

УДК 582.594:575.113.2

**Генетическая структура популяций представителей рода *Cypripedium* (*C. calceolus*, *C. macranthon*, *C. shanxiense* и *C. × ventricosum*) России по данным аллозимного анализа**

**Genetic structure of the Russian *Cypripedium* populations (*C. calceolus*, *C. macranthon*, *C. shanxiense* and *C. × ventricosum*) inferred from allozyme data**

Е. Г. Филиппов<sup>1</sup>, Е. В. Андропова<sup>2</sup>

E. G. Filippov, E. V. Andronova

<sup>1</sup>Ботанический сад Уральского отделения РАН, 620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202а, Россия, e-mail: filorch@mail.ru

<sup>2</sup>Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, 197376 г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова д.2, Россия, e-mail: elena.andronova@mail.ru

**Реферат.** Проведен анализ 10 генных локусов (*PGI*, *6PGD*, *NADHD*, *SKDH*, *GDH*, *PGM*, *DIA*, *ADH*, *GOT-1*, *GOT-2*) у особей *Cypripedium calceolus*, *C. macranthon*, *C. shanxiense* и *C. × ventricosum*, произрастающих в Забайкалье, Центральной и Западной Сибири, на Урале и на Европейской части России. Исследование подтвердило ранее установленный факт на примере изучения популяций с юга Дальнего Востока, что аллельный состав локусов *6-PGD*, *NADHD*, *GDH*, *ADH*, *GOT-1* и *PGI* являются диагностическими для *C. calceolus* и *C. macranthon*. Все изученные особи *C. × ventricosum*, также как и ранее изученные из Приморья, оказались гетерозиготными по всем диагностическим для *C. calceolus* и для *C. macranthon* аллелям. Особи *C. shanxiense* из Забайкалья также как и из Приморского края и с Сахалина оказались мономорфными по всем 10 изученным локусам, это подтверждает, что признак является диагностическим для данного вида. Как оказалось, *C. macranthon* в Забайкалье характеризуется большим полиморфизмом морфологических признаков. Здесь были отмечены растения *C. macranthon* с двумя цветками на генеративном побеге, имеющие более открытый тип цветка, лодочкообразный стаминодий. Эти вышеперечисленные признаки в ботанических определителях указываются исключительно для *C. × ventricosum*. На основании частот аллелей были вычислены генетические дистанции по Nei et al. (1983) между изученными популяциями и построена дендрограмма с использованием алгоритма UPGMA. Кластерный анализ разделит изученные выборки 4 таксонов на 2 большие группы. В первую группу попали все *C. macranthon* и *C. × ventricosum*, которые в свою очередь разделились на отдельные достоверные (100 %) подгруппы. Во вторую группу попали все *C. shanxiense* и *C. calceolus*, которые также распались на две достоверно разные подгруппы с высокой бутстреп оценкой (99 %). В подгруппе *C. × ventricosum* с вероятностью 94 % разделились популяции из Приморья и с Урала. В подгруппе *C. macranthon* с вероятностью 100 % отделились популяции из Приморья и Сахалина. Популяции *C. macranthon* с Урала с вероятностью 56 % отделились от популяций из Сибири и из Забайкалья, которые в свою очередь разделились между собой с поддержкой 64 %. Группа популяций *C. calceolus* разделилась на 2 подгруппы с бутстреп поддержкой 58 % на Приморско-Забайкальские и все остальные.

