

Изучение особенностей орхидной микоризы:
цитологические аспекты, установление
трофического статуса и выявление
биоразнообразия грибных симбионтов и
эндофитов на примере *Hammarbya paludosa* (L.) O.
Kuntze и *Goodyera repens* (L.) R. Br.

Дмитриев Г.В.

Кафедра микологии и альгологии
биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова
Научный руководитель – Е.Ю. Воронина

Сем. Orchidaceae – Орхидные

27 801 вида (The Plant List, 2013)

- Все орхидеи образуют микоризу уже при прорастании семян и на ранних стадиях развития являются микогетеротрофами. Частичная гетеротрофия может сохраняться и у взрослых растений, несмотря на способность к фотосинтезу
- Разнообразные эколого-климатические условия произрастания орхидных влияют как на состав микобионтов, так и на степень микоризации растения.



Hammarbya paludosa (L.) Kuntze (Orchidaceae)

Цель

Исследование различных аспектов микоризного симбиоза двух видов орхидей *Goodyera repens* и *Hammarbya paludosa*.

Задачи

- Проверить типичность картины микоризной колонизации исследуемых видов растений;
- Выявить биоразнообразие грибов-микоризообразователей и эндофитов *Goodyera repens* и *Hammarbya paludosa*;
- Установить трофический статус *H. paludosa* и *G. repens*, проверить потенциальную частичную гетеротрофию растений.

Goodyera repens (L.) R. Br.



- Московская область, Звенигородская биостанция МГУ
- Хвойный лес
- Июнь-сентябрь 2016 г.
- Собрано 28 растений

Hammarbya paludosa (L.) Kuntze



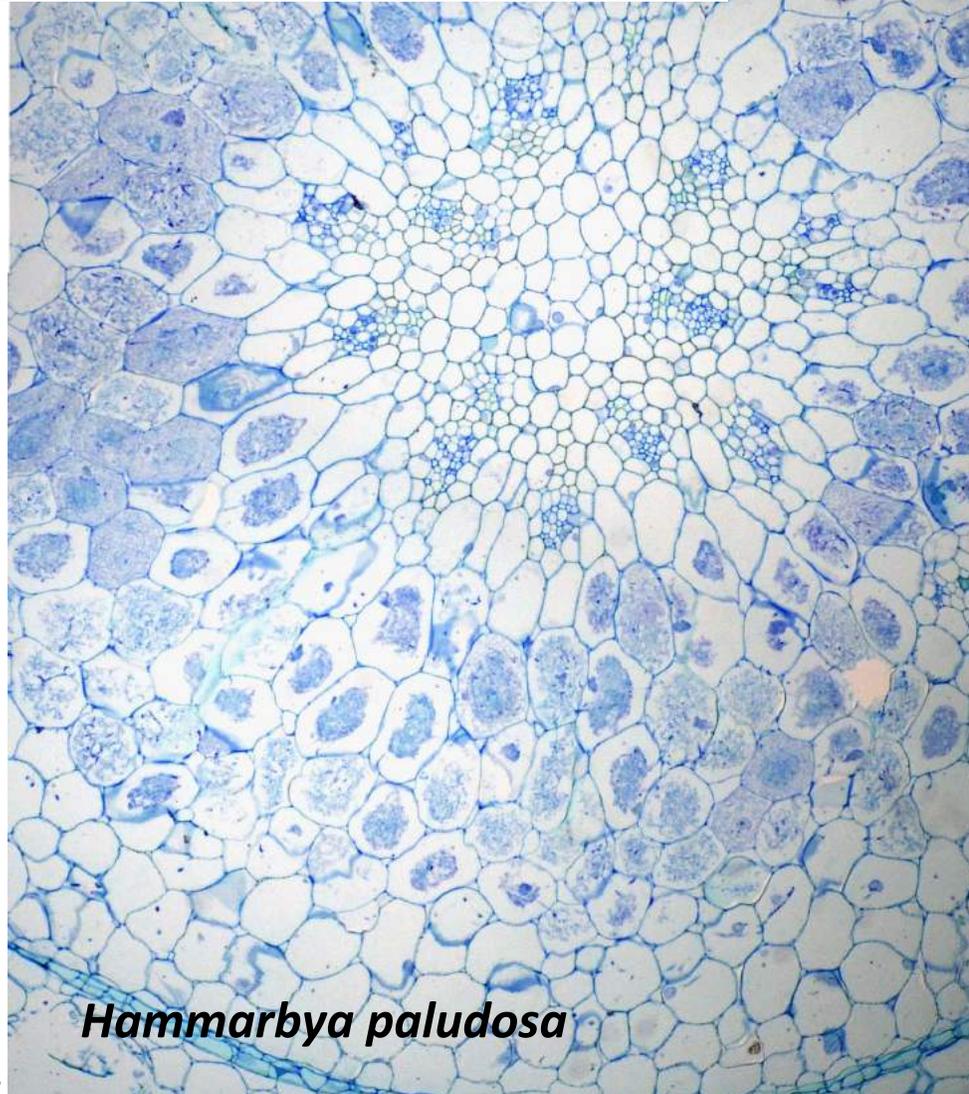
- Мурманская область, Кандалакшский заповедник
- Верховое болото
- Август 2016 г.
- Собрано 14 растений

