

УДК 582.52

Популяционные исследования орхидных в заповеднике «Кедровая Падь»

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

*Ботанический сад Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова
Москва, 119991, Российская Федерация*

E-mail: el.terenteva@mail.ru

Аннотация

На территории заповедника «Кедровая падь» обследованы 17 популяций видов из семейства Orchidaceae Jussieu, 1789 (Орхидные). Морфологическими и молекулярными методами подтверждено произрастание на территории заповедника 16 видов из семейства Orchidaceae Jussieu, 1789. Впервые обнаружено новое местонахождение *Pogonia japonica*. Исследование возрастной структуры популяций сем. Orchidaceae показало, что популяции *Liparis japonica* и *L. kumokiri*, *Spiranthes inensis*, *Pogonia japonica*, *Tulotis ussuriensis*, *Tulotis fuscescens*, *Habenaria linearifolia* и *H. radiata* полночленные, устойчивые, нормального типа. Популяции *Liparis krameri* и *L. makinoana*, *Platanthera hologlottis*, *P. extremiorientalis* и *P. freynii* малочисленные, но представлены особями различных возрастных групп. *Neottia papilligera* и *N. asiatica*, *Cephalanthera longibracteata* и *Cypripedium macranthon* наиболее редкие виды на обследованной территории. Большинство видов имеют хорошее плодоношение и возобновление, что свидетельствует о хорошей перспективе развития их популяций.

Анализ спейсеров ITS 1,2 ядерной рибосомной ДНК позволил уточнить видовую принадлежность растений из природных популяций рода *Liparis* Richard, 1817, липарис.

Ключевые слова: заповедник «Кедровая Падь», Orchidaceae, *Liparis*, ITS1, 2 ярдНК.

Введение. Наряду с другими южно-приморскими заповедниками «Кедровая Падь» входит в южную зону хвойно-широколиственных лесов Дальнего Востока. Именно в «Кедровой Пади» особенно ярко выражено преобладание элементов маньчжурской флоры, в том числе здесь отмечено до 26 видов орхидных [1], среди которых 12 видов занесены в Красную книгу РФ [2] и 15 в Красную книгу Приморского края [3]. Поскольку большинство видов орхидных в той или иной мере являются редкими видами и нуждаются в охране на территории ФГБУ национального парка «Земля леопарда» и государственного природного биосферного заповедника «Кедровая Падь» с 28 июля по 3 августа 2015 г. группой сотрудников биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова проводились исследования в рамках проекта Российского Научного Фонда «Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем» и подготовки следующего издания Красной книги РФ. Особое внимание было уделено популяциям редких видов и сложным в определении видам, к которым

[§] Авторы: Варлыгина Татьяна Ивановна, канд. биол. наук, снс Ботанического сада биологического факультета Московского государственного университета им М.В. Ломоносова и др.

относятся представители рода *Liparis L.* (липарис, лосняк, глянцелистник): *krameri* Franchet & Savatier, 1873, липарис Крамера; *L. japonica* (Miquel) Maximowicz, 1886, липарис японский; *L. kumokiri* Fumino Maekawa, 1936, липарис Кумокири; *L. makinoana* Schlechter, 1919, липарис Макино. Род *Liparis* насчитывает около 250-300 видов, которые встречаются преимущественно в тропических областях Азии. На территории России произрастает 6 видов этого рода. Один из них распространен в европейской части и в Сибири – *Liparis loeselii* (Linnaeus) Richard 1818, липарис Лёзеля, а пять других встречаются на Дальнем Востоке: *L. japonica*, *L. krameri*, *L. kumokiri*, *L. makinoana* и *L. sachalinensis* Nakai, 1931, липарис сахалинский, который, вероятно, является эндемиком острова Сахалин [4; 5]. Все виды рода *Liparis* в России являются редкими и занесены в Красную книгу РФ [3] и красные книги регионов, где они встречаются. В красную книгу Приморского края [4] занесены 4 вида: *L. krameri*, *L. japonica*, *L. kumokiri* и *L. makinoana*.

Согласно литературным источникам и гербарным образцам (MW, LE, VLA, и др.) на территории заповедника произрастает 4 вида рода *Liparis*: *L. japonica*, *L. krameri*, *L. kumokiri* и *L. makinoana* [6-8 и др.]. Несмотря на многочисленные работы различных авторов, посвященных видам этого рода [9-16] сегодня род *Liparis* остаётся одним из наиболее сложных в систематическом отношении в семействе Orchidaceae. Наблюдения в природе, изучение гербарных сборов и литературных данных показывает значительную изменчивость морфологических признаков видов рода *Liparis*, что делает их трудно различимыми. Характерно, что таксоны с широким ареалом распространения в различных эколого-географических условиях, как правило, демонстрируют широкий полиморфизм. Изучение морфологической изменчивости на массовом материале с привлечением молекулярных методов является необходимым условием получения объективных результатов при проведении таксономических исследований. С появлением молекулярных методов, основанных на различиях структуры нуклеиновых кислот, представление о последовательностях ДНК “как морфологии особого типа” по [17, с.312] представляется рациональным и очень своевременным.

В задачи нашего исследования входило изучение популяций редких видов и их состояния на территории заповедника (возрастные спектры, плодообразование, наличие возобновления), оценка размеров популяций (площадь, численность и плотность) и установление видовой принадлежности образцов, взятых из этих популяций, с использованием морфологических и молекулярных методов.

Материалы и методы. По материалам гербарных коллекций (MW, МНА, LE, VLA, VBGI) и предоставленных сотрудником заповедника И. В. Шибневой, было уточнено распространение редких видов орхидных на территории заповедника и составлены рабочие маршруты для наблюдений и сбора материала в природе: северный склон Сухореченского хребта (Первый Золотой и Второй Золотые

ключи), центральная часть заповедника (долина р. Кедровой), склон Гаккелевского хребта, долина Гаккелевского ключа, гора Известковая (юго-восточный склон), северный склон горы Скалистой и окрестности ж/д станции Рязановка.

Изучение возрастной структуры популяций орхидных проводили по методике Т.А. Работнова [18]. При выделении возрастных групп у видов из рода *Liparis* использовали методику, приведенную для *L. japonica* [19] с нашими поправками для остальных видов рода. В связи с этим отмечали размер листовой пластинки, число и выраженность жилок, а также окраску цветка, форму губы, соотношение размеров лепестков. У растений из популяций всех видов *Liparis* были взяты фрагменты вегетативных и генеративных частей (18 образцов) для молекулярных исследований с целью уточнения их видовой принадлежности. Особенно актуально это было для тех популяций, где растения находились в состоянии плодоношения или генеративные особи отсутствовали, поэтому трудно было однозначно отнести их к определенному виду. При сборе материала для молекулярных исследований с помощью GPS определяли координаты популяции, из которой брали образец для анализа. Это дает возможность при необходимости сделать повторный сбор в том же месте и провести анализ. В ряде случаев гербаризировали растение, с которого был взят образец. Поскольку все виды рода занесены в красные книги, растения в гербарий брали без подземных органов (в щадящем режиме). Координаты места сбора указаны в гербарной этикетке и списке анализируемых образцов.

