

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

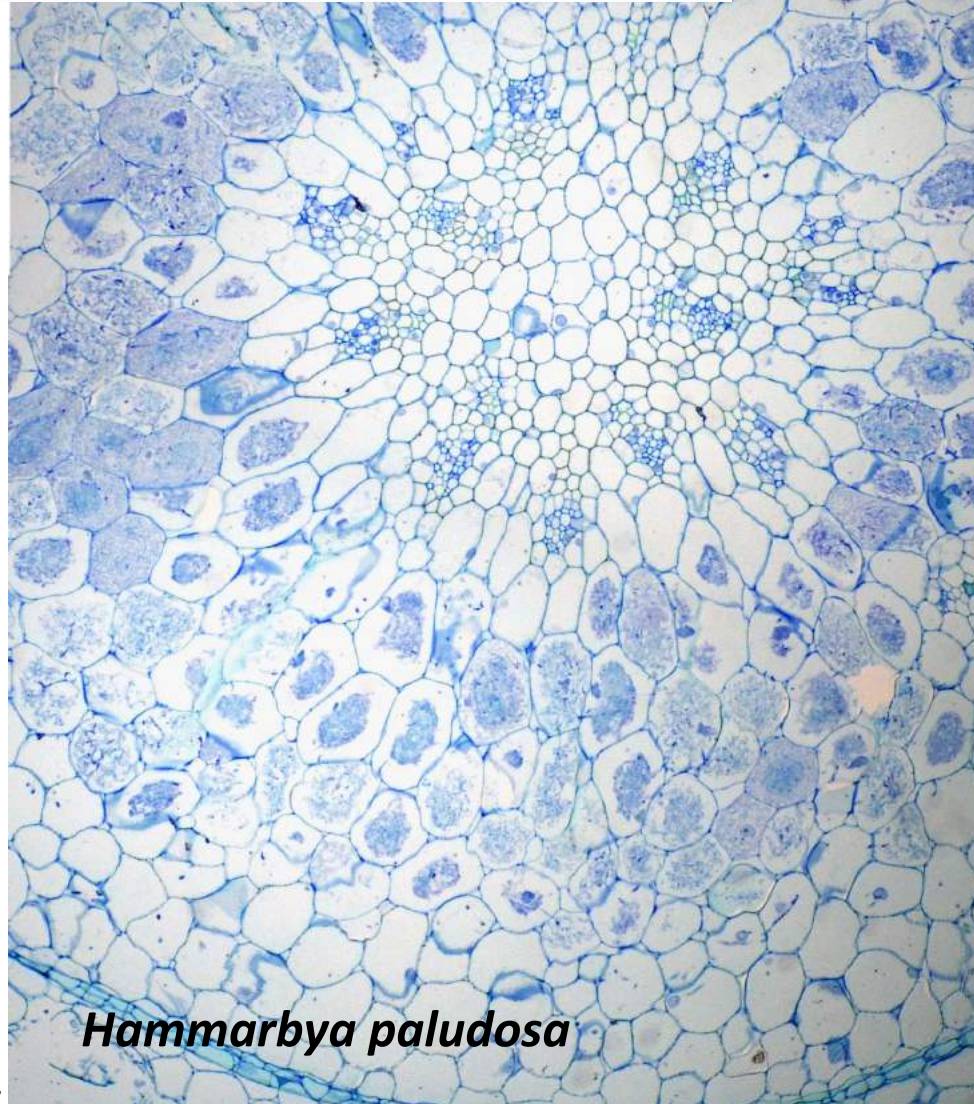
# Методы

- 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 ( $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ ) 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

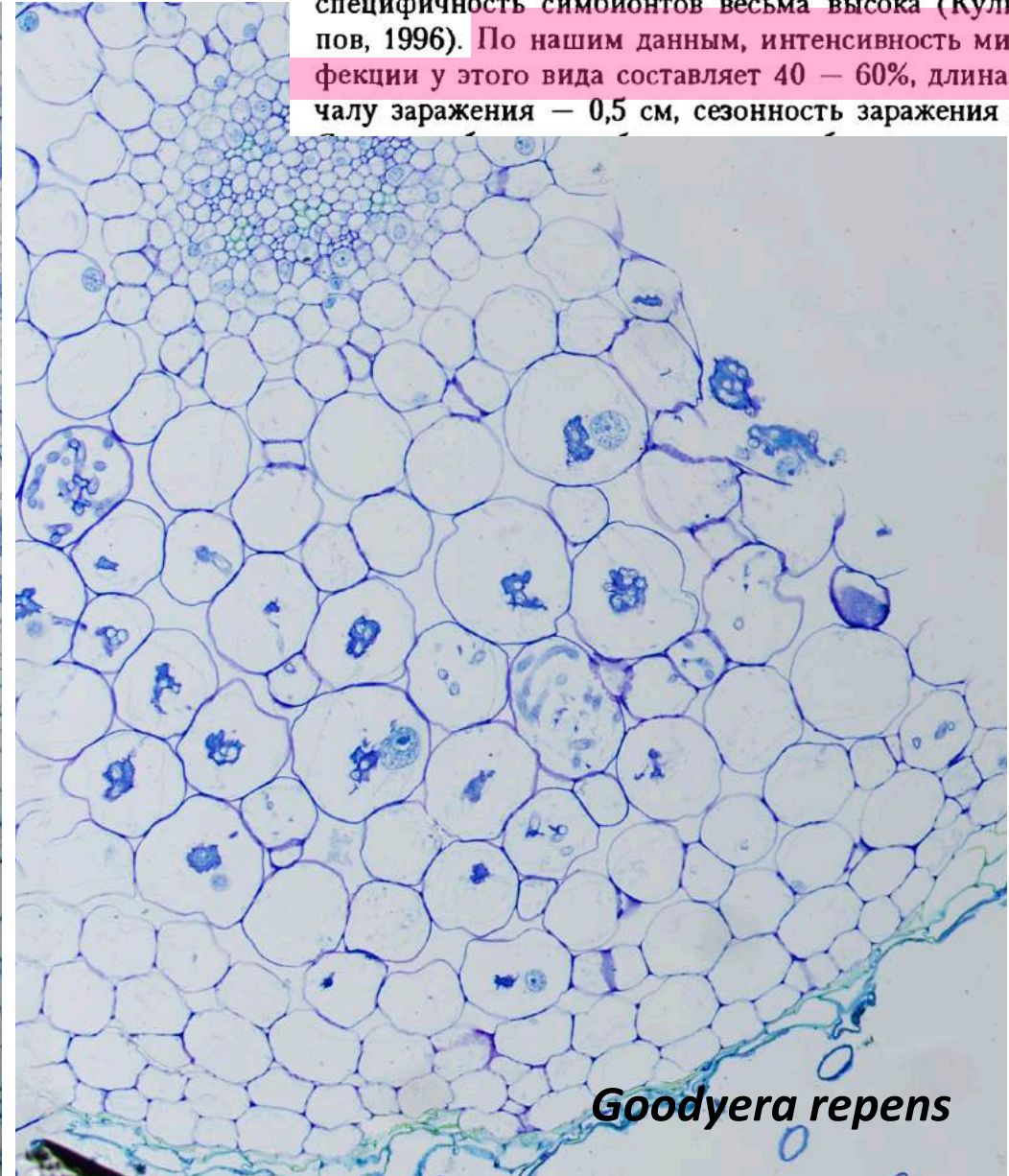


Интенсивность микоризной инфекции у *H. paludosa* невелика (С=12%). Молодые особи не заражены грибом совсем. Наши данные не подтверждают бытующее мнение о полной зависимости этой орхидеи от микоризных грибов на протяжении всей жизни особи (Summerhayes, 1951; S. Nilsson, 1979).

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>
<b><i>Alternaria alternata</i></b>	<i>Ceratobasidium cornigerum</i>	<i>Umbelopsis nana</i>
<b><i>Colletotrichum dematium</i></b>	<i>Entoloma cetratum</i>	<i>Umbelopsis ramanniana</i>
<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Galerina</i> sp.	
<b><i>Fusarium</i> spp.</b>	<i>Lentinus</i> sp.	
<b><i>Ilyonectria destructans</i></b>	<i>Mycena galopus</i>	
<b><i>Phomopsis</i> spp.</b>	<b><i>Russula vinosa</i></b>	
<b><i>Pochonia bulbillosa</i></b>	<b><i>Thanatephorus cucumeris</i></b>	
<b><i>Thysanophora penicillioides</i></b>	<i>Tomentella</i> cf. <i>stuposa</i>	
<b><i>Trichoderma</i> sp.</b>	<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



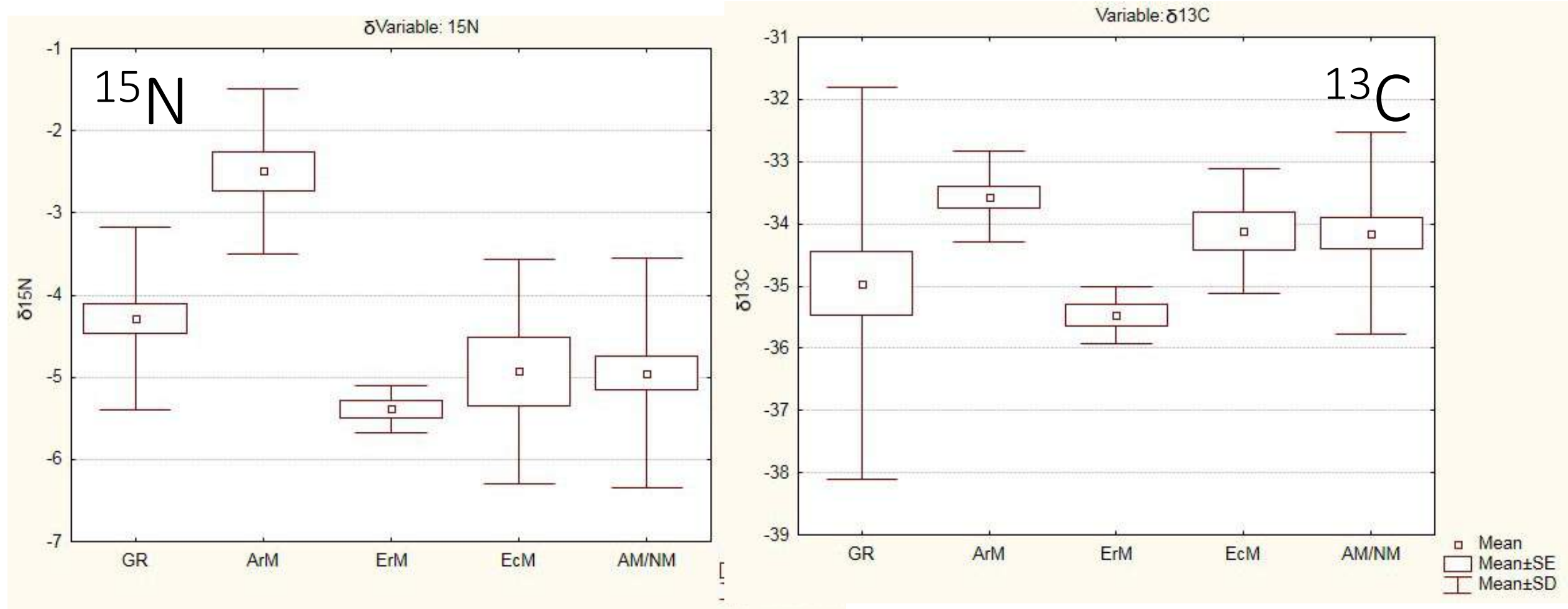
– Грибы иного трофического статуса





# *Goodyera repens* (L.) R. Br.

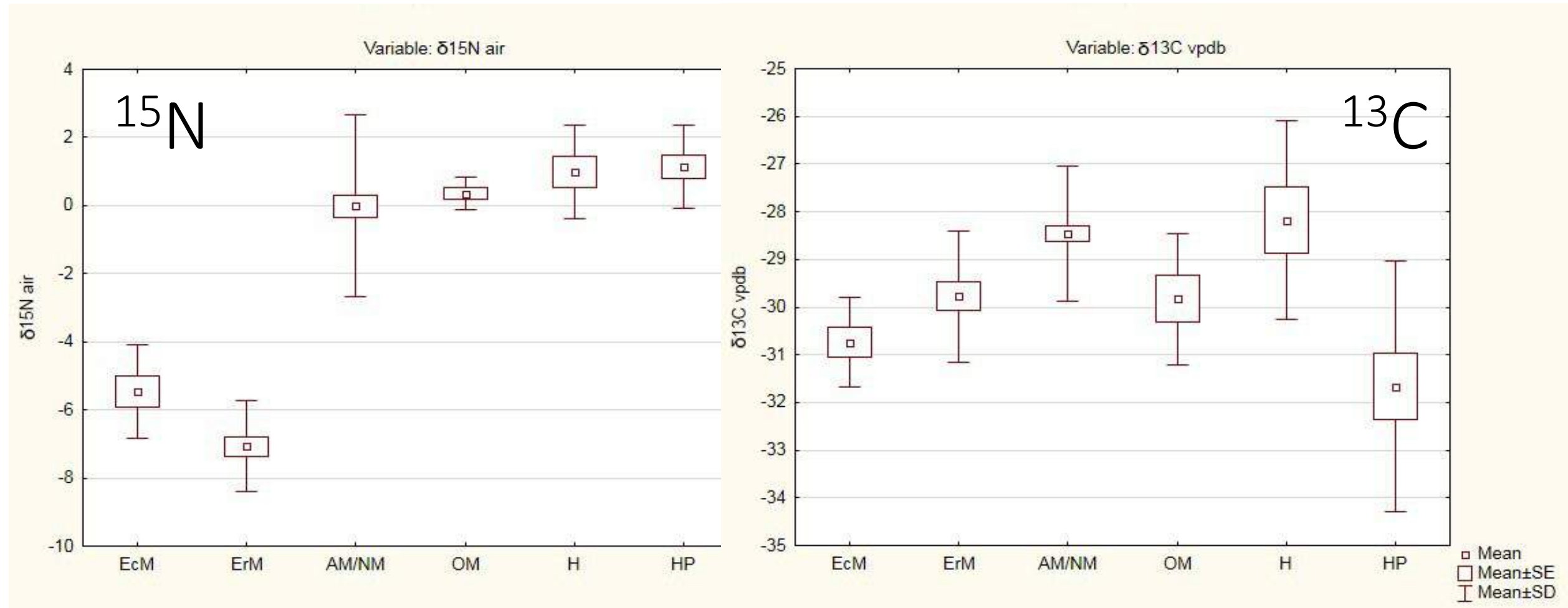
$\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  значения варьировали от -38.87 до -24.46 ‰ по  $^{13}\text{C}$  и от -6.44 до -2.12 ‰ по  $^{15}\text{N}$



**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 ( $^{12}\text{C}$  и  $^{13}\text{C}$ ) и азота ( $^{14}\text{N}$  и  $^{15}\text{N}$ ), 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.

