
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ РЕЛИКТОВЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ БАЙКАЛЬСКОЙ СИБИРИ*

М.В. Протопопова¹, В.В. Павличенко¹, А.А. Гнутиков^{2,3},
Р.В. Адельшин⁴, В.В. Чепинога^{5,6}

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН (СИФИБР СО РАН)
ул. Лермонтова, 132, Иркутск, Россия, 664033

² Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН)
ул. Профессора Попова, 2, Санкт-Петербург, 197376

³ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР РАН)
ул. Большая Морская, 42-44, Санкт-Петербург, Россия, 190000

⁴ Научно-исследовательский противочумный институт Сибири
и Дальнего Востока Роспотребнадзора
ул. Трилисера, 78, Иркутск, Россия, 664047

⁵ Институт географии им. В.Б. Сочавы СО РАН (ИГ СО РАН)
ул. Улан-Баторская, 1, Иркутск, Россия, 664033

⁶ Биолого-почвенный факультет
Иркутский государственный университет (ФГБОУ ВПО «ИГУ»)
ул. К. Маркса, 1, Иркутск, Россия, 664003

Наличие реликтовых видов в составе флоры Байкальской Сибири обуславливает необходимость разработки эффективных методов мониторинга состояния природных объектов этого региона. Данная работа направлена на поиск молекулярных маркеров, эффективно отражающих степень генетического полиморфизма популяций модельных видов растений для их возможного применения в оценке состояния реликтового комплекса Байкальской Сибири. В работе представлены данные о возможном использовании некоторых генетических маркеров (ITS1, ITS2, rps12-rpl20, psbA-trnH) для оценки состояния двух реликтовых видов растений *Anemone baicalensis* Turcz. и *Eranthis sibirica* DC.

Ключевые слова: Байкальская Сибирь, байкальская природная территория, молекулярно-генетические маркеры, методы оценки состояния уникальных экосистем, реликтовые виды, редкие и исчезающие виды, рефугиум, глобальное изменение климата, хр. Хамар-Дабан

На протяжении четвертичного периода растительность Южной Сибири претерпевала значительные изменения, но при этом, в отличие от флоры Северной Европы, не теряла своей преимущества в ходе чередования оледенений и межледниковий [17]. Некоторые биомы, например широколиственные (неморальные) леса, в прежнее время широко представлены в Южной Сибири, все же уступили место таежным сообществам. Однако ряд неморальных видов растений выжили в условиях меняющегося климата и в настоящее время продолжают существовать в реликтовом состоянии в пределах рефугиумов — территорий с уникальными для региона природными условиями. Такие реликтовые виды представляют большую научную ценность не только как источник информации о растительном покрове и о климатических изменениях прошлых геологических

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-04-31350-мол_а.

эпох, но и как основа для разработки подходов, позволяющих прогнозировать направления изменений растительности в будущем. Поскольку реликты возникли и длительное время существовали в природных условиях значительно отличающихся от современных, в настоящее время они являются наиболее уязвимым компонентом биоты. Ввиду высокой чувствительности реликтов к изменениям среды обитания представляется перспективным их использование в качестве индикаторов для оценки состояния экосистем, к которым они приурочены. Так, дальнейшее сокращение ареалов реликтовых видов может свидетельствовать об изменениях условий окружающей среды, в том числе вызванных антропогенными факторами. Применение традиционных популяционных методов для оценки численности популяций нередко отражает лишь локальную ситуацию и не всегда оказывается достоверным при экстраполяции данных на другие, особенно труднодоступные территории. На современном этапе развития науки большую популярность приобрели подходы на основе использования молекулярно-генетических маркеров к оценке состояния отдельных популяций и экосистем в целом. Широкое применение молекулярно-генетических методов для подобных исследований объясняется, главным образом, их высокой информативностью, что в комплексе с классическими подходами позволяют более достоверно выполнять биогеографические реконструкции истории таксонов, а также формировать сценарии дальнейших возможных изменений [4; 5]. Оценка степени генетического полиморфизма является одним из известных подходов определения состояния популяций видов [11]. В результате давления среды (в том числе антропогенной природы) уменьшается количество и плотность популяций видов, что ведет к снижению их генетического разнообразия, и, соответственно, потенциала к восстановлению [9]. Поэтому, определив степень генетического полиморфизма популяций, можно оценить их стабильность в данный момент, а также прогнозировать динамику дальнейших изменений в будущем [6; 8].

