

УДК 582.594:575.113.2

Е.Г. Филиппов
Е.В. Андропова

E.G. Filippov
E.V. Andronova

**ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ НЕКОТОРЫХ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *DACTYLORHIZA* (ORCHIDACEAE) В ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ АРЕАЛА**

**SPECIAL FEATURES OF THE GENETIC STRUCTURE OF SOME *DACTYLORHIZA*
(*ORCHIDACEAE*) POPULATIONS IN THE EASTERN PART OF THE AREA**

Представлены результаты аллозимного анализа представителей подсемейства *Dactylorhiza*, произрастающих на территории России: *D. incarnata* (L.) Soó, *D. ochroleuca* (Wüst. ex Boll.) Holub, *D. salina* (Turcz. ex Lindl.) Soó, *D. euxina* (Nevski) Czer. У особей *D. incarnata* Центральной России, на Южном и Среднем Урале и в Сибири выявлен полиморфизм по локусам PGI и NADHD, особи из Северо-Западного региона и юга Европейской части России были полностью мономорфными. Показано существование географической дифференциации между восточными и западными популяциями *D. incarnata*. Обнаружено различие аллельной структуры *D. incarnata* от *D. ochroleuca* по локусам GDH и PGI, от *D. salina* по локусам SKDH и IDH, от *D. euxina* по локусам PGI, NADHD, SKDH, PGM и IDH.

Род *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski является наиболее многочисленным, его представители широко распространены в умеренной зоне. Для таксонов рода характерна высокая изменчивость морфологических признаков, и, несмотря на длительную историю изучения, некоторые из них остаются наиболее сложными объектами для систематиков, а таксономическая значимость отдельных представителей до настоящего времени остается неопределенной (Аверьянов, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992). Для решения такого рода вопросов недостаточно только морфологического анализа, необходимо выявление генетических маркеров и изучение генетической структуры популяций отдельных таксонов. Довольно большая работа в этом направлении проводилась и проводится в настоящее время в западно-европейской части ареала рода (Pillon et al., 2006; Paun et al., 2011), практически не затрагивая территории России, на которую приходится большая часть ареала некоторых видов. Кроме того, молекулярно-генетические исследования некоторых представителей рода (например, *D. salina* и *D. umbrosa*) не проводились вообще.

В данной работе представлены результаты аллозимного анализа представителей подсемейства *Dactylorhiza*, произрастающих на территории России: *D. incarnata* (L.) Soó, *D. ochroleuca* (Wüst. ex Boll.) Holub, *D. salina* (Turcz. ex Lindl.) Soó, *D. euxina* (Nevski) Czer. Материалом служили свежие листья. Экстракцию белков, электрофорез в полиакриламидном геле, гистохимическое окрашивание ферментов и обработку полученных данных проводили согласно методике, описанной ранее в статье по анализу результатов аллозимного анализа представителей рода *Cypripedium* России (Филиппов, Андропова, 2011). В анализе учитывалось 8 генных локусов: фосфоглюкоизомераза (PGI, EC 5.3.1.9), NADH-дегидрогеназа (NADHD, EC 1.6.99.5), шикиматдегидрогеназа (SKDH, EC 1.1.1.25), глутаматдегидрогеназа (GDH, EC 1.4.1.2), фосфоглюкомутаза, (PGM, EC 5.4.2.2), диафороза (DIA, EC 1.6.4.3.), алкогольдегидрогеназа (ADH, EC 1.1.1.1), изоцитратдегидрогеназа (IDH, EC 1.1.1.42). В ходе анализа было изучено более 1000 растений из 41 локальной популяции: *D. euxina* – Кисловодск, *D. incarnata* – Аркаулово (Башкортостан), М. Бича (Омская обл.), Ускуль (Башкортостан), Урал-Дача (Челябинская обл.), Аять (Свердловская обл.), Багаряк (Свердловская обл.), Вс.-Благодатское (Свердловская обл.), Каракулево (Башкортостан), Миасс (Челябинская обл.), Звенигород (Московская обл.), Москва, Н. Ладога (Ленинградская обл.), Пудость (Ленинградская обл.), Крым, Тормосин (Волгоградская обл.), Химки (Москва), Талдом1 (Московская обл.), Талдом2 (Московская обл.), Сибай (Башкортостан), Сусанино (Костромская обл.), Вербная (Иркутская обл.), Слюдянка, локальные популяции 1–4 (Иркутская обл.), Бабушкино (Иркутская обл.), р. Косурта (окр. Петровского Завода, Забайкальский край), Петровский Завод, локальные популяции 1,2,3,5 (Забайкальский край), Торы (Бурятия), Туран (Бурятия), *D. ochroleuca* – Ускуль (Башкортостан), Урал-Дача (Челябинская обл.), *D. salina* – р. Верия (Забайкальский край), Газимуровский Завод (Забайкальский край), Иволгинск (Бурятия), р. Ягье (Забайкальский край), р. Хонхолойка (Бурятия).

