

БОТАНИКА

УДК 582.594.2(470.13)
doi: 10.17223/19988591/43/3

И.А. Кириллова, Д.В. Кириллов, Д.М. Шадрин

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия

Морфологический и молекулярно-генетический подходы к изучению рода *Dactylorhiza* в Республике Коми

Работа выполнена при поддержке Комплексной программы фундаментальных исследований Уральского отделения Российской академии наук на 2018 год, проект № АААА-А17-117121270031-2 (18-4-4-23) «Генетическое разнообразие редких видов Европейского северо-востока России: инвентаризация и прогноз устойчивости к глобальным изменениям климата» и частично гранта РФФИ № 16-44-110167 p_a

Представлены результаты изучения видов рода *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski на территории Республики Коми. На основании анализа маркерных последовательностей ДНК (ITS1-5.8S-ITS2) и 19 морфометрических признаков 480 растений изучено 16 ценопопуляций видов рода в регионе. Совместное использование морфологического и молекулярно-генетического подходов позволило подтвердить произрастание на территории Республики Коми 4 видов: *Dactylorhiza fuchsii* (Druce) Soó, *D. maculata* (L.) Soó, *D. incarnata* (L.) Soó s. l. (включая *D. cruenta* (O. F. Muell) Soó) и *D. traunsteineri* (Saut.) Soó. *D. cruenta*, по-видимому, стоит рассматривать как подвид (или разновидность) *D. incarnata*. Приведены морфологические признаки, позволяющие разделить виды внутри рода, ими стали ширина губы и шпорца, длина прицветника, ширина нижних листьев. Получены новые молекулярно-филогенетические данные для этих видов. Вопрос о наличии *D. baltica* (Klinge) Orlova на территории региона остается открытым и требует дополнительных исследований.

Ключевые слова: *Orchidaceae*; морфометрия; систематика; *Dactylorhiza fuchsii*; *D. maculata*; *D. incarnata*; *D. baltica*; *D. traunsteineri*; ITS.

Введение

Род *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski (пальчатокоренник), несмотря на высокую изученность, до сих пор остается одним из самых сложных в таксономическом отношении [1]. Это связано с относительной молодостью видов этого рода, способностью к гибридизации, высокой амплитудой изменчивости признаков. Ботаники выделяют в нем от 12 до 75 видов, в зависимости от объема их понимания [2]. Большинство видов рода принадлежит к *Dactylorhiza incarnata/maculata*, полиплоидному комплексу, который состоит из

трех больших групп: *D. incarnata* s. l., *D. maculata* s. l. и аллотетраплоидов – гибридов между двумя первыми группами [3–6].

В последнее время вышло большое количество работ, посвященных исследованию рода *Dactylorhiza* молекулярно-филогенетическими и морфологическими методами [7–11], в основном на зарубежном материале. Несколько статей, опубликованных в 2000-х гг. [12–14], осветили проблемы, характерные для российских представителей этого рода. Ими стали отношения внутри комплекса *D. maculata* s. l., таксономический статус аллотетраплоидов (группа *D. traunsteineri* s. l., *D. baltica*) и видов группы *D. incarnata* s. l. Выходят отдельные статьи по систематике рода *Dactylorhiza* в России [15–18 и др.], они охватывают в основном центральный и северо-западный округа европейской части, а также некоторые регионы Сибири. На Европейском Северо-Востоке такие работы не проводились. К сожалению, объем выборки пальчатокоренников для огромной территории России остается низким [16]. Поэтому любые исследования систематики этого сложного рода здесь актуальны. Кроме того, виды рода *Dactylorhiza* включены в списки охраняемых растений во всем мире и важной задачей становится правильная их идентификация, особенно в связи с переизданием региональных Красных книг и составлением списков редких и охраняемых таксонов.

Цель работы – уточнение таксономического состава рода *Dactylorhiza* на территории Республики Коми на основании результатов морфолого-популяционного и молекулярно-генетического исследований.

Материалы и методика исследования

Основная трудность при определении ряда видов рода *Dactylorhiza* заключается в перекрывании признаков у особей разных таксонов из-за большого размаха изменчивости. Поэтому важно рассматривать признаки не отдельных растений, а их естественных групп – ценопопуляций. Это позволит более точно выявить характерные признаки и избежать ошибок отнесения отдельных уклоняющихся особей к тому или иному таксону. Сравнение признаков, присущих всей ценопопуляции, выявление групп сходных и близких ценопопуляций дает возможность более точно определить границы и ранг отдельных таксонов. Конечно, этот подход не является универсально принятым, и у него есть свои ограничения. Таким образом, одна из задач работы – уточнение таксономического состава рода *Dactylorhiza* на основе данных морфолого-популяционного изучения, выделение характерных признаков отдельных видов.

Исследования проведены в 2015–2016 гг. на территории Республики Коми. Обследовано 16 ценопопуляций видов рода *Dactylorhiza* (табл. 1). В каждой ценопопуляции случайным образом отобрано по 30 генеративных растений (в общей сложности 480 особей). У всех растений измерено по 19–22 морфометрических признака (табл. 2, рис. 1). Учитывали признаки

Таблица 1 [Table 1]

Местонахождения изученных ценопопуляций видов рода *Dactylorhiza* в Республике Коми
[Locations of the studied *Dactylorhiza* ceno-populations (CP) in the Komi Republic]

№ ЦП [No CP]	Вид [Species]	Местонахождение [Location]	Географические координаты [Geographic coordinates]	Местообитание [Habitat]	№ образца [No specimen]	Genbank ID
1	<i>Dactylorhiza maculata</i>	Окр. дер. Слудка [Vicinity of Sludka village]	N61°55'35,50" E50°13'14,49"	Кустарничково-разнотравно-сфагновое болото с осной [Dwarf shrub herb sphagnum mire with pine]	DmacIK0101	MH016576
2	<i>D. maculata</i>	Пойма р. Тылаю [Floodplain of the Tylayu river]	N61°33'55,08" E50°40'29,10"	Заболоченный еловый кустарничково-травяно-сфагново-зеленомошный лес [Overlogged spruce dwarf shrub herb sphagnum-green moss forest]	DmacIK0302	MH016577
3	<i>D. maculata</i>	Окр. дер. Коччойяг [Vicinity of Kochchoyag village]	N61°57'17,78" E50°43'51,25"	Сосняк разнотравно-кустарничково-сфагновый [Pine herb dwarf shrub sphagnum forest]	DmacIK0503 DmacIK0603	MH016578 MH016579
4	<i>D. maculata</i>	Пр. берег р. Шугор [Right bank of the Shugor river]	N64°13'22,90" E58°33'17,20"	Пушицево-сфагновое болото [Eriophorum sphagnum mire]	DmacIK0704 DmacIK0804	MH016580 MH016581
5	<i>D. fuchsii</i>	Пойма р. Сысола [Floodplain of the Sysola river]	N61°33'38,71" E50°38'27,13"	Сосново-еловый чернично-зеленомошный лес [Pine-spruce bilberry green moss forest]	DfucIK0905 DfucIK1005	MH016582 MH016583
6	<i>D. fuchsii</i>	Пойма р. Тылаю [Floodplain of the Tylayu river]	N61°34'28,34" E50°40'29,91"	Сосново-ивово-ольховый разнотравный лес [Pine willow alder herb forest]	DfucIK1106 DfucIK1206	MH016584 MH016585
7	<i>D. fuchsii</i>	Пойма р. Сысола [Floodplain of the Sysola river]	N61°33'17,30" E50°39'29,80"	Сосняк разнотравно-кустарничково-зеленомошный [Pine herb dwarf shrub green moss forest]	DfucIK1307 DfucIK1407	MH016586 MH016587

Продолжение табл. 1 [Table 1 (cont.)]