Препараты ДНК были выделены из собранного в природе материала, и гербарных образцов (LE и MW) (Приложение). При выделении ДНК был использован набор NucleoSpin Plant II (250) (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1,2) участка 18S-26S ядерной рибосомной ДНК (ярдНК) были выбраны в качестве молекулярного маркера для молекулярно-филогенетического анализа. Для ПЦР были использованы праймеры: ITS1 (5' — TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG — 3') и ITS4 (5' — TCCTCCGCTTATTGATATGC — 3'). ПЦР проводили в термоциклере Biometra T 300 с использованием набора "Encyclo PCR kit" («Евроген», Москва) по следующей программе: начальная денатурация ДНК — 94°C, 2 мин — (1 цикл); денатурация ДНК — 94°C, 40 с, отжиг праймеров — 60°C, 30 с, синтез ДНК (элонгация) — 72°C, — 1 мин (25 циклов); элонгация — 72°C, 5 мин — (1 цикл). Полученные ПЦР-продукты, очищали, с использованием набора реактивов фирмы «Цитокин» (Россия). Концентрацию матрицы для секвенирования подбирали в пределах 20-50 нг. Нуклеотидные последовательности определяли с использованием набора реагентов ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit с последующим анализом продуктов на автоматическом

секвенаторе ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, США) в Межинститутском Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии РАН им. В. А. Энгельгардта).

Результаты и обсуждение. *L. kumokiri* и *L. japonica* произрастали в центральной части заповедника, а также на южном склоне Гаккелевского хребта (Рис.1, точки 1 и 5). *L. japonica* встречался также в широколиственном лесу в долине Большого Золотого ручья (Рис. точка 2).

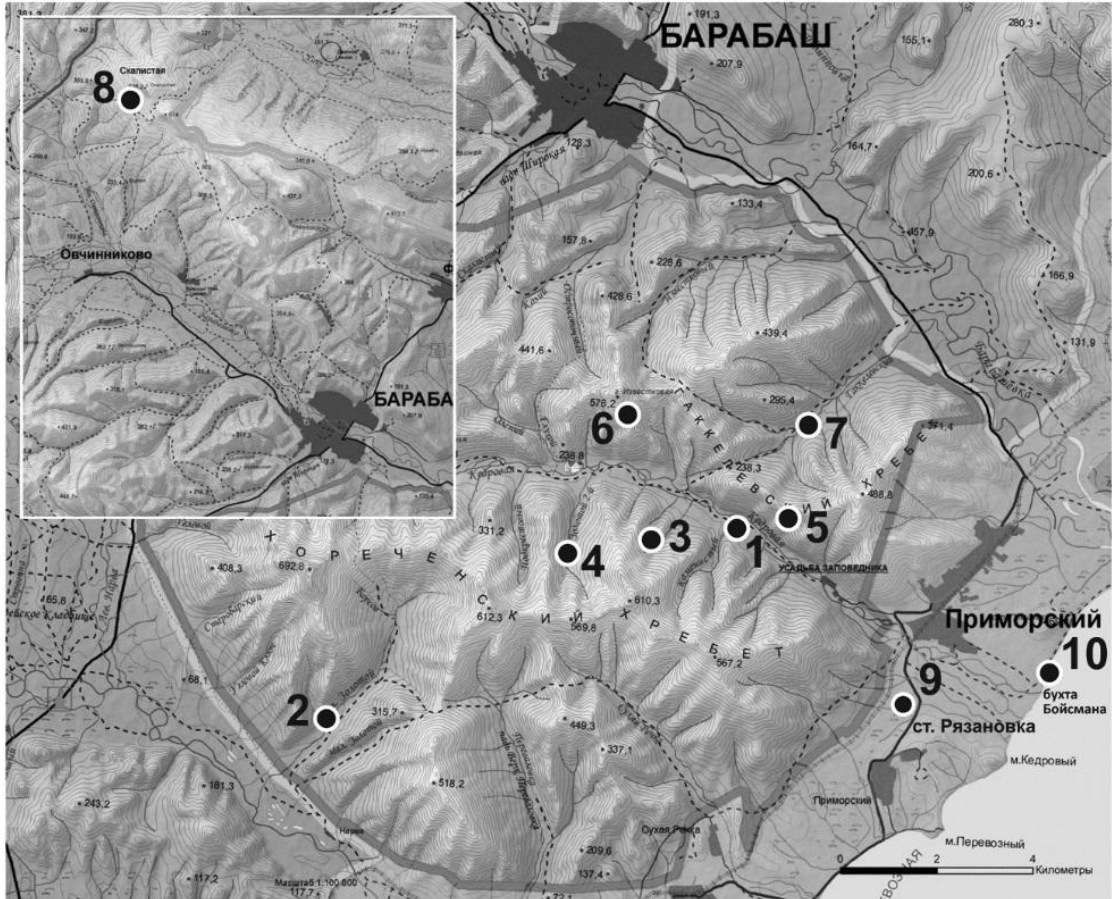


Рис. 1. Местоположение популяций орхидневых в заповеднике «Кедровая Падь» и сбора гербария и образцов для молекулярно-генетических исследований.

1. - центральная часть заповедника (долина р. Кедровая); 2. - Большой Золотой ключ; 3. - Сухореченский хребет (Первый Золотой ключ); 4. - Сухореченский хребет (Второй Золотой ключ); 5. - Гаккелевский хребет (южный склон); 6. - гора Известковая (юго-восточный склон); 7. - долина Гаккелевского ключа; 8. - гора Скалистая (северный склон); 9. - окрестности станции Рязановка; 10. - бухта Бойсмана.

s populations distribution in The State Natural Reserve “Kedrovaya Pad”, herbarium collection and samples for molecular analysis.

1. - the central part of the Reserve "Kedrovaya Pad" (valley of the Kedrovaya River); 2. - Large Gold Key; 3 - Suhorechensky ridge (First Golden Key); 4 - Suhorechensky ridge (Second Golden Key); 5. - Gakkelevskaya ridge (southern slope); 6. - Izvestkovaya Mountain (south-eastern slope); 7. – valley of the Gakkelevsky Key; 8. – Skalistsyaya Mountain (northern slope); 9. – Ryazanovka station; 10. – Boisman Bay.

