

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ
РАЗНООБРАЗИЕ ПОПУЛЯЦИЙ *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. (Orchidaceae)
НА ЕВРОПЕЙСКОМ СЕВЕРО-ВОСТОКЕ РОССИИ (РЕСПУБЛИКА КОМИ)**

© 2019 г. О. Е. Валуйских¹, *, Д. М. Шадрин¹, Я. И. Пылина¹

¹Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук, Сыктывкар, 167982 Россия

*e-mail: valuyskikh@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 21.02.2018 г.

После доработки 23.04.2018 г.

Принята к публикации 03.05.2018 г.

С использованием метода ISSR-PCR проведены исследования генетического разнообразия и структуры 10 популяций орхидеи *G. conopsea* в Республике Коми, где вид находится на северной границе своего ареала и демонстрирует высокий уровень фенотипической изменчивости. Установлено, что реакция особей *G. conopsea* на недостаток тепла выражается в уменьшении величин наиболее пластичных признаков фенотипа (высота побега, длина соцветия, число цветков, размеры листьев) и определяет четкую морфологическую дифференциацию популяций в разных по температурному режиму карстовых ландшафтах Тиманского кряжа. Два ISSR-праймера позволили выделить 839 локусов, из них доля полиморфных – 37.79%. Анализ UPGMA разделил всю совокупность популяций *G. conopsea* на два кластера: популяции на известняках Тиманского кряжа (180 растений) и группу особей на Вычегодско-Мезенской равнине (20 растений). Оценка генетической изменчивости позволила выявить пониженные показатели для популяции *G. conopsea* с Вычегодско-Мезенской равнины ($P = 26.94\%$, $H_e = 0.050$, $I_s = 0.084$). На известняках Южного Тимана для вида характерны как высоковариабельные популяции ($P = 55.5–60.6\%$, $H_e = 0.084–0.089$), так и с пониженными показателями генетической изменчивости ($P = 29.3–29.6\%$, $H_e = 0.053–0.059$), при этом, несмотря на разнообразие карстовых ландшафтов и территориальную разобщенность выборок, между ними существует достаточно активный поток генов ($D = 0.007–0.020$, $I = 0.980–0.993$). Тест Мантела не выявил корреляции между генетическими и географическими расстояниями ($r = -0.047$; $p = 0.04$). Установлено, что большая часть выявленной генетической изменчивости *G. conopsea* реализуется внутри популяций, а на долю межпопуляционной составляющей приходится 14%. Анализ генетических взаимоотношений на основе программы Structure позволил разделить выборку по принадлежности к двум географическим районам, а также предположить, что на Южном Тимане существуют минимум четыре генетически обособленные группы. Очевидной связи между типом карстовых ландшафтов, морфологической изменчивостью и генетическим разнообразием популяций не обнаружено.

Ключевые слова: *Gymnadenia conopsea*, граница ареала, морфологические признаки, ISSR-маркеры, генетическое разнообразие, полиморфизм.

DOI: 10.1134/S0016675819020164

Тиманская гряда (Тиман) представляет собой крупную орографическую структуру на северо-востоке европейской части России сильно эродированных, местами почти сглаженных холмистых возвышенностей с преобладающими высотами 250–300 м. Некоторые участки Тимана включены в систему охраняемых природных территорий Республики Коми и играют важную роль в сохранении биологического разнообразия [1]. История формирования растительного покрова этой территории под влиянием покровного оледенения, неоднократно повторяющегося в плейстоцене [2], разнообразные формы рельефа и широкий

диапазон температурных условий на известняковых обнажениях [3], отсутствие существенного антропогенного воздействия определяют возможность существования здесь большого числа редких видов растений. Многие эндемики Арктики, Урала и европейского северо-востока России представлены на Тимане краевыми или изолированными популяциями, оторванными от основного ареала [4], и входят в состав реликтового скального флористического комплекса [5, 6]. Длительное обособленное существование пограничных популяций должно обеспечиваться поддержанием достаточно высокого уровня генети-

ческого разнообразия, которое служит основой для эволюционных изменений [7]. Их генетическая структура зависит от способа размножения растений и репродуктивного успеха, размера и географического местоположения популяций, скорости мутаций, потоков генов между популяциями и других факторов, обеспечивающих способность видов стабильно существовать и адаптироваться к условиям изменения окружающей среды [8–10].

Среди представителей семейства Orchidaceae, распространение которых вблизи северных границ ареалов чаще всего связано с выходами кальцийсодержащих пород, на известняках Тиманского кряжа отмечены шесть видов [11, 12]. Приуроченность этих таксонов к растительным сообществам карстовых ландшафтов различна. Наиболее широкой эколого-ценотической амплитудой и встречаемостью в разных типах экотопов обладает *Gymnadenia conopsea* (кокушник комарниковый) — широко распространенный в Европе и Азии вид наземных орхидей. На территории Республики Коми он находится вблизи северной границы своего ареала [13] и нуждается в биологическом надзоре [4]. Краевые популяции *G. conopsea* в регионе, помимо Урала, приурочены к карбонатным возвышенностям Тиманского кряжа и входят в состав реликтового скального флористического комплекса. Широкая экологическая амплитуда позволяет этому виду занимать различные местообитания в карстовых ландшафтах — осыпные известняковые склоны разной экспозиции и, реже, луга в долинах рек. В отличие от других северных регионов, где *G. conopsea* образует небольшие малочисленные пограничные популяции [14, 15], в Республике Коми численность популяций этого вида насчитывает от нескольких сотен до тысячи и более особей. Отнесение *G. conopsea* к семейству Orchidaceae, наличие многочисленных дефинитивных популяций на границе ареала, принадлежность к реликтовому скальному флористическому комплексу определяют интерес в исследовании биологии, экологии и генетической структуры этого вида.

Ранее были исследованы особенности онтогенеза и поливариантность развития особей *G. conopsea*, структура и динамика ценопопуляций, изменчивость морфометрических признаков растений на известняках европейского северо-востока России [16–19]. Учитывая высокую фенотипическую изменчивость и резко выраженную дифференциацию популяций *G. conopsea* на известняках Тиманского кряжа по морфологическим признакам, нами была выдвинута гипотеза о существовании согласованной с фенотипом генетической дивергенции этих популяций. Таким образом, цель настоящей работы заключалась в изучении генетического разнообразия и дифференциации популяций *G. conopsea* с помощью ISSR-марке-

ров, а также в сопоставлении морфологической и генетической изменчивости этого вида на известняках европейского северо-востока России. Несмотря на интерес к комплексу *G. conopsea* s. l., исследований, направленных на определение генетической структуры этого вида с помощью межмикросателлитных маркеров, ранее не проводилось. ISSR-анализ успешно применяется для изучения генетики популяций многих видов сосудистых растений, в том числе орхидных [20–22 и др.], позволяет оценить полиморфизм локусов и выявить основные показатели генетического разнообразия популяций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. *Gymnadenia conopsea* — многолетнее травянистое растение высотой 13–35 см. Цветет в первой-второй декаде июля, массовое цветение отдельной популяции длится около двух недель. Для вида характерно перекрестное опыление посредством энтомофилии (дневные и ночные бабочки), автогамия встречается редко [23, 24]. Размножается преимущественно семенами, вегетативное размножение в природе встречается крайне редко [25]. Семена мелкие, не имеют периода покоя и способны прорасти сразу после попадания в почву при наличии микосимбионта [26]. Имеет высокие показатели семенной продуктивности и доли полноценных семян в Республике Коми [27].

Район исследований и отбор образцов. Сбор материала проводили в природных популяциях¹ *G. conopsea* (экспедиционный выезд осуществлен в июле 2016 г.) на территории Республики Коми в разных орографических районах: Южный Тиман и Вычегодско-Мезенская равнина (рис. 1,а). На Южном Тимане (Республика Коми, окрестности пос. Троицко-Печорск) исследовано девять популяций *G. conopsea* в долинах рек Сойва и Омра, где вид встречается на разнотравно-злаковых лугах, а также в редколесьях (травяно-зеленомошнеловых, сосновых, березовых и березово-лиственничных) и травяно-кустарничковых группировках скальной растительности (табл. 1). Исследованные популяции располагались в нескольких типах карстовых ландшафтов: на склоновых участках северной и северо-западной экспозиции, южной и юго-западной экспозиции, а также на выположенных поверхностях в долинах рек (рис. 1,б). Минимальное расстояние между популяциями составляло 0,2 км (Л3 и С5), максимальное — 3,5 км (Ю4 и Ю9). Для оценки уровня межпопуляционного полиморфизма в анализ включены растения из заболоченного смешанного леса с

¹ Под популяцией в настоящей работе мы понимали совокупность особей данного вида в пределах одного ценоза (ценотическая популяция) [28].