№ ЦП [No CP]	Вид [Species]	Местонахождение [Location]	Географические координаты [Geographic coordinates]	Местообитание [Habitat]	№ образца [No specimen]	Genbank ID
8	<i>D. fuchsii</i>	Пр. берег р. Шугор [Right bank of the Schugor river]	N64°14'25,10" E58°32'45,00"	Разнотравный бечевник [Herb towpath community]	DfucIK1608	MH016588
9	<i>D. fuchsii</i>	Пойма р. Вазелью [Floodplain of the Vazhel'yu river]	N61°39'01,25" E50°40'17,50"	Вахтово-осоково-гипново- сфагновое болото с елью [Menyanthes carex hyr- num-sphagnum mire]	DfucIK1709	MH016589
10	<i>D. maculata</i>	Пойма р. Емваль [Floodplain of the Emval river]	N61°47'34,20" E50°36'48,10"	Сосняк вахтово-сфаг- новый с березой [Pine menyanthes sphag- num mire with birch]	DmacIK1910 DmacIK2010	MH016590 MH016591
11	<i>D. baltica</i>	Пр. берег р. Шугор [Right bank of the Schugor river]	N64°14'59,90" E58°31'54,00"	Болото разнотравно-моховое кочечное [Herb hyrnum-sphagnum mire]	DbaltIK2111 DbaltIK2211	MH016592 MH016593
12	<i>D. baltica</i>	Пр. берег р. Шугор [Right bank of the Schugor river]	N64°14'26,50" E58°32'56,00"	Ключевое осоково-травя- но-гиново-сфагновое [Carex herb hyrnum-sphagnum mire]	DactIK2312	MH016594
13	<i>D. traunsteineri</i>	Пр. берег р. Шугор [Right bank of the Schugor river]	N64°11'22,00" E58°33'17,00"	Вахтово-гиново-сфаг- новое болото [Menyanthes hyrnum-sphagnum mire]	DtrauIK2513 DtrauIK2613	MH016595 MH016596
14	<i>D. traunsteineri</i>	Пойма р. Тылаю [Floodplain of the Tylyayu river]	N61°35'33,95" E50°37'28,07"	Вахтово-осоково-гипновое болото [Menyanthes carex hyrnum mire]	DtrauIK2714 DtrauIK2814	MH016597 MH016598
15	<i>D. incarnata</i>	Пр. берег р. Шугор [Right bank of the Schugor river]	N64°11'13,00" E58°32'45,30"	Разнотравно-гипновое болото [Herb-hyrnum mire]	DincaIK2915	MH016599
16	<i>D. cruenta</i>	Пойма р. Вазелью [Floodplain of the Vazhel'yu river]	N61°39'22,93" E50°39'57,23"	Вахтово-гиново-сфаг- новое болото [Menyanthes hyrnum-sphagnum mire]	DeruIK3116 DeruIK3216	MH016600 MH016601

Окончание табл. 1 [Table 1 (end)]

№ ЦП [No CP]	Вид [Species]	Местонахождение [Location]	Географические координаты [Geographic coordinates]	Местообитание [Habitat]	№ образца [No specimen]	Genbank ID
17	<i>Coeloglossum viride</i>	Пойма р. Щугор [Floodplain of the Schugor river]	N64°11'38,14" E58°01'54,48"	Вахтово-гипново-сфагновое болото [Menyanthes hupium-sphagnum mire]	CvirIK3317	MN016602
18	<i>Gymnadenia conopsea</i>	Пойма р. Вазелью [Floodplain of the Vazhel'yu river]	N61°37'50,5" E50°40'49,8"	Еловый вахтово-осоково- гипново-сфагновый лес [Spruce menyanthes carex hupium-sphagnum mire]	GconIK3417	MN016603

вегетативной и генеративной сфер. При исследовании генеративной сферы с каждого растения для измерений брали по два цветка из центральной части соцветия, их фиксировали на картон, затем сканировали и проводили измерения в программе Gimp 2. В последующем данные усредняли и использовали как показатели размеров частей цветка для отдельного растения.

Таблица 2 [Table 2]

Используемые морфологические признаки
[List of morphological parameters]

ВР [PH]	Высота растения [Plant height]
ДС [LI]	Длина соцветия [Length of inflorescence]
ЧЛ [NL]	Число листьев [Number of leaves]
Д1Л [L1L]	Длина первого (нижнего) листа [Length of the first (lower) leaf]
Ш1Л [W1L]	Ширина первого (нижнего) листа [Width of the first (lower) leaf]
Д1Ш [L1W]	Расстояние до наибольшей ширины первого (нижнего) листа [Position of maximal lower leaf width]
Д2Л [L1L]	Длина второго снизу листа [Length of the second leaf]
Ш2Л [W2L]	Ширина второго листа [Width of the second leaf]
Д2Ш [L2W]	Расстояние до наибольшей ширины второго листа [Position of maximal second leaf width]
ЧЦ [NF]	Число цветков [Number of flowers]
ЧЦ/ДС [NF/LI]	Плотность соцветия [Inflorescence density]
ДГ [LL]	Длина губы [Length of labellum]
ДВЛ [LUP]	Длина верхнего лепестка наружного круга околоцветника [Length of the upper petal of the outer circle of the perianth]
ДНЛ [LLP]	Длина нижнего лепестка наружного круга околоцветника [Length of the lower petal of the outer circle of the perianth]
ДШп [LS]	Длина шпорца [Length of spur]
ШШп [WS]	Ширина шпорца [Width of spur]
ДБ [LLL]	Длина боковой доли губы [Length of lateral lobe of the labellum]
ДО [LBS]	Длина от основания губы до выемки губы [Length from the base of labellum entrance to base of sinus]
ШБ [WLL]	Ширина боковой доли губы [Width of lateral lobe of the labellum]
ШГ [WL]	Ширина губы [Width of labellum]
ДПр [LB]	Длина прицветника [Length of bract]
ДЗ [LO]	Длина завязи [Length of ovary]
ДД=ДГ-ДО [LCL=LL-LBS]	Длина средней доли губы [Length of central lobe of the labellum]
ИГ=2×ДГ/ (ДО+ДБ) [IL=2×LL/ (LBS+LLL)]	Индекс формы губы [Labellum shape index]

Данные обработаны вариационно-статистическими методами с использованием пакетов MICROSOFT EXCEL 2010 (Microsoft, США), StatSoft STATISTICA 6.0 (США) и среды R (вер.3.4.2) (The R foundation). В тексте и таблицах приведены среднее арифметическое \pm стандартное отклонение, а также границы минимального и максимального значения. Проверку на нор-

мальность распределения выборок значений морфометрических параметров проводили с помощью W-теста Шапиро–Уилка. Поскольку в результате проверки у некоторых выборок выявлены отклонения от нормального распределения, для их сравнения использовали две группы методов: параметрические (t-критерий Стьюдента для выборок с нормальным распределением) и непараметрические (U-критерий Манна–Уитни для данных с отклонениями от нормального распределения). Наряду с одномерной статистикой применяли многомерные статистические методы – дискриминантный и кластерный анализы. Кластеризацию осуществляли на основании полученных в дискриминантном анализе квадратов расстояния Махаланобиса.

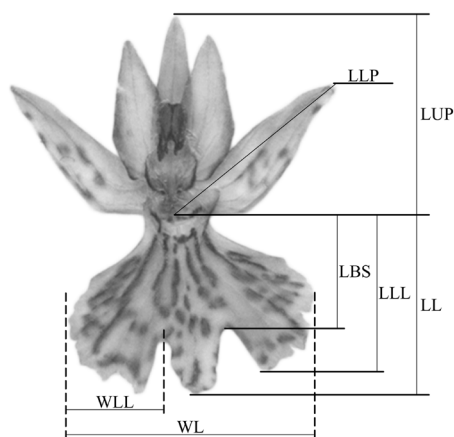


Рис. 1. Морфометрические признаки цветка видов рода *Dactylorhiza*.

Обозначения даны в табл. 2

[**Fig. 1.** Morphological characteristics of the flower of *Dactylorhiza* species.

Symbols are the same as in Table 2]

Второй задачей стали попытка выделения естественных групп видов в пределах рода на основании анализа маркерных последовательностей ДНК, а именно последовательностей ITS1-5.8S-ITS2, и соотнесение выделенных групп с результатами таксономического анализа. ДНК из исследуемых образцов (26 образцов видов рода *Dactylorhiza* (по 1–2 с каждой ценопопуляции), а также по одному образцу *Coeloglossum viride* (L.) Hartm. и *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br.) выделена с помощью набора «DNeasy Plant Mini Kit» (Qiagen, Германия) согласно инструкциям производителя. Выделенную ДНК хранили при температуре -20°C . Амплификацию фрагмента проводили в реакционной смеси объемом 50 мкл, содержащей 10 мкл ScreenMix («Евроген», Россия), 10 мкл каждого праймера (0,3 мкМ) («Евроген», Россия), 18 мкл воды без нуклеаз («Ambion», США) и 2,0 мкл геномной ДНК (10 нг).

Для амплификации фрагмента ITS1-5.8S-ITS2 использовали праймеры ITS5 5'-ggaagtaaaagtcgtaacaagg-3' и ITS-4 5'-tcctccgcttattgatgc-3', для фрагмента matK – KIM 3F 5'-cgtacagtacttttgtgtttacgag-3' и KIM 1R 5'-accagtcctatctggaatcttggttc-3'. Для амплификации фрагментов использовали следующий температурный профиль полимеразной цепной реакции (ПЦР): предварительная денатурация – 5 мин при 95°C; 35 циклов: денатурация – 30 с при 94°C, отжиг – 30 с при 55°C (ITS1-5.8S-ITS2) и 49°C (matK), элонгация – 40 с при 72°C; и финальная элонгация – 2 мин при 72°C.