Популяции этих видов обычно располагались в небольших сыроватых западинах или по пологим берегам водотоков на участках с разреженным травостоем, часто вдоль центральной тропы в широколиственных лесах из *Quercus mongolica* Fisch.ex Ledeb. (дуба монгольского), *Tilia amurensis* Rupr. (липы амурской), *Acer mono* Maxim. (клёна мелколистного) и *Acer pseudosieboldianum* (Pax) Kom. (клёна ложнозибольдового), с примесью *Fraxinus rhynchophylla* Hance (ясеня носолистного), *Juglans mandshurica* Maxim. (ореха маньчжурского), *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc. (сосны корейской) и других пород. В травяном ярусе, наряду с лесными видами, встречались *Caltha silvestris* Worosch. (калужница лесная), *Trollius chinensis* Bunge (купальница китайская), *Veratrum dahuricum* (Turcz. Loes. fil.) (чемерица даурская), *Chrysosplenium flagelliferum* Fr. Schmidt (селезёночник плетеносный).

L. krameri отмечен только на склонах Гаккелевского хребта (Рис.1, точка 5) и горы Известковой (Рис.1, точка 6) в широколиственном лесу из клёна мелколистного с *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (лимонником китайским), с преобладанием *Osmundastrum asiaticum* (Fern.) Tagawa (чистоустника азиатского) и *Carex siderosticta* Hance (осоки ржаво-пятнистой) в травяном покрове. Растения были бледно-зеленые и низкорослые, средняя высота генеративных особей – около 8 см. В составе популяции преобладали генеративные особи (61%), взрослых вегетативных было немного (5,6%), имматурных и ювенильных особей было по 16,7%. Плотность в группах не превышала 4 особей на м².

L. makinoana встречен в разнотравно-злаковой луговине у железнодорожного моста через р. Рязановку около ст. Рязановка (Рис.1, точка 9). В луговом сообществе преобладали несколько видов полыни, *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth (вейник наземный) и *C. langsdorffii* (Link) Trin. (вейник Лангсдорфа). Популяция этого вида была самой малочисленной. Отмечены единичные молодые и генеративные особи.

Состояние популяций видов *Liparis* в большинстве местонахождений на территории заповедника было удовлетворительным, как по численности особей, так и по занимаемой площади. Численность ценопопуляций колебалась от нескольких экземпляров до десятков особей. Растения обычно размещались небольшими группами, рассеянными по значительной территории, реже наблюдались крупные скопления или единичные экземпляры. Практически во всех популяциях преобладали взрослые особи, чаще генеративные (23-58%), доля имматурных колебалась от 7 до 38%, а ювенильных от 7 до 23 % в зависимости от вида и условий произрастания.

Там, где уже завязались плоды, процент плодоношения колебался у *L. japonica* — от 30 до 60%, у *L. kumokiri* — от 40 до 65%; у *L. krameri* – 50-70%.

Таким образом, во всех изученных популяциях отмечалось хорошее плодоношение и наличие возобновления, были представлены все возрастные группы особей, т.е. по классификации Т.А. Работнова популяции были полночленными, нормального типа [Работнов, 1950].

В ценопопуляциях видов рода *Liparis*, где отсутствовали генеративные особи или они находились в состоянии плодоношения, а также для особей с неясно выраженными видовыми признаками для уточнения определения были использованы последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1,2 ярдНК.

ITS — последовательности достаточно вариабельны для изучения взаимоотношений на внутривидовом уровне, в настоящее время они используются в очень многих работах по молекулярно-филогенетическому анализу [20-23 и др.].

При проведении молекулярно-филогенетического анализа 18 образцов вида рода *Liparis* дополнительно из базы данных GenBank были взяты нуклеотидные последовательности (ITS1,2) 14 видов *Liparis* и 2 видов *Malaxis Solander et Swartz, 1788*, мякотница (таксон из той же трибы *Malaxideae*, что и *Liparis*) (Приложение). Выборку таксонов для молекулярного анализа осуществляли, опираясь на работу [24].

Все ITS последовательности анализируемых видов, выравнивались в программе MUSCLE [25]. Просмотр результатов выравнивания нуклеотидных последовательностей и последующая ручная доработка выполнялась в программе BioEdit version 5.0.9. [26]. Набор из 38 выровненных последовательностей ITS 1,2 ярдНК содержит 732 позиции, из которых 446 — консервативные, 143 — парсимонно-информативные и 143 — парсимонно-неинформативные. Молекулярно-филогенетические деревья, были построены по ITS последовательностям двумя методами: методом Mr. Bayes 3.1 [27] и методом максимальной экономии RAUP* 4.0b8 [Swofford, 2003]. Полученные топологии деревьев не идентичны, но конгруэнтны в основных узлах. В статье мы приводим консенсусное молекулярно-филогенетическое дерево, построенное методом Mr. Bayes 3.1 (Рис.2).

В полученных нами молекулярных деревьях образцы из популяций разных видов *Liparis* формируют 3 хорошо поддержанных клады (А, С, D), что подтверждает их естественность (рис. 2).

Попарное сравнение ITS-последовательностей ярдНК анализируемых видов, показало, что все таксоны клады А близки между собой и имеют довольно низкий уровень дивергенции последовательностей (0,05%). Клада А включает в себя хорошо поддержанную субкладу В. Все образцы субклады В имеют идентичные нуклеотидные последовательности с реперными образцами *Liparis japonica* (Приложение). Полученные данные позволяют предположить, что образцы из

популяций субклады В представлены видом *L. japonica*. Образцы растений клады А, не вошедшие в субкладу В, имеют идентичные нуклеотидные последовательности с реперными образцами *L. kumokiri* (Приложение). В таком случае эти образцы можно отнести к *L. kumokiri*. При сравнении ITS последовательностей образцов клады А были отмечены группоспецифичные (синапоморфные) замены в положении 548 (С→Т) и 577 (С→А), которые маркируют виды клады А от видов субклады В (Рис. 3).

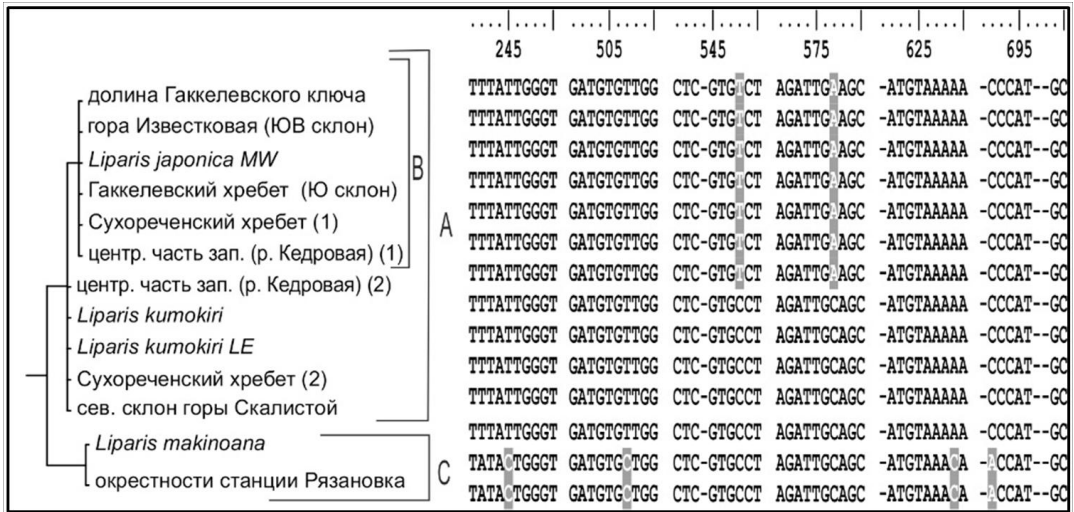


Рис. 2. Молекулярно-филогенетическое дерево, полученное с помощью метода Mr. Bayes 3.1 по результатам анализа последовательностей участка ITS1,2 ярдНК. Числа над ветвями обозначают апостериорную вероятность, числа под ветвями — значения бутстрэпа (≥50%), полученные в результате бутстреп-анализа с помощью метода максимальной экономии.