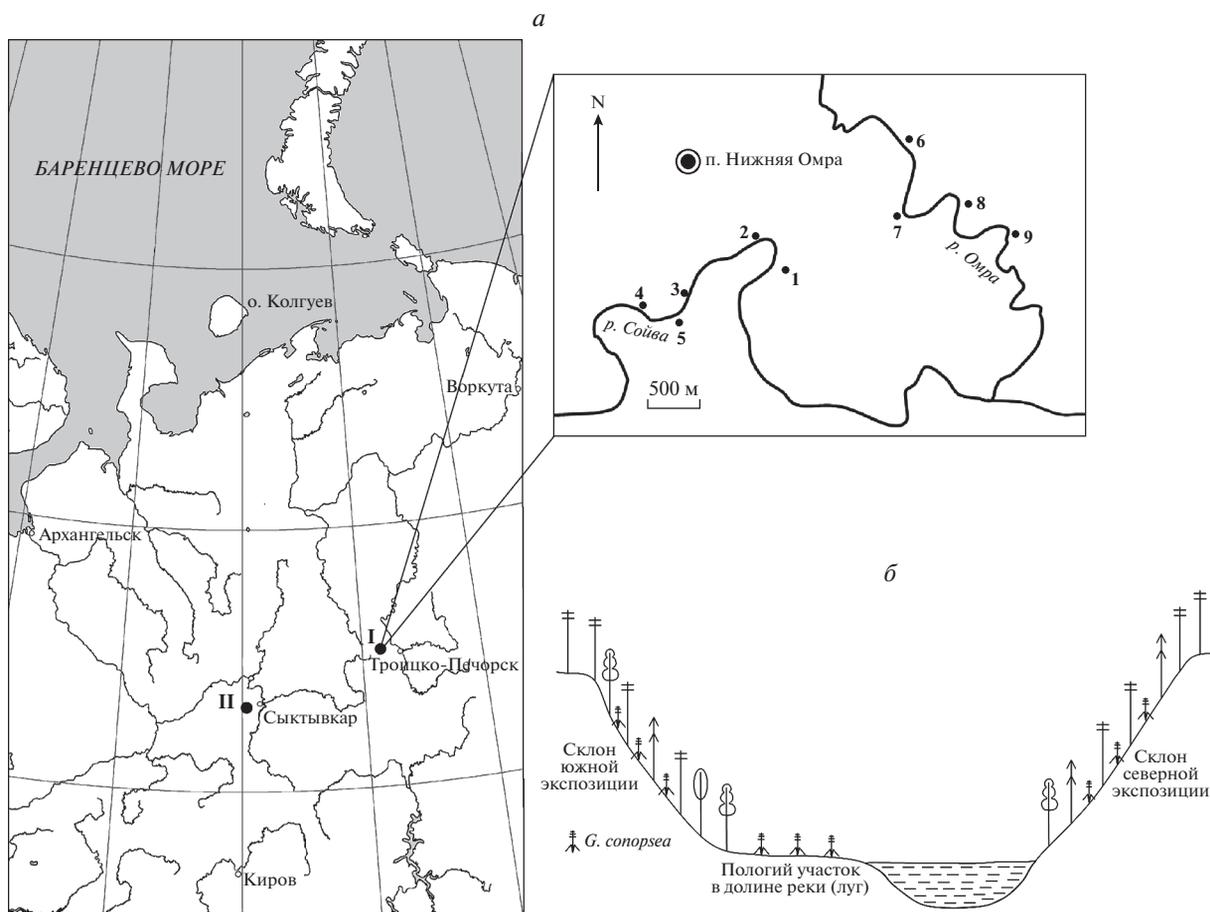


Рис. 1. Расположение точек сбора материала на европейском северо-востоке России (а) и схематическое изображение карстовых ландшафтов (б). I – Южный Тиман; II – Вычегодско-Мезенская равнина. Номера популяций, обозначенные по рекам Сойва и Омра, соответствуют табл. 1.

Вычегодско-Мезенской равнины (Республика Коми, окрестности г. Сыктывкар). Всего исследовано 200 генеративных растений *G. conopsea* из 10 популяций (по 20 особей из каждой популяции). Выбор растений происходил случайным образом по всей площади популяции в пределах экотопа, но не более двух экземпляров из одного скопления. У каждой особи отбирался лист срединной формации и фиксировался для генетического анализа, а растение гербаризировалось с присвоением номера.

Анализ морфологических признаков. Исследовано 200 особей из 10 популяций *G. conopsea*. В каждой популяции у 20 генеративных растений проанализированы семь количественных признаков: измерены высота побега до соцветия, длина соцветия, длина и ширина листовой пластинки второго листа срединной формации, подсчитаны число листьев верховой и срединной формации, число цветков. Статистическую обработку данных проводили методами дискриминантного и

дисперсионного анализа при помощи IBM SPSS Statistic 22 и Excel надстройки ExcelToR [29].

ISSR-анализ. Всего проанализировано 200 образцов *G. conopsea*. Суммарная ДНК была выделена из свежих листьев с помощью набора реагентов “Сорб-ГМО-Б” (Синтол, Россия) согласно протоколу производителя. Амплификацию проводили в финальном объеме 25 мкл. Реакционная смесь включала флуоресцентно-меченный праймер (Applied Biosystems, США) – 10 мкл (0.3 мкмоль/л), 5 мкл 5× смеси для ПЦР с *Taq*-полимеразой-qPCRMix-HS (Евроген, Россия), 9 мкл воды, свободной от нуклеаз (Ambion, США), 1 мкл ДНК (10 нг). Использовали два праймера ISSR-1.2 ((GT)₇-YG) и ISSR-AG8 ((AG)₈-YT), меченных FAM [30, 31]. Применяли следующий температурный режим полимеразной цепной реакции (ПЦР): начальная денатурация – 5 мин при 94°C; пять циклов по схеме: 90°C (30 с), 45°C (60 с), 72°C (90 с); 27 циклов по схеме: 90°C (30 с), 55°C (45 с), 72°C (60 с) и конечная элонгация 5 мин при 72°C. Далее 0.5 мкл стандарта GeneScan

Таблица 1. Места сбора образцов и характеристика популяций *G. conopsea*

№ п/п	Код популяции*	Местоположение/Эколого-ценотические условия	Координаты	Характеристика популяции**
1	С1	Южный Тиман, левый берег р. Сойва/Средняя часть склона северо-западной экспозиции, крутизна 40°–45°. Еловое редколесье костянично-зеленомошное	62°44'995" 55°50'468" 161 м над ур. м.	>1000, 9.7
2	Л2	Южный Тиман, левый берег р. Сойва/Участок низкой поймы в долине реки. Манжетково-разнотравный луг	62°45'129" 55°50'292" 136 м над ур. м.	200–300, 8.9
3	Л3	Южный Тиман, левый берег р. Сойва/Участок низкой поймы в долине реки у подножия склона. Разнотравно-злаковый луг	62°44'880" 55°49'490" 135 м над ур. м.	200–300, 8.2
4	Ю4	Южный Тиман, левый берег р. Сойва/Средняя часть склона южной экспозиции, крутизна 45°–50°. Березовое редколесье	62°44'768" 55°49'036" 150 м над ур. м.	>500, 7.6
5	С5	Южный Тиман, правый берег р. Сойва/Средняя часть склона северной экспозиции, крутизна 45°. Подрост <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Picea obovata</i> , <i>Betula pendula</i>	62°44'773" 55°49'516" 176 м над ур. м.	>1000, 11.2
6	Л6	Южный Тиман, левый берег р. Омра/Участок низкой поймы в долине реки у подножия склона. Пойменный злаково-разнотравный луг	62°45'534" 55°51'840" 143 м над ур. м.	200–300, 4.3
7	С7	Южный Тиман, правый берег р. Омра/Средняя часть склона северной экспозиции, крутизна 40°–45°. Елово-сосновое редколесье	62°45'218" 55°51'931" 177 м над ур. м.	>1000, 9.2
8	Ю8	Южный Тиман, левый берег р. Омра/Средняя часть склона юго-западной экспозиции, крутизна 30°. Еловое редколесье травянисто-лишайниково-зеленомошное	62°45'263" 55°52'328" 181 м над ур. м.	>500, 7.7
9	Ю9	Южный Тиман, левый берег р. Омра/Верхняя часть склона юго-западной экспозиции, крупнообломочная осыпь крутизной 40°. Единичные деревья <i>Pinus sylvestris</i>	62°45'112" 55°52'919" 140 м над ур. м.	>300, 5.6
10	ВМ10	Вычегодско-Мезенская равнина/Заболоченный еловый вахтово-осоково-гипновый сфагновый лес	61°37'505" 50°40'498" 110 м над ур. м.	<200, 2.4

* Обозначены популяции со склонов северной и северо-западной экспозиции (С1, С5, С7), южной и юго-западной экспозиции (Ю4, Ю8, Ю9), лугов в долинах рек (Л2, Л3, Л6) Южного Тимана, а также заболоченного леса с Вычегодско-Мезенской равнины (ВМ10).

** Представлены сведения о численности (шт.) и плотности особей (шт./м²) в популяциях.

Liz 1200 (Applied Biosystems) и 0.5 мкл продукта реакции амплификации растворяли в 9 мкл Hi-Di формамида (Applied Biosystems). Затем полученные образцы анализировали на генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) на базе ЦКП “Молекулярная биология” Института биологии Коми НЦ УрО РАН (г. Сыктывкар). Полученные электрофореграммы были обработаны с использованием внутреннего стандарта в программе GeneMapper 4.0 (Applied

Biosystems) для установления длин полученных фрагментов. ISSR-маркеры относятся к маркерам доминантного типа наследования, полиморфизм которых тестируется по наличию/отсутствию фрагмента. В анализ были включены фрагменты размером от 20 до 1200 пн. Наличие или отсутствие фрагментов кодировали как “1” или “0” соответственно. В последующий анализ включены только информативные (полиморфные) маркеры.

Статистическая обработка результатов. Были проанализированы две выборки: первая включала 200 образцов из всех 10 популяций, вторая – 180 образцов только из популяций с Южного Тимана. Молекулярный дисперсионный анализ (AMOVA) был выполнен в среде R с использованием пакета “poppr” [32]. Анализ генетической структуры исследуемых образцов проводили с помощью дискриминантного анализа главных компонент (DAPC) с использованием пакета adegenet в программной среде R [33]. Выполнили два варианта DAPC с использованием и без использования априорных данных о происхождении образцов. Оптимальное число главных компонент (PC) определяли с помощью рекомендаций Т. Jombart [34]. Наименьшие из полученных значений использовали в анализе DAPC. Для оценки оптимального количества кластеров применяли Байесовский информационный критерий (Bayesian Information Criterion).

Оценку генетической дифференциации выборки проводили в специализированном макросе GenAlEx 6.5 для MS-Excel [35] с определением числа полиморфных (N_e) и редких (N_p) аллелей, информационного индекса Шеннона (I_s), ожидаемой гетерозиготности (H_e), генетического расстояния (D) между популяциями [36], а также с использованием анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) с определением уровня внутри- и межпопуляционной изменчивости и др. Зависимость потока генов от географического расстояния оценивали тестом Мантелла [37]. Кластеризация выполнена в программе Past 3 [38] методом невзвешенного парно-группового усреднения (UPGMA).