У особей *D. incarnata* выявлен отчетливый полиморфизм по локусам PGI и NADHD. Ранее полиморфизм был описан только для локальных популяций, произрастающих в Турции (Hedrén et al., 2007) и Да-

нии (Pedersen, 1998). На всей остальной изученной части ареала – в Средиземноморье, Западной Европе и Скандинавии отмечалось полное отсутствие полиморфизма у данного вида (Hedré, 1996; 2001; Pillon et. all, 2006, 2007). На территории России можно выделить регионы с разной степенью полиморфизма по изменчивым локусам. Наибольшей изменчивостью характеризовались локальные популяции в Центральной России, на Южном и Среднем Урале и в Сибири, для которых выявлено наличие трех разных аллелей в локусе PGI и трех аллелей в локусе NADHD. Локальные популяции Северо-Западного региона и юга Европейской части России были полностью мономорфны по всем изученным локусам.

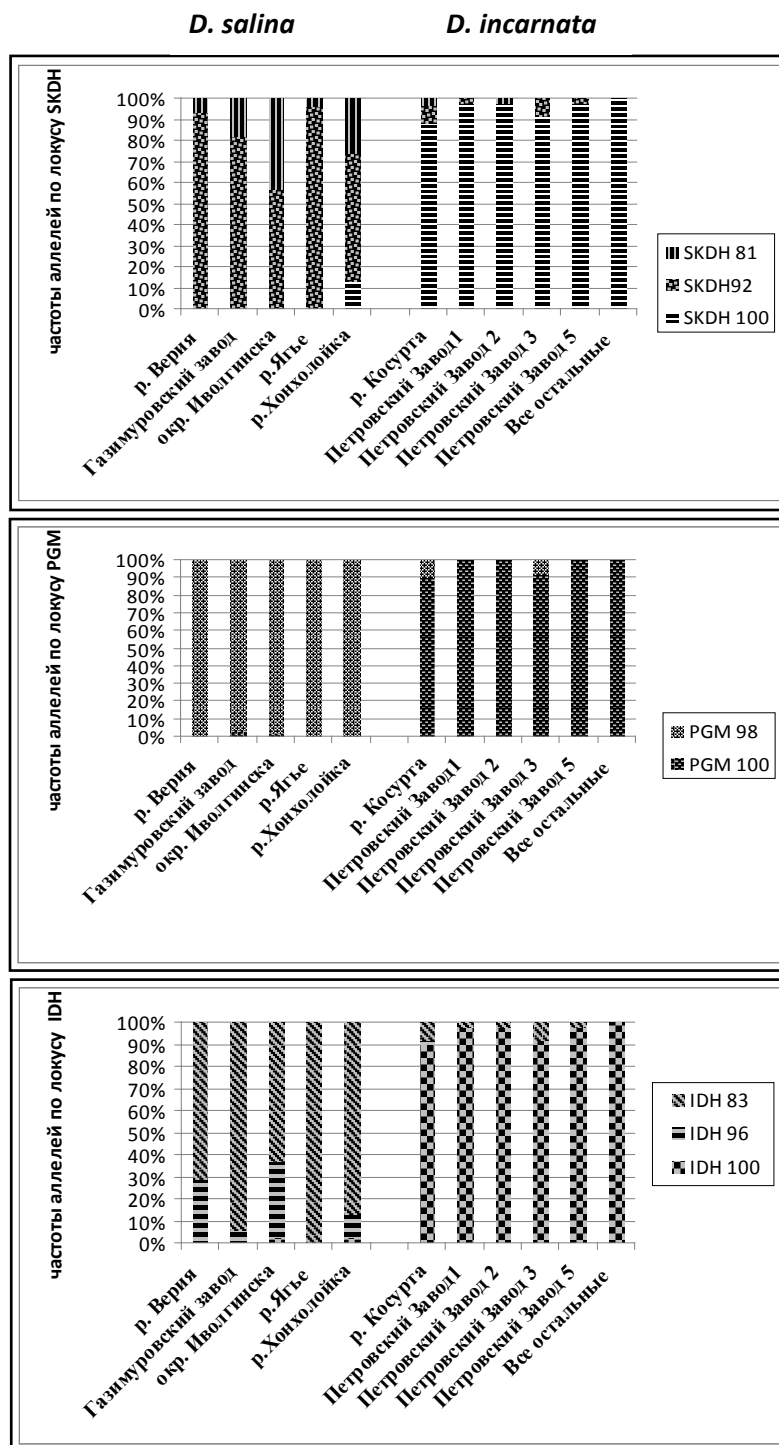


Рис. 1. Сравнение аллельной структуры 3 локусов у особей *D. salina* и *D. incarnata* из разных локальных популяций (местонахождение подробнее указано на рисунке 2)

Показано отличие особей *D. incarnata* локальных популяций восточносибирских и западных частей ареала. В них наблюдаются существенные различия по аллелям локуса PGI. В западной части ареала преобладает более медленный аллель (PGI¹⁰⁰) с примесью более быстрых аллелей (PGI¹³⁶ и PGI¹²⁸), а у восточносибирских популяций преобладал аллель PGI¹²⁸ с примесью двух других аллелей. Это указывает на существование географической дифференциации между удаленными локальными группами особей данного вида.

Не выявлено различий в аллельной структуре между группами особей *D. incarnata*, имеющих разную окраску листьев, что является основным диагностическим критерием для выделения *D. cruenta*. Ранее было показано отсутствие и морфологических различий между данными группами. В целом, для популяций, характеризующихся полиморфизмом на генетическом уровне, характерен полиморфизм по пятнистости листьев, хотя данные морфотипы не сопровождаются какими-либо специфическими аллелями 8 изученных генных локусов. В этих популяциях можно выделить три основных типа окраски листьев: без пятен, с округлыми пятнами, иногда сливающимися у верхушки листа и фиолетово окрашенные листья. Доля особей с листьями, в той или иной степени пятнистыми, составляет около 30 %, иногда достигая более высокого процента. Все это позволяет сделать вывод об отсутствии *D. cruenta* как отдельного таксона на территории России и наличии полиморфизма по пятнистости листьев собственно для *D. incarnata*.

