

ГЕНЕТИКА

УДК 582.287.23:575

Д. М. Иванов

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОДБЕРЕЗОВИКОВ С АНОМАЛИЯМИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ И ПРЕВЫШЕНИЕМ СОДЕРЖАНИЯ ^{137}Cs В ПЛОДОВЫХ ТЕЛАХ МЕТОДОМ РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА УЧАСТКОВ рДНК*

Введение

При изучении филогенетических связей между видами эктомикоризообразующих грибов рода *Leccinum* S. F. Gray были обнаружены плодовые тела с аномалиями морфологических признаков: поры трубочек гимениального слоя в норме тонкие и округлые становятся широкими и угловатыми, а сам гимениальный слой разрастается вниз и увеличивается в размерах [1].

В плодовых телах с морфологическими аномалиями было установлено превышение в 1,5–2 раза допустимого уровня содержания ^{137}Cs в сухих грибах [1], составляющего по данным СанПиН 2.3.2.1078-01 2500 Бк/кг [2].

Ранее, на основе морфологических, микроскопических и экологических характеристик, определение подберезовиков с аномалиями морфологических признаков было проведено до вида *L. holopus* — Подберезовик болотный [1].

Недостаточность идентификации найденных образцов с морфологическими аномалиями по приведенным признакам обусловлена тем, что при высоком разнообразии морфологических характеристик — окраска поверхности шляпки, цвет чешуек ножки, консистенция плодового тела, изменение окраски на срезе — таксономически значимые микроскопические признаки (размеры спор, цистид и базидий) перекрываются. Поэтому необходимо провести идентификацию на основе дополнительных количественных признаков, полученных с помощью методов анализа целевых фрагментов ДНК.

Кроме того, в сходных местообитаниях в те же сроки плодоношения встречается другой вид *L. variicolor* Watling — Подберезовик разноцветный. Поиск гиагуса между двумя близкими в экологическом отношении видами обсуждается в работе [3].

Цель работы — идентифицировать плодовые тела с превышением допустимого уровня содержания ^{137}Cs и морфологическими аномалиями методом рестрикционного анализа амплифицированных участков рибосомальной ДНК.

Иванов Дмитрий Михайлович — канд. биол. наук, Санкт-Петербургский государственный университет; 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 микологический гербарий плодовых тел грибов восточноевропейских видов рода *Leccinum* и выделить препараты ДНК;
- провести амплификацию области внутренних транскрибируемых спейсеров и гена 5,8S (ITS1-5,8S-ITS2) рибосомальной ДНК (рДНК) с праймерами ITS1F и ITS4B с последующим рестрикционным анализом;
- амплифицировать область межгенного интервала IGS1 рДНК с праймерами CNL12 и 5SA и провести ее рестрикционный анализ;
- сравнить размеры фрагментов изученных областей у грибов с аномалиями морфологических признаков с результатами, полученными для плодовых тел видов грибов рода *Leccinum* без морфологических аномалий.

Материалы и методы исследования

Для решения поставленных задач был составлен специализированный, предназначенный для изучения грибов одного рода *Leccinum* микологический гербарий.

Полевые исследования проводились в Мурманской обл., Республике Карелия, Ленинградской обл., Краснодарском крае. Для наблюдения за плодовыми телами и сбора материала использовались маршрутный метод и работа на постоянных пробных площадях. Сборы проводились с 2003 по 2011 г. Коллекция высушенных плодовых тел грибов насчитывает в настоящее время 400 образцов.

Вся информация, накопленная об образцах, была объединена в реляционную базу данных, разработанную с помощью программы Access. Для каждого образца она включает в себя: географическое местонахождение с указанием GPS координат, описание типа леса, ссылки на номера и даты цифровых фотографий, описание микроскопических и макроморфологических признаков, результат измерения суммарной бета-активности радионуклидов (Бк/кг) в плодовых телах.

