

Московский государственный университет
имени М. В. Ломоносова
Биологический факультет
кафедра Микологии и альгологии

**Морфология и разнообразие представителей
таксономически неоднозначных и трудно
идентифицируемых групп порядка Helotiales
(класс Leotiomycetes)**

Исполнитель:
Погостина Д. Д.

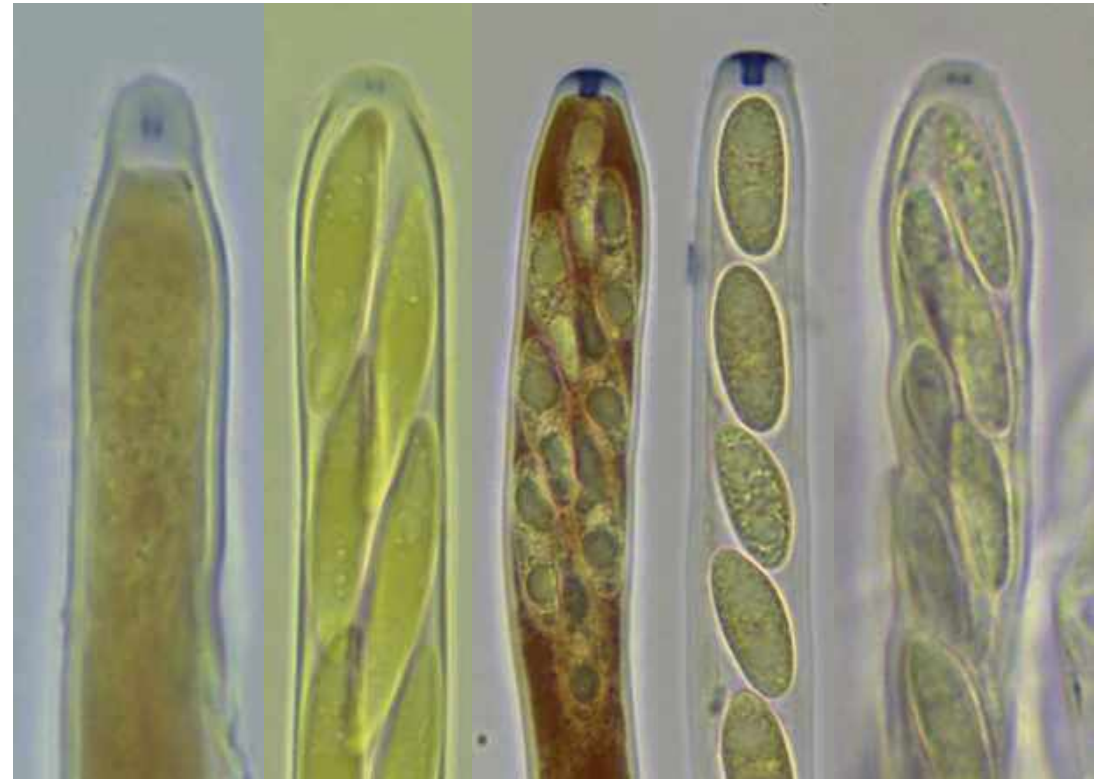
Руководитель:
к. б. н., доцент Воронина Е. Ю.

Введение

Helotiales — порядок аскомицетов внутри класса Leotiomycetes, включающий порядка 4000 видов, все представители которого имеют плодовые тела типа апотечий и иноперкулятные сумки.



Апотечии на примере *Hymenoscyphus* sp.

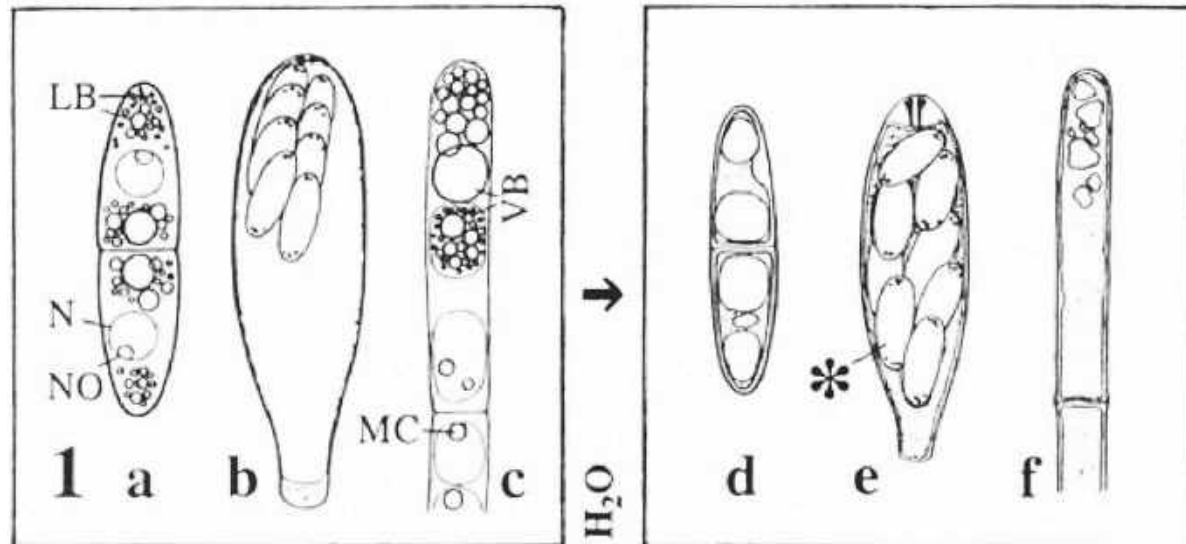


Иноперкулятные сумки разных типов

Актуальность



Medardi, 2008



Baral, 1992

- Значительное внешнее сходство видов.
- Известные нам по определительным ключам морфологические признаки не всегда работают как диагностические.
- Отсутствие четкого описания методик в определителях и статьях.
- Частый отказ от морфологического анализа.
- Отсутствие референсных последовательностей в молекулярных базах данных для многих видов.
- Неоднозначность систематики в пределах данного таксона.

Цель работы

Изучить микроморфологические признаки и проявление реакции амилоидности и оценить их роль для видовой идентификации у представителей таксономически неоднозначных и трудно идентифицируемых групп апотециальных аскомицетов из порядка *Helotiales*.

Задачи работы

- Провести видовую идентификацию представителей таксономически неоднозначных и трудно идентифицируемых групп из порядка Helotiales.
- Исследовать морфологические признаки представителей различных групп порядка Helotiales и оценить их диагностический вес.
- Оценить вариабельность морфологических признаков и химических реакций в пределах вида.
- Произвести молекулярную верификацию образцов наиболее трудно различимых видов и сравнить результаты с полученными путем морфологической идентификации.

Материалы и методы

1. Сбор материала

- Метод – маршрутный
- Места сбора:
 - Академгородок, Новосибирская область
 - Битцевский парк, Москва
 - Звенигородская биологическая станция МГУ
 - Приокско-Террасный заповедник
- Фотографирование на месте роста и этикетирование
- 53 образца собраны, включены в работу 42

Фото Смирновой Е.В.