ПЦР-продукты разделяли методом электрофореза в 1,3%-ном агарозном геле в трис-ацетатном буферном растворе, окрашивали бромистым этидием, для визуализации применяли трансиллюминатор UVT-1 (Биоком, Москва). В качестве маркера длины фрагментов ДНК использовали 100 bp Ladder DNA marker (100 bp–3000 bp) (Thermo Scientific, EC). Для очистки полученного продукта применяли набор QI Aquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия). Секвенирование проводили с использованием набора реагентов Ready Reaction Mix (Life Technology) на приборе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в Центре коллективного пользования «Молекулярная биология» Института биологии Коми НЦ УрО РАН (г. Сыктывкар).

Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью алгоритма ClustalW и редактировали вручную в программном пакете Mega 7.0 (MEGA software development team, США). Филогенетические деревья с расчетом бутстреп-поддержек узлов ветвления (1 000 репликаций) с применением методов ближайшего соседа (NJ), максимальной экономии (MP), максимального правдоподобия (ML) и UPGMA построены в том же пакете программ.

Результаты исследования и обсуждение

Кластерный анализ, проведенный для всех изученных ценопопуляций видов рода *Dactylorhiza* с использованием всех морфометрических признаков, показал деление на две большие группы (рис. 2): верхнюю (соответствующую группе *D. maculata* s. l.) и нижнюю, разделившуюся на две группы, соответствующие *D. incarnata* s. l. (ЦП 15, 16) и аллотетраплоидам (ЦП 11–14). Наибольший вклад в разделение ценопопуляций внесли такие признаки, как длина прицветника, ширина шпорца, губы и второго снизу листа (по первой дискриминантной оси), а также ширина нижнего листа (по второй) и число цветков (по третьей). Эти признаки можно рассматривать в качестве диагностических при разделении видов данного рода. Ниже более подробно рассмотрим структуру отдельных групп видов.

Группа таксонов *D. maculata* s. l. (в широком понимании объема этого вида) является наиболее сложной в роде *Dactylorhiza*. До сих пор нет единого мнения о числе и статусе таксонов, входящих в эту группу [9, 16]. Сейчас большинство исследователей принимают четыре вида – три диплоидных (*D. fuchsii* (Druce) Soó, *D. saccifera* (Brongn.) Diklic., *D. foliosa* (Sol. ex Lowe)

Soó) и один тетраплоидный (*D. maculata* (L.) Soó). У нас произрастают два вида этой группы – *D. fuchsii* и *D. maculata*. Морфометрические признаки *D. fuchsii* и *D. maculata* варьируют очень широко. Разные авторы предлагали для них свои отличительные признаки, например: степень рассеченности губы цветка и относительная длина средней доли губы, ширина и пятнистость листьев и т.д.

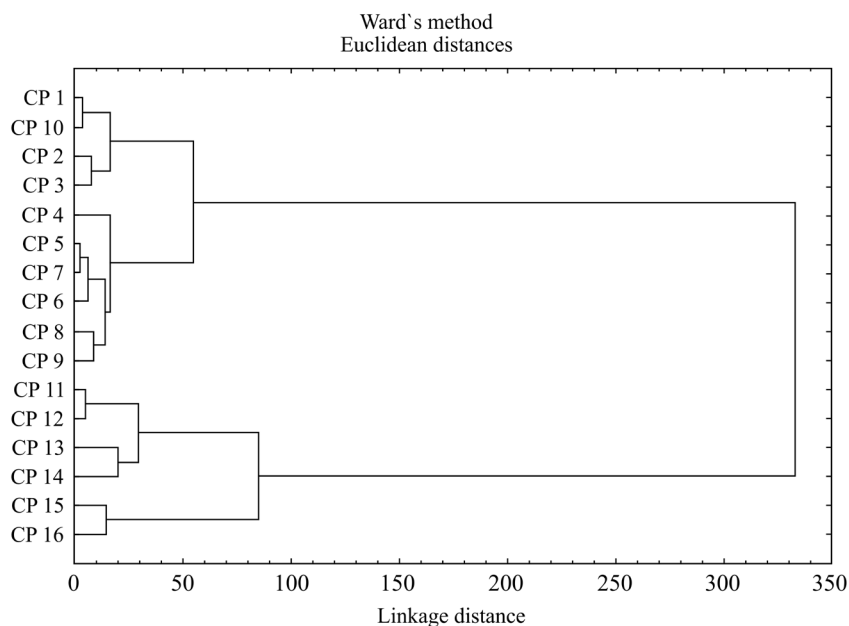


Рис. 2. Распределение ценопопуляций видов рода *Dactylorhiza* при проведении кластерного анализа

[Fig. 2. Distribution of cenopopulations (CP) of *Dactylorhiza* species during cluster analysis]

Для анализа группы *D. maculata* s. l. мы более подробно изучили 10 ценопопуляций (ЦП 1–10), которые выделились в отдельный кластер (см. рис. 2). Он в свою очередь состоит из двух групп. Ценопопуляции, образующие верхнюю группу (ЦП 1–3, 10, а также ЦП 4), мы отнесли к *D. maculata* s. str., нижнюю (ЦП 5–9) – к *D. fuchsii*. Сравнение средних показателей значений признаков этих групп приведено в табл. 3. Несмотря на довольно сильное перекрытие, растения достоверно отличаются практически по всем параметрам, кроме высоты растений и числа цветков. Растения *D. maculata* характеризуются более длинным и расставленным соцветием, более длинными, но узкими листьями и более крупными цветками и шпорцами, а также расположением наибольшей ширины нижних листьев (у *D. maculata* наибольшая ширина листа у середины и ниже, у *D. fuchsii* – выше).

Т а б л и ц а 3 [Table 3]

Морфометрические признаки видов рода *Dactylorhiza* в Республике Коми
[Morphometric parameters of *Dactylorhiza* species in the Komi Republic]

Признак [Parameter]	<i>Dactylorhiza maculata</i> s. l.		<i>p</i>	Аллотетраплоиды [Allotetraploid]		<i>p</i>	<i>Dactylorhiza incarnata</i> s. l.		<i>p</i>
	<i>D. maculata</i>	<i>D. fuchsii</i>		<i>D. baltica</i>	<i>D. traunsteineri</i>		<i>D. incarnata</i>	<i>D. cruenta</i>	
ВР, см [PH, cm]	37,3±6,57 (21,0–51,5)	36,5±7,11 (21,0–57,5)	–	31,7±5,70 (21,0–46,0)	24,7±3,16 (18,0–32,0)	**	26,3±4,78 (13,0–35,0)	35,7±6,42 (24,0–49,5)	**
ДС, см [LI, cm]	6,4±1,93 (2,8–12,0)	5,6±1,61 (2,5–12,0)	**	7,0±1,47 (3,0–11,0)	5,9±1,38 (2,5–9,8)	**	5,2±1,0 (3,2–7,8)	5,6±1,47 (3,5–9,7)	–
ЧЛ, шт. [NL, pcs.]	2,4±0,53 (2–4)	2,6±0,54 (2–4)	**	3,2±0,66 (2–5)	3,0±0,41 (2–4)	–	3,0±0,37 (2–4)	3,2±0,38 (3–4)	–
Д1Л, см [L1L, cm]	9,7±2,81 (3,8–16,5)	7,9±2,05 (3,2–14,0)	**	7,8±1,79 (4,6–13,0)	7,7±1,71 (4,4–12,0)	–	7,8±1,63 (4,6–12,0)	10,6±2,53 (6,8–18,0)	**
Ш1Л, см [W1L, cm]	1,4±0,36 (0,7–2,5)	2,0±0,44 (1,0–3,1)	**	2,2±0,52 (1,4–3,6)	1,4±0,25 (0,9–2,0)	**	1,7±0,31 (1,3–2,4)	1,7±0,39 (1,2–3,2)	–
Д1Ш, см [L1W, cm]	5,3±2,06 (1,5–12,0)	4,8±1,57 (1,5–10)	*	2,9±1,02 (1,0–6,5)	2,3±0,67 (1,0–4,0)	**			
Д2Л, см [L2L, cm]	10,9±2,64 (4,0–18,0)	9,9±1,98 (5,5–16,0)	**	9,5±1,64 (5,9–14,8)	9,3±1,22 (7,0–13,0)	–	9,5±1,75 (5,3–13,0)	13,0±1,89 (10,0–17,5)	**
Ш2Л, см [W2L, cm]	1,2±0,35 (0,5–2,2)	1,6±0,45 (0,7–2,9)	**	2,3±0,55 (1,0–3,6)	1,4±0,29 (0,8–2,1)	**	1,9±0,37 (1,2–2,8)	1,9±0,33 (1,3–2,7)	–
Д2Ш, см [L2W, cm]	4,8±1,97 (1,0–12,0)	5,4±1,58 (2,0–11,0)	**	3,1±0,14 (1,5–6,5)	2,3±0,56 (1,5–3,5)	**			
ЧЦ, шт. [NF, pcs.]	17,5±5,82 (7–40)	19,1±6,92 (7–50)	–	15,3±3,90 (9–27)	15,1±4,12 (8–26)	–	19,0±4,64 (10–31)	23,2±7,09 (11–42)	**
ЧЦ/ДС [NF/LI]	2,8±0,70 (1,3–4,8)	3,5±1,05 (1,5–7,1)	**	2,2±0,43 (1,3–3,1)	2,7±1,14 (1,3–9,6)	*	3,6±0,60 (2,7–5,3)	4,2±0,95 (2,2–6,0)	*
Д1Ш/Д1Л [L1W/L1L]	0,5±0,10 (0,3–0,8)	0,6±0,09 (0,4–0,8)	**	0,4±0,08 (0,2–0,6)	0,3±0,06 (0,2–0,5)	**			
Д2Ш/Д2Л [L2W/L2L]	0,4±0,11 (0,1–0,7)	0,5±0,09 (0,3–0,7)	**	0,3±0,08 (0,2–0,5)	0,3±0,05 (0,2–0,4)	**			
ДГ, мм [LL, mm]	9,1±0,91 (6,9–11,4)	8,5±0,81 (6,9–11,2)	**	9,5±0,89 (7,3–11,2)	8,7±0,98 (7,1–11,0)	**	6,8±0,36 (6,4–7,4)	7,0±0,49 (5,7–8,1)	–
ДВЛ, мм [LUP, mm]	9,5±0,95 (7,0–11,6)	8,8±0,76 (7,3–11,2)	**	10,3±1,12 (7,9–13,3)	9,5±0,77 (7,9–11,3)	**	7,5±0,43 (6,9–8,1)	8,1±0,47 (7,3–9,5)	*
ДНЛ, мм [LLP, mm]	10,1±0,95 (7,0–12,3)	9,3±0,79 (7,6–11,3)	**	10,9±1,08 (8,5–13,5)	10,0±0,89 (8,1–11,8)	**	7,9±0,45 (7,4–8,8)	8,6±0,55 (7,5–10,2)	*
ДШп, мм [LS, mm]	7,0±1,09 (4,4–10,0)	6,0±0,88 (3,2–8,7)	**	7,7±0,87 (5,6–9,6)	6,9±1,06 (4,6–9,1)	**	4,5±0,58 (3,8–5,3)	6,6±0,66 (5,0–7,7)	**
ШШп, мм [WS, mm]	2,0±0,34 (1,3–2,8)	1,8±0,28 (1,2–2,8)	**	2,9±0,45 (2,0–4,0)	2,9±0,32 (2,2–3,6)	–	2,5±0,26 (2,1–2,8)	2,5±0,33 (1,7–3,2)	–