Методы

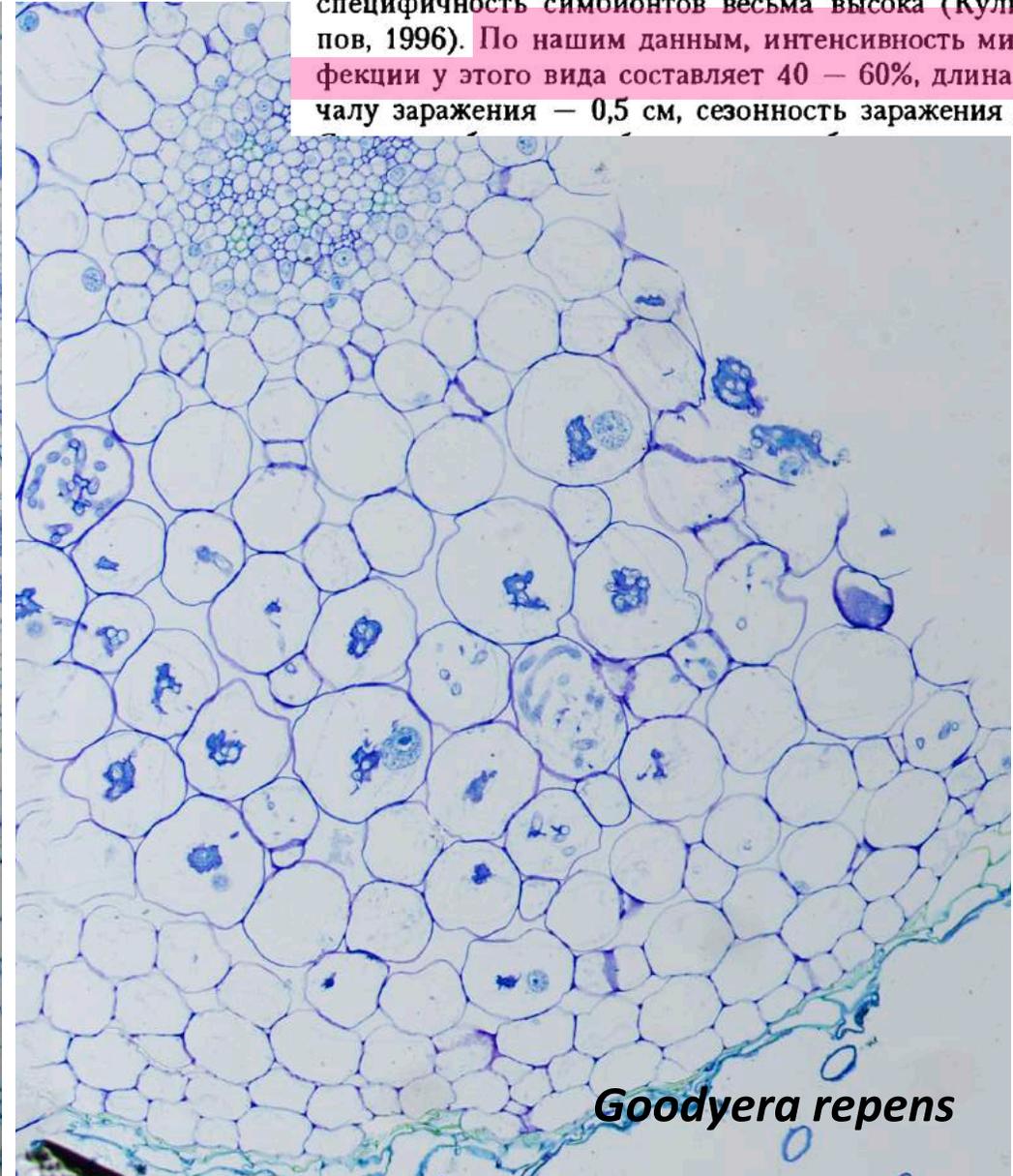
- Прямая идентификация микобионтов из фрагментов корневой системы (28 образцов *G. repens* и 14 образцов *H. paludosa*)
 - Выделения ДНК в СТАВ-буфере
 - Аmplификация ITS1-5.8S-ITS2 региона с использованием праймеров ITS1f+ITS4 и ITS1f+ITS4B, секвенирование ПЦР-продукта по методу Сэнгера
 - Сравнение последовательностей по алгоритму BLAST с данными открытых баз NCBI и UNITE.
- Выделение и культивация грибов на питательных средах.
- Анализ стабильных изотопов (^{13}C и ^{15}N) для установления трофического статуса растений (350 образцов)
- Анализ анатомических срезов корневища для определения локализации микобионтов методами световой микроскопии. Окраска толуидиновым синим, заключение в среду Техновит

Интенсивность микоризной инфекции у *H. paludosa* невелика (С=12%). Молодые особи не заражены грибом совсем. Наши данные не подтверждают бытующее мнение о полной зависимости этой орхидеи от микоризных грибов на протяжении всей жизни особи (Summerhayes, 1951; S. Nilsson, 1979).

Татаренко, 1996



Микоризные грибы, симбионты *G. repens*, изучены в Европе (Downie, 1940, 1943; Alexander C., Alexander J., 1984). Установлена постоянная взаимозависимость растения и гриба. Видоспецифичность симбионтов весьма высока (Куликов, Филиппов, 1996). По нашим данным, интенсивность микоризной инфекции у этого вида составляет 40 – 60%, длина корней к началу заражения – 0,5 см, сезонность заражения не выражена.



увеличение X40
(панорама)
Толуидиновый-синий,
техновит

Goodyera repens: список видов микоризообразователей, эндوفитов и сапротрофов

Ascomycota	Basidiomycota	Mucoromycota
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Bjerkandera adusta</i>	<i>Mucor racemosus</i>
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Ceratobasidium cornigerum</i>	<i>Umbelopsis nana</i>
<i>Colletotrichum dematium</i>	<i>Entoloma cetratum</i>	<i>Umbelopsis ramanniana</i>
<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Galerina</i> sp.	
<i>Fusarium</i> spp.	<i>Lentinus</i> sp.	
<i>Ilyonectria destructans</i>	<i>Mycena galopus</i>	
<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Russula vinosa</i>	
<i>Pochonia bulbillosa</i>	<i>Thanatephorus cucumeris</i>	
<i>Thysanophora penicillioides</i>	<i>Tomentella</i> cf. <i>stuposa</i>	
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Tomentella</i> sp.	
<i>Verticillium leptobactrum</i>	<i>Tulasnella</i> sp.	
	<i>Trametes versicolor</i>	
	<i>Xenasmattella vagая</i>	



- Корневые эндوفиты неопределенного трофического статуса
 - Эктомикоризные грибы
 - Сапротрофы разных субстратов
- Виды определенные культуральными методами**
- Виды определенные молекулярно-генетическими методами

Список видов, ассоциированных с древесными растениями

Ascomycota

Archaeorhizomyces sp.

Basidiomycota

Amphinema byssoides

Lactarius sp.

Russula paludosa

Russula puellaris

Russula vinosa

Serendipita sp.

Thelephoraceae

Tomentella spp.

Tylospora fibrillosa



– Эктомикоризные
грибы



– Сапротрофы
разных
субстратов

Nattarbya paludosa: список видов микоризообразователей и эндофитов

Ascomycota	Basidiomycota
<i>Meliniomyces</i> sp.	<i>Ceratobasidium cornigerum</i>
<i>Varicosporium elodeae</i>	<i>Tulasnella</i> sp.



– Эктомикоризные грибы

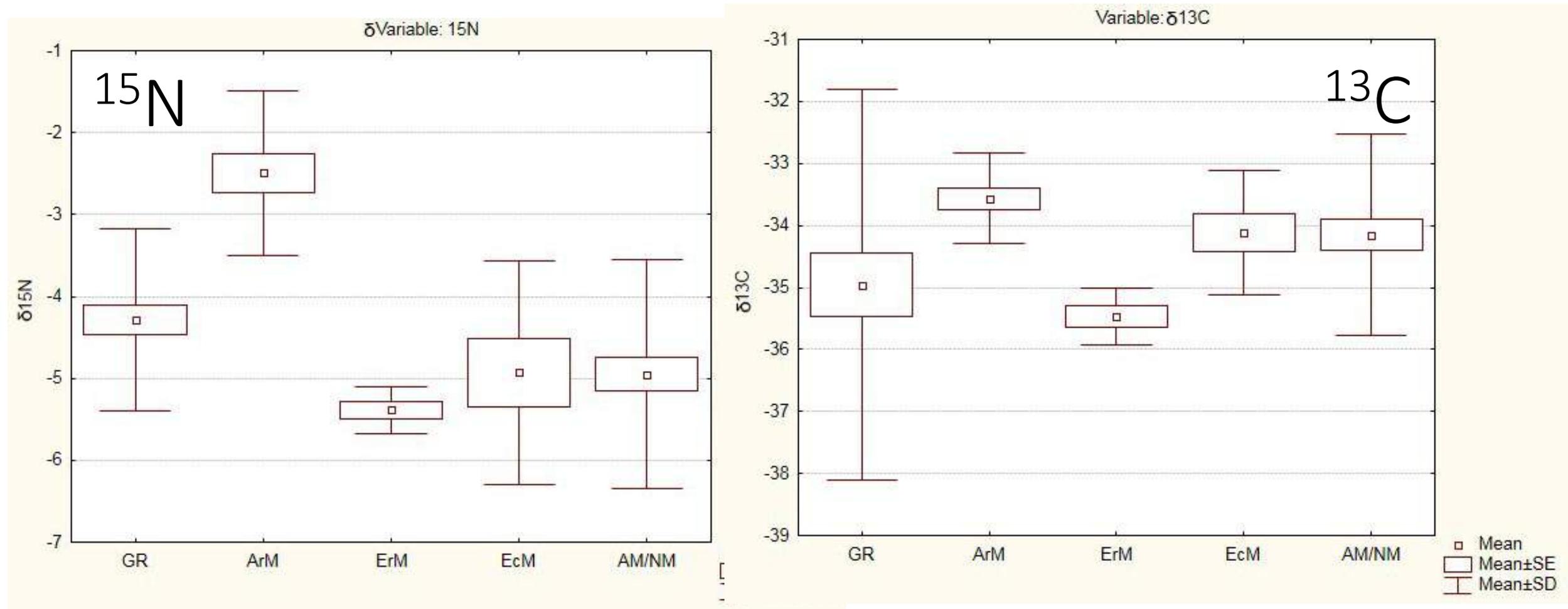


– Грибы иного трофического статуса



Goodyera repens (L.) R. Br.

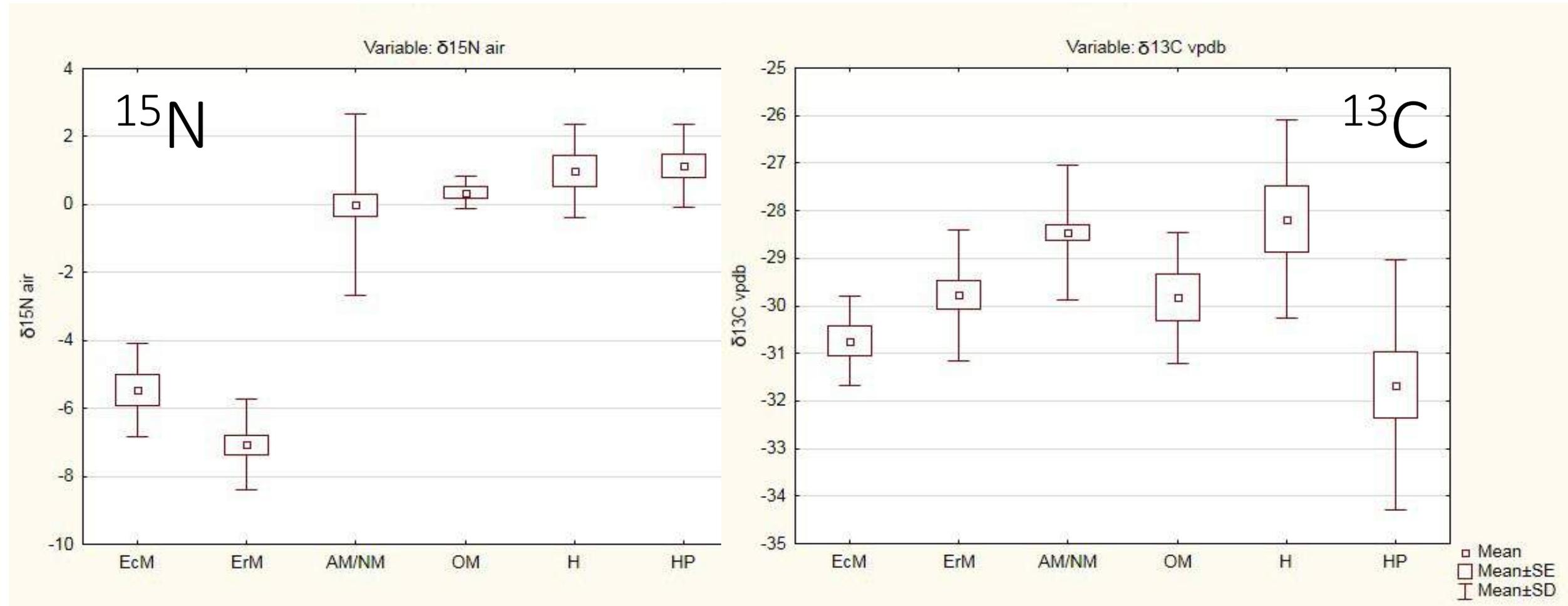
$\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ значения варьировали от -38.87 до -24.46 ‰ по ^{13}C и от -6.44 до -2.12 ‰ по ^{15}N



GR - *Goodyera repens*, **ArM** – арбутоидная микориза. **ErM** – эрикоидная микориза, **EcM** – эктомикориза, **AM/NM** – арбускулярная микориза/немикоризные растения

Hammarbya paludosa (L.) Kuntze

$\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ значения варьировали от -36,82 до -25,92‰ по $\delta^{13}\text{C}$ и от -1,9 до 3,31‰ по $\delta^{15}\text{N}$.



HP – *Hammarbya paludosa*, **ArM** – арбутоидная микориза, **ErM** – эрикоидная микориза, **EcM** – эктомикориза, **AM/NM** – арбускулярная микориза/немикоризные растения, **OM** – орхидная микориза, **H** – насекомоядные растения

Выводы

- Подземные органы *H. paludosa* и *G. repens* содержат грибные структуры, типичные для орхидной микоризы. По визуальной оценке, степень колонизации *H. paludosa* существенно выше приведенной в литературе.
- Молекулярно-генетическими и культуральными методами в корнях и корневищах *G. repens* было идентифицировано 27 таксонов грибов-микобионтов и эндофитов, в корневищах *H. paludosa* - 4 таксона.
- Более ограниченный спектр микобионтов и эндофитов *H. paludosa* отражает условия произрастания вида, приуроченного к верховым сфагновым болотам.
- Для изотопных подписей *H. paludosa* и *G. repens* характерна тенденция к обеднению по $\delta^{13}\text{C}$ и обогащению по $\delta^{15}\text{N}$. Достоверность тенденции должна быть проверена на выборке большего объема.
- Анализ изотопных подписей *H. paludosa* и *G. repens* подтверждает, что оба растения относятся к частично микогетеротрофным видам. На основании азотного обогащения возможно предполагать «криптическую миксотрофию» для обоих видов.

Благодарности

Елене Юрьевне Ворониной

Алексею Владимировичу Тиуну (ИПЭЭ РАН) за помощь в проведении изотопного анализа

Михаилу Николаевичу Кожину за помощь в сборе материала в Кандалакшском заповеднике

Екатерину Фёдоровну Малышеву и Веру Фёдоровну Малышеву (БИН РАН) за помощь в проведении молекулярно-генетического анализа.

Спасибо за внимание!

Изотопный анализ

- В основе метода лежит свойство многих элементов, в том числе углерода (^{12}C и ^{13}C) и азота (^{14}N и ^{15}N), существовать в виде нескольких стабильных изотопов.
- Каждый организм обладает своей изотопной подписью, которая определяется соотношением легких и тяжелых изотопов.
- Изотопная подпись отражает трофический статус организма.