Латинские названия таксонов приводятся в работе [4]. Порядок следования названий в списке соответствует распределению видов по секциям и подсекциям в системе восточноевропейских видов рода *Leccinum* S. F. Gray. В случае отсутствия широко известного названия в кавычках приведен дословный перевод. Материалом для исследования послужили плодовые тела, принадлежащие к следующим видам:

Leccinum aurantiacum (Bull.) Gray — Подосиновик красный;

Leccinum vulpinum Watling — Красный гриб сосновый;

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

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

Leccinum rotundifoliae (Singer) A. H. Sm., Thiers & Watling — Подберезовик «округлолистный»;

Leccinum schistophilum Bon — Подберезовик «щербнелюбивый»;

Leccinum variicolor Watling — Подберезовик разноцветный;

Leccinum holopus (Rostk.) Watling — Подберезовик болотный;

Leccinum pseudoscabrum (Kallenb.) Šutara — Грабовик.

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 и ITS4B [5]. Межгенный спейсер IGS1 амплифицировали с парой праймеров CNL12 и 5SA [6]. Для расщепления

амплифицированного фрагмента использовали рестриктазу HinfI — 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 [7]. В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК бактериофага λ, расщепленную энзимом Pst I (Fermentas).

Результаты исследований и их обсуждение

Участки ядерной рДНК выбраны в качестве целевых последовательностей потому, что их организация хорошо известна для многих организмов, включая грибы. Интерес к указанным участкам рДНК при филогенетических и экологических исследованиях грибов с применением методов анализа ДНК обусловлен тем, что они играют ключевую роль в биосинтезе белков и представлены в геноме большим количеством копий. В то время как гены рРНК филогенетически консервативны, размер и структура спейсеров и межгенных интервалов характеризуется четко выраженной видовой специфичностью. Участок ITS1-5,8S-ITS2 по данным NCBI — National Center for Biotechnology Information (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) — успешно использовался для изучения филогенетических связей в различных таксонах эктомикоризообразующих базидиальных грибов.

Размеры амплифицированных участков (п.н.) ITS1-5,8S-ITS2 и IGS1 для образцов каждого вида и длины фрагментов, получающихся после воздействия на них рестриктазы, приведены в таблице. Виды в ней расположены в порядке увеличения размера ITS1-5,8S-ITS2. Все многообразие изученных в работе образцов в соответствии с размерами полученных в результате амплификации и рестрикционного анализа фрагментов разделилось на девять групп, соответствующих приведенному списку видов (см. таблицу).

Размер изученных участков рДНК после амплификации и рестрикционного анализа

Виды <i>Leccinum</i>	ITS1-5,8S-ITS2	ITS1-5,8S-ITS2/Hinf I	IGS1	IGS1/Hinf I
<i>L. pseudoscabrum</i>	1100	640, 220	700	550, 150
<i>L. schistophilum</i>	1160	470, 410, 150, 130	980	320, 290, 175
<i>L. rotundifoliae</i>	1250	480, 440, 170	990	730, 200
<i>L. scabrum</i>	1350	580, 440, 170	1000	340, 200
<i>L. vulpinum</i>	1470	710, 460	1100	520, 340, 170
<i>L. holopus</i>	1580	900, 470	1050	900, 170
<i>L. variicolor</i>	1650	980, 460	1200	440, 310, 170
<i>L. versipelle</i>	1700	910, 460	1030	900, 170
<i>L. aurantiacum</i>	1700	980, 460	1030	900, 170

Обращает на себя внимание размер ITS1-5,8S-ITS2 рДНК, который у видов рода *Leccinum* достигает 1100–1700 п.н. По данным базы NCBI у других таксонов базидиальных грибов, в том числе и у представителей близкородственных родов, размер этого участка составляет 600–950 п.н. Предварительный анализ секвенированных образцов из числа изученных в работе показывает наличие в области ITS1 коротких (8 п.н.) нерегулярных повторов, что и приводит к увеличению молекулярной массы.

Возможно, что данные о секвенированных последовательностях видов рода *Leccinum* можно будет использовать не только для построения филогенетических дендрограмм, но, после соответствующей проверки, и для изучения популяционной структуры видов в конкретных лесных сообществах.

Размеры амплифицированных участков ITS1-5,8S-ITS2 и IGS1 рДНК, а также наборы фрагментов, образующихся после проведения рестрикционного анализа, могут быть использованы как дополнительные количественные признаки для подтверждения определения видов рода *Leccinum* по морфологическим, микроскопическим и экологическим признакам. Участок IGS1 рДНК для видов рода *Leccinum* изучался впервые.

Плодовые тела грибов с морфологическими аномалиями гимениального слоя и превышением содержания ^{137}Cs в плодовых телах соответствуют виду *L. holopus* — Подберезовик болотный.

Перед нами пример индуцированного видимого повреждения репродуктивной части плодового тела в результате селективного концентрирования ^{137}Cs . Но в данном случае мы не просто наблюдаем радиационное воздействие на отдельное плодовое тело. Перед нами результат воздействия ионизирующего излучения на уровне биоценоза, поскольку плодовые тела формируются протяженным вегетативным мицелием, пронизывающим верхние органоминеральные горизонты почвы на глубину проникновения корней эктомикоризных древесных пород.

Для ответа на вопрос о том, только ли ^{137}Cs индуцирует морфологические изменения гимениального слоя, намечены дополнительные исследования по определению содержания металлов в плодовых телах грибов изучаемого рода.

Для названия организма, способного изменять визуально наблюдаемые морфологические признаки в ответ на накопление загрязняющих веществ, предложен термин биомонитор [8]. До обнаружения морфологически измененных плодовых тел Подберезовика болотного ранее среди высших базидиальных грибов биомониторы были неизвестны и использование морфологических признаков грибов для биомониторинга различного рода загрязнений не проводилось. Таким образом, мнение о том, что по внешнему виду грибов загрязнение установить невозможно, следует пересмотреть и рекомендовать специалистам, изучающим различные таксоны грибов, проводить морфологические сравнения плодовых тел на загрязненных и незагрязненных территориях.

Это расширяет сферу применения грибов в биоиндикации, ограниченную химическим анализом содержания тяжелых металлов и радионуклидов в плодовых телах. В работе [1] изложены предложения по включению Подберезовика болотного в состав референтной фауны и флоры для оценки влияния загрязнения лесных и болотных сообществ ^{137}Cs .

Основным источником облучения на территориях, подвергшихся загрязнению чернобыльского происхождения, является ^{137}Cs . В среднем в грибах концентрация ^{137}Cs более чем в 20 раз выше, чем в максимально загрязненном слое лесной подстилки. Установлено, что грибы поглощают ^{137}Cs в 10 раз больше, чем изотопы $^{238-240}\text{Pu}$ и в 1000 раз больше, чем ^{90}Sr [9].

По прогнозам, сделанным на основе короткого периода полураспада ^{137}Cs ($T_{1/2} = 33$ годам), за время, прошедшее после аварийного выброса, активность радионуклидов, выпавших в Ленинградской области, должна уменьшиться более чем на 20%, а площадь загрязненных территорий сократиться на 20–30%. Однако наряду с этим ^{137}Cs активно включается в биогенный круговорот.

При поглощении ^{137}Cs вегетативным мицелием может происходить его передача древесным растениям через эктомикоризные окончания. После накопления в плодовых телах дальнейший перенос ^{137}Cs происходит по трофической цепочке к насекомым, развивающимся на грибах, мелким лесным млекопитающим, поедающим грибы, и к человеку, если речь идет о дикорастущих съедобных грибах.

Со времени прохождения чернобыльского следа загрязнение проникает вниз по почвенному профилю. Аккумулировать ^{137}Cs начинают виды грибов, мицелий которых расположен достаточно глубоко. Из грибов, образующих эктотрофную микоризу, в иллювиальный и нижележащие горизонты почвы проникает мицелий представителей родов *Amanita*, *Boletus*, *Gomphidius*, *Leccinum*, *Suillus* и *Paxillus* [10, 11]. Поэтому интерес может представлять путь повторного выноса на поверхность ^{137}Cs , который поглощается глубоко расположенным мицелием, аккумулируется в плодовых телах и возвращается в верхние горизонты почвы после их отмирания.

Преимуществом найденного биомонитора является то, что Подберезовик болотный имеет обширное географическое распространение и широко известен среди населения. Макроскопические признаки представителей рода *Leccinum*, к которому относятся подосиновики и подберезовики, известны каждому любителю сбора грибов — полушаровидная шляпка, окрашенная в различные оттенки от белого до черного у представителей субсекции *Scabra* и от желтого до красного в субсекции *Leccinum*. Центральная цилиндрическая ножка, покрытая чешуйками, является одним из главных признаков рода *Leccinum*.

По размеру изучаемых фрагментов было установлено, что некоторые плодовые тела из березово-еловых лесных сообществ по морфологическим и микроскопическим признакам предварительно отнесенные к *L. scabrum*, являются *L. holopus*. Таким образом, местообитания *L. holopus* не только сырые березовые леса и болота с березой, что следует из его названия — Подберезовик болотный, — но и свежие по увлажнению березово-еловые леса с почвами различного механического состава. Одним из определяющих факторов здесь является величина рН. В сфагновых верховых болотах значение рН достигает 4,5. Известно, что за счет корневых выделений ель подкисляет почву, на которой растет. Значения рН в тех почвенных горизонтах, где сосредоточена основная масса эктомикоризных окончаний в разных типах еловых лесов, может колебаться от 4,0 до 5,5 [12, 13]. Это существенно расширяет местообитание обнаруженного вида-биомонитора.

Заключение

Для видов грибов рода *Leccinum* восточноевропейской части России проведена оценка молекулярных масс фрагментов области внутренних транскрибируемых спейсеров и гена 5,8S, причем для межгенного интервала рибосомальной ДНК IGS1 такие данные получены впервые.

На основе анализа фрагментов рДНК впервые установлено, что подберезовики с аномалиями морфологических признаков и превышением суммарной бета-активности в плодовых телах вследствие накопления ^{137}Cs относятся к виду *Leccinum holopus* — Подберезовик болотный. Впервые среди высших базидиальных грибов обнаружен биомонитор, изменяющий морфологические признаки при накоплении ^{137}Cs в плодовых телах.

Полученные результаты могут быть использованы для изучения длительного воздействия небольших доз облучения на биоту лесных и болотных экосистем.

Литература

1. 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.-Петерб. ун-та. Сер. 3: Биология. 2012. Вып. 2. С. 55–61.
2. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов // Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.3.2.1078-01. Утв. главным государственным санитарным врачом РФ 6 ноября 2001 г., с изменениями от 31 мая 2002 г., 20 августа 2002 г., 15 апреля 2003 г.
3. Иванов Д. М. Поиск гиагуса между видами *Leccinum holopus* и *Leccinum variicolor* // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. 2010. № 1. С. 37.
4. 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.
5. Gardes M., Bruns T. D. ITS-RFLP matching for the identification of fungi // Species diagnostic protocols: PCR and other nucleic acid methods / ed. by J. P. Clapp. Totowa: Humana press inc., 1996. P. 177–186 (Methods in molecular biology. Vol. 50).
6. 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.
7. Иванов Д. М. Верификация метода рестрикционного анализа рДНК для изучения геномного полиморфизма представителей порядка Boletales // Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 3: Биология. 2008. Вып. 4. С. 112–120.
8. Черненкова Т. В. Реакция лесной растительности на промышленное загрязнение. М.: Наука, 2002. 191 с.
9. Щеглов А. И., Цветнова О. Б. Грибы — биоиндикаторы техногенного загрязнения // Природа. 2002. № 11. С. 39–46.
10. Шубин В. И. Экологические ниши и сукцессии макромицетов-симбиотрофов в лесных экосистемах таежной зоны. I. Экологические ниши // Микол. и фитопатол. 1998. Т. 32, вып. 6. С. 32–37.
11. Иванов Д. М. Микобиоты эктомикоризных окончаний *Picea abies* (L.) Karst. в ельнике черничном (Ленинградская область) // Микол. и фитопатол. 2005. Т. 39, вып. 3. С. 41–47.
12. Рысин Л. П., Савельева Л. И. Еловые леса России. М.: Наука, 2002. 335 с.
13. Лукина Н. В., Полянская Л. М., Орлова М. А. Питательный режим почв северотаежных лесов. М.: Наука, 2008. 342 с.

Статья поступила в редакцию 13 сентября 2012 г.