Окончание табл. 3 [Table 3 (end)]

Признак [Parameter]	<i>Dactylorhiza maculata</i> s. l.		<i>p</i>	Аллотетраплоиды [Allotetraploid]		<i>p</i>	<i>Dactylorhiza incarnata</i> s. l.		<i>p</i>
	<i>D. maculata</i>	<i>D. fuchsii</i>		<i>D. baltica</i>	<i>D. traun- steineri</i>		<i>D. incarnata</i>	<i>D. cruenta</i>	
ДБ, мм [LLL, mm]	8,0±0,99 (5,4–10,3)	7,1±0,91 (2,8– 10,4)	**	7,5±0,94 (5,3–9,3)	7,3±0,78 (5,5–8,9)	–	5,4±0,26 (5,0–5,7)	5,6±0,47 (4,3–6,3)	–
ДО, мм [LBS, mm]	6,3±1,10 (3,7–8,7)	5,2±0,79 (3,4–7,8)	**	7,0±0,86 (5,1–8,6)	6,7±0,80 (5,1–8,3)	–			
ШБ, мм [WLL, mm]	4,0±0,55 (2,8–5,3)	3,7±0,61 (1,8–5,9)	**	3,5±0,63 (2,3–4,9)	3,3±0,42 (2,5–4,2)	–			
ШГ, мм [WL, mm]	11,1±1,29 (8,3–14,6)	10,7±1,41 (7,5– 15,1)	**	10,3±1,42 (7,5–13,7)	9,6±0,91 (7,4–11,4)	**	6,7±0,43 (6,2–7,3)	7,2±0,59 (6,0–8,3)	*
ДПр, мм [LB, mm]	12,8±1,76 (8,9–17,6)	11,7±1,86 (7,3– 16,9)	**	16,4±2,09 (12,0–22,0)	18,7±2,49 (13,2–25,0)	**	18,3±1,55 (16,0–20,6)	20,2±2,60 (15,1– 29,1)	–
ДЗ, мм [LO, mm]	9,7±1,51 (6,9–16,1)	8,2±1,12 (5,9– 11,9)	**	11,2±1,38 (8,0–14,9)	9,6±1,09 (7,4–12,3)	**	10,8±0,84 (9,9–12,1)	11,7±1,39 (8,6– 14,5)	–
ДД, мм [LCL, mm]	2,8±0,82 (1,0–4,5)	3,3±0,75 (1,4–5,1)	**	2,5±0,47 (1,3–3,6)	2,0±0,78 (0,3–3,9)	**			
ИГ [IL]	1,3±0,12 (1,1–1,7)	1,4±0,15 (1,1–2,3)	**	1,3±0,08 (1,2–1,6)	1,2±0,09 (1,0–1,4)	**			

Примечание. *статистическая значимость отличий при $p < 0,05$; ** статистическая значимость отличий при $p < 0,01$. Обозначения см. табл. 2.

[Note. *significant level $p < 0.05$; **significant level $p < 0.01$. For symbols see Table 2. Significant level $p < 0.05$; significant level $p < 0.01$. For symbols see Table 2].

Дискриминантный анализ, проведенный для ценопопуляций группы *D. maculata* s. l., выявил признаки, максимально отличающие два вида этой группы, ими стали ширина нижнего листа – по первой дискриминантной оси (0,92) и длина от основания губы до выемки губы – по второй оси (1,09). Признак «ширина нижнего листа» приводят в качестве диагностического и другие исследователи. Так, в Скандинавии [9] он составляет 0,6–2,3 см для *D. maculata* и 1,3–3,0 см для *D. fuchsii*; в Западной Европе [19] – 1,4–2,5 см и 1,3–3,8 см, на Британских островах [20] – менее 1,5 см и более 1,5 см соответственно. Наши данные (табл. 3) сопоставимы с данными, полученными из других частей ареала этих видов, наиболее близких к данным со Скандинавии. Второй признак «длина от основания губы до выемки губы» связан со степенью рассеченности губы цветка. В большинстве ключей фигурирует признак «индекс формы губы цветка», предложенный G. Heslop-Harrison [21]. В наших исследованиях также одним из основных отличительных признаков *D. fuchsii* стал более выраженный срединный зубчик губы и больший индекс формы губы (см. табл. 3).

Признак наличия пятен на листьях очень вариабелен, и у того и у другого вида в популяциях присутствовали экземпляры с пятнистыми листьями и

листьями без пятен, иногда популяции состояли только из пятнистых растений. Значимой разницы между видами по этому признаку не обнаружено. Лишь несколько отличается форма пятен, у *D. fuchsii* пятна на листьях чаще яркие и поперечно-вытянутые, у *D. maculata* – округлые.

Различаются виды по фитоценологической приуроченности. *D. maculata* в Республике Коми встречается в основном на осоково-сфагновых болотах и в заболоченных сосняках с кислыми почвами (pH=4,6–6,4) [22]. *D. fuchsii* характеризуется более широкой эколого-фитоценологической амплитудой – произрастает на лугах, по берегам рек, в лесах и на болотах, предпочитает более щелочные почвы [23].

***D. incarnata* s. l.** – полиморфный диплоидный комплекс, состоящий из различных таксонов, отличающихся по местообитаниям, окраске цветков и пятнистости листьев [10, 24–26]. Виды этой группы хорошо отличаются от других видов рода *Dactylorhiza*. На исследуемой территории для них характерна ромбовидная, чуть сжатая с боков губа цветка шириной менее 8 мм (см. табл. 3). Стебель полый, листья с максимальной шириной у основания, вверх направленные, достигающие соцветия. Соцветие плотное, прицветники длиннее цветков (15–30 мм длиной).

В данном комплексе выделяют два вида *D. incarnata* (L.) Soó и *D. cruenta* (O. F. Muell) Soó [27]. Однако последние молекулярные исследования [12 и др.] свидетельствуют о том, что *D. cruenta* следует рассматривать как форму *D. incarnata*. В качестве их основного отличительного признака в большинстве работ приводят пятнистость листьев. Кроме того, по мнению некоторых исследователей [24, 27] отличительной особенностью *D. cruenta* являются темная окраска цветков и более мелкие их размеры, а также более короткие и широкие листья. R. Bateman и I. Denholm [25] в качестве отличительных признаков *D. cruenta* приводят меньшую высоту растений, а также более короткие и узкие листья.

