

На правах рукописи

Морозова Мария Игоревна

ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕДКИХ ВИДОВ
КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ И ПУТИ ИХ СОХРАНЕНИЯ
В ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

03.02.08 – экология (биологические науки)

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Пензенская государственная сельскохозяйственная академия»

Научный руководитель: Ильина Галина Викторовна
доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты: Переведенцева Лидия Григорьевна
доктор биологических наук,
профессор кафедры ботаники и
генетики растений Пермского
государственного
национального исследовательского
университета

Новикова Любовь Александровна,
доктор биологических наук, главный
научный сотрудник кафедры ботаники,
физиологии и биохимии растений
ФГБОУ ВПО «Пензенский
государственный университет»

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева»

Защита состоится «15» ноября 2013 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.13 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83, E-mail: biosovet@sgu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им. В.А. Артисевич ГОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Автореферат разослан « » _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



С.А. Невский

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Одной из важнейших проблем сохранения биологического разнообразия является эффективная организация охраны редких видов. Если принципы охраны высших сосудистых растений в основном определены, то для грибов, которые имеют присущие только им особенности размножения и расселения, проблемы сохранения отдельных популяций и генофонда в целом, изучены слабо. В практике природоохранных мероприятий важно использовать комплекс молекулярных, морфологических, географических и экологических данных. Это в полной мере относится к макромицетам, в том числе, ксилотрофным базидиомицетам. Названная группа грибов является специфическим компонентом лесных экосистем, составляющим основу механизма регуляции процессов накопления и разложения растительных остатков. Среди ксилотрофных базидиомицетов особое положение занимают редкие виды с узкой трофической специализацией, поскольку сокращение площадей, занятых древесными растениями, с которыми связаны редкие виды (сапротрофы или паразиты) ставит под угрозу и популяции этих грибов. Поэтому важнейшими звеньями в их охране является выявление популяций редких видов в различных регионах, а также разработка оптимальных путей их сохранения в условиях культуры. Кроме того, организация системного мониторинга состояния популяций редких видов и установление комплекса факторов, лимитирующих их развитие, позволят определить новые пути сохранения биоразнообразия биоты ксилотрофных базидиомицетов.

Цели и задачи исследований. Цель настоящей работы – установление экологических особенностей и возможностей сохранения редких видов ксилотрофных базидиомицетов в условиях Пензенской области. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- изучить историю находок, современное распространение и состояние популяций редких видов ксилотрофных базидиомицетов на территории Пензенской области;
- выявить влияние отдельных микроклиматических факторов (температуры, атмосферной влажности и уровня осадков) на плодоношение редких видов ксилотрофных базидиомицетов;
- оценить особенности развития (онтогенез, морфогенез) грибов в культуре, разработать приемы их культивирования, обеспечивающие контроль этапов развития и максимальную сохранность мицелиальных культур редких и занесенных в Красные Книги РФ (2008) и Пензенской области (2002) видов ксилотрофных базидиомицетов;

- исследовать возможности получения стадии телеоморфы и спор полового спороношения в лабораторных условиях с последующей реинтродукцией мицелия изученных видов в естественные местообитания.

Научная новизна. Впервые проведена ревизия и обобщение сведений о характере, закономерностях распространения и определено современное состояние популяций редких видов ксилотрофных базидиомицетов в Пензенской области. Предложены оригинальные методики комплексной оценки физиологических параметров мицелиальных культур. Впервые показана связь стрессовой реакции мицелия со стимуляцией образования анаморфных структур и плодообразованием в чистой культуре. Показана целесообразность использования для оптимизации хранения мицелиальных культур соединения германия. Впервые на территории Пензенской области обнаружен вид *Sparassis nemecii* Pilát & Veselý. Разработаны приемы реинтродукции *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. в естественные местообитания.

Практическая значимость. Разработаны методики оценки оксидантного статуса хранящихся в коллекции мицелиальных культур. Предложены приемы, позволяющие оптимизировать хранение культур редких видов. Полученные данные использованы при подготовке второго издания Красной Книги Пензенской области (Том 1, раздел «Грибы»), используются в преподавании курсов «Экология», «Основы экологии», спецкурсов в ФГБОУ ВПО «Пензенская ГСХА».

