

УДК 582.52 (476)

В.В. ПИНЧУК, Вал.Н. ТИХОМИРОВ

ИЗМЕНЧИВОСТЬ *EPIPACTIS HELLEBORINE* И *EPIPACTIS ATRORUBENS* (ORCHIDACEAE) ПРИ ИХ ГИБРИДИЗАЦИИ

A hybrid of *Epipactis* × *schmalhauseni* K. Richt. (*E. atrorubens* × *E. helleborine*) was for the first time shown for Republic of Belarus. By the totality of characteristics it resembles intermediate state between parent species. By part of features the hybrid is more similar to one of parents and authentically different from the other. For example, *E. schmalhauseni* is similar to *E. helleborine* but differs from *E. atrorubens* with an upper leaf width, internode length under the flower, outer perianth width, length and width of inner perianth. *E. atrorubens* and *E. × schmalhauseni* obviously does not differ between each other, but are different from from *E. helleborine* with the length of upper steam leaf and bract, hypohilium width, length to width interrelation of internode under inflorescence and bract and ovary length ratio. The discriminant analysis generally confirmed conclusions made during average values comparison of parameters studied.

Orchidaceae Juss. довольно молодое в эволюционном отношении семейство покрытосеменных. Оно является хорошей модельной группой для изучения эволюционных процессов. В нем широко распространена межвидовая и даже межродовая гибридизация, причем гибриды образуются не только в результате искусственного скрещивания, но довольно часто – в естественных местообитаниях при совместном произрастании родительских видов [1, 2]. И хотя вопрос о том, какую роль играет гибридизация в эволюции орхидных, в настоящее время широко дискутируется [2, 3], изучение гибридов и гибридных популяций представляет значительный интерес.

Род *Epipactis* Zinn. – Дремлик – насчитывает от 60 до 80 видов, распространенных в умеренном поясе Евразии, в Африке и Северной Америке [4]. Однако, по некоторым данным [5], род может насчитывать свыше 250 видов, что связано с биологическими особенностями его видов. В настоящее время помимо широко распространенных перекрестно опыляющихся видов дремликов [6] описывается большое количество самоопыляющихся автогамных или даже клейстогамных видов [7–10]. Большинство из них имеет локальное распространение и, вероятно, гибридную природу [3, 11].

На территории Беларуси в настоящее время отмечено всего три вида рода *Epipactis*: *E. atrorubens* (Hoffm. ex Bernh.) Besser, *E. helleborine* (L.) Crantz и *E. palustris* (L.) Crantz. Последние два вида дремликов являются довольно обычными на территории нашей страны, тогда как *E. atrorubens* довольно редок и занесен в Красную книгу Республики Беларусь.

В ходе полевых исследований 2008 г. на территории Мядельского района Минской области (окр. к. п. Нарочь (500 м к СЗ), обочина насыпной дороги на месте старой узкоколейки) было обнаружено местообитание, в котором совместно произрастали *E. atrorubens* и *E. helleborine*. При этом наблюдалась их гибридизация. Гибриды визуально отличались от родительских видов по качественным признакам. Они имели зеленый стебель и листья (признак *E. helleborine*), но их цветки были окрашены в красный цвет, а эпихилий имел бахромчатый край и сильно морщинистые бугорки у основания (признаки *E. atrorubens*). Цель настоящей статьи – оценить степень изменчивости данных видов при их гибридизации и количественно оценить отличия *E. atrorubens* и *E. helleborine* от гибрида *E. × schmalhauseni* K. Richt.

Материал и методика

В исследуемой смешанной популяции было проанализировано в общей сложности 30 растений, из них 10 – *E. atrorubens*, 13 – *E. helleborine* и 7 – *E. × schmalhauseni*. У каждого растения в 40 % этиловом спирте фиксировалось по 3 раскрывшихся цветка, которые в лабораторных условиях препарировались, наклеивались на бумагу и сканировались с разрешением 1200 dpi. Полученные изображения в дальнейшем анализировались с помощью программы tpsDig 2.