В Южной Сибири одной из территорий с уникальными природными условиями, где сохранился ряд неморальных реликтовых видов, является хребет Хамар-Дабан, расположенный вдоль южного и юго-восточного побережья оз. Байкал. Данная работа направлена на поиск генетических маркеров, эффективно отражающих степень генетического полиморфизма популяций модельных видов из числа реликтовых для их возможного применения в оценке состояния реликтового комплекса Байкальской Сибири.

Объекты и методы исследования

В качестве модельных видов были выбраны представители семейства лютиковых (*Ranunculaceae* Juss): ветреница байкальская — *Anemone baicalensis* Turcz. и весенник сибирский — *Eranthis sibirica* DC. Выбранные виды являются наиболее массовыми и широко распространенными среди представителей неморальных реликтов флоры северного макросклона хр. Хамар-Дабан [1; 2]. В то же время ареал этих видов значительно фрагментирован и представлен в Южной Сибири разрозненными участками. Во всех субъектах Российской Федерации, где произрастают данные растения, они включены в региональные Красные книги.

Оценку генетического разнообразия популяций исследуемых видов проводили с помощью сравнительного анализа их пloidности и нуклеотидных последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ядерных генов рибосомной РНК (*ITS1*, *ITS2*, без учета гена *5.8S* рРНК) и межгенных спейсеров ДНК хлоропластов (*rpl20-rps20*, *psbA-trnH*). Сбор материала для молекулярно-генетических исследований проводили в поймах крупных рек северного макросклона хр. Хамар-Дабан на участке от р. Безымянная (близ с. Мангутай) до р. Большая Речка. Для исследования полиморфизма *ITS1* и *ITS2* регионов у *E. sibirica* сбор материала осуществляли также в области предгорий Восточного Саяна (в поймах р. Белая Зима и р. Кирейская Тагна), где находится еще один участок дизъюктивного ареала этого вида на территории Байкальской Сибири.

Для определения хромосомных чисел корни растений фиксировали по методу Кларка (смесь 96% этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1) с предварительной предфиксационной обработкой в растворах колхицина (0,05% ÷ 0,1%). Окраску проводили ацетокармином (раствор кармина в 45%-ной уксусной кислоте) с последующим приготовлением давленных препаратов. Определение числа хромосом производили методом иммерсионной микроскопии.

Для определения нуклеотидных последовательностей маркерных участков ДНК осуществляли сбор зеленых неповрежденных листьев с шестью особями из каждой популяции и затем высушивали в силикагеле. Для выделения ДНК использовали СТАВ-метод [7] с авторскими дополнениями. Амплификацию маркерных последовательностей проводили с использованием набора Promega (# M8291) и специфичных праймеров [10; 14; 15] в финальном объеме реакционной смеси 20 мкл. Амплификацию исследованных маркеров у *E. sibirica* проводили при использовании финальной концентрации каждого праймера 100—200 нМ и температуре отжига 52 °С в течение 20 сек. Амплификацию исследованных маркеров у *A. baicalensis* проводили при использовании финальной концентрации праймеров в 5—10 раз выше, чем у первого вида, и при температуре отжига 48—52 °С в течение 30 сек. Полученные ампликоны отделяли от димеров праймеров и продуктов реакции с помощью электрофореза в агарозном геле, затем участки ДНК выделяли из геля и проводили их очистку с использованием набора Thermo Scientific. Очищенные продукты лигировали с коммерческим плазмидным T/A вектором pTZ57R/T (Thermo Scientific) с последующим клонированием в клетках *E. coli*. Выделение плазмид из культуры *E. coli* проводили набором реагентов компании Thermo Scientific. Определение нуклеотидных последовательностей маркерных последовательностей ДНК осуществляли с помощью секвенирования плазмидного вектора по методу Сэнгера, с использованием набора реагентов BigDye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems) на генетическом анализаторе ABI 3500 xL (Applied Biosystems).