Оценку популяционной структуры выполняли с помощью программы Structure 2.3 [39, 40]. Программа позволяет оценить генетическую структуру популяций и вероятность нахождения каждой особи в составе того или иного кластера K , в пределах которого отклонение от равновесия Харди–Вайнберга было бы минимальным. Анализ осуществляли с использованием двух моделей кластеризации: “admixture” (допускающую обмен генетической информацией между популяциями) и “no admixture” (с запретом на обмен генетической информацией между популяциями). Применяли следующие параметры: количество начальных “холостых” итераций (burn-in period) – 20000; количество итераций – 100000. С каждым набором настроек программу запускали по 29 раз для каждого значения K в диапазоне от 1 до 10. Остальные настройки были указаны в соответствии с рекомендациями авторов программы Structure для анализа доминантных маркеров [41]. Расчеты проводились на Вычислительном кластере Физико-математического института Коми НЦ УрО РАН (г. Сыктывкар). Наиболее вероятное значение K (гипотети-

ческого числа обособленных генетических групп в изучаемой выборке) определяли методом, предложенным в работе G. Evanno с соавт. [42]. Для численной оценки однородности (сходимости) результатов, полученных при независимых запусках Structure, использовали программу CLUMPP [43]. Визуализацию результатов расчета проводили с помощью программы DISTRUCT [44]. Для запуска двух последних программ использовался сервис, доступный на сайте <http://clumpak.tau.ac.il/index.html> [45].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологическая изменчивость

Мы исследовали проявление фенотипической изменчивости особей *G. conopsea* и вычислили средние значения семи морфометрических признаков (табл. 2). Максимальные значения высоты побега, длины соцветия, ширины листа, числа листьев срединной формации и цветков отмечены у особей *G. conopsea* в заболоченном лесу (BM10) и лугах (Л3, Л6) (рис. 2). Растения с минимальными показателями характерны для склонов северной (С5, С7) и южной (Ю9) экспозиции. Комплекс семи признаков проанализирован методом канонического дискриминантного анализа (рис. 3). Вдоль первой оси дискриминантной функции группа особей с более “теплых” популяций на лугах (Л2, Л3) и заболоченного леса (BM10) хорошо обособляется от особей со склонов (Ю9, С1, С7). Остальные облака распределения особей перекрываются и в осях координат занимают промежуточное положение. Наибольшую корреляцию с первой канонической осью (64.1% общей дисперсии) показали следующие параметры: число цветков (0.72), число листьев (0.68), длина соцветия (0.53). Со второй осью (22.9% общей дисперсии) максимально коррелирует высота побега (0.70). Остальные морфологические признаки вносят меньший вклад в разделение популяций.

Фенология

Установлено, что у популяций *G. conopsea*, расположенных в разных экотопах, различаются сроки наступления фенофаз, в частности цветения. Так, на лугах и южных склонах растения начинают зацветать в конце июня на 1–1.5 нед. раньше по сравнению с прохладными северными склонами, а в период массового цветения этих популяций на склонах северной экспозиции цветки раскрыты только у 40–50% особей, что связано с особенностями температурного режима экотопов. Растительные сообщества на южных склонах получают больше тепла (по сумме активных температур – на 24%) и существуют в более стабильном температурном режиме по сравне-

Таблица 2. Морфологические показатели особей *G. soroxea* в популяциях (средние значения ± стандартная ошибка): *F* – критерий Фишера о равенстве дисперсий; *p* – уровень значимости

Популяции	Высота побега, см	Длина соцветия, см	Число листьев	Число цветков	Длина листа, см	Ширина листа, см	Число листьев срединной формации	Число листьев верховой формации
C1	21.0 ± 0.7	7.45 ± 0.38	4.85 ± 0.15	21.6 ± 1.53	11.59 ± 0.6	0.56 ± 0.03	3.55 ± 0.11	1.3 ± 0.11
Л2	27.86 ± 0.83	10.06 ± 0.51	5.9 ± 0.19	42.55 ± 3.29	11.89 ± 0.44	0.71 ± 0.05	3.85 ± 0.18	2.05 ± 0.09
Л3	29.78 ± 0.87	12.28 ± 0.63	6.1 ± 0.22	56.4 ± 3.31	12.74 ± 0.5	0.79 ± 0.05	3.95 ± 0.11	2.15 ± 0.18
Ю4	26.01 ± 0.57	9.72 ± 0.33	6.35 ± 0.17	39.25 ± 2.11	13.04 ± 0.6	0.8 ± 0.06	4.3 ± 0.11	2.05 ± 0.11
C5	21.21 ± 0.8	8.26 ± 0.61	4.5 ± 0.15	24.85 ± 2.19	10.82 ± 0.36	0.52 ± 0.03	3.3 ± 0.11	1.2 ± 0.14
Л6	29.65 ± 0.87	10.22 ± 0.62	5.35 ± 0.2	30.5 ± 2.25	12.12 ± 0.49	0.8 ± 0.06	3.5 ± 0.15	1.85 ± 0.13
C7	22.45 ± 0.66	6.34 ± 0.29	3.9 ± 0.1	17.65 ± 1.14	11.71 ± 0.44	0.49 ± 0.03	3.65 ± 0.11	0.25 ± 0.12
Ю8	23.23 ± 0.91	8.39 ± 0.37	5.2 ± 0.17	23.2 ± 1.69	11.88 ± 0.44	0.6 ± 0.04	3.75 ± 0.12	1.45 ± 0.2
Ю9	20.8 ± 0.85	6.07 ± 0.4	3.95 ± 0.37	17.11 ± 1.17	11.87 ± 0.55	0.62 ± 0.04	3.44 ± 0.15	0.94 ± 0.21
ВМ10	35.55 ± 1.17	9.71 ± 0.46	5.68 ± 0.2	33.63 ± 2.43	14.72 ± 0.36	0.75 ± 0.05	4.16 ± 0.19	1.53 ± 0.27
<i>F</i>	31.325	16.310	18.310	31.362	4.638	7.077	5.468	13.398
<i>p</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C1, C5, C7	21.55 ± 0.42	7.35 ± 0.27	4.42 ± 0.09	21.37 ± 1.03	11.37 ± 0.28	0.52 ± 0.02	3.5 ± 0.07	0.92 ± 0.09
Ю4, Ю8, Ю9	23.35 ± 0.53	8.06 ± 0.29	5.17 ± 0.19	26.68 ± 1.57	12.26 ± 0.31	0.67 ± 0.03	3.84 ± 0.08	1.5 ± 0.12
Л2, Л3, Л6	28.09 ± 0.51	10.85 ± 0.36	5.78 ± 0.12	43.15 ± 2.19	12.25 ± 0.28	0.77 ± 0.03	3.77 ± 0.09	2.02 ± 0.08
ВМ А10	35.55 ± 1.17	9.71 ± 0.46	5.68 ± 0.2	33.63 ± 2.43	14.72 ± 0.36	0.75 ± 0.05	4.16 ± 0.19	1.53 ± 0.27
<i>F</i>	76.576	25.550	17.634	32.581	11.359	15.415	5.999	19.061
<i>p</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000



Рис. 2. Фенотипический облик растений *G. conopsea* из разных экотопов: 1 – заболоченный лес (BM10), 2 – разнотравный луг (L2), 3 и 4 – редколесье на склоне северной экспозиции (C7). Представлены гербарные образцы в период плодоношения.

нию со склонами северной ориентации [3]. Контрастность экологических условий обуславливает календарное несовпадение (частичное перекрытие) периода массового цветения популяций *G. conopsea*, что может ограничивать перекрестное опыление и поток генов между популяциями в градиенте экотопов и усиливать репродуктивную изоляцию.

Генетическая изменчивость и дистанции между популяциями

В результате проведения ПЦР с двумя выбранными ISSR-праймерами получено 839 локусов. На основе этих данных рассчитаны основные показатели генетического полиморфизма, отражающие уровень изменчивости в исследованных популяциях *G. conopsea* (табл. 3). Доля полиморфных локусов для отдельных популяций варьирует от 26.94 до 60.55% со средним значением 37.79%. Число редких аллелей (N_p) в популяциях изменя-

ется от 3 до 93, информационный индекс Шеннона (I_s) варьирует от 0.084 до 0.154.

В качестве меры генетической дифференциации популяций использовали индекс генетического расстояния (D) и генетической идентичности (I) между группами [36]. Оценка генетических расстояний между популяциями *G. conopsea* показала, что генетическая дистанция D варьировала от 0.007 до 0.062 (табл. 4). Наиболее близки по генетической структуре популяции с Южного Тимана (в среднем $D = 0.013$), среди которых минимальным расстоянием характеризуются L2 и L3, C5 и L6, Ю9 и L6 ($D = 0.007$). Высокую степень дивергенции проявляет популяция C1 с выборками L2 и C5 ($D = 0.020$). Наиболее обособленной выглядит популяция BM10 с Вычегодско-Мезенской равнины. Значения генетических дистанций между ней и остальными выборками варьируют в пределах 0.045–0.062, демонстрируют сравнительно высокую степень дифференциации популяций *G. conopsea* двух ботанико-географических районов и указывают на их относительную изолирован-

