

УДК 582.594:57.088.1(571.61)

DOI: 10.14258/pbssm.2021085

Предварительные результаты изучения генетического разнообразия *Malaxis monophyllos* (Orchidaceae) в Амурской области

Preliminary results of studying the genetic diversity of *Malaxis monophyllos* (Orchidaceae) in the Amur region

Терентьева Е. И., Дегтярева Г. В., Ефимов С. В., Варлыгина Т. И.

Terentieva E. I., Degtjareva G. V., Efimov S. V., Varlygina T. I.

Ботанический сад Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, г. Москва, Россия.

E-mail: el.terenteva@mail.ru, degavi@mail.ru, efimov-msu@yandex.ru, tat-varlygina@yandex.ru

Botanical Garden, Moscow State University, Moscow, Russia

Реферат. Для исследования *Malaxis monophyllos* (L.) Sw. был собран материал в природных популяциях вида на территории Амурской области, а также из гербарных коллекций этого же региона (МВ и МНА). У растений наблюдалась высокая степень variability морфологических признаков. Прежде всего, обращали внимание на число листьев, а также учитывали: высоту растений и цветоносов, число и размер листьев, число цветков. Целью проведенной работы стали сравнительные молекулярные исследования особей вида с различными морфологическими характеристиками. В качестве молекулярного маркера были выбраны внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2) участка 18S–26S ядерной рибосомной ДНК. На молекулярно-филогенетическом дереве проанализированные растения *M. monophyllos* образуют кладу с высокой апостериорной вероятностью (1.0). ITS последовательности анализируемых образцов не идентичны, но уровень генетической дифференциации нуклеотидных последовательностей составил 0,12 %, что соответствует изменчивости в пределах вида. Это подтверждает принадлежность образцов к данному виду, несмотря на широкий диапазон изменчивости морфологических признаков. Ввиду большого ареала вида для получения достоверных результатов необходимо проанализировать образцы растений из других регионов. В генетический анализ необходимо добавить участки из ядерного и пластидного геномов.

Ключевые слова. Молекулярные исследования, морфологические признаки, особо охраняемая природная территория, филогения, ITS.

Summary. For research the plants of *Malaxis monophyllos* (L.) Sw. were sampled in the Amur region and taken from the herbarium collections of the same region (MW and MNA). The plants of *M. monophyllos* have a high degree of variability of quantitative morphological characters. First, we paid attention to the number of leaves, the height of plants and peduncles, the number and size of leaves and the number of flowers. Therefore, the purpose of this work was comparative molecular studies of individuals of the same species with different morphological characteristics. Internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) of the 18S–26S region of nuclear ribosomal DNA were chosen as a molecular marker. On the molecular phylogenetic tree, the analyzed *M. monophyllos* plants form clade with a high posterior probability (1.0). The ITS sequences of the analyzed samples are not identical. The level of genetic differentiation of nucleotide sequences was 0.12 %, which corresponds to the variability within the species, which confirms the belonging of the analyzed samples to the same species. Since the species has a large area, it is necessary to analyze plant samples from other regions to obtain reliable results. The different regions of the nuclear and plastid genomes should be added to the genetic analysis.

Key words. Molecular-phylogenetic study, morphological traits, ITS, phylogeny, Protected Areas.

Введение. Объектом исследований стало растение *Malaxis monophyllos* (L.) Sw из сем. Orchidaceae (триба Malaxideae). Ареал вида голарктический, охватывает Европу, значительную часть Азии, северо-запад Сев. Америки. В России встречается в лесной зоне европейской части, на Урале и юге Сибири, в Горном Алтае, Забайкалье и Якутии. На Дальнем Востоке растет в Амурской обл., в Еврейской АО, Приморском, Хабаровском и Камчатском краях, в Магаданской и Сахалинской областях.

Численность вида сокращается, особенно в европейской части. Он включен в Красные книги 35 регионов России, исчез в Калининградской и Тульской областях (Вахрамеева и др., 2014).

Malaxis monophyllos – растение с тонким корневищем и фотосинтезирующей псевдобульбой. Стебель тонкий, 8–30 (40) см высоты, с одним, редко с двумя (очень редко – тремя) зелеными листьями, расположенными в нижней части стебля. Листовая пластинка 5–10 см длиной, 1,2–5 см шириной, широкоэллиптическая, туповатая, суженная в длинный черешок, объемлющий стебель. Второй лист, если он присутствует, обычно значительно меньше. Соцветие – узкая рыхлая кисть, 3–14 см длиной из мелких бледно-зеленых цветков на скрученных цветоножках. Листочки околоцветника 2–3 мм длиной, наружные ланцетные или яйцевидно-ланцетные, на верхушке суженные, внутренние значительно уже их, узколинейные. Губа широкояйцевидная при основании, немного короче других листочков околоцветника, по краю мелкозубчатая, на верхушке заостренная, с пятью жилками, обращенная вверх (Невский, 1935; Delforge, 1995; Вахрамеева и др., 2014).

M. monophyllos встречается на сырых лугах, опушках лесов, болотах в хвойных и лиственных лесах, на торфяниках и болотах. Любит влажные, нейтральные или слабощелочные почвы, растет в полутени и чаще в условиях умеренной влажности (Delforge, 1995; Vakhrameeva et al., 2008; Вахрамеева и др., 2014).

Отмечают две формы этого вида, исходя из размеров растений – *f. monophyllos* (растения до 10 см высотой, в соцветии менее 30 цветков) и *f. robusta* (высота более 10 см, в соцветии более 30 цветков) (Procházka, Velíšek, 1983). Изредка можно встретить двулистную форму, что послужило основанием для выделения самостоятельного вида *Malaxis diphylla* Cham. Однако было показано, что одна и та же особь в разные годы может образовать то один, то два листа (Füller, 1966).

По нашим наблюдениям в евро-сибирской части ареала вида более характерна однолистная форма растений, а в дальневосточном регионе чаще встречаются растения с двумя листьями. Поэтому целью проведенной работы стали сравнительные молекулярные исследования особей вида с различными морфологическими характеристиками (с 1 и 2-мя листьями, разной высоты и с разными размерами листьев) из трех районов Амурской области.

Материалы и методы. Материал для исследований был собран во время ботанической экспедиции сотрудников Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова в июле 2018 г. в Амурской области на охраняемых природных территориях (ООПТ): в Муравьевском парке устойчивого развития (УР) в Тамбовском р-не, на двух участках государственного природного заповедника «Хинганский» (ГПЗ) в Архаринском р-не и в Зейском ГПЗ в Зейском р-не. В анализ также были включены 4 образца *M. monophyllos* из гербарных коллекций MW и MHA этих же районов.

Для молекулярно-филогенетического анализа выделение ДНК, амплификация и секвенирование участка (ITS1–5,8S–ITS2) проводилось согласно методике, описанной в работе С. М. Valiejo-Roman и др. (2002). В ходе исследования нами было получено 14 ITS последовательностей *M. monophyllos*. Дополнительно для сравнения из базы данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) были привлечены нуклеотидные последовательности (ITS1–5,8S–ITS2) всех имеющихся образцов *M. monophyllos* (4 образца), 5-ти видов рода *Malaxis* (*M. tenuis* Rchb. f., *M. brachypoda* Fernald, *M. spicata* Sw., *M. soulei* L. O. Williams, *M. corymbosa* S. (Watson) Kuntze), которые по литературным данным входят в одну кладу с *M. monophyllos* (Ya et al., 2021), а также 5-ти видов рода *Liparis* (*L. loeselii*(L.) Rich, *L. japonica* (Miq.) Maxim., *L. krameri* Franch. et Savat., *L. kumokiri* F. Maek., *L. makinoana* Schlechter) из трибы Malaxideae и род *Dendrobium* Swartz из трибы Dendrobieae, которая является сестренской кладой к Malaxideae (Cameron, 2005; Ya et al., 2021). Всего в анализ было включено 36 (ITS1–5,8S–ITS2) нуклеотидных последовательностей.

Результаты. У растений, собранных в природе и у гербарных образцов был исследован диапазон изменчивости морфологических признаков. Высота однолистных особей колебалась от 15 до 31 см, длина соцветия 11–20 см, длина листа – 3–9 см. У двулистных экземпляров отмечены: высота – 27–40 см, длина соцветия – 19–30 см; длина нижнего листа – 5,5–13 см; длина верхнего листа – 2,5–6,2 см.

