

© Е. В. Андропова,¹ Э. М. Мачс,¹ Е. Г. Филиппов,² М. П. Райко,³
Янг-Ай Ли,⁴ Л. В. Аверьянов¹

ФИЛОГЕОГРАФИЯ ТАКСОНОВ РОДА *CYPRIPEDIUM* (ORCHIDACEAE) НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

¹ Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН
ул. Проф. Попова, 2, Санкт-Петербург, 197376, Россия
E-mail: elena.andronova@mail.ru; av_leonid@mail.ru; edw.machs@gmail.com

² Ботанический сад Уральского отделения РАН
ул. 8 Марта, 202а, Екатеринбург, 620144, Россия
E-mail: filorch@mail.ru

³ Калифорнийский университет
Сан-Диего, Калифорния, США
E-mail: mike.rayko@gmail.com

⁴ Национальный музей естественной истории
Тайчунг, Тайвань
E-mail: leeyungi@mail.nmns.edu.tw
Поступила 10.07.2017

Представлены результаты изучения межвидового, внутривидового и внутригеномного полиморфизма представителей рода *Cypripedium*, произрастающих на территории России, по данным аллозимного анализа и пиросеквенирования. Было подтверждено, что особи *C. × ventricosum* представляют собой гибриды между *C. calceolus* и *C. macranthon*. На основании результатов морфологического и аллозимного анализов, а также сравнительного исследования межгенного спейсера *trnL-trnF* хлоропластной ДНК сделано заключение о существовании двух разных генетических линий *C. calceolus*, граница между которыми проходит в Забайкалье. Одна из них по материнской линии имеет общее происхождение с *C. shanxiense*. Анализ внутригеномного полиморфизма участка *ITS1* ДНК не подтвердил наличие гибридизации в симпатрических популяциях между *C. shanxiense* и *C. calceolus* и *C. shanxiense* и *C. macranthon*. На основании результатов проведенного исследования можно высказать предположение о гибридогенном происхождении как *C. shanxiense*, так и «восточной» расы *C. calceolus*, распространенной от Забайкальского края до Приморья. Возможно, эту расу *C. calceolus*, характеризующуюся выраженными фенотипическими и генотипическими особенностями, следует рассматривать в качестве самостоятельного морфологически слабо выраженного скрытого таксона, статус которого трудно определим на настоящий момент.

Ключевые слова: *Cypripedium*, *C. macranthon*, *C. calceolus*, *C. × ventricosum*, *C. shanxiense*, аллозимный анализ, секвенирование 454, межвидовой и внутригеномный полиморфизм, *ITS1*, 18S рПНК, *trnL-trnF*, естественная межвидовая гибридизация.

Род *Cypripedium* насчитывает около 40—45 видов, распространенных преимущественно в умеренных областях северного полушария (Cribb, 1997, 1999; Eccarius, 2009). В России род представлен 5 видами (*C. calceolus* L., *C. macranthon* Sw., *C. shanxiense* S. C. Chen, *C. guttatum* Sw., *C. yatabeanum* Makino), 4 разновидностями (*C. macranthon* Sw. var. *macranthon*, *C. macranthon* Sw. var. *atropurpureum* Aver., *C. macranthon* Sw. var. *album* Mandl, *C. macranthon* Sw. var. *flavum* Mandl), несколькими внутривидовыми гибридными формами и несколькими межвидовыми гибридами — *C. × ventricosum* Sw., *C. × microsaccos* Kraenzl. и

др. (Averyanov, 1999). Практически все представители рода (за исключением *C. guttatum*) включены в Красную книгу РФ (ККРФ, Red., 2008). Большинство из них имеет статус 3 — редкие таксоны с естественной малой численностью, имеющие значительный ареал распространения, в пределах которого встречаются спорадически и с малой численностью популяций. Один вид — *C. shanxiense* — внесен в Приложение к ККРФ (Red., 1988:786), как требующий дальнейшего изучения (Varlygina, 2007, 2008), поскольку это наиболее редкий представитель рода в России и сведения о его распространении и биологии очень ограничены.

Практически все виды орхидных относятся к редким растениям, являются высоко декоративными и представляют интерес для садоводов любителей. Некоторые виды полностью исчезли из дикой природы из-за чрезмерного сбора. Известно, что в некоторых ботанических учреждениях разрабатывались специальные методики размножения редких видов орхидных в условиях культуры и проводились мероприятия по их реинтродукции в местах их прежнего возможного произрастания. Например, в Англии такая работа проведена для *C. calceolus* (Ramsay, Dixon, 2003).

Для разработки методик сохранения генетического разнообразия редких видов необходимы сведения о полиморфизме и генетической структуре их популяций. Довольно большая работа по изучению генетических особенностей представителей рода *Cypripedium* проводилась преимущественно за рубежом (Fay et al., 2009; Pedersen et al., 2012). В связи с большим размером генома у представителей рода *Cypripedium* такие маркеры, как AFLP и RAPD, при исследовании полиморфизма не используются (Fay et al., 2005). Поэтому для установления генетической дифференциации видов и описания генетической структуры популяций наиболее часто применялся аллозимный анализ (Case, 1993; Knyasev et al., 2000a, b; Wallace, Martha, 2000; Brzosko et al., 2002; Izawa et al., 2007; Chung et al., 2009; Filippov, Andronova, 2011). Для исследования межпопуляционной изменчивости и выявления географической дифференциации популяций использовались гены хлоропластной ДНК, такие как *atpB*, *rbcL*, *matK*, *psaB* и *trnL-trnF* (Fay, Cowan, 2001; Taniguchi et al., 2001; Hedrén, 2003; Kocyan et al., 2004; Jo et al., 2005; Hedrén et al., 2007; Fay et al., 2009; Li et al., 2011). В отличие от ядерной ДНК хлоропластная ДНК у орхидных наследуется по материнской линии (Wu et al., 2010). Для установления филогенетических связей между таксонами рода применялись также анализ участков *ITS1* ДНК (Cox, 1995, 1999; Li et al., 2011).

К настоящему времени внутривидовой полиморфизм *C. calceolus*, *C. macranthon* и *C. × ventricosum* остается недостаточно подробно изученным. Данные таксоны имеют протяженные ареалы, большая часть которых проходит по территории России. В молекулярно-генетических исследованиях зарубежных коллег использовались единичные российские образцы, на примере которых полностью описать весь спектр внутривидового полиморфизма не представляется возможным.

В ряде районов, где ареалы нескольких видов перекрываются, сформировались межвидовые интрогрессивно гибридные комплексы. Например, известно, что на Дальнем Востоке и Забайкалье имеет место сложный, исключительно полиморфный гибридный комплекс между *C. calceolus*, *C. macranthon* и *C. shanxiense*, и в полевых условиях таксономический статус многих особей однозначно не определим (Averyanov, 1999; Andronova et al., 2007; Melnikova et al., 2007). Особенно трудным оказалось установление статуса уклоняющихся особей, относимых к *C. calceolus*, имеющих губу коричневого цвета, распространенных толь-

ко в определенной части ареала вида — от Приморья до Забайкалья. Генетическая структура популяций *C. calceolus* с юга Дальнего Востока и Урала была подробно изучена (Кнышев et al., 2000; Filippov, Andronova, 2011). Однако сведения о структуре популяций с большей части ареала *C. calceolus* (вся Сибирь) отсутствовали. Особый интерес представляли сведения о популяциях вида из Забайкалья, где проходит западная граница распространения уклоняющихся особей.

Изучение структуры и возобновление межвидовых интрогрессивно гибридных комплексов, образующихся с участием редких видов орхидных, относится к фундаментальным исследованиям микроэволюционных процессов и факторов, определяющих динамику биологического разнообразия. В последнее время появились новые высокоэффективные методики анализа ДНК, которые позволяют получать сведения о внутригеномном полиморфизме образцов, что позволяет выявлять гибриды и устанавливать их происхождение. Исследование внутригеномного полиморфизма у представителей рода *Cypripedium* ранее не проводилось.

В данной работе представлены результаты изучения полиморфизма представителей рода *Cypripedium* по данным аллозимного анализа и *trnL-trnF* участка хлоропластной ДНК, а также по исследованию внутригеномного полиморфизма участка *ITS1* ядерного гена рибосомальной РНК методом 454 (пиросеквенирование).

Материал и методика

Растительный материал был собран в местах естественного произрастания представителей рода. Образцы отбирались с одного из генеративных побегов каждого растения.

Аллозимный анализ. Для анализа использовали или свежие или замороженные при -80°C листья. Всего было исследовано 1210 растений из 18 популяций *C. macranthon* (рис. 1), 24 популяций *C. calceolus* (рис. 2), 5 популяций *C. $\times$ ventricosum* (рис. 3) и 5 популяций *C. shanxiense* (рис. 4).

Для анализа ДНК использовались высушенные в силикагеле листья 40 особей из 37 популяций (табл. 1). Как правило, из популяций исследовались по 1 образцу.

Аллозимный анализ проводили с использованием электрофореза в пластинках полиакриламидного геля в трис-ЭДТА-боратном буфере. Экстракцию белков и электрофорез в полиакриламидном геле и гистохимическое окрашивание ферментов осуществляли по общепринятым методикам (Murphy et al., 1990; Shurkhal et al., 1992). Исследовали следующие ферментные системы: фосfogлюкоизомеразы (PGI, EC 5.3.1.9), 6-фосfogлюконатдегидрогеназа (6PGD; EC 1.1.1.44), NADH-дегидрогеназа (NADHD, EC 1.6.99.5), шикиматдегидрогеназа (SKDH, EC 1.1.1.25), глутаматдегидрогеназа (GDH, EC 1.4.1.2), фосfogлюкомутаза, (PGM, EC 5.4.2.2), диафораза (DIA, EC 1.6.4.3), алкогольдегидрогеназа (ADH, EC 1.1.1.1), глутамат оксалоацетат трансминаза (GOT, EC 2.6.1.1). В последней ферментной системе учитывались 2 локуса, которые обозначили цифрами в соответствии с их подвижностью начиная с наиболее подвижного (GOT-1 и GOT-2). Таким образом, в работе анализировали 10 генных локусов 9 ферментных систем. Определение генетических дистанций между популяциями D_A (Nei et al., 1983; Nei, Kumar, 2004) для данных аллозимного анализа, файл для построения дендрограммы по методу невзвешенных парно-групповых средних (UPGMA) и бутстреп-тест для 1000 реплик выполнены с помощью программы PowerMarker V. 3.25



Рис. 1. Местонахождения популяций *Cypripedium macranthum*, где были собраны образцы для аллозимного анализа.

1 — Верхняя Сысерть (Свердловская обл.), 2 — Нижний Атлян (Челябинская обл.), 3 — Малая Бича (Омская обл.), 4 — Мельниково (Томская обл.), 5 — Койниха (Новосибирская обл.), 6 — Кокуй (Кемеровская обл.), 7 — Слюдянка (Иркутская обл.), 8 — Мойготы (Бурятия), 9 — Улюкан (Бурятия), 10 — Сохондинский заповедник (Забайкальский край), 11 — Будюмкан (Забайкальский край), 12 — Горнотаежное (Приморский край), 13 — Лазо (Приморский край), 14 — Новонежино (Приморский край), 15 — гора Снежная (Приморский край), 16 — Новиково (Сахалин), 17 — Холмск (Сахалин), 18 — гора Вайда (Сахалин).

Fig. 1. The locations of *Cypripedium macranthum* populations, where the samples for allozyme analysis were collected.

1 — Verkhnyaya Sysert (Sverdlovsk Reg.), 2 — Nizhniy Atlian (Chelyabinsk Reg.), 3 — Malaya Bicha (Omsk Reg.), 4 — Melnikovo (Tomsk Reg.), 5 — Koynikha (Novosibirsk Reg.), 6 — Kokuy (Kemerovo Reg.), 7 — Slyudyanka (Irkutsk Reg.), 8 — Moygoty (Buryatia), 9 — Ulyukan (Buryatia), 10 — Sokhondinskiy Reserve (Transbaikial), 11 — Budyumkan (Transbaikial), 12 — Gornotayozhnoe (Primorye), 13 — Lazo (Primorye), 14 — Novonezhino (Primorye), 15 — Snezhnaya (Primorye), 16 — Novikovo (Sakhalin), 17 — Kholmok (Sakhalin), 18 — Vayda Mt. (Sakhalin).

(Liu, Muse, 2005). Консенсусное дерево с бутстреп-тестом получено в программе Phylip 3.69 (Felsenstein, 1988) и визуализировано в программе Mega 6.0 (Tamura et al., 2013).