**Summary.** The analysis of 10 gene loci (*PGI*, *6PGD*, *NADHD*, *SKDH*, *GDH*, *PGM*, *DIA*, *ADH*, *GOT-1*, *GOT-2*) in *Cypripedium calceolus*, *C. macranthon*, *C. shanxiense* and *C. × ventricosum*, growing in Transbaykal, Central and West Siberia, in the Urals and on the European Russia is carried out. A study confirmed the previously established fact based on the example of the studied populations from the south of the Far East, that the allelic composition of loci *6-PGD*, *NADHD*, *GDH*, *ADH*, *GOT-1* and *PGI* are diagnostic for *C. calceolus* and *C. macranthon*. All studied *C. × ventricosum*, just as those previously studied from the Primorie, were heterozygote on all diagnostic alleles for *C. calceolus* and for *C. macranthon*. *C. shanxiense* from Transbaykal just as from the Primorskiy Kray and from Sakhalin was homozygote on all 10 studied loci, this confirms that it is a diagnostic for this species. *C. macranthon* in Transbaykal is characterized by the large morphological polymorphism. The plants with two flowers on the generative shoot, with the more open type of flower, and having a staminode in the form of boats were found here. In the botanical determinants these characteristic features are indicated exclusively for *C. × ventricosum*. On the basis the frequencies of the alleles were calculated genetic distances between the studied populations according to Nei et al. (1983) and the UPGMA dendrogram is built. Cluster analysis divided the studied samples into 2 the large groups. In the first group burn all *C. macranthon* and *C. × ventricosum*, which in turn were divided into the separate reliable (100 %) subgroups. In the second group burn all *C. shanxiense* and *C. calceolus*, which also be made burning hot to two reliably different subgroups with the high bootstrap estimation (99 %). In the subgroup *C. × ventricosum* with the probability 94 % populations from the

Prymorie were divided from the Urals ones. In the subgroup *C. macranthon* the populations from Prymorie and Sakhalin were separated with the probability 100 % from others. Populations *C. macranthon* from the Urals with the probability 56 % were separated from the populations from Siberia and from Transbaykal, which in turn were divided between themselves with the support 64 %. Group of the populations *C. calceolus* was divided into 2 the subgroups: Prymorie-Transbaikal and all others, with bootstrap 58 %.

На примере изучения представителей рода, произрастающих на юге Дальнего Востока и на Урале, было показано, что аллельные составы локусов *6-PGD*, *NADHD*, *GDH*, *ADH*, *GOT-1* и *PGI* являются диагностическими для видов *C. calceolus* и *C. macranthon*, что особи *C. × ventricosum* представляют собой гибриды *C. calceolus* × *C. macranthon*, что особи *C. shanxiense* мономорфны по всем 10 изученным локусам, и этот признак является диагностическим для данного таксона (Князев и др., 2000; Knyasev et al., 2000; Филиппов, Андропова, 2011). Также было выявлено, что аллельный состав локусов *PGI* и *SkDH* у *C. calceolus* из западной и восточной частей ареала различается. Аллели, отсутствующие у особей *C. calceolus* из западной части ареала, встречались у представителей вида с юга Дальнего Востока с высокой частотой (28–41 % и 55–68 %, соответственно). Эти аллели были обнаружены у особей *C. shanxiense* (Дальний Восток) в гомозиготном состоянии (Филиппов, Андропова, 2011). Было высказано предположение, что особая структура популяций *C. calceolus* на юге Дальнего Востока связана с гибридизацией с *C. shanxiense*. Поскольку последний вид встречается также и на юге Забайкальского края (Аверьянов, 1999), была высказана гипотеза, что зона гибридизации, вероятнее всего, должна распространяться также и на эту территорию. В связи этим были проведены полевые исследования для сбора материала на северо-востоке и юго-востоке Бурятии в Забайкалье, на западе Бурятии, на юго-востоке Иркутской обл., на юго-востоке и юго-западе Забайкальского края, где предположительно могла бы проходить граница зоны гибридизации между *C. calceolus* и *C. shanxiense*. Кроме этого проведено исследование структуры популяций представителей рода из Центральной и Западной Сибири, Урала и из Европейской части России, которые ранее не исследовались. В работе проведен анализ 10 генных локусов 9 ферментных систем (*PGI*, *6PGD*, *NADHD*, *SKDH*, *GDH*, *PGM*, *DIA*, *ADH*, *GOT-1*, *GOT-2*). Изоферментный анализ проводили с использованием электрофореза в пластинках полиакриламидного геля в трис-ЭДТА-боратном буфере. Материалом служили свежие листья генеративных побегов. Экстракцию белков и электрофорез в полиакриламидном геле и гистохимическое окрашивание ферментов осуществляли по общепринятым методикам (Murphy et al., 1990; Shurkhal et al., 1992).

