

УДК 582.59:575.174

Особенности генетической структуры популяций представителей рода *Dactylorhiza* на территории Республики Беларусь по данным изоферментного анализа

Е. Г. Филиппов¹, Е. В. Андропова², О. Н. Козлова³, Т. И. Фоменко³

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад УрО РАН, Екатеринбург, Россия, filorch@mail.ru

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институт им. В.Л.Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия, elena.andronova@mail.ru

³ Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь, kozlova_o@yahoo.com

Special features of the *Dactylorhiza* population genetic structure in the Belarus according to the data of allozyme analysis. Philippov E.G., Andronova E.V., Kazlova V.M., Fomenko T.I. The results of the allozyme analysis of *Dactylorhiza* plants (*D. fuchsii* (Druce) Soó, *D. maculata* (L.) Soó, *D. incarnata* (L.) Soó, *D. ochroleuca* (Wüst. ex Boll.) Holub, *D. baltica* (Klinge) Orlova (= *D. longifolia* (L. Neum.) Aver.), *D. majalis* (Rchb.) P.F. Hunt & Summerh), which grow in the territory of Belarus, are represented.

Род *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski (*Orchidaceae*) является одним из наиболее многочисленных. Его представители широко распространены в умеренной зоне. Для них характерна высокая изменчивость морфологических признаков. Представители разных таксонов легко гибридизируют между собой. Поэтому до сих пор они являются довольно сложными объектами для систематиков, а таксономическая значимость отдельных таксонов до настоящего времени остается неопределенной. Зачастую, проведение только морфологического анализа является недостаточным. Необходимо также выявление генетических маркеров, дифференцирующих отдельные таксоны и изучение особенностей генетической структуры локальных популяций. Довольно большая работа в этом направлении проводилась и проводится в настоящее время в Западно-Европейской части ареала рода (Pillon et. al., 2006, 2007; Paun et. al., 2011) и на территории России (Филиппов, Андропова, 2011а, 2012, 2013). Исследование полиморфизма и генетической структуры популяций представителей рода, произрастающих на территории Республики Беларусь, проводится впервые.

В 2012-2013 гг. в Минской и Витебской обл. был собран материал для изучения структуры локальных популяций *D. fuchsii* (Druce) Soó, *D. maculata* (L.) Soó, *D. incarnata* (L.) Soó, *D. ochroleuca* (Wüst. ex Boll.) Holub, *D. baltica* (Klinge) Orlova (= *D. longifolia* (L. Neum.) Aver.), *D. majalis* (Rchb.) P.F. Hunt & Summerh. Изоферментный анализ был проведен для 506 растений из 29 локальных популяций. 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, 2011б). 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, E.C.1.4.1.2), фосфоглюкомутаза, (PGM, EC 5.4.2.2), диафораза (DIA, EC 1.6.4.3.), алкогольдегидрогеназа (ADH, EC 1.1.1.1), изоцитратдегидрогеназа (IDH, EC 1.1.1.42).

Локус	Алель, номер	Местонахождение, вид, изученная выборка														
		<i>Dactylorhiza baltica</i>					<i>D. majalis</i>			<i>D. fuchsii</i>						
		Вязынка	Лучно (с пятн.)	Лучно (без пятен)	Березин . запов.	Зеленое	Талька	Жуковк а	Берези н. запов.	Вишне в о	Жуков ка	Талька	Березин . зап.	Зелено е	Энергети к	
N=21	N=27	N=12	N=10	N=12	N=18	N=12	N=3	N=22	N=35	N=14	N=14	N=13	N=24			
PGI	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.157	0.000	0.000	0.000	0.125	
	2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.114	0.000	0.107	0.036	0.038	0.000	
	3	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.386	0.843	0.893	0.964	0.962	0.854	
	5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	
	7	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.458	0.500	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	SKDH	1	0.238	0.185	0.167	0.500	0.500	0.382	0.500	0.500	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2	0.762	0.815	0.833	0.500	0.500	0.618	0.500	0.500	0.500	0.914	1.000	0.917	0.667	0.917
4		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.029	0.000	0.083	0.333	0.063	
5		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.057	0.000	0.000	0.000	0.000	
6		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	
PGM		1	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.462	0.455	0.500	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000
	2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.231	0.500	0.292	0.100	0.393	0.167	0.300	0.458	
	3	0.381	0.426	0.000	0.364	0.500	0.000	0.308	0.045	0.188	0.757	0.536	0.750	0.633	0.479	
	4	0.119	0.074	0.500	0.136	0.000	0.500	0.000	0.000	0.021	0.143	0.036	0.056	0.033	0.021	
	5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.036	0.000	0.033	0.000	
	6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	
IDH	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
ADH	2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
DIA-1	1	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	2	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
	5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
NADHD	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.077	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	2	0.775	0.846	1.000	0.545	1.000	0.694	0.423	0.500	0.479	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
	3	0.225	0.154	0.000	0.455	0.000	0.306	0.500	0.500	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
GDH	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.077	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.923	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	

