

СООБЩЕНИЯ

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ
ПОПУЛЯЦИИ *CYPRIPEDIUM* × *VENTRICOSUM* (ORCHIDACEAE)
В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

© 2020 г. А. Ю. Набиева^{1,*}, Е. В. Жмудь¹, И. Н. Кубан¹, О. В. Дорогина¹

¹ Центральный сибирский ботанический сад СО РАН
ул. Золотодолинская, 101, Новосибирск, 630090, Россия

*e-mail: sibflower05@gmail.com

Поступила в редакцию 20.11.2019 г.

После доработки 10.03.2020 г.

Принята к публикации 17.03.2020 г.

Проведено сравнительное исследование морфометрических параметров и молекулярно-генетических маркеров у совместно произрастающих в пределах одной и той же популяции видов рода *Cypripedium* (Orchidaceae) — *C. calceolus* и *C. macranthum*, а также их гибрида, в Новосибирской области. Выявлены ISSR-праймеры, позволяющие изучать генетический полиморфизм у видов рода *Cypripedium* из родства *C. calceolus* и *C. macranthum*. Подтверждено произрастание гибридов *C. calceolus* и *C. macranthum* в Искитимском районе Новосибирской области.

Ключевые слова: *Cypripedium*, гибридизация, микросателлитная ДНК, ISSR, Новосибирская область

DOI: 10.31857/S0006813620060058

Cypripedium calceolus L. и *C. macranthum* Sw. (Orchidaceae) — виды, редкие практически по всему ареалу на территории России, внесены в Красную книгу РФ со статусом 2а. Указывается, что они сокращаются в численности в результате изменения условий существования и разрушения местобитаний (Krasnaya... Rossiiskoi, 2008). Они также занесены практически во все Красные книги территорий, расположенных в Сибири и на Дальнем Востоке.

В области перекрытия ареалов *C. calceolus* и *C. macranthum* изредка встречается их гибрид — *C. ventricosum*. Согласно литературным данным, особи *C. × ventricosum* имеют морфологические признаки, промежуточные между родительскими видами (Averyanov, 1999; Knyazev et al., 2000; Filippov, Andronova, 2011; Andronova et al., 2016). Известно, что для гибрида характерен значительный полиморфизм по окраске и размерам цветков (Averyanov, 1999; Andronova et al., 2017). На территории Сибири и Дальнего Востока данный вид указан как редкий в Красных книгах Амурской и Еврейской автономной областей и Республики Саха (Якутия) (Krasnaya... Amurskoi...; Red... Jewish, 2006; Krasnaya... Respubliki Sakha, 2017).

Все виды башмачков очень декоративны, и в сельских ландшафтах страдают от сбора в букеты и выкапывания куртин. На территории Новосибирской области у *C. calceolus*, *C. macranthum* и *C. × ventricosum* нами проведено сравнительное

исследование морфометрических признаков, изучение кариотипов для определения числа хромосом и полиморфизма ДНК с использованием метода ISSR-маркирования. К преимуществам данного метода относится возможность обнаружения значительного количества полиморфных локусов, так как ISSR-маркеры обладают большой вариабельностью (Nybom, 2004), что и объясняет его широкое применение в популяционных и таксономических исследованиях. Согласно литературным данным, исследование ISSR полиморфизма используется у представителей рода для выявления внутривидовой генетической дифференциации (Qian et al., 2014; Opitz, 2016; Tian et al., 2018), но исследуемые нами таксоны, насколько нам известно, ранее в эти исследования не включались.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследуемая популяция находится в Искитимском районе, в окр. с Линёво, в пойме р. Койниха (Новосибирская область); абсолютная высота 190 м над уровнем моря, N 54°27'42"; E 83°20'42". В 2019 г. нами проведены морфометрические исследования выборочно взятых генеративных побегов (по одному из каждого парцеллярного куста) у видов рода *Cypripedium* на занимаемой ценопопуляцией площади (более 1 тыс. кв. м).