При проведении предварительного анализа (см. рис. 2) виды этой группы образовали отдельный кластер. Пятнистые растения (ЦП 16) мы отнесли к *D. cruenta*, не пятнистые (ЦП 15) – к *D. incarnata*. Сравнение средних показателей значений признаков этих видов показало, что они достоверно различаются по ряду параметров. Растения *D. cruenta* достоверно выше, с более длинными листьями и крупными цветками (см. табл. 3). Наши данные находятся в некотором противоречии с данными других исследователей. Возможно, это указывает на то, что *D. cruenta* – микротаксон, в различных частях ареала представляющий собой независимо возникающую гиперхромную форму. А выявленные морфологические отличия между ценопопуляциями могут отражать не таксономическое разнообразие, а различие между популяциями в пределах одного вида.

D. cruenta и *D. incarnata* встречаются в Республике Коми в основном на ключевых болотах. *D. incarnata*, кроме этого, отмечен нами на заболоченных бечевниках в долинах рек Илыч и Подчерем в предгорьях Северного Урала.

Аллотетраплоиды – это виды, имеющие гибридное происхождение от групп *D. incarnata* s. l. и *D. maculata* s. l. При первичном анализе (см. рис. 2) четыре ценопопуляции расположились между двумя этими группами. Ценопопуляции 13 и 14 мы отнесли к *D. traunsteineri* (Saut.) Soó. Это небольшие растения, в среднем 25 см высотой, с двулопастными корневищными клубнями, заканчивающимися длинными тонкими корневыми окончаниями. Листья, в числе 2–4, линейно-ланцетные, часто вдоль сложены, до 2 см шириной. Соцветие из крупных фиолетовых цветков, с длинными прицветниками. Шпорец широкий, более 2,2 мм шириной (см. табл. 3). В Республике Коми вид встречается на травяно-сфагновых, осоково-гипново-сфагновых и травяно-гипновых болотах.

Две ценопопуляции (ЦП 11 и 12) по внешнему облику оказались близки к *D. baltica* (Klinge) Orlova. В отличие от других аллотетраплоидов, имеющих в основном западноевропейское распространение, распространение этого вида ограничивается восточной частью Германии, Польшей, странами Балтии, южной частью Финляндии и Россией [13]. Этот вид несет промежуточные признаки между *D. fuchsii* и *D. incarnata*, что объясняется его происхождением. Довольно крупные растения, с широкими (более 1,5 см) островатыми продолговато-ланцетными листьями, с наибольшей шириной в нижней части листа, с яркими круглыми пятнами. Соцветие из 9–27 крупных цветков, длина средней доли губы $2,5 \pm 0,47$ (1,3–3,6) мм (см. табл. 3). А. Шипунов с соавт. [13] приводят в качестве диагностических признаков этого вида подобные признаки: широкую губу (7–13 мм) с длиной средней доли менее 4 мм и широкие (1,4–4,0 см) заостренные листья с круглыми пятнами.

Виды рода *Dactylorhiza* отличаются в регионе и по срокам цветения. Первыми в начале – середине июня зацветает *D. traunsteineri*, в конце июня начинают цвести *D. incarnata*, *D. cruenta*, *D. baltica*, в июле цветут *D. maculata* и *D. fuchsii*.

Результаты молекулярно-филогенетического исследования. В результате молекулярно-филогенетического анализа 28 образцов, проведенного на основании сравнения последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 рДНК (регистрационные номера в GenBank: MH016576–MH016603), построено филогенетическое древо (рис. 3). В качестве внешней группы выбран представитель сестринского рода *Gymnadenia* – *G. conopsea* (GconIK3417). Так как некоторые молекулярно-филогенетические исследования [28, 29] показали необходимость включения монотипного рода *Coeloglossum* Hartm. в род *Dactylorhiza* (*Dactylorhiza viridis* (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase), в анализ также добавлен образец *C. viride* (CvirIK3317).

На филогенетическом древе видно, что в роде *Dactylorhiza* выделяется несколько групп: *D. incarnata* s. l. (группа 1), *D. baltica* (группа 2), а также большая неоднородная группа, включающая все остальные изученные образцы. *C. viride* встал между группой *D. incarnata* s. l., с одной стороны, и другими исследованными видами – с другой. Подобное положение

этого вида приведено и в работе R.M. Bateman et al. [29]. Внутри смешанной группы выделяется несколько подгрупп, две (3 и 4) включают образцы *D. traunsteineri*, подгруппа 5 объединяет виды группы *Dactylorhiza maculata* s. l. с бассейна р. Вычегда, подгруппа 6 – преимущественно образцы с бассейна р. Щугор.

Относительно видов группы *D. maculata* s. l. явного разделения на виды на основании сравнения ITS-последовательностей не произошло. Возможно, это связано с тем, что большинство представителей данной группы на севере европейской части России относятся к растениям, которые сочетают геномы *D. maculata* s. str. и *D. fuchsii* [12].

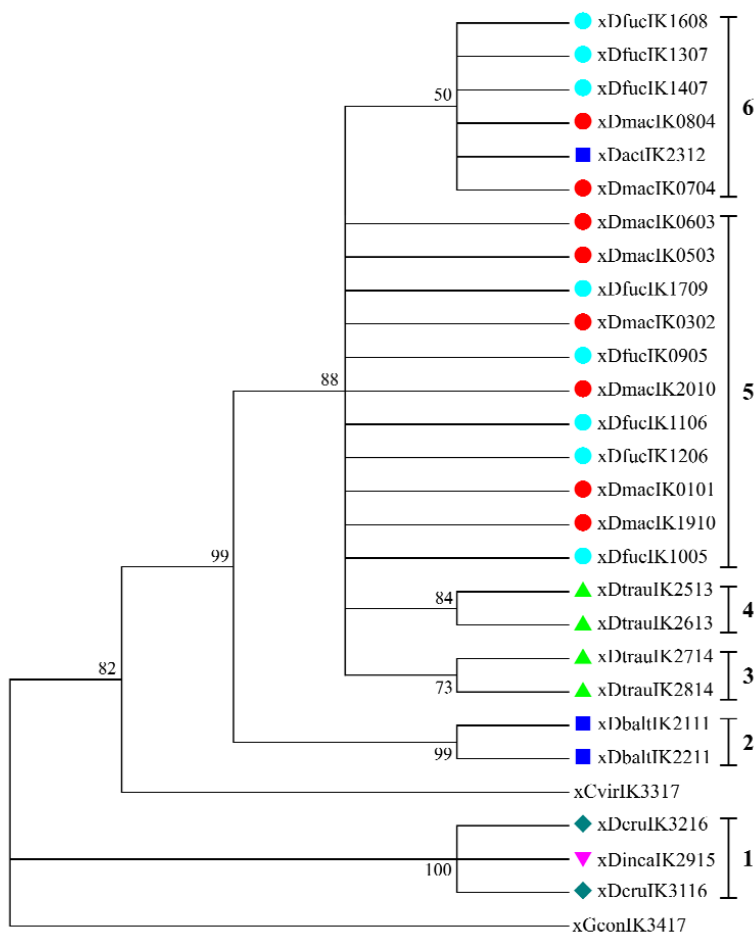


Рис. 3. Результаты молекулярно-филогенетического анализа (метод максимального правдоподобия, коэффициент бутстрепа 1 000)

[Fig. 3. Molecular phylogenetic analysis by the maximum likelihood method (the bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates)]

Особый интерес представляет *D. baltica*, сочетающая морфологические признаки *D. maculata* s. l. и *D. incarnata* s. l. Проведенный анализ ITS-последовательностей трех образцов, отнесенных нами к этому виду по морфологическим признакам, показал, что два из них (DbaltIK2111 и DbaltIK2211 из ЦП 11) образовали отдельный самостоятельный кластер (с высокой бутстреп поддержкой) (рис. 3). Для уточнения систематического положения данной ценопопуляции мы провели дополнительный анализ ее образцов (DbaltIK2111Mt и DbaltIK2211Mt) с использованием последовательностей гена *matK* [30], в сравнении с данными имеющимися в базе данных GenBank. Кладограмма, построенная на основании последовательностей гена *matK*, показала принадлежность ценопопуляции 11 к *D. baltica* (рис. 4). Данные по образцам данной ценопопуляции (фото, лист гербария, последовательности ITS и *matK*) загружены в систему BOLD (<http://www.boldsystems.org/>) под Sample ID: Dbalt2111Mt.