Fig. 2. Phylogenies based on the nuclear (ITS1,2) sequence data. Bootstrap values (≥50%) and posterior probability values (from the Bayesian analysis) are shown above and below the branches, respectively.

Образец, собранный у ж/д моста в окрестности станции Рязановка (Рис. 1, точка 9), вместе с *L. makinoana* из базы данных GenBank формируют хорошо поддержанную субкладу в кладе С. ITS последовательности этих образцов идентичны. Таким образом, полученные данные позволяют нам предположить, что образец, собранный в окрестности станции Рязановка — *L. makinoana*. Группоспецифичные замены в ITS последовательностях в положении 245 (Т→С), 507 (Т→С), 629 (А→С) и 692 (С→А) маркируют виды субклады *L. makinoana* в кладе С (Рис. 3). Базальное положение в кладе С занимает *Liparis japonica* (Япония, Хоккайдо) [24], что согласуется с молекулярными данными [14] и морфологическими признаками [16].

Клада D занимает на филогенетическом дереве (Рис.2) обособленное положение относительно клад А и С. В кладу D входит образец, собранный на южном склоне Гаккелевского хребта (Рис. 1, точка 5) и два образца *L. krameri* из базы данных

GenBank. Все образцы клады D имеют идентичные нуклеотидные последовательности. Обособленное положение клады D, определяется достаточно высокой вариабельностью ITS последовательностей *L. krameri* по сравнению с последовательностями *L. japonica*, *L. kumokiri* и *L. makinoana*.

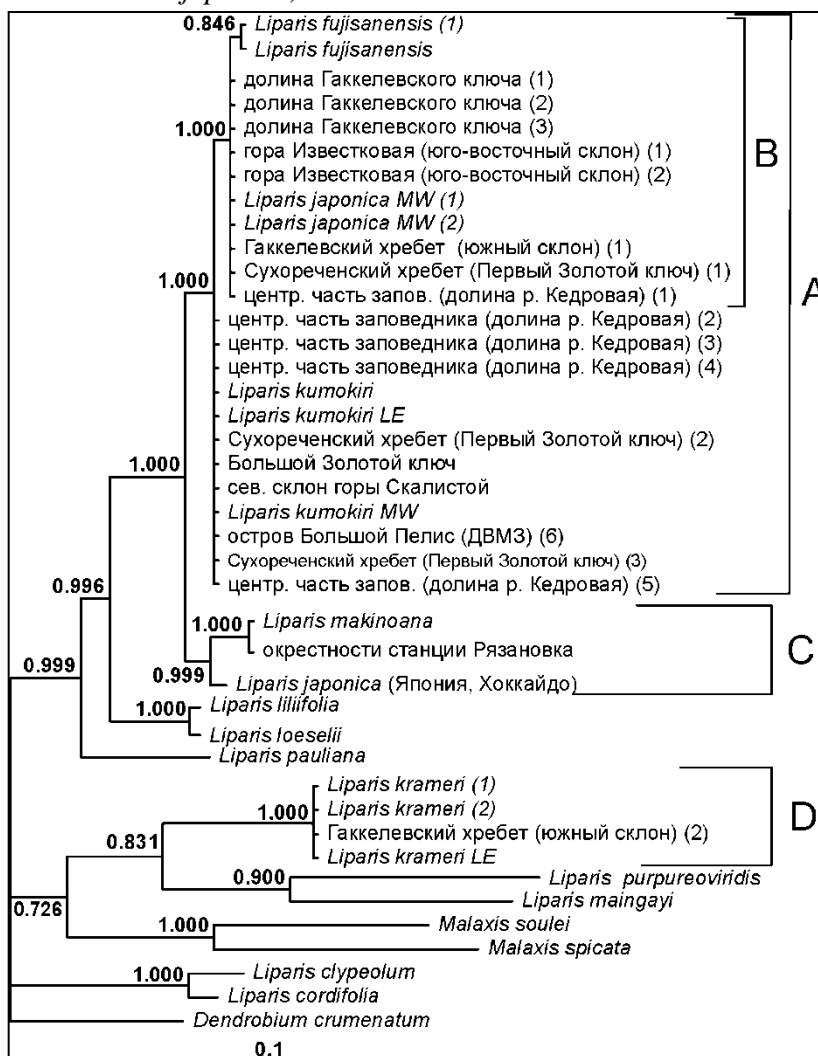


Рис. 3. Фрагменты молекулярно-филогенетического дерева, полученного с помощью метода Mr. Bayes 3.1 и фрагменты выравнивания последовательностей участка ITS ярдНК, анализируемых образцов с группоспецифичными заменами.

Fig.3. Fragments of the molecular phylogenetic tree obtained by the method of Mr. Bayes 3.1 and fragments of sequence alignment of ITS nrDNA with group-specific substitutions.

Согласно полученным данным, популяция на южном склоне Гаккелевского хребта образована *L. krameri*.

Таким образом, использование внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1,2 ярдНК в качестве молекулярных маркёров позволило провести определение образцов рода *Liparis* в изученных популяциях.

На территории заповедника и за его пределами, кроме видов рода *Liparis* (*L. japonica*, *L. krameri*, *L. kumokiri* и *L. makinoana*), были встречены еще 13 видов из семейства *Orchidaceae*. Для этих видов проводилось изучение возрастной структуры и дана оценка состояния популяций в соответствии с программой мониторинга редких видов на охраняемых природных территориях. Выделение возрастных групп у разных видов проводилось как с использованием литературных данных (Татаренко, 1996), так и собственных наблюдений.