Локус	Алель, номер	Местонахождение, вид, изученная выборка														
		<i>D. hybrida</i>				<i>D. incarnata</i>					<i>D. ochroleuca</i>			Нетипичные (<i>D. incarnata</i> x <i>D. ochroleuca</i> ?)		
		Нарочь	Жуковка	Березин. запов.	Зеленое	Вязьнка	Жуковка	Пашевичи	Березин. запов. (темная)	Нарочь	Сервечь	Нарочь	Сервечь	Пашевичи	Нарочь	Сервечь
		N=16	N=9	N=11	N=7	N=13	N=28	N=18	N=10	N=25	N=20	N=24	N=7	N=21	N=20	N=15
PGI	1	0.000	0.222	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	3	0.469	0.278	0.500	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	7	0.500	0.500	0.500	0.500	1.000	0.893	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.107	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SKDH	1	0.563	0.056	0.500	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	2	0.438	0.778	0.364	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	4	0.000	0.000	0.136	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	5	0.000	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PGM	1	0.500	0.500	0.500	0.500	1.000	1.000	0.944	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	2	0.222	0.000	0.136	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	3	0.278	0.500	0.318	0.357	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	4	0.000	0.000	0.045	0.143	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IDH	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
ADH	2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
DIA-1	1	0.500	0.444	0.500	0.357	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	2	0.500	0.500	0.500	0.643	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	5	0.000	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
NADHD	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2	0.500	0.944	0.500	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	3	0.500	0.056	0.500	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
GDH	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.152	0.087	1.000	1.000	1.000	1.000	0.906
	2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.982	1.000	1.000	0.848	0.913	0.000	0.000	0.000	0.000	0.094

Частоты встречаемости аллелей в изученных выборках растений представлены в таблице. Как показало исследование, основные виды - *D. fuchsii* и *D. incarnata* s.l. различаются по дифференцирующим аллелям локусов PGI, SKDH, PGM, DIA и NADHD.

Особи *D. incarnata* в Беларуси оказались практически полностью мономорфными, что характерно и для других локальных популяций из западной части ареала (Hedrén, 1996; 2001; Филиппов, Андропова, 2011б). Только в одной из локальных популяций локус PGI был полиморфным. Полиморфизм по GDH, наблюдаемый в трех субпопуляциях, обусловлен процессами гибридизации с близким таксоном *D. ochroleuca*. В целом, *D. ochroleuca* отличается от *D. incarnata* соломенно-желтой окраской цветков, а также, в основной части ареала, большими морфометрическими параметрами (высота растения и длина листьев). Особи данного таксона произрастают исключительно на известковых болотах (Rajchel, 1964; Fuller, 1983; Аверьянов, 1988). Все изученные особи *D. ochroleuca*, произрастающие в Беларуси, имели специфичную аллель в локусе GDH, а все типичные особи *D. incarnata* были дифференцированы по другой аллели данного локуса. Полученные данные позволяют высказать предположение, что существует определенная генетическая обособленность и механизм изоляции *D. ochroleuca* от *D. incarnata* даже при их совместном произрастании. Тем не менее, в исследованных популяциях, выявлены уклоняющиеся особи *Dactylorhiza*, с розовыми цветками, которые имели желтое пятно при основании губы. В полевых условиях их отнесли к гибриду *D. x versicolor* (Schmidt et Luscher) Peitz. Однако аллозимный анализ показал, что подавляющее большинство нетипичных особей с двухцветной губой были гомозиготными по аллели, характерной для *D. ochroleuca* (80 и 100% растений). Таким образом, они не являлись первичными гибридами, по-видимому, их можно отнести к возвратным гибридам с *D. ochroleuca*. Интересен факт практически полного отсутствия гетерозигот в выборке уклоняющихся особей с двухцветной губой (которые могут являться как первичными, так и вторичными гибридами). По-видимому, гетерозиготные особи менее жизнеспособные, по сравнению с гомозиготными, т.е. при возобновлении межвидовых гибридов действует отбор в сторону гомозигот. Весьма вероятно, что первичные гибриды практически не отличаются от *D. incarnata*, и в нашем случае они могли попасть в изучаемые выборки. Локус GDH характеризуется полиморфизмом только в выборках *D. incarnata* из локальных популяций, которые произрастают совместно с *D. ochroleuca*, за исключением единичных примеров.

