

УДК 575.222.582.594.6(470)

**Таксономическая ревизия видов рода *Liparis* (Orchidaceae),
распространенных в Приморском крае и Сахалинской области, по
результатам анализа морфологических и молекулярных данных**

**Taxonomic revision of species of the genus *Liparis* (Orchidaceae) distributed in
Primorsky Krai and the Sakhalin region based on the analysis of morphological
and molecular data**

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

¹ Ботанический сад Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия.
E-mail: el.terentieva@mail.ru; degavi@mail.ru; efimov-msu@yandex.ru; tat-varlygina@yandex.ru

² НИИ Физико-Химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, г. Москва, Россия.
E-mail: tagrai@mail.ru

¹ Botanical Garden, Moscow State University, Moscow, Russia

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

Реферат. На территории Приморского края и Сахалинской области было проведено обследование популяций видов рода *Liparis* и первичное определение растений. Так как виды рода *Liparis* (*L. japonica*, *L. krameri*, *L. kumokiri*, *L. makinoana* и *L. sachalinensis*) морфологически трудно различимы, то для определения видовой принадлежности представителей природных популяций были взяты фрагменты растений для молекулярно-филогенетических исследований. В качестве молекулярных маркеров были выбраны внутренние транскрибируемые спейсеры ITS участка 18S-26S ярдНК и маркеры хлоропластного генома trnL-trnF и *ycf1*. Анализ морфологических признаков и молекулярных данных позволил нам провести видовую идентификацию представителей природных популяций рода *Liparis*. В данной работе получены предварительные результаты по микроструктуре поверхности семян отдельных видов *Liparis*.

Summary. The species of the genus *Liparis* were sampled on the territory Primorsky Krai and the Sakhalin region. 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 ITS of a region of 18S-26S nuclear ribosomal DNA and the markers of the chloroplast genome trnL-trnF and *ycf1* were selected as a molecular markers for molecular analysis. Analysis of morphological characters and molecular data allowed us to conduct species identification of representatives of natural populations of the genus *Liparis*. In this paper preliminary results on the microstructure of the seed surface of individual *Liparis* species are obtained.

Введение

Род *Liparis* Rich. из трибы *Malaxideae* Lindl. насчитывает около 250–300 видов, распространенных преимущественно в тропических областях Старого Света. На территории России произрастает 6 видов рода *Liparis* (*L. japonica* (Miq.) Maxim., *L. krameri* Franch. et Savat., *L. kumokiri* F. Maek., *L. makinoana* Schlechter, *L. loeselii* (L.) L.C. Rich. и *L. sachalinensis* Nakai), которые встречаются на юге Дальнего Востока, причем *L. sachalinensis* является эндемиком острова Сахалин (Вахрамеева и др., 2014), *L. loeselii* распространен в европейской части и в Сибири. Наблюдения в природе, изучение гербарных сборов и литературных данных (Шибнева, 2004; Ефимов, 2010) показывают значительную внутривидовую вариабельность морфологических признаков. Это затрудняет, а порою делает невозможным определение видовой принадлежности отдельных видов рода *Liparis* (*L. japonica*, *L. kumokiri*, *L. sachalinensis* и *L. makinoana*). Кроме того, ареалы этих видов перекрываются, что также вносит путаницу в их опреде-

ление. Поэтому, по-прежнему, остается актуальным поиск новых диагностических признаков для надежного разграничения видов рода *Liparis*. Цель нашего исследования – уточнение видового состава *Liparis* на территории Дальнего Востока (Приморского край и Сахалинская область) с использованием молекулярных и морфологических методов.

Материалы и методы

Проведено молекулярно-филогенетическое исследование 6 видов *Liparis* (*L. japonica*, *L. kumokiri*, *L. sachalinensis*, *L. krameri*, *L. makinoana* и *L. loeselii*), а также с помощью сканирующего электронного микроскопа была проведена видовая диагностика семян пяти образцов *Liparis*. Материалом для исследования послужили гербарные образцы, хранящиеся в гербариях (MW, МНА, LE, МАG), и образцы, собранные в ходе экспедиций в 2015–2016 гг. по территории Дальнего Востока (Приморский край и Сахалинская область). В качестве молекулярных маркеров были выбраны внутренние транскрибируемые спейсеры ITS участка 18S-26S ярдНК и маркеры хлоропластного генома *trnL-trnF* и *ycf1*. Молекулярно-филогенетические деревья были построены по комбинированным данным ITS – *trnL-trnF* и *trnL-trnF – ycf1* двумя методами: – байесовским методом в программе Mr. Bayes 3.1 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003) и методом максимальной экономии в программе RAUP* 4.0b8 (Swofford, 2003). Полученные топологии деревьев не идентичны, но конгруэнтны в основных узлах. Название видов рода *Liparis* в молекулярно-филогенетических деревьях соответствует первичному визуальному определению, сделанному в природе по морфологическим признакам. Микроструктуру поверхности семян изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (JEOL, Япония) (СЭМ).