Положения, выносимые на защиту:

1. Возникшие в результате антропогенной нагрузки необратимые изменения в экосистемах, характерных для редких видов грибов: *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray, *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr., *Sparassis crispa* (Wulfen) Fr., *Lenzites warnieri* Durieu & Mont., негативно сказываются на состоянии их популяций.
2. Действие окислительного и температурного стрессов стимулирует формирование на мицелии анаморф (артро- и бластоспоры), которые дают начало мицелию, склонному к формированию телеоморфы (базидиом). Это дает основания предполагать наличие связи между воздействием факторов ненаправленного действия (засухи, пирогенного фактора и др.) и процессами плодообразования у редких видов ксилотрофных базидиомицетов в естественных условиях.
3. Низкомолекулярные экзогенные факторы (соединения селена, германия, металлов переходной валентности), способны нивелировать и индуцировать окислительный стресс и могут быть использованы в практике хранения мицелиальных культур и стимуляции плодообразования *in vitro*.

Работа выполнена в лаборатории биохимии при кафедре биологии животных и ветеринарии Пензенской государственной сельскохозяйственной

академии при поддержке гранта РФФИ 12-04-97078-р_поволжье_a № 12-04-97078.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены и обсуждены на конференциях: «Инновационные идеи молодых исследователей для АПК России» (Пенза, 2009); «Мониторинг экологически опасных промышленных объектов и природных экосистем» (Пенза, 2011); Международной научно-практической конференции, посвященной 60-летию ФГБОУ ВПО «Пензенская ГСХА» «Образование, наука, практика: инновационный аспект» (Пенза, 2011); 3-ем съезде микологов России (Москва, 2012); Международной конференции «Мониторинг экологически опасных промышленных объектов и природных экосистем» (Пенза, 2012).

Публикации. Автором опубликовано 11 научных работ, включая 3 статьи в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ.

Личный вклад соискателя. Автором спланированы и осуществлены полевые наблюдения и лабораторные эксперименты, положенные в основу настоящей работы, подобраны оптимальные методики, интерпретированы полученные результаты. В совместных публикациях личный вклад автора составил от 30 до 70%.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка использованных литературных источников. Работа изложена на 132 страницах машинописного текста, основная часть содержит 12 таблиц, 6 диаграмм, 32 рисунка, в том числе карты и фотоиллюстрации. Список литературы включает 146 источников отечественных и зарубежных авторов.

Глава 1. ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИИ, ЭКОСИСТЕМНЫЕ ФУНКЦИИ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИЗУЧЕННЫХ ВИДОВ (обзор литературы)

В главе приводится информация о функциональной роли ксилотрофных базидиомицетов в экосистемах (Мухин, 1993; Стороженко, 2002; Арефьев, 2010). Рассматриваются аспекты биологии и практической значимости видов, имеющих статус редких на территории Пензенской области (Иванов, 1992; Гарибова, 2011). Указывается, что некоторые из них нашли применение в биотехнологии как продуценты иммуномодулирующих, геронтопротекторных и других ценных веществ (Smith et al, 2002). Обосновывается причина выбора объектов исследования при реализации лабораторной части работы. Приводится обзор приемов сохранения генофонда микроорганизмов в условиях культуры и сохранения биоразнообразия в целом (Мацкевич, 1989; Иванов и др., 2002; Гарибова и др., 2012).

Глава 2. МАТЕРИАЛ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования, положенные в основу настоящей работы, проводились в течение 2009-2013 г. на территории Пензенской области. Объектами исследования послужили популяции редких для Пензенской области видов ксилотрофных базидиомицетов. Определение статуса «редкий вид» принято по Красной книге РФ (2008) и Красной книге Пензенской области (2002). Использовались маршрутные и стационарные методы полевых исследований, которыми были охвачены основные лесные массивы Пензенской области. За период исследований собрано 370 плодовых тел грибов, среди которых в качестве редких находок присутствовали базидиомы редких видов. Выделено 96 штаммов ксилотрофных базидиомицетов, среди которых 23 штамма видов, относящихся к категории редких. Систематическое положение видов определялось по системе, приведенной на сайте Index Fungorum (CABI Databases, 2010). Выделение, оценка ростовых показателей и хранение чистых культур для лабораторных исследований проводилось по общепринятым методикам (Бухало, 1988). Оксидазную и пероксидазную активность мицелия определяли спектрофотометрически (Александрова, 1999; Барыкина, 2000; Стрельцов, 2009; Gramss, 1997). Для определения концентрации маркера окислительного стресса – малонового диальдегида (МДА) в мицелии использовали метод Michara et al. (1980). Дегидрогеназную активность мицелия оценивали при помощи гистохимической реакции с нитросиним тетразолием (Пирс, 1962; Барыкина и др., 2000). Качественную реакцию на наличие липидных перекисей проводили с использованием 2,7-диаминофлуорена (Фейгль, 1954). Статистическая обработка проводилась с помощью компьютерной программы для обработки и анализа данных «Statistica 6.0».

Глава 3. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