Таблица 1. Характеристика использованных в работе ISSR-праймеров
Table 1. Characteristics of the ISSR primers used in the work

Нуклеотидная последовательность Nucleotide sequence 5'-3'	Название праймера Primer	Температура отжига Temperature °C	Число амплифицированных (полиморфных) фрагментов Total (polymorphic) fragments	Уровень полиморфизма, % Polymorphism, %
(CA) ₆ AC	17898A	42	23 (21)	91.3
(CA) ₆ AG	17899A	47	15 (14)	93.3
(GA) ₆ CC	HB-10	44	12 (10)	83.3
(AC) ₈ CG	M-1	56	9 (8)	88.9

Обилие видов дано по шкале Друде (Shennikov, 1964).

Для исследования морфологических особенностей в данной ценопопуляции проведены измерения параметров у зрелых генеративных особей видов этого рода ($n = 10$). Изучали некоторые метрические показатели генеративной сферы, а также изменчивость ряда характеристик продуктивности особей в данном местообитании. Это размеры губы у цветков и второго сверху листа (длину и ширину). Также изучали изменчивость длины генеративного побега, числа цветков на побеге, побегов у особи (вегетативных и генеративных), и плодозавязывание (отношение завязавшихся плодов к общему числу сформированных, %), в том числе для выявления наличия признаков, возможно, подверженных гетерозису. В статье обсуждаются только статистически достоверно отличавшиеся значения признаков при уровне значимости не ниже 95% ($P = 95\%$). Достоверность отличий средних значений признаков оценивалась по непараметрическим критериям (Mann, Whitney, 1947).

Для подсчета числа хромосом изученных трех видов р. *Cypripedium* использовали кончики корней растений, которые были зафиксированы в смеси Карнуа без выкопки растений. Подсчет хромосом делящихся клеток на стадии метафазы проводили на временных давленных препаратах (Krasnikov, 2004).

Для изучения полиморфизма ISSR-маркеров ДНК выделяли из высушенных в лабораторных условиях листьев *C. calceolus*, *C. macranthon*, *C. × ventricosum*, собранных в фазе цветения у трех особей каждого вида. Экстракция ДНК проводилась на основе СТАБ с некоторыми модификациями (Doyle, Doyle, 1987). Для предварительного тестирования использовали 11 ISSR-праймеров, а после апробации были отобраны 4 наиболее информативных, которые характеризовались четким, воспроизводимым, полиморфным паттерном: 17898A, 17899A, HB-10, M-1 (табл. 1). ПЦР проводили на амплификаторе С – 1000 (Bio-Rad, USA) в объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала: 1.5 ед. Таq ДНК-полимеразы (Medigen, Russia); 2.7

мМ MgCl₂; 0.8 мМ ISSR-праймер (Medigen, Russia); раствор ДНК – 2 мкл; вода mQ H₂O – 2 мкл. Программа амплификации состояла из этапа денатурации ДНК в течение 90 сек при 94°C и 35 циклов, каждый из которых включал 40 сек при 94°C, 45 сек – отжиг праймера (табл. 1) и 90 сек при 72°C. Заключительный этап пролонгирования нуклеотидной цепи длился 5 мин при 72°C. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 1.5% агарозном геле в 1х TAE буфере при напряжении 4 В/см. Для статистической обработки данных использовали пакет программ TREECON (Peer, Wachter, 1994). Каждый ISSR-маркер рассматривался как доминантный, и отмечалось его наличие (1) либо отсутствие (0), по результатам чего была построена бинарная матрица. Генетические дистанции рассчитывали по Нею (Nei, Li, 1979). Уровень полиморфизма (P , %) каждого праймера рассчитывали по формуле $P = 100 * Np/N$, где Np – число полиморфных фрагментов, N – общее число фрагментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследуемой ценопопуляции нами найдены 15 цветущих особей *Cypripedium calceolus*, 25 – *C. macranthon*, и 12 – *C. × ventricosum* (рис. 1а, 1б). Ценопопуляция находится в лесостепной зоне и приурочена к разреженному березовому лесу с участием подроста черемухи, калины и клена. Древостой состоит из *Betula pendula* Roth. (cop 1) и подроста *Acer negundo* L. (sp.) и *Padus avium* Mill. (sp.). Кустарниковый ярус представлен *Viburnum opulus* L. (sp.), *Ribes rubrum* L., *Rosa rugosa* Thunb. (sp.). Проективное покрытие травянистого яруса составляло 80–90%. В данном сообществе отмечены 19 видов травянистых многолетников, в том числе *Cypripedium calceolus* L. (sp), *C. macranthon* Sw. (cop 1), *C. × ventricosum* Sw. (sp), *Dactylis glomerata* L. (cop 1), *Equisetum pratense* Ehrh. (cop1), *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. (sp), *Galium boreale* L. (sp), *Trollius asiaticus* L. (cop 1), *Paris quadrifolia* L. (sp), *Sanguisorba officinalis* L. (cop 1), *Iris ruthenica* Ker-Gawl. (sp), *Veratrum lobelianum* Bernh. (sp),