На примере восточносибирского фрагмента популяции *D. incarnata* можно увидеть влияние «принципа основателя» при формировании небольших локальных популяций. Особи в них характеризуются однообразием морфологических признаков и сходством в распределении и интенсивности антоциановой окраски на листьях. Изменчивость по генетическим локусам у особей внутри группы также отсутствует, хотя аллельная структура особей из разных групп может существенно различаться. В таких группах обычно насчитывается несколько десятков цветущих экземпляров, которые произрастают на небольших по площади участках, часто антропогенно нарушенных. Вероятно, данные скопления произошли от единичных экземпляров (экземпляра), поэтому в них сохраняются характерные признаки основателей (основателя). Подобные локальные популяции наблюдались и на Урале.

Обнаружена специфичность аллельной структуры двух локусов (GDH и PGI) у особей *D. ochroleuca*, произрастающих на Урале. Полученные данные отличаются от результатов аллозимного анализа *D. incarnata* и *D. ochroleuca* в Скандинавии (Hedré, 1996), где особи этих видов были гомозиготны и не различались по всем используемым при исследовании ферментным системам. По данным Н. Pedersen (1998), у *D. ochroleuca* и *D. incarnata* в Дании наблюдался полиморфизм по 1 локусу Ugpp (глюкозо-1-фосфат уридилтрансфераза E.C. 2.7.7.9). К сожалению, в нашей работе, а также в исследовании локальных популяций в Скандинавии, данный локус не изучался. По двум другим локусам – DIA и PGI, использованных при изучении особей *D. incarnata* и *D. ochroleuca* из Дании, они были полностью мономорфны. В отличие от этих данных, в двух изученных местонахождениях на Урале, где особи данных таксонов произрастают совместно, был отмечен высокий полиморфизм у *D. incarnata* и полная гомозиготность у *D. ochroleuca* по локусу PGI. По локусу GDH наблюдались устойчивые различия в этих популяциях: для *D. ochroleuca* характерен более быстрый аллель, а для *D. incarnata* более медленный. Полученные данные позволяют высказать предположение, что в изученных местонахождениях на Урале существует генетическая обособленность и механизм изоляции между особями *D. ochroleuca* и *D. incarnata* при их совместном произрастании.