Для подтверждения соответствия полученных ампликонов искомым, нуклеотидную последовательность сравнивали со сходными последовательностями, находящимися в базе данных NCBI.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в Mega 6.06 с помощью алгоритма ClustalW. Филогенетический анализ с помощью метода ближайших соседей (Neighbour-Joining), а также расчет идентичности нуклеотидных

последовательностей на основе полученного выравнивания проводили в программе ClustalX. Анализ генетического разнообразия осуществляли с использованием модели Тамуры—Нея [12; 13] в Mega 6.06.

Результаты и их обсуждение

Предварительные данные кариологического анализа показали, что ploидность популяций *A. baicalensis* в пределах участка ареала на северном макросклоне хр. Хамар-Дабан стабильна, и особи являются тетраплоидами ($2n = 28, x = 7$). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей маркерных участков *ITS1* и *ITS2* выявил различия между двумя популяциями *A. baicalensis*, произрастающих на р. Безымянная и р. Большая Речка. Однако филогенетический анализ на основании выравнивания последовательностей *ITS1* и *ITS2* показал, что представители двух популяций формируют общий кластер. Оценка степени идентичности и генетического разнообразия показала, что степень внутривидового полиморфизма *ITS1* и *ITS2* регионов была весьма незначительна, а различия между популяциями составляли не более 1% (табл. 1, 2).

Таблица 1

Процент идентичности (представлены средние значения по выборке) нуклеотидных последовательностей на основании выравнивания последовательностей *ITS1* и *ITS2* (без 5.8S рРНК) у представителей двух популяций *A. baicalensis* и других представителей сем. *Ranunculaceae*

Вид	Степень идентичности, %					
	1	2	3	4	5	6
<i>Anemone flaccida</i> (GenBank: AB120212.1)	***	98-99	98-99	83	83	83
<i>A. baicalensis</i> (р. Безымянная)	98-99	***	99	83	84	84
<i>A. baicalensis</i> (р. Большая Речка)	98-99	99	***	83	84	84
<i>A. antucensis</i> (GenBank: AY056049.1)	83	83	83	***	85	85
<i>Saccharina japonica</i> (GenBank: KP058318.1)	83	84	84	85	***	99
<i>Hepatica nobilis</i> (GenBank: AB120214.1)	83	84	84	85	99	***

Таблица 2

Генетическое разнообразие популяций *A. baicalensis*

Популяция	Количество последовательностей	Генетическое разнообразие
р. Безымянная	11	0.006
р. Большой Мамай	15	0.005
Среднее разнообразие суммарной выборки		0.006
Среднее выборочное разнообразие		0.005
Доля межпопуляционного разнообразия		0.127

Был также выявлен высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей *ITS1* и *ITS2* регионов у исследованных популяций *A. baicalensis* с близкородственным видом *A. flaccida*, имеющего восточно-азиатское распространение. Однако, о таксономическом статусе этого вида нет единого мнения, и некоторые авторы рассматривают *A. flaccida* в качестве восточно-азиатской расы *A. baicalensis* [16]. Наши результаты показали, что этот вид образовывал общий кластер с представителями *A. baicalensis* из двух исследованных популяций, уровень идентичности составил 98—99%, близкий к внутривидовому значению (см. табл. 1). Так,

процент идентичности последовательностей *ITS1* и *ITS2* у *A. flaccida* и других родственных видов составлял не более 90% (см. табл. 1).

Кариологический анализ *E. sibirica* не выявил полиморфизма ploидности у особей из изученных популяций этого вида с Хамар-Дабана (р. Большой Мамай и р. Дулиха) (Протопопова и др., неопубл.). Все изученные особи оказались диплоидами ($2n = 16, x = 8$). Однако у растений, произрастающих на Тункинском хребте (Восточный Саян), известна выявленная ранее тетраплоидная ($2n = 32$) раса [3], что не исключает возможности выявления рас различной ploидности и в пределах Хамар-Дабана.