Рис. 1. Представители *Cypripedium ventricosum* в Новосибирской области (2019 г.): а — парциальный куст; б — цветки.
Fig. 1. Plants of *Cypripedium ventricosum* in the Novosibirsk Region (2019): а — partial bush; б — individual flowers.

Phlomis tuberosa (L.) Moench (sp), *Pulmonaria mollissima* Wulfen ex Hornem. (cop 1) и др.

Три изученных в данной ценопопуляции вида *Cypripedium* качественно отличались по характеру опушенности побегов, что является их общеизвестным отличительным признаком (Averyanov, 1999). Согласно морфометрическим исследованиям, средние размеры губы цветка у особей *C. calceolus* были достоверно меньше, чем у представителей *C. macranthon* и *C. × ventricosum* ($P = 95\%$) (рис. 2а), а размеры второго сверху листа меньше у *C. macranthon* по сравнению с двумя другими изученными видами этого рода в данной ценопопуляции ($P = 95\%$) (рис. 2б). Длина побегов у особей *C. calceolus* и *C. × ventricosum* была больше, чем у *C. macranthon* (соответственно, 35.8 ± 1.9 , 34.2 ± 1.6 и 24.5 ± 0.4 см). У большинства особей *C. calceolus* на каждом генеративном побеге было сформировано по 2 цветка (1.7 ± 0.2), а у *C. macranthon* — только один. У *C. × ventricosum* отмечено промежуточное значение этого признака (1.2 ± 0.1).

По сравнению с особями двух других изученных видов, представители *C. × ventricosum* отличались высокой потенциальной продуктивностью, которая выражалась в формировании крупных куртин с более высоким числом генеративных и вегетативных побегов. Так, у особей *C. × ventricosum* отмечено, в среднем, 21.2 ± 7.6 генеративных и 5.0 ± 1.2 вегетативных побегов, что достоверно выше, чем у *C. calceolus* и *C. macranthon* (7.2 ± 2.2 , 0.9 ± 0.4 и 3.7 ± 0.8 и 2.2 ± 0.8 , соответственно) ($P = 95\%$). То есть, для представителей *C. × ventricosum* (в данной популяции) характерно развитие крупных куртин, что ранее также выявлено при изучении *C. × ventricosum* на Среднем Урале.

Можно согласиться с тем, что это явление может быть следствием эффекта гетерозиса (Knyazev et al., 2000).

В то же время *C. × ventricosum* имел, по нашим данным, более низкую плодородность: среднее число плодов у *C. × ventricosum* составило 25.2 ± 8.4 , тогда как у *C. calceolus* и *C. macranthon* — соответственно 74.8 ± 5.6 и 82.6 ± 8.7 . Возможной причиной этого может быть пониженная фертильность пыльцы, что было отмечено у *C. × ventricosum* при исследованиях причин низкой завязываемости плодов у данных гибридов на Среднем Урале (Knyazev et al., 2000).

Таким образом, выявленные достоверные различия *C. × ventricosum* с двумя другими видами *Cypripedium*, совместно произрастающими в данной популяции в Новосибирской области, заключаются в следующем: у представителей *C. × ventricosum* выявлено формирование мощных куртин с наиболее высоким числом генеративных побегов, вызванное, вероятно, эффектом гетерозиса, но при этом отмечена самая низкая завязываемость плодов в расчете на особь.

У *C. × ventricosum* формировалось промежуточное число цветков на генеративном побеге. Сходство особей *C. × ventricosum* с *C. calceolus* выражалось в формировании более длинных побегов и крупных размеров 2-го сверху листа (рис. 2а), а с *C. macranthon* — в более крупных размерах губы (рис. 2б) ($P = 95\%$). Выявленное нами число хромосом $2n = 20$ для *C. macranthon* и *C. calceolus* соответствует диплоидному числу хромосом, известному для данных видов из других регионов России и Китая (<http://www.tropicos.org/project/PCN>; Stepanov, 1994; Averyanov, 1999), а также Европы и Британских островов (Kull, 1999).