На гербарных образцах и сканированных препарированных цветках учитывались 24 параметра [5, 12]: высота растения (H , мм); число стеблевых листьев (N , шт.), длина второго листа от основания (L_{f1} , мм), ширина второго листа от основания (H_{f1} , мм); длина верхнего листа (L_{f2} , мм); ширина верхнего листа (H_{f2} , мм); длина междоузлия под соцветием (L_{int} , мм); диаметр стебля под соцветием (D_1 , мм); диаметр стебля у нижнего листа (D_2 , мм); число цветков (N_f , шт.); длина соцветия (L_{infl} , мм); длина участка соцветия между первым и пятым цветком (L_{1-5} , мм); длина первого прицветного листа (L_{br} , мм); ширина первого прицветного листа (H_{br} , мм); длина завязи (L_{ov} , мм); длина боковых листочков наружного круга околоцветника (L_{p1} , мм); ширина боковых листочков наружного круга околоцветника (H_{p1} , мм); длина внутренних листочков (L_{p2} , мм); ширина внутренних листочков (H_{p2} , мм); длина гипохилия (L_{hyp} , мм); ширина гипохилия (H_{hyp} , мм); ширина перехода эпихилия в гипохилий (H_{ins} , мм); длина эпихилия (L_{ep} , мм); ширина эпихилия (H_{ep} , мм).

На основании перечисленных признаков были рассчитаны 13 индексов: отношение высоты стебля к длине верхнего междоузлия (H/L_{int}); форма второго листа от основания (L_{f1}/H_{f1}); форма верхнего листа (L_{f2}/H_{f2}); отношение высоты растения к диаметру стебля под соцветием (H/D_1); среднее расстояние между цветками (L_{infl}/N_f); форма прицветного листа (L_{br}/H_{br}); отношение длины прицветного листа к длине завязи (L_{br}/L_{ov}); форма листочков наружного круга околоцветника (L_{p1}/H_{p1}); форма листочков внутреннего круга околоцветника (L_{p2}/H_{p2}); форма гипохилия (L_{hyp}/H_{hyp}); форма эпихилия (L_{ep}/H_{ep}); отношение длины гипохилия к длине эпихилия (L_{hyp}/L_{ep}); отношение ширины гипохилия к ширине эпихилия (H_{hyp}/H_{ep}).

На первом этапе для оценки степени изменчивости признаков цветка в пределах соцветия был использован дисперсионный анализ (ANOVA). После этого данные по признакам цветков были усреднены в пределах каждого растения и для каждого изучаемого признака были определены среднее значение (M), его ошибка (m), коэффициент вариации (CV , %). Для оценки нормальности распределений по отдельным признакам был использован тест Колмогорова – Смирнова. Кроме того, для изучения структуры изменчивости морфологических признаков был применен дисперсионный анализ (ANOVA с апостериорным сравнением по методу Шеффе), метод главных компонент (PCA) (без вращения) и дискриминантный анализ (DA) (пошаговое включение с использованием расстояния Махаланобиса; F для включения признака в анализ 1,7, F для исключения – 1,5). Статистическая обработка полученного материала проводилась в пакете SPSS 16.0 for Windows.

Результаты и их обсуждение

Анализ распределения значений всех изученных признаков в выборках показал, что оно подчиняется закону нормального распределения (Z Колмогорова – Смирнова не более 0,98 при 1,85 для

$P_0 = 0,05$). Это позволило применить для сравнения полученных средних значений мощные параметрические методы дисперсионного анализа.

Оценка степени изменчивости признаков цветка в пределах соцветия с помощью дисперсионного анализа показала, что вклад данной компоненты в общую изменчивость анализируемой системы незначителен. Ни по одному из признаков не было выявлено достоверных различий между цветками в пределах соцветия. Это дало нам основание усреднить значения признаков цветка для каждой особи с целью получения более точной оценки признаков.