Филогенетический анализ на основании выравнивания последовательностей *ITS1* и *ITS2* у представителей четырех популяций *E. sibirica* и других представителей семейства *Ranunculaceae* (включая другие виды рода *Eranthis*) показал большой полиморфизм по сравнению с *A. baicalensis*. Так, сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей *ITS1* и *ITS2* у *E. sibirica* выявил наличие не только межпопуляционного генетического полиморфизма, но и существенный уровень полиморфизма в пределах одной особи. Так, у отдельных индивидуумов уровень различий нуклеотидных последовательностей *ITS* регионов достигал 5% (у особей из популяции с р. Безымянная, хр. Хамар-Дабан), и даже 8% (у особей из популяции с р. Белая Зима с предгорий Восточного Саяна), что существенно выше средних значений уровня внутри- и даже межпопуляционных различий. Среднее значение процента идентичности последовательностей между популяциями составляло 98—99%, однако минимальные значения могли не превышать 92% (см. табл. 1). Для сравнения: уровень сходства нуклеотидных последовательностей *ITS1* и *ITS2* регионов у исследованных популяций *E. sibirica* с близкородственным видом *Eranthis stellata* колебался в пределах 94—95% (табл. 3). Таким образом, выявленные межпопуляционные различия (1—8%) у *E. sibirica* являются довольно существенными, и их значения приближаются к межвидовому уровню в пределах одного рода. Оценка внутрипопуляционного генетического разнообразия показала, что наибольшая степень полиморфизма *ITS1* и *ITS2* регионов характерна для популяции с р. Белая Зима, а наименьшая — с р. Кирейская Тагна. Полиморфизм Хамар-Дабанских популяций находился на среднем уровне (табл. 4). Оценка доли межпопуляционного генетического разнообразия показала, что на эту составляющую у *E. sibirica* приходится около 17% общего генетического разнообразия (табл. 4). Это может говорить о довольно хорошей дифференциации популяций этого вида.

В отличие от выявленного полиморфизма внутренних транскрибируемых спейсеров у обоих изученных видов анализ маркеров на основе некодирующих участков ДНК хлоропластов не выявил существенных различий между популяциями.

Так, филогенетический анализ на основании выравнивания последовательностей межгенного спейсера *trnH-psbA* ДНК хлоропластов у представителей двух популяций *A. baicalensis* и других представителей семейства *Ranunculaceae* не выявил различий между популяциями. Кроме того, не было выявлено различий в нуклеотидных последовательностях представителей двух популяций *A. baicalensis* и *A. flaccida*. Для популяций *E. sibirica* был выявлен незначительный уровень по-

лиморфизма межгенного спейсера *rps 12-rpl20* ДНК хлоропластов. Процент идентичности по этому региону был значительно выше, чем выявленный при анализе *ITS1* регионов, и был близок к 100%.

Таблица 3

Процент идентичности нуклеотидных последовательностей на основании выравнивания последовательностей *ITS1* и *ITS2* (без 5.8S рРНК) у представителей четырех популяций *E. sibirica* и близкородственного вида *E. stellata*

Вид	Степень идентичности, %				
	1	2	3	4	5
<i>Eranthis stellata</i> (GenBank: JF505766.1)	***	94	94	94	95
<i>E. sibirica</i> (р. Безымянная, хр. Хамар-Дабан)	94	***	98 (93-100)	98 (92-100)	98 (96-100)
<i>E. sibirica</i> (р. Большой Мамай, хр. Хамар-Дабан)	94	98 (93-100)	***	98 (92-100)	99 (97-100)
<i>E. sibirica</i> (р. Белая Зима, Восточный Саян)	94	98 (92-100)	98 (92-100)	***	99 (93-100)
<i>E. sibirica</i> (р. Кирейская Тагна, Восточный Саян)	95	98 (96-100)	99 (97-100)	99 (93-100)	***

Таблица 4

Генетическое разнообразие популяций *E. sibirica*

Популяция	Количество последовательностей	Генетическое разнообразие
р. Безымянная (хр. Хамар-Дабан)	20	0.017
р. Большой Мамай (хр. Хамар-Дабан)	20	0.017
р. Белая Зима (Восточный Саян)	19	0.024
р. Кирейская Тагна (Восточный Саян)	16	0.006
Среднее разнообразие суммарной выборки		0.019
Среднее выборочное разнообразие		0.016
Доля межпопуляционного разнообразия		0.172