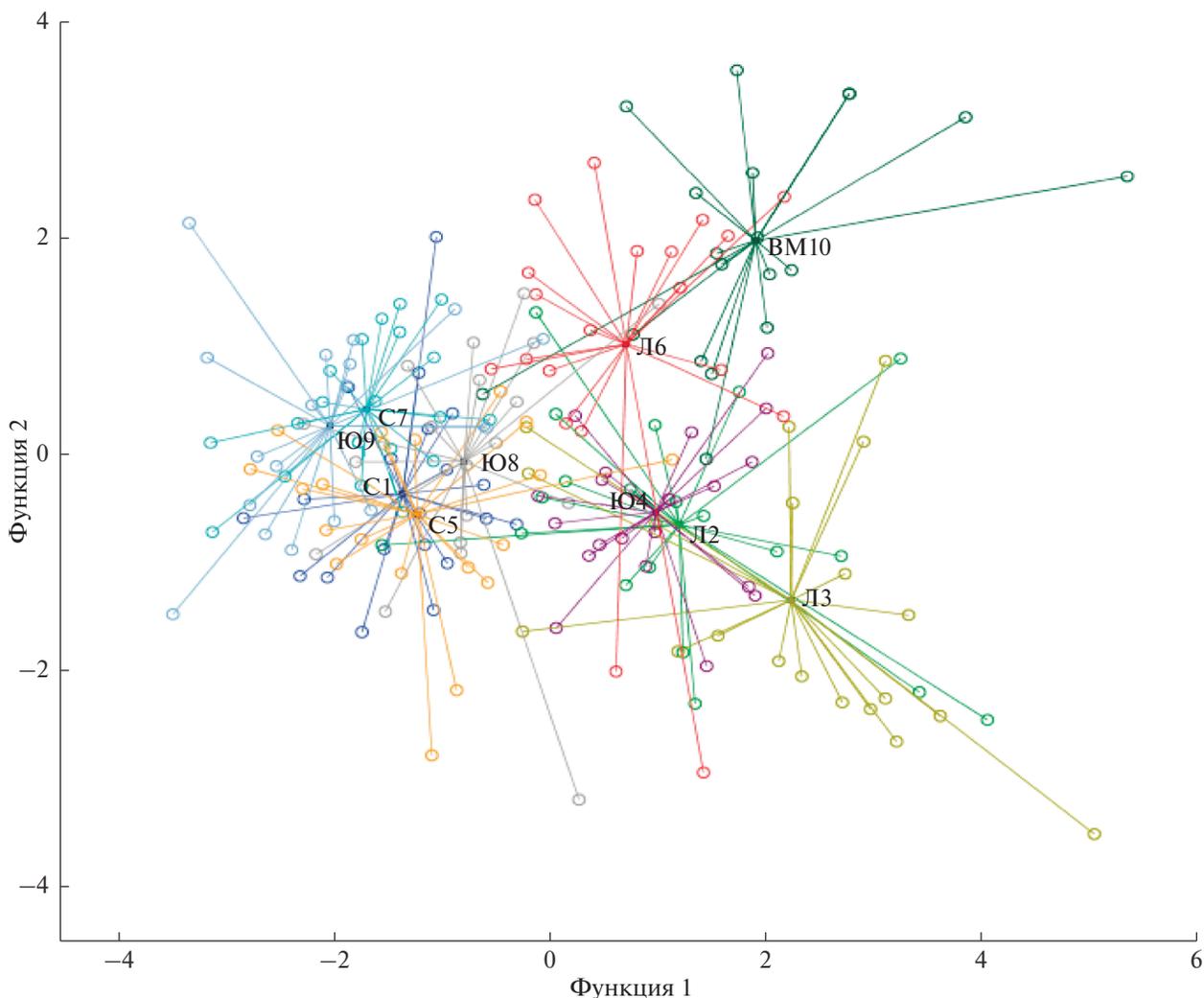


Рис. 3. Результаты дискриминантного анализа распределения особей *G. conopsea* по семи морфометрическим признакам.

ность. Значения показателя генетической идентичности *I* изменялись от 0.939 до 0.993 (табл. 4). Анализ молекулярной дисперсии (АМОВА) свидетельствует о том, что уровень инбридинга отдельной популяции относительно всей выборки значительно выше (табл. 5).

Для кластерного анализа методом UPGMA были использованы генетические дистанции между всеми исследованными популяциями (рис. 4). На дендрограмме генетического сходства популяций показано деление выборок на два кластера. Все популяции с известняков Южного Тимана объединялись в общий кластер, популяция с заболоченного леса на Вычегодско-Мезенской равнине формировала ветвь, дистально расположенную от предыдущего кластера (рис. 4,а). Кластер, объединяющий популяции № 1–9, сохраняет свою топологию как при совместном анализе с ВМ10, так и без нее (рис. 4,б). На графике видно, что Тиманские популяции образуют общую груп-

пу, в которой можно выделить кластер с популяциями Л2 и Л3, расположенными в однотипных экотопах на лугах. Во вторую группу попадают Ю4 и С5 из бассейна р. Сойва, а также популяции Л6, С7, Ю8, Ю9 из бассейна р. Омра. Согласно тесту Мантелла ($r = -0.047$; $p = 0.04$), корреляция значений генетических дистанций *D* и географического расстояния между популяциями *G. conopsea* на Южном Тимане отсутствует (рис. 5). Выявление генетической структуры популяций *G. conopsea* продолжили методом дискриминантного анализа главных компонент DAPC [34]. При PC = 13 обособленное положение сохраняют популяции С1 и ВМ10 (рис. 6). Особи из остальных популяций образуют четкое скопление на плоскости. В целом ординация популяций, показывающая генетические взаимоотношения между растениями *G. conopsea*, схожа с кластеризацией, полученной методом UPGMA.

Таблица 3. Показатели генетической изменчивости в популяциях *G. conopsea*, рассчитанные на основе частот аллелей ISSR-локусов

Популяция	<i>n</i>	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>N_p</i>	<i>H_e</i>	<i>I_s</i>
С1	20	472	55.54	54	0.089	0.154
Л2	20	262	29.56	7	0.059	0.097
Л3	20	314	36.11	14	0.064	0.108
Ю4	20	311	36.00	8	0.066	0.111
С5	20	253	29.32	5	0.053	0.089
Л6	20	280	32.06	8	0.055	0.093
С7	20	361	41.48	19	0.068	0.117
Ю8	20	521	60.55	93	0.084	0.149
Ю9	20	263	30.39	3	0.056	0.093
ВМ10	20	230	26.94	29	0.050	0.084
В среднем для популяций	20	326.7	37.79	24.0	0.066	0.109

Примечание. *n* – число проанализированных образцов; *N* – общее число локусов; *P* – доля полиморфных локусов, %; *N_p* – число редких аллелей; *H_e* – ожидаемая гетерозиготность; *I_s* – индекс информации Шеннона.

Таблица 4. Показатели генетической идентичности *I* (над диагональю) и генетического расстояния *D* (под диагональю) между популяциями *G. conopsea*, рассчитанные на основе частот аллелей ISSR-локусов

Популяция	С1	Л2	Л3	Ю4	С5	Л6	С7	Ю8	Ю9	ВМ10
С1		0.980	0.982	0.983	0.980	0.983	0.985	0.983	0.984	0.946
Л2	0.020		0.993	0.983	0.982	0.985	0.984	0.984	0.989	0.940
Л3	0.018	0.007		0.987	0.986	0.989	0.987	0.987	0.991	0.940
Ю4	0.018	0.017	0.013		0.987	0.987	0.988	0.987	0.990	0.939
С5	0.020	0.019	0.014	0.013		0.993	0.988	0.990	0.991	0.956
Л6	0.017	0.015	0.011	0.013	0.007		0.992	0.990	0.993	0.947
С7	0.015	0.016	0.013	0.012	0.012	0.008		0.990	0.990	0.943
Ю8	0.017	0.016	0.014	0.013	0.010	0.010	0.010		0.992	0.948
Ю9	0.016	0.012	0.009	0.010	0.009	0.007	0.010	0.008		0.950
ВМ10	0.056	0.062	0.062	0.062	0.045	0.054	0.059	0.053	0.051	

Таблица 5. Результаты анализа молекулярной дисперсии популяций *G. conopsea* (AMOVA)

Изменчивость	Степень свободы	Сумма квадратов	Процент дисперсии
Для всей выборки			
Между популяциями	9	1479.395	14
Внутри популяций	190	7315.950	86
Для тиманских популяций			
Между популяциями	8	64.091	4
Внутри популяций	171	746.201	96

При анализе в программе Structure использовали данные ISSR для всей выборки с двух ботанико-географических районов и отдельно для Тиманских ценопопуляций, исключая популяцию ВМ10. В первом случае наиболее вероятным числом кластеров, идентифицированных программой с использованием моделей “admixture” и

“no admixture”, являлось $K = 2$ (рис. 7). Число вероятных кластеров для двух моделей совпадало. Во втором случае для Тиманских популяций число кластеров, оцененных Structure, было различным: в первой модели (“admixture”) $K = 4$, во второй модели (“no admixture”) $K = 5$. Несовпадение количества кластеров может служить подтвер-

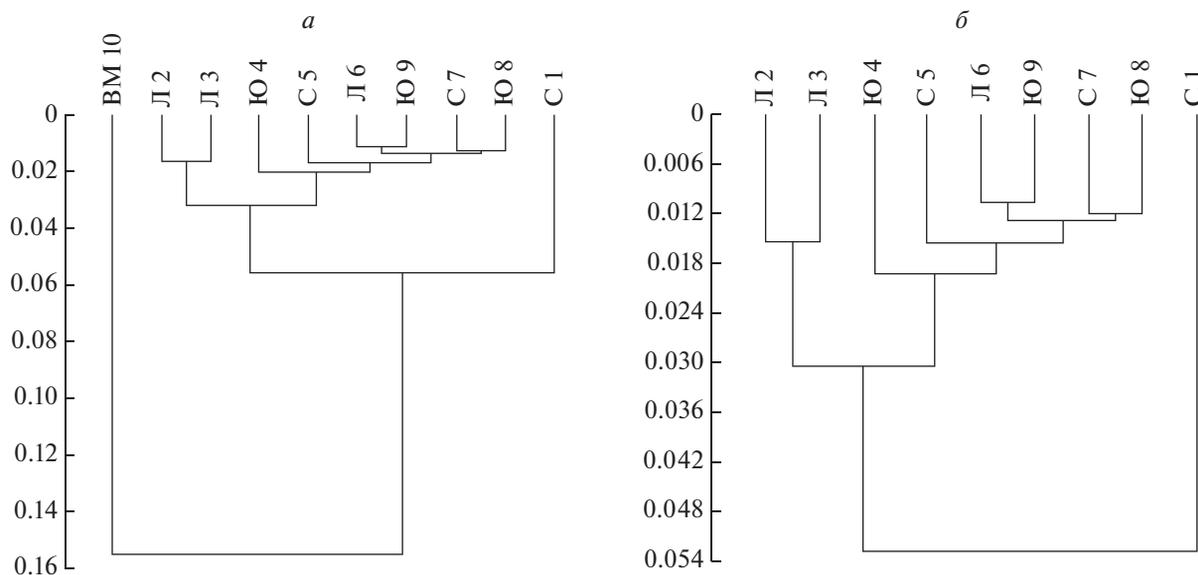


Рис. 4. Дендрограмма сходства популяций *G. conopsea*, построенная на основе значений генетических расстояний [36] методом кластеризации (UPGMA). По оси ординат – Евклидово расстояние: *a* – популяции № 1–10, *б* – популяции № 1–9.

ждением сложной структуры вида, наличия подгрупп или неоднозначного отнесения образцов к группам.

ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологическая дифференциация

Среди наиболее значимых факторов окружающей среды, которые оказывают влияние на размерные и количественные характеристики осо-

бей *G. conopsea* и позволяют выявить внутри вида дискретные группировки, следует выделить тип местообитания и мезорельефные условия. В районе исследований данный вид проявляет значительный уровень морфологической изменчивости, проявляющийся в разном фенотипическом облике популяций. Так, сходные характеристики имеют растения *G. conopsea*, произрастающие в заболоченном лесу на Вычегодско-Мезенской равнине и на разнотравных лугах Южного Тимана (рис. 2). Это преимущественно высокие растения с большим числом длинных листьев и цветков в соцветии.