Анализ внутригеномного полиморфизма методом пиросеквенирования 454

Выделение ДНК проводили по протоколу Doyle и Doyle (1990). Анализируемые фрагменты амплифицировали двумя парами праймеров: *ITS1P* (Ridgway et al., 2003), *ITS2* (White et al., 1990); *TabE* (Taberlet et al., 1991) и *Cyp2-R* (Fay, Cowan, 2001; Fay et al., 2009) по стандартному протоколу при следующих условиях: 95° — 5 мин; 40 циклов (94° — 5 с, 52° — 5 с, 72° — 20 с); 72° — 1 мин. Секвенирование проводилось на приборе фирмы GS Junior (Roche, Switzerland) согласно инструкции производителя.

Данные обрабатывались в программе GS Amplicon Variant Analyzer v2.9. В данной программе по каждому образцу получены консенсусные группы прочтений и таблица уникальных вариантов на основе выявленных различий между анализируемым образцом и референсной последовательностью. В качестве референсных последовательностей из Генбанка выбраны сиквенсы ДНК *C. calceolus*

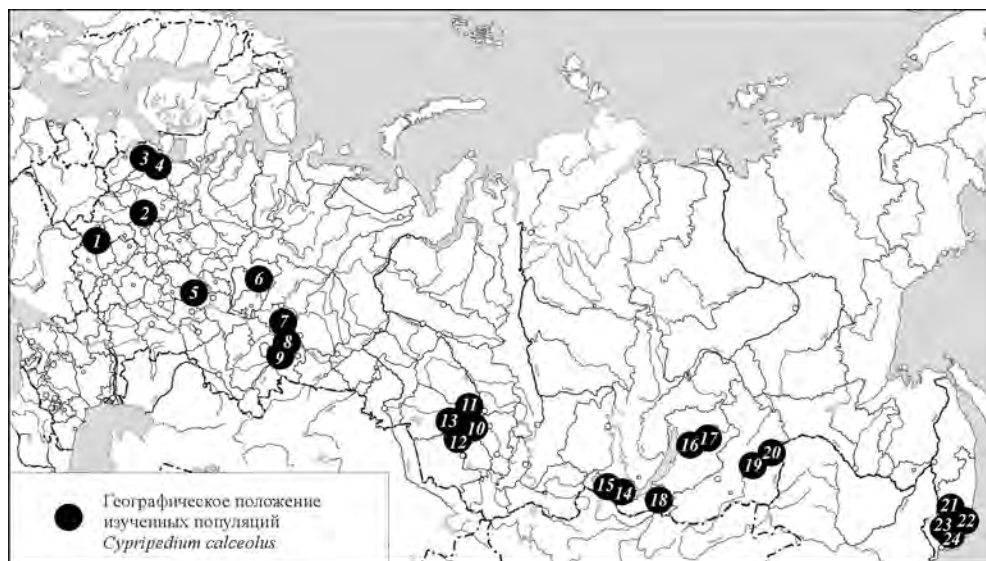


Рис. 2. Местонахождения популяций *Cypripedium calceolus*, где были собраны образцы для аллозимного анализа.

1 — Алтухово (Брянская обл.), 2 — Тверская обл., 3 — Пудость (Ленинградская обл.), 4 — Глядино (Ленинградская обл.), 5 — Игра (Удмуртия), 6 — Сергино (Удмуртия), 7 — Березовка (Пермский край), 8 — Верхняя Сысерть (Свердловская обл.), 9 — Нижний Атян (Челябинская обл.), 10 — Кокуй (Кемеровская обл.), 11 — Мельниково (Томская обл.), 12 — Койниха (Новосибирская обл.), 13 — Бердск (Новосибирская обл.), 14 — Слюдянка (Иркутская обл.), 15 — Мойготы (Бурятия), 16 — Улюкан (Бурятия), 17 — Джергинский заповедник (Бурятия), 18 — оз. Круглое (Бурятия), 19 — Будюмкан (Забайкальский край), 20 — Урюпино (Забайкальский край), 21 — Горнотаежное (Приморский край), 22 — Лазо (Приморский край), 23 — Новонежино (Приморский край), 24 — Анисимовка (Приморский край).

Fig. 2. The locations of *Cypripedium calceolus* populations, where the samples for allozyme analysis were collected.

1 — Altukhovo (Bryansk Reg.), 2 — Tver Reg., 3 — Pudost (Leningrad Reg.), 4 — Glyadino (Leningrad Reg.), 5 — Igra (Udmurtia), 6 — Sergino (Udmurtia), 7 — Beryozovka (Perm Territory), 8 — Verkhnyaya Sysert (Sverdlovsk Reg.), 9 — Nizhniy Atlyan (Chelyabinsk Reg.), 10 — Kokuy (Kemerovo Reg.), 11 — Melnikovo (Tomsk Reg.), 12 — Koynikha (Novosibirsk Reg.), 13 — Berdsk (Novosibirsk Reg.), 14 — Slyudyanka (Irkutsk Reg.), 15 — Moygoty (Buryatia), 16 — Ulyukan (Buryatia), 17 — Dzherginskiy Reserve (Buryatia), 18 — Krugloe Lake (Buryatia), 19 — Budyumkan (Transbaikal), 20 — Uryupino (Transbaikal), 21 — Gornotayozhnoe (Primorye), 22 — Lazo (Primorye), 23 — Novonezhino (Primorye), 24 — Anisimovka (Primorye).

(18S—26S rRNA—AY557232.1 и tRNA-Leu (*trnL*) ген и межгенный спейсер *trnL-trnF*—AY557224.1, Косюан et al., 2004). Условия фильтрации вариантов: минимальная доля выявляемого варианта (замены, вставки/делеции) выше 0.25 %, исключая синглтоны, т. е. последовательности, встречающиеся только один раз. Отфильтрованные таким образом варианты экспортировались в формат FASTA и анализировались в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2016).

После выравнивания значительно отличающиеся варианты были проверены по базе данных BLAST. В результате такой дополнительной фильтрации были исключены из анализа короткие варианты и варианты, высокомологичные ДНК других видов растений, грибов, микроорганизмов и животных.

Поскольку метод 454 допускает ошибку для прочтений участков с несколькими идущими подряд одинаковыми нуклеотидами, для уточнения числа нуклеотидов в таких участках были использованы данные секвенирования по Сэнгеру. В данной статье полиморфизм участков с повторами не рассматривается.

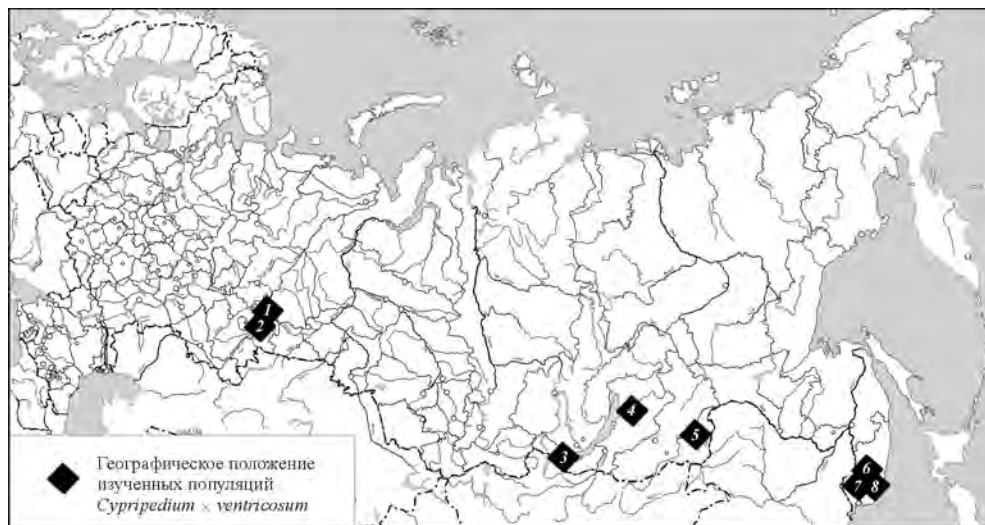


Рис. 3. Местонахождения популяций *Cypripedium* × *ventricosum*, где были собраны образцы для аллозимного анализа.

1 — Верхняя Сысерть (Свердловская обл.), 2 — Нижний Атыян (Челябинская обл.), 3 — Слюдянка (Иркутская обл.), 4 — Улюкан (Бурятия), 5 — Будюмкан (Забайкальский край), 6 — Горнотажное (Приморский край), 7 — Лазо (Приморский край), 8 — Новонежино (Приморский край).

Fig. 3. The locations of *Cypripedium* × *ventricosum* populations, where the samples for allozyme analysis were collected.

1 — Verkhnyaya Sysert (Sverdlovsk Reg.), 2 — Nizhniy Atlyan (Chelyabinsk Reg.), 3 — Slyudyanka (Irkutsk Reg.), 4 — Ulyukan (Buryatia), 5 — Budyumkan (Transbaikal), 6 — Gornotayozhnoe (Primorye), 7 — Lazo (Primorye), 8 — Novonezhino (Primorye).

Для уточнения вариантов замен мы проводили сравнение последовательностей, полученных при секвенировании с прямым и с обратным праймерами. Кроме того, мы удаляли последовательности с вариантами замен, которые выявлялись только в каком-то одном из трех запусков секвенирования. Оставшиеся после фильтрации группы уникальных последовательностей мы использовали для кластеризации на основе метода максимального правдоподобия, модель Tamura-Nei (Tamura, Nei, 1993) без учета делеций. В полученном дереве вероятности выше 50 % указаны над ветвями. Длина ветвей соответствует числу замен на сайт в указанном масштабе. В анализе использовались 142 нуклеотидные последовательности. Весь анализ проводили с использованием программы MEGA7 (Kumar et al., 2016).

В данном исследовании мы не рассматриваем подробно полиморфизм участка *trnL* хлоропластной ДНК. Для данного участка мы приводим данные по сравнению последовательностей, выявленных с максимальной частотой. Поскольку участок содержит А/Т-обогащенный 30-нуклеотидный район, результаты выравнивания разными методами различаются. Мы использовали алгоритм выравнивания MUSCLE (Edgar, 2004).

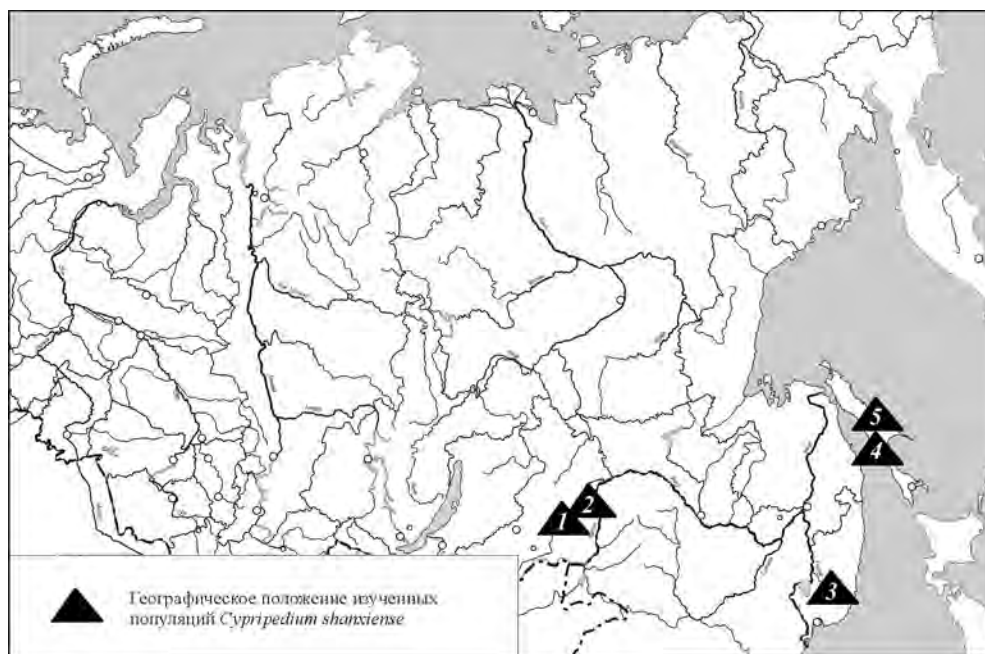


Рис. 4. Местонахождения популяций *Cypripedium shanxiense*, где были собраны образцы для аллозимного анализа.