Таким образом, на основании полученных предварительных результатов можно заключить следующее. Выявленный низкий уровень внутри- и межпопуляционного генетического полиморфизма у хамар-дабанских популяций *A. baicalensis* и высокая степень сходства с восточно-азиатским близкородственным видом позволяет говорить о существенном вкладе переноса генов в формировании генетической структуры популяций этого вида. Учитывая тот факт, что *A. baicalensis* в пределах хр. Хамар-Дабан активно возобновляется вегетативно и имеет, по всей видимости, единый цельный ареал, выявленный низкий уровень генетического полиморфизма указывает на активный обмен генами между популяциями и свидетельствует, что сокращения ареала этого вида в настоящее время не происходит. Используемые генетические маркеры отражают некоторые особенности видовой структуры этого вида, однако они недостаточно чувствительны для оценки и мониторинга состояния *A. baicalensis*. Большой интерес представляет *E. sibirica*, у которого выявлена высокая степень внутри- и межпопуляционного полиморфизма *ITS1-ITS2* региона. Потенциально этот маркер может быть использован для оценки генетического полиморфизма данного вида.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Мальшев Л.И., Пешкова Г.А.* Особенности и генезис флоры Сибири: Предбайкалье и Забайкалье. Новосибирск: Наука, 1984.
- [2] *Положий А.В., Крапивкина Э.Д.* Реликты третичных широколиственных лесов во флоре Сибири. Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1985.
- [3] *Чепинога В.В.* Хромосомные числа растений флоры Байкальской Сибири. Новосибирск: Наука, 2014.
- [4] *Avice, J.C.* Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge: Harvard University Press, 2000.
- [5] *Avice, J.C.* Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition). Sunderland: Sinauer, 2004.
- [6] *Chen T., Wang X., Tang H., Chen Q., Huang X., Chen J.* Genetic diversity and population structure of Chinese Cherry revealed by chloroplast DNA trnQ-rps16 intergenic spacers variation // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2013. Vol. 60. P. 1859–1871.
- [7] *Doyle J.J., Doyle J.L.* A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.* 1987. Vol. 19. P. 11–15.
- [8] *Feng X., Wang Y., Gang X.* Genetic diversity, genetic structure and demographic history of *Cycas simplicipinna* (Cycadaceae) assessed by DNA sequences and SSR markers // *BMC Plant Biology.* 2014. Vol. 14. № 187. 1–16.
- [9] *Furlan E., Stoklosa J., Griffiths J., Gust N., Ellis R., Huggins R.M., Weeks A.R.* Small population size and extremely low levels of genetic diversity in island populations of the platypus *Ornithorhynchus anatinus* // *Ecol. Evol.* 2012. Vol. 2. № 4. P. 844–857.
- [10] *Hamilton M.* Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation // *Molecular Ecology.* 1999. Vol. 8. P. 521–52.
- [11] *Hoffmann A.A., Willi Y.* Detecting genetic responses to environmental change // *Natural Reviews Genetics.* 2008. Vol. 9. № 6. P. 421–432.
- [12] *Nei M., Kumar S.* Molecular Evolution and Phylogenetics. New York: Oxford University Press, 2000.
- [13] *Tamura K., Nei M., Kumar S.* Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2004. Vol. 101. P. 11030–11035.
- [14] *Utelli A., Roy B., Baltisberger M.* Molecular and morphological analyses of European *Aconitum* species (Ranunculaceae) // *Plant Systematics and Evolution.* 2000. V. 224. P. 195–212.
- [15] *Wang L., Abbott R. J., Zheng W., Chen P., Wang Y., Liu J.* History and evolution of alpine plants endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau: *Aconitum gymnantrum* (Ranunculaceae) // *Molecular Ecology.* 2009. Vol. 18. № 4. P. 709–21.
- [16] *Wang W., Zinam S.N., Dutton B.E.* Anemone Linnaeus // *Flora of China.* 2001. Vol. 6. P. 307–328.
- [17] *Wilson R.C.L., Drury S.A., Chapman J.L.* The Great Ice Age: climate change and life. London: Routledge and the Open University, 2000.