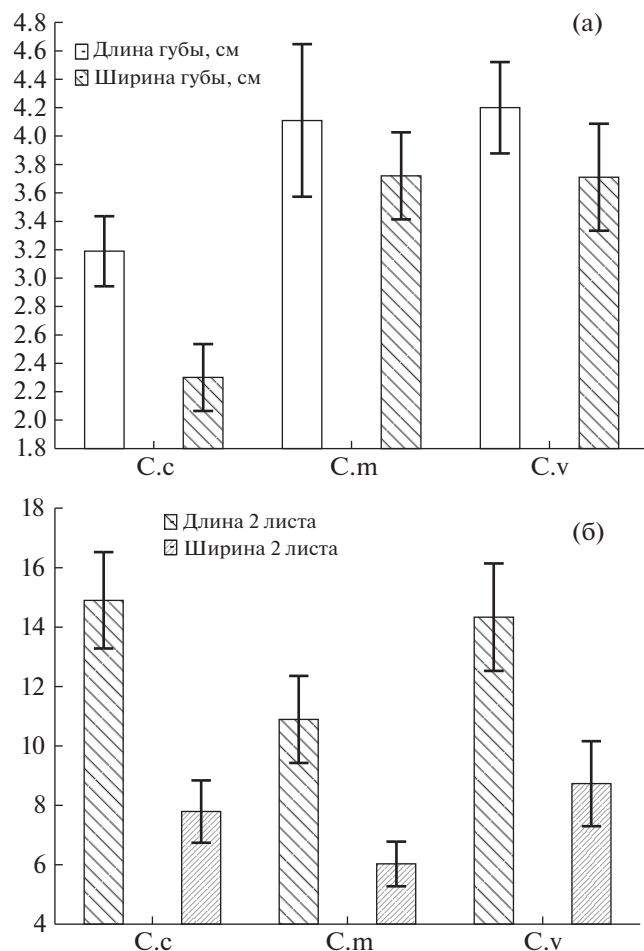


Рис. 2. Варьирование морфологических признаков у видов рода *Cypripedium* в Новосибирской области: а – размеры (длина и ширина) губы, см; б – размеры (длина и ширина) второго листа, см. C.c. – *Cypripedium calceolus*; C.m. – *C. macranthon*; C.v. – *C. ventricosum*.

Fig. 2. Variation of morphological characters in *Cypripedium* species in the Novosibirsk Region: а – dimensions (length and width) of the lip, cm; б – dimensions (length and width) of the second leaf, cm. C.c. – *Cypripedium calceolus*; C.m. – *C. macranthon*; C.v. – *C. ventricosum*.

Известны случаи анеуплоидии у *C. macranthon* при исследовании флоры Японских островов – $2n = 21$ (Karasawa, Aoyama, 1986) и Командорских островов – $2n = 22$ (Volkova et al., 2003). Соматическое число хромосом *C. × ventricosum* соответствует диплоидному набору хромосом родительских видов $2n = 20$. Такое же число хромосом для этого вида известно для растений из Приморского края (Probatova, Sokolovskaya, 2006).

Анализ молекулярно-генетических маркеров показал следующее. На четырех полученных электрофореграммах нами выявлено 59 фрагментов, 53 из которых были полиморфными. Число фрагментов, амплифицируемых одним праймером, варьировало от 9 (М-1) до 23 (17898А). Уро-

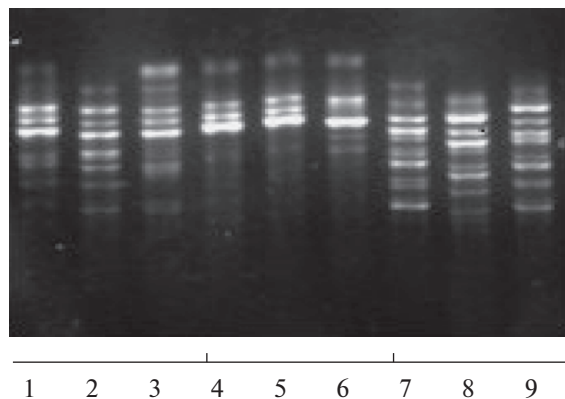


Рис. 3. Электрофоретические спектры ДНК у видов рода *Cypripedium* в Новосибирской области (2019 г.). 1–3 – *Cypripedium ventricosum*; 4–6 – *C. calceolus*; 7–9 – *C. macranthon*.