Более показательное изменение фенотипического облика особей *G. conopsea* можно проследить в градиенте экотопов на Тимане. Реакция растений на недостаток тепла в разных типах карстовых ландшафтов выражается в изменении величин наиболее пластичных признаков фенотипа (высота побега, длина соцветия, число цветков и листьев). Наиболее отчетливо морфологическая дифференциация особей проявляется в контрастных по температурным условиям экотопах – между популяциями с лугов и склонов северной экспозиции. Это демонстрирует представленная ранее дискриминантная модель (рис. 3) по первым двум функциям с перекрывающимися облаками, согласно которой дивергенция между экотопическими популяциями очевидна по всем анализируемым признакам. Так, например, число цветков у особей в луговых популяциях (Л2, Л3 и Л6) составляет в среднем 56.4 (15–92), тогда как на склонах северной экспозиции (С1, С5, С7) этот показатель равен 21.5 (7–41). Следует отметить,

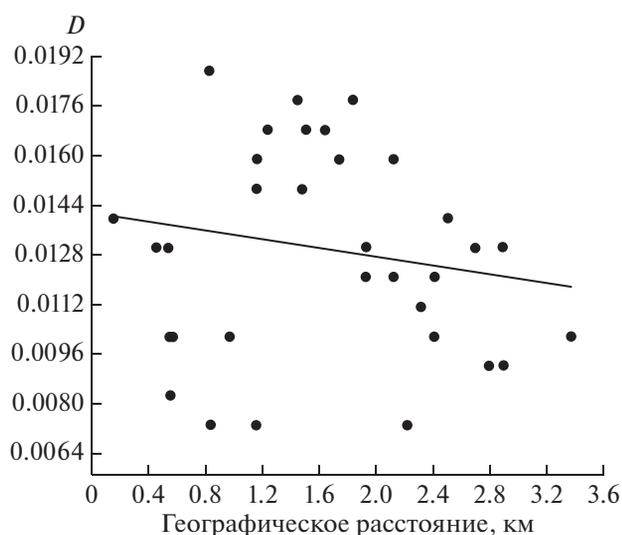


Рис. 5. График корреляции генетических дистанций (*D*) и географического расстояния между популяциями *G. conopsea* ($r = -0.047$; $p = 0.04$).

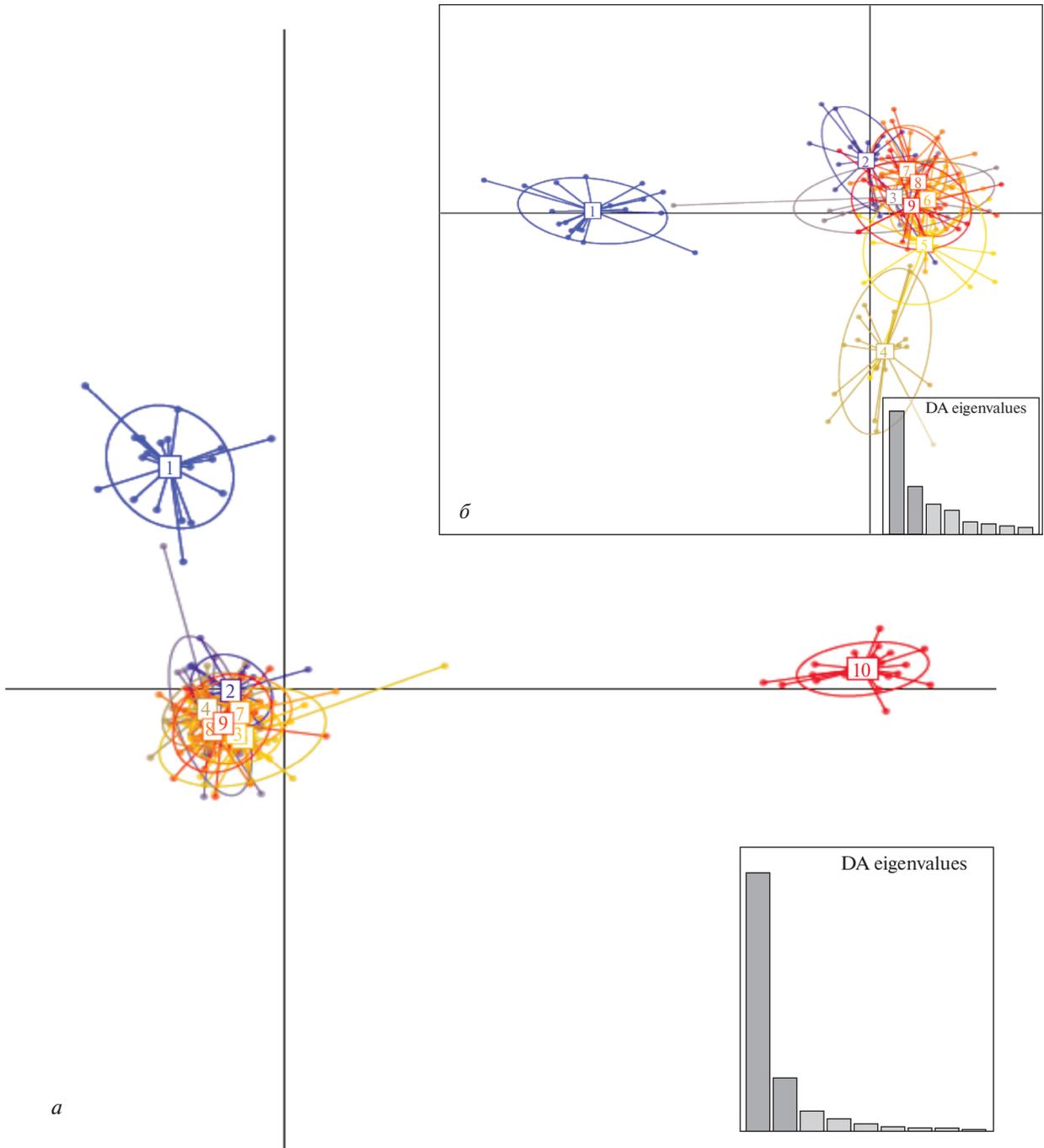


Рис. 6. Диаграмма рассеяния, построенная по результатам дискриминантного анализа главных компонент (PCA) матрицы ISSR-локусов популяций *G. conopsea* ($PC = 13$): *a* – для всех популяций, *б* – только для популяций с Южного Тимана.

что различия между некоторыми выборками хоть и улавливаются статистическими методами, но очень тонки и зачастую не явно выражаются в фенотипическом облике популяции. Условия среды, определяя размах варьирования отдельных морфометрических признаков, влияют на силу и структуру корреляционных матриц. Такая особенность фенотипического проявления генотипа

достигается за счет переключения регуляторных механизмов особей, направляющих процессы морфогенеза и роста, и является немаловажным способом адаптации вида к условиям среды [46]. Ранее нами было выявлено [47], что для *G. conopsea* с северных склонов характерен своеобразный тренд в направлении узкой специализации особей к прохладным условиям, что проявляется в

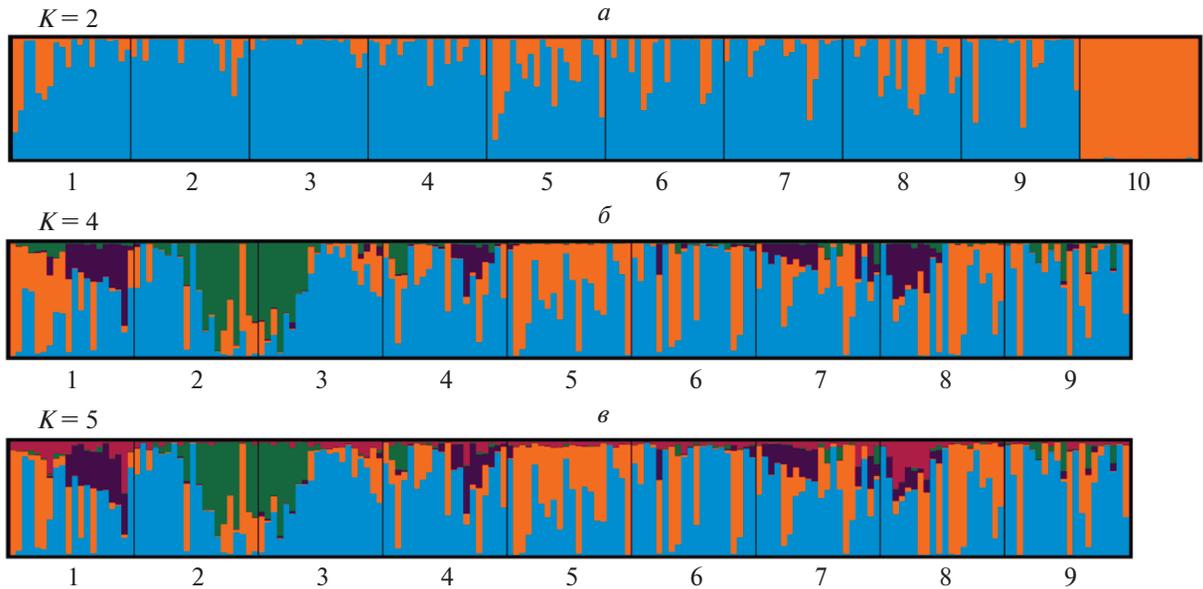


Рис. 7. Результаты кластерного анализа состава ISSR-локусов *G. conopsea*, выявленные с использованием программы Structure: а – структура генетического разнообразия для всех популяций с использованием моделей “admixture” и “no admixture” ($K = 2$); б – структура для тиманских популяций с использованием модели “admixture” ($K = 4$); в – структура для тиманских популяций с использованием модели “no admixture” ($K = 5$). Цифрами по оси абсцисс обозначены номера популяций (см. табл. 1). Цветные рисунки см. в электронной версии.

низкой амплитуде варьирования признаков (минимальные для вида значения коэффициента вариации) и снижении пластичности системы взаимосвязей между признаками (минимальные для вида значения коэффициента корреляции) в этом типе карстовых ландшафтов.