Исследование подтвердило ранее установленный факт различия *C. calceolus* и *C. macranthon* по аллельной структуре локусов *6-PGD*, *NADHD*, *GDH*, *ADH*, *GOT-1* и *PGI*. Все изученные особи *C. × ventricosum*, также как и ранее изученные из Приморья и Урала, оказались гетерогизотными по всем диагностическим для *C. calceolus* и для *C. macranthon* аллелям. Особи *C. shanxiense* из Забайкалья также как и из Приморского края и с Сахалина оказались мономорфными по всем 10 изученным локусам.

Полученные данные по *Cypripedium* не дают никаких оснований считать, что между *Cypripedium macranthon* и *C. calceolus*, в зоне их совместного произрастания, имеет место интрогрессивная гибридизация. *C. × ventricosum* – это, в основном, гибриды первого поколения. Скрещивания *C. × ventricosum* с родительскими видами возможны, но возвратные гибриды встречаются очень редко.

Аллельные составы двух локусов *PGI* и *SkDH* при исследовании *C. calceolus* представляли наибольший интерес. Как оказалось, аллели, которые у *C. shanxiense* находятся в гомозиготном состоянии (аллель № 6 в локусе *PGI* и аллель № 4 в локусе *SkDH*), были выявлены у *C. calceolus* из юго-восточной части Забайкальского края (2 популяции из Газимуро-Заводского р-на) и с северо-востока Бурятии (2 популяции из Курумканского р-на). Частота аллеля № 6 в локусе *PGI* достигала 15 %, а аллеля № 4 в локусе *SkDH* варьировала от 17 до 62 %. С более низкой частотой (до 6 %) эти аллели встречались в одной популяции (небольшая выборка из 15 особей) с запада Бурятии (Мойготы, Тункинская долина). Тогда как в изученной популяции *C. calceolus* с юго-востока Бурятии (озеро Круглое, Селенгинский р-н), находящейся на более близком расстоянии от Забайкальского края, чем Тункинская долина, данные аллели не были выявлены совсем. Не были обнаружены данные аллели также в популяциях из Центральной и Западной Сибири, с Урала, из европейской части России. Проведенное исследование подтвердило точку зрения о том, что особые аллельные структуры локусов *PGI* и *SkDH* в популяциях *C. calceolus* обнаруживается только в зоне возможной гибридизации с *C. shanxiense* (в местах совместного произрастания двух видов и прилегающей к ней территории).

Как оказалось, *C. macranthon* в Забайкалье характеризуется большим полиморфизмом морфологических признаков. Здесь были отмечены растения *C. macranthon* с двумя цветками на генеративном побе-

ге, имеющие более открытый тип цветка, лодочкообразный стаминодий (рис. 1). Эти вышеперечисленные признаки в ботанических определителях указываются исключительно для *C. × ventricosum*. Был проведен аллозимный анализ выборки нетипичных *C. macranthon* из Сохондинского заповедника. Он не выявил присутствие специфичных аллелей каких-либо других таксонов за исключением *C. macranthon*. На основании полученных результатов можно констатировать тот факт, что *C. macranthon* и *C. × ventricosum* в некоторых местонахождениях имеют сходные морфологические признаки, в связи с чем, их сложно различать друг от друга. Аллозимный анализ позволяет четко различить особи гибридного происхождения – *C. × ventricosum*, от особей одного из родителей – негибридных *C. macranthon*.



Рис. 1. *Cypripedium macranthon* из Сохондинского заповедника. 1, 2 – общий вид растений с одним цветком и двумя цветками (2) на генеративном побеге, 3 – общий вид цветка, 4 – завязи растения с 2 цветками на побеге (увеличено), видно, что они не имеют железистого опушения, 5–9 – стаминодии в норме уплощенные (5,6, 8) и лодочкообразные (7,9), 10, 11 – аномалии строения рыльца.

По какой-то пока не понятной причине *C. × ventricosum* в Забайкальском крае, на севере и на востоке Бурятии, в местах совместного произрастания *Cypripedium macranthum* и *C. calceolus*, встречается в виде единичных особей. В период полевых исследований в 2010 г. в Забайкальском крае и в 2015 году в Бурятии были обнаружены несколько предположительно *C. × ventricosum* (среди отцветших растений). Аллозимный анализ показал, что только 2 особи (по одной из Забайкальского края и Бурятии) являются *C. × ventricosum*, а все остальные оказались *C. macranthum*.