У *D. fuchsii* наблюдается высокий полиморфизм по локусам PGI, SKD и PGM. Растения данного вида в Республике Беларусь имеют характерные для данного вида признаки вегетативных органов: широкие листья с закругленной верхушкой с пятнами или без них (до половины растений имеют листья без пятен). В одном из мест произрастания *D. fuchsii* (Жуковка) была обнаружена группа растений, отличающихся более узкими листьями сизоватого цвета с очень яркой пятнистостью, и которые имели чуть более мелкие цветки. При аллозимном анализе было выявлено гибридное происхождение данных растений. У них имелись аллели, характерные и для *D. fuchsii*, и для *D. incarnata* в локусах PGI, PGM, DIA. Но в остальных двух дифференцирующих два разных таксона локусах - SKDH и NADHD, преобладали аллели, характерные только для *D. fuchsii*. Таким образом, данные растения не являлись первичными гибридами между *D. fuchsii* и *D. incarnata*, а могут представлять собой либо группу вторичных гибридов, либо группу гибридов с участием *D. fuchsii* или *D. baltica*. В таблице эта группа особей обозначена как *D. hybrida*.

Особи из двух локальных популяций, которые в полевых условиях были отнесены к виду *D. maculata*, имели вполне типичную для этого вида форму губы, но отличались ярко-пятнистыми листьями и нетипичным местообитанием – окраины сыроватого луга. Аллозимный анализ показал, что они имеют гибридное

происхождение (таблица - *D. hybrida*). Эти две субпопуляции имели существенные различия: в одной из них особи имели аллели, характерные и для *D. fuchsii*, и для *D. incarnata* во всех дифференцирующих эти виды локусах, а во второй у особей в локусах SKDH и NADHD преобладали аллели, характерные только для *D. fuchsii*. Форма губы и общий облик растений не позволяли отнести данные растения к первичным гибридам, возможно, они относятся к каким-либо аллотетраплоидным таксонам, не указываемых для данного региона. В настоящее время определить таксономический статус данных особей затруднительно. Типичная *D. maculata* по данным аллозимного анализа выявлена не была.

Третья группа гибридных растений была встречена в Березинском заповеднике на сплавине у озера. Эти растения имели некрупные узкие листья, малоцветковые соцветия при достаточной высоте растения и напоминали *D. traunsteineri*, но имели более мелкие цветки и явно трехлопастную губу. У данных растений имелись аллели, характерные и для *D. fuchsii*, и для *D. incarnata* во всех дифференцирующих эти виды локусах. Таксономический статус данных растений также остался неопределенным.