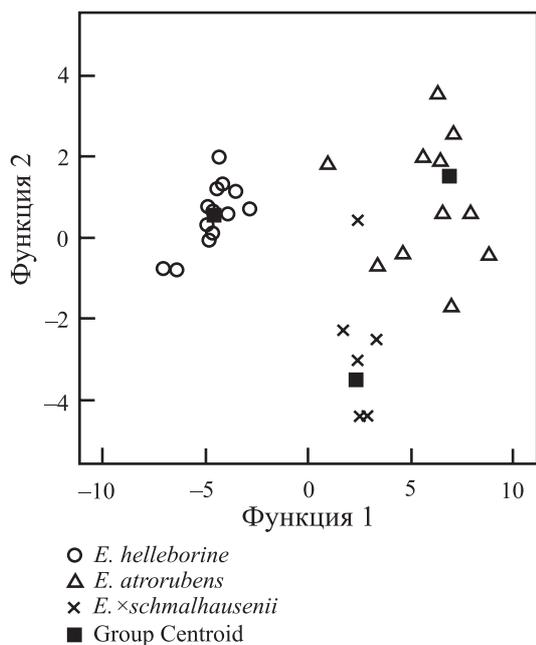
Данные о морфологических характеристиках исследованных видов и гибрида представлены в табл. 1. В соответствии с ними виды достоверно различаются по средним значениям целого комплекса признаков. Прежде всего по такому признаку, как длина листочков наружного круга околоцветника (L_{p1}), по которому все три вида с высокой степенью достоверности различаются между собой, причём гибрид имеет промежуточные значения по сравнению с родительскими видами. По таким признакам, как H_{br} , L_{hyp} , H_{ins} , L_{ep} , H_{ep} , L_{hyp}/L_{ep} , достоверно различаются *E. atrorubens* и *E. helleborine*, а *E. × schmalhauseni*, занимая промежуточное положение, достоверно от них не отличается.

Таблица 1

Базовые статистики анализируемых признаков и результаты ANOVA с апостериорным сравнением

Признак	<i>E. helleborine</i>		<i>E. × schmalhauseni</i>		<i>E. atrorubens</i>		P
	$\bar{X} \pm S_x$	CV, %	$\bar{X} \pm S_x$	CV, %	$\bar{X} \pm S_x$	CV, %	
H	589,62±144,10	24,44	427,86±126,49	29,56	583,09±161,87	27,76	—
N	6,62±2,02	30,57	6,00±2,08	34,69	9,45±2,11	22,37	** (a-h; a-s)
L_{f1}	87,38±10,55	12,07	69,50±13,36	19,22	83,70±11,97	14,30	* (h-s)
H_{f1}	30,62±8,30	27,11	18,53±5,19	28,00	25,80±7,19	27,88	** (h-s)
L_{f2}	67,38±17,88	26,53	44,64±24,99	55,99	40,82±12,11	29,66	** (a-h; h-s)
H_{f2}	6,25±2,79	44,73	6,29±3,96	62,95	3,01±1,16	38,51	* (a-h; a-s)
L_{int}	52,92±10,62	20,06	63,86±12,08	18,91	87,09±20,92	24,02	*** (a-h; a-s)
D_1	2,53±0,76	29,94	1,33±0,36	27,04	1,94±0,53	27,26	*** (h-s)
D_2	4,39±1,04	23,71	2,96±1,15	38,75	3,77±0,79	20,84	* (h-s)
N_{fl}	29,77±8,65	29,06	15,43±5,53	35,86	24,09±8,48	35,20	** (h-s)
L_{infl}	203,92±70,35	34,50	135,86±44,68	32,89	194,55±76,45	39,30	—
L_{1-5}	46,85±15,61	33,32	56,14±7,45	13,27	57,00±8,91	15,63	—
L_{br}	46,15±16,90	36,61	24,57±12,20	49,67	22,45±7,12	31,70	*** (a-h; h-s)
H_{br}	4,92±1,97	39,95	3,57±1,10	30,70	3,00±1,07	35,63	* (a-h)
L_{ov}	6,88±1,36	19,75	6,63±1,26	18,95	5,68±0,78	13,77	—
L_{p1}	9,40±0,54	5,73	8,43±0,83	9,83	6,76±0,51	7,50	*** (a-h; h-s; a-s)
H_{p1}	3,86±0,34	8,80	3,72±0,60	16,12	3,04±0,28	9,15	*** (a-h; a-s)
L_{p2}	8,02±0,57	7,10	7,64±0,73	9,60	6,15±0,27	4,31	*** (a-h; a-s)
H_{p2}	3,92±0,42	10,65	3,84±0,50	13,00	3,27±0,41	12,48	** (a-h; a-s)
L_{hyp}	3,17±0,30	9,31	3,03±0,28	9,41	2,83±0,28	10,00	* (a-h)
H_{hyp}	2,10±0,20	9,33	1,82±0,20	11,22	1,68±0,22	13,22	*** (a-h; h-s)
H_{ins}	1,88±0,23	12,29	1,62±0,33	20,23	1,43±0,20	14,17	*** (a-h)
L_{ep}	3,68±0,36	9,85	3,36±0,41	12,29	2,95±0,37	12,53	*** (a-h)
H_{ep}	4,07±0,40	9,70	3,75±0,54	14,37	3,52±0,46	13,20	* (a-h)
H/L_{int}	11,31±2,42	21,44	7,76±4,07	52,46	6,76±1,17	17,32	*** (a-h; h-s)
L_{f1}/H_{f1}	3,01±0,73	24,23	3,68±0,80	21,79	3,45±1,01	29,16	—
L_{f2}/H_{f2}	12,10±3,61	29,83	9,87±6,93	70,24	14,09±3,05	21,64	—
H/D_1	237,54±34,57	14,55	363,08±125,37	34,53	311,06±75,00	24,11	** (h-s)
L_{infl}/N_{fl}	6,81±1,14	16,72	9,01±1,34	14,88	8,27±1,80	21,80	** (h-s)
L_{br}/H_{br}	9,73±2,18	22,36	7,20±3,07	42,62	7,85±1,64	20,88	—
L_{br}/L_{ov}	7,02±3,02	43,02	3,91±1,98	50,76	4,07±1,66	40,71	** (a-h; h-s)
L_{p1}/H_{p1}	2,45±0,18	7,47	2,30±0,16	7,12	2,26±0,18	7,98	—
L_{p2}/H_{p2}	2,08±0,25	11,85	2,01±0,16	7,99	1,92±0,27	14,12	—
L_{hyp}/H_{hyp}	1,54±0,24	15,61	1,70±0,13	7,40	1,71±0,19	11,17	—
L_{ep}/H_{ep}	0,92±0,14	15,41	0,91±0,09	9,86	0,87±0,11	12,51	—
L_{hyp}/L_{ep}	0,86±0,07	8,19	0,91±0,11	12,53	0,97±0,11	11,11	* (a-h)
H_{hyp}/H_{ep}	0,52±0,05	9,58	0,49±0,05	11,21	0,48±0,05	10,62	—