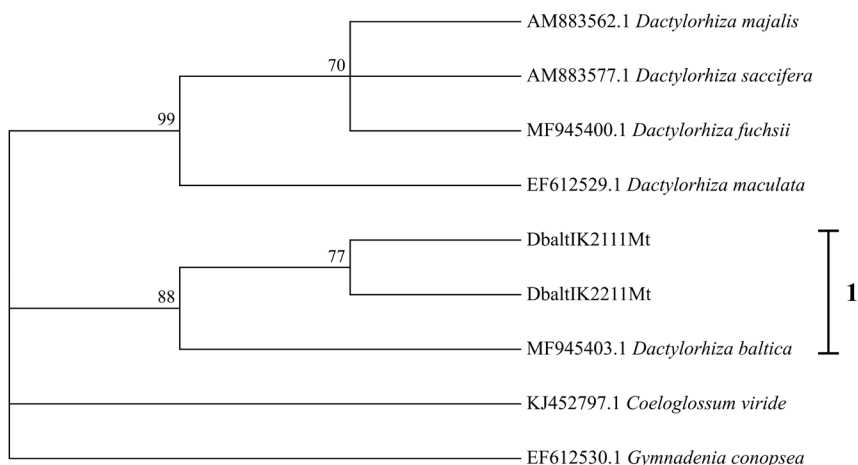


Рис. 4. Результаты молекулярно-филогенетического анализа (метод максимального правдоподобия, коэффициент бутстрепа 1 000)

[Fig. 4. Molecular phylogenetic analysis by the maximum likelihood method (the bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates)]

Заключение

Совместное использование данных морфологического и молекулярно-филогенетического анализов является основой более полного понимания филогенетических связей между видами и адекватной оценки объема и границ таксонов. Проведенные нами исследования позволили подтвердить произрастание на территории Республики Коми четырех видов рода *Dactylorhiza* – *Dactylorhiza fuchsii*, *D. maculata*, *D. incarnata* s. l. (включая

D. cruenta) и *D. traunsteineri*. Выявлены диагностические признаки для разделения этих видов: длина прицветника, ширина шпорца, губы и нижних листьев. Кроме того, хорошим диагностическим признаком для разделения *D. fuchsii* и *D. maculata* в регионе оказалась их фитоценотическая приуроченность. Вопрос о наличии *D. baltica* на территории региона остается открытым и требует дополнительных исследований.

Проведенный молекулярно-филогенетический анализ позволил нам еще ближе подойти к пониманию этого сложного рода на территории Республики Коми. На перспективу будет уместно проведение более глубокого исследования, на большем материале с анализом других маркерных последовательностей ДНК.

Литература

1. Bateman R.M., Hollingsworth P.M., Preston J., Yi-Bo L., Pridgeon A.M., Chase M.W. Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae) // Botanical Journal of the Linnean Society. 2003. Vol. 142. PP. 1–40. doi: [10.1046/j.1095-8339.2003.00157.x](https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.00157.x)
2. Pedersen H.A. Species concept and guidelines for infraspecific taxonomic ranking in *Dactylorhiza* (Orchidaceae) // Nordic Journal of Botany. 1998. Vol. 18. PP. 289–310. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1998.tb01881.x>
3. Hedrén M. Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in northern European *Dactylorhiza* (Orchidaceae): evidence from allozyme markers // Plant Systematics and Evolution. 1996. Vol. 201. PP. 31–55. <https://doi.org/10.1007/BF00989050>
4. Hedrén M. Conservation priorities in *Dactylorhiza*, a taxonomically complex genus // Lindleyana. 2001. Vol. 16. PP. 17–25.
5. Hedrén M. Speciation patterns in the *Dactylorhiza incarnata/maculata* polyploid complex (Orchidaceae): evidence from molecular markers // Journal Europäischer Orchideen. 2002. Vol. 34. PP. 707–731.
6. Hedrén M., Fay M.F., Chase M.W. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae) // American Journal of Botany. 2001. Vol. 88. PP. 1868–1880. <https://doi.org/10.2307/3558363>
7. Pillon Y., Fay M.F., Shipunov A.B., Chase M.W. Species diversity versus phylogenetic diversity: a practical study in the taxonomically difficult genus *Dactylorhiza* (Orchidaceae) // Biological Conservation. 2006. Vol. 129. PP. 4–13. doi: [10.1016/j.biocon.2005.06.036](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.06.036)
8. Pillon Y., Fay M.F., Hedrén M., Bateman R.M., Devey D.S., Shipunov A.B., van der Bank M., Chase M.W. Evolution and temporal diversification of western European polyploid species complexes in *Dactylorhiza* (Orchidaceae) // Taxon. 2007. Vol. 56. PP. 1185–1208.
9. Ståhlberg D., Hedrén M. Systematics and phylogeography of the *Dactylorhiza maculata* complex (Orchidaceae) in Scandinavia: insights from cytological, morphological and molecular data // Plant Systematics and Evolution. 2008. Vol. 273. PP. 107–132. doi: [10.1007/s00606-008-0035-x](https://doi.org/10.1007/s00606-008-0035-x)
10. Hedrén M., Nordström S. Polymorphic populations of *Dactylorhiza incarnata* s. l. (Orchidaceae) on the Baltic island of Gotland: morphology, habitat preference and genetic differentiation // Annals of Botany. 2009. Vol. 104. PP. 527–542. doi: [10.1093/aob/mcp102](https://doi.org/10.1093/aob/mcp102)
11. Paun O., Bateman R.M., Fay M.F., Hedrén M., Civeyrel L., Chase M.W. Stable epigenetic effects impact adaptation in allopolyploid orchids (*Dactylorhiza*: Orchidaceae) // Molecular biology and evolution. 2010. Vol. 27, № 11. PP. 2465–2473. doi: [10.1093/molbev/msq150](https://doi.org/10.1093/molbev/msq150)

12. Shipunov A.B., Fay M.F., Pillon Y., Bateman R.M., Chase M.W. *Dactylorhiza* (Orchidaceae) in European Russia: combined molecular and morphological analysis // American Journal of Botany. 2004. Vol. 91. PP. 1419–1426. doi: [10.3732/ajb.91.9.1419](https://doi.org/10.3732/ajb.91.9.1419)
13. Shipunov A.B., Fay M.F., Chase M.W. Evolution of *Dactylorhiza baltica* (Orchidaceae) from European Russia: evidence from molecular markers and morphology // Botanical Journal of the Linnean Society. 2005. Vol. 147. PP. 257–274. doi: [10.1111/j.1095-8339.2005.00380.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2005.00380.x)
14. Shipunov A.B., Bateman R.M. Geometric morphometrics as a tool for understanding *Dactylorhiza* (Orchidaceae) diversity in European Russia // Biological Journal of the Linnean Society. 2005. Vol. 85. PP. 1–12. doi: [10.1111/j.1095-8312.2005.00468.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00468.x)
15. Ефимов П.Г. Исследование генетического полиморфизма *Dactylorhiza baltica*, *D. fuchsii* и *D. incarnata* (Orchidaceae) из Северо-Запада европейской части России методом ISSR // Ботанический журнал. 2012. Т. 97, № 6. С. 751–761.
16. Shipunov A.B., Efimov P.G. «Northern tetraploids» clarified: a study of dactylorchids (*Dactylorhiza*, Orchidaceae) from North European Russia // Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology. 2015. Vol. 215. PP. 40–45. doi: [10.1016/j.flora.2015.07.005](https://doi.org/10.1016/j.flora.2015.07.005)
17. Efimov P.G., Philippov E.G., Krivenko D.A. Allopolyploid speciation in Siberian *Dactylorhiza* (Orchidaceae, Orchidoideae) // Phytotaxa. 2016. Vol. 258, № 2. PP. 101–120. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.258.2.1>
18. Филиппов Е.Г., Андропова Е.В. Генетическая структура популяций и естественная гибридизация *Dactylorhiza salina* и *D. incarnata* (Orchidaceae) // Генетика. 2017. Т. 53, № 3. С. 310–323. doi: [10.7868/S0016675817030055](https://doi.org/10.7868/S0016675817030055)
19. Tyteca D., Gathoye J.L. Morphometric analyses of the *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó group in Western Europe // Berichte aus den Arbeitskreisen Heimische Orchideen. 2004. Vol. 21. PP. 4–35.
20. Bateman R.M., Denholm I. The Heath Spotted-orchid (*Dactylorhiza maculata* (L.) Soó) in the British Isles: a cautionary case study in delimitating infraspecific taxa and inferring their evolutionary relationships // Journal Europäischer Orchideen. 2003. Vol. 35. PP. 3–36.
21. Heslop-Harrison J. A comparison of some Swedish and British form of *Orchis maculata* L. s. l. // Svensk Botanisk Tidsskrift. 1951. Vol. 45. PP. 608–635.
22. Кириллова И.А., Кириллов Д.В. Пальчатокоренник пятнистый *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae) в Республике Коми: структура ценопопуляций и репродуктивная биология // Известия Коми научного центра УрО РАН. 2017. № 3(31). С. 5–14.
23. Кириллова И.А., Кириллов Д.В. Особенности биологии, воспроизведение и структура ценопопуляций *Dactylorhiza fuchsii* s.l. (Orchidaceae) на северном пределе распространения // Ботанический журнал. 2013. Т. 98, № 2. С. 75–90.
24. Heslop-Harrison J. Some observation on *Dactylorchis incarnata* (L.) Vermln. in the British Isles // Proceedings of the Linnean Society. 1956. Vol. 166, № 12. PP. 51–82. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1956.tb00751.x>
25. Bateman R.M., Denholm I. A reappraisal of the British and Irish dactylorchids, 2. The diploid marsh-orchids // Watsonia. 1985. Vol. 15. PP. 321–355.
26. Hedrén M., Paun O., Sayers B. The polymorphic early marsh orchids, *Dactylorhiza incarnata* s. l. (Orchidaceae), at Lough Gealain, Ireland // New Journal of Botany: Journal of the Botanical Society of Britain and Ireland. 2011. Vol. 1. PP. 16–23. <https://doi.org/10.1179/204234811X577817>
27. Аверьянов Л.В. Орхидные (Orchidaceae) Средней России // Turczaninowia. 2000. Т. 3, № 1. С. 30–53.
28. Pridgeon A.M., Bateman R.M., Cox A.V., Nappaman J.R., Chase M.W. Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences: 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis* sensu lato // Lindleyana. 1997. Vol. 12. PP. 89–109.