1 — Будюмкан (Забайкальский край), 2 — Урюпино (Забайкальский край), 3 — Анисимовка (Приморский край), 4 — Макаров (Сахалин), 5 — Известковый (Сахалин).

Fig. 4. The locations of *Cypripedium shanxiense* populations, where the samples for allozyme analysis were collected.

1 — Budyumkan (Transbaikal), 2 — Uryupino (Transbaikal), 3 — Anisimovka (Primorye), 4 — Makarov (Sakhalin), 5 — Izvestkovyi (Sakhalin).

Результаты и обсуждение

Аллозимный анализ

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*. Особи *C. × ventricosum* представляют собой гибриды *C. calceolus* × *C. macranthon* (Knyasev et al., 2000a, b). Особи *C. shanxiense* являются гомозиготными по всем 10 изученным локусам, и признак мономорфности является диагностическим для данного таксона (Filippov, Andronova, 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* в гомозиготном состоянии (Filippov, Andronova, 2011). Исследование популяций представителей рода было продолжено на примере ранее не изучавшихся популяций из Забайкалья, Центральной и Западной Сибири, с Урала и европейской части России; в нем все вышеперечисленные заключения нашли свое подтверждение.

ТАБЛИЦА 1

Местонахождения популяций, в которых собирались образцы
для ДНК-анализа (n — число анализируемых образцов)

TABLE 1. The locations of populations where the samples for DNA analysis
were collected (n — number of analyzed samples)

Region, locality	Code	n
<i>Cypripedium calceolus</i>		
Bryansk Reg., Altukhovo	Z23	1
Leningrad Reg., Pudost	A11	1
Moscow Reg.	Z25	1
Belarus, Servech	Z22	1
Sverdlovsk Reg., Verkhnyaya Sysert	A5	1
Novosibirsk Reg., Koynikha	Z30	1
Irkutsk Reg., Slyudyanka	Z28	1
Buryatia, Dzherginskiy Reserve	Z17	1
Buryatia, Krugloe Lake	Z20	1
Transbaikal, Budyumkan	OR121, autogamy	1
Transbaikal, Budyumkan	OR118, with brown lips	1
Transbaikal, Budyumkan	OR125	1
Transbaikal, Uruipino	OR93	1
Primorye, Novonezhino	A4	1
Primorye, Novonezhino	Z27, with crest	1
Primorye, Novonezhino	Z26, with brown lips	1
<i>Cypripedium macranthos</i>		
Sakhalin, Kholmsk	Mac2	1
Primorye, Novonezhino	A9, pink flower	1
Primorye, Novonezhino	A10, white flower	1
Transbaikal, Sokhondinskiy Reserve	Z4	1
Irkutsk Reg., Slyudyanka	A2	1
Sverdlovsk Reg., Verkhnyaya Sysert	A6	1
<i>Cypripedium × ventricosum</i>		
Sverdlovsk Reg., Verkhnyaya Sysert	A7, burgundy red	1
Sverdlovsk Reg., Verkhnyaya Sysert	Z41, burgundy red and pink	1
Irkutsk Reg., Slyudyanka	Z39, burgundy red	1
Buryatia, Ulyukan	Z16	1
Primorye	Z43, lemon	1
Primorye	Z44, white and pink	1
Primorye	Z45, burgundy red	1
Primorye	Z46, burgundy red	1
Primorye	Z47, burgundy red	1
Primorye	A3, burgundy red	1
Primorye	A8, burgundy red	1
<i>Cypripedium shanxiense</i>		
Sakhalin, Izvestkovyi	Shan1, A12 (Shan2)	2
Primorye, Anisimovka	A1	1
Transbaikal, Uryupino	OR34	1
Transbaikal, Budyumkan	OR70, A13 (OR50), A14 (OR55)	3

Особый интерес представляло изучение популяций *C. calceolus* и *C. shanxiense* из зоны их совместного произрастания в Забайкалье. Наибольший интерес представлял анализ аллельного состава локусов *PGI* и *SKDH*. 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 (оз. 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* обнаруживаются только в зоне возможной гибридизации с *C. shanxiense* (в местах совместного произрастания двух видов и прилегающей к ней территории).

На основании частот аллелей были вычислены генетические дистанции D_A по Nei et al. (1983) между изученными популяциями и построена дендрограмма с использованием алгоритма UPGMA (рис. 5). В анализ 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. 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 высоким бутстреп-тестом (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 вероятностью 64 %.

Группа популяций *C. calceolus* разделилась на 2 подгруппы с бутстреп-тестом 58 % на Приморско-Забайкальскую 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.

Различия популяций *C. calceolus* из западной и восточной частей ареала по аллельному составу локусов *PGI*, *SKDH* можно объяснить несколькими причинами. Возможно, это связано с географической дифференциацией вида — при продвижении на запад происходила потеря некоторых аллелей в отдельных локусах. В этой связи можно высказать предположения о возможном дальневосточном центре происхождения *C. calceolus* и о происхождении двух таксонов (*C. calceolus* и *C. shanxiense*) от одного предка.

Различие также может быть связано с проявлением интрогрессивной гибридизации между *C. calceolus* и *C. shanxiense*. Возможность интрогрессивной гибридизации между *C. calceolus* и *C. shanxiense* отмечалась ранее Л. В. Аверьяновым (Averyanov, 1999). Он считал, что только некоторые растения на Дальнем

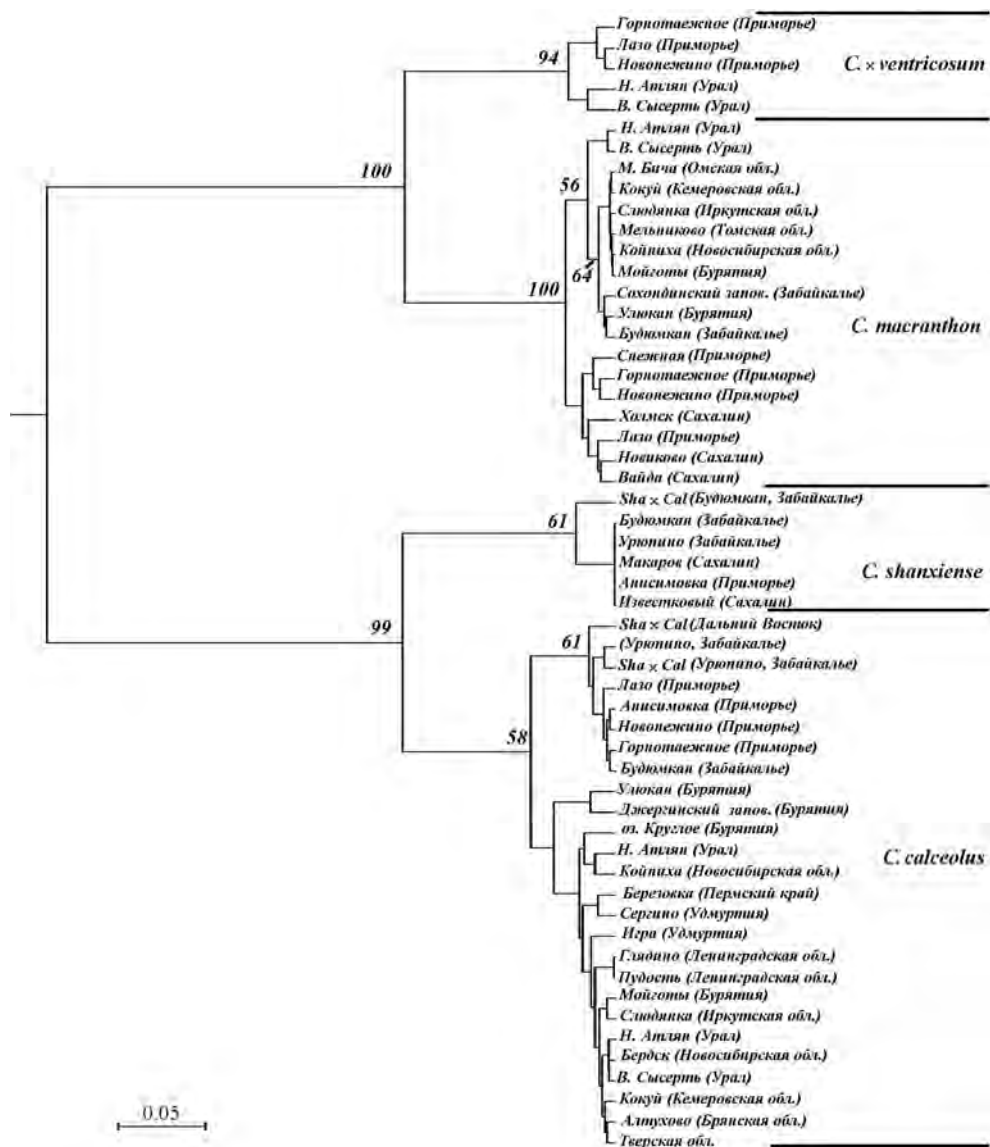


Рис. 5. UPGMA дендрограмма на основании генетических расстояний D_A по данным частот аллелей 10 генных локусов для изученных популяций представителей рода *Cypripedium* (генетические расстояния рассчитаны и файлы для построения исходного дерева и дерева с бутстреп-тестом для 1000 реплик получены в программе PowerMarker V3.25, консенсусное дерево построено в программе Phylip 3.69, визуализация дерева проведена в программе Mega 6.06).

Fig. 5. The UPGMA dendrogram based on the genetic distance D_A according to the allele frequencies of 10 genetic loci for the studied populations of *Cypripedium* taxa (genetic distances calculated and the files to build the source tree and tree with bootstrap test of 1000 replicas obtained using PowerMarker V3.25 software; a consensus tree is built using Phylip 3.69 software; visualization of the tree held using Mega 6.06 software).

Востоке являются гибридами между вышеуказанными видами. Согласно результатам аллозимного анализа, практически все особи *C. calceolus* из восточной части ареала можно отнести к гибридам, поскольку не только у уклоняющихся, но и у типичных растений отмечены признаки, характерные для *C. shanxiense*. Аналогичный пример можно привести и по представителям другого рода орхидных. Например, при молекулярно-генетическом изучении особей *Orchis militaris* и *O. simia* в местах их совместного произрастания в Европе оказалось, что они все являются результатом интрогрессивной гибридизации, хотя какие-либо зримые морфологические признаки, указывающие на это, обнаружены не были (Fay, Krauss, 2003).

Точка зрения о наличии межвидовой интрогрессивной гибридизации между *C. calceolus* и *C. shanxiense* хорошо согласуется с результатами более детального морфологического исследования. Так, в местонахождениях в Забайкальском, Приморском и Хабаровском краях наблюдается большее число нетипичных особей *C. calceolus* (Averyanov, 1999), имеющих губу коричневого цвета (рис. 6). Их доля составляет от 30 до 50 % от общего числа цветущих растений в популяциях (Andronova et al., 2007). Кроме того, у некоторых растений *C. calceolus* из Приморья и Забайкалья была выявлена факультативная контактная автогамия (Filippov, Andronova, 2007). Согласно литературным данным, для *C. calceolus* характерно исключительно перекрестное опыление (Darwin, 1950; Nilsson, 1979), тогда как для *C. shanxiense* — самоопыление (Perner, Averyanov, 1995).

В ходе опытов по искусственному самоопылению цветков у уклоняющихся особей и типичных *C. calceolus* было показано, что процент завязывания плодов довольно высок — более 90 %. Однако в плодах наблюдалось сравнительно большое число семян нежизнеспособных из-за аномалий развития зародыша, что свидетельствует о сниженной семенной продуктивности у растений из восточной части ареала.

Цитологическое исследование пыльцы у уклоняющихся растений с помощью ацетокарминового метода выявило наличие большого числа аномальных пыльцевых зерен (рис. 7). Так у одного из растений практически все пыльцевые зерна были аномальными. Почти половина из примерно 800 просмотренных зерен были пустые (безъядерные). Остальная часть пыльцевых зерен в основном оставались слабоокрашенными (вероятно, их можно считать стерильными), и лишь единичные окрашивались достаточно ярко, т. е. с высокой вероятностью были жизнеспособными. Практически все пыльцевые зерна отличались аномальной формой — имели разного рода борозды, инвагинации, вмятины, что указывает на нарушение деления клеток в ходе формирования пыльцевых зерен. У 8 % пыльцевых зерен были обнаружены микроядра, что свидетельствует о нарушении процесса деления ядер. Обычно такие аномалии наблюдаются у отдаленных гибридов и, именно они приводят к стерильности их пыльцы.