Виды рода *Neottia* Guettard 1750 (гнездовка) встречались очень редко, единичными особями. Растения находились в стадии плодоношения. *N. papilligera* Schlechter, 1920 (гнездовка сосочковидная) и *N. asiatica* Ohwi, 1931 (гнездовка азиатская) были найдены в широколиственном лесу из клёна мелколистного, липы амурской, дуба монгольского между 1 и 2 Золотыми ручьями (Рис.1, между точками 3 и 4) на почти мёртво-покровном участке. Гнездовка азиатская отмечена также на склоне 2-ого Золотого ручья (Рис.1, точка 4), в кедрово-широколиственном лесу с *Betula costata* Trautv. (берёза ребристая) и *Betula schmidtii* Regel (берёза Шмидта) на участке с разреженным травостоем, где покрытие составляло 5–7%.

Cephalanthera longibracteata Blume, 1859 (пыльцеголовник длинноприцветниковый) — найден один генеративный экземпляр с 5-ю плодами в средней части склона юго-восточной экспозиции г. Известковая (Рис.1, точка 6), на открытом участке разреженного дубняка в составе разнотравно-злакового лугового сообщества.

Cypripedium macranthon Swartz, 1800 (башмачок крупноцветковый) — у подножья г. Скалистой (Рис.1, точка 8) встречены 1 генеративный и 1 взрослый вегетативный и 1 имматурный экземпляры вида, расположенные на небольшом расстоянии друг от друга, под пологом широколиственного леса из клёна мелколистного с примесью дуба монгольского и др. широколиственных пород. Сомкнутость крон – 0,7. В травяном ярусе доминировали: *Leptorumohra amurensis* (Christ) Tzvel. (лепторумора амурская), *Brachybotrys paridiformis* Maxim. ex Oliver (короткокисточник воронеглазый), *Convallaria keiskei* Miq. (ландыш Кейске) и *Cacalia hastata* L. (какалия копьевидная). Проективное покрытие травяного яруса составило около 20%.

Habenaria linearifolia Maximowicz, 1859 (поводник линейнолистный) — популяция численностью в несколько десятков особей отмечена на болотнищевосоковом болоте с *Eleocharis wichurae* Voeck. (болотница Вихуры), *Sanguisorba tenuifolia* Fisch. ex Link (кровохлёбка тонколистная), *Sanguisorba officinalis* L. (кровохлёбка лекарственная) у ст. Рязановка (Рис.1, точка 9). Плотность генеративных растений в местах скопления — 5 особей на 1 м², общая плотность — 8 особей на 1 м². Площадь, на которой встречается вид 50x30 м.

Вторая популяция вида расположена за береговым валом в бухте Бойсмана (Рис.1, точка 10) на топком кочкарном разнотравно-осоковом болоте с *Menyanthes trifoliata* L. (вахтой трёхлистной), *Caltha palustris* L. (калужницей болотной), *Sanguisorba tenuifolia* Fisch. ex Link (кровохлёбкой тонколистной). Плотность генеративных растений в местах скопления — 4 особи на 1 м².

Habenaria radiata Sprengel, 1826 (поводник лучистый) — популяции, численностью в несколько десятков особей отмечены на болотнищевом-осоковом болоте у ст. Рязановка (Рис.1, точка 9), а также на топком кочкарном разнотравно-осоковом болоте за береговым валом в бухте Бойсмана (Рис.1, точка 10) в фазе массового цветения. На болоте у ст. Рязановка плотность популяции достигала в местах скопления 45 особей на 1 м², здесь значительно преобладали молодые растения и составляли до 70% численности, генеративные — около 2% и около 28% — взрослые вегетативные особи. В бухте Бойсмана площадь занятая видом невелика. Плотность в местах скопления — в среднем составила 24 особи на 1 м². Генеративные и иматурные особи составляют по 33%, а взрослые вегетативные и ювенильные — по 17%, т.е. доля молодых и взрослых растений в популяции одинакова.

Platanthera extremiorientalis Nevski, 1935 (любка дальневосточная) — встречается небольшими группами по 2–3 экземпляра в широколиственном лесу между 1-м и 2-м Золотыми ключами (Рис.1, между точками 3 и 4). Всего было отмечено три группы, в которых преобладали иматурные особи.

Platanthera freynii Kraenzlin, 1913 (любка Фрейна) — встречена в широколиственном лесу из клёна мелколистного, дуба монгольского и *Tilia amurensis* Rupr. (липы амурской) на северном склоне г. Скалистой (Рис.1, точка 8) по сыроватым местам небольшими по численности разновозрастными группами из 3-5 особей и единичными генеративными особями. Плодообразование – 35,7%.

Platanthera hologlottis Maximowicz, 1859 (любка цельногубая) — высокие (85-95 см) единичные экземпляры вида в фазе цветения отмечены на сыром разнотравно-полынном лугу по дороге к Большому Золотому ключу (Рис.1, точка 2). Немногочисленные популяции вида по 5-7 генеративных особей и 3-6 вегетативных отмечены также на болотнищевом-осоковом болоте у ст. Рязановка (Рис.1, точка 9) и на топком кочкарном болоте за береговым валом в бухте Бойсмана (Рис.1, точка 10).

Spiranthes sinensis (Persoon) Ames, 1908 (скрученник китайский) — в фазе цветения встречена на пойменном разнотравно-злаковом лугу с преобладанием *Artemisia gmelinii* Weber ex Stechm. (полынь Гмелина) у реки Рязановки близ ст. Рязановка (Рис.1, точка 9) в районе железнодорожного моста. Общее проективное покрытие травяного яруса – 35%. Плотность популяции 3–5 особей на 1 м². Преобладали генеративные растения.

Вторая популяция отмечена на болотнищьево-осоковом болоте у ст. Рязановка (Рис.1, точка 9). Численность её невелика – не более 20 особей. Обе популяции полночленные и устойчивые.

Pogonia japonica Reichenbach Fil, 1852 (бородатка японская). — впервые отмечено новое местонахождение вида на топком кочкарном осоково-разнотравном болоте за береговым валом в северной части бухты Бойсмана (Рис.1, точка 10). Растения находились в фазе плодоношения. Популяция располагалась как на моховых подушках из сфагнома, так и в более топкой части болота. Отмечена высокая плотность популяции в местах массового произрастания вида (110 особей на 1 м²). В составе популяции преобладали молодые особи (41,8% имматурные и 25,5% ювенильные), генеративных растений было значительно меньше — 7,2%, взрослых вегетативных — 25,5%. Отмечено очень хорошее плодообразование (98%).

Tulotis fuscescens Rafinesque, 1836 (тулотис буреющая) – небольшая популяция вида найдена на сыроватом участке в широколиственном лесу с примесью берёзы в долине 1-го Золотого ручья (Рис.1, точка 3). Она состояла из 15 растений, причем большую часть составляли молодые (ювенильные и имматурные) особи (60%), доля генеративных — 20%, взрослых вегетативных – 20%. Плодообразование было около 50%.