Для аллотетраплоидных видов: *D. baltica* и *D. majalis* подтверждено их гибридогенное происхождение от *D. fuchsii* и *D. incarnata*. Это выражается в присутствии у всех особей видоспецифичных аллелей исходных родительских групп в локусах PGI, SKD, PGM и DIA. При этом наблюдались различия в аллельной структуре этих видов по локусам PGM и NADHD. У *D. baltica* в локусе PGM присутствуют первая и третья аллели с примесью четвертой, а у *D. majalis* кроме первой и третьей аллели встречается вторая аллель с высокой частотой. У особей *D. majalis* локус NADHD почти стопроцентно гетерозиготный. В случае *D. baltica*, у части особей или у всех в локусе NADHD произошла элиминация дифференцирующей аллели *D. incarnata* - одного из родительских таксонов. В окрестностях д. Лучно была найдена довольно многочисленная группа особей *D. baltica*, не имеющих пятен на листьях. Они произрастали вместе с типичными *D. baltica*, которые также имели довольно большую численность. Все особи зеленолистной формы имели одинаковый гетерозиготный генотип по локусу PGM, состоящий из первой и четвертой аллели, в то время как практически все особи типичной формы были гетерозиготными по первой и третьей аллели. В целом, *D. longifolia* произрастающая на территории Республики Беларусь, характеризуется более высоким полиморфизмом, чем встречающаяся в России, особенно по локусам PGM и NADHD.

Благодарности

Работа выполнена по государственным заданиям № 01201255606 и № 012001459509, при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 12-04-01560 а) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН: «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» (подпрограмма "Динамика и сохранение генофондов"). Авторы благодарят сотрудников Института экспериментальной ботаники им. В.Ф.Купревича НАН Беларуси: Л.В. Семеренко, А.Н. Скуратовича, Д.В. Дубовика, И.Н. Вершицкую, ГПУ «Березинский биосферный заповедник»: В.С. Ивковича, Е.Н. Ивкович, С.А. Автушко, ГПУ НП «Нарочанский»: В.С. Люштыка, О.С. Ежову, ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам»: М.Г. Дмитренко за ценные советы и консультации по дикорастущим представителям рода *Dactylorhiza*, встречающихся в Республике Беларусь, а также за помощь при сборе материалов для исследования, Администрацию ГНУ «ЦБС НАН Беларуси» и лично директора В.В. Титка за помощь при проведении полевых исследований на территории Республики Беларусь.

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.
- Филиппов Е.Г., Андропова Е.В. Особенности генетической дифференциации представителей родов *Dactylorhiza*, *Cypripedium* и *Orchis* России по данным изоферментного анализа // Охрана и культивирование орхидей: Матер. IX Междун. конф., 26 – 30 сентября 2011 г, г. Санкт-Петербург. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011а. С. 451 – 456.
- Филиппов Е.Г., Андропова Е.В. Генетическая дифференциация представителей рода *Cypripedium* по данным изоферментного анализа // Генетика, 2011б. Т. 47. № 5. С. 615 - 623.
- Филиппов Е.Г., Андропова Е.В. Генетическая дифференциация представителей подсекции *Dactylorhiza* рода *Dactylorhiza* (Orchidaceae) на территории России по данным изоферментного анализа // Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры; Материалы Международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (19-22 июня 2012, Минск, Беларусь) / Нац. акад. Наук Беларуси, Централ. ботан. сад; редкол.: В.В. Титок и др., Минск, 2012, Ч. 2, стр. 348-350.
- Филиппов Е. Г., Андропова., Е. В. Особенности генетической структуры популяций некоторых представителей рода *Dactylorhiza* (Orchidaceae) в восточной части ареала // Материалы XII международной научно-практической конференции «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии». Барнаул, 28-30 октября 2013 г., 2013. С. 60 – 64.
- Füller F. Die Gattungen *Orchis* und *Dactylorhiza* // *Orchideen Mitteleuropas*. 3. - Aufl. Wittenberg; Lutherstadt: Ziemsen., 1983. - 132 S.
- 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/incarnate/maculate* polyploidy complex (Orchidaceae) in Turkey: evidence from allozyme data. *Plant Sys. Evol.* 2001. V. 229. P. 23 – 44.
- 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. V. 11. 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.
- Rajchel R. *Orchis incarnata* L. subsp. *ochroleuca* (Wüstnei) O. Schwarz w Polsce // *Fragm. florist. et geobot.* 1964. - Vol. 10. N 2. - P. 193-197.