Fig. 3. Electrophoretic spectra of DNA in *Cypripedium* species in the Novosibirsk Region (2019). 1–3 – *Cypripedium ventricosum*; 4–6 – *C. calceolus*; 7–9 – *C. macranthon*.

вень полиморфизма при амплификации варьировал от 83.3% (НВ-10) до 93.3% (17899А) (рис. 3). На электрофореграммах у гибридной особи № 1 присутствуют 3 компонента от *C. calceolus*; на спектре особи № 2 четко проявляются компоненты как от *C. calceolus* (3 компонента), так и от *C. macranthon* (2 компонента). На электрофореграмме гибридной особи № 3 присутствуют 3 компонента от *C. calceolus* и 3 – от *C. macranthon*. Таким образом, в каждом из трех изученных гибридов присутствуют компоненты от *C. calceolus*, а у двух из них четко видны компоненты от обоих родительских видов (рис. 3).

Анализ данных ISSR показал, что в изученной симпатрической популяции наименьшее генетическое сходство выявлено между тремя исследованными видами (табл. 2). Особи *C. calceolus* характеризовались наиболее высокой генетической однородностью, а *C. × ventricosum* – наиболее низкой, по сравнению с двумя другими видами (табл. 2). Полученные нами результаты по внутривидовой изменчивости (71–97%) соответствуют данным других исследований, полученных при изучении популяций *C. calceolus* в Восточной Европе (Opitz, 2016) и *C. japonicum* в Восточной Азии (Qian et al., 2014; Tian et al., 2018) с использованием метода ISSR. Согласно этим литературным данным, у *C. calceolus* в Восточной Европе внутривидовая генетическая дифференциация составляла 80.5%, что выше, чем в изученной нами популяции этого вида. Внутривидовая генетическая изменчивость *C. japonicum* в трех районах Восточной Азии (Китай, Япония, Корея) имела значения генетической дивергенции, составившие 71–89%, что

Таблица 2. Взаимосвязь видов рода *Cypripedium* (Orchidaceae) на основе ISSR
Table 2. The relationship of species of the genus *Cypripedium* (Orchidaceae) based on ISSR

Источник вариации Source of variation		Df*	Генетическое расстояние** Genetic distance	P-value***
Между видами Between species		2	0.569	<0.001
Внутри видов Within species	<i>C. calceolus</i>	2	0.03	<0.05
	<i>C. macranthum</i>	2	0.225	<0.05
	<i>C. ventricosum</i>	2	0.29	<0.05

Примечание. Статистические параметры: Df* — степени свободы; ** — генетическое расстояние (по Nei, Li, 1979); ***P-value — уровень достоверности отличий.

Note. Statistical parameters: Df* — degrees of freedom; ** — genetic distance (Nei, Li, 1979); ***P-value — level of significance of differences.

сопоставимо с полученными нами данными для трех видов рода.

методами”, № государственной регистрации проекта AAAA-A17-117012610051-5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в исследованной симпатрической популяции в Новосибирской области нами подтверждено наличие гибрида *C. × ventricosum*. Число таких гибридных особей сопоставимо с числом особей у малочисленного *C. calceolus*. Наиболее многочисленны в данном местообитании представители *C. macranthum*, число особей которого сопоставимо с числом *C. × ventricosum* и *C. calceolus*, вместе взятых. По числу цветков на генеративном побеге гибрид занимает промежуточное положение, а размеры губы цветка сопоставимы с таковыми у *C. macranthum*. По размерам листовой пластинки *C. × ventricosum* имел сходство с *C. calceolus*. Зрелые генеративные особи *C. × ventricosum* формировали наиболее крупные куртины по сравнению с родительскими видами, что, вероятно, обусловлено эффектом гетерозиса и может способствовать укреплению его ценотической роли.