2. Морфологический анализ: морфотипы

- Существуют группы видов с очень схожим внешним обликом
- Их идентификация особо затруднена



Siboria-тип



Hymenoscyphus-тип



Mollisia-тип

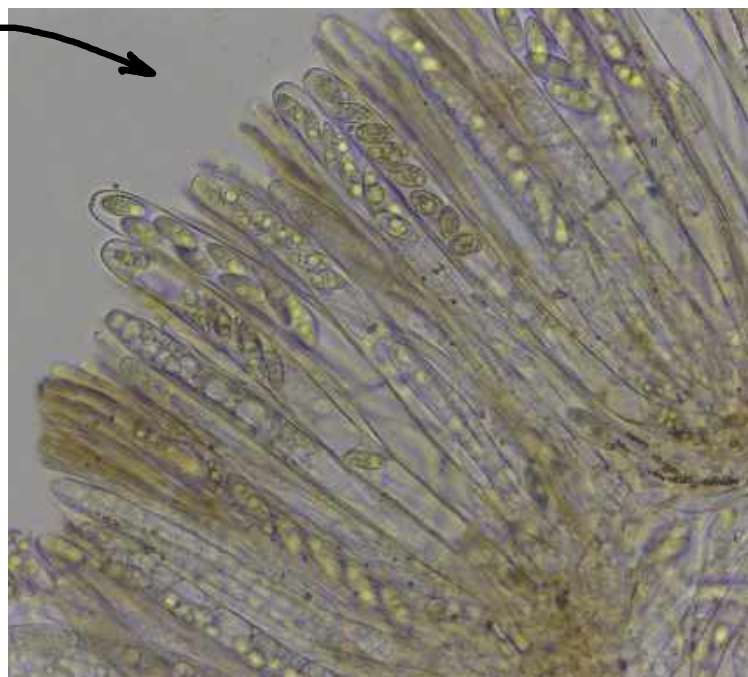
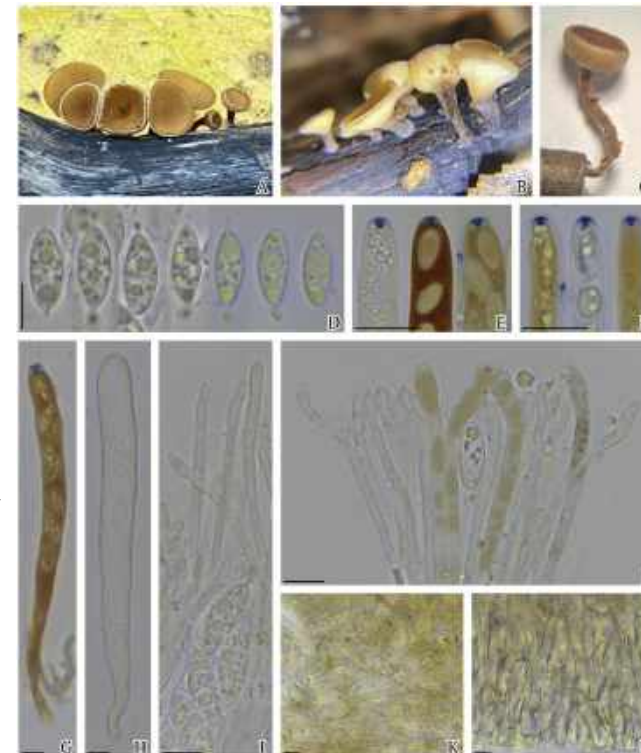
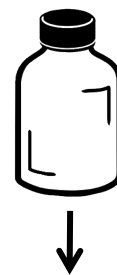


Lachnum-тип

3. Морфологический анализ

- Описание морфологических признаков
- Постановка реакции амилоидности
- Фиксирование результатов

Люголь



	A	B	C	D	E	F
1. Номер образца	1	2	3	4	5	6
2. Предполагаемая идентификация	<i>Gliozia thierckiana</i> Breda & Bolani	<i>Mutinuscurvatus</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Mutinuscurvatus</i>	<i>Gliozia</i>	
3. Амилоидность спор	есть	есть	есть	есть	есть	
4. Тип амилоидности	I	два плоских	два плоских	два плоских	I	
5. Дихотомичность	есть	есть	нет	есть	есть	
6. Дихотомичность KOH	есть	нет	нет	есть	есть	
7. Форма спор	цилиндрические	булавовидные	булавовидные	булавовидные	цилиндрические	
8. Везикулы спор	с утолщением	без утолщения, в виде усеченной пирамиды	клеточная, часто борознистая	конусовидная	с утолщением	
9. Размер спор	115-175 * 33,5-15	105-125 * 9,5-12,5	90-70 * 0,5-8	80-120 * 8-11,5	150-190 * 30-11,5	
10. Пророст	есть	есть	нет	есть	есть	
11. Количество спор в споры	II	II	II	II	II	
12. Расположение спор в споры		двуцепочечный	двуцепочечный	двуцепочечный	одноцепочечный	
13. Особенности спор			Амилоидность после KOH выражена ярко, особенно в срезах растертых спор (в 88 тит)	Амилоидность после KOH ч/з ареол, но не зонитическая, в любом случае она выражена в обеих частях споры	после KOH незначительная реакция в продольной амиллоидности не наблюдается	
14. Окраска спор	палевые	темно-коричневые	темно-коричневые	палевые	палевые	
15. Окраска спор	темно-коричневые, светлая	темно-коричневые, иногда до коричнево-темных, один	темно-коричневые, часто	темно-коричневые, темная	темно-коричневые, часто	

4. Высушивание и идентификация образцов

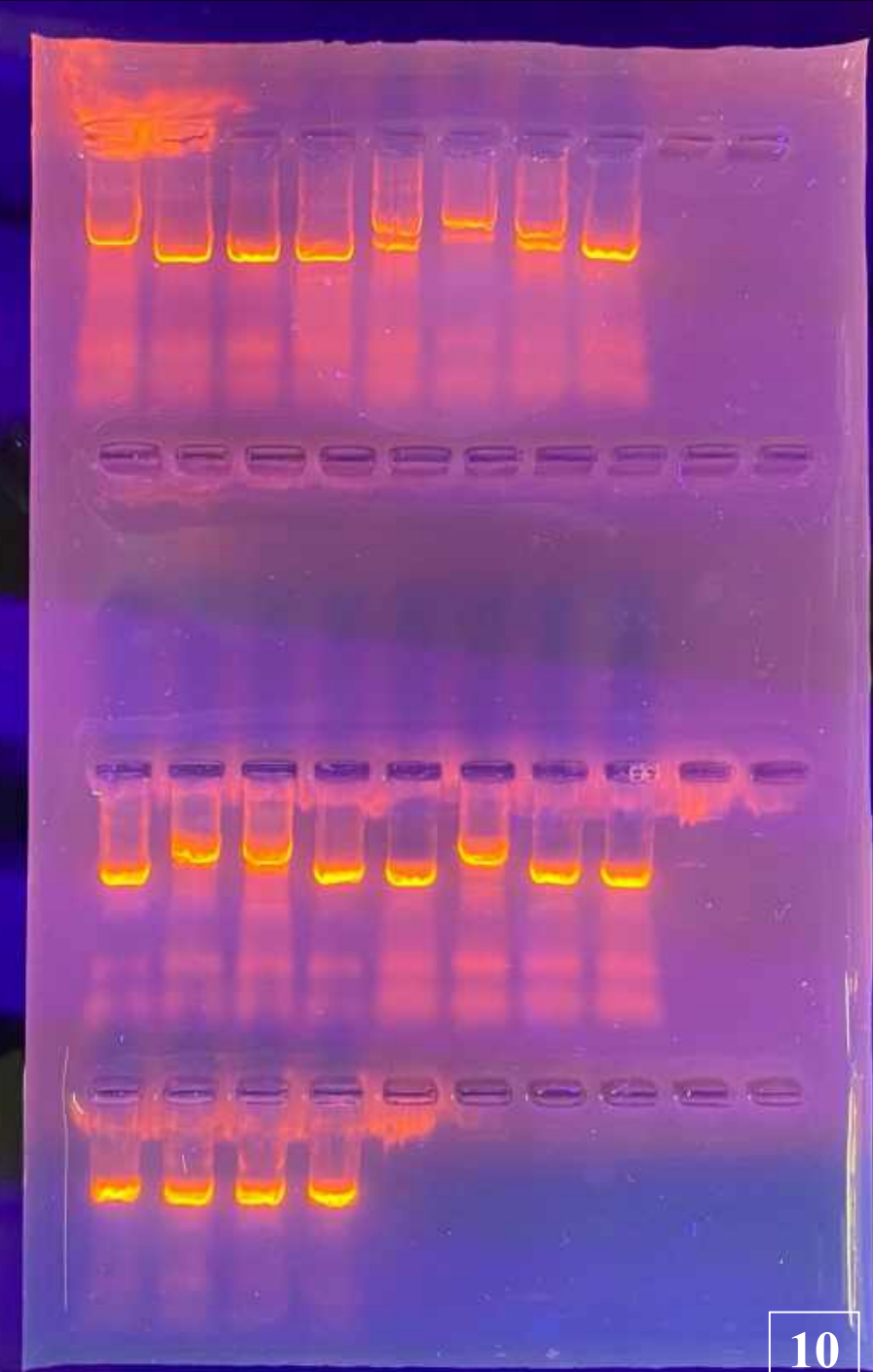
- После обработки образцы высушивались при температуре 30 градусов от 5 до 20 часов.