Tulotis ussuriensis (Regel & Maack) H. Nara, 1955 (тулотис уссурийская) — встречается по северному склону г. Скалистой (Рис.1, точка 8) в широколиственном лесу из дуба монгольского, ореха маньчжурского с примесью клёна мелколистного. В травяном покрове доминируют папоротники и осока ржаво-пятнистая. Местами *Tulotis ussuriensis* образует довольно большие скопления, площадь которых колеблется от 2,5 до 17 м² с плотностью популяции более 50 особей на 1 м². Нами отмечено 3 таких фрагмента популяции. Генеративные растения составляют около 26%, 43% - взрослые вегетативные, 22% имматурных особей и 9% ювенильных. Значительное участие, как взрослых, так и молодых особей в составе популяции и свидетельствует не только об её устойчивости, но и о перспективах расширения занимаемой ею площади.

Заключение. На территории заповедника и за его пределами нами отмечено 17 видов орхидных, т.е. подтверждено произрастание 16 видов и впервые обнаружено новое местонахождение *Pogonia japonica* – на топком кочкарном осоково-разнотравном болоте за береговым валом в северной части бухты Бойсмана.

Проведённая с помощью молекулярно-филогенетических методов идентификация растений показала, что виды рода *Liparis* хорошо различимы на молекулярном уровне. Таким образом, параллельное использование морфологических и молекулярных методов позволяет более точно провести определение растений рода *Liparis*, особенно в сложных случаях.

Исследование возрастной структуры популяций растений из сем. Orchidaceae показало, что популяции *Liparis japonica* и *L. kumokiri*, *Spiranthes sinensis*, *Pogonia japonica*, *Tulotis ussuriensis*, *Tulotis fuscescens*, *Habenaria linearifolia* и *H. radiata*, были по классификации Т.А. Работнова (1950) полночленными, устойчивыми, нормального типа. Популяции *Liparis krameri* и *L. makinoana*, *Platanthera hologlottis*, *P. extremiorientalis* и *P. freynii* были малочисленными, но представлены особями различных возрастных групп. К наиболее редким видам на обследованной территории можно отнести *Neottia papilligera* и *N. asiatica*, а также *Cephalanthera longibracteata* и *Cypripedium macranthon*.

Для большинства видов отмечено хорошее плодоношение и наличие возобновления, что свидетельствует о хорошей перспективе развития их популяций.

Благодарности

Выражаем глубокую благодарность сотрудникам гербариев МГУ, БИН РАН, ГБС РАН, ДВНЦ РАН и Ботанического сада-института ДВО РАН за помощь в нашей работе, а также сотрудникам заповедника за оказанное содействие в проведении полевых работ.

Особенно хотели бы выразить глубокую благодарность Инне Владимировне Шибневой за предоставленные материалы и помощь при проведении полевых работ на территории заповедника. Но к сожалению, она ушла из жизни в 2015 году. Всю жизнь проработала в «Кедровой пади», натуралист широкого профиля.

Литература

1. Коркишко Р. И. Сосудистые растения // Коркишко Р. И., Медведева Л. А., Гамбарян С. К. и др. Кадастр растений и грибов заповедника "Кедровая падь": Списки видов. — Владивосток : Дальнаука, 2002. С. 31-66.
2. Красная книга Российской Федерации. / Кн. 1. Растения и грибы / ред. Р. В. Камелин. — М.: Товарищество научных изданий КМК. 2008. 855 с.
3. Красная книга Приморского края. В 2 кн. Кн. 2. Растения. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов / ред. Н. И. Дегтярёв, Н. Гамова. — Владивосток: АВК «Апельсин». 2008. 688 с.
4. Вышин И. Б. Семейство Ятрышниковые или орхидные — Orchidaceae Juss. — СПб.: Наука, 1996. Т. 8. С. 301–339. (Сосудистые растения советского Дальнего Востока: в 8 т.).
5. Вахрамеева М. Г., Варлыгина Т.И., Татаренко И.В. Орхидные России (биология, экология и охрана). — М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. 437 с.
6. Ракова М. В. Биология редких видов растений заповедника «Кедровая Падь». — Владивосток : Дальнаука, 1992 (1993). 175 с.
7. Шибнева И. В., Коркишко Р. И. О новом местонахождении *Liparis kumokiri* F. Maek. в заповеднике «Кедровая Падь» // Животный и растительный мир Дальнего Востока. Сер. Экология и систематика растений. – Уссурийск: УГПИ, 2001. Вып. 5. С. 46–52.
8. Шибнева И.В. *Liparis kumokiri* (Orchidaceae) на Дальнем Востоке России // Бот. журн., 2004. Т. 89, № 10. С. 1633–1636.
9. Невский С.А. Род *Liparis* L. С. Rich. Флора СССР. — Л.: АН СССР, 1935. Т. 4. С. 601–604.
10. Kim S.N., Kim Y.S. Morphological and cytological Study on genus *Liparis* in Korea // Kor. J. Plant Tax. 1986. Vol. 16, No. 2. P. 59–88.

11. Ракова М. В. *Liparis krameri* (Orchidaceae) — новый вид для флоры СССР из заповедника «Кедровая Падь» (Приморский край) // Бот. журн., 1990. Т. 75, № 12. С. 1780–1782.
12. Шибнева И. В. Виды рода *Liparis* (Orchidaceae) на юге материковой части Дальнего Востока России // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века, Петрозаводск, 22–27 сент. 2008 г.: материалы Всерос. конф.: в 6 ч. / отв. ред. Л.В. Багмет. - Петрозаводск: Карельский научный центр, 2008. Ч. 3. С. 148–150.
13. Tsutsumi C., Yukawa T. Taxonomic status of *Liparis japonica* and *L. makinoana* (Orchidaceae); preliminary report // Bull. Natl. Mus. Nat. Sci. Ser., 2008. Vol. 34, No. 2. P. 89–94.
14. Lee C. S., Tsutsumi C., Yukawa T., Lee N. S. Two New Species of the Genus *Liparis* (Orchidaceae) from Korea Based on Morphological and Molecular Data // J. Plant Biol., 2010. Vol. 53, No. 3. P. 190–200.
15. Ефимов П.Г. Род *Liparis* (Orchidaceae) на территории России // Бот. журн., 2010. Т. 95, № 10. С. 1458–1480.
16. Шибнева И. В. Что такое *Liparis japonica* (Miq) Maxim. и *L. makinoana* Schltr. (Orchidaceae) — заметки флориста // Охрана и культивирование орхидей, Санкт-Петербург, 26–30 сент. 2011 г.: матер. IX междунар. науч. конф. / отв. ред. И.И. Шамрова. - Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2011. С. 287–289.
17. Stuessy T. F. Morphological data in plant systematics // Stuessy T.F, Mayer V. and Hörandl E. (eds.). Deep morphology. Toward a renaissance of morphology in plant systematics. 2003. P. 299–315.
18. Работнов Т. А. Вопросы изучения состава популяций для целей фитоценологии // Проблемы ботаники. 1950а. № 1. С. 465–483.
19. Татаренко И. В. Орхидные России: жизненные формы, биология, вопросы охраны. – М.: Аргус, 1996. 206 с.
20. Berg C., Higgins W. E., Dressler R. L., Whitten W. M., Soto Arenas M. A., Culham A., Chase M. W. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA // Lindleyana. 2000. Vol. 15, No. 2. P. 96–111.
21. Valiejo-Roman C. M., Terentieva E. I., Samigullin T. H., Pimenov M. G. Relationships among genera in Saniculoideae (Umbelliferae) and connected taxa inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA // Taxon. 2002. Vol. 51. P. 91–101.
22. Zhang J-W., Nie Z-L., Wen J., Sun H. Molecular phylogeny and biogeography of three closely related genera, *Soroseris*, *Stebbinsia*, and *Synclathium* (Asteraceae, Cichorieae), endemic to the Tibetan Plateau, SW China // Taxon. 2011. Vol. 60, No 1. P. 15–26.
23. Liang Z., Wei W., Yi R., Julien B. B. Floral Development in *Asteropyrum* (Ranunculaceae): Implications for ITS Systematic Position // Annales Botanici Fennici. 2012. Vol. 49, No.1–2. P. 31–42.
24. Su Y. Y., Huang Y. L., Chen L. J., Zhang P. W., Liu Z. J., Zhang G. Q. *Liparis wenshanensis*, a new orchid species from China; Evidence from morphological and molecular analyses // Phytotaxa, 2015. Vol. 204, No. 4. P. 253–264.
25. Edgar R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucleic Acids Research, 2004. Vol. 32. P. 1792–1797.
26. Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids Symp. 1999. No. 41. P. 95–98.
27. Ronquist F. R., Huelsenbeck J. P. MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. No 19. P. 1572–1574.
28. Swofford, D. L. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (and Other Methods), version 4.0. — Sunderland: Massachusetts, Inc. Publishers, 2003. Sinauer Associates.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 14-50-00029: сбор материала на территории Приморского края, анализ материала морфологическими методами; при поддержке гранта РФФИ № 14-04-01486: молекулярно-филогенетический анализ.

Приложение.

Список видов, ITS — последовательности которых использованы при построении молекулярно-филогенетического дерева, их ваучеры и номера в базе данных GenBank.

Kingdom PLANTAE — РАСТЕНИЯ
Subkingdom VIRIDIPLANTAE — ЗЕЛЁНЫЕ РАСТЕНИЯ
Phylum MAGNOLIOPHYTA — ЦВЕТКОВЫЕ
Class LILIOPSIDA— ОДНОДОЛЬНЫЕ
Order Orchidales — Орхидноцветные
Family Orchidaceae Jussieu — Орхидные
Genus *Liparis* Richard, 1817

1. *Liparis fujisanensis* Fumio Maekawa ex Konta & Sadamu Matsumoto — липарис фуджисанензис, EU024936
2. *Liparis fujisanensis* Fumio Maekawa ex Konta & Sadamu Matsumoto — липарис фуджисанензис, AB289461
3. *Liparis kumokiri* Fumino Maekawa — липарис Кумокири, AB289470
4. *Liparis makinoana* Schlechte — липарис Макино, EU017405
5. *Liparis krameri* Franchet & Savatier — липарис Крамера, AB289469
6. *Liparis krameri* Franchet & Savatier — липарис Крамера, AB289468
7. *Liparis liliifolia* (Linnaeus) Richard & Lindley — липарис лилиифолия, AF521067
8. *Liparis loeselii* (Linnaeus) Richard — липарис Лёзеля, AY907091
9. *Liparis japonica* (Miquel) Maximowicz var. *makinoana* (Schlechter) M. Hiroe — липарис японский, AB289462
10. *Liparis pauliana* Handel-Mazzetti — липарис паулиана, AY907096
11. *Liparis clypeolum* Lindley — липарис клипеолум, AY907079
12. *Liparis japonica* (Miquel) Maximowicz — липарис японский (MW), Приморский край, заповедник «Уссурийский» им. В.Л. Комарова, 29.08. 1965, коллектор О.Д. Форш
13. *Liparis japonica* (Miquel) Maximowicz — липарис японский (MW), Приморский край, заповедник «Кедровая Падь», №198, 20.08.1983, коллекторы Е.В. Ключков, М.Г. Пименов
14. *Liparis kumokiri* Fumino Maekawa — липарис Кумокири (LE) Приморский край, 11.09.1979 г., коллектор Н. Цвелев
15. *Liparis kumokiri* Fumino Maekawa — липарис Кумокири (MW) Сахалинская область, пос. Южно-Курильск, 2.08.1995 г., коллектор И. Татаренко
16. *Liparis krameri* Franchet & Savatier — липарис Крамера (LE), заповедник «Кедровая Падь», Гаккелевский хребт, 2.10.1989 г., коллектор М.В.Ракова

Genus *Malaxis* Solander & Swartz, 1788

17. *Malaxis spicata* Swartz — Малаксис колосковый, AF521068
18. *Malaxis soulei* L.O.Williams — Малаксис Соулей, AY907119

Genus *Dendrobium* Swartz, 1799

19. *Dendrobium crumenatum* Swartz — Дендробиум круменатум, HM590370

Population Studies of the Orchids in the Reserve Kedrovaya Pad

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

Botanical Garden, Moscow State University

Moscow, 119991, Russian Federation

E-mail: el.terenteva@mail.ru

Abstract

17 species from the family Orchidaceae Jussieu, 1789 were studied. Analysis of the ITS sequences allowed to identify species with unclear taxonomic status belonging to the genus *Liparis*. The occurrence of 16 species from the family Orchidaceae are confirmed in the reserve using morphological and molecular methods. A new location of *Pogonia japonica* was discovered. The study of the age structure of populations from the family Orchidaceae showed that populations of *Liparis kumokiri* and *L. japonica*, *Spiranthes sinensis*, *Pogonia japonica*, *Tulotis ussuriensis*, *T. fuscescens*, *Habenaria linearifolia* and *H. radiata* were sustainable and of normal type. Populations of *Liparis krameri* and *L. makinoana*, *Platanthera hologlottis*, *P. extremiorientalis* and *P. freynii* were small but represented by individuals of various age. *Neottia papilligera* and *N. asiatica*, *Cephalanthera longibracteata* and *Cypripedium macranthon* were the most rare species in the observer area. Most species had good fruiting and renewal; which demonstrates a good perspective of development of the populations.

Keywords: reserve Kedrovaya Pad, *Liparis*, Orchidaceae, ITS1, 2 nrDNA.

References

1. Korkishko R. I., 2002, Vascular plants, in *Kadastr rasteniy igribov zapovednika «Kedrovaya Pad'»*: *Spiski vidov* [Inventory of the plants and fungi of the reserve «Kedrovaya Pad'»: List of species], Dalnauka, pp. 31-66, Vladivostok. (in Russ).
2. *Krasnaya kniga Rossiyskoy Federatsii, Rasteniya i griby*, 2008, [The Red Book of the Russian Federation, Plants and mushrooms], Association of scientific editions KMK, 855 p. Moscow. (in Russ).
3. *Krasnaya kniga Primorskogo kraja, Rasteniya*, 2008, [Red Data Book of Primorsky Krai, Plants], AVK "Apelsin", 688 p. Vladivostok. (in Russ).
4. Vyshin I. B., 1996, *Family Orchidaceae or Orchid family — Orchidaceae Juss*, in Kharkevich S. S. (ed.), *Sosudistyje rasteniya sovetskogo Dal'nego Vostoka, 8 t.* [Vascular plants of the Soviet Far East. 8 volumes], Nauka, vol. 8, pp. 301-339, Sankt-Petersburg. (in Russ).
5. Vahrimeeva M. G., Varlygina T. I., Tatarenko I. V., 2014, *Orkhidnye Rossii (biologiya, ekologiya i okhrana)* [Orchids of Russia (biology, ecology and protection)], Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK, 437 p. Moscow. (in Russ).
6. Rakova M. V., 1992 (1993), *Biologiya redkikh vidov rasteniy zapovednika «Kedrovaya Pad'»* [Biology of rare plants of the Reserve «Kedrovaya Pad'»], Dalnauka, 175 p. Vladivostok. (in Russ).
7. Shibneva I. V., Korkishko, R. I., 2001, On the new location of *Liparis kumokiri* F. Maek, in the Reserve «Kedrovaya Pad'», *Zhivotnyy i rastitel'nyy mir Dal'nego Vostoka, Seria Ekologiya i sistematika rasteniy* [Flora and Fauna of the Far East, Series Ecology and systematics of plants], vol. 5, pp. 46-52. (in Russ).
8. Shibneva V. I., 2004, *Liparis kumokiri* (Orchidaceae) in Far East of Russia, *Botanicheskiy zhurnal*, vol. 89, no. 10, pp. 1633-1636. (in Russ).
9. Nevskiy S. A., 1935, The Genus *Liparis* L. C. Rich, in *Flora of the USSR, AN SSSR*, vol. 4, pp. 601 -604. Leningrad. (in Russ).
10. Kim S. N., Kim Y. S., 1986, Morphological and cytological Study on the genus *Liparis* in Korea, *Korean Journal of Plant Taxonomists*, vol. 16, no. 2, pp. 59-88.
11. Rakova, M. V., 1990, *Liparis krameri* (Orchidaceae) — a new species for the flora of the USSR from the reserve Kedrovaya Pad (Primorsky Krai), *Botanicheskiy zhurnal*, vol. 75, no. 12, pp. 1780 - 782. (in Russ).
12. Shibneva V. I., 2008, Species of the genus *Liparis* (Orchidaceae) in the South mainland of the Russian Far East in *Fundamental'nye i prikladnye problemy botaniki v nachale XXI veka*, [Proceedings of the 6 Conference

- "Fundamental and applied problems of botany at the beginning of the XXI century", Petrozavodsk, 2008,], Karelian research centre, part 3, pp. 148-150, Petrozavodsk. (in Russ).
13. Tsutsumi C., Yukawa T., 2008, Taxonomic status of *Liparis japonica* and *L. makinoana* (Orchidaceae); preliminary report, *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B, Botany*, 34, no. 2, pp. 89-94.
 14. Lee C. S., Tsutsumi C., Yukawa T., Lee N. S., 2010, Two New Species of the Genus *Liparis* (Orchidaceae) from Korea Based on Morphological and Molecular Data, *Journal of Plant Biology*, vol. 53, no. 3, pp. 190-200.
 15. Efimov P. G., 2010, Genus *Liparis* (Orchidaceae) on the territory of Russia, *Botanicheskiy zhurnal*, vol. 95, no. 10, pp. 1458-1480. (in Russ).
 16. Shibnev V. I., 2011, What is *Liparis japonica* (Miq) Maxim. and *L. makinoana* Schltr. (Orchidaceae) — notes florist, in Proceedings of the 9th Conference "Protection and cultivation of orchids ", St. Petersburg, 26-30 Sept. 2011, Partnership of scientific publications KMK, pp. 287-289, Moscow. (in Russ).
 17. Stuessy T. F., 2003, Morphological data in plant systematics, in Stuessy T. F, Mayer V. and Horandl E. (eds.), *Deep morphology, Toward a renaissance of morphology in plant systematics*, Koeltz, Konigstein, pp. 299-315.
 18. Rabotnov T. A., 1950, The problems of studying the structure of populations for the purposes of phytocenology, *Problemy botaniki*, no. 1, pp. 465-483. (in Russ).
 19. Tatarenko I. V., 1996, *Orkhidnye Rossii: zhiznennye formy, biologiya, voprosy okhrany* [Orchids of Russia: life forms, biology, protection], Argus, 206 p. Moscow. (in Russ).
 20. Berg C., Higgins W. E., Dressler R. L., Whitten W. M., Soto Arenas M. A., Culham A., Chase M. W., 2000, A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA, *Lindleyana*, vol. 15, no. 2, pp. 96-11.
 21. Valiejo-Roman C. M., Terentieva E. I., Samigullin T. H., Pimenov M. G., 2002, Relationships among genera in Saniculoideae (Umbelliferae) and connected taxa inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA, *Taxon*, vol. 51, pp. 91-101.
 22. Zhang J-W., Nie Z-L., Wen J., Sun H., 2011, Molecular phylogeny and biogeography of three closely related genera, *Soroseris*, *Stebbinsia*, and *Synclathium* (Asteraceae, Cichorieae), endemic to the Tibetan Plateau, SW China, *Taxon*, vol. 60, no 1, pp. 15-26.
 23. Liang Z., Wei W., Yi R., Julien B. B., 2012, Floral Development in *Asteropyrum* (Ranunculaceae): Implications for ITS Systematic Position, *Annales Botanici Fennici*, vol. 49, no. 1-2, pp. 31-42.
 24. Su Y. Y., Huang Y. L., Chen L. J., Zhang P. W., Liu Z. J., Zhang G. Q., 2015, *Liparis wenshanensis*, a new orchid species from China; Evidence from morphological and molecular analyses, *Phytotaxa*, vol. 204, no. 4, pp. 253-264.
 25. Edgar R. C., 2004, MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research*, vol. 32, pp. 1792-1797.
 26. Hall T. A., 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*, no. 41, pp. 95-98.
 27. Ronquist F. R., Huelsenbeck J. P., 2003, MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models, *Bioinformatics*, no. 19, pp. 1572-1574.
 28. Swofford, D. L., 2003, *PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and Other Methods), version 4*, Sunderland: Massachusetts, Inc. Publishers, Sinauer Associates.

Материалы поступили в редакцию 17.05.2016.