В ходе изучения пыльцы у других особей с коричневой, переходной и типичной окраской губы также были отмечены описанные выше аномалии. Хотя процент аномальных пыльцевых зерен был меньшим, тем не менее полученные данные свидетельствуют о том, что у изученных особей имеют место генетические нарушения, которые обычно наблюдаются при отдаленной гибридизации.

Таким образом, выявленные вышеуказанные нетипичные морфологические и молекулярно-генетические (на основе аллозимного анализа) признаки у *C. calceolus*, которые наблюдались только у особей в зоне совместного произрастания с *C. shanxiense*, хорошо согласовались с предположением о межвидовой интро-



Рис. 6. Нетипичные особи *Cypripedium calceolus* из Приморского края.

Fig. 6. Atypical plants of *Cypripedium calceolus* from Primorye Territory.

грессивной гибридизации между данными таксонами. На основании этих данных было высказано предположение о существовании межвидового интрогрессивно гибридного комплекса в зоне перекрытия ареалов *C. calceolus* и *C. shanxiense* в Забайкальском, Хабаровском и Приморском краях. Как предполагалось, в нем преобладают гибриды ($C. calceolus \times C. shanxiense$), а число особей родительских видов сравнительно невелико. Один из родительских видов — *C. shanxiense* — относится к наиболее редким представителям рода, встречающихся на террито-

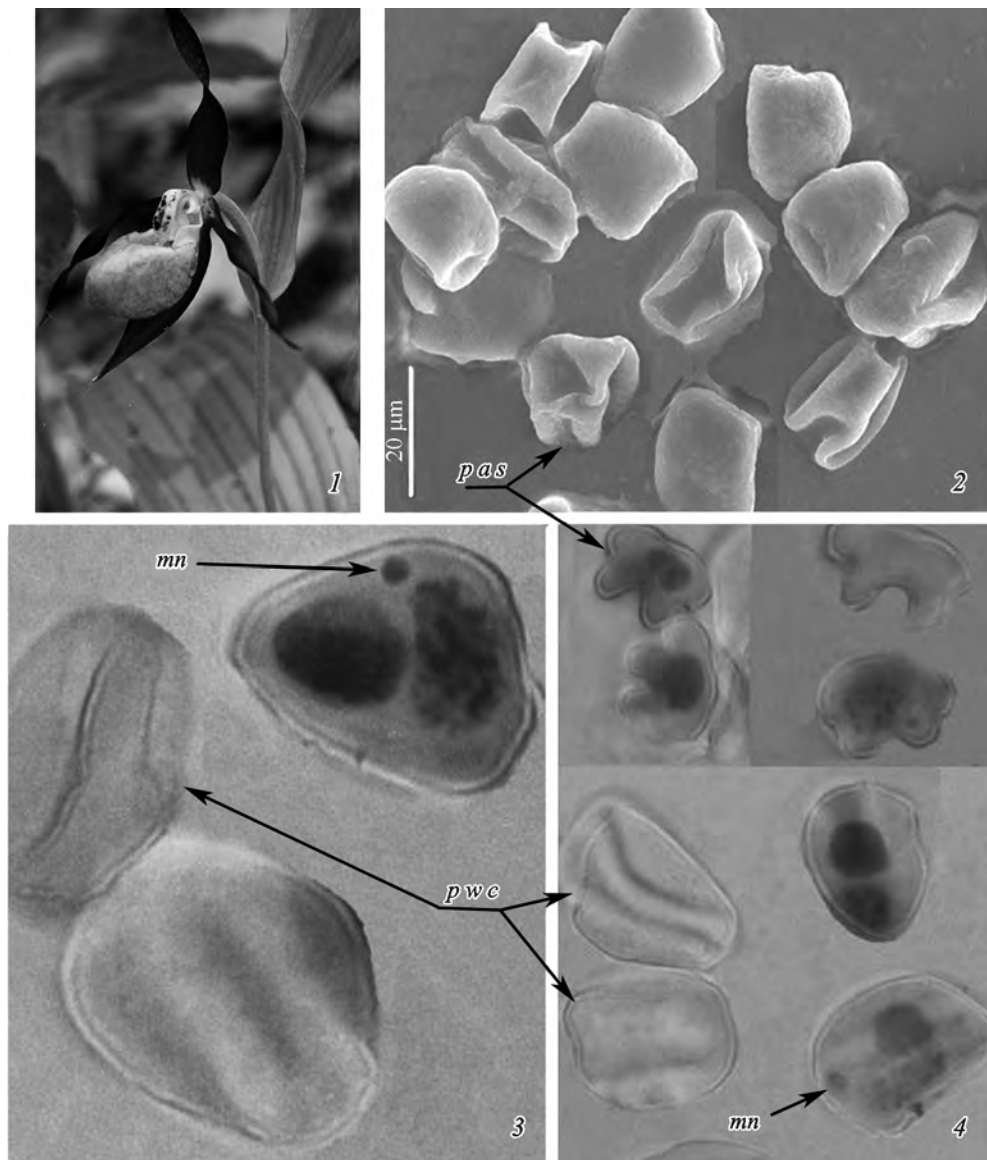


Рис. 7. Строение пылевых зерен у одной из уклоняющихся особей *Cypripedium calceolus* (Большехецирский заповедник).

Общий вид цветка (1), пыльца под СЭМ (2) и световым микроскопом (3, 4). *mn* — микроядро, *pas* — пыльца аномальной формы, *pwc* — пустые пылевые зерна.

Fig. 7. The structure of the pollen grains of one of the deviating individuals of *Cypripedium calceolus* (Bolshehekhtsirskiy Reserve).

General view of flower (1), pollen under SEM (2) and light microscope (3, 4). *mn* — micronucleus, *pas* — pollen grains of abnormal shape, *pwc* — pollen grains without intracellular content.

рии России. Особи *C. shanxiense* характеризуется облигатной автогамией. Эта особенность обеспечивает биологическую изоляцию данного таксона от близкого вида *C. calceolus*. Второй из родительских видов — *C. calceolus* — в норме относится к перекрестно опыляемым растениям и является облигатным энтомофилом. Представители данного вида, возможно, еще более редки на данной территории, а растения, морфологически похожие на *C. calceolus*, на самом деле являются гибридами *C. calceolus* × *C. shanxiense*. Это предположение высказано в связи с тем, что в популяциях *C. calceolus*, произрастающих на юге Приморского, Хабаровского и Забайкальского краев, присутствует большое число особей с нетипичными признаками (цветок с губой коричневого цвета) и особенностями репродуктивной биологии (факультативное самоопыление). Выражением их генетической нестабильности является формирование у них пыльцы и семян с высокой долей аномалий, и как следствие, резкое снижение семенной продуктивности (Averyanov, 1999; Andronova et al., 2007, 2009; Filippov, Andronova, 2011).

Для подтверждения высказанной гипотезы было проведено исследование внутригенного полиморфизма с использованием методики 454 участка *ITS1* гена 35S рибосомальной РНК и хлоропластной ДНК района *trnL-trnF* у *C. calceolus*, *C. macranthon*, *C. shanxiense* и *C. × ventricosum*. Все полученные прочтения сравнивали с референсными последовательностями *C. calceolus* из Генбанка.

Сравнительный анализ участка *ITS1* 16 образцов *C. calceolus* показал, что у 4 из них имеется внутригенный полиморфизм в позиции 320 (позиция здесь и далее обозначена в соответствии с номером нуклеотида в последовательности AY557232, секвенированной Косуян et al., 2004, в которой собственно *ITS1* начинается с нуклеотида 174 и завершается позицией 419, табл. 2). У трех образцов преобладали последовательности, аналогичные референсу, у одного образца преобладали последовательности с заменой С на Т. У большинства изученных образцов замена в позиции 320 была практически во всех прочтениях. Полиморфные образцы *C. calceolus* были собраны в разных частях ареала: в Ленинградской, Брянской областях, в Забайкалье и в Приморье, географической приуроченности по данному признаку не выявлено.

Сравнительный анализ участка *ITS1* 7 образцов *C. shanxiense* (4 образца из Забайкалья, 2 — с Сахалина, 1 — из Приморья) показал, что в позициях 268 и 276 имеются замены Г на Т, а в позиции 320 — С на Т. Замена в позиции 320 была практически в 100 % прочтений. Как оказалось, по позициям 268 и 276 особи *C. shanxiense* отличаются и от референса, и от всех других изученных таксонов. Это специфичные для данного таксона замены.

Следует отметить, что по позициям 268 и 276 у образцов *C. shanxiense* имелся внутригенный полиморфизм. Так, образцы из Забайкалья отличались от референса по позициям 268 и 276 в 50—79 % прочтений, из Приморья — в 85—87 %, а с Сахалина — 57—73 %.

В образцах *C. calceolus* замены Г на Т, специфичные для *C. shanxiense* в позициях 268 и 276, были обнаружены только в единичных прочтениях. Из этого следует, что изученные образцы *C. calceolus* нельзя отнести к гибридам.

Сравнительный анализ участка *ITS1* 5 образцов *C. macranthon* показал, что они отличаются от референса по позициям 269, 320 и 352, где есть замены С на Т. По позициям 269 и 352 они отличаются также от *C. shanxiense*.

Сравнительный анализ участка *ITS1* 11 образцов *C. × ventricosum* показал, что имеется полиморфизм в позициях 269 и 352, по которым различаются родительские виды *C. calceolus* и *C. macranthon*. Число прочтений с заменами в пози-

ТАБЛИЦА 2

Варианты уникальных последовательностей участка *ITS1* ДНК, обнаруженные в образцах разных видов рода *Cyripedium*, которые использовались в анализе

TABLE 2. The variants of unique sequences of *ITS1* detected in samples of different *Cyripedium* species, used in the analysis

Group, N*	Reference Reads**	136	149	163	185	231	234	235	268	269	276	317	320	321	329	330	352	391	394	436	437
		G	C	C	G	C	G	A	G	C	G	C	T	G	C	G	C	G	C	C	G
1	<i>Cyripedium calceolus</i> A11 2876	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> OR93 1814	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> A5 4369	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> OR118 902	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> OR121 1414	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> OR125 1566	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> Z17 1545	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> Z20 413	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> Z22 1301	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> Z23 714	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> Z25 1874	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> Z26 899	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> Z27 944	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> Z28 1528	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> Z30 1563	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. shanxiense</i> Shan1 198	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. shanxiense</i> A12 377	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. shanxiense</i> A13 427	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. shanxiense</i> A14 393	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z41 884	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z43 1170	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z16 657	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z44 639	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z45 1079	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

ТАБЛИЦА 2 (продолжение)

Group, N*	Reference		136	149	163	185	231	234	235	268	269	276	317	320	321	329	330	352	391	394	436	437
	Reads**		G	C	C	G	C	G	A	G	C	G	C	T	G	C	G	C	G	C	C	G
2	<i>Cypripedium</i> × <i>ventricosum</i> Z46 162		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z47 878		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> A3 818		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z39 851		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z47 27		.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	<i>C. × ventricosum</i> Z46 31		.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z44 30		.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z43 31		.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> Z30 68		.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. calceolus</i> Z28 83		.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. shanxiense</i> Shan1 808		.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. shanxiense</i> A14 373		.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	<i>C. shanxiense</i> OR34 1346		.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. shanxiense</i> A13 375		.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. shanxiense</i> OR70 692		.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. shanxiense</i> A12 568		.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. shanxiense</i> Shan1 70		.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
5	<i>C. shanxiense</i> A12 150		.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
6	<i>C. shanxiense</i> OR34 34		.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.
	<i>C. shanxiense</i> OR34 38		.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
7	<i>C. shanxiense</i> OR70 45		.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	<i>C. shanxiense</i> Shan1 65		.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. shanxiense</i> OR34 35		.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. shanxiense</i> OR70 61		.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. shanxiense</i> A12 128		.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

ТАБЛИЦА 2 (продолжение)

Group, N*	Reference Reads**	136	149	163	185	231	234	235	268	269	276	317	320	321	329	330	352	391	394	436	437
		G	C	C	G	C	G	A	G	C	G	C	T	G	C	G	C	G	C	C	G
	<i>Cypripedium macranthon</i> A10 68	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. macranthon</i> Z4 94	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z41 166	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> A7 294	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z43 102	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z16 118	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z44 141	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z45 184	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z46 134	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z47 149	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z39 157	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. macranthon</i> Mac2 44	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z44 24	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z47 26	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	<i>C. macranthon</i> Mac2 1295	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
	<i>C. macranthon</i> A6 144	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
	<i>C. macranthon</i> A9 572	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
	<i>C. macranthon</i> A10 1085	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
	<i>C. macranthon</i> Z4 1426	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z41 794	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> A7 1761	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> A8 149	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z43 182	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z16 191	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z44 356	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.