Известно, что род *Gymnadenia* принадлежит к группе растений, находящейся в процессе активного видообразования с выраженной экологической (и географической) изменчивостью и обособлением внутривидовых таксонов в специфических экологических нишах [47, 48]. Сложный в систематическом отношении политипический комплекс *G. conopsea* s. l. включает около двух десятков таксонов с различной авторской трактовкой объема и категории (подвид, вариация, форма), отличающихся областью распространения, экологической приуроченностью, морфологией, фенологией, плоидностью [49–54]. Для разделения таксонов в рамках *G. conopsea* s. l. используются различные критерии, основными из которых являются признаки цветка и вегетативной сферы (высота побега, параметры листа, густота соцветия), а также приуроченность к конкретным местообитаниям и время цветения. Направление естественного отбора для орхидных на северном пределе распространения может захватывать генетически устойчивые признаки (число ассимилирующих листьев, число цветков в соцветии), создавая максимально экономичную модель для северных условий [15]. Установленная нами тен-

денция в уменьшении величин “маркерных” и наиболее пластичных признаков фенотипа у *G. conopsea* в более “суровых” условиях прослеживается для таксонов этого рода на всем протяжении ареала. Так, сходные механизмы морфологической адаптации видов к недостатку тепла лежат в основе образования в горах и на Севере нескольких похожих по фенотипическим признакам разновидностей – *G. conopsea* var. *alpina* Turcz. ex Rchb. f., *G. conopsea* var. *lapponica* J.E. Zetterst. Несмотря на выявленные нами четкие различия по комплексу морфометрических признаков между популяциями разного типа карстовых ландшафтов, все исследованные выборки мы рассматриваем в пределах одного таксона *G. conopsea* subsp. *conopsea*.

Генетическая изменчивость и дифференциация популяций

Полиплоидные таксоны растений часто демонстрируют высокий уровень генетического разнообразия [55, 56], обуславливающий ширину их ареала, способность реагировать и адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Существует мнение, что генетическое разнообразие в пограничных популяциях растений ниже, чем в популяциях центральной части ареала [57, 58], поэтому мы предположили, что генетическое разнообразие *G. conopsea* в исследованных популяциях близ северной границы ареала может оказаться низким. Анализ ISSR-локусов

позволил определить средний уровень генетической изменчивости *G. conopsea* ($P = 37.79\%$) при достаточно высоком диапазоне варьирования этого показателя среди выборок ($P = 26.94–60.55\%$).

Полиморфность лишь отчасти отражает генетическое разнообразие особей в популяции. Расчет основных показателей генетической изменчивости показал, что из 10 исследованных популяций *G. conopsea* самые низкие показатели (P , H_e , I_s) отмечены для единственной выборки с Вычегодско-Мезенской равнины, расположенной в заболоченном лесу (популяция ВМ10). Вероятно, сохранение пониженного уровня ее полиморфизма ($P = 26.94\%$) и локусного разнообразия ($H_e = 0.050$, $I_s = 0.084$) может быть связано с комплексом ограничивающих факторов. Эта небольшая локальная популяция характеризуется самой низкой численностью (до 200 растений) и плотностью размещения особей (2.4 экз./м²) по сравнению с остальными выборками, расположенными на Южном Тимане.

Более значительный уровень генетической изменчивости по сравнению с другими группами в районе исследований выявлен для популяций С1 и Ю8, расположенных на северо-западном и южном склоне известняковых обнажений соответственно ($H_e = 0.089$ и 0.084 , $I_s = 0.154$ и 0.149 , $P = 55.54$ и 60.55%). Эти многочисленные популяции (более 1000 особей) можно рассматривать в качестве источника генетического разнообразия среди исследуемой совокупности на Южном Тимане. Помимо этого, популяция Ю8 отличается максимальной долей редких локусов (17.9%) среди всех поселений *G. conopsea* в районе исследования. В целом на склонах известняковых обнажений по сравнению с луговыми сообществами условия для прорастания семян *G. conopsea* более благоприятны, так как для них характерны наличие открытых осыпных участков, низкая межвидовая конкуренция (общее проективное покрытие растений составляет 10–15%), сильно гумусированные нейтральные и слабощелочные почвы. Высокая семенная продуктивность (15.5–18.6 тыс. семян на одну особь [27]) и наличие большого числа молодых особей [15, 18] определяют более активную динамику возрастных спектров и смену поколений; как следствие, создают условия для повышенного генетического разнообразия.

Невысокий процент полиморфных локусов (до 30%) и пониженные показатели генетической изменчивости отмечены также для ряда популяций из разного типа карстовых ландшафтов на Тимане. Например, популяции *G. conopsea* на склонах известняковых обнажений разной экспозиции (С5, Ю9) имеют показатели, сравнимые с небольшими (15–25 м²) луговыми популяциями (Л6) со стабильно невысокой численностью

(200–300 особей). Также на лугах присутствует небольшая антропогенная нагрузка (сенокосение) и периодически возникает опасность повреждения соцветий *G. conopsea* в период раннелетних заморозков (до 70–95% генеративных особей в популяции, личные наблюдения авторов). Смена поколений в луговых популяциях происходит более медленно из-за сложности прорастания семян в плотном слое дернины и невысокой доли проростков [18] даже при высокой эффективной численности популяций (процента цветущих растений). Помимо перечисленных выше факторов, усиливающих давление отбора, более однородная генетическая структура популяций *G. conopsea* может демонстрировать сравнительно недавнее время их образования и позволяет предположить, что эти группы (Л6, С5, Ю9) представляют собой самые молодые поселения вида в исследуемом районе на Южном Тимане.

Таким образом, значительный разброс средних значений показателей генетического разнообразия в популяциях *G. conopsea*, полученных по ISSR-маркерам, демонстрирует несколько разнонаправленных паттернов, не проявляющих четкой связи с типом карстовых ландшафтов, фенотипическим обликом особей, численностью и площадью популяций. Очевидно, что причины проявления разного уровня генетического разнообразия исследованных популяций в градиенте условий на известняках требуют дополнительного изучения. Значительное преобладание внутрипопуляционной изменчивости (86%) свидетельствует об отсутствии направленных генетических изменений, способствующих процессу разделения популяций *G. conopsea* в районе исследования. Очевидно, что поддержание определенного уровня полиморфизма в популяциях *G. conopsea* обусловлено комплексом факторов. Микроклиматические условия места произрастания, длительный полный онтогенез отдельной особи (генеты) продолжительностью 20–25 лет, способность к поливариантности развития в течение жизни, возможность повторного цветения генеративных растений после временного покоя, высокая семенная продуктивность и другие особенности способствуют поддержанию и сохранению определенного уровня полиморфизма в пограничных популяциях этого вида и нивелируют последствия неблагоприятных условий на северном пределе распространения.

Известно, что стабильное существование популяций и сохранение их эволюционного потенциала осуществляются путем поддержания естественного уровня генетического разнообразия и потока генов между популяциями. *Gymnadenia conopsea* как представителю семейства Orchidaceae присуще несколько репродуктивных особенностей, не характерных более никакому другому семейству цветковых растений. Для этого вида

свойственна узкоспециализированная энтомофилия, приводящая при повышенной дифференциации экологических ниш к усложнению механизмов опыления (вплоть до перехода к самоопылению), что имеет первостепенное значение в эволюционных процессах [24, 59]. Высокая семенная продуктивность, отсутствие периода покоя семян и неспособность к их запасанию в почве [26], а также необходимость контакта с мицелием совместимого микосимбионта при их прорастании [60] играют важную роль в популяционно-генетических взаимоотношениях этого вида. Несмотря на то, что насекомые-опылители *G. conopsea* преодолевают большие расстояния, а многочисленные мелкие семена могут распространяться ветром [61], поток генов между популяциями может быть ограничен некоторыми особенностями, присущими виду. Так, большинство опылений и обмен пылью у *G. conopsea* происходят между соседними особями [51], а основная часть семян прорастает в непосредственной близости от материнского растения [62]. Эти два фактора обуславливают неравномерное распределение растений по площади с образованием в пределах популяции небольших скоплений (микрораспространений) со сложным генезисом. С учетом высокой специализации опылителей эта особенность повышает вероятность близкородственного скрещивания (инбридинг) внутри таких скоплений.

Полученная на основе ISSR-маркеров генетическая дифференциация популяций *G. conopsea* двух географических районов (Южного Тимана и Вычегодско-Мезенской равнины) существенна ($D = 0.056$, $I = 0.946$) и демонстрирует ограничение потока генов между выборками, расположенными друг от друга на расстоянии более чем 300 км (табл. 3). В южной части Республики Коми на Вычегодско-Мезенской равнине *G. conopsea* тяготеет к сфагновым болотам и пойменным лугам, различным по флористическому составу, а также встречается в зеленомошных, травяных и сфагновых смешанных лесах. При продвижении на север этот вид меняет свой фитоценологический диапазон и тяготеет к выходам карбонатных пород Тиманской возвышенности. Пониженный уровень генного обмена между популяциями разных географических районов обусловлен длительным периодом, прошедшим с момента начала дивергенции сравниваемых популяций, имеющих общего предка, а также точечной встречаемостью данного вида в сообществах средней тайги, что ограничивает распространение семян и обмен генетической информацией. Ординация популяций, полученная методами дискриминантного анализа главных компонент DAPC и кластеризации UPGMA и показывающая генетические взаимоотношения между популяциями *G. conopsea* двух ботанико-географических районов, подобна (рис. 4, 6).

Популяции *G. conopsea* с известняков Южного Тимана оказались генетически более близки. Расположенные на площади около 8 км², они представляют собой большую локальную популяцию, между экотопическими группировками которой существует как сравнительно сильный поток генов ($D = 0.007$), так и снижение интенсивности обмена генетической информацией ($D = 0.020$). Если в первом случае популяции имеют очень много общего ($I = 0.993$), то попарное сравнение последних демонстрирует некоторое уменьшение доли общих ISSR-локусов в популяциях ($I = 0.980$). Разнообразие карстовых ландшафтов в районе выхода известняков и приуроченность популяций *G. conopsea* к контрастным по экологическим условиям экотопам, морфологическая дифференциация и смещение сроков массового цветения особей заставили нас задуматься о том, какие популяционно-генетические взаимоотношения существуют между этими популяциями?

Мы предполагали, что приуроченность особей *G. conopsea* к экотопам разного типа (луга, северные и южные склоны) может служить барьером для обмена генетической информацией и в той или иной степени ограничивать снижение потока генов между популяциями, проявляясь в уменьшении генетического сходства популяций контрастных по экологическим условиям экотопов вследствие особенностей топологии карстовых ландшафтов, разницы периодов массового цветения, морфологической дифференциации, различного возрастного состава популяций (эффективной численности популяции).