Анализ межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR-маркеров) показал, что в исследованной популяции внутривидовая изменчивость была более низкой, чем межвидовая. Разработаны праймеры, позволяющие эффективно выявлять генетический полиморфизм у представителей рода *Cypripedium*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Ю.А. Панову за помощь в поиске ценопопуляции орхидей в Искитимском районе Новосибирской области.

Работа выполнена в рамках государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН “Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [Andronova et al.] Андропова Е.В., Мачс Э.М., Филиппов Е.Г. 2016. Генетический полиморфизм *Cypripedium calceolus*, *C. macranthum*, *C. shanxiense*, *C. × ventricosum* (Orchidaceae) по данным пиросеквенирования. — В сб.: Материалы XV Международной научно-практической конференции “Молекулярные методы в исследовании растений и хемосистематика таксонов”. Сб. науч. ст. по материалам XV Междунар. науч.-практ. конф “Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии” (Барнаул, 23–26 мая 2016 г.). Барнаул. С. 95–100.
- [Andronova et al.] Андропова Е.В., Мачс Э.М., Филиппов Е.Г., Райко М.П., Янг-Ай Ли, Аверьянов Л.В. 2017. Филогеография таксонов рода *Cypripedium* (Orchidaceae) на территории России. — Бот. журн. 102(8): 1027–1059.
<https://doi.org/10.1134/S0006813617080014>
- [Averyanov] Аверьянов Л.В. 1999. Род башмачок — *Cypripedium* (Orchidaceae) на территории России. — Turczaninovia. 2(2): 5–40.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation of fresh leaf tissue. — Phytochemistry Bull. 19: 11–15.
- [Filippov, Andronova] Филиппов Е.Г., Андропова Е.В. 2011. Генетическая дифференциация представителей рода *Cypripedium* России по данным изоферментного анализа. — Генетика. 47(5): 615–623.
- Karasawa K., Aoyama M. 1986. Karyomorphological studies on *Cypripedium* in Japan and Formosa. — Bull. Hiroshima Bot. Gard. 31: 1–22.
- [Knyazev et al.] Князев М.С., Куликов П.В., Князева О.И., Семериков В.Л. 2000. О межвидовой гибридизации (Orchidaceae) и таксономическом статусе *C. ventricosum*. — Бот. журн. 85(5): 94–102.
- [Krasnaya... Amurskoy...] Красная книга Амурской области
<https://cicon.ru/krasnaya-kniga-amurskoibl.html>
(дата обращения: 11. 2019.)
- [Krasnaya... Respubliki Sakha] Красная книга Республики Саха (Якутия). 2017. Редкие и находящиеся под

- угрозой исчезновения виды растений и грибов. М. 412 с.
- [Krasnaya... Rossiiskoi...] Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). 2008. М. 855 с.
- [Krasnikov] Красников А.А. 2004. Методика приготовления временных давленных препаратов для подсчета хромосом растений. — В сб.: Проблемы кариологии, кариосистематики и молекулярной систематики растений. Новосибирск. 10 с.
- Kull T. 1999. *Cypripedium calceolus* L. — J.Ecol. 87: 913–924.
- Mann H.B., Whitney D.R. 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. — Ann. Math. Stat. P. 50–60.
- Nei M., Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76(10): 5269–5273.
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. — Mol. Ecol. 13: 1143–1155.
- Opitz A. 2016. Populationsgenetische Untersuchungen an hessischen Populationen von *Cypripedium calceolus* L. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) am Fachbereich 08: Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen Institut für Botanik AG Spezielle Botanik vorgelegt von Diplom-Biologe. Wissemann eingereicht im November 2016. 115 p. http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2017/12491/pdf/OpitzAndreas_2017_02_14.pdf
- Peer V.Y., Wachter R.D. 1994. TREECON for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. — Comput. Appl. Biosci. 10: 569–570.
- [Probatova, Sokolovskaya] Пробатова Н.С., Соколовская А.П. 2006. — В кн.: Флора российского Дальнего Востока. Дополнения и изменения к изданию “Сосудистые растения советского Дальнего Востока”. Т. 1–8 (1985–1996). Владивосток. С. 283.
- Qian X., Li Q.-J., Liu F., Gong M.-J., Wang C.-X., Tian M. 2014. Conservation Genetics of an Endangered Lady's Slipper Orchid: *Cypripedium japonicum* in China. — Int J Mol Sci. 2014 Jul; 15(7): 11578–11596. Published online 2014 Jun 30. <https://doi.org/10.3390/ijms150711578>
- [Red... Jewish...] Красная книга Еврейской автономной области. Растения и грибы. 2006. Новосибирск. 247 с.
- [Shennikov] Шенников А.П. 1964. Введение в геоботанику. Изд-во ЛГУ. 446 с.
- [Stepanov] Степанов Н.В. 1994. Числа хромосом некоторых таксонов высших растений флоры Красноярского края. — Бот. журн. 79(2): 135–139.
- Tian H.Z., Han L.X., Zhang J.L., Li X.L., Kawahara T., Yukawa T., López-Pujol J., Kumar P., Chung M.G., Chung M.Y. 2018. Genetic diversity in the endangered terrestrial orchid *Cypripedium japonicum* in East Asia: Insights into population history and implications for conservation. — Scientific Reports. 8 (6467). <https://www.nature.com/articles/s41598-018-24912-z> Accessed: 12-2019
- [Volkova et al.] Волкова С.А., Горовой П.Г., Ткаченко К.Г. 2003. Числа хромосом представителей некоторых семейств флоры Командорских островов. — Бот. журн. 88(8): 115–116.