ТАБЛИЦА 2 (продолжение)

Group, N*	Reference		136	149	163	185	231	234	235	268	269	276	317	320	321	329	330	352	391	394	436	437
	Reads**		G	C	C	G	C	G	A	G	C	G	C	T	G	C	G	C	G	C	C	G
31	<i>Cypripedium macranthum</i>		.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.
	A6 100		.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.
	<i>C. macranthum</i> A9 1299		.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.
	<i>C. macranthum</i> Z4 46		.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z43 133		.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z16 180		.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z44 28		.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.
32	<i>C. × ventricosum</i> Z45 197		.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z43 42		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z16 50		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.
33	<i>C. × ventricosum</i> Z45 73		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z43 25		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
	<i>C. × ventricosum</i> Z45 41		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
			.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Примечание. * — номера групп соответствуют номерам групп на рис. 8. ** — название каждой уникальной последовательности содержит информацию о видовой принадлежности, коде с указанием места сбора образца (A, Z и т. д. по табл. 1) и о числе прочтений, имеющих одинаковый нуклеотидный состав.

ции 269 и 352 варьировало от 30 до 50 %. В позиции 320 замена С на Т была практически в 100 % прочтений. Согласно результатам исследования, практически все образцы *C. × ventricosum* являются гибридами между *C. calceolus* и *C. macranthon*, возможно, это гибриды первого поколения. Эти данные полностью согласуются с результатами аллозимного анализа. Ни одного гибрида между *C. macranthon* и *C. shanxiense* не обнаружено.

У двух из 11 изученных образцов *C. × ventricosum* изученный участок хлоропластной ДНК имел сходство с *C. calceolus* из Забайкальского края и из Приморья, у всех других он был идентичен таковому *C. macranthon* (табл. 3). Тем самым особи этого гибридного таксона могут образовываться с участием как *C. macranthon*, так и *C. calceolus* в качестве женских растений.

Если изученные образцы *C. calceolus* не различались по участку *ITS1*, то по хлоропластной ДНК они разделились на 2 группы. Нуклеотидная последовательность участка хлоропластной ДНК оказалась идентичной у всех изученных образцов *C. shanxiense* и у *C. calceolus* из Забайкальского края и из Приморья. Однако при сравнении с образцами *C. calceolus*, собранными в забайкальской части Бурятии и западнее (Сибирь, Урал и европейская часть России), были выявлены существенные различия по наличию вставок/делеций в позициях 457 и 516 (табл. 3). Вероятная граница между группами *C. calceolus* проходит в Забайкальском крае. Эти данные хорошо согласуются с результатами аллозимного анализа.

Сравнение оригинальных и представленных в Генбанке данных по другим таксонам рода показывает, что изученный участок хлоропластной ДНК начиная с 457 позиции включает высоко полиморфный 30-нуклеотидный А/Т район, содержащий различные (6, 9, 18 и 24) нуклеотидные делеции, характерные для разных видов рода *Cypripedium*. Вставка в позиции 516—520 специфична только для *C. calceolus* из местонахождений из Европы, Западной и Центральной Сибири и западной части Забайкалья (Бурятия). Эта вставка не встречается ни у представителей других изученных нами таксонов, ни у представителей рода, данные по которым имеются в Генбанке. Замены G на Т в позиции 526 и А на Т в позиции 534 маркируют *C. macranthon* и некоторые другие виды секции *Macrantha* (Сох, 1999), сведения по которым имеются в Генбанке.

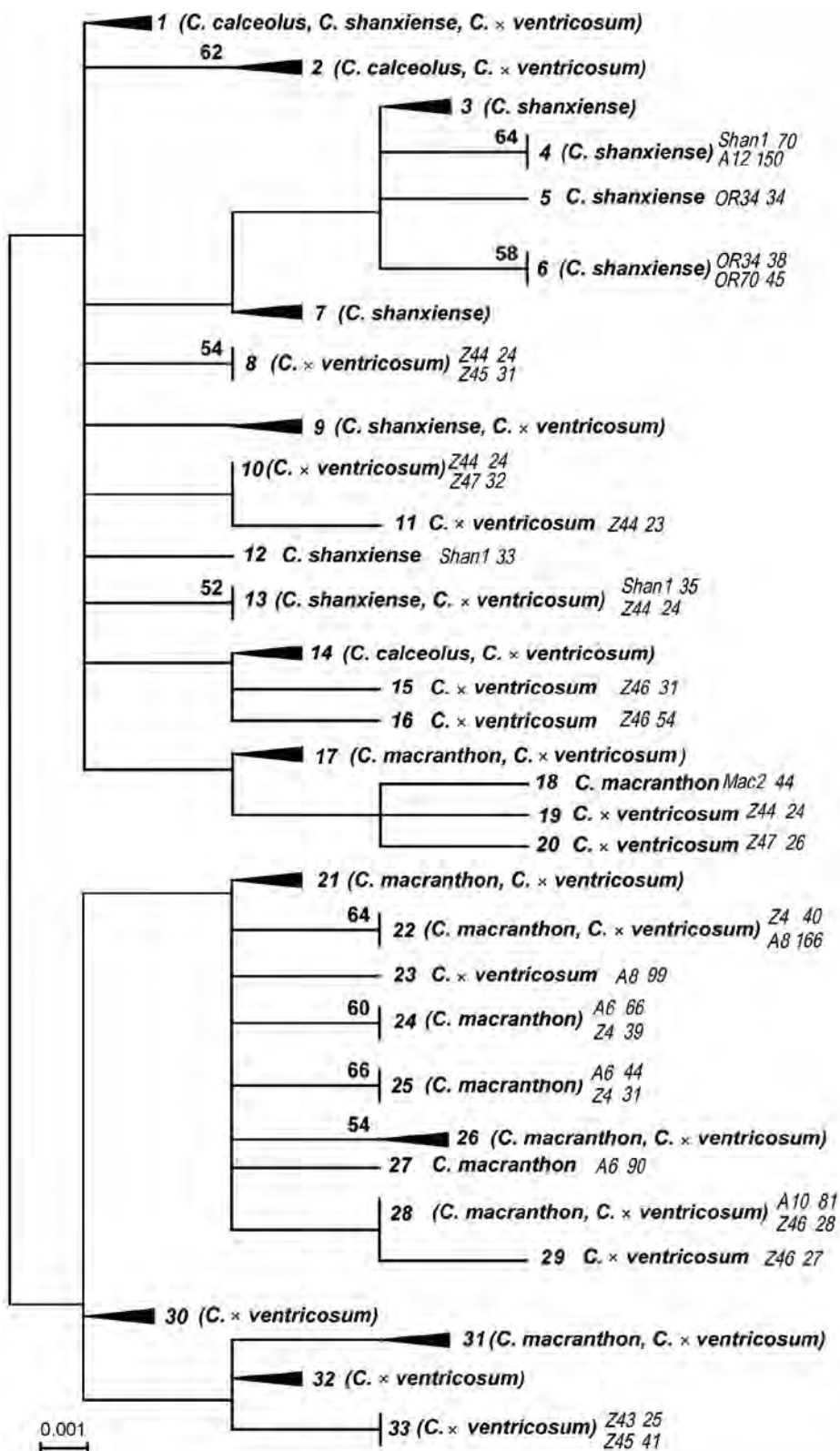
Было проанализировано 142 варианта последовательностей *ITS1*, которые встречались в геноме анализируемых образцов с долей не менее 5 % и имели уровень вариабельности сайтов примерно 80 % (рис. 8). Варианты разделились на два больших кластера и на 33 группы. Варианты замен в нуклеотидных последовательностях в группах по сравнению с выбранной референсной последовательностью *C. calceolus*, приведены в табл. 2.

В первом кластере, имеющем 20 групп, оказались все варианты *C. calceolus* и *C. shanxiense*. В него вошли варианты каждого из образцов *C. × ventricosum*, а также небольшая часть вариантов *C. macranthon*, которые имели замену С на Т только в одной позиции из двух специфичных для данного вида. Во второй кластер, состоящий из 13 групп, вошли все остальные варианты, обнаруженные в образцах *C. macranthon* и *C. × ventricosum*.

Следует обратить внимание на то, что группы включают идентичные варианты *ITS1*, обнаруженные в образцах разных таксонов. Например, в группе 1 объединялись идентичные варианты, выявленные у всех изученных 15 образцов *C. calceolus*, всех 6 образцов *C. shanxiense* и 9 из 11 анализируемых образцов *C. × ventricosum*. Эти последовательности были также идентичны референсу — *C. calceolus*. В другой (21) сгруппировались варианты всех образцов *C. macranthon* и *C. × ventricosum*.

<i>C. shanxiense</i>	OR34 Transbaikal (303)	T	A	T	—	—	—	—	—	·
	OR70 Transbaikal (356)	T	A	T	—	—	—	—	—	·
	Shan1 Sakhalin (366)	T	A	T	—	—	—	—	—	·
	A1 Primorye (331)	T	A	T	—	—	—	—	—	·
	A12 Sakhalin (373)	T	A	T	—	—	—	—	—	·
	A13 Transbaikal (514)	T	A	T	—	—	—	—	—	·
	A14 Transbaikal (426)	T	A	T	—	—	—	—	—	·
<i>C. × ventricosum</i>	Z47 Primorye (361)	T	A	T	—	—	—	—	—	·
	Z43 Primorye (506)	T	A	T	—	—	—	—	—	·
	Z16 Buryatia (447)	—	—	—	—	—	—	—	—	G
	Z39 Irkutsk Reg. (455)	—	—	—	—	—	—	—	—	G
	Z41 Sverdlovsk Reg. (489)	—	—	—	—	—	—	—	—	G
	Z44 Primorye (421)	—	—	—	—	—	—	—	—	G
	Z45 Primorye (465)	—	—	—	—	—	—	—	—	G
	Z46 Primorye (426)	—	—	—	—	—	—	—	—	G
	A3 Primorye (423)	—	—	—	—	—	—	—	—	G
	A7 Sverdlovsk Reg. (170)	—	—	—	—	—	—	—	—	G
	A8 Primorye (328)	—	—	—	—	—	—	—	—	G

Примечание. Число в скобках означает число прочтений, имеющих одинаковый нуклеотидный состав. Делеции выделены серым цветом.
 Note. The number in the brackets indicates the number of reads with the same nucleotide composition. Deletions are isolated with the gray color.



Варианты *C. calceolus* вошли в 3 группы, только вместе с образцами *C. × ventricosum* и *C. shanxiense*. Варианты *C. shanxiense* разделились на 9 групп (6 из которых специфичны только для данного таксона). Варианты *C. macranthon* обнаруживаются в 10 группах, практически во всех из них присутствуют образцы *C. × ventricosum*. Варианты *C. × ventricosum* разделились на 23 группы, как правило, в них присутствуют или образцы *C. calceolus*, или *C. macranthon*.

Ни одной группы, объединяющей варианты и от *C. calceolus* и от *C. macranthon*, или и от *C. shanxiense* и от *C. macranthon*, выявлено не было.

В двух группах (9 и 13) объединились сходные варианты последовательностей, выявленных у *C. shanxiense* и *C. × ventricosum*. Поскольку ни у одного из образцов *C. × ventricosum* специфичные для *C. shanxiense* замены G на T хотя бы в одной из позиций (269, 276) не были выявлены, мы не можем рассматривать это сходство по более редким заменам C на T в двух позициях как доказательство участия *C. shanxiense* в образовании *C. × ventricosum* в качестве одного из родителей.

Полученные данные указывают на то, что межвидовая гибридизация между *C. shanxiense* и *C. macranthon* в симпатрических популяциях, по-видимому, отсутствует.

Из полученных результатов следует, что на территории России имеется две разные генетические линии *C. calceolus*, которые различаются по хлоропластной ДНК. Она, как известно, наследуется по материнской линии. Участок хлоропластной ДНК у одной из линий *C. calceolus* и *C. shanxiense* оказался идентичным, тогда как участок *ITS1* ДНК у представителей двух таксонов имел существенные различия. Интересно отметить, что особи этой линии *C. calceolus* произрастали только в зоне совместного произрастания с *C. shanxiense*. Поскольку хлоропластная ДНК наследуется по материнской линии, можно предположить, что имеется ограничение расстояния, на которое происходит рассеивание семян при созревании плодов. Полученные данные по анализу хлоропластной ДНК не подтверждают, но и не опровергают возможное гибридогенное происхождение одной из линий *C. calceolus* с идентичным *C. shanxiense* участком хлоропластной ДНК. Совершенно очевидно только то, что эти два таксона имеют общее происхождение по материнской линии.