APPLICATION OF GENETIC MARKERS FOR ECOLOGICAL STATUS ASSESSMENT OF THE RELICT PLANT SPECIES OF BAIKAL SIBERIA

M.V. Protopopova¹, V.V. Pavlichenko¹, A.A. Gnutikov^{2,3},
R.V. Adelshin⁴, V.V. Chepinoga^{5,6}

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS

Lermontov str., 132, Irkutsk, Russia, 664033

² Komarov Botanical Institute RAS

Prof. Popov str., 2, Saint Petersburg, Russia 197376

³ N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR)

B. Morskaya str., 42-44, Saint Petersburg, Russia, 190000

⁴ Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Rospotrebnadzor

Trilisser str., 78, Irkutsk, Russia, 664047

⁵ V.B. Sochava Institute of Geography SB RAS

Ulan-Batorskaya str., 1, Irkutsk, Russia, 664033

⁶ Faculty of biology and soil sciences

Irkutsk State University

Karl Marx str., 1, Irkutsk, Russia, 664003

The development of effective approaches for ecological monitoring of Baikal Siberia becoming more important mainly because of unique plant species occurring in this region. The present study was aimed to find the effective molecular markers for estimation of genetic variation in model species. The results are important for evaluation of the relict biota in Baikal Siberia. The paper presents results of estimation of genetic variety in two relict plant species *Anemone baicalensis* Turcz. and *Eranthis sibirica* DC. on data of several genetic markers (*ITS1*, *ITS2*, *rps12-rpl20*, *psbA-trnH*).

Key words: Baikal Siberia, Genetic markers, ecological status assessment of unique ecosystems, Relict species, Endangered species, Refugium, Global climate change, Khamar-Daban

REFERENCES

- [1] Malyshev L.I., Peshkova G.A. Osobennosti i genezis flory Sibiri: Predbajkal'e i Zabajkal'e. [Features and genesis of Siberian flora (Cis-Baikal and Trans-Baikal)]. Novosibirsk: Nauka, 1984.
- [2] Polozhij A.V., Krapivkina Je.D. Relikty tretichnyh shirokolistvennyh lesov vo flore Sibiri [Relicts of Tertiary Broad-leaved Forests in the Flora of Siberia]. Tomsk: Izd-vo Tomsk. un-ta, 1985.
- [3] Chepinoga V.V. Hromosomnye chisla rastenij flory Bajkal'skoj Sibiri [Chromosome numbers of Plant Species from Baikal Siberia]. Novosibirsk: Nauka, 2014
- [4] Avise J.C. Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge: Harvard University Press, 2000.
- [5] Avise J.C. Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition). Sunderland: Sinauer, 2004.
- [6] Chen T., Wang X., Tang H., Chen Q., Huang X., Chen J. Genetic diversity and population structure of Chinese Cherry revealed by chloroplast DNA trnQ-rps16 intergenic spacers variation // Genet. Resour. Crop Evol. 2013. Vol. 60. P. 1859—1871.
- [7] Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. 1987. Vol. 19. P. 11—15.
- [8] Feng X., Wang Y., Gang X. Genetic diversity, genetic structure and demographic history of *Cycas simplicipinna* (Cycadaceae) assessed by DNA sequences ad SSR markers // BMC Plant Biology. 2014. Vol. 14. № 187. 1—16.
- [9] Furlan E., Stoklosa J., Griffiths J., Gust N., Ellis R., Huggins R.M., Weeks A.R. Small population size and extremely low levels of genetic diversity in island populations of the platypus *Ornithorhynchus anatinus* // Ecol. Evol. 2012. Vol. 2. № 4. P. 844—857.
- [10] Hamilton M. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation // Molecular Ecology. 1999. Vol. 8. P. 521—52.
- [11] Hoffmann A.A., Willi Y. Detecting genetic responses to enviromental change // Natural Reviews Genetics. 2008. Vol. 9. № 6. P. 421—432.
- [12] Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. New York: Oxford University Press, 2000.
- [13] Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004. Vol. 101. P. 11030—11035.

- [14] Utelli A., Roy B., Baltisberger M. Molecular and morphological analyses of European *Aconitum* species (Ranunculaceae) // *Plant Systematics and Evolution*. 2000. V. 224. P. 195—212.
- [15] Wang L., Abbott R. J., Zheng W., Chen P., Wang Y., Liu J. History and evolution of alpine plants endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau: *Aconitum gymnantrum* (Ranunculaceae) // *Molecular Ecology*. 2009. Vol. 18. № 4. P. 709—21.
- [16] Wang W., Zinam S.N., Dutton B.E. *Anemone* Linnaeus // *Flora of China*. 2001. Vol. 6. P. 307—328.
- [17] Wilson R.C.L., Drury S.A., Chapman J.L. *The Great Ice Age: climate change and life*. London: Routledge and the Open University, 2000.