Примечание. P – достоверность различий: *** – на 99,9 % уровне значимости; ** – на 99 % уровне; * – на 95 % уровне; «—» – различия незначимы. Достоверные различия при апостериорном сравнении (тест Шеффе): (a-h) – между *E. atrorubens* и *E. helleborine*; (a-s) – между *E. atrorubens* и *E. schmalhauseni*; (h-s) – между *E. helleborine* и *E. schmalhauseni*.



Положение особей *E. atrorubens*, *E. helleborine* и *E. x schmalhauseni* в пространстве первой и второй канонических дискриминантных функций

из родительских видов, *E. helleborine*, были в целом несколько меньше, чем обычно (см. табл. 1). Это, по нашему мнению, говорит о том, что существует какой-то механизм интрогрессии генов *E. atrorubens* в геном *E. helleborine*. Подобное явление было описано для других видов этого рода [3], других групп орхидных [13, 14], а также представителей других семейств [11, 15].

Анализ степени изменчивости признаков у родительских видов и гибрида в изучаемой выборке показывает, что имеются как слабо-, так и сильноизменчивые признаки. Наиболее изменчивыми оказались признаки вегетативной сферы (CV у родительских видов чаще всего 20–40 %). Признаки генеративной сферы родительских видов оказались гораздо более консервативными (CV 5–15 %). Это подтверждает точку зрения П.Г. Ефимова [4], согласно которой признаки вегетативной сферы могут быть лишь ограниченно использованы для разграничения видов у дремликков. Основными систематическими признаками, используемыми с этой целью, должны быть признаки генеративной сферы. Очень интересен и тот факт, что у гибрида изменчивость признаков более высокая по сравнению с родительскими видами. Иногда различия могут быть довольно существенными (признаки L_{f2} , H_{f2} , D_2 , H_{p1} , H/L_{int} , L_{f2}/H_{f2} , L_{br}/H_{br}).

Дискриминантный анализ, при проведении которого в качестве группирующей переменной была взята принадлежность к определенному таксону, подтверждает выводы, полученные при сравнении средних значений изученных признаков. В ходе анализа были выделены две канонические дискриминантные функции. Первая составляет 88,8 % общей дисперсии анализируемой системы, а вторая – 11,2 %. Как видно из рисунка, виды и гибрид довольно четко обособляются друг от друга в пространстве первой и второй канонических дискриминантных функций. При этом корректно классифицируется 93,5 % анализируемых образцов, что является очень высоким результатом.

