихты (*Abies sibirica* Ledeb.) на территории Западносибирской равнины и Красноярского края // Особь и популяция – стратегия жизни: сб. материалов IX Всерос. популяц. семинара (Уфа, 2-6 окт. 2006г.). – Уфа, 2006. – Ч.2. – С. 475-481.

7. Семериков В.Л. Дифференциация популяций и гибридогенная трансформация их генетической структуры у некоторых лесных и степных широкоареальных видов: исследование популяционно - генетической структуры видов пихт / В.Л. Семериков, **С.А. Семерикова** // Биоразнообразие и динамика генофондов: прогр. II «Динамика генофондов» / РАН. – М., 2007. – С.77-78.

8. **Semerikova S.A.** Population-genetic structure of the firs of Russian Far East inferred from cytoplasmic markers / S.A. Semerikova, V.L. Semerikov // Modern achievement in population, evolutionary and ecological genetics: intern. symp., Vladivostok, Sept. 9-14, 2007. – Vladivostok, 2007. – P. 34.

9. **Семерикова С.А.** Изменчивость хлоропластных микросателлитных локусов у пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) и двух дальневосточных видов пихт *A. nephrolepis* (Trautv.) Maxim. и *A. sachalinensis* Fr. Schmidt. / С.А. Семерикова, В.Л. Семериков // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 12. – С.1637-1646.

10. Семериков В.Л. Дифференциация популяций и гибридогенная трансформация их генетической структуры у некоторых лесных и степных широкоареальных видов: исследование популяционно - генетической структуры видов пихт / В.Л. Семериков, **С.А. Семерикова**, М.А. Полежаева // Биоразнообразие и динамика генофондов: прогр. II «Динамика генофондов» / РАН. – М., 2007. – С.108-110.

11. **Семерикова С.А.** Структура аллозимной изменчивости и генетические связи пихт сахалинской *Abies sachalinensis* Fr. Schmidt. и белокорой *A. nephrolepis* (Trautv.) Maxim. / С.А. Семерикова, В.Л. Семериков // Вестн. СВНЦ ДВО РАН. – 2008. – №1. – С. 77-85.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантами РФФИ-Урал, проекты №07-04-96106 и № 04-0496011, и Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека» (гос. контракт № 10002-251/П-24/154-360/290404-171).

Лицензия ПД №11-00[illegible] от 25 апреля 2000 года

П[illegible]исано [illegible]ать 10.10.2008 г. Формат 60x84 1/16
У[illegible] печ. л [illegible]. Бумага «Гознак» Тираж 100 экз. Заказ №95

Отпечатано в типографии ООО «ИРА УТК»
620075, г. Екатеринбург, ул. [illegible] Либ[illegible]ехта, 42, к. 1103.