Зона гибридизации между *C. calceolus* и *C. shanxiense*, определенная на основании аллельного состава локусов *PGI* и *SKDH* (по дифференцирующим *C. shanxiense* аллелям у *C. calceolus*), представляется более широкой, так как она распространяется не только на территорию совместного произрастания двух таксонов, но и на прилегающие к ней районы. Это может быть связано с тем, что имеет место поток генов, который осуществляется посредством переноса пыльцы на большие расстояния по сравнению с дисперсией семян. Однако статистическая обработка данных аллозимного анализа показала, что популяции *C. cal-*

Рис. 8. Дерево генетических расстояний для 142 вариантов *ITS1*, построенное методом максимального правдоподобия, модель Tamura-Nei (Tamura, Nei, 1993).

Номера групп указаны перед видовым названием. Значения вероятности выше 50 % указаны на ветвях сверху. Длины ветвей соответствуют количеству замен на сайт в указанном масштабе. Анализ выполнен с использованием MEGA7 (Kumar et al., 2016).

Fig. 8. A tree of genetic distances for 142 variants of *ITS1* built using the maximum likelihood method, the model of Tamura-Nei (Tamura, Nei, 1993).

Group numbers are indicated before species names. Probability values above 50 % are indicated above branches. The branch lengths correspond to the number of substitutions at a site at a specified scale. The analysis is made using MEGA7 (Kumar et al., 2016).

ceolus находятся в равновесном (Харди-Вайнберга) состоянии по локусам, в которых были выявлены дифференцирующие *C. shanxiense* аллели (Filiprov, Andronova, 2016). Следовательно, обмен генетическим материалом между таксонами происходит очень редко.

Как оказалось, не все гипотезы, высказанные на основании данных аллозимного анализа, подтвердились после проведения исследования внутри геномного полиморфизма участка *ITS1* ДНК. Например, различие аллельного состава двух аллозимных локусов *PGI* и *SKDH* у *C. calceolus* из восточной и западной частей ареала можно было бы объяснить потоком генов от *C. shanxiense*, что в симпатрических популяциях может осуществляться и в реальном времени. Однако в исследовании внутригеномного полиморфизма участка *ITS1* ДНК у *C. calceolus* замены, специфичные *C. shanxiense*, встречались очень редко (не более 1.5 % от числа всех прочтений). Это однозначно свидетельствует о том, что проанализированные образцы *C. calceolus* (в том числе две нетипичные особи с губой коричневого цвета) не являются гибридами первого поколения. Тогда как в геноме *C. shanxiense*, который, по данным аллозимного анализа, является мономорфным по всем 10 генным локусам, что не дает возможность отнести его к гибридам, имелось от 13 до 50 % идентичных *C. calceolus* последовательностей *ITS1*. Согласно этим данным, *C. shanxiense* можно было бы отнести к межвидовым гибридам, с потоком генов от *C. calceolus*. Однако отсутствие полиморфизма аллозимных локусов у *C. shanxiense* свидетельствует о том, что все исследованные образцы (даже те, у которых доля специфичных для *C. calceolus* последовательностей *ITS1* составляла 50 %) также не являются гибридами первого поколения. Принимая во внимание и данные аллозимного анализа, и результаты исследования внутригеномного полиморфизма, можно заключить, что в настоящее время не имеется фактов, подтверждающих наличие гибридизации между *C. shanxiense* и *C. calceolus* в симпатрических популяциях. На основании результатов проведенного исследования можно высказать предположение о гибридогенном происхождении как *C. shanxiense*, так и «восточной» расы *C. calceolus*, распространенной от Забайкальского края до Приморья. Возможно, эту расу *C. calceolus*, характеризующуюся выраженными фенотипическими и генотипическими особенностями, следует рассматривать в качестве самостоятельного морфологически слабо выраженного скрытого таксона, статус которого трудно определим на настоящий момент.

Благодарности

Авторы благодарят заведующего лабораторией Е. Е. Андронova, научного сотрудника А. И. Жернакова и инженера-исследователя А. А. Кичко Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии за помощь при проведении исследования. Особую благодарность выражаем зав. Лабораторией биосистематики и цитологии Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН А. В. Родионову за критические замечания при подготовке рукописи статьи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-04-92004 ННС_а) и Программы фундаментальных исследований президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития». Пиросеквенирование методом 454 проводилось с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [Andronova et al.] Андропова Е. В., Филиппов Е. Г. 2007. Морфологические особенности цветков у самоопыляющихся растений *Cypripedium calceolus* и *C. shanxiense* (Orchidaceae). — Бот. журн. 92(3): 360—364.
- [Andronova et al.] Андропова Е. В., Филиппов Е. Г., Мельникова А. Б., Аверьянов Л. В. 2007. Морфологический анализ и соотношение типичных и уклоняющихся форм в популяциях *Cypripedium calceolus* на юге Хабаровского и Приморского краев. — Вестн. Тверского ГУ. Сер. Биология и Экология. 7(35): 17—19.
- [Andronova et al.] Андропова Е. В., Филиппов Е. Г., Мельникова А. Б. 2009. Об особой генетической структуре популяций *Cypripedium calceolus* L. в Хабаровском и Приморском краях. В сб. Трудов II региональной науч.-практич. конф. «Амур заповедный». Хабаровск. С. 122—127.
- [Averyanov] Аверьянов Л. В. 1999. Род Башмачок — *Cypripedium* (Orchidaceae) на территории России. — Turczaninowia. 2 (2): 5—40.
- Brzosko E., Wrblewska A., Ratkiewicz M. 2002. Spatial genetic structure and clonal diversity of island populations of lady's slipper (*Cypripedium calceolus*) from the Biebrza National Park (northeast Poland). — Molecular Ecology. 11: 2499—2509.
- Case M. A. 1993. High levels of allozyme variation within *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) and low levels of divergence among its varieties. — Systematic Botany. 18: 663—677.
- Chung J. M., Park K. W., Park C. S., Lee S. H., Chung M. G., Chung M. Y. 2009. Contrasting levels of genetic diversity between the historically rare orchid *Cypripedium japonicum* and the historically common orchid *Cypripedium macranthos* in South Korea. — Botanical Journal of the Linnean Society. 160: 119—129.
- Cox A. 1995. The utility of 5S r-DNA in Phylogenetic Reconstructions: Development of the Polymerase Chain Reaction in Plant Systematics. Ph. D theses. University of Reading.
- Cox A. 1999. *Cypripedium*. Phylogenetics. In Genera Orchidacearum. Vol. 1. General Introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. New York. P. 120—123.
- Cribb P. 1997. The Genus *Cypripedium*. Portland. 301 p.
- Cribb P. 1999. *Cypripedium*. Distribution. In: Genera Orchidacearum. Vol. 1. General Introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. New York. P. 115.
- [Darwin] Дарвин Ч. 1950. Опыление орхидей насекомыми. Ч. Дарвин. Сочинения. М.; Л., С. 214—217.
- Doyle J. J., Doyle J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. — Focus. 12 (1): 13—15.
- Eccarius W. 2009. Die Orchideengattung *Cypripedium*. Buerger. 384 p.
- Edgar R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. — Nucleic Acids Research. 32(5): 1792—1797.
- Fay M. F., Bone R., Cook P., Kahandawala I., Greensmith J., Harris S., Pedersen H. E., Ingrouille M. J., Lexer C. 2009. Genetic diversity in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) with a focus on north-western Europe, as revealed by plastid DNA length polymorphisms. — Annals of Botany. 104: 517—525.
- Fay M. F., Cowan R. S. 2001. Plastid microsatellites in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae): genetic fingerprint prints from herbarium specimens. — Lindleyana. 16: 151—156.
- Fay M. F., Cowan R. S., Leitch I. J. 2005. The effects of genome size on the quality and utility of AFLP fingerprints. — Annals of Botany. 95: 237—246.
- Fay M. F., Krauss S. L. 2003. Orchid conservation genetics in the molecular age. In Orchid conservation. Kota Kinabalu. P. 91—112.
- Felsenstein J. 1988. Phylogenies and quantitative characters — Annual Review of Ecology and Systematics. 19: 445—471.
- [Filippov, Andronova] Филиппов Е. Г., Андропова Е. В. 2011. Генетическая дифференциация представителей рода *Cypripedium* России по данным аллозимного анализа. — Генетика. 47(5): 615—623. (Filippov E. G., Andronova E. V. 2011. Genetic Differentiation in Plants of the Genus *Cypripedium* from Russia Inferred from Allozyme Data. — Russian J. Genetics. 47(5): 538—545). DOI: 10.1134/S1022795411050061
- [Filippov, Andronova] Филиппов Е. Г., Андропова Е. В. 2016. Генетическая структура популяций представителей рода *Cypripedium* (*C. calceolus*, *C. macranthos*, *C. shanxiense* и *C. × ventricosum*) России по данным аллозимного анализа. В сб. научных статей по матер. XV Междунар. науч.-практич. конф. «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии». Барнаул. С. 137—142.
- Hedré M. 2003. Plastid DNA variation in the *Dactylorhiza incarnate/maculata* polyploid complex and the origin of allotetraploid *D. sphagnicola* (Orchidaceae). — Molecular Ecology. 12: 2669—2680.
- Hedré M., Nordström S., Persson H. A., Pedersen H. E., Hansson S. 2007. Patterns of polyploid evolution in Greek marsh orchids (*Dactylorhiza*; Orchidaceae) as revealed by allozymes, AFLPS, and plastid DNA data. — American Journal of Botany. 94: 1205—1218.

- Izawa T., Kawahara T., Takahashi H. 2007. Genetic diversity of an endangered plant, *Cypripedium macranthos* var. *rebutense* (Orchidaceae): background genetic research for future conservation. — *Conservation Genetics*. 8: 1369—1374.
- Jo S., Ochiai M., Furuta K., Yagi K. 2005. Genetic Analysis of genus *Cypripedium*, found in Northern Japanese Island and Related species endemic in northern China — Japan. *Soc. Hort. Sci.* 74(3): 234—241.
- [Knyasev et al.] Князев М. С., Куликов П. В., Князева О. И., Семериков В. Л. 2000a. О межвидовой гибридизации евразийских видов рода *Cypripedium* (Orchidaceae) и таксономическом статусе *C. ventricosum*. — *Бот. журн.* 85(5): 94—102.
- Knyasev M. S., Kulikov P. V., Knyaseva O. I., Semerikov V. I. 2000b. Interspecific hybridization in northern eurasian *Cypripedium*: morphometric and genetic evidence of the hybrid origin of *C. ventricosum*. — *Lindleyana*. 15(1): 15—26.
- Kocyan A., Qiu Y.-L., Endress P., Conti E. 2004. A phylogenetic analysis of *Apostasioideae* (Orchidaceae) based on *ITS*, *trnL-F* and *matK*. — *Plant Syst. Evol.* 247: 203—213.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. — *Molecular Biology and Evolution*. 33: 1870—1874.
- Li Ji-hong, Liu Zhong-jian, Salazar G. A., Bernhardt P., Perner H., Tomohisa Yu., Jin Xiao-hua, Chung Shih-wen, Luo Yi-bo. 2011. Molecular phylogeny of *Cypripedium* (Orchidaceae: Cypripedioideae) inferred from multiple nuclear and chloroplast regions. — *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 61: 308—320.
- Liu K., Muse S. V. 2005. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. — *Bioinformatics*. 21(3): 2128—2129.
- [Melnikova et al.] Мельникова А. Б., Андреева Е. В., Махинов А. Н., Филиппов Е. Г. 2007. Стационарные исследования *Cypripedium calceolus* в Большеехцирском заповеднике. В сб.: Матер. Междунар. конф. «Охрана и научные исследования на особо охраняемых природных территориях Дальнего Востока и Сибири». Хабаровск. С. 148—158.
- Murphy R. W., Sites J. W., Buth D. G., Hauffer C. H. 1990. Proteins I: Isozyme Electrophoresis. In: *Molecular Systematics*. Sunderland, P. 45—126.
- [Nei, Kumar] Ней М., Кумар С. 2004. Молекулярная эволюция и филогенетика. Киев. 418 с.
- Nei M., Tajima F., Tatenos Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. — *J. Mol. Evol.* 19: 133—170.
- Nilsson L. A. 1979. Anthecological studies on the Lady's Slipper, *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) — *Bot. Notiser*. 132(3): 329—347.
- Pedersen H. E., Rasmussen H. N., Kahandawala I., Fay M. F. 2012. Genetic diversity, compatibility patterns and seed quality in isolated populations of *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae). — *Conservation Genetics*. 13: 89—98.
- Perner H., Averyanov L. 1995. *Cypripedium shanxiense* Chen in Russian Far East. — *Die Orchidee*. 46(5): 196—197.
- Ramsay M. M., Dixon K. W. 2003. Propagation Science, Recovery and Translocation of Terrestrial Orchids. In: *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu. P. 259—288.
- [Red...] Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). 2008. М. С. 352—421, 786.
- Ridgway K. P., Duck J. M., Young J. P. W. 2003. Identification of roots from grass swards using PCR-RFLP and FFLP of the plastid trnL (UAA) intron. — *BMC Ecology*. 3: 8.
- Shurkhal A. V., Podogas A. V., Zhivotovsky L. A. 1992. Allozyme differentiation in the genus *Pi-mus*. — *Silvae Genetica*. 41: 105—109.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G. et al. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. — *Plant Mol. Biol.* 17: 1105. DOI:10.1007/BF00037152
- Tamura K., Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial-DNA in humans and chimpanzees. — *Mol. Biol. Evol.* 10: 512—526.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. — *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725—2729.
- Taniguchi H., Nakamura T., Mizukami H., Kawano S., Sano H., Katsumi M. 2001. Identity of *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) in Rebut Island: Comparative DNA analysis of related species. — *Genes Genet. Syst.* 76: 181—188.
- [Varlygina] Варлыгина Т. И. 2007. Охрана Орхидных (Orchidaceae) в России. — *Вестн. Тверского ГУ. Сер. Биология и экология*. 7(35): 70—74.
- Varlygina T. I. 2008. Species protection. In: *Orchids of Russia and adjacent countries (within the borders of the former USSR)*. Liechtenstein. P. 107—116.
- Wallace L. E., Martha A. 2000. Case contrasting allozyme diversity between northern and southern populations of *Cypripedium parviflorum* (Orchidaceae): Implications for Pleistocene refugia and taxonomic boundaries. — *Systemic Botany*. 25: 281—296.