Объяснить характер генетической структуры *G. conopsea* на Южном Тимане степенью удаленности популяций не получилось, так как их генетические взаимоотношения не всегда соответствуют реальному географическому расположению, а заселение новых мест произрастания, вероятно, происходило путем разнонаправленного заноса пыльники и семян. Отсутствие корреляции между генетическими и географическими расстояниями популяций (тест Мантелла) показывает, что удаленность и особенности рельефа карстовых ландшафтов (разная экспозиция склонов, бассейны рек, высота над уровнем моря и др.) не всегда ограничивают генный поток между поселениями вида. Так, популяции Л2 и Л3 (расположенные в долине р. Сойва в 500 м друг от друга в одинаковом типе карстовых ландшафтов на лугах), Л6 и Ю9 (расположенные в долине р. Омра в 1.5 км друг от друга) и С5 и Л6 (расположенные в бассейнах разных рек на расстоянии более 2 км) демонстрируют одинаково стабильный современный поток генов ($D = 0.007$). При этом популяция С1 со склона северо-западной экспозиции по р. Сойва резко дифференцирована (рис. 4) от других популяций, как близко расположенных к ней (Л2), так и более удаленных, но расположенных в

бассейне одной реки и имеющих сходный тип ландшафта (С5). Полученные данные указывают на то, что экотопическая приуроченность и географическое расположение популяций в карстовых ландшафтах Южного Тимана не оказывают существенного влияния на поток генов, а значения генетических дистанций между выборками демонстрируют низкую степень дивергенции популяций *G. conopsea* на известняках. Тем не менее выявленные нами особенности по составу полиморфных локусов и кластеризация некоторых популяций методами UPGMA и DAPC отражают их генетическое своеобразие и обособленность. В некоторых точках расстояние между растениями из популяций разных экотопов было меньше 500 м, т.е. группы теоретически могут свободно обмениваться как пыльцой, так и семенами. Однако здесь показатель генетического сходства был минимальным в пределах этого географического района ($I = 0.980$).

Мы оценили генетическую структуру популяций с помощью моделей, реализованных в программе Structure (рис. 7). После обработки всех вариантов программа четко разделила всю выборку по принадлежности к двум географическим районам (Вычегодско-Мезенская и Тиманская) как обособленных генетических групп в изучаемой выборке. Внутри тиманской группы популяций распределение ISSR-маркеров с наибольшей вероятностью соответствует дроблению изучаемой выборки на четыре или пять групп. Это означает, что на Южном Тимане существуют минимум четыре самостоятельные группы, отличные по ISSR-маркерам. Число потенциальных популяций, оцененных программой Structure, не совпадает с морфологическим подразделением выборок по экотопической приуроченности. Несовпадение количества кластеров может служить подтверждением сложной структуры вида, наличия нестабильных подгрупп или неоднозначного отнесения программой образцов к группам.

Данное исследование позволило оценить генетическое разнообразие популяций *G. conopsea* с помощью ISSR-маркеров и установить, что этот тип маркеров является надежной и воспроизводимой системой для изучения внутривидового полиморфизма этого вида. Тип местообитания, особенности онтогенеза, структура и динамика популяций, репродуктивная стратегия этого представителя семейства Orchidaceae являются важными факторами, которые влияют на уровень генетического разнообразия. Установлено, что для *G. conopsea* прослеживается тренд уменьшения размеров растений и изменения фенотипического облика популяций, а также смещение сроков массового цветения особей в градиенте температурных условий в ряде карстовых ландшафтов на обнажениях Тиманского кряжа. Исследованные популяции *G. conopsea* характеризуются не только

высокой морфологической дифференциацией по размерным и количественным признакам, но и относительно высокой степенью генетической дифференциации. Интерпретация полученных результатов не всегда может быть однозначной. Специфические особенности в формировании внутривидовой генетической изменчивости, выявленные с помощью ISSR-маркеров, опровергают нашу гипотезу о генетической обособленности исследованных популяций *G. conopsea* в разных типах карстовых ландшафтов на известняках Южного Тимана. Граница между этими выборками условна, а показатели генетической изменчивости демонстрируют сложный комплекс популяций, связанных миграционными взаимодействиями. Существование пограничных популяций *G. conopsea* в различных эколого-фитоценологических условиях, пластичность морфологии особей, высокая семенная продуктивность, повышенный генетический полиморфизм и стабильный поток генов между популяциями демонстрируют устойчивую стратегию сохранения вида в сообществах реликтового скального флористического комплекса на известняках Тиманской возвышенности. Полиморфизм фенотипических признаков и генетических маркеров усиливает пластичность *G. conopsea* и возможность существования вида в различных эколого-фитоценологических условиях на границе ареала. При этом популяции с пониженными значениями показателей генетического разнообразия требуют особых мер охраны и поддержания стабильного развития вблизи северного предела распространения.

Авторы выражают особую благодарность к. б. н. Ивану Федоровичу Чадину (Институт биологии Коми НЦ УрО РАН) за помощь в статистической обработке данных, обмен идеями и поддержку, а также признательны Марине Владимировне Протопоповой (Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН) за ценные замечания в ходе подготовки статьи.

Экспедиционные выезды, закупка реактивов и необходимого оборудования для проведения исследования произведены при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-34-00608 мол_а. Работа выполнена в рамках гос. задания на тему «Структурно-функциональная организация растительных сообществ, разнообразие флоры, лишено- и микобиоты южной части национального парка «Югыд ва» (№ АААА-А16-116021010241-9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кадастр особо охраняемых природных территорий Республики Коми / Под ред. Дегтевой С.В., Пономарева В.И. Сыктывкар, 2014. 428 с.
2. Ильчуков С.В. Ландшафты Республики Коми. Екатеринбург, 2010. 198 с.

3. *Елсаков В.В., Тетерюк Л.В.* Роль рельефа в формировании растительности карстовых ландшафтов европейского северо-востока России // Исследование Земли из космоса. 2012. № 3. С. 78–93.
4. Красная книга Республики Коми / Под ред. Таскаева А.И. Сыктывкар, 2009. 791 с.
5. *Юдин Ю.П.* Реликтовая флора известняков Северо-Востока европейской части СССР // Материалы по истории флоры и растительности СССР. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1963. Вып. 4. С. 493–587.
6. *Тетерюк Л.В.* Роль известняков Тимана в сохранении редких видов сосудистых растений // Биологическое разнообразие растительного мира Урала и сопредельных территорий: Материалы Всерос. конф. с международным участием. Екатеринбург, 2012. С. 92–94.
7. *Грант В.* Видообразование у растений. М.: Мир, 1984. 528 с.
8. *Schaal B.A., Hayworth D.A., Olsen K.M. et al.* Phylogeographic studies in plants: problems and prospects // Mol. Ecol. 1998. V. 7. P. 465–474. doi 10.1046/j.1365-294x.1998.00318.x
9. *Hedrick P.W.* Genetics of Populations. 2nd ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publ., 2000. 553 p.
10. *Tremblay R.L., Ackerman J.D.* The genetic structure of orchid populations and its evolutionary importance // Lankesteriana. 2003. V. 7. P. 87–92.
11. Биологическое разнообразие особо охраняемых природных территорий Республики Коми. Вып. 4. Охраняемые природные комплексы Тимана (часть 1) / Под ред. Дегтевой С.В. Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 2006. 272 с.
12. *Тетерюк Л.В.* Орхидные реликтового скального флористического комплекса на известняках Тимана // Вестник ТвГУ. Серия: Биология и экология. 2007. № 4. С. 159–160.
13. Флора северо-востока европейской части СССР. Л.: Наука, 1976. Т. 2. 316 с.
14. *Vakhrameeva M.G., Tatarenko I.V., Varlygina T.I. et al.* Orchids of Russia and adjacent countries (within the borders of the former USSR). Liechtenstein: A.R.G. Gantner Verlag Ruggell, 2008. 690 p.
15. *Блинова И.В.* Биология орхидных на северо-востоке Фенноскандии и стратегии их выживания на северной границе распространения: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2009. 44 с.
16. *Валу́йских О.Е.* Популяционная биология *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. (Orchidaceae) на северной границе ареала: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Сыктывкар, 2009. 20 с.
17. *Тетерюк Л.В., Валу́йских О.Е., Савиных Н.П.* Биоморфология и онтогенез *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. (Orchidaceae) в краевых популяциях на известняках европейского северо-востока России // Экология. 2013. № 4. С. 254–262. doi 10.7868/S0367059713030141
18. *Валу́йских О.Е., Тетерюк Л.В.* Структура и динамика популяций *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. в краевых популяциях на известняках Европейского Север-Востока России // Экология. 2013. № 6. С. 420–427. doi 10.7868/S0367059713060103
19. *Валу́йских О.Е., Тетерюк Л.В.* Экологическая, морфологическая и онтогенетическая дифференциация *Gymnadenia conopsea* var. *alpina* Rchb. f. ex Beck. (Orchidaceae) // Экология: факты, гипотезы, модели: Материалы конф. молодых ученых, посвященной 170-летию В.В. Докучаева. Екатеринбург: Гошицкий, 2016. С. 13–21.
20. *Pinheiro L.R., Rabbani A.R., Cruz da Silva A.V. et al.* Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers // Plant System. Evol. 2012. V. 298. P. 1815–1825. doi 10.1007/s00606-012-0682-9
21. *Warghat A.R., Bajpai P.K., Srivastava R.B. et al.* Population genetic structure and conservation of small fragmented locations of *Dactylorhiza hatagirea* in Ladakh region of India // Sci. Horticulturae. 2013. V. 164. P. 448–454. doi 10.1016/j.scienta.2013.09.044
22. *Khomann E.E., Nam I.Y., Zayakin V.V.* Using ISSR-markers for genetic diversity of some representatives of Orchidaceae // Biosci. Biotech. Res. Asia. 2016. V. 13. № 1. P. 115–118. doi 10.13005/bbra/2012
23. *Talalaj I., Skierczynski M.* Mechanism of spontaneous autogamy in the allogamous lepidopteran orchid *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. (Orchidaceae) // Acta Biol. Cracovensia. Series Botanica. 2015. V. 57. № 1. P. 130–140. doi 10.1515/abcsb-2015-0010
24. *Кривошеев М.М., Барлыбаева М.Ш.* Опылители *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Brown s. l. (Orchidaceae Juss.) на Южном Урале // Экологические проблемы промышленных городов: Материалы VIII Междунар. научно-практ. конф. Саратов: Изд-во СГТУ, 2017. С. 345–348.
25. *Валу́йских О.Е.* О вегетативном размножении *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. (Orchidaceae) // Вестник ТвГУ. Серия “Биология и экология”. 2007. Вып. 6(22). С. 129–134.
26. *Куликов П.В., Филингов Е.Г.* Репродуктивная стратегия орхидных умеренной зоны // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Системы репродукции. СПб.: Мир и семья, 2000. Т. 3. С. 510–513.
27. *Кириллова И.А., Кириллов Д.В.* Особенности репродуктивной биологии *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. (Orchidaceae) на северной границе ареала // Сиб. экол. журн. 2015. № 4. С. 617–629. doi 10.15372/SEJ20150413
28. Ценопопуляции растений (Основные понятия и структура) / Колл. авторов: Смирнова О.В., Заугольнова Л.Б., Ермакова И.М. и др. М.: Наука, 1976. 215 с.
29. *Новаковский А.Б.* Взаимодействие Excel и статистического пакета R для обработки данных в экологии // Вестник Института биологии Коми НЦ УрО РАН. 2016. № 3. С. 26–33.
30. *Archibald J.K., Crawford D.J., Santos-Guerra A., Mort M.E.* The utility of automated analysis of inter-simple sequence repeat (ISSR) loci for resolving relationships in the canary island species of *tolpis* (Asteraceae) // Am. J. Bot. 2006. V. 93(8). P. 1154–1162. doi 10.3732/ajb.93.8.1154
31. *Debnath S.C., Khanizadeh S., Jamieson A.R., Kempler C.* Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers to assess genetic diversity and relatedness within strawberry gen-