- Высушенные образцы были помещены в индивидуальные пакеты с этикетками.

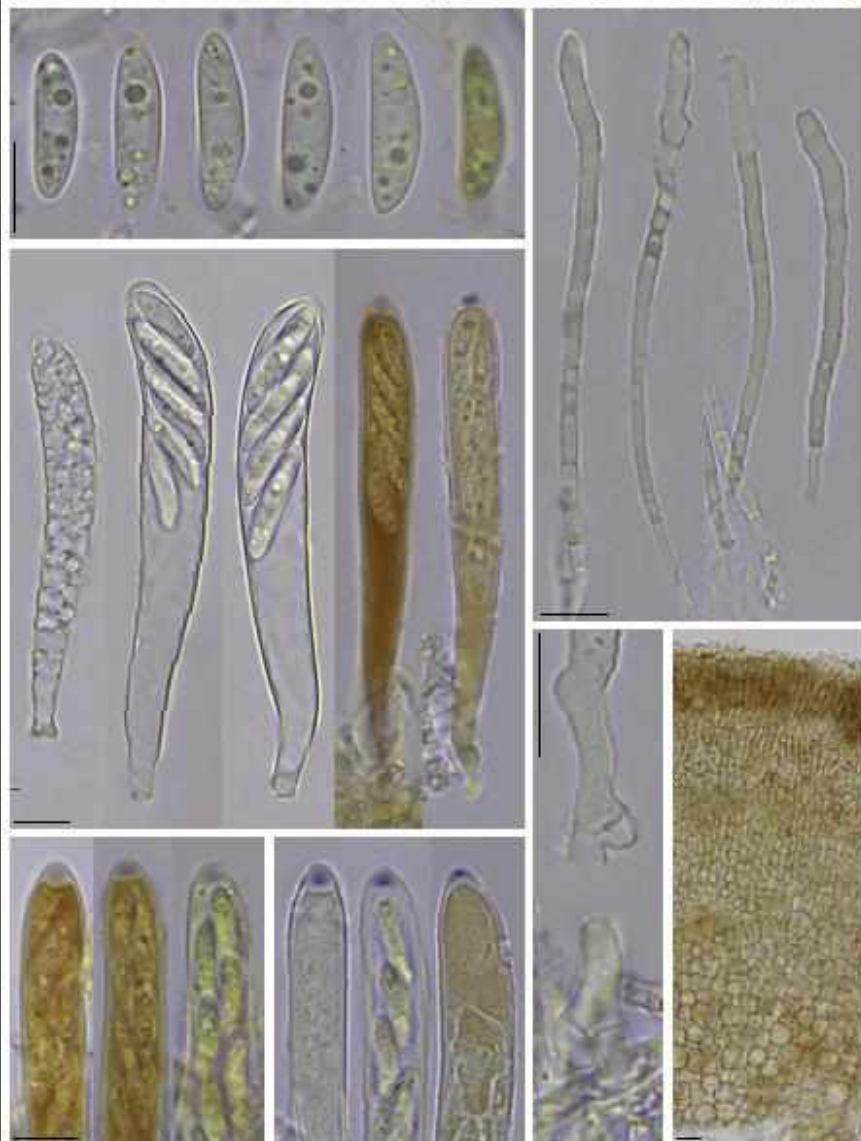
5. Молекулярный анализ

- 20 образцов 2 морфотипов
- Модифицированный протокол выделения ДНК
- Праймеры: ITS5 и ITS4
- GenBank BLAST
- Выравнивание: MAFFT
- Обрезка и построение дерева: MEGA 11
- Maximum Likelihood
- Bootstrap с 1000 реплик



Результаты

Составлены фототаблицы и описания



Номер образца	PDD_034 (240921_015)	PDD_042 (250921_023)	PDD_046	PDD_052 (061021_033)
Предположительная идентификация	<i>Hymenoscyphus subferrugineus</i>	<i>Phaeohelotium geogenum</i>	<i>Rutstroemia bolaris</i>	<i>Hymenoscyphus cf. immutabilis</i>
Форма апотециев/пт	Сразу открытые, дисковидные с выпуклым, слегка подушковидным гимением, на небольшой ножке (гвоздики)	вначале почти шаровидные, замкнутые, вырастая, раскрываются до блюдцевидных на короткой ножке (гвоздики)	Кубковидные, широко кубковидные, молодые частично замкнутые с завернутыми внутрь краями	достаточно ровные диско- или блюдцевидные на небольшой ножке (гвоздики)
Край апотеция	Ровный, цельный, гладкий	ровный, иногда крупно волнистый, цельный, гладкий	ровный, цельный и мелко опушенный, как и вся внешняя поверхность, светлый	Ровный, цельный, гладкий
Наличие ножки	суженное основание	суженное основание	есть	Суженное основание
Окраска апотециев	Бледно-желтые, при намокании коричневеют, внешняя поверхность более белая, ножка такая же, как внешняя часть, но может быть слегка темнее к основанию	Гимений кремово-белый, внешняя поверхность такая же	Желтовато-коричневые, внешняя поверхность светлее, беловатая. Ножка темно-коричневая до черной, темнеет к основанию.	Белый, чуть с желтизной, кремоватые
Размер апотециев	1,5-3 мм в диаметре, 0,5-1 мм в высоту, ножка до 0,5 мм в диаметре и до 0,5 мм в высоту	до 4 мм в диаметре и до 2 мм в высоту	2-8 мм в диаметре, высота чаши 1-5 мм, ножка 0,5-2 мм в диаметре и 2-25 мм длиной	0,5-3 мм в диаметре, до 1 мм высотой (высота ножки = высота шляпки), ширина ножки до 0,5 мм
Особенности пт	нет	нет		нет
Погруженность	На поверхности субстрата	На поверхности субстрата	Нет, но растут среди подстилки и могут быть слегка в нее закопаны	На поверхности субстрата
Группировка апотециев	Одиночные, в небольшом количестве	Одиночные, в небольшом количестве	Одиночные или группами до 7 и более, но не сросками	Одиночные, тесные группы не образуют, в некотором количестве
Внешняя поверхность	Гладкая	Гладкая	Слегка опушенная	Слегка опушенные
Амилоидность сумок	есть	есть	есть	есть
Тип амилоидности	две длинные полосы, клиновидно	две короткие полосы, градиентно выцветающие к вершине	T	две короткие полосы, градиентно выцветающие к вершине

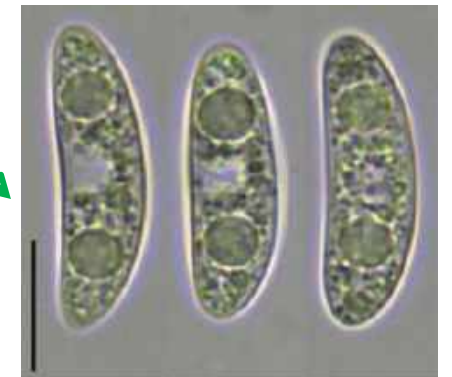
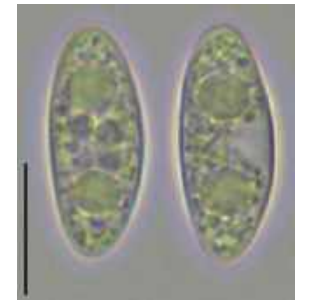
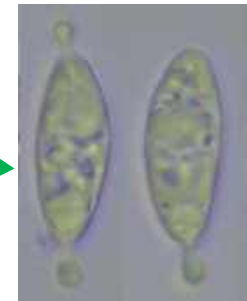
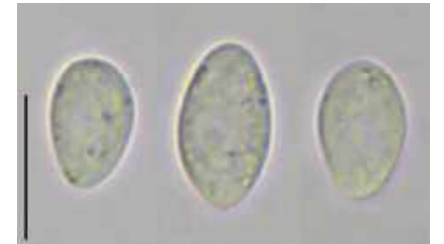
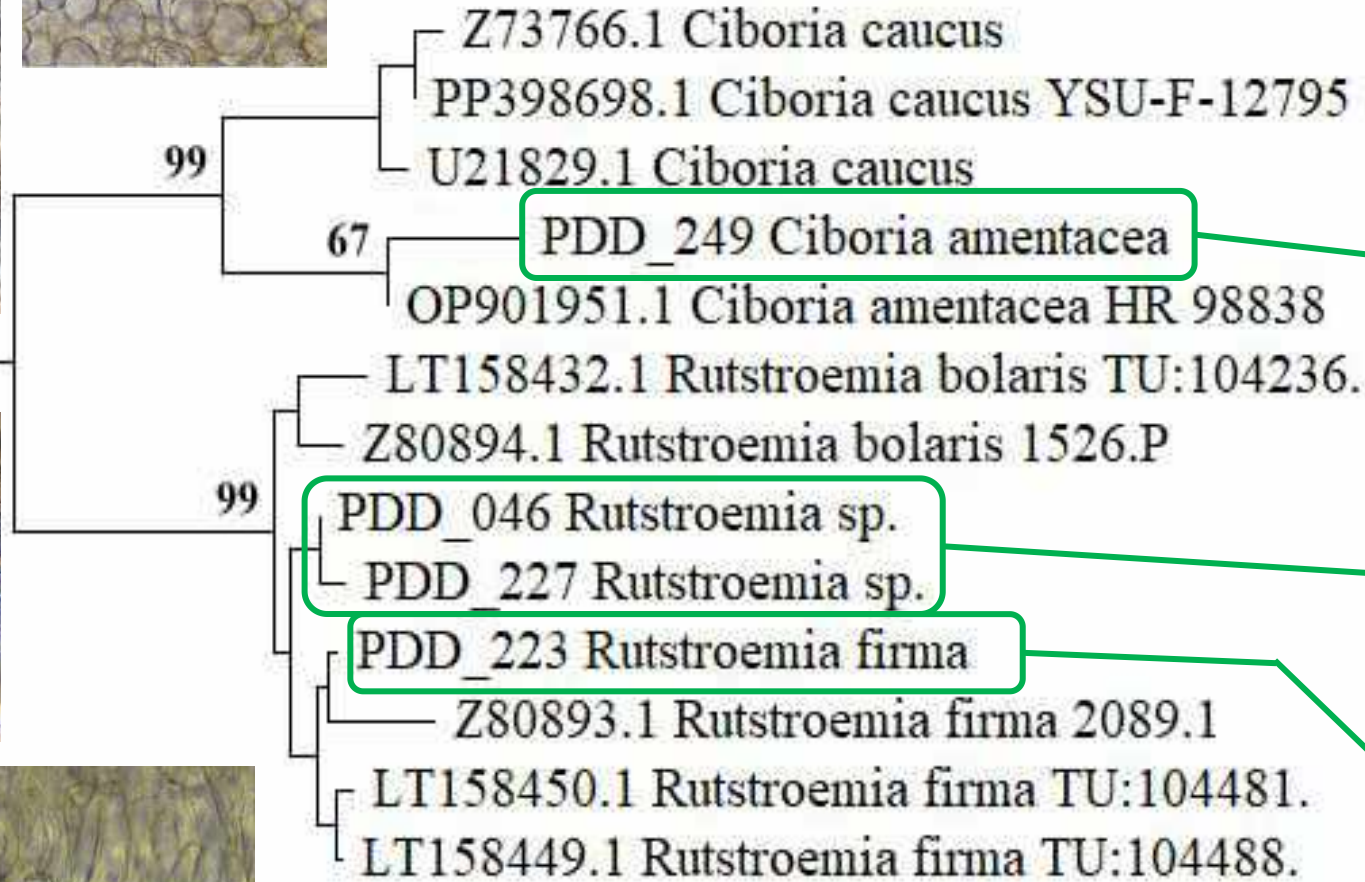
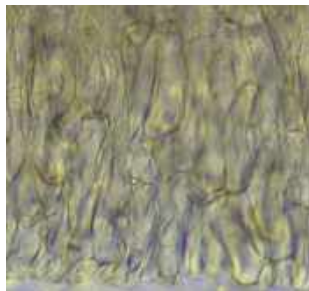
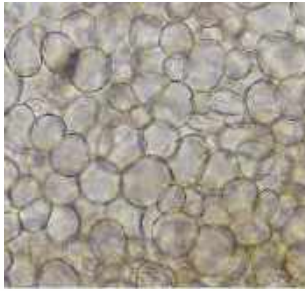
Данные по таксономическому* составу

42 образца из 8 семейств, 13 родов, 24 видов

Семейство	Количество образцов	Морфотип
Rutstroemiaceae	3	<i>Ciboria</i> -тип
Sclerotiniaceae	2	
Helotiaceae	22	<i>Hymenoscyphus</i> -тип
Pezizellaceae	2	
Lachnaceae	5	<i>Lachnum</i> -тип
Solenopeziaceae	1	
Dermataceae	2	<i>Mollisia</i> -тип
Mollisiaceae	5	

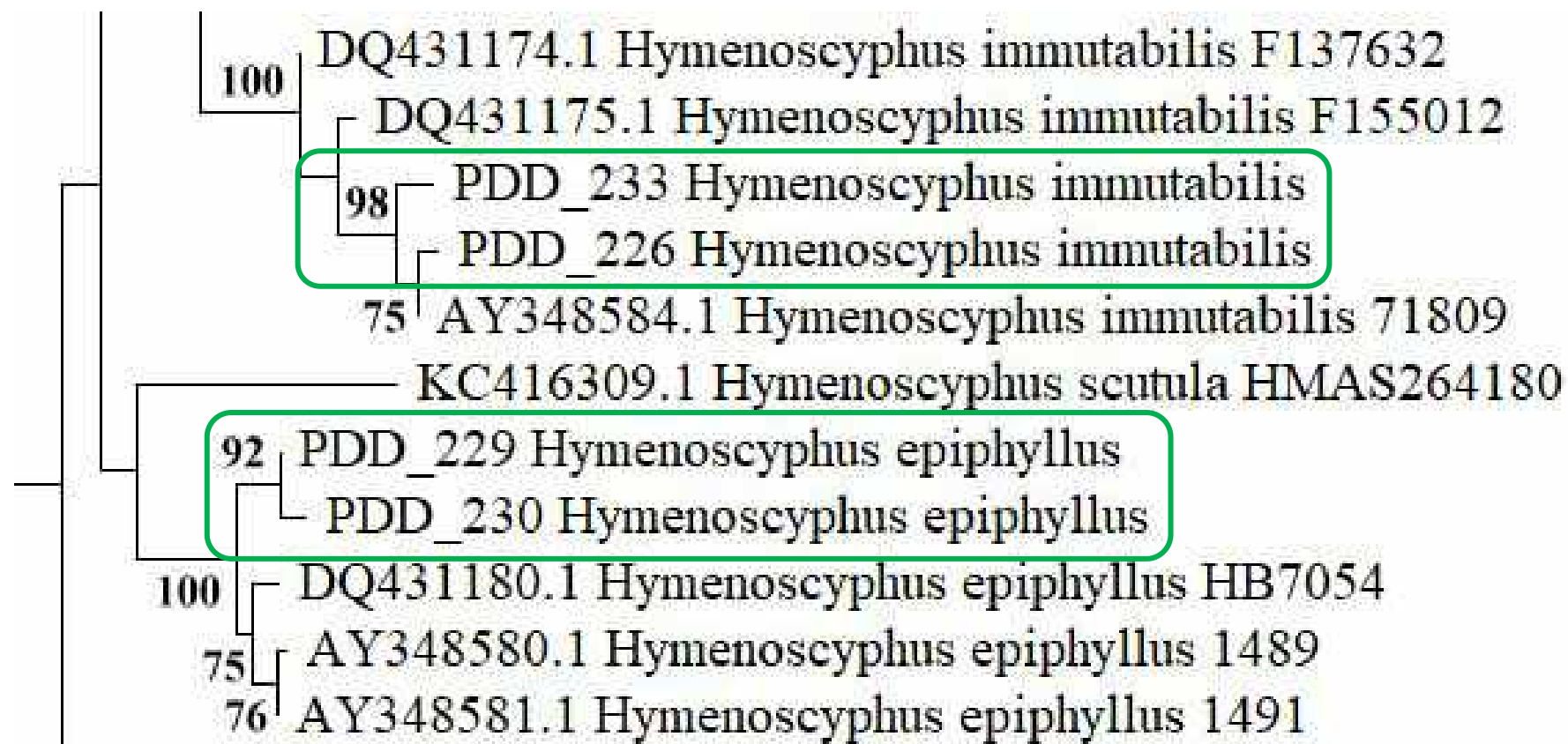
* данные о систематическом положении родов взяты из электронной базы данных MocoBank

Ciboria-ТИП

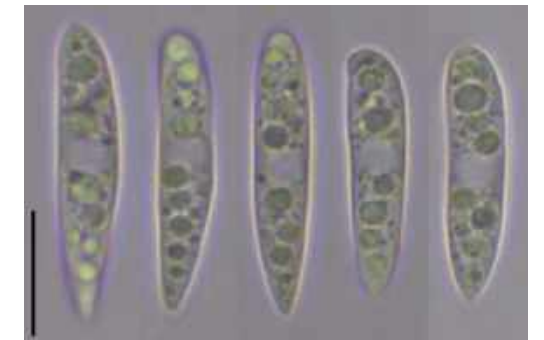
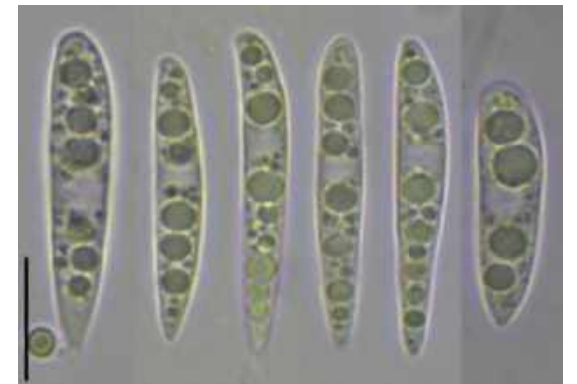
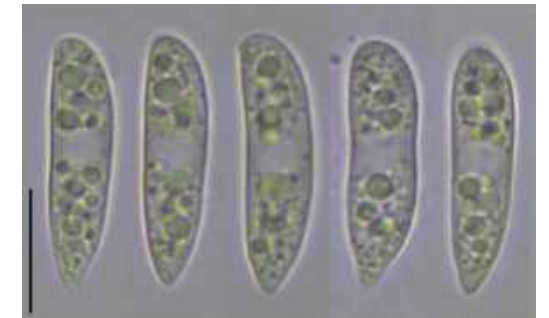
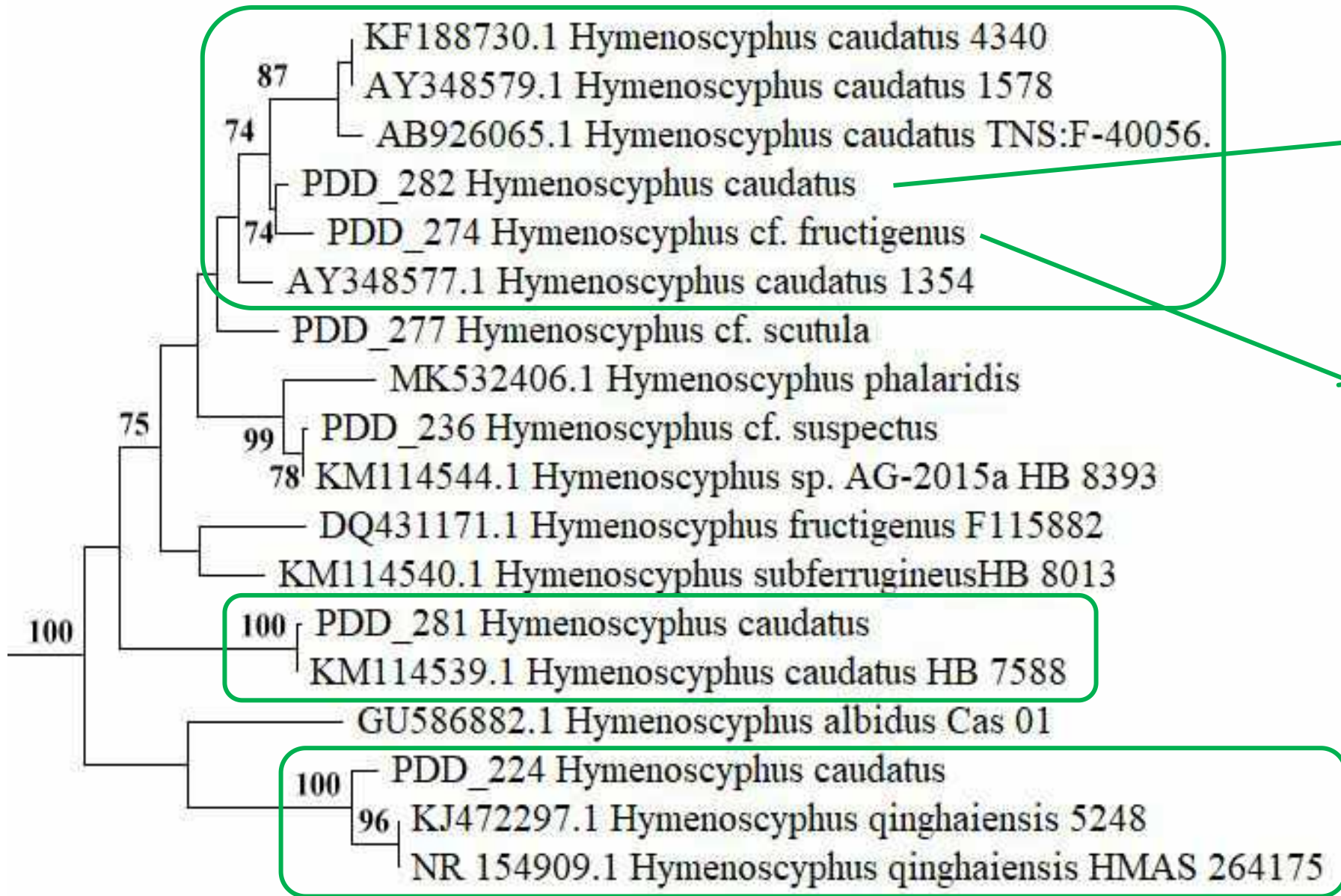


Hymenoscyphus-ТИП

- Наиболее широко представленная группа
- Для некоторых видов морфологические и молекулярные данные показали идентичные результаты



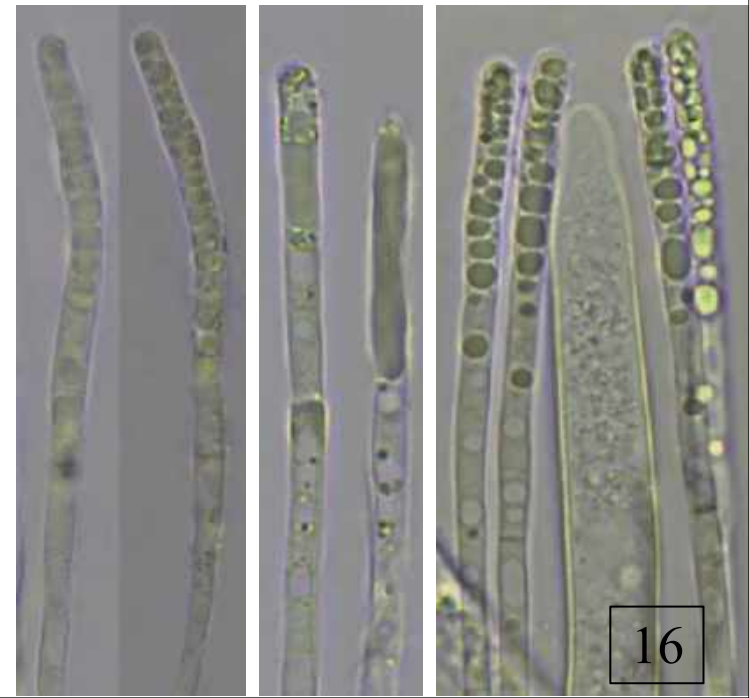
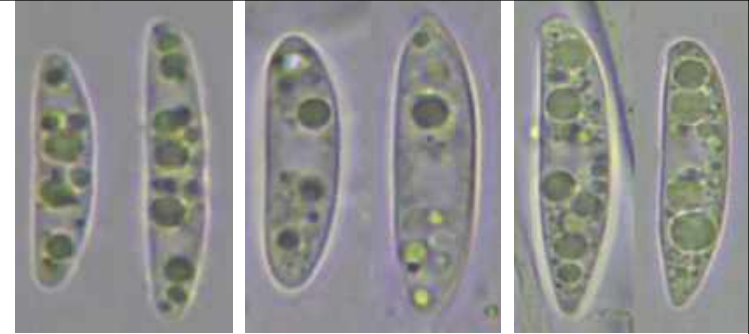
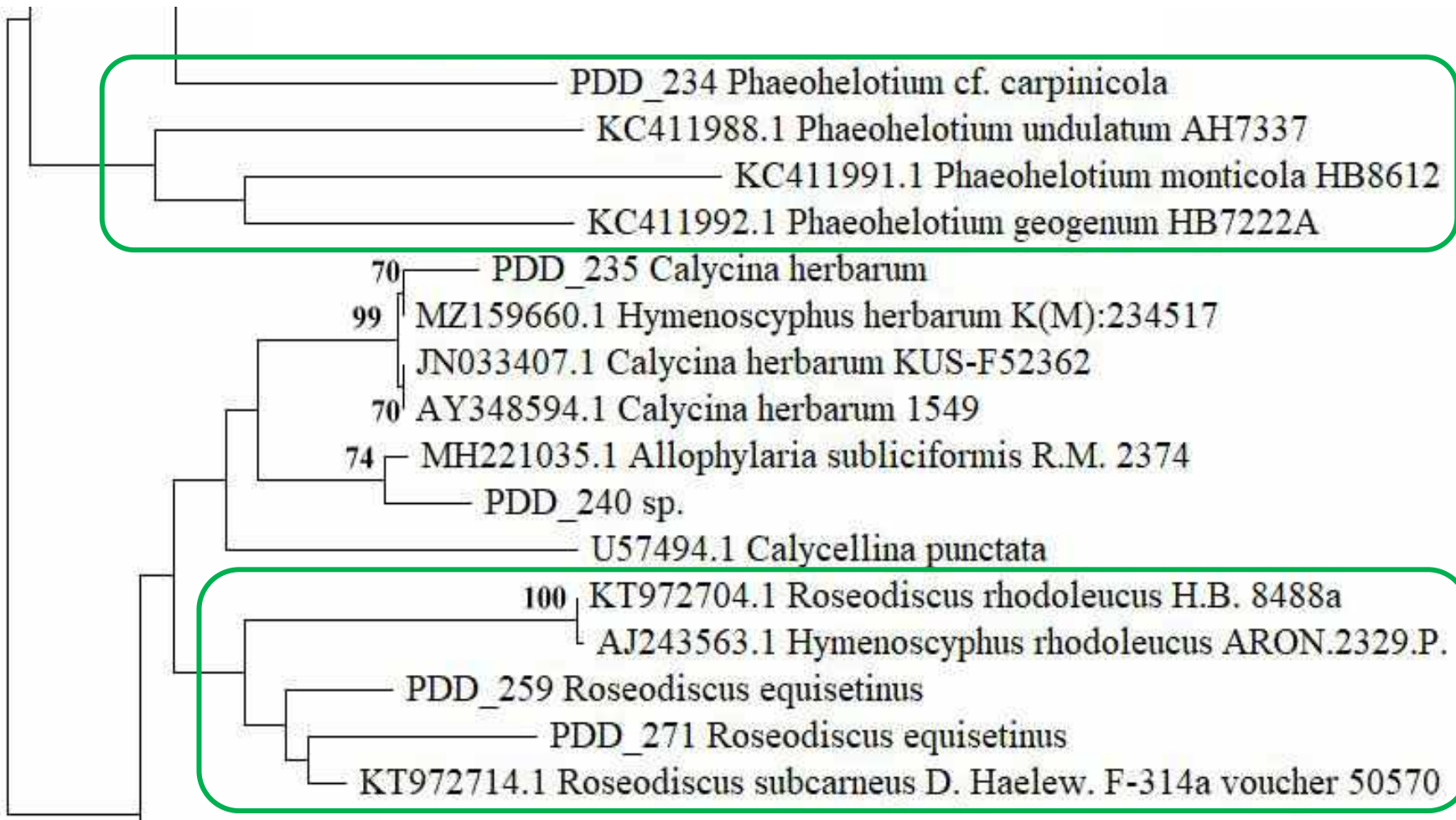
Hymenoscyphus-ТИП



H. fructigenus

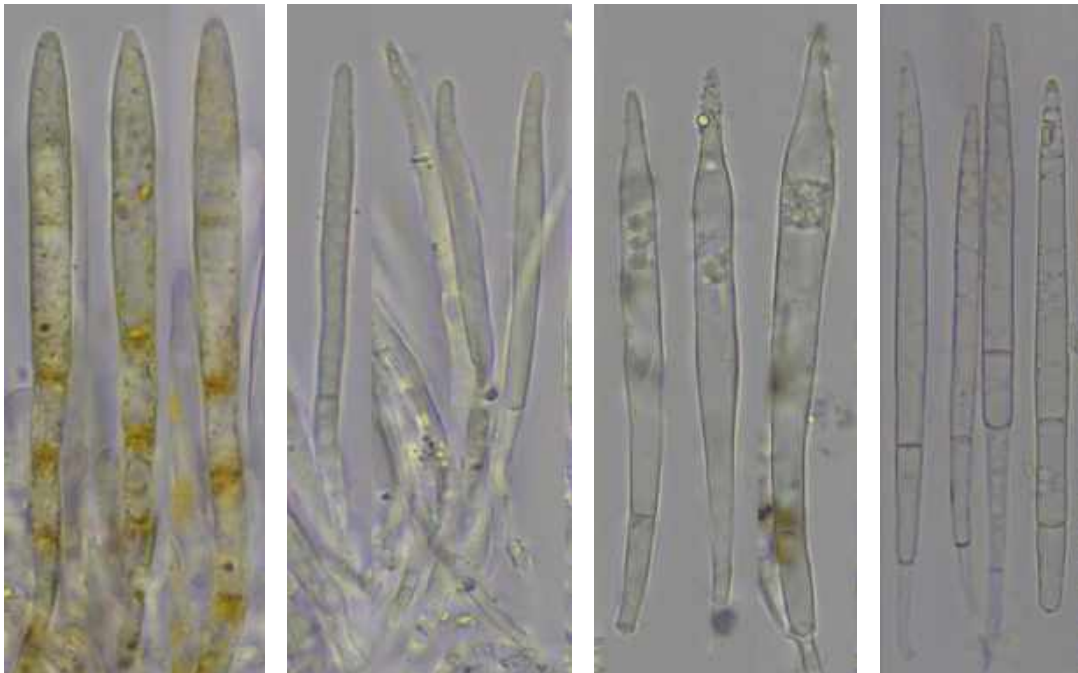
PDD_280

Hymenoscyphus-тип

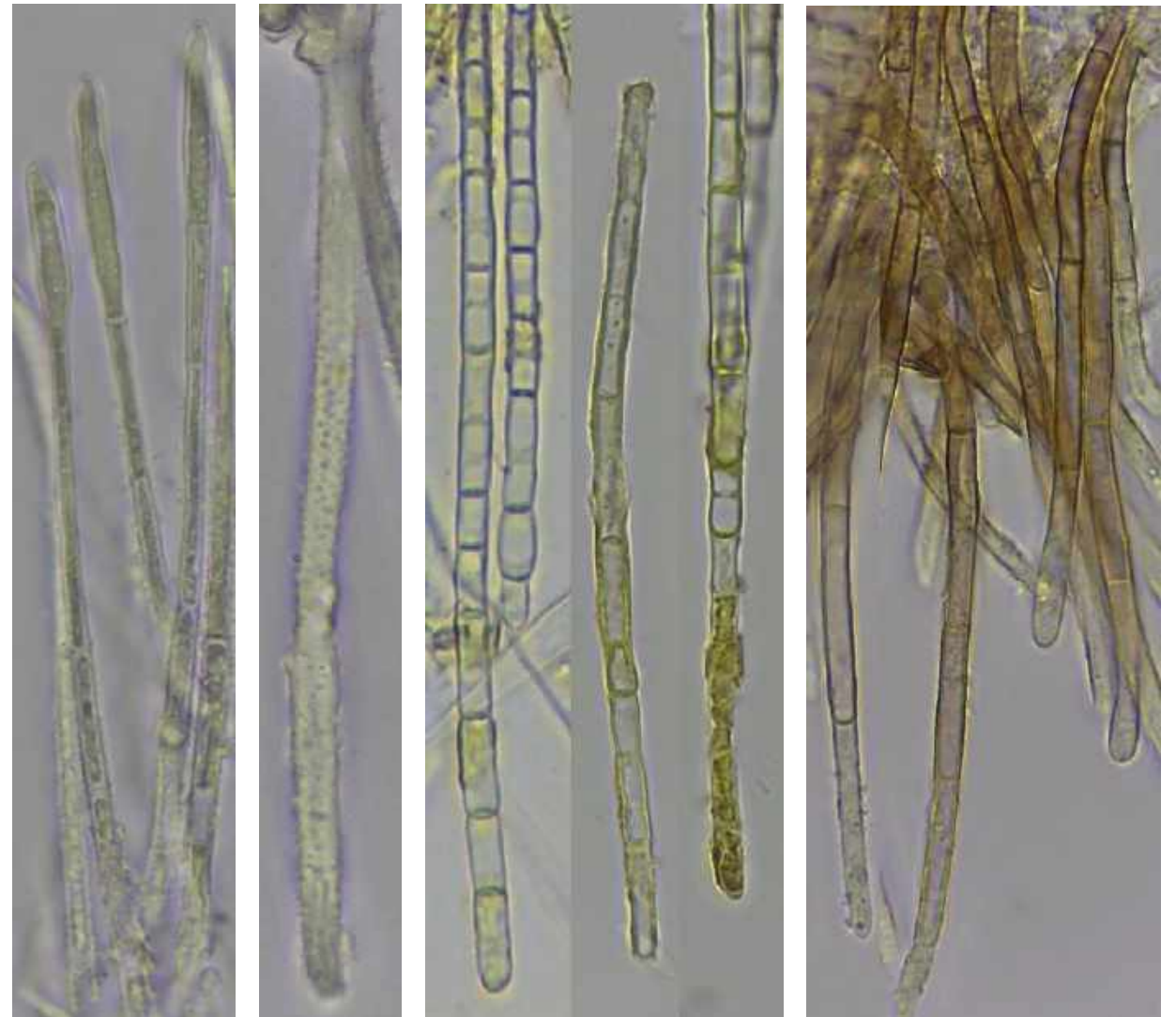


Lachnum-ТИП

- Особенности волосков стерильной поверхности
- Форма, ширина и включения парафиз



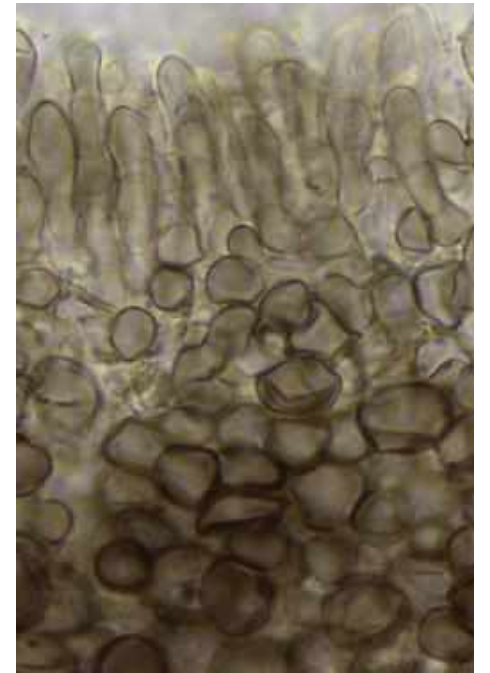
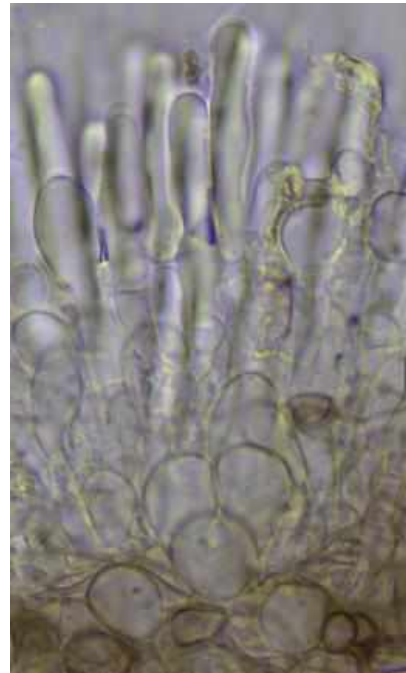
Парафизы



Волоски

Mollisia-ТИП

- Особенности стерильных слоев апотеция
- Включения парафиз и их реакция с КОН
- Окраска плодовых тел переменна