MORPHOMETRIC AND MOLECULAR ANALYSIS OF *CYPRIPEDIUM* × *VENTRICOSUM* (ORCHIDACEAE) POPULATION IN THE NOVOSIBIRSK REGION

A. Nabieva^{a, #}, E. Zhmud^a, I. Kuban^a, and O. Dorogina^a

^a Central Siberian Botanical Garden SB RAS
Zolotodolinskaya Str., 101, Novosibirsk, 630090, Russia

[#]e-mail: sibflower05@gmail.com

A comparative study of morphometric parameters and molecular genetic markers was carried out in species of the genus *Cypripedium* (Orchidaceae) *C. calceolus* and *C. macranthum* as well as their hybrid, co-growing within the same population in the Novosibirsk Region. The ISSR primers were identified to make it possible to determine the genetic polymorphism in the *Cypripedium* species of the *C. calceolus* and *C. macranthum* affinity. The occurrence of hybrids of *C. calceolus* with *C. macranthum* in the Iskitim District of the Novosibirsk Region was confirmed.

Keywords: *Cypripedium*, hybridization, microsatellite DNA, ISSR, Novosibirsk Region

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Yuri Alexandrovich Panov for assistance in finding the orchid cenopopulation of in the Iskitim District of the Novosibirsk Region. This work was carried out as a part of the state assignment of the Central Siberian Botanical Garden of the SB RAS “Assessment of the morphogenetic po-

tential of plant populations of North Asia by experimental methods”, the project No. AAAA-A17-117012610051-5.

REFERENCES

- Andronova E.V., Machs E.M., Filippov E.G. 2016. Genetic polymorphism of *Cypripedium calceolus*, *C. macran-*

