

УДК 582.594.2+543.423.3(470.21)

Молекулярный анализ двух видов рода *Dactylorhiza* в Мурманской области

Molecular analysis of the two species of *Dactylorhiza* in the Murmansk region

Терентьева Е. И.¹, Дегтярева Г. В.¹, Ефимов С. В.¹, Самигуллин Т. Х.², Варлыгина Т. И.¹

Terentieva E. I.¹, Degtjareva G. V.¹, Efimov S. V.¹, Samigullin T. H.², Varlygina T. I.¹

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

¹Botanical Garden, Moscow State University, Vorobjevy Gory, Leninskie gory, 1/12, Moscow, 119991

²НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ, Ленинские горы, дом 1, стр. 40, Москва, 119992
E-mail: tagrai@mail.ru

²Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Leninskie gory, 1/40, Moscow, 119992

Реферат. В черте г. Мурманска были найдены и обследованы локальные популяции *Dactylorhiza baltica* и *D. maculata*. Так как виды рода *Dactylorhiza* морфологически трудно различимыми из-за высокой вариабельности морфологических признаков, нами было использовано традиционное определение видов по морфологическим признакам в сочетании с молекулярно-генетическим анализом последовательностей ITS участка 18S – 26S ядерной рибосомной ДНК. В построенных дендрограммах образцы *D. baltica* формируют отдельный, высоко поддержанный кластер, что согласуется и с морфологическими признаками. Полученные с помощью молекулярных методов результаты подтвердили, что в городе Мурманске нами обнаружено в настоящее время самое северное местонахождение *D. baltica* в европейской части России.

Summary. During investigation of vegetation in the Murmansk, small local populations of *Dactylorhiza baltica* and *D. maculata* have been found and examined. As species of genus *Dactylorhiza* cannot be easily distinguished using morphological methods due to high intraspecific variability of morphological traits, for more precise assessment of species authenticity of the found plants, the traditional analysis of morphological features has been used in combination with the molecular-genetic analysis ITS of 18S – 26S nuclear ribosomal DNA. In plotted dendrograms, samples of *D. baltica* form a separate, highly supported cluster, which also agrees with morphological traits. The obtained results suggest that the small local population revealed in the Murmansk corresponds to the northernmost point of *D. baltica* area distribution.

Введение

В настоящее время в роде *Dactylorhiza* (сем. Orchidaceae) идут процессы активного видообразования (Филиппов, Андропова, 2017; Pillon et al., 2006; Devos et al., 2006) с выраженной экологической и географической изменчивостью. Род насчитывает около 50–70 видов, распространенных в странах с умеренным и бореальным климатом. Центром биоразнообразия рода *Dactylorhiza* является Западная Европа, и по мере продвижения на восток число видов этого рода сокращается. Большая часть видов является общепризнанной (Невский, 1935; Аверьянов, 1979, 2000; Vermeulen, 1947 и др.), однако их объем не всегда одинаков в понимании разных авторов, а определение порой вызывает значительные трудности из-за наличия растений с промежуточными морфологическими признаками.

Виды рода *Dactylorhiza* из секции *Dactylorhiza* часто скрещиваются между собой, образуя многочисленные гибриды. Считают, что *Dactylorhiza baltica* (Klinge) Orlova является стабилизированным гибридогенным видом. Причем одни авторы полагают, что *D. baltica* происходит от гибридизации *D. incarnata* x *D. majalis* (Цвелёв, 2000), а другие – на основе изучения генетического полиморфизма (Ефимов, 2012) и, используя молекулярные методы (Shipunov et al., 2005), подтверждают гибридогенное происхождение *D. baltica* от другой пары видов (*D. fuchsii* x *D. incarnata*).

Ареал *D. baltica* на территории России состоит из двух частей (Иванова, 1987), хотя есть мнение, что в Сибири этот вид отсутствует (Куликов, Филиппов, 1999). В любом случае азиатская часть ареала нуждается в проверке (Вахрамеева и др., 2014). В Европейской России вид распространен преимуще-

щественно в лесной зоне от западных границ до Южного Урала. Северная граница европейской части ареала вида проходит по Ленинградской, Архангельской, Вологодской, Тверской и др. областям. *D. baltica* занесён в Красную книгу РФ (2008). Найденное нами местонахождение расположено значительно севернее ареала вида, за полярным кругом.

В данной работе для уточнения таксономического статуса найденных видов был использован традиционный анализ морфологических признаков в сочетании с молекулярно-генетическим анализом ITS участка 18S – 26S ярдНК.

Материалы и методы

Растительный материал был собран летом 2016 г. в черте г. Мурманска. Отдельные растения из популяции были сфотографированы на цифровую камеру. В данной работе в молекулярный анализ также были включены образцы видов рода *Dactylorhiza maculata* из 6 популяций, найденных на территории Мурманской области (п-ов Рыбачий, Турий мыс, окрест. п. Варзуга). У растений из указанных популяций были взяты фрагменты вегетативных и генеративных частей растений (18 образцов) для молекулярных исследований с целью уточнения их таксономического статуса. Для молекулярно-филогенетического анализа маркерами были выбраны внутренние транскрибируемые спейсеры ITS участка 18S – 26S ярдНК. Выделение ДНК, амплификация и секвенирование участка ITS проводилось согласно методике, описанной в работе Valiejo-Roman et al. (2002).

Результаты и обсуждение

В ходе экспедиции по Мурманской области 7 июля 2016 г. в черте г. Мурманска на сыром злаково-разнотравном лугу по склону холма к Семёновскому озеру были найдены и обследованы локальные популяции двух видов: *Dactylorhiza baltica* и *D. maculata* (L.) Soó. Растения были определены нами по морфологическим признакам (наличие или отсутствие полого стебля, форма губы цветка, размеры соцветия, соотношение длины и ширины листьев, форма пятен на них и др.). Популяция *D. baltica* насчитывала 10 особей, из которых 8 были генеративными в фазе цветения. Растения располагались рассеянно, по 1–3 экз.

Для молекулярно-филогенетического анализа были дополнительно взяты 28 нуклеотидных последовательностей ITS 6 видов рода *Dactylorhiza* и *Gymnadenia conopsea* (таксон, близкий к роду *Dactylorhiza*) из базы данных GenBank. Выборку таксонов для молекулярного анализа осуществляли, опираясь на работы Pillon et al. (2006) и Devos et al. (2006).

Все ITS последовательности анализируемых видов выравнились 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 45 выравненных последовательностей ITS ярдНК содержит 642 позиции, из которых 558 – консервативные, 36 – парсимонно-информативные и 48 – парсимонно-неинформативные. Молекулярно-филогенетические деревья были построены по ITS последовательностям двумя методами – методом Mr. Bayes 3.1 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003) и методом максимальной экономии RAUP* 4.0b8 (Swofford, 2003). Полученные топологии деревьев неидентичны, но конгруэнтны в основных узлах. В статье мы приводим консенсусное молекулярно-филогенетическое дерево, построенное методом Mr. Bayes 3.1 (рис.).

В построенных нами филогенетических деревьях виды рода *Dactylorhiza* формируют 3 хорошо поддержанных клады (А, В и С), что подтверждает их естественность. Образцы, собранные на территории Мурманской области, а также 9 образцов из базы данных GenBank входят в состав клады А. В клады С и В входят только образцы GenBank из европейских популяций (рис. 1).

При сравнении ITS последовательностей всех анализируемых таксонов рода *Dactylorhiza* для образцов клады А были выявлены синапоморфные замены в положении 91 (С→Т) и 501 (G→С), которые отличают их от таксонов клады В и С. Анализ ITS последовательностей показал, что образцы *D. maculata*, собранные в Мурманской области, маркируются видоспецифичными заменами и не объединяются в одну кладу с образцами *D. maculata* из базы данных GenBank.

Уровень дивергенции между ITS последовательностями образцов *D. maculata* клады А и В составил 0,012 %, это достаточно высокий показатель для образцов одного вида.

Все образцы *D. baltica* вместе с *D. fuchsii* (DQ022863) из базы данных GenBank образовали хорошо поддержанный компактный кластер (1) в кладе А (рис.). ITS-последовательности этих образцов

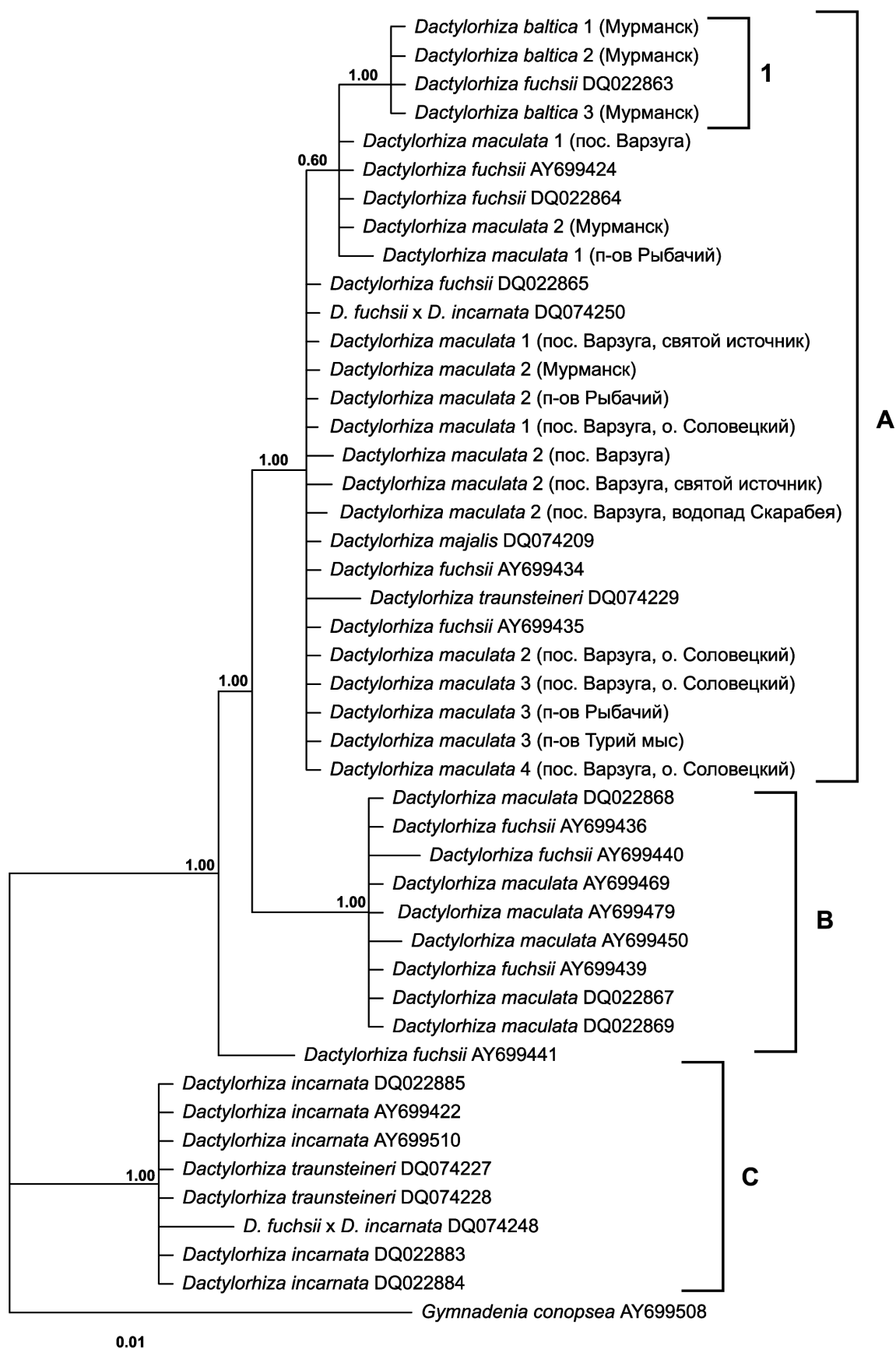


Рис. Консенсусное дерево, полученное по результатам анализа последовательностей участка ITS ядерной рибосомной ДНК 45 видов с помощью метода Mr. Bayes 3.1 на основании 25 000 000 деревьев. Числа около узлов представляют значения апостериорной вероятности. Узлы с поддержкой менее 0,50 не показаны.

идентичны и имеют синапоморфные замены в положении 208 (C→A) и 429 (A→G), маркирующие кластер *D. baltica* от таксонов клад A, B и C, что согласуется и с морфологическими признаками.

Выявленная нами локальная популяция в г. Мурманске является пока самым северным местонахождением вида в европейской части России.

Благодарности. Работа выполнена в рамках госзадания МГУ им. М. В. Ломоносова № ААА-А-А16-116021660049-0: сбор материала на территории Мурманской области; при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-50-00029: анализ материала морфологическими методами, молекулярно-филогенетический анализ.

ЛИТЕРАТУРА

- Аверьянов Л. В. О внутривидовой структуре таксона *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó. s.l. сем. Orchidaceae // Бот. журн., 1979. – Т. 64, № 4. – С. 572–582.
- Аверьянов Л. В. Орхидные (Orchidaceae) Средней России // Turczaninowia, 2000. Т. 3, вып. 1. – С. 30–53.
- Вахрамеева М. Г., Варлыгина Т. И., Татаренко И. В. Орхидные России (биология, экология и охрана). – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. – 437 с.
- Ефимов П. Г. Исследования генетического полиморфизма *Dactylorhiza baltica*, *D. fuchsii* и *D. incarnata* (Orchidaceae) из северо-запада Европейской части России методом ISSR // Бот. журн., 2012. – Т. 97, № 6. – С. 751–760.
- Иванова Е. В. Семейство Orchidaceae // Флора Сибири. – Новосибирск: Наука, 1987. – С. 125–147.
- Куликов П. В., Филиппов Е. Г. О наличии *Dactylorhiza baltica* (Klinge) Orlova во флорах Урала и Западной Сибири // Бюл. МОИП. Отд. биол., 1999. – Т. 104, вып. 2. – С. 29–33.
- Невский С. А. Семейство Ятрышниковые – Orchidaceae // Флора СССР. – Л.: Изд-во АН СССР, 1935. – Т. 4. – С. 589–730.
- Филиппов Е. Г., Андропова Е. В. Генетическая структура популяций и естественная гибридизация *Dactylorhiza salina* и *D. incarnata* (Orchidaceae) // Генетика, 2017. – Т. 53, № 3. – С. 310–323.
- Цвелёв Н. Н. Определитель сосудистых растений Северо-Западной России (Ленинградская, Псковская и Новгородская области. – СПб.: Изд-во СМПХФА, 2000. – 781 с.
- Devos N., Raspe O., Oh Sang-Hun, Tyteca D., Jacquemart A. L. The evolution of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) allo-tetraploid complex: Insights from nrDNA sequences and cpDNA PCR-RFLP data // Molecular Phylogenetics and Evolution, 2006. – Vol. 38. – P. 767–778.
- 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.
- 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) // Biological conservation, 2006. – Vol. 129. – P. 4–13.
- Ronquist F.R., Huelsenbeck J.P. MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. – №. 19. – P. 1572–1574.
- Shipunov A. B., Fay M. F., Chase M. W. Evolution of *Dactylorhiza baltica* (Orchidaceae) in European Russia: evidence from molecular markers and morphology // Bot. J. Linn. Soc., 2005. – P. 147–164.
- Swofford D. L. PAUP*: version 4.0. Sunderland, Massachusetts: Inc. Publishers, Sinauer Associates, 2003.
- 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.
- Vermeulen P. Studies on *Dactylorhiza*: F. Schoturius and Jens. – Utrecht, 1947. – 180 s.