Анализ структурных коэффициентов, которые отражают корреляцию между исследуемыми признаками и выделенными каноническими дискриминантными функциями, показывает, что наибольшую связь с первой канонической дискриминантной функцией имеют такие признаки, как L_{p1} , H_{ep} , L_{int} , L_{ep}/H_{ep} , L_{br}/H_{br} и др. (табл. 2). Со второй канонической дискриминантной функцией сильнее всего связаны H/D_1 , L_{f2} , H_{f2} , L_{p1} , H/L_{int} , L_{int} , N_{fl} .

Стандартизированные коэффициенты канонической дискриминантной функции, которые отражают вклад каждой переменной в значение дискриминантной функции, а также последовательность включения признаков в анализ, демонстрируют несколько иные результаты. Как видно из табл. 2, наибольший вклад в значение первой дискриминантной функции вносят такие признаки, как L_{p1} , H/D_1 и L_{int} , что совпадает с их сильной корреляцией с данной переменной. Вместе с тем часть сильно

Занимая в целом промежуточное положение по совокупности признаков, по части из них гибрид более схож с одним из родительских видов и достоверно отличается от другого. Так, *E. x schmalhauseni* схож с *E. helleborine*, но отличается от *E. atrorubens* по H_{f2} , L_{int} , H_{p1} , L_{p2} и H_{p2} . *E. atrorubens* и *E. x schmalhauseni* достоверно не различаются между собой, но отличаются от *E. helleborine* по L_{f2} , L_{br} , H_{hyp} , H/L_{int} и L_{br}/L_{ov} .

Очень интересны признаки, которые у *E. x schmalhauseni* имеют минимальное значение по сравнению с родительскими видами. Это N , L_{fl} , H_{fl} , D_1 , D_2 , N_{fl} , L_{int}/N_{fl} и L_{br}/L_{ov} . Большею частью это признаки вегетативной сферы. Если добавить к этому набору H и L_{infl} , хотя различия по ним недостоверны из-за их высокой степени изменчивости, то характерные особенности гибрида вырисовываются довольно четко. Это небольшое растение меньших по сравнению с родительскими особями размеров, с более рыхлым цветоносом и меньшим количеством цветков. Такие размеры гибрида по сравнению с родительскими формами – обычное явление при гибридизации у растений, часто говорящее о пониженной жизнеспособности гибридов.

Интересно отметить, что размеры растений одного

коррелирующих со значением первой дискриминантной функции признаков (H_{ep} , L_{ep}/H_{ep} , L_{br}/H_{br} и др.) вообще не была включена в пошаговый дискриминантный анализ, что связано, вероятно, с их частичной избыточностью. В то же время такой признак, как L_{ov} , слабо коррелирующий со значением дискриминантной функции, вносит существенный вклад в ее собственное значение. В целом эту группу признаков можно охарактеризовать как видоспецифичные, позволяющие отличить *E. atrorubens* от *E. helleborine*.

Таблица 2

Значения структурных коэффициентов и стандартизированных коэффициентов канонической дискриминантной функции

Признак	Структурный коэффициент		Стандартизированный коэффициент канонической дискриминантной функции	
	Функция 1	Функция 2	Функция 1	Функция 2
L_{p1}	-0,387	-0,307	-1,184	-0,507
H_{ep}	-0,320	-0,079	-	-
L_{ep}/H_{ep}	0,210	-0,075	-	-
L_{br}/H_{br}	0,195	-0,036	-	-
H_{hyp}/H_{ep}	0,183	0,167	-	-
H_{p1}	-0,178	-0,118	-	-
H_{hyp}	-0,169	0,067	-0,043	0,942
H_{ins}	-0,147	-0,065	-1,004	-0,137
H_{br}	-0,139	0,091	-	-
L_{1-5}	-0,139	-0,134	-	-
L_{ep}	-0,124	-0,111	-	-
L_{hyp}/L_{ep}	0,117	0,054	0,678	0,035
L_{p2}	-0,096	-0,045	-	-
L_{p1}/H_{p1}	-0,090	-0,056	-0,665	0,120
L_{ov}	-0,090	-0,050	1,289	-0,270
H	0,087	0,005	-	-
N	0,074	0,001	-	-
H_{p2}	-0,071	-0,028	-	-
L_{br}/L_{ov}	-0,054	0,037	-	-
L_{br}	-0,046	0,003	-	-
D_2	0,046	-0,028	-	-
H/D_1	0,134	-0,323	1,245	-0,251
L_{f1}	-0,031	0,322	-0,781	1,187
H_{f1}	-0,030	0,320	-	-
H/L_{int}	-0,039	-0,290	-	-
L_{int}	0,225	0,246	0,981	0,450
N_{fl}	-0,014	0,221	-	-
L_{f2}/H_{f2}	-0,165	-0,203	-	-
L_{infl}/N_{fl}	0,115	-0,186	0,344	-1,063
H_{f2}	0,070	0,173	-	-
L_{infl}	-0,023	0,147	-	-
D_1	0,059	0,137	-	-
L_{hyp}/H_{hyp}	0,108	-0,136	-	-
L_{f2}/H_{f2}	0,044	-0,120	-	-
L_{hyp}	-0,038	-0,084	-	-
L_{f2}	0,000	0,052	-	-
L_{p2}/H_{p2}	-0,005	0,036	-	-