Нуклеотидные последовательности анализируемых образцов выравнивались с помощью программы MUSCLE (Edgar, 2004). Просмотр результатов выравнивания последовательностей и последующая ручная доработка выполнялась в программе BioEdit version 5.0.9. (Hall, 1999). Набор из 36 выровненных нуклеотидных последовательностей (ITS1–5,8S–ITS2) содержит 743 позиции, из которых 430 – консервативные, 172 – парсимонно-информативные и 141 – парсимонно-неинформативные.

на значительный диапазон изменчивости морфологических признаков, генетически проанализированные образцы оказались относительно однородны.

Наши результаты хорошо согласуются с данными Е. Jermakowicz и др. (2017), которые были получены методом AFLP (амплификация полиморфных по длине фрагментов ДНК). Они также показали низкое генетическое разнообразие образцов *M. monophyllus*, собранных на территории Европы в разных биотопах, при высоком морфологическом полиморфизме.

Ввиду большого ареала вида для получения достоверных результатов необходимо проанализировать образцы растений из других регионов, поэтому наши выводы носят предварительный характер. Кроме того, в дальнейшем в генетический анализ необходимо добавить участки из ядерного и пластидного геномов.

ЛИТЕРАТУРА

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

Красная книга Амурской области: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных растений и грибов: официальный справочник / под ред. Сенчик А. В., Маликова Е. И. – Благовещенск: Изд-во Дальневосточного государственного аграрного университета, 2019. – 501 с.

Красная книга Российской Федерации. В 2 кн. / гл. ред. Трутнев Ю. П. / Кн. 1. Растения и грибы / отв. ред. Камелин Р. В., Новиков В. С. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 855 с.

Невский С. А. Род *Malaxis* L. С. Rich. // Флора СССР. – Л.: Изд-во АН СССР, 1935. – Т. 4. – С. 599–600.

Cameron K. M. Leave it to the leaves: a molecular phylogenetic study of Malaxideae (Epidendroideae, Orchidaceae) // *American Journal of Botany*, 2005. – Vol. 92. – P. 1025–1032.

Delforge P. *Orchids of Britain and Europe*. – London: Harper Collins Publishers, 1995. – 480 p.

Edgar R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucleic Acids Research*, 2004. – Vol. 32, № 5. – P. 1792–1797.

Füller F. *Malaxis, Hammarbya, Liparis*. Die Orchideen Deutschland Die // Neue Brehm-Bücherei. – Wittenberg Lutherstadt, 1966. – 48 s.

Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucleic Acids Symposium*. Oxford, 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.

Jermakowicz E., Brzosko E., Kotowicz J., Wroblewska A. Genetic diversity of orchid *Malaxis monophyllus* over European range as an effect of population properties and postglacial colonization // *Polish Journal of Ecology*, 2017. – Vol. 65. – P. 69–86.

Page R. D. M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers // *Computer applications in the biosciences*, 1996. – Vol. 12, № 4. – P. 357–358.

Procházka F., Velíšek V. *Orchideje naší přírody*. – Praha: Academia, 1983. – 279 s.

Ronquist F. R., Huelsenbeck J. P. Mr. BAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics*, 2003. – Vol. 19, № 12. – P. 1572–1574.

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

Vakhrameeva M. G., Tatarenko I. V., Varlygina T. I., Torosyan G. K., Zagulskii M. N. *Orchids of Russia and adjacent countries*. – Ruggell: A. R. G. Gantner Verlag K. G., 2008. – 690 p.

Valiejo-Roman C. M., Terentieva E. I., Samigullin T. H., Pimenov M. G. Relationships among genera in Saniculoideae (Umbelliferae) and connected taxa inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA // *Taxon*, 2002. – Vol. 51, № 4. – P. 685–701.

Ya, J.-D., Lin, D.-L., Han, Z.-D., Cai, L., Zhang, Z.-R., He, D.-M., Jin, X.-H., Yu, W.-B. Three new species of *Liparis* s. l. (Orchidaceae: Malaxideae) from Southwest China based on morphological characters and phylogenetic evidence // *Plant Diversity*, 2021. – Vol. 762, № 3 – P. 290–312.