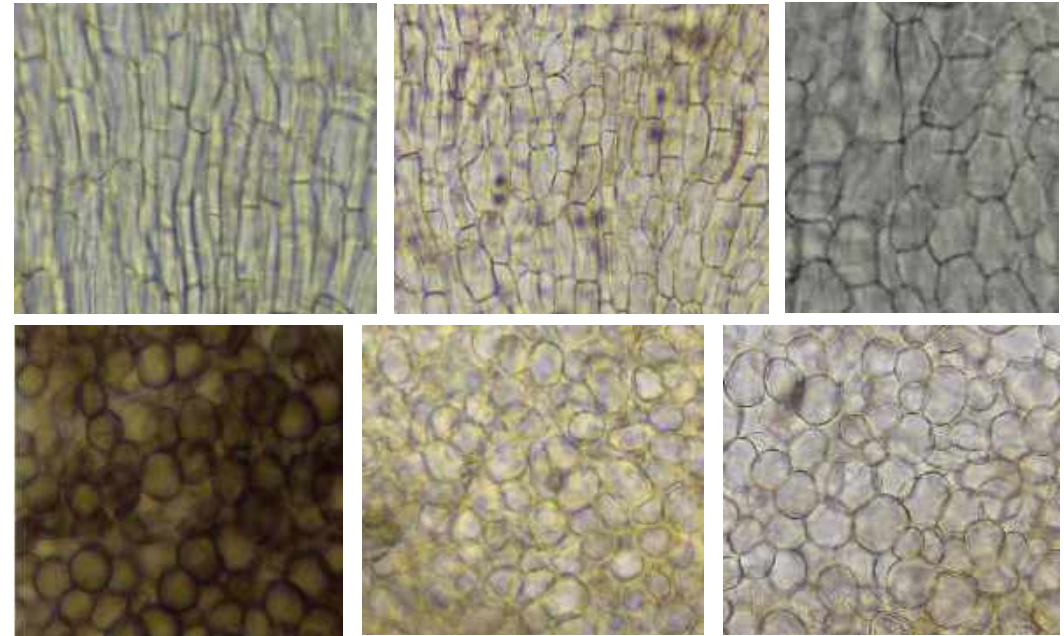


Апотеции одного вида в
разном состоянии

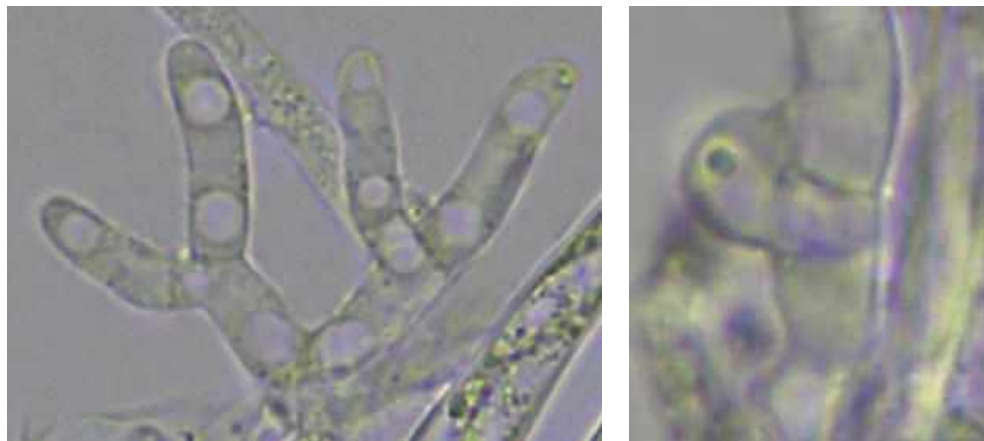
Волоски

Заключение

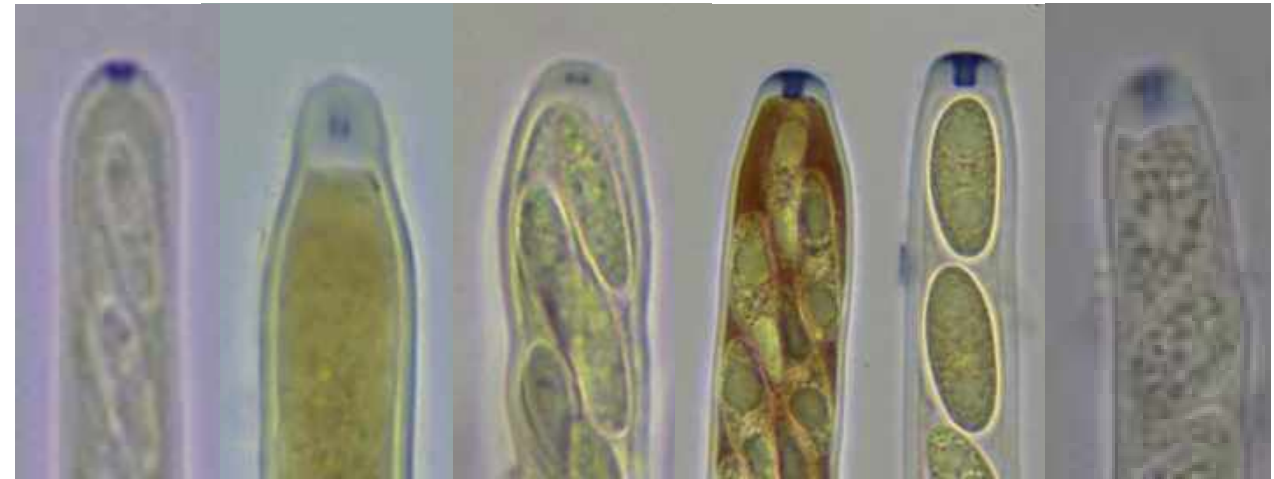
- Необходим комплексный подход
- Существует ряд признаков, которые могут использоваться для трудно идентифицируемых видов
- Проверка происхождения последовательностей



Эктальный эксципул



Формирование сумок



Апикальные аппараты сумок

Выводы

- На основании анализа 42 образцов выявлены представители 8 семейств, 13 родов и 24 видов порядка Helotiales.
- Созданы оригинальные описания и фотоатлас макро- и микроструктур, отображающий диагностические признаки видов, проведен сравнительный анализ с имеющимися литературными данными.
- Паттерн включений в спорах и парафизах, анатомия эктального эксципула, а также тип развития сумок, тип их апикального аппарата и его реакция на йодные реагенты могут быть использованы для идентификации трудно различимых и весьма сходных видов.
- Некоторые из перечисленных выше признаков, тем не менее, проявляют вариабельность внутри одного вида, что может быть свидетельством гетерогенности вида и требует более тщательного изучения.

Выводы

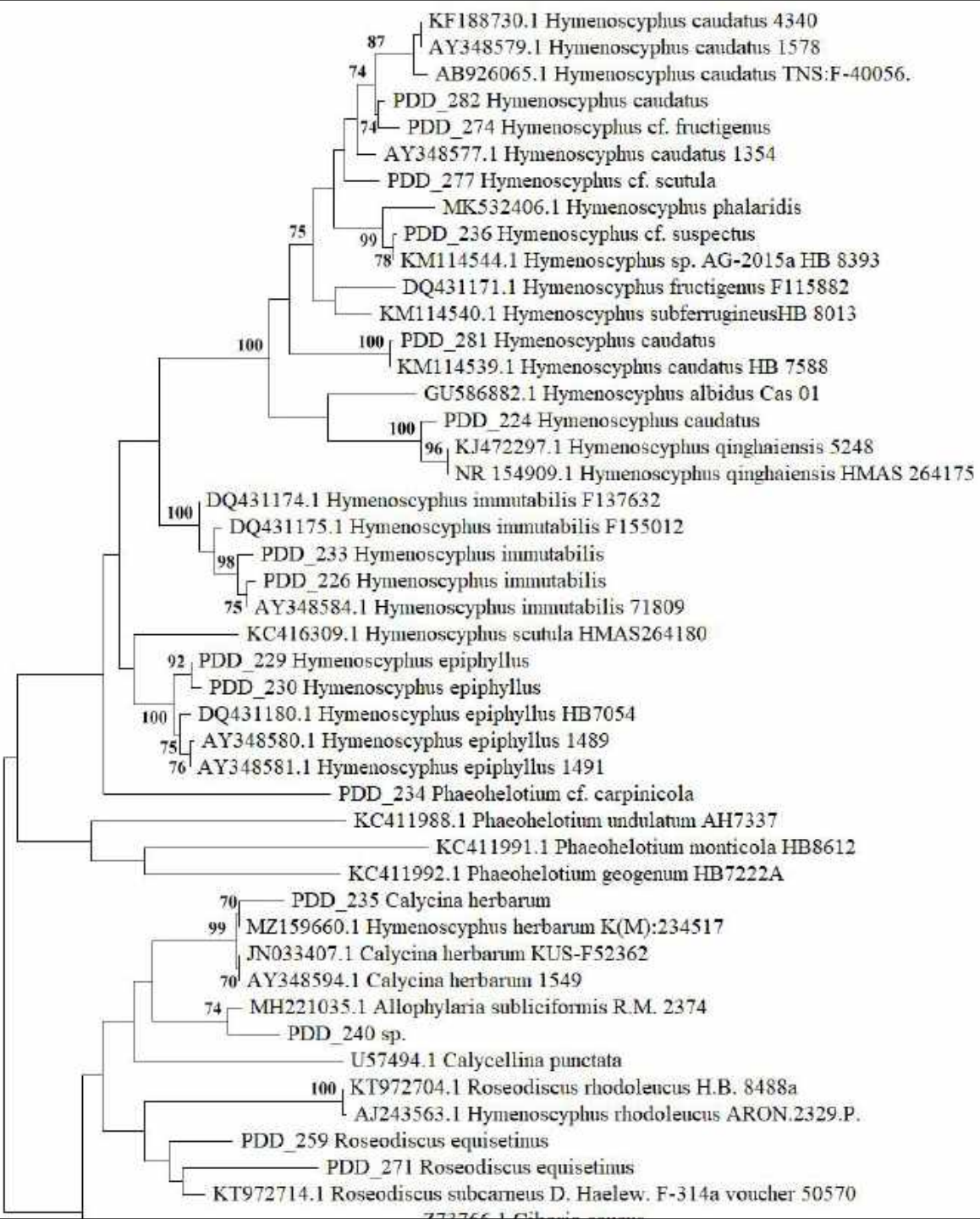
- Молекулярный анализ позволяет надежно верифицировать определенные по морфологическим признакам образцы исторически ранее описанных таксонов с уже устоявшимися и общепринятыми границами.
- Присутствуют трудности с молекулярной верификацией редко встречаемых и упоминаемых в литературе видов, так же, как и относительно недавно описанных таксонов. В целом, представленность Helotiales в генетических базах данных все еще крайне низка и для многих видов отсутствуют референсные последовательности.
- Требуется составление определительных ключей и атласов, включающих большое число видов, с обязательным указанием особенностей изменений признаков при гербаризации и методики постановки химических реакций, а также расширение генетических баз данных.



Спасибо за внимание!

Благодарности

- Руководителю Ворониной Елене Юрьевне за наставления и поддержку на протяжении написания работы.
 - Старшему научному сотруднику кафедры микологии и альгологии Кокаевой Людмиле Юрьевне.
 - Старшему научному сотруднику Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук Попову Евгению Сергеевичу.
 - Старшему преподавателю кафедры Гмошинскому Владимиру Ивановичу и Киреевой Надежде Ивановне.
 - Х. О. Баралу за предоставление доступа к некоторым статьям, не имеющимся в широком доступе.



Hymenoscyphus-ТИП