- otypes // *Can. J. Plant Sci.* 2008. V. 88. P. 313–322. doi 10.4141/CJPS07088
32. *Kamvar Z.N., Tabima J.F., Grünwald N.J.* Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and or sexual reproduction // *Peer J.* 2014. V. 2. P. 14. doi 10.7717/peerj.281
 33. *Jombart T.* Adegnet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers // *Bioinformatics.* 2008. V. 24. P. 1403–1405. doi 10.1093/bioinformatics/btn129
 34. *Jombart T.* A Tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) Using Adegnet 1.4–0. 2013. 35 p.
 35. *Peakall R., Smouse P.E.* Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes.* 2006. V. 6. № 1. P. 288–295. doi 10.1093/bioinformatics/bts460
 36. *Nei M.* Genetic distance between populations // *The Am. Naturalist.* 1972. P. 283–292. doi 10.1086/282771
 37. *Diniz-Filho J.A.F., Soares T.N., Lima J.S. et al.* Mantel test in population genetics // *Genet. Mol. Biol.* 2013. V. 36. № 4. P. 475–485. doi 10.1590/S1415-47572013000400002
 38. *Hammer Q., Harper D.A.T., Ryan P.D.* PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // *Palaeontologia Electronica.* 2001. V. 4. P. 9.
 39. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* 2000. V. 155. № 2. P. 945–959. doi 10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x
 40. *Falush D., Stephens M., Pritchard J.K.* Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles // *Mol. Ecol. Notes.* 2007. V. 7. № 4. P. 574–578. doi 10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x
 41. *Pritchard J.K., Wen W., Falush D.* Documentation for STRUCTURE software: Version 2.3. 2010. 38 p.
 42. *Evanno G., Regnaut S., Goudet J.* Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. № 8. P. 2611–2620. doi 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
 43. *Jakobsson M., Rosenberg N.A.* CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. CLUMPP. № 14. P. 1801–1806.
 44. *Rosenberg N.A.* Distruct: a program for the graphical display of population structure // *Mol. Ecol. Notes.* 2004. V. 4. P. 137–138. doi 10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x
 45. *Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M. et al.* CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K // *Mol. Ecol. Resour.* 2015. V. 15. № 5. P. 1179–1191. doi 10.1111/1755-0998.12387
 46. *Ростова Н.С.* Корелляции: структура и изменчивость. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2002. 308 с.
 47. *Валуйских О.Е., Тетерюк Л.В.* Фенотипическая изменчивость *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. (Orchidaceae) в краевых популяциях на известняках европейского северо-востока России // *Экология.* 2014. № 1. С. 30–39. doi 10.7868/S0367059714010132
 48. *Аверьянов Л.В.* Видообразование и изменчивость видов рода *Gymnadenia* R. Br. в северной части арала // Биологические проблемы Севера: Материалы IX Междунар. симп. Сыктывкар, 1981. Ч. 1. С. 10.
 49. *Soliva M., Widmer A.* Genetic and floral divergence among sympatric populations of *Gymnadenia conopsea* s. l. (Orchidaceae) with different flowering phenology // *Int. J. Plant Sci.* 1999. V. 160. № 5. P. 897–905. doi 10.1086/314192
 50. *Невский С.А.* Сем. XXXVI. Ятрышниковые – Orchidaceae Lindl. // *Флора СССР. Л.: Изд-во АН СССР, 1935. Вып. IV. С. 589–730.*
 51. *Gustafsson S., Sjögren-Gulve P.* Genetic diversity in the rare orchid *Gymnadenia odoratissima* and a comparison with the more common congener *G. conopsea* // *Conserv. Genet.* 2002. V. 3. P. 225–234. doi 10.1023/A:1019969014333
 52. *Marhold K., Jongepierova I., Krahulcova A.* Morphological and karyological differentiation of *Gymnadenia densiflora* and *G. conopsea* in the Czech Republic and Slovakia // *Preslia.* 2005. V. 77. P. 159–176.
 53. *Bateman R.M., Rudall P.J.* Phylogenetic context, generic affinities and evolutionary origin of the enigmatic Balkan orchid *Gymnadenia frivaldii* Hampe ex Griseb. // *Taxon.* 2006. V. 55. № 1. P. 107–118. doi 10.2307/25065532
 54. *Ефимов П.Г.* Криптические виды кокушников (*Gymnadenia*: Orchidaceae, Magnoliophyta) России // *Генетика.* 2013. Т. 49. № 3. С. 343–354. doi 10.7868/S0016675813020045
 55. *Molecular Systematics and Plant Evolution / Ed. Hollingsworth P.M., Bateman R.M., Gornall R.J.* London; New York, 1999. 108 p.
 56. *Hedren M.* Plastid DNA variation in the *Dactylorhiza incarnata/maculata* polyploid complex and the origin of allotetraploid *D. sphagnicola* (Orchidaceae) // *Mol. Ecol.* 2003. V. 12. P. 2669–2680. doi 10.1046/j.1365-294X.2003.01930.x
 57. *Hamrick J.L., Godt M.J.W.* Allozyme diversity in plant species // *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources / Ed. Brown H.D., Clegg M.T., Kahler A.L.* Sunderland: Sin. Associates, Inc. 1989. P. 43–46.
 58. *Hens H., Pakanen V.M., Jäkäläniemi A. et al.* Low population viability in small endangered orchid populations: Genetic variation, seedling recruitment and stochasticity // *Biol. Conservation.* 2017. V. 210. P. 174–183. doi 10.1016/j.biocon.2017.04.019
 59. *Tremblay R.L., Ackerman J.D., Zimmerman J.K., Calvo R.N.* Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification // *Biol. J. Linnean Soc.* 2005. V. 84. P. 1–54. doi 10.1111/j.1095-8312.2004.00400.x
 60. *Воронина Е.Ю.* Микоризы в наземных экосистемах: экологические, физиологические и молекулярно-генетические аспекты микоризных симбиозов // *Микология сегодня. М.: Национ. акад. микологии, 2007. Т. 1. С. 142–285.*
 61. *Rasmussen H.* *Terrestrial Orchids from Seed to Mycotrophic Plant.* Cambridge: Cambr. Univ. Press, 1995. 444 p. doi 10.1017/CBO9780511525452
 62. *Баталов А.Е.* Состояние популяций *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. (Orchidaceae) в различных фитоценозах // *Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Системы репродукции.* СПб.: Мир и семья, 2000. Т. 3. С. 524–532.

Morphological Variation and Genetic Diversity of *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. (Orchidaceae) Populations in the Northeast of European Russia (Komi Republic)

O. E. Valuyskikh^{a,*}, D. M. Shadrin^a, and Ya. I. Pylina^a

^a*Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982 Russia*

**e-mail: valuyskikh@ib.komisc.ru*

Using ISSR-PCR approach, the genetic structure of *G. conopsea* populations have been studied in the Komi Republic (Russia) at the northern edge of its distribution area where the populations have high level of phenotypic variation. Differentiation of morphological features was clearest in the karst landscapes of Timan. Here, the phenological periods were shifted depending on the ecological and phytocoenotical conditions. Two used ISSR primers allowed us to reveal 839 loci. 37.79% of them were polymorphic. UPGMA analysis divided the pool of *G. conopsea* populations into two clusters: populations from the limestones of Timan (180 plants) and population from the Vychegda-Mezen plain (20 plants). The assessment of genetic variability revealed the decreased parameters in *G. conopsea* population from the Vychegda-Mezen plain ($P = 26.94\%$, $H_e = 0.050$, $I_s = 0.084$). At limestones of South Timan, the species had both high variable populations ($P = 55.5\text{--}60.6\%$, $H_e = 0.084\text{--}0.089$), and populations with decreased parameters of genetic variability ($P = 29.3\text{--}29.6\%$, $H_e = 0.053\text{--}0.059$). Despite the high diversity of karst landscapes and territorial fragmentation of the populations, we found low level of interpopulation differentiation ($F = 0.017\text{--}0.036$) and strong genetic flows between the populations ($D = 0.007\text{--}0.020$, $I = 0.980\text{--}0.993$). Mantel test showed no correlation between the genetic and geographic distances among populations ($r = -0.047$; $p = 0.04$). Most of the revealed genetic variability was realized inside the populations. The share of interpopulation variability was only 14%. Analysis of genetic relationships based on the Structure v2.3 program software allowed us to divide the selection by two geographical areas, and to suggest that there are at least four separate groups differed by ISSR markers at South Timan. There was no clear dependence between the type of karst landscape and genetic variability of the populations.

Keywords: *Gymnadenia conopsea*, range boundary, morphological characters, ISSR markers, genetic diversity, polymorphism.