- thon, *C. shanxiense*, *C. × ventricosum* (Orchidaceae) inferred from pyrosequencing data. — In: Sbornik nauchnykh statei po materialam XV Mezhdunarodnoi nauchno-practicheskoy konferentsii “Problemy Botaniki Yuzhnoi Sibiri i Mongolii” “Molekularnie metody v issledovanii rasteniy i khemosistematika taksonov”. (Barnaul, 23–26 may 2016). Barnaul. P. 95–100 (In Russ.).
- Andronova E.V., Machs Ed.M., Filippov E.G., Raiko M.P., Yung-I. L., Averyanov L.V. 2017. Phylogeography of the genus *Cypripedium* (Orchidaceae) taxa in Russia. — *Botanicheskii zhurnal*. 102(8): 1027–1059 (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0006813617080014>
- Averyanov L.V. 1999. Rod bashmachok — *Cypripedium* (Orchidaceae) na territorii Rossii [Genus *Cypripedium* (Orchidaceae) in the Russia]. — *Turczaninovia*. 2(2): 5–40 (In Russ.).
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation of fresh leaf tissue. — *Phytochemistry Bull*. 19: 11–15.
- Filippov E.G. Andronova E.V. 2011. Genetic differentiation in plants of the genus *Cypripedium* from Russia inferred from allozyme data. — *Genetics*. 47(5): 615–623 (In Russ.).
- Karasawa K., Aoyama M. 1986. Karyomorphological studies on *Cypripedium* in Japan and Formosa. — *Bull. Hiroshima Bot. Gard*. 31: 1–22.
- Knyazev M.C., Kulikov P.V., Knyazeva O.I., Semerikov V.L. 2000. On interspecific hybridization (Orchidaceae) and taxonomic status *C. ventricosum*. — *Botanicheskii zhurnal*. 85(5): 94–102 (In Russ.).
- Krasnaya kniga Amurskoi oblasti. [Red Book of the Amur Region] <https://cicon.ru/krasnaya-kniga-amurskoibl.html>. Accessed 11. 2019 (In Russ.).
- Krasnaya kniga Respubliki Sakha (Yakutiya). 2017. Redkiye i nakhodyashiesya pod ugrozoy ischeznoveniya vidy rasteniy i gribov [The Red Book of the Republic of Sakha (Yakutia). Rare and endangered species of plants and mushrooms]. Moscow. 412 p. (In Russ.).
- Krasnaya kniga Rossiiskoi Federatsii (rasteniya i griby) 2008. [Red Data Book of the Russian Federation (plants and fungi)]. Moscow. 855 p. (In Russ.).
- Krasnikov A.A. 2004. Metodika prigotovleniya vremennyykh davlenykh preparatov dlya podscheta khromosom rasteniy [Methods of preparing temporary squeezed preparations for counting plant chromosomes]. — *Problemy kariologii, karosistematiki i molekulyarnoy sistematiki rasteniy*. Novosibirsk. 10 p. (In Russ.).
- Kull T. 1999. *Cypripedium calceolus* L. — *J. Ecol* 87: 913–924.
- Mann H.B., Whitney D.R. 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. — *Ann. Math. Stat.* P. 50–60.
- Nei M., Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 76(10): 5269–5273.
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. — *Mol. Ecol*. 13: 1143–1155.
- Opitz A. 2016. Populationsgenetische Untersuchungen an hessischen Populationen von *Cypripedium calceolus* L. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) am Fachbereich 08: Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen Institut für Botanik AG Spezielle Botanik vorgelegt von Diplom-Biologe. Wissemann eingereicht im November 2016. 115 p. http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2017/12491/pdf/OpitzAndreas_2017_02_14.pdf
- Peer V.Y., Wachter R.D. 1994. TREECON for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. — *Comput. Appl. Biosci*. 10: 569–570.
- Probatova N.S., Sokolovskaya A.P. 2006. Flora of the Russian Far East. Addenda and corrigenda to “Vascular plants of the Soviet Far East”. Vol. 1–8 (1985–1996). Vladivostok. 283 p. (In Russ.).
- Qian X., Li Q.-J., Liu F., Gong M.-J., Wang C.-X., Tian M. 2014. Conservation Genetics of an Endangered Lady’s Slipper Orchid: *Cypripedium japonicum* in China — *Int J Mol Sci*. 2014 Jul; 15(7): 11578–11596. Published online 2014 Jun 30. <https://doi.org/10.3390/ijms150711578>
- Red Data Book of the Jewish Autonomous Region. Rare and Endangered Species of Plants and Mushrooms. 2006. Novosibirsk. 247 p. (In Russ.).
- Shennikov A.P. 1964. Vvedeniye v geobotaniku [Introduction to Geobotany]. Leningrad. 446 p. (In Russ.).
- Stepanov N.V. 1994. Chromosome numbers of some taxa of higher plants of the flora of the Krasnoyarsk Territory. — *Botanicheskii zhurnal*. 79(2): 135–139 (In Russ.).
- Tian H.Z., Han L.X., Zhang J.L., Li X.L., Kawahara T., Yukawa T., López-Pujol J., Kumar P., Chung M.G., Chung M.Y. 2018. Genetic diversity in the endangered terrestrial orchid *Cypripedium japonicum* in East Asia: Insights into population history and implications for conservation. — *Scientific Reports*. 8(6467). <https://www.nature.com/articles/s41598-018-24912-z> Accessed: 12-2019
- Volkova S.A., Gorovoy P.G., Tkachenko K.G. 2003. Chromosome numbers of representatives of some families of the Commander Islands flora. — *Botanicheskii zhurnal*. 88 (8): 115–116 (In Russ.).