29. Bateman R.M., Pridgeon A.M., Chase M.W. Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 2. Intrageneric relationships and reclassification to achieve monophyly of *Orchis* sensu stricto // *Lindleyana*. 1997. Vol. 12. PP. 113–141.
30. Kress W.J., Erickson D.L., Jones F.A., Swenson N.G., Perez R., Sanjur O., Bermingham E. DNA barcodes and a community phylogeny of tropical forest dynamics plot in Panama // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. Vol. 106, №. 44. PP. 18621–18626. doi: [10.1073/pnas.0909820106](https://doi.org/10.1073/pnas.0909820106) <https://doi.org/10.1073/pnas.0909820106>

*Поступила в редакцию 20.03.2018 г.; повторно 20.04.2018 г.;
принята 15.05.2018 г.; опубликована 12.10.2018 г.*

Авторский коллектив:

Кириллова Ирина Анатольевна – канд. биол. наук, н.с. отдела флоры и растительности Севера Института биологии Коми НЦ УрО РАН (167982, г. Сыктывкар, Россия, ул. Коммунистическая, 28).
E-mail: kirilova_orchid@mail.ru

Кириллов Дмитрий Валерьевич – канд. биол. наук, н.с. лаборатории компьютерных технологий и моделирования Института биологии Коми НЦ УрО РАН (167982, г. Сыктывкар, Россия, ул. Коммунистическая, 28).
E-mail: kirdimka@mail.ru

Шадрин Дмитрий Михайлович – канд. биол. наук, н.с. ЦКП «Молекулярная биология» Института биологии Коми НЦ УрО РАН (167982, г. Сыктывкар, Россия, ул. Коммунистическая, 28).
E-mail: shdimas@ya.ru

For citation: Kirillova IA, Kirillov DV, Shadrin DM. Molecular and morphological approaches to studying the *Dactylorhiza* genus in the Komi Republic. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* = *Tomsk State University Journal of Biology*. 2018;43:44–65. doi: 10.17223/19988591/43/3. In Russian, English Summary

Irina A. Kirillova, Dmitriy V. Kirillov, Dmitriy M. Shadrin

Institute of Biology of the Komi Scientific Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Sykt'yvkar, Russian Federation

Molecular and morphological approaches to studying the *Dactylorhiza* genus in the Komi Republic

The genus *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski is well known as a taxonomically difficult group due to its youth, hybridization ability and high phenotypic plasticity. The aim of our research was to define taxonomical structure of this genus in the Komi Republic using molecular and morphological approaches.

The studies were carried out during 2015–2016. We investigated 16 coenopopulations (See Table 1). From each coenopopulation (CP), we collected 30 generative plants (totally 480 samples) and then measured 19–22 morphological features (See Table 2, Fig. 1). Also, DNA was extracted from 1–2 plant samples from each CP (totally 26 samples) using «DNeasy Plant Mini Kit» (Qiagen, Germany). Primers ITS5 5'-ggaagtaaaagtcgtaacaagg-3' and ITS-4 5'-tctccgcttattgatatgc-3' were used to amplify the fragment ITS1–5.8S–ITS2; primers KIM 3F 5'-cgtacagactctttgtttacag-3' and KIM 1R 5'-accagtcctatctggaatcttggttc-3' were used to amplify the fragment matK. PCR products were separated by electrophoresis in 1.3% agarose gel in Tris acetate buffer solution, stained with bromide ethidium, and UVT-1 transilluminator was used for visualization (Biocom, Moscow). As a marker of the length of the DNA fragments used 100 bp Ladder DNA marker (100 bp–3000 bp) (Thermo Scientific, EU). To clean the

resulting product, a set of QI Aquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) was used. Sequencing was performed using kit reagents Ready Reaction Mix (Life Technology) on the instrument ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) in the Center for collective use "Molecular biology", Institute of Biology of the Komi Scientific Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. Nucleotide sequences were aligned with the ClustalW algorithm and edited manually in the Mega 7.0 software package. Phylogenetic trees were built in the Mega 7.0.

Cluster analysis of all studied coenopopulations using all morphometric parameters revealed two large clusters (See Fig. 2): top cluster (the group of *Dactylorhiza maculata* s. l.) and bottom cluster, divided into two groups corresponding to the *D. incarnata* s. l. (CP 15 and 16) and allotetraploids (CP 11-14). The most important parameters were the length of bract, the width of spur and labellum, the width of lower leaves and the number of flowers. These parameters may be used as diagnostic for dividing the genus. The *D. maculata* group in the Republic of Komi is represented by two species *D. fuchsii* and *D. maculata*. Plants of *D. maculata* differ by a longer and spaced inflorescence, longer, but narrow leaves and larger flowers and spurs, as well as the location of the largest width of the lower leaves (*D. maculata* has the largest leaf width in the middle and below, but *D. fuchsii* - above) (See Table 3). The discriminant analysis carried out on the basis of the data obtained for coenopopulations of the *D. maculata* s. l. group, showed features that maximally distinguishes two species of this group, they were the width of the lower leaf and the length from the base of labellum entrance to base of sinus. In addition, these species differed by the phytocenotic features of the habitats. *D. maculata* in the Komi Republic occurs mainly in sedge-sphagnum bogs and in wetland pine forests with acidic soils (pH = 4.6-6.4), but *D. fuchsii* is characterized by a wider ecological and phytocenotic amplitude. It grows in meadows, river banks, forests and swamps, and prefers more alkaline soils. Species from the group *D. incarnata* s. l. differ from other species of the genus *Dactylorhiza*. In the study area, they are characterized by a diamond-shaped labellum, slightly compressed from the sides, with a width of less than 8 mm. The stem is hollow; the leaves are with maximum width at the base, upward directed and reaching inflorescence. The inflorescence is dense, with bracts longer than flowers (15-30 mm long). *D. incarnata* s. l. group is represented by two species, *D. incarnata* and *D. cruenta*. *D. cruenta* should be considered as a microtaxon that may constitute an independently occurring hyperchromic form in different parts of the area. Two coenopopulations (CP 13 and 14) were identified as *D. traunsteineri*. It is a small plant, with an average height of 25 cm, with bipinnate rhizomatous tubers, ending with long thin root tips. The number of leaves varies from 2 to 4, they are linear-lanceolate and often stacked along, the leaf width is up to 2 cm. The inflorescence is formed of large purple flowers with long bracts. The spur is wide; the width is more than 2.2 mm (See Table 3). Two coenopopulations (CP 11 and 12) in appearance were close to *D. baltica* species. These are quite large plants, with wide (more than 1.5 cm), acute oblong-lanceolate leaves, with the largest width at the bottom of the leaf, with bright rounded spots. The inflorescence consists of 9 to 27 large flowers; the length of the central lobe of the labellum is 2.5 ± 0.47 (1.3-3.6) mm. A phylogenetic tree (See Fig. 3) was created using molecular and phylogenetic analysis based on the comparison of rDNA sequences ITS1-5.8S-ITS2 (GenBank IDs: MH016576–MH016603). It is clear that the genus *Dactylorhiza* is divided in some groups: *D. incarnata* s. l. (group 1), *D. baltica* (group 2) and a third heterogeneous group that includes all other samples. Additional analysis of *D. baltica* (the species with the most difficult systematics) using the gene matK (See Fig. 4) confirmed its occurrence in the region. The molecular-phylogenetic analysis allowed us to come closer to the understanding of this intricate genus in the Komi Republic. In the near future, it would be appropriate to conduct a

more in-depth study, with inclusion of more samples and analysis of other DNA marker sequences.

The paper contains 4 Figures, 3 Tables and 30 References.

Key words: Orchidaceae; morphometry; systematics; *Dactylorhiza fuchsii*; *D. maculata*; *D. incarnata*; *D. baltica*; *D. traunsteineri*; ITS.