Наибольший вклад в значение второй дискриминантной функции вносят признаки L_{f1} , L_{infl}/N_{fl} и H_{hyp} . Если учесть признаки, имеющие достаточно высокие значения структурных коэффициентов по отношению ко второй дискриминантной функции (см. выше), то эту группу признаков можно охарактеризовать как определяющую степень развитости (мощность) растений. Из рисунка видно, что по значению второй канонической дискриминантной функции *E. atrorubens* и *E. helleborine* не отличаются друг от друга, но отличаются от *E. × schmalhauseni*. Таким образом, проведенный дискриминантный анализ в целом подтверждает выводы, сделанные в ходе сравнения средних значений исследуемых признаков.

* * *

1. Впервые на территории Республики Беларусь выявлен *Epipactis × schmalhauseni* K. Richt., который является гибридом *E. atrorubens* (Hoffm. ex Bernh.) Besser и *E. helleborine* (L.) Crantz.

2. Данный гибрид занимает промежуточное положение по совокупности признаков между родительскими видами. По части признаков он более схож с одним из родительских видов и достоверно отличается от другого. Так, *E. × schmalhauseni* схож с *E. helleborine*, но отличается от *E. atrorubens* по H_{f2} , L_{int} , H_{p1} , L_{p2} и H_{p2} . *E. atrorubens* и *E. × schmalhauseni* достоверно не различаются между собой, но отличаются от *E. helleborine* по таким признакам, как L_{f2} , L_{br} , H_{hyp} , H/L_{int} и L_{br}/L_{ov} . Проведенный дискриминантный анализ в целом подтверждает выводы, сделанные в ходе сравнения средних значений исследуемых признаков.

1. Danesch O., Danesch E. Orchideen Europas. Ophrys Hybriden. Berne, 1972.
2. Ehrendorfer F. // Jahresberichte Naturwissenschaftlichen Vereins in Wuppertal. 1980. Bd. 33. P. 15.
3. Robatsch K. // Sonderfeld d. Zeitschrift Die Orchidee. 1983. P. 25.
4. Ефимов П.Г. // Turczaninowia. 2004. Vol. 7. № 3. P. 8.
5. Tałaj I., Brzosko A.E. // Plant. Syst. Evol. 2008. Vol. 276. P. 21.
6. Squirrell J., Hollingsworth P.M., Bateman R.M. et al. // Mol. Ecol. 2002. Vol. 10. P. 1957.
7. Claessens J., Kleynen J. // Ber. Arbeitskrs. Heim. Orchid. 1995 [publ. 1996]. Bd. 12. № 2. P. 4.
8. Delforge P., Gevaudan A. // Nat. Belg. 2002. Vol. 83. P. 19.
9. Pedersen H.E. // Nordic J. of Botany. 2008. Vol. 18. № 1. P. 15.
10. Richards A.J. // Abstr. Intern. Bot. Congr. Sydney. 1981. P. 102.
11. Harris S.A., Abbott R.J. // Heredity. 1997. Vol. 79. P. 402.
12. Tyteca D. // Scripta Botanica Belgica. 2003. Vol. 24. P. 45.
13. Devey D.S., Bateman R.M., Fay M.F., Hawkins J.A. // Annals of Botany. 2009. № 104 (3). P. 483.
14. Lack A.J. // New Phytol. 1995. Vol. 130. P. 217.
15. Тихомиров Вал.Н. // Бот. журн. 2004. Т. 89. № 4. С. 652.

Поступила в редакцию 01.12.09.

Вероника Владимировна Пинчук – магистрант биологического факультета.

Валерий Николаевич Тихомиров – кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники.