

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 582.287.23:575

Д. М. Иванов

### ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВ РОДА *LECCINUM*, ОБРАЗУЮЩИХ ПЛОДОВЫЕ ТЕЛА В МИКРОЭКОСИСТЕМАХ ПРИРУСЛОВОГО ВАЛА Р. КРЕМЕНКА, МЕТОДОМ РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА УЧАСТКОВ рДНК\*

#### Введение

Было установлено, что род *Leccinum* S. F. Gray представлен в Восточно-Европейской части России небольшим числом видов (9), образующих, в зависимости от экологических условий местообитания, несколько морфологических форм, различающихся размерами плодового тела, цветом кожицы шляпки и изменением окраски на срезе [1].

В полевые сезоны 2011–2012 гг. было зарегистрировано массовое плодоношение эктомикоризных грибов изучаемого рода *Leccinum* в микроэкосистемах прируслового вала р. Кременка (Ленинградская обл., Гатчинский р-н), иногда состоящих из нескольких деревьев. Микроэкосистемы ограничены от леса на коренном берегу затопляемыми участками поймы, а от реки лугом, с характерными комплексами видов травянистых растений.

Автором данной статьи были обнаружены плодовые тела представителей рода *Leccinum*, существенно отличающиеся морфологически от видов окружающих лесных и болотных мезоэкосистем. Нетипичным является также состав древесных пород, с которыми в обнаруженных микроэкосистемах произрастают грибы рода *Leccinum*: ольха, ель, древовидные и кустарниковые ивы.

В качестве рабочей гипотезы было принято следующее предположение: возможно, что в микроэкосистемах, отличающихся по составу древесных пород и по эдафическим условиям от окружающих мезоэкосистем, характерных для данной территории, происходит изменение видового состава рода *Leccinum* за счет прорастания спор видов из других регионов Голарктики.

Цель работы — идентифицировать плодовые тела, собранные в микроэкосистемах прируслового вала, методом рестрикционного анализа амплифицированных участков рибосомальной ДНК.

---

Иванов Дмитрий Михайлович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Санкт-Петербургский государственный университет; доцент, Санкт-Петербургский государственный университет гражданской авиации; e-mail: goldenflees@mail.ru

\* Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 10-04-01190-а).

© Д. М. Иванов, 2013

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- составить схему поймы р. Кременка и нанести на нее микроэкосистемы в которых был проведен сбор плодовых тел;
- сравнить эдафические условия в микроэкосистемах прируслового вала с лесными мезоэкосистемами на коренном берегу;
- провести амплификацию области внутренних транскрибируемых спейсеров, включающих ген 5,8S (ITS1-5,8S-ITS2), и межгенного интервала IGS1 рибосомальной ДНК (рДНК) с последующим рестрикционным анализом;
- сравнить размеры фрагментов изученных областей у грибов, собранных в микроэкосистемах прируслового вала реки, с результатами, полученными для видов грибов рода *Leccinum*, собранных в лесных и болотных сообществах Восточно-Европейской части РФ.

### Материалы и методы исследования

Сбор плодовых тел грибов был проведен в пойме р. Кременка (Ленинградская обл., Гатчинский р-н). Массовое плодоношение наблюдалось в периоды 15–26.08.2011 и 20–29.08.2012. Географические координаты каждой микроэкосистемы, показанной на плане местности (рис. 1), определялись GPS-навигатором eTrex производства Garmin, точность 15 м (приведены в скобках). По составу древесных пород и почвенным условиям были выделены следующие микроэкосистемы.

I. Две группы берез 11 и 19 шт. Расположены на границе между лугом и топким участком осоковой поймы глубиной 0,5–1,0 м (N 59°04,734', E 30°27,664').

II. Четыре березы и кустарниковые ивы на границе лугового сообщества (N 59°04,751', E 30°27,678').

III. Узкая полоса берез шириной 1,0–3,0 м посреди затопляемой части поймы (N 59°04,781', E 30°27,644'). В подросте кустарниковая ива, ольха и ель.

IV. Сообщество с доминированием ольхи серой и единичными березами (N 59°04,831', E 30°27,693').

V. Густой подрост молодых елей, береза и кустарниковые ивы (N 59°04,813', E 30°27,660').

VI. Березы разного возраста и подрост из ели, рябины, крушины (N 59°04,823', E 30°27,638').

Камеральная обработка плодовых тел и их высушивание проводились согласно методике, описанной в работе [2]. Выделение ДНК проводилось из сухих плодовых тел в лизирующем буфере с протеиназой К. Для амплификации области ITS1-5,8S-ITS2 рДНК использовали пару праймеров, специфичных для базидиальных грибов ITS1F-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA и ITS4B-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG [3]. Межгенный спейсер IGS1 амплифицировали с парой праймеров CNL12-CTGAACGCCTCTAAGTCAG и 5SA-CAGAGTCCTATGGCCGTGGAT [4].

Для расщепления амплифицированных фрагментов использовали рестриктазу *Hinf*I — сайт узнавания — G↓ANTC, где N — любой нуклеотид. Методика выделения ДНК, условия проведения полимеразной цепной реакции, рестрикционного анализа и разделения полученных фрагментов в агарозном геле приводятся в работе [3]. В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК бактериофага λ, расщепленную энзимом *Pst* I (Fermentas).

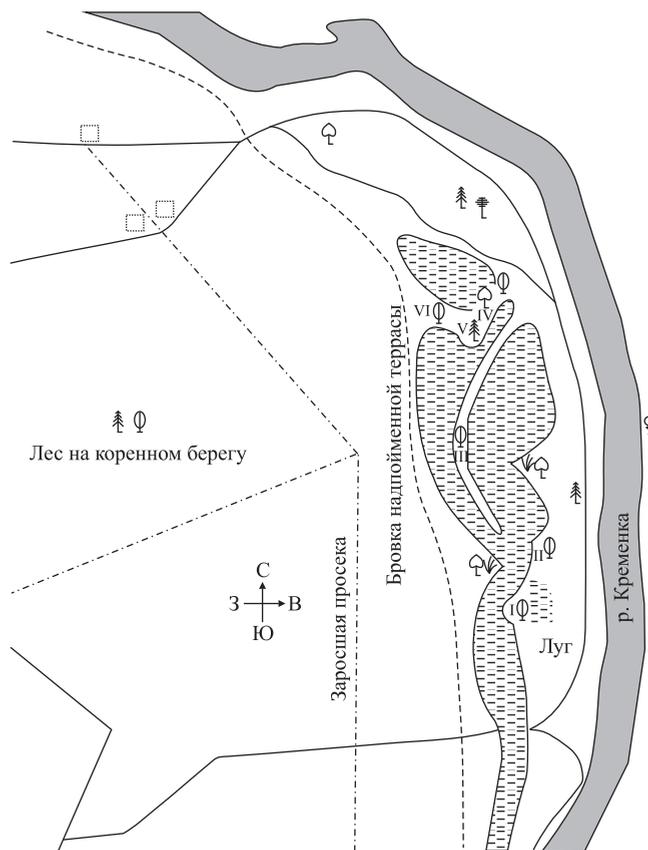


Рис. 1. Расположение поймы р. Кременка на плане местности  
 Условные обозначения: I–VI — номера микроэкосистем, — ель, — сосна, — береза, — ольха, — ива, — топкий участок поймы, — родник, — старинные фундаменты.  
 В 1 см — 20 м.

### Результаты исследований и их обсуждение

Ранее, при изучении представителей рода *Lessinut*, сбор материала проводился в экосистемах болот и в разных типах леса, однородных на большом протяжении [2]. При обнаружении массового плодоношения в пойме р. Кременка возникла необходимость использования термина «микроэкосистема» для того, чтобы подчеркнуть ее локальные размеры и пространственную изоляцию.

Район исследования относится к группе низинных моренных ландшафтов с покровом из бескарбонатных валунных суглинков и супесей. Было проведено сравнение эдафических условий произрастания древесных пород в мезоэкосистеме смешанного леса на коренном берегу и микроэкосистемы I (см. рис. 1) прируслового вала. На коренном берегу в смешанном березово-еловом лесу почва дерново-слабоподзолистая. Почва прируслового вала в пойме р. Кременка аллювиально-дерновая. Было проведено определение гранулометрического состава, обменных катионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , количества гумуса, гидrolитической кислотности.

Трудности изучения базидиальных грибов, участвующих в эктомикоризном симбиозе, связаны с тем, что, за редким исключением они не растут на питательных средах. Поэтому основные методы работы генетиков — скрещивание, наблюдение за потомством, прослеживание признаков, — к сожалению, не применимы. Методы генетического анализа экологических отношений между участниками эктомикоризного симбиоза также затруднены из-за сложности выявления элементарных признаков.

Классификация изучаемого рода с точки зрения классической систематики также встречает ряд ограничений, поскольку таксономические признаки (размеры спор, цистид, базидий, окраска частей плодового тела и ее изменения на срезе) у разных видов перекрываются. Трудности изучения видов рода *Leccinum* миколог Б. П. Васильков (1956) отметил следующей фразой — “*crux et scandalum agaricologicorum*” ([5], с. 383).

Поэтому основным методом исследования является анализ ITS1-5,8S-ITS2 и IGS1 рДНК [1]. Организация рДНК для грибов и сайты отжига используемых праймеров изображены на рис. 2.

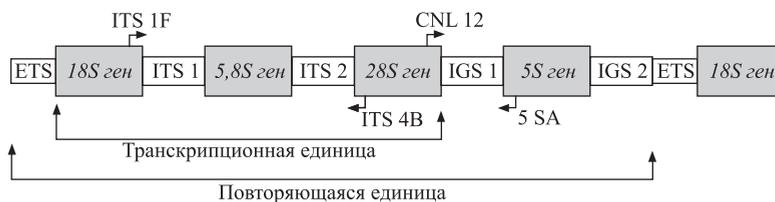


Рис. 2. Схема организации рДНК базидиальных грибов и сайты отжига праймеров:

18S, 5,8S, 28S и 5S – гены рРНК; ETS — внешний транскрибируемый спейсер; ITS1, ITS2 — внутренние транскрибируемые спейсеры; IGS1, IGS2 — межгенные спейсеры; ITS 1F и ITS 4B; CNL 12 и 5 SA — пары праймеров, используемые для амплификации.

В результате сравнения амплифицированных фрагментов ITS1-5,8S-ITS2 (рис. 3 и 4) и IGS1 рДНК и фрагментов, образующихся после воздействия рестриктазы,

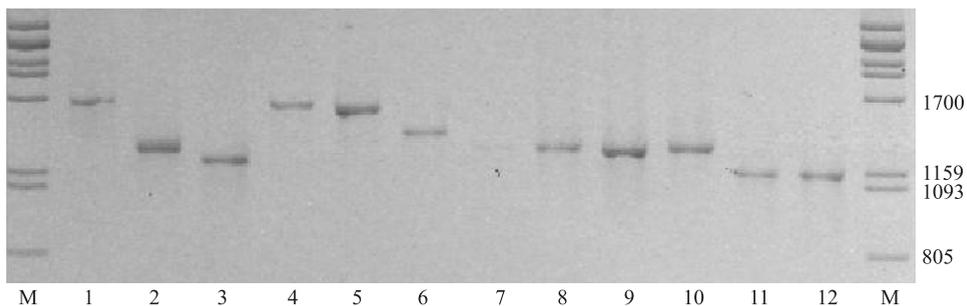


Рис. 3. Электрофоретическое разделение амплифицированной области внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1-5,8S-ITS2 рДНК:

1 — *L. versipelle*; 2, 7–10 — *L. scabrum*; 3, 11, 12 — *L. schistophilum*; 4 — *L. variicolor*, 5 — *L. holopus*; 6 — *L. sp. I*; М — маркер молекулярной массы (п.н.).

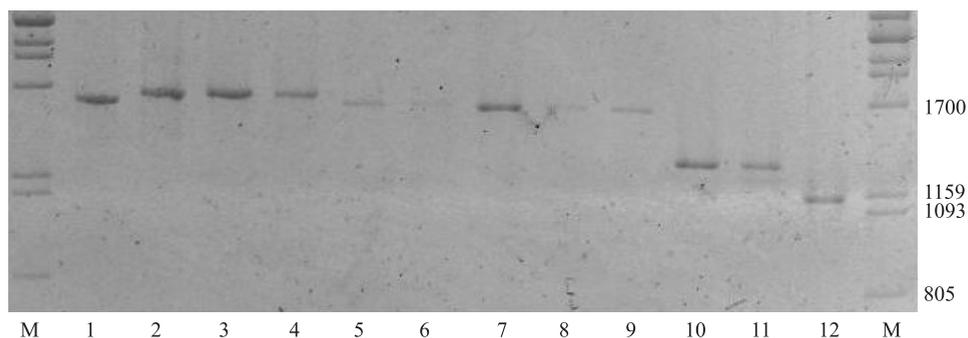


Рис. 4. Электрофоретическое разделение амплифицированной области внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1-5,8S-ITS2 рДНК:

1, 5–7 — *L. variicolor*; 2–4 — *L. versipelle*; 8, 9 — *L. holopus*; 10, 11 — *L. scabrum*; 12 — *L. schistophilum*; M — маркер молекулярной массы (п.н.).

с данными, полученными ранее для Восточно-Европейских видов рода *Leccinum* [1], были идентифицированы следующие виды:

*Leccinum versipelle* (Fr. et Hök) Snell — подосиновик желто-бурый;

*Leccinum scabrum* (Bull. : Fr.) S. F. Gray — подберезовик обыкновенный;

*Leccinum schistophilum* Bon — подберезовик «щелюлюбивый»;

*Leccinum variicolor* Watling — подберезовик разноцветный;

*Leccinum holopus* (Rostk.) Watling — подберезовик болотный.

Латинские названия таксонов приводятся по работе [6]. Полученные данные обобщены в таблице.

#### Виды рода *Leccinum*, идентифицированные в микроэкосистемах прирусового вала

Микроэкосистема	Идентифицированные виды	Доминирующая порода
I	<i>L. schistophilum</i> , <i>L. scabrum</i> , <i>L. versipelle</i>	Береза
II	<i>L. schistophilum</i> , <i>L. scabrum</i> ,	»
III	<i>L. schistophilum</i>	»
IV	<i>L. variicolor</i> , <i>L. sp. 2</i>	Ольха
V	<i>L. holopus</i>	Ель
VI	<i>L. variicolor</i> , <i>L. holopus</i> , <i>L. sp. 1</i>	Береза

В микроэкосистемах речной поймы были идентифицированы все виды, свойственные произрастающим древесным породам. Не был обнаружен *L. vulpinum* Watling, произрастающий совместно с сосной. Также не были обнаружены *L. pseudoscabrum* (Kalenb.) Šutara, произрастающий совместно с грабом, и *L. rotundifoliae* (Singer) A. H. Sm., Thiers & Watling, приуроченный к соответствующему виду березы.

Однако были обнаружены плодовые тела, которые не показали гомологии по размеру амплифицированных фрагментов (см., например, рис. 3, дорожка б) и фрагментов, образующихся после воздействия рестриктазы, с электрофоретическими спектрами девяти видов, встречающихся в Восточно-Европейской части России. Для их идентификации планируется использовать метод установления родства с известными видами по секвенированным последовательностям.

Таким образом, в микроэкосистемах прируслового вала р. Кременка было идентифицировано пять видов рода *Leccinum*, а в мезоэкосистемах на коренном берегу встречаются один-два вида. Например, в березово-еловом лесу встречаются *L. scabrum* и *L. versipelle*, в сосновом лесу — *Leccinum vulpinum*, на верховом болоте с болотной формой сосны — *L. holopus* и *L. variicolor*.

Среди идентифицированных видов *L. schistophilum*, *L. scabrum* и *L. versipelle* приурочены к березе в микроэкосистемах I и II на границе между лугом и топким участком поймы, на аллювиальных кварцевых породах, а *L. holopus* и *L. variicolor* приурочены к ели и ольхе в микроэкосистемах IV–VI топкой осоковой поймы.

В пойме р. Кременка, в трех микроэкосистемах, идентифицирован вид *L. schistophilum*, который ранее был обнаружен в экосистемах антропогенного происхождения — по обочинам дорог, обсыпанных известковым щебнем [7]. Также в микроэкосистеме IV с доминированием ольхи серой был идентифицирован *L. variicolor*, обычно приуроченный к сосне, растущей по окраинам верховых болот [8].

В растительных сообществах, формирующихся на молодом песчаном аллювии в поймах рек, с участием кустарниковой и древесной растительности, складываются своеобразные условия микоризообразования [9]. Еще в 1955 г. Б. П. Васильков отмечал, что в отношении напочвенных грибов эти сообщества еще очень мало исследованы [9], но и в настоящее время эктомикоризные грибы растительных сообществ на затопляемых территориях являются наименее изученными. Можно предположить, что недостаточный интерес к их исследованию связан с тем, что заросшие кустарником поймы малых рек в хозяйственном отношении не представляют интереса, относятся к «неудобьям» и трудно осваиваемым территориям. Тем не менее это не снимает необходимости изучения микоризообразования в таких сообществах. Прежде всего это актуально в связи со своеобразием эдафических условий и большим количеством микроэкосистем, образующихся в поймах рек, по сравнению с окружающими лесными и болотными экосистемами.

Приуроченность к древесному партнеру была впервые использована для видов *Leccinum*, как таксономический признак, в классификации Р. Уотлинга (R. Watling) [10]. Это оказало большое влияние не только на систематику данного рода, но стало подходом к классификации всех грибов с эктомикотрофным типом питания. В настоящее время общепризнано, что приуроченность к древесному партнеру для грибов, образующих эктотрофную микоризу, является определяющим фактором.

Основными древесными породами на территории Восточно-Европейской части России, вступающими в эктомикоризный симбиоз с представителями изучаемого рода *Leccinum*, являются: береза, осина, сосна, дуб и граб. Ольха, образующая актиноризу с азотфиксирующими бактериями, обычно рассматривается в качестве микотрофной древесной породы только для очень ограниченного круга видов, в состав которых представители рода *Leccinum* не входят. Вопрос о возможности существования видов рода *Leccinum*, образующих микоризу в чистых еловых насаждениях, окончательно не решен. Ива редко рассматривается в качестве микотрофного растения и вопрос о существовании *Leccinum* sp., связанного с древовидными и кустарниковыми ивами остается открытым [11].

## Заключение

В пойме р. Кременка на аллювиальных почвах изучены микрэкосистемы, в которых сложились своеобразные условия микоризообразования как по эдафическим условиям, так и по составу доминирующих древесных пород.

В микрэкосистемах прируслового вала р. Кременка было идентифицировано пять видов рода *Leccinum*, а к мезоэкосистемам на коренном берегу приурочены один-два вида. Также, на основе электрофоретических спектров, были обнаружены плодовые тела, которые пока не удалось сопоставить с известными видами.

## Литература

1. Иванов Д. М. Идентификация подберезовиков с аномалиями морфологических признаков и превышением содержания  $^{137}\text{Cs}$  в плодовых телах методом рестрикционного анализа участков рДНК // Вестн. С.-Петербург. ун-та. Сер. 3: Биология. 2013. Вып. 1. С. 90–95.
2. Иванов Д. М., Ефремова М. А. Оценка суммарной бета-активности в плодовых телах грибов рода *Leccinum*, произрастающих в лесных и болотных экосистемах Ленинградской области // Вестн. С.-Петербург. ун-та. Сер. 3: Биология. 2012. Вып. 2. С. 55–61.
3. Иванов Д. М. Верификация метода рестрикционного анализа рДНК для изучения геномного полиморфизма представителей порядка Boletales // Вестн. С.-Петербург. ун-та. Сер. 3: Биология. 2008. Вып. 4. С. 112–120.
4. Hönig K., Riefler M., Kottke I. Survey of *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. inoculum and fruitbodies in a nursery by IGS-RFLPs and IGS sequences // Mycorrhiza. 2000. Vol. 9. P. 315–322.
5. Васильков Б. П. Березовик — *Krombholzia scabra* (Fr.) Karst. — в СССР // Тр. Бот. ин-та АН СССР. Сер. II. 1956. Вып. 10. С. 367–384.
6. Den Bakker H. C., Noordeloos M. E. A revision of European species of *Leccinum* Gray and notes on extralimital species // Persoonia. 2005. Vol. 18. P. 511–587.
7. Иванов Д. М. Идентификация *Leccinum chistophilum* по данным рестрикционного анализа участков ядерной рибосомальной ДНК // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. 2009. № 1. С. 9–10.
8. Иванов Д. М. Поиск гиятуса между видами *Leccinum holopus* и *Leccinum variicolor* // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. 2010. № 1. С. 37.
9. Васильков Б. П. Очерк географического распространения шляпочных грибов в СССР. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1955. 86 с.
10. Watling R. Boletaceae, Gomphidiaceae, Paxillaceae // British Fungus Flora. Agarics and Boleti 1. Edinburgh: Royal Botanical Gard, 1970. P. 45–57.
11. Watling R. Macrofungi associated with British willows // Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. 1992. 98B. P. 135–147.

Статья поступила в редакцию 13 июня 2013 г.