Результаты и обсуждения

В построенных нами филогенетических деревьях по комбинированным данным ITS – *trnL-trnF* и *trnL-trnF – ycf1* анализируемые образцы из разных популяций видов рода *Liparis* формируют 4 хорошо поддержанные клады, что согласуется с результатами (Варлыгина и др., 2017). В статье мы приводим молекулярно-филогенетические деревья, построенные байесовским методом по комбинированным данным ITS – *trnL-trnF* и *trnL-trnF – ycf1* (рис.1). Клада 1 объединяет 46 образцов (рис. 1а) и 42 образца (рис. 1б), собранных в разных точках на территории Приморского края и Сахалинской области – это самая большая клада, которая включает в себя высоко поддержанную субкладу А из 19 образцов (рис. 1а) и 15 образцов (рис. 1б), собранных в разных точках в Хасанском и Уссурийском районах Приморского края. Все образцы субклады А имеют идентичные нуклеотидные последовательности по ITS, *trnL-trnF* и *ycf1*. При сравнении нуклеотидных последовательностей по трем маркерам образцов *Liparis* субклады А с остальными образцами клады 1 были выявлены синапоморфные замены для ITS и *trnL-trnF*, а для *ycf1* синапоморфные замены отсутствуют. Полученные данные позволяют нам предположить, что образцы из субклады А представлены одним видом. Это может быть *L. japonica* (MW), выбранный нами в качестве реперного вида. Данный образец собран в Уссурийском районе и по морфологическим признакам соответствует описанию вида *L. japonica* (Miq.) Maxim. или *Liparis koreana* (Nakai) Nakai (данные Генбанка). Полученный результат требует дальнейшего комплексного анализа, так как в настоящее время существует проблема с идентификацией *L. japonica*. Российские образцы *L. japonica* (Miq.) Maxim. по морфологическим и молекулярным данным отличаются от образцов этого вида, собранных в Японии (*L. japonica* (Miq.) Maxim. var. *makinoana* (Schlechter) M. Hiroe. В нашей работе *L. japonica* (Япония) входит в одну кладу с *L. makinoana* (рис. 1а), что согласуется с морфологическими признаками и литературными данными (Tsutsumi et al., 2008). Образцы растений клады 1, не вошедшие в субкладу А, имеют идентичные нуклеотидные последовательности по ITS, *trnL-trnF* и *ycf1* с реперными образцами *L. kumokiri* из гербариев LE и MW с характерными для *L. kumokiri* морфологическими признаками и образцами *L. kumokiri* из Генбанка. Таким образом, мы можем предположить, что образцы клады 1 относятся к *L. kumokiri*. Полученные нами данные по трем маркерам (ITS, *trnL-trnF* и *ycf1*) не подтвердили самостоятельный статус *L. sachalinensis*. Все проанализированные образцы из гербариев LE, МНА и MW не сформировали отдельного кластера, а вошли в кладу 1 с образцами *L. kumokiri*. Это дает основание усомниться в самостоятельности данного вида. Образцы *L. krameri*, *L. loeselii* и *L. makinoana*, собранные в Хасанском и в Шкотовском районах Приморья по результа-

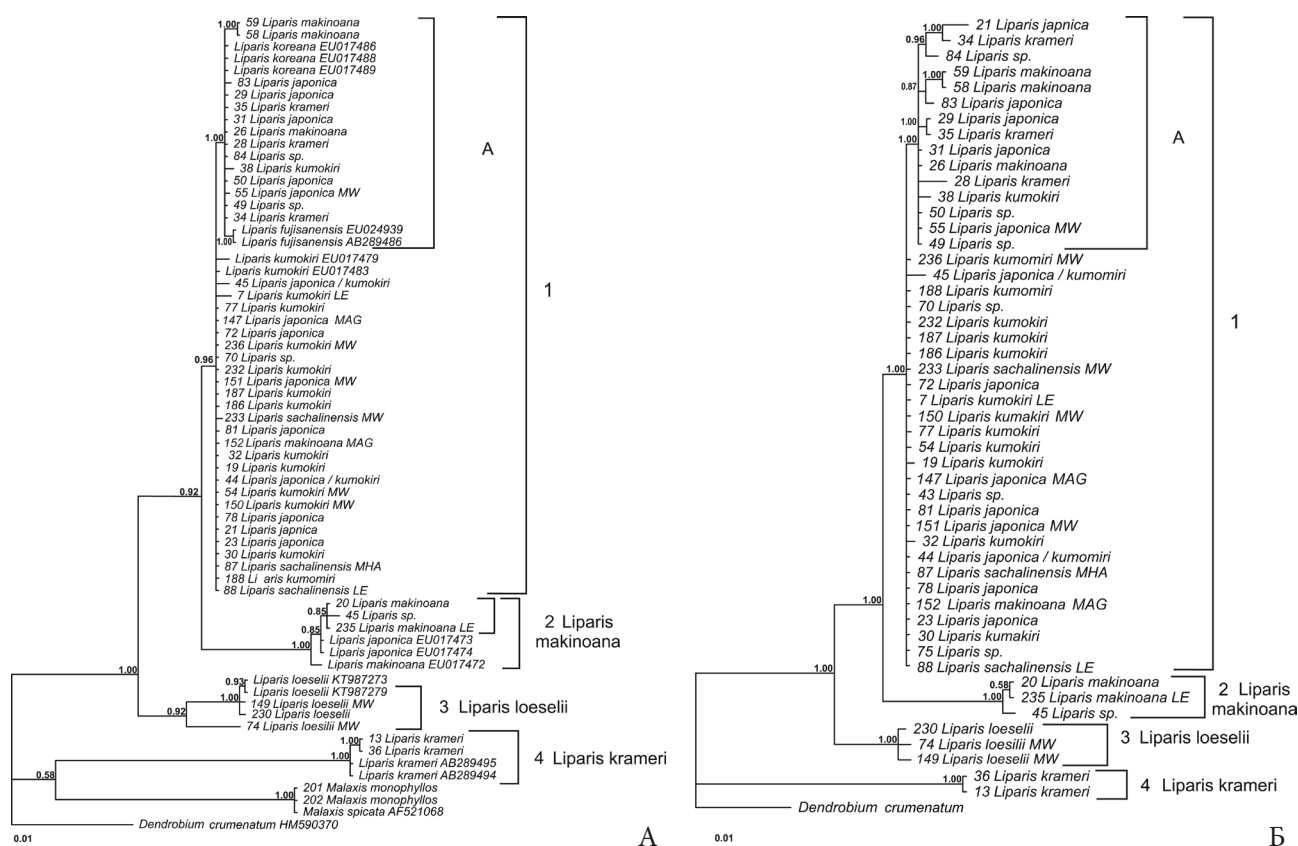


Рис. 1. Консенсусные деревья, полученные по результатам анализа последовательностей участков а) ITS и trnL-trnF; б) trnL-trnF и ycf1 для 61 образца видов *Liparis* с помощью байесовского метода в программе Mr. Bayes 3.1 на основании 5500000 деревьев. Числа около узлов представляют значения апостериорной вероятности. Узлы с поддержкой менее 0,50 не показаны.

там анализа нуклеотидных последовательностей по трем маркерам формируют отдельные хорошо поддержанные клады (рис.1), что согласуется с морфологическими и молекулярными данными (Варлыгина и др., 2017).

У пяти образцов из разных видов рода *Liparis* из гербариев MW и MAG была проведена диагностика семян при помощи СЭМ. По мнению отдельных авторов (Barthlott, 1976; Vij et al., 1992) особенности строения семенной оболочки у орхидей являются важным морфологическим признаком для характеристики таксонов. Плоды четырех образцов (*L. makinoana*, *L. kumokiri*, *L. japonica* (MAG) и *L. japonica* (MW 0047469)) по форме, размеру и по особенностям клеточных стенок оказались однотипными. Это хорошо согласуется с результатами молекулярно-филогенетического анализа. Все четыре образца вошли в кладу 1, которую формируют образцы *L. kumokiri*. Семена *L. loeselii* по форме и размеру отличаются от других проанализированных образцов семян *Liparis*. Данные по микроструктуре поверхности семян *L. loeselii* хорошо согласуются с результатами молекулярно-филогенетического анализа. Полученные предварительные результаты по микроструктуре поверхности семян отдельных видов *Liparis* показывают необходимость продолжения дальнейшего исследования по диагностике семян видов *Liparis*.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФ № 14-50-00029: сбор материала на территории Приморского края и Сахалинской области, анализ материала морфологическими и молекулярными методами.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, в межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ.

ЛИТЕРАТУРА

Вахрамеева М. Г., Варлыгина Т. И., Татаренко И. В. // Орхидные России (биология, экология и охрана). – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. – 437 с.

Варлыгина Е. И., Дегтярева Г. В., Ефимов С. В., Терентьева Е. И. Популяционные исследования орхидных в заповеднике «Кедровая падь» // Биота и среда заповедников Дальнего Востока, 2017. — Т. 1, № 10. – С. 67–83.

Ефимов П. Г. Род *Liparis* (Orchidaceae) на территории России // Бот. журн., 2010. – Т. 95, № 10. – С. 1458–1480.

Шибнева И. В. *Liparis kumokiri* (Orchidaceae) на Дальнем Востоке России // Бот. журн., 2004. – Т. 89, № 10. – С. 1633–1636.

Barthlott W. Epidermal and seed surface characters of plant: systematic applicability and some evolutionary aspects // Nordic J. Bot., 1981. – Vol. 1. – No3. – P.345–355.

Ronquist F. R., Huelsenbeck J. P. MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics, 2003. – No. 19. – P. 1572–1574.

Swofford D. L. PAUP*: version 4.0. – Sunderland, Massachusetts: Inc. Publishers, Sinauer Associates, 2003.

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.

Vij S. P., Kaur P., Kaur S., Kaushal P. S. The orchid seeds: taxonomic, evolutionary and functional aspects // J. Orchid Soc., India, 1992. – Vol. 6. – P. 91–107.