Установлена специфичность аллельной структуры *D. salina* по локусам SKDH, IDH и PGM, по которым они достоверно отличаются от *D. incarnata* (см. рис 1). Особи *D. salina* гибридизируют с особями *D. incarnata*, выявлены также вторичные гибриды в локальных популяциях, произрастающих в республике Бурятия (восточная часть) и некоторых районах Забайкальского края. В многочисленных локальных популяциях *D. salina* наблюдалась значительная изменчивость морфологических признаков, в том числе по окраске цветков и листьев (зеленые или полностью фиолетовые), и высокая генетическая изменчивость.

Особи *D. euxina* и *D. incarnata* существенно различаются по специфичным аллелям локусов PGI, NADHD, SKDH, PGM и IDH.

На основании частот аллелей были вычислены генетические дистанции по Nei (1978) между изученными выборками и построен кластер, представленный на рисунке 2. Выборки объединяются в три крупных группы. Первая объединяет группу локальных популяций *D. incarnata* s.l., в которой обособляется *D. ochroleuca* и локальные популяции из Прибайкалья и Забайкалья. Вторая группа включает группу популяций *D. salina*, к которой примыкает *D. euxina*.

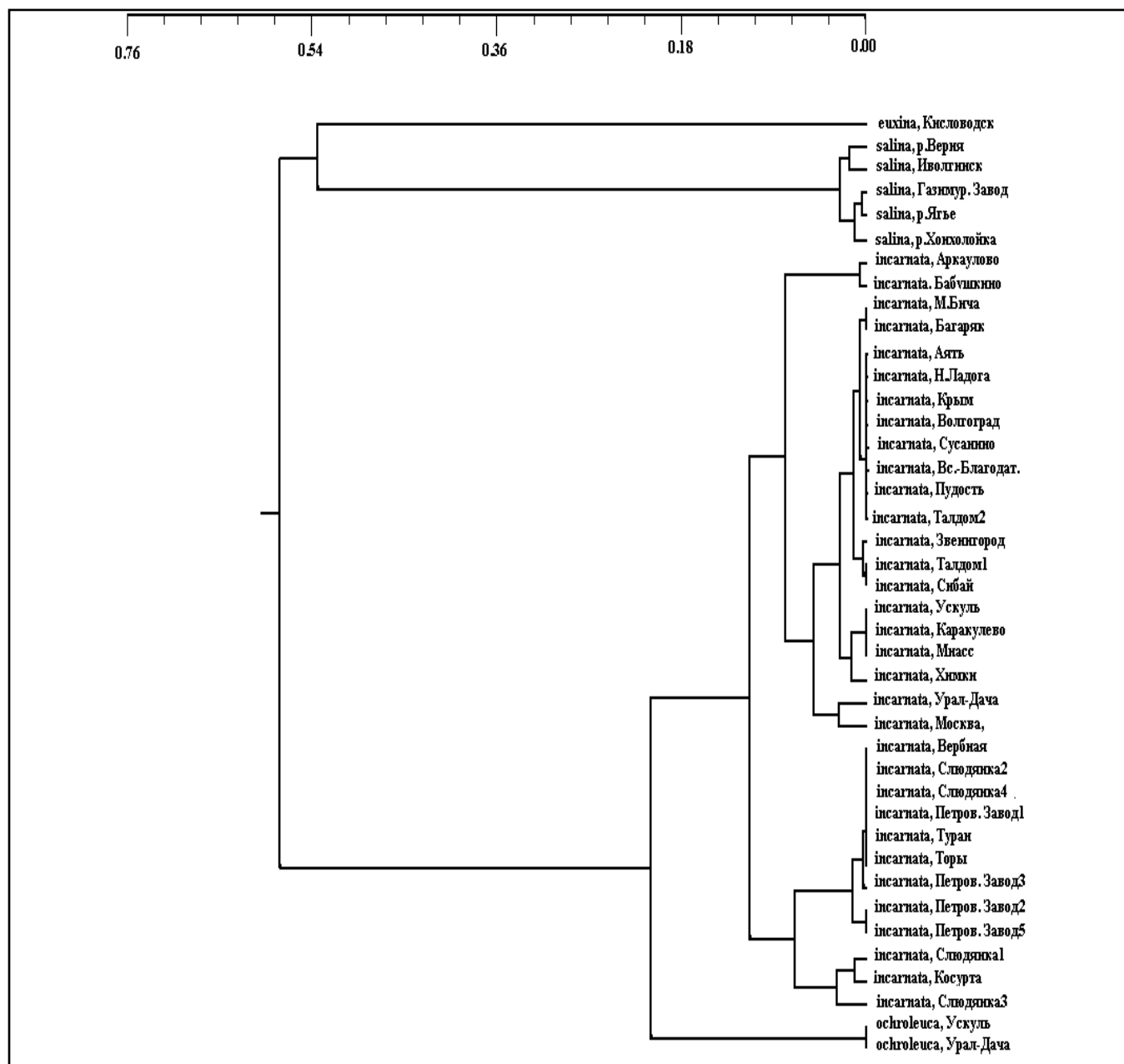


Рис. 2. Дендрограмма для 41 локальной популяции представителей подсекции *Dactylorhiza*. Генетические дистанции рассчитаны по частотам аллелей 8 локусов

По результатам проведенного исследования можно сделать несколько выводов.

