

УДК 575.222.582.594.6(470)

Использование морфологических и молекулярных методов для определения видовой принадлежности растений рода *Liparis* (Orchidaceae) в ГПБ заповеднике «Кедровая падь»

Species delimitation in *Liparis* (Orchidaceae) based on morphological and molecular methods in reserve «Kedrovaya Pad'»

Е. И. Терентьева¹, Г. В. Дегтярева¹, С. В. Ефимов¹, Т. Х. Самигуллин², Т. И. Варлыгина¹

E. I. Terentieva, G. V. Degtjareva, S. V. Efimov, T. H. Samigullin, T. I. Varlygina

¹Ботанический сад Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Ленинские Горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119991. E-mail: el.terenteva@mail.ru, degavi@mail.ru, efimov-msu@yandex.ru, tat-varlygina@yandex.ru

²НИИ Физико-Химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Ленинские Горы, д. 1, стр. 40, Москва, 119992. E-mail: tagrai@mail.ru

Реферат. На территории государственного природного заповедника «Кедровая падь» ДВО РАН было проведено обследование популяций видов рода *Liparis* и первичное определение растений. Так как виды рода *Liparis* (*L. japonica*, *L. krameri*, *L. kumokiri* и *L. makinoana*) морфологически трудно различимы, то для оценки видовой принадлежности представителей природных популяций были взяты фрагменты растений для молекулярно-филогенетических исследований. В качестве молекулярного маркера были выбраны внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1,2) участка 18S-26S ядерной рибосомной ДНК. В полученных нами дендрограммах представители природных популяций рода *Liparis* формируют 3 хорошо поддержанных клады (A, C, D) и субкладу (B). ITS последовательности анализируемых растений каждой клады имеют группоспецифические замены. Анализ морфологических признаков и молекулярных данных позволил нам провести видовую идентификацию представителей природных популяций рода *Liparis*.

Summary. The species of the genus *Liparis* were sampled on the territory of reserve «Kedrovaya Pad'». In nature, initial definition of plants was conducted. Morphological characters are insufficient for the species delimitation of the genus *Liparis* (*L. japonica*, *L. krameri*, *L. kumokiri* and *L. makinoana*), so for to assess species identity of representatives of natural populations fragments of plants for molecular phylogenetic studies were taken. The internal transcribed spacers (ITS1 and 2) of a portion of 18S-26S nuclear ribosomal DNA were selected as a molecular marker for molecular analysis. The representatives of natural populations of the genus *Liparis* are formed 3 well-supported clades (A, C, D) and subclade (B) in the phylogenetic trees. The ITS sequences of analyzed plants of each clade have specific substitution. Analysis of morphological characters and molecular data allowed us to conduct species identification of representatives of natural populations of the genus *Liparis*.

Введение

На территории ФГБУ национального парка «Земля леопарда» и государственного природного биосферного заповедника «Кедровая падь» (Приморский край) с 28 июля по 3 августа 2016 г. группой сотрудников биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова проводились исследования в рамках проекта Российского Научного Фонда «Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем» и подготовки следующего издания Красной книги РФ, поэтому особое внимание уделялось популяциям редких видов, а также видам с неясным таксономическим статусом из семейства Orchidaceae, к которым относятся и представители рода *Liparis* Rich. из трибы *Malaxideae*. Род насчитывает около 250–300 видов, которые встречаются преимущественно в тропических областях Старого Света. На территории России произрастает 6 видов рода *Liparis*. Все они занесены в Красную книгу РФ (2008). Один из них распространен в европейской части и в Сибири (*L. loeselii*), а пять других встречаются на Дальнем Востоке: *L. japonica* (Miq.) Maxim., *L. krameri* Franch. et Savat., *L. kumokiri* F. Maek., *L. makinoana* Schlechter и *L. sachalinensis* (Nakai), который, вероятно, является эндемиком острова Сахалин (Вышин, 1996; Вахрамеева и др., 2014).

Согласно литературным источникам на территории заповедника произрастает 4 вида рода *Liparis*: *L. japonica*, *L. krameri*, *L. kumokiri* и *L. makinoana* (Ракова, 1990; Шибнева, Коркишко, 2001; Шибнева, 2004). В задачу нашего исследования входило изучение состояния популяций видов рода *Liparis*, выявленных на

территории заповедника (возрастной спектр, плодообразование, наличие возобновления), оценка размеров популяций (площадь, численность и плотность). Оказалось, что в некоторых случаях сложно провести видовую идентификацию наблюдаемых популяций. Несмотря на многочисленные работы различных авторов, посвященных систематике видов этого рода (Schlechter, 1919; Невский, 1935; Ohwi, 1965; Kim S. N., Kim Y. S., 1986; Ракова, 1990, 1992; Шибнева, 2005, 2006, 2008; Tsutsumi, Yukawa, 2008; Lee et al., 2010; Ефимов, 2010) на сегодняшний день род *Liparis* является одним из наиболее сложных в систематическом отношении в семействе Orchidaceae. К основным диагностическим признакам видов рода *Liparis* относят такие морфологические признаки, как: размеры частей околоцветника, форму и степень скрученности губы, длину соцветия и цветоножек, длину черешка, форму листьев и др. И.В. Шибнева (2011) предполагает, что строение колонки (гиностемия), ее форма, размеры могут быть важны для диагностики и систематики видов рода *Liparis*. Так для *L. krameri* специфическая форма и детали строения колонки резко отличают этот вид от других видов рода *Liparis*, отмеченных на Дальнем Востоке. По наблюдениям в природе, гербарным сборам, а также по литературным данным (Ohwi, 1965; Kim S.N., Kim Y.S., 1986; Tsutsumi, Yukawa, 2008; Невский, 1935; Шибнева, 2005, 2006, 2008; Ефимов, 2010) морфологические признаки проявляют высокую внутривидовую вариабельность, что делает виды рода *Liparis* трудно различимыми. Поэтому, по-прежнему, остается актуальным поиск новых диагностических признаков для надежного разграничения видов рода *Liparis*. В качестве таких признаков могут выступать молекулярные маркеры для различных участков ядерного и хлоропластного геномов (Tsutsumi et al., 2008; Lee et al., 2010; Su et al., 2015).

Материалы и методы

Согласно материалам, полученным при изучении гербарных коллекций (MW, MHA, LE, VLA, VBGI) и предоставленных сотрудником заповедника И.В. Шибневой, было уточнено географическое распространение видов рода *Liparis* на территории заповедника и составлены рабочие маршруты для наблюдений и сбора материала в природе: северный склон Сухореченского хребта (Первый Золотой ключ), центральная часть заповедника (долина р. Кедровой), склон Гаккелевского хребта, долина Гаккелевского ключа, гора Известковая (юго-восточный склон), северный склон горы Скалистой и окрестности станции Рязановка. Картирование выявленных местонахождений видов проводилось с использованием GPS. Отдельные растения из популяций были сфотографированы на цифровую камеру. У растений из найденных популяций видов рода *Liparis* были взяты фрагменты вегетативных и генеративных частей растений (18 образцов) для молекулярных исследований с целью уточнения их таксономического статуса. В данной работе в молекулярный анализ также была включена популяция видов рода *Liparis* острова Большой Пелис (ДВМЗ). В качестве реперных видов рода *Liparis* были использованы гербарные образцы из гербариев (LE и MW) (прил.). Внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1,2) участка 18S – 26S ядерной рибосомной ДНК были выбраны в качестве молекулярного маркера для молекулярно-филогенетического анализа. Выделение ДНК, амплификация и секвенирование участка (ITS1,2) проводилось согласно методике, описанной в работе Valiejo-Roman et al. (2002).

Результаты и обсуждение

Для молекулярно-филогенетического анализа были взяты дополнительно нуклеотидные последовательности (ITS1,2) 14 видов рода *Liparis* и 2 видов рода *Malaxis* (близкородственный таксон к роду *Liparis*) из базы данных GenBank (см. прил.). Выборку таксонов для молекулярного анализа осуществляли, опираясь на работу Su et al. (2015).

Все ITS последовательности анализируемых видов, выравнивались в программе MUSCLE (Edgar, 2004). Просмотр результатов выравнивания нуклеотидных последовательностей и последующая ручная доработка выполнялась в программе BioEdit version 5.0.9. (Hall, 1999). Набор из 54 выровненных последовательностей ITS 1,2 ярдНК содержит 732 позиции, из которых 427 – консервативные 166 – парсимонно-информативные и 139 – парсимонно-неинформативные. Молекулярно-филогенетические деревья, были построены по ITS последовательностям двумя методами – методом Mr. Bayes 3.1 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003) и методом максимальной экономии PAUP* 4.0b8 (Swofford, 2003). Полученные топологии деревьев не идентичны, но конгруэнтны в основных узлах. В статье мы приводим консенсусное молекулярно-филогенетическое дерево, построенное методом Mr. Bayes 3.1 (рис. 1).

В полученных нами молекулярных деревьях образцы из популяций разных видов рода *Liparis* формируют 3 хорошо поддержанных клады (A, C, D), что подтверждает их естественность, (рис. 1). Все таксо-

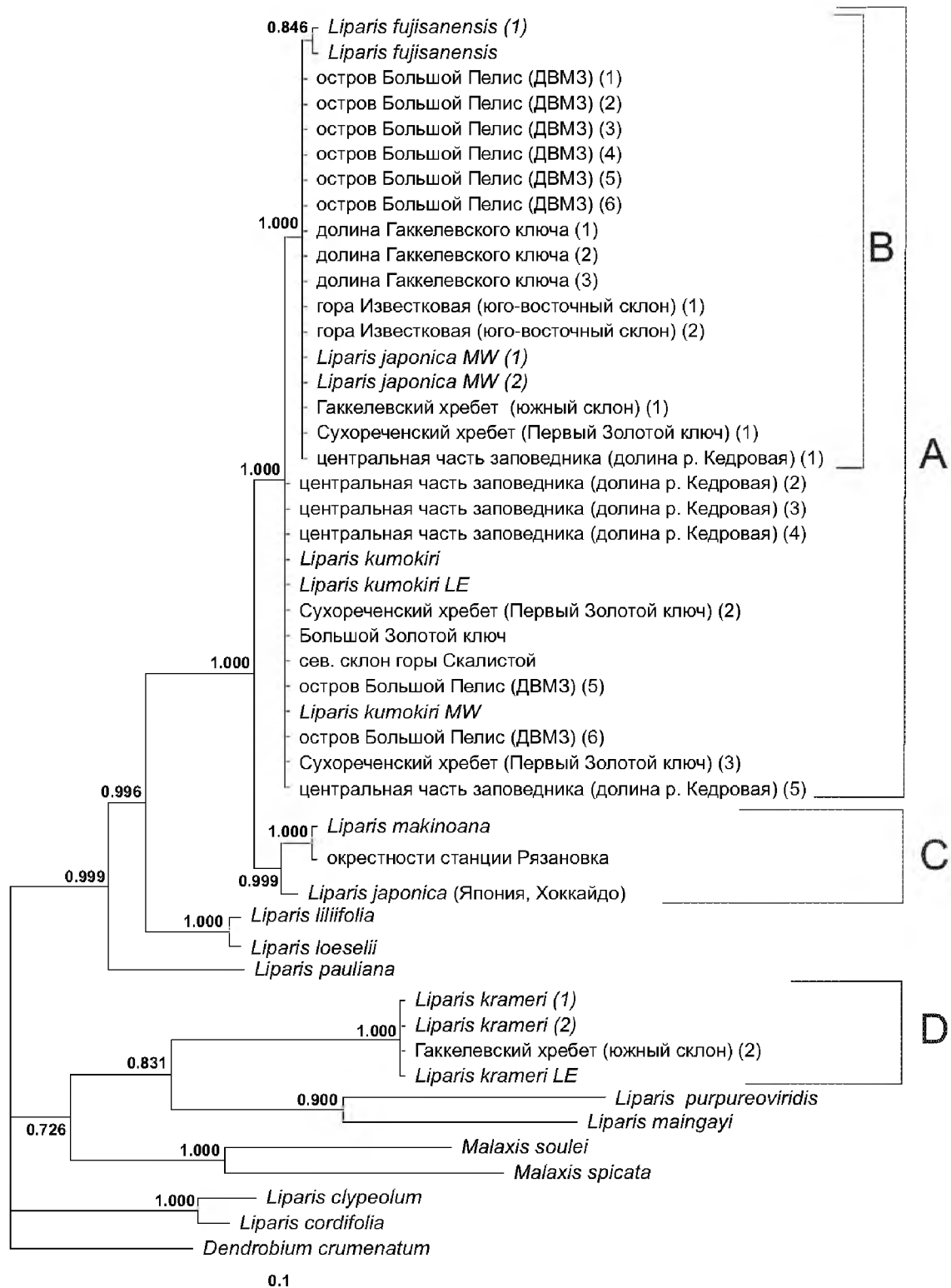


Рис. 1. Консенсусное дерево, полученное по результатам анализа последовательностей участка ITS ядерной рибосомной ДНК 48 видов с помощью метода Mr. Bayes 3.1 на основании 5500000 деревьев. Числа около узлов представляют значения апостериорной вероятности. Узлы с поддержкой менее 0,50 не показаны.

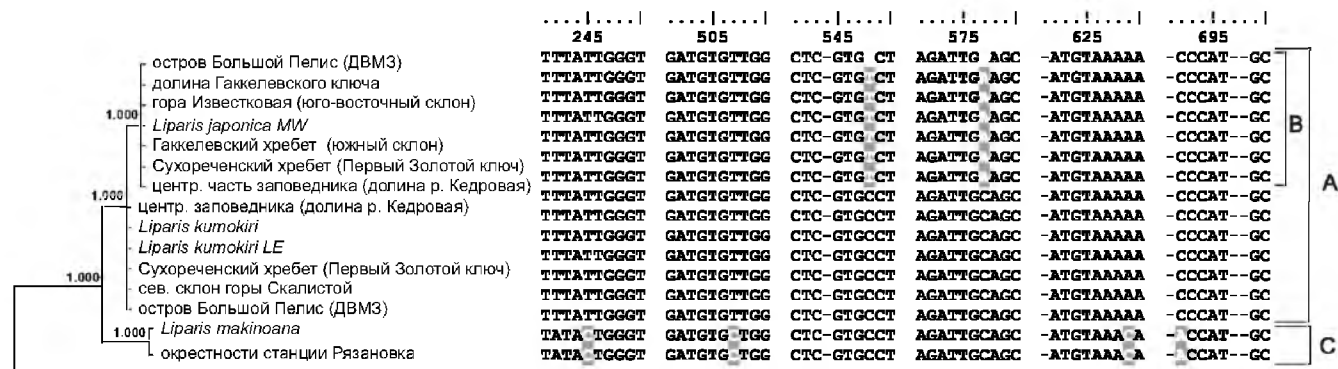


Рис. 2. Фрагменты молекулярно-филогенетического дерева, полученного с помощью метода Mr. Bayes 3.1 и фрагменты выравнивания последовательностей участка ITS ядерной рДНК, анализируемых образцов с группоспецифичными заменами.

ны клады А близки между собой и имеют довольно низкий уровень дивергенции последовательностей (0,05 %). Клада А включает в себя хорошо поддержанную субкладу В. Все образцы популяций субклады В близки между собой и имеют идентичные нуклеотидные последовательности с реперными образцами *Liparis japonica* (см. прил.). Полученные данные позволяют нам предположить, что образцы из популяций субклады В представлены видом *L. japonica*, что согласуется и с морфологическими признаками (высота растения – до 25 – 30 см, с хорошо выраженным листовым черешком – до 7 см, с широкими листьями, с широкой губой, загнутой по краю, с зеленоватыми и окрашенными цветками). Образцы растений клады А не вошедшие в субкладу В имеют идентичные нуклеотидные последовательности с реперными образцами *L. kumokiri* (см. прил.). В таком случае мы можем отнести эти образцы к *L. kumokiri*, что соответствует морфологическим признакам (высота растения – до 25 см, отсутствие длинного черешка, более короткое соцветие, желто-зеленоватые цветки, узкая, сильно закрученная губа) и согласуется с литературными данными (Шибнева, 2008, 2011; Ефимов, 2010). При сравнении ITS последовательностей образцов клады А были отмечены синапоморфные замены в положении 548 (С→Т) и 577 (С→А), которые согласуются с положением видов на филогенетическом дереве и маркируют виды клады А от видов субклады В (рис. 2). Образец, собранный из популяции в окрестности станции Рязановка, вместе с *L. makinoana* из базы данных GenBank формируют хорошо поддержанную субкладу в кладе С. ITS последовательности этих образцов идентичны. Таким образом, полученные молекулярные данные позволяют нам предположить, что образец, собранный в окрестности станции Рязановка – *L. makinoana*. Синапоморфные замены в ITS последовательностях в положении 245 (Т→С), 507 (Т→С), 629 (А→С) и 692 (С→А) маркируют виды субклады (*L. makinoana*) в кладе С (рис. 2). Базальное положение в кладе С занимает *Liparis japonica* (Япония, Хоккайдо) (Su et al., 2015), что согласуется с молекулярными данными (Lee et al., 2010) и морфологическими признаками (Шибнева, 2011).

Клада D занимает на филогенетическом дереве (рис.1) обособленное положение относительно клад А и С. В кладу D входит образец, собранный на южном склоне Гаккелевского хребта и два образца *L. krameri* из базы данных GenBank. Все образцы клады D имеют идентичные нуклеотидные последовательности. Обособленное положение клады D, определяется достаточно высокой вариабельностью ITS последовательностей *L. krameri* по сравнению с последовательностями (*L. japonica*, *L. kumokiri* и *L. makinoana*). Согласно полученным данным, популяция на южном склоне Гаккелевского хребта образована *L. krameri*, что согласуется как с морфологическими (мелкие размеры растений: высота до 15 см, листья длиной до 5 см, шириной – до 2,5 см, мелко-волнистые, заостренные; губа 0,8 × 0,5 см, в средн. части с резким перегибом и с изогнутым острием на кончике), так с молекулярными данными (Lee et al., 2010).

Анализ ITS последовательностей растений популяции рода *Liparis* с острова Большой Пелис (ДВМЗ)

Популяция занимала довольно большую площадь на сырой поляне в широколиственном лесу. Здесь по соседству группами располагались растения, у которых морфологические признаки (высота растения, ширина листовой пластинки, окраска цветов, ширина губы, степень скрученности губы, длина цветоножки) сильно различались. Вариабельность была настолько выражена, что трудно было понять, что мы наблюда-

ем: полиморфизм признаков одного вида в пределах популяции, популяции разных видов, произрастающих совместно или гибриды. Чтобы разобраться в этом, были взяты образцы для молекулярного анализа с растением: с окрашенной и неокрашенной широкой губой и с узкой сильно закрученной губой.

По результатам анализа последовательностей участка ITS ядерной рибосомной ДНК растения из популяции разделились на две группы в кладе А: 2 образца остались в кладе А, а 6 образцов оказались в субкладе В. В кладе А, состоящую из *Liparis kumokiri* попали растения с желто-зеленоватыми цветками и узкой, сильно закрученной губой и более коротким соцветием. В субкладе В, состоящую из *Liparis japonica* попали растения с широкой губой, зеленоватыми и окрашенными цветками, с хорошо выраженным листовым черешком и более широкими листьями. Параллельное применение морфологической и молекулярной методик показало, что в этом местообитании одновременно произрастают 2 вида рода *Liparis*.

Исследования показали, что анализируемые виды рода *Liparis* хорошо различимы на молекулярном уровне. Таким образом, параллельное использование морфологических и молекулярных методов позволяет более точно провести таксономическую идентификацию растений рода *Liparis*, особенно в сложных случаях.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 14-50-00029: сбор материала на территории Приморского края, анализ материала морфологическими методами; при поддержке гранта РФФИ № 14-04-01486: молекулярно-филогенетический анализ.

ЛИТЕРАТУРА

- Вахрамеева М. Г., Варлыгина Т. И., Татаренко И. В.* Орхидные России (биология, экология и охрана). – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. – 437 с.
- Вышин И. Б.* Семейство Ятрышниковые или орхидные – Orchidaceae // Сосудистые растения советского Дальнего Востока. – СПб., 1996. – Т. 8. – С. 301–339.
- Ефимов П. Г.* Род *Liparis* (Orchidaceae) на территории России // Бот. журн., 2010. – Т. 95, № 10. – С. 1458–1480.
- Невский С. А.* Род *Liparis* L. С. Rich. // Флора СССР. – Л.: АН СССР, 1935. – Т. 4. – С. 601–604.
- Ракова М. В.* *Liparis krameri* (Orchidaceae) – новый вид для флоры СССР из заповедника «Кедровая Падь» (Приморский край) // Бот. журн., 1990. – Т. 75, № 12. – С. 1780–1782.
- Ракова М. В.* // Биология редких видов растений заповедника «Кедровая Падь». – Владивосток, 1992. – 175 с.
- Татаренко И. В.* // Орхидные России: жизненные формы, биология, вопросы охраны. – М.: Аргус, 1996. – 207 с.
- Шибнева И. В., Коркишко Р. И.* О новом местонахождении *Liparis kumokiri* F. Maek. в заповеднике «Кедровая Падь» // Животный и растительный мир Дальнего Востока. Сер. Экология и систематика растений. 2001. – Вып. 5. – С. 46–52.
- Шибнева И. В.* *Liparis kumokiri* (Orchidaceae) на Дальнем Востоке России // Бот. журн., 2004. – Т. 89, № 10. – С. 1633–1636.
- Шибнева И. В.* Заметки о видах рода *Liparis* (Orchidaceae) из Приморского края // Растения в муссонном климате: Матер. конф. (10–13 октября 2006 г., Владивосток). – Владивосток, 2007. – С. 264–268.
- Шибнева И. В.* Что такое *Liparis japonica* (Miq) Maxim. и *L. makinoana* Schltr. (Orchidaceae) – заметки флориста // Охрана и культивирование орхидей: Материалы IX Междунар. науч. конф. (26–30 сентября 2011 г., Санкт-Петербург). – СПб., 2011. – С. 287–289.
- Edgar R. C.* MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucleic Acids Research, 2004. – Vol. 32. – P. 1792–1797.
- Hall T. A.* BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. 1999. – Ser. 41. – P. 95–98.
- Kim S. N., Kim Y. S.* Morphological and cytological Study on genus *Liparis* in Korea // Kor. J. Plant Tax., 1986. – Vol. 16. – P. 59–88.
- Lee C. S., Tsutsumi C., Yukawa T., Lee N. S.* Two New Species of the Genus *Liparis* (Orchidaceae) from Korea Based on Morphological and Molecular Data // J. Plant Biol., 2010. – Vol. 53, No. 3. – P. 190–200.
- Ohwi J.* Flora of Japan. – Washington, 1965. – 1067 p.
- Sataka Y., Ohwi J., Watari S., Tominari T.* Wild flowers of Japan. I. – Tokyo, 1982. – 305 p.
- Schlechter R.* Orchideologiae-Japonicae Prodromus // Repert. Sp. Nov. Fedde Beih. 1919. – Bd. 4. – P. 63.
- Su Y. Y., Huang Y. L., Chen L. J., Zhang P. W., Liu Z. J., Zhang G. Q.* *Liparis wenshanensis*, a new orchid species from China: Evidence from morphological and molecular analyses // Phytotaxa, 2015. – Vol. 204, No. 4. – P. 253–264.
- Swofford D. L.* PAUP*: version 4.0. Sunderland, Massachusetts: Inc. Publishers, Sinauer Associates, 2003

Tsutsumi C., Yukawa T., Lee N. S et al. Phylogeny and comparative seed morphology of epiphytic and terrestrial species of *Liparis* (Orchidaceae) in Japan // Plant Res., 2007. – Vol. 120. – P. 405–412.

Tsutsumi C. Yukawa T. Taxonomic status of *Liparis japonica* and *L. makinoana* (Orchidaceae); preliminary report // Bull. Natl. Mus. Nat. Sci. Ser., 2008. – Vol. 34, No. 2. – P. 89–94.

Valiejo-Roman C. M., Terentieva E. I., Samigullin T. H., Pimenov M. G. Relationships among genera in Saniculoideae (Umbelliferae) and connected taxa inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA // Taxon, 2002. – Vol. 51. – P. 91–101.