Funding: This work was supported by the Comprehensive Program of Basic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences for 2018, project No AAAA-A17-117121270031-2 (18-4-4-23) "Genetic diversity of rare species at the European Northeast of Russia: inventorying and forecast of their stability under climate change" and partly by the Russian Foundation for Basic Research grant No 16-44-110167 p_a.

References

1. Bateman RM, Hollingsworth PM, Preston J, Yi-Bo L, Pridgeon AM, Chase MW. Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2003;142:1-40. doi: [10.1046/j.1095-8339.2003.00157.x](https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.00157.x)
2. Pedersen HA. Species concept and guidelines for infraspecific taxonomic ranking in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *Nordic Journal of Botany*. 1998;18:289-310. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1998.tb01881.x>
3. Hedrén M. Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in northern European *Dactylorhiza* (Orchidaceae): evidence from allozyme markers. *Plant Systematics and Evolution*. 1996;201:31-55. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00989050>
4. Hedrén M. Conservation priorities in *Dactylorhiza*, a taxonomically complex genus. *Lindleyana*. 2001;16:17-25.
5. Hedrén M. Speciation patterns in the *Dactylorhiza incarnata/maculata* polyploid complex (Orchidaceae): Evidence from molecular markers. *Journal Europäischer Orchideen*. 2002;34:707-731.
6. Hedrén M, Fay MF, Chase MW. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*. 2001;88:1868-1880. doi: <https://doi.org/10.2307/3558363>
7. Pillon Y, Fay MF, Shipunov AB, Chase MW. Species diversity versus phylogenetic diversity: A practical study in the taxonomically difficult genus *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *Biological Conservation*. 2006;129:4-13. doi: [10.1016/j.biocon.2005.06.036](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.06.036)
8. Pillon Y, Fay MF, Hedrén M, Bateman RM, Devey DS, Shipunov AB, van der Bank M, Chase MW. Evolution and temporal diversification of western European polyploid species complexes in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *Taxon*. 2007;56: 1185-1208.
9. Ståhlberg D, Hedrén M. Systematics and phylogeography of the *Dactylorhiza maculata* complex (Orchidaceae) in Scandinavia: Insights from cytological, morphological and molecular data. *Plant Systematics and Evolution*. 2008;273:107-132. doi: [10.1007/s00606-008-0035-x](https://doi.org/10.1007/s00606-008-0035-x)
10. Hedrén M, Nordström S. Polymorphic populations of *Dactylorhiza incarnata* s. l. (Orchidaceae) on the Baltic island of Gotland: Morphology, habitat preference and genetic differentiation. *Annals of Botany*. 2009;104:527-542. doi: [10.1093/aob/mcp102](https://doi.org/10.1093/aob/mcp102)
11. Paun O, Bateman RM, Fay MF, Hedrén M, Civeyrel L, Chase MW. Stable epigenetic effects impact adaptation in allopolyploid orchids (*Dactylorhiza*: Orchidaceae). *Molecular Biology and Evolution*. 2010;27(11):2465-2473. doi: [10.1093/molbev/msq150](https://doi.org/10.1093/molbev/msq150)
12. Shipunov AB, Fay MF, Pillon Y, Bateman RM, Chase MW. *Dactylorhiza* (Orchidaceae) in European Russia: Combined molecular and morphological analysis. *American Journal of Botany*. 2004;91:1419-1426. doi: [10.3732/ajb.91.9.1419](https://doi.org/10.3732/ajb.91.9.1419)

13. Shipunov AB, Fay MF, Chase MW. Evolution of *Dactylorhiza baltica* (Orchidaceae) from European Russia: Evidence from molecular markers and morphology. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2005;147:257-274. doi: [10.1111/j.1095-8339.2005.00380.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2005.00380.x)
14. Shipunov AB, Bateman RM. Geometric morphometrics as a tool for understanding *Dactylorhiza* (Orchidaceae) diversity in European Russia. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2005;85:1-12. doi: [10.1111/j.1095-8312.2005.00468.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00468.x)
15. Efimov PG. The study of ISSR polymorphism of *Dactylorhiza baltica*, *D. fuchsii* and *D. incarnata* (Orchidaceae) from the North-West European Russia. *Botanicheskiy zhurnal* = *Botanical Journal*. 2012;97(6):751-761. In Russian
16. Shipunov AB, Efimov PG. «Northern tetraploids» clarified: a study of dactylorchids (*Dactylorhiza*, Orchidaceae) from North European Russia. *Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology*. 2015;215:40-45. doi: [10.1016/j.flora.2015.07.005](https://doi.org/10.1016/j.flora.2015.07.005)
17. Efimov PG, Philippov EG, Krivenko DA. Allopolyploid speciation in Siberian *Dactylorhiza* (Orchidaceae, Orchidoideae). *Phytotaxa*. 2016;258(2):101-120. doi: <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.258.2.1>
18. Filippov EG, Andronova EV, Kazlova VM. Genetic structure of the populations of *Dactylorhiza ochroleuca* and *D. incarnata* (Orchidaceae) in the area of their joint growth in Russia and Belarus. *Russian Journal of Genetics*. 2017;53(6):661-671. doi: [10.1134/S1022795417050039](https://doi.org/10.1134/S1022795417050039)
19. Tyteca D, Gathoye JL. Morphometric analyses of the *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó group in Western Europe. *Berichte aus den Arbeitskreisen Heimische Orchideen*. 2004;21:4-35.
20. Bateman RM, Denholm I. The Heath Spotted-orchid (*Dactylorhiza maculata* (L.) Soó) in the British Isles: A cautionary case study in delimitating infraspecific taxa and inferring their evolutionary relationships. *Journal Europäischer Orchideen*. 2003;35:3-36.
21. Heslop-Harrison J. A comparison of some Swedish and British form of *Orchis maculata* L. s. l. *Svensk Botanisk Tidsskrift*. 1951;45:608-635.
22. Kirillova IA, Kirillov DV. *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae) in the Komi Republic: coenopopulation structure and reproductive biology. *Izvestiya Komi nauchnogo centra Ural'skogo otdeleniya Rossiyskoy akademii nauk* = *Proceedings of the Komi Science Centre of the Ural Division of the Russian Academy of Sciences*. 2017;3(31):5-14. In Russian
23. Kirillova IA, Kirillov DV. The biological features, reproduction, and population structure of *Dactylorhiza fuchsii* s. l. (Orchidaceae) on the northern border of its range. *Botanicheskiy zhurnal* = *Botanical Journal*. 2013;98(2):75-90. In Russian
24. Heslop-Harrison J. Some observation on *Dactylorhiza incarnata* (L.) Verm. in the British Isles. *Proceedings of the Linnean Society*. 1956;166(12):51-82. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1956.tb00751.x>
25. Bateman RM, Denholm I. A reappraisal of the British and Irish dactylorchids, 2. The diploid marsh-orchids. *Watsonia*. 1985;15:321-355.
26. Hedrén M, Paun O, Sayers B. The polymorphic early marsh orchids, *Dactylorhiza incarnata* s. l. (Orchidaceae), at Lough Gealain, Ireland. *New Journal of Botany: Journal of the Botanical Society of Britain and Ireland*. 2011;1:16-23. doi: <https://doi.org/10.1179/204234811X577817>
27. Averyanov LV. Orchids (Orchidaceae) of the Middle Russia. *Turczaninowia*. 2000;3(1):30-53. In Russian
28. Pridgeon AM, Bateman RM, Cox AV, Hapeman JR, Chase MW. Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences: 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis sensu lato*. *Lindleyana*. 1997;12:89-109.
29. Bateman RM, Pridgeon AM, Chase MW. Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 2. Intrageneric relationships and reclassification to achieve monophyly of *Orchis sensu stricto*. *Lindleyana*. 1997;12:113-141.

30. Kress WJ, Erickson DL, Jones FA, Swenson NG, Perez R, Sanjur O, Bermingham E. DNA barcodes and a community phylogeny of tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(44):18621-18626. doi: [10.1073/pnas.0909820106](https://doi.org/10.1073/pnas.0909820106) <https://doi.org/10.1073/pnas.0909820106>

*Received 20 March 2018; Revised 20 April 2018;
Accepted 15 May 2018; Published 12 October 2018*

Authors info:

Kirillova Irina A, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Group of Geobotany and Comparative Floristics, Department of Flora and Vegetation of the North, Institute of Biology of the Komi Scientific Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 28 Kommunisticheskaya Str., Syktyvkar 167982, Russian Federation. E-mail: kirillova_orchid@mail.ru

Kirillov Dmitriy V, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Group of Computer Technologies and Models, Department of Flora and Vegetation of the North, Institute of Biology of the Komi Scientific Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 28 Kommunisticheskaya Str., Syktyvkar 167982, Russian Federation. E-mail: kirdimka@mail.ru

Shadrin Dmitriy M., Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Molecular Biology Core Facility, Institute of Biology of the Komi Scientific Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 28 Kommunisticheskaya Str., Syktyvkar 167982, Russian Federation. E-mail: shdimas@ya.ru