1. Особи *D. incarnata* на территории России имеют сравнительно высокий полиморфизм по нескольким генным локусам.
2. По локусу PGI выявлена географическая дифференциация локальных популяций западной и восточной части ареала *D. incarnata* на территории России.
3. В зонах перекрытия ареалов *D. incarnata* и *D. ochroleuca* на Урале, *D. incarnata* и *D. salina* в Забайкалье сформировались интрогрессивно межвидовые гибридные комплексы.
4. По данным аллозимного анализа особи с фиолетовыми пятнами на листьях или с листьями полностью фиолетовыми и фиолетовыми цветками, которые относят к *D. cruenta*, не отличаются от типичных *D. incarnata*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 12-04-01560 а) и Программы № 30 фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

ЛИТЕРАТУРА

- Аверьянов Л.В.** Конспект рода *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski (Orchidaceae). Ч.1. // Нов. сист. высш. раст. Л.: Наука, 1988. – Т. 25. – С. 48–67; Ч. 2. // Там же. 1989. – Т. 26. – С. 47–56; Ч. 3 // Там же. 1990. – Т. 27. – С. 32–62; Ч. 4 // Там же. 1991. – Т. 28. – С. 33–42; Ч. 5 // Там же. 1992. – Т. 29. – С. 14–5.
- Филиппов Е.Г., Андропова Е.В.** Генетическая дифференциация представителей рода *Cypripedium* по данным изоферментного анализа // Генетика, 2011. – Т. 47, № 5. – С. 615–623.
- Hedrén M.** Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in Northern European *Dactylorhiza* (Orchidaceae) // Plant Syst. Evol., 1996. – V. 201. – P. 31–55.
- Hedrén M.** Systematics of the *Dactylorhiza euxina/incarnata/maculate* polyploidy complex (Orchidaceae) in Turkey: evidence from allozyme data. // Plant Syst. Evol, 2001. – V. 229. – P. 23–44.
- Pedersen H.A.** Allozyme variation and genetic integrity of *Dactylorhiza incarnata* (Orchidaceae) // Nordic J. Bot., 1998. – V. 18, № 1. – P. 15–20.
- Paun O., Bataman R.M., Fay M. F., Luna J.A., Moat J., Hedren M., Chase M.W.** Altered gene expression and ecological divergence in sibling allopolyploids of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) // Evol. Biol., 2011. – P. 113–127.
- Pillon Y., Fay M.F., Hedrén M., Bateman R.M., Devay D.S., Shipunov A.B., van der Bank M., Chase M.W.** Evolution and temporal diversification of western European polyploidy species complexes in *Dactylorhiza* (Orchidaceae) // Taxon. 2006. – V. 56, № 4. – P. 1185–1208.
- Pillon Y., Fay M.F., Shipunov A.B., Chase M.W.** Species diversity versus phylogenetic diversity: A practical study in the taxonomically difficult genus *Dactylorhiza* (Orchidaceae) // Biol. Conserv. 2007, – V. 129. – P. 4–13.

SUMMARY

The results of the allozyme analysis of *Dactylorhiza* plants (*D. incarnata* (L.) Soó, *D. ochroleuca* (Wüst. ex Boll.) Holub, *D. salina* (Turcz. ex Lindl.) Soó, *D. euxina* (Nevski) Czer), which grow in the territory of Russia are represented. In individuals *D. incarnata* from Central Russia, South and Central Urals and from Siberia polymorphism on the loci PGI and NADHD is revealed, individuals from the North Western region and the south of the European part of Russia were monomorphic. Existence of geographical differentiation between the eastern and western populations of *D. incarnata* is shown. A difference in the allelic structure *D. incarnata* from *D. ochroleuca* on the loci GDH and PGI, from *D. salina* on the loci SKDH and IDH, from *D. euxina* on the loci PGI, NADHD, SKDH, PGM and IDH is discovered.