White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York. P. 315—322.

Wu Fu-Hui, Chan Ming-Tsair, Liao De-Chih, Hsu Chen-Tran, Lee Yi-Wei, Daniell H., Duvall M. R., Lin Choun-Sea. 2010. Complete chloroplast genome of *Oncidium* Gower Ramsey and evaluation of molecular markers for identification and breeding in Oncidiinae. — BMC Plant Biology. 10:68. DOI: 10.1186/1471-2229-10-68

© E. V. Andronova,¹ Ed. M. Machs,¹ E. G. Filippov,² M. P. Raiko,³
Yung-I Lee,⁴ L. V. Averyanov¹

PHYLOGEOGRAPHY OF THE GENUS *Cypripedium* (ORCHIDACEAE) TAXA IN RUSSIA

¹ Komarov Botanical Institute RAS

Prof. Popov Str., 2, St. Petersburg, 197376, Russia

E-mail: elena.andronova@mail.ru; av_leonid@mail.ru; edw.mach@gmail.com

² Botanical Garden of Ural Branch RAS

8 Marta Str., 202a, Yekaterinburg, 620144, Russia

E-mail: filorch@mail.ru

³ University of California, San Diego, CA, USA

E-mail: mike.rayko@gmail.com

⁴ National Museum of Natural Science, Taichung, Taiwan

E-mail: leeyungi@mail.nmns.edu.tw

The article presents the results of the study of the polymorphism in the genus *Cypripedium* based on allozyme analysis and the *trnL-trnF* region of chloroplast DNA, and intra-genomic polymorphism based on 454 sequencings of *ITS1* regions of nuclear gene ribosomal RNA.

Allozyme analysis was performed using 10 gene loci in samples from the populations of the Transbaikial, Central and Western Siberia, the Urals and the European Russia. This work complemented previously obtained data on populations from the southern Russian Far East. It has been confirmed that the allelic compositions of the *6-PGD*, *NADHD*, *GDH*, *ADH*, *GOT-1* and *PGI* loci are diagnostic for *C. calceolus* and *C. macranthos* species; *C. × ventricosum* specimens are *C. calceolus* × *C. macranthos* hybrids, *C. shanxiense* specimens are homozygous for all 10 loci studied, and the monomorphy is a diagnostic character for the given taxon.

It was shown that the allelic composition of *PGI* and *SKDH* loci in *C. calceolus* varies in western and eastern parts of the range. Alleles missing in *C. calceolus* from the western part of the range were encountered in its eastern part with a high frequency. Thus, allele No. 6 in the *PGI* locus and allele No. 4 in the *SKDH* locus was found in *C. calceolus* at a frequency of 28—41 % and 55—68 %, respectively, in the southern Far East, and at a frequency of 0—15 % and 17—62 % in the Transbaikial, and in *C. shanxiense* they were in a homozygous state. These alleles were not found in populations of *C. calceolus* from the Central and Western Siberia, the Urals and the European Russia.

Thus, the study confirmed the view that the specific allelic structures of *PGI* and *SKDH* loci in *C. calceolus* populations are found only in the possible hybridization zone with *C. shanxiense* (in the regions of the concurrent growth of the two species and in adjacent areas). Based on the allele frequencies, we calculated the Nei genetic distances D_A and built UPGMA dendrogram. We showed that the plants of *C. calceolus* in Russia form two groups, and the border between them passes through the Transbaikial.

Morphological analysis revealed that the large number of individuals with atypical traits (a flower with a brown lip) and features of reproductive biology (facultative self-pollination) occur in the populations of *C. calceolus* growing in the southern Primorye, Khabarovsk and Transbaikial Territories. There is a genetic instability in the formation of pollen and seeds and, as a consequence, a decrease in seed production.

The identified atypical morphological and genetic features in *C. calceolus* (based on allozyme analysis), which were observed only in plants in the overlapping range with *C. shanxiense*, were in good agreement with the assumption of interspecific introgressive hybridization between these taxa. It was suggested that there is an interspecies introgressively hybrid complex in the zone of overlapping of the *C. calceolus* and *C. shanxiense* ranges in the Transbaikial, Khabarovsk and Primorye Territories, where hybrids (*C. calceolus* × *C. shanxiense*) predominate, and the number of individuals of parental species is comparatively small. One of the parental species, *C. shanxiense*, is among the rarest species of the genus, and is characterized by obligate autogamy, which provides biological isolation of this taxon from the closely related species *C. calceolus*. Plants of the second parent species, *C. calceolus*, are perhaps even more rare in this

area, and the plants morphologically similar to *C. calceolus* are in fact hybrids of *C. calceolus* × *C. shanxiense*.

To confirm this hypothesis, a study of intragenomic polymorphism was carried out using the 454 sequencing technology. We sequenced *ITS1* regions of gene 35S ribosomal RNA and *trnL-trnF* region of chloroplast DNA.

Analysis of the *ITS1* region in 16 *C. calceolus* samples has shown that some of them have an intra-genomic polymorphism at position 320 (the position is hereinafter denoted according to a similar reference in the reference sequence of *C. calceolus* from the GenBank. In three samples, sequences were similar to the reference, in one sample prevailed sequences with C to T substitution. Analysis of the *ITS1* region of 7 samples of *C. shanxiense* (4 samples from Transbaikal, 2 from Sakhalin, 1 from Primorye) has shown that in positions 268 and 276 there are G to T substitution, and at position 320 — C to T.

As it turned out, replacements in positions 268 and 276 are specific for this taxon, and there is an intra-genomic polymorphism of these positions. So, samples from the Transbaikal differed from the reference in positions 268 and 276 in 50—79 % of reads, from Primorye — in 85—87 %, and from Sakhalin 57—73 %. Analysis of the *ITS1* region of 5 samples of *C. macranthon* has shown that they differ from the reference at positions 269, 320 and 352, with the substitutions C to T. In positions 269 and 352 they also differ from *C. calceolus* and *C. shanxiense*. Analysis of the *ITS1* region of 11 samples of *C. × ventricosum* has shown that there is polymorphism at positions 269 and 352, which distinguish the parent species *C. calceolus* and *C. macranthon*. The number of reads with changes in positions 269 and 352 ranged from 30 to 50 %. According to the results of the study, almost all *C. × ventricosum* samples are the first generation hybrids between *C. calceolus* and *C. macranthon*. These data are completely consistent with the allozyme analysis results. No hybrids between *C. macranthon* and *C. shanxiense* were found.

In two of the 11 analyzed samples of *C. × ventricosum* the studied region of chloroplast DNA resembled *C. calceolus* from the Transbaikal and Primorye, in all others it was identical to that of *C. macranthon*. Thus, the individuals of this hybrid taxon can be formed with participation of both *C. macranthon* and *C. calceolus* as female plants.

Although the studied samples of *C. calceolus* did not show any difference in the *ITS1* region, they were divided into 2 groups according to the chloroplast DNA. The nucleotide sequence of the studied chloroplast DNA region was identical in all the *C. shanxiense* and *C. calceolus* specimens from the Transbaikal and Primorye. However, when compared to the samples of *C. calceolus* collected in the Transbaikal Buryatia and to the west (Siberia, the Urals and the European Russia), there were significant differences in the presence of insertions / deletions at positions 457 and 516. The probable boundary between the groups of *C. calceolus* occurs in Transbaikal. These data are in good agreement with the results of allozyme analysis.

We analyzed 142 variants of *ITS1* sequences that were found in the genome of the analyzed samples with at least 5 % frequency and showed approximately 80 % of site variability. The analysis divided the variants into 33 groups, with two large clusters. It worth noting that the groups with identical *ITS1* variants were found in samples of different taxa. Variants of *C. calceolus* were found in 3 groups, always with the samples of *C. × ventricosum* and *C. shanxiense*. The variants of *C. shanxiense* were divided into 9 groups (6 of which are specific only for this taxon). *C. macranthon* variants are found in 10 groups, in almost all of them there are *C. × ventricosum* samples. Variants of *C. × ventricosum* were divided into 23 groups, they contain either samples of *C. calceolus* or *C. macranthon*. No group combining variants from both *C. calceolus* and *C. macranthon*, or both *C. shanxiense* and *C. macranthon*, was identified. The data obtained indicate that there is apparently no interspecific hybridization between *C. shanxiense* and *C. macranthon* in sympatric populations.

Based on these results, there are two different genetic lines of *C. calceolus* on the territory of Russia, which differ in the chloroplast DNA. The region of chloroplast DNA in one of the lineages of *C. calceolus* and *C. shanxiense* was identical, whereas the *ITS1* region of DNA in the representatives of the two taxa had significant differences. It was noted that the individuals of this *C. calceolus* lineage were found only in the localities of *C. shanxiense*.

The hybridization zone between *C. calceolus* and *C. shanxiense*, determined on the basis of the allelic composition of *PGI* and *SKDH* loci (by presence of the specific *C. shanxiense* alleles in *C. calceolus*) appears to be wider: it extends not only to the area of cuncurrent growth of the two taxa, but also to adjacent areas. This may be due to a gene flow carried through the transfer of pollen over longer distances compared with the dispersion of seeds. However, the exchange of genetic material between the taxa is very rare.

As it turned out, not all the hypotheses based on the data of the allozyme analysis were confirmed after the investigation of the intragenomic polymorphism of the *ITS1* region. For example, the difference in the allelic composition of the two allozyme loci *PGI* and *SKDH* in *C. calceolus* from the eastern and western parts of the range could be explained by the gene flow from *C. shanxiense*, which in sympatric populations can also occur in real time. However, in the study of intragenomic polymorphism of the *ITS1* region of DNA in *C. calceolus*, the replacement of specific *C. shanxiense* was very rare (no more than 1.5 % of all reads). This clearly indicates that the analyzed samples of *C. calceolus* (including two atypical spe-

cimens with a brown lip) are not the first generation hybrids. *C. shanxiense*, according to the allozyme analysis, is monomorphic in all 10 gene loci, which does not make it possible to attribute it to hybrids. But in this genome there were 13—50 % *ITS1* sequences identical to *C. calceolus*. According to these data, *C. shanxiense* could be attributed to interspecific hybrids, with the flow of genes from *C. calceolus*. However, the lack of polymorphism of allozyme loci in *C. shanxiense* suggests that all the samples (even those where the *C. calceolus*-specific *ITS1* fraction was 50 %) are also not the first generation hybrids. Taking into account both the allozyme analysis data and the results of the intragenomic polymorphism analysis, it can be concluded that at present there are no facts confirming the hybridization between *C. shanxiense* and *C. calceolus* in sympatric populations. Based on the results of the study, it is possible to suggest the hybridogenic origin of both *C. shanxiense* and the «eastern» race of *C. calceolus* spread from the Transbaikal to Primorye. Perhaps this *C. calceolus* race, characterized by frank phenotypic and genotypic features, should be considered as an independent, weakly morphologically expressed, latent taxon of a certain taxonomic rank.