Проведена статистическая обработка данных аллозимного анализа. Статистические показатели полиморфизма – частоты аллелей, наблюдаемую и ожидаемую гетерозиготности, F-коэффициенты (Райта), а также тест Хи-квадрат для проверки равновесия Харди-Вайнберга и попарные сравнения субпопуляций на основании дисперсионного анализа (AMOVA) проведены с помощью программы GenAlEx версия 6.4 (Peakall, Smouse, 2006). Определение генетических дистанций между популяциями по Nei et al. (1983), а также построение дендрограммы с использованием метода невзвешенных парно-групповых средних, кластерный анализ и бутстреп оценка проводились с помощью программы PowerMarker V. 3.25 (Liu, Muse, 2005). Дендрограмма с бутстреп оценкой получена в программе Phylip 3.69 (Felsenstein, 1988) и визуализирована в программе Mega 6.0 (Tamura, et al., 2007). В статистическую обработку были включены все, исследованные к настоящему времени популяции представителей рода *Cypripedium*.

Генетический анализ 18 популяций *C. macranthum* не выявил статистически существенных отклонений от соотношения Харди-Вайнберга, что свидетельствует об их равновесном состоянии. F-коэффициенты составили  $F_{is} = -0,032$ ,  $F_{it} = 0,085$ ,  $F_{st} = 0,113$ . Генетическая дифференциация между локальными популяциями от Урала до Сахалина составляет 11 %. Дисперсионный анализ (AMOVA) показал, что варьирование генотипов между локальными популяциями составляет 17 %, а внутри популяций – 83 %. Дисперсионный анализ (AMOVA) на основании варьирования частот аллелей показал, что различия между локальными популяциями составляет 10 %, внутри субпопуляций – 4 %, а на индивидуальном уровне достигает 86 %.

Генетический анализ 24 локальных популяций *C. calceolus* не выявил статистически существенных отклонений от соотношения Харди-Вайнберга, что свидетельствует об их равновесном состоянии. F-коэффициенты составили  $F_{is} = 0,062$ ,  $F_{it} = 0,191$ ,  $F_{st} = 0,124$ . Генетическая дифференциация между локальными популяциями от Европейской части России до Приморья составляет 12 %. Дисперсионный анализ (AMOVA) показал, что варьирование генотипов между локальными популяциями составляет 25 %, а внутри популяций – 75 %. Дисперсионный анализ варьирования частот аллелей (AMOVA) показал, что различие между локальными популяциями составляет 15 %, внутри популяций – 5 %, а на индивидуальном уровне достигает 80 %.

Генетический анализ 5 локальных популяций *C. × ventricosum* показал, что они характеризуются очень высоким полиморфизмом. Это был ожидаемый результат, т.к. данный таксон имеет гибридное происхождение (*Cypripedium macranthum* × *C. calceolus*). По 6 локусам из 10 изученных все особи *C. × ventricosum* оказались гетерозиготными. Эти локусы имеют дифференцирующие аллели родительских видов. Хи-квадрат тест указал на существенные различия между ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготностями и на неравновесное состояние популяций. F-коэффициенты составили:  $F_{is} = -0,638$ ,  $F_{it} = -0,608$ ,  $F_{st} = 0,021$ . Генетическая дифференциация между субпопуляциями составила 2 %. Дисперсионный анализ (AMOVA) генетических данных показал, что полиморфизм между локальными популяциями находится в пределах 4 %, а внутри составляет 96 %. AMOVA анализ на основании частот аллелей указывает, что изменчивость имеет индивидуальный характер на 99 %.

На основании частот аллелей были вычислены генетические дистанции по Nei et al. (1983) между изученными популяциями и построена дендрограмма с использованием алгоритма UPGMA (Рисунок 2). В нее также были включены данные по выборкам гибридных растений (*C. shanxiense* × *C. calceolus*) из разных местонахождений. Кластерный анализ разделил изученные выборки 4 таксонов на 2 большие группы. В первую группу попали все *C. macranthum* и *C. × ventricosum*, которые в свою очередь разделились на отдельные достоверные (100 %) подгруппы. Во вторую группу попали все *C. shanxiense* и *C. calceolus*, которые также распались на две достоверно разные подгруппы с высокой бутстреп оценкой (99 %). В подгруппе *C. × ventricosum* с вероятностью 94 % разделились популяции из Приморья и с Урала. В подгруппе *C. macranthum* с вероятностью 100 % отделились популяции из Приморья и Сахалина. Популяции *C. macranthum* с Урала с вероятностью 56 % отделились от популяций из Сибири и из Забайкалья, которые в свою очередь разделились между собой с поддержкой 64 %.

Группа популяций *C. calceolus* разделилась на 2 подгруппы с бутстреп поддержкой 58 % на Примор-

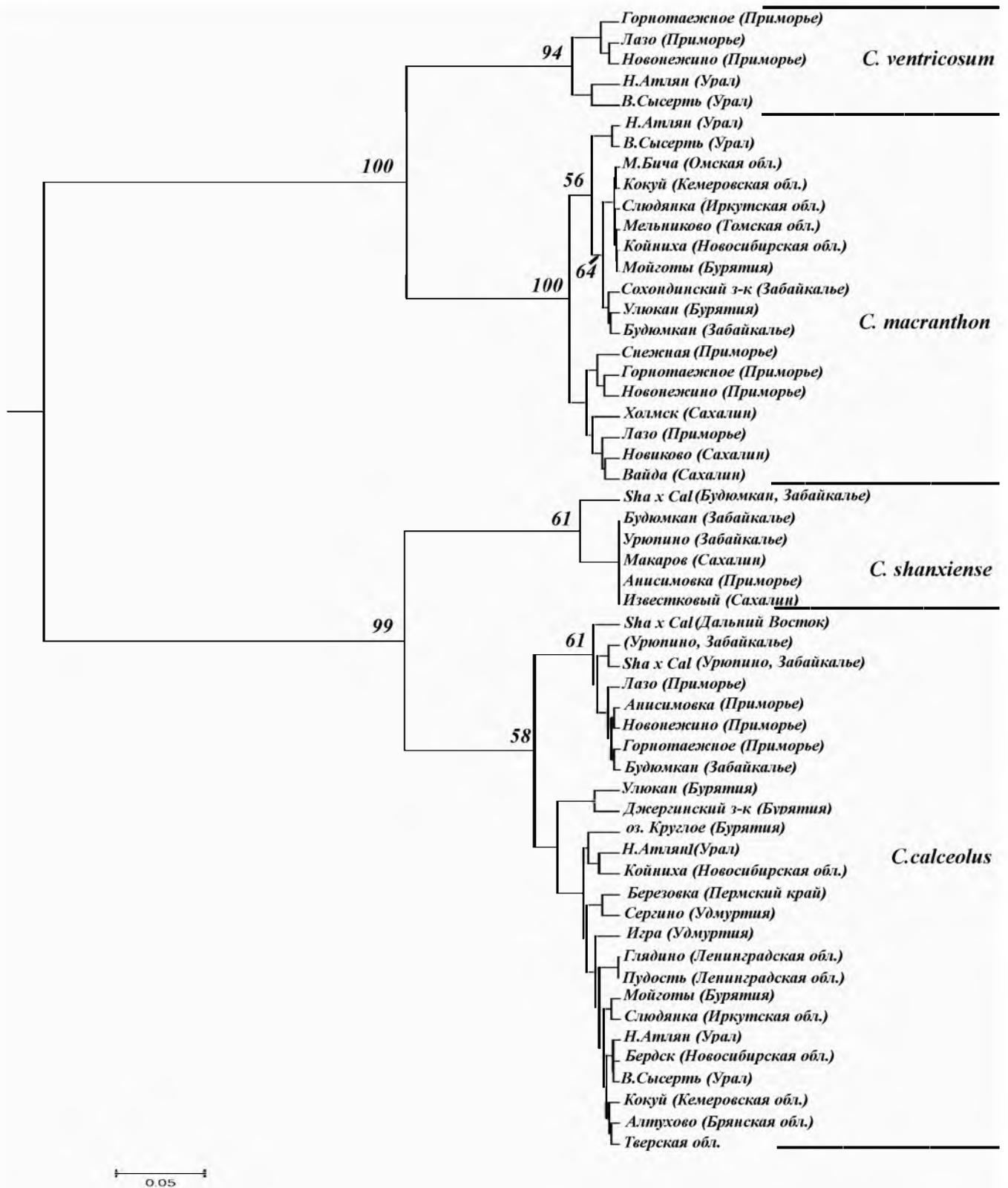


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основании генетических расстояний по Nei et al (1983) по данным аллозимного анализа 10 генных локусов и алгоритма UPGMA, для популяций *Cypripedium calceolus*, *C. macranthon*, *C. shanxiense* и *C. × ventricosum* (генетические расстояния и файл для построения дерева с бутстрепоценкой получены в программе PowerMarker V3.25, дерево в программе Phylip 3.69, визуализация дерева с бутстреп оценкой ветвей выполнена в программе Mega 6.06).

ско-Забайкальские и все остальные. Кластерный анализ на основе данных аллозимного анализа 10 генных локусов показал, что особи *C. calceolus*, встречающиеся на территории России, образуют две группы, граница между ними проходит по Забайкалью.

### Благодарности

Работа выполнена по государственным заданиям № 01201255606 и № 012001459509 при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 14-04-92004 ННС\_а) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН: «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

### ЛИТЕРАТУРА

- Аверьянов Л. В.* Род Башмачок – *Cypripedium* (Orchidaceae) на территории России // *Turczaninowia.*, 1999. – Т. 2, вып. 2. – P. 5–40.
- Андропова Е. В.; Филиппов Е. Г., Мельникова А. Б., Аверьянов Л. В.* Морфологический анализ и соотношение типичных и уклоняющихся форм в популяциях *Cypripedium calceolus* на юге Хабаровского и Приморского краев // *Вестник ТвГУ. Серия Биология и Экология*, 2007. – № 7(35). – С. 17–19.
- Князев М. С., Куликов П. В., Князева О. И., Семериков В. Л.* О межвидовой гибридизации евразийских видов рода *Cypripedium* (Orchidaceae) и таксономическом статусе *C. ventricosum* // *Бот. журн.*, 2000. – Т. 85, № 5. – С. 94–102.
- Филиппов Е. Г., Андропова Е. В.* Генетическая дифференциация представителей рода *Cypripedium* России по данным аллозимного анализа // *Генетика*, 2011. – Т. 47, № 5. – С. 615–623.
- Felsenstein J.* Phylogenies and quantitative characters // *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1988. – Vol. 19. – P. 445–471.
- Knyasev M. S., Kulikov P. V., Knyaseva O. I., Semerikov V. I.* Interspecific hybridization in northern eurasian *Cypripedium*: morphometric and genetic evidence of the hybrid origin of *C. ventricosum* // *Lindleyana*, 2000. – Vol. 15, No. 1. – P. 15–26.
- Liu K., Muse S. V.* PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data // *Bioinformatics*, 2005. – Vol. 21, No. 3. – P. 2128–2129.
- Murphy R. W., Sites J. W., Buth D. G., Haufler C. H.* Proteins I: Isozyme Electrophoresis // *Molecular Systematics* / Eds. Hillis D.M., Moritz C. – Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc. Publ., 1990. – P. 45–126.
- Nei M., Tajima F., Tateno Y.* Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data // *J. Mol. Evol.*, 1983. – Vol. 19. – P. 133–170.
- Peakall R., Smouse P. E.* GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular Ecology Notes*, 2006. – Vol. 6. – P. 288–295.
- Shurkhal A. V., Podogas A.V., Zhivotovsky L.A.* Allozyme differentiation in the genus *Pinus* // *Silvae Genetica*, 1992. – Vol. 41. – P. 105–109.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Molecular Biology and Evolution*, 2013. – Vol. 30. – P. 2725–2729.