Key words: *Cypripedium*, *C. macranthos*, *C. calceolus*, *C. × ventricosum*, *C. shanxiense*, allozyme analysis, method 454 of sequencing, intragenomic and interspecies polymorphism, *ITS1*, 18S rRNA, *trnL-trnF*, natural interspecific hybridization.

Acknowledgements

We thank the head of the laboratory E. E. Andronov, researcher A. I. Zhernakov and engineer-researcher A. A. Kichko of All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology (ARRIAM) for their help. Special thanks to the head of the laboratory of Biosystematics and Cytology, Komarov Botanical Institute RAS, A. V. Rodionov for critical comments during the preparation of the manuscript.

The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project N 12-04-01560); Programs of the Presidium of the Russian Academy of Sciences «Biodiversity of Living Systems. Biological Resources of Russia: Contemporary State and Problems of Development» (subprogram «Dynamics and Retention of Gene Pools»). 454 sequencing was performed at the Core Center «Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology» at ARRIAM.

REFERENCES

- Andronova E. V., Philippov E. G. 2007. Morphological peculiarities of flowers in autogamous plants of *Cypripedium calceolus* and *C. shanxiense* (Orchidaceae). — *Botanicheskii Zhurnal*. 92(3): 360—364. (In Russ.).
- Andronova E. V., Philippov E. G., Melnikova A. B., Averyanov L. V. 2007. Typical and deviated forms in populations of *Cypripedium calceolus* in the South of Khabarovsk and Primorye territories, their morphology and correlative quantity. — *Vestnik Tverskogo GU, Seria Biologia i Ecologia*. 7(35): 17—19. (In Russ.).
- Andronova E. V., Philippov E. G., Melnikova A. B. 2009. Ob osoboi geneticheskoi strukture populatsii *Cypripedium calceolus* L. v Khabarovsk and Primorye kraiaikh [About especial genetic structure of populations of *Cypripedium calceolus* in Khabarovsk and Primorye territories]. In: *Amur zapovednii. Trudy II regionalnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii*. Khabarovsk. P. 122—127. (In Russ.).
- Averyanov L. V. 1999. Genus *Cypripedium* (Orchidaceae) in the Russia. — *Turczaninowia*. 2 (2): 5—40.
- Brzosko E., Wróblewska A., Ratkiewicz M. 2002. Spatial genetic structure and clonal diversity of island populations of lady's slipper (*Cypripedium calceolus*) from the Biebrza National Park (northeast Poland). — *Molecular Ecology*. 11: 2499—2509.
- Case M. A. 1993. High levels of allozyme variation within *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) and low levels of divergence among its varieties. — *Systematic Botany*. 18: 663—677.
- Chung J. M., Park K. W., Park C. S., Lee S. H., Chung M. G., Chung M. Y. 2009. Contrasting levels of genetic diversity between the historically rare orchid *Cypripedium japonicum* and the historically common orchid *Cypripedium macranthos* in South Korea. — *Botanical Journal of the Linnean Society*. 160: 119—129.
- Cox A. 1995. The utility of 5S r-DNA in Phylogenetic Reconstructions: Development of the Polymerase Chain Reaction in Plant Systematics. Ph. D theses. University of Reading.

- Cox A. 1999. *Cypripedium*. Phylogenetics. In *Genera Orchidacearum*. Vol. 1. General Introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. New York. P. 120—123.
- Cribb P. 1997. The Genus *Cypripedium*. Portland. 301 p.
- Cribb P. 1999. *Cypripedium*. Distribution. In *Genera Orchidacearum*. Vol. 1. General Introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. New York. P. 115.
- Darwin Ch. 1950. Opylenie orkhidei nasekomymi. [The Fertilization of Orchids by insects]. *Sobranie sochinenii Ch. Darwin*. Moscow, Leningrad, C. 214—217. (In Russ.).
- Doyle J. J., Doyle J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. — *Focus*. 12 (1): 13—15.
- Eccarius W. 2009. Die Orchideengattung *Cypripedium*. Buergerl. 384 p.
- Edgar R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. — *Nucleic Acids Research*. 32(5): 1792—1797.
- Fay M. F., Bone R., Cook P., Kahandawala I., Greensmith J., Harris S., Pedersen H. Æ., Ingrouille M. J., Lexer C. 2009. Genetic diversity in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) with a focus on north-western Europe, as revealed by plastid DNA length polymorphisms. — *Annals of Botany*. 104: 517—525.
- Fay M. F., Cowan R. S. 2001. Plastid microsatellites in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae): genetic finger prints from herbarium specimens. — *Lindleyana*. 16: 151—156.
- Fay M. F., Cowan R. S., Leitch I. J. 2005. The effects of genome size on the quality and utility of AFLP fingerprints. — *Annals of Botany*. 95: 237—246.
- Fay M. F., Krauss S. L. 2003. Orchid conservation genetics in the molecular age. In: *Orchid conservation*. Kota Kinabalu. P. 91—112.
- Felsenstein J. 1988. Phylogenies and quantitative characters — *Annual Review of Ecology and Systematics*. 19: 445—471.
- Filippov E. G., Andronova E. V. 2011. Genetic Differentiation in Plants of the Genus *Cypripedium* from Russia Inferred from Allozyme Data. — *Russian J. Genetics*. 47(5): 538—545. DOI: 10.1134/S1022795411050061
- Filippov E. G., Andronova E. V. 2016. Genetic structure of the Russian *Cypripedium* populations (*C. calceolus*, *C. macranthos*, *C. shanxiense* and *C. × ventricosum*) inferred from allozyme data. In: *Problems of Botany of South Siberia and Mongolia. Proceedings of the 15h International Scientific and Practical Conference*. Barnaul. P. 137—142. (In Russ.).
- Hedrén M. 2003. Plastid DNA variation in the *Dactylorhiza incarnate/maculata* polyploid complex and the origin of allotetraploid *D. sphagnicola* (Orchidaceae). — *Molecular Ecology*. 12: 2669—2680.
- Hedrén M., Nordström S., Persson H. A., Pedersen H. E., Hansson S. 2007. Patterns of polyploid evolution in Greek marsh orchids (*Dactylorhiza*; Orchidaceae) as revealed by allozymes, AFLPS, and plastid DNA data. — *American Journal of Botany*. 94:1205—1218.
- Izawa T., Kawahara T., Takahashi H. 2007. Genetic diversity of an endangered plant, *Cypripedium macranthos* var. *rebutense* (Orchidaceae): background genetic research for future conservation. — *Conservation Genetics*. 8: 1369—1374.
- Jo S., Ochiai M., Furuta K., Yagi K. 2005. Genetic Analysis of genus *Cypripedium*, found in Northern Japanese Island and Related species endemic in northern China — *Japan. Soc. Hort. Sci.* 74(3): 234—241.
- Knyasev M. S., Kulikov P. V., Knyaseva O. I., Semerikov V. L. 2000a. About interspecific hybridization in northern eurasian *Cypripedium* (Orchidaceae) and taxonomic status of *C. ventricosum*. — *Botanicheskii Zhurnal*. 85(5): 94—102. (In Russ.).
- Knyasev M. S., Kulikov P. V., Knyaseva O. I., Semerikov V. L. 2000b. Interspecific hybridization in northern eurasian *Cypripedium*: morphometric and genetic evidence of the hybrid origin of *C. ventricosum*. — *Lindleyana*. 15(1): 15—26.
- Kocyan A., Qiu Y.-L., Endress P., Conti E. 2004. A phylogenetic analysis of Apostasioideae (Orchidaceae) based on ITS, trnL-F and matK. — *Plant Syst. Evol.* 247: 203—213.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. — *Molecular Biology and Evolution*. 33: 1870—1874.
- Li Ji-hong, Liu Zhong-jian, Salazar G. A., Bernhardt P., Perner H., Tomohisa Yu., Jin Xiao-hua, Chung Shih-wen, Luo Yi-bo. 2011. Molecular phylogeny of *Cypripedium* (Orchidaceae: Cypripedioideae) inferred 3 from multiple nuclear and chloroplast regions. — *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 61: 308—320.
- Liu K., Muse S. V. 2005. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. — *Bioinformatics*. 21(3): 2128—2129.
- Melnikova A. B., Andronova E. V., Makhinov A. N., Filippov E. G. 2007. *Statsionarnye issledovaniya Cypripedium calceolus v Bolshekhkhtyrskom zapovednike* [The investigation of *Cypripedium calceolus* on permanent experimental plots in Bolshekhkhtyrskiy Reserve]. In: *Okhrana i nauchnye issledovaniya*

- vaniya na osobo okhranyaemykh prirodnkh territoriyakh Dalnego Vostoka i Sibiri. Materialy mezhdunarodnoi konferentsii. Khabarovsk. P. 148—158. (In Russ.).
- Murphy R. W., Sites J. W., Buth D. G., Haufler C. H. 1990. Proteins I: Isozyme Electrophoresis. In: Molecular Systematics. Sunderland. P. 45—126.
- Nei M., Kumar S. 2004. Molecularnaia evolyutsiya i filogenetika [Molecular Evolution and Phylogenetics]. Kiev. 418 p. (In Russ.).
- Nei M., Tajima F., Tatenko Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. — J. Mol. Evol. 19: 133—170.
- Nilsson L. A. 1979. Anthecological studies on the Lady's Slipper, *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) — Bot. Notiser. 132(3): 329—347.
- Pedersen H. E., Rasmussen H. N., Kahandawala I., Fay M. F. 2012. Genetic diversity, compatibility patterns and seed quality in isolated populations of *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae). — Conservation Genetics. 13: 89—98.
- Perner H., Averyanov L. 1995. *Cypripedium shanxiense* Chen in Russian Far East. — Die Orchidee. 46(5): 196—197.
- Ramsay M. M., Dixon K. W. 2003. Propagation Science, Recovery and Translocation of Terrestrial Orchids. In: Orchid Conservation. Kota Kinabalu. P. 259—288. (In Russ.).
- Red data book of nature of the Russian Federation (plants and fungi). 2008. Moscow. P. 352—421, 786. (In Russ.).
- Ridgway K. P., Duck J. M., Young J. P. W. 2003. Identification of roots from grass swards using PCR-RFLP and FFLP of the plastid trnL (UAA) intron. — BMC Ecology. 3: 8.
- Shurkhal A. V., Podogas A. V., Zhivotovsky L. A. 1992. Allozyme differentiation in the genus *Pinus*. — Silvae Genetica. 41: 105—109.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G. et al. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. — Plant Mol Biol. 17: 1105. DOI:10.1007/BF00037152
- Tamura K., Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial-DNA in humans and chimpanzees. — Mol. Biol. Evol. 10: 512—526.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. — Molecular Biology and Evolution. 30: 2725—2729.
- Taniguchi H., Nakamura T., Mizukami H., Kawano S., Sano H., Katsumi M. 2001. Identity of *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) in Rebun Island: Comparative DNA analysis of related species. — Genes Genet. Syst. 76: 181—188.
- Varlygina T. I. 2007. Conservation of Orchids (*Orchidaceae*) in Russia. — Vestnik Tverskogo GU, Seria Biologia i Ecologia. 7(35): 70—74. (In Russ.).
- Varlygina T. I. 2008. Species protection. In: Orchids of Russia and adjacent countries (within the borders of the former USSR). Liechtenstein. P. 107—116.
- Wallace L. E., Martha A. 2000. Case contrasting allozyme diversity between northern and southern populations of *Cypripedium parviflorum* (Orchidaceae): Implications for Pleistocene refugia and taxonomic boundaries. — Systemic Botany. 25: 281—296.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York. P. 315—322.
- Wu Fu-Hui, Chan Ming-Tsair, Liao De-Chih, Hsu Chen-Tran, Lee Yi-Wei, Daniell H., Duvall M. R., Lin Choun-Sea. 2010. Complete chloroplast genome of *Oncidium* Gower Ramsey and evaluation of molecular markers for identification and breeding in Oncidiinae. — BMC Plant Biology. 10:68. DOI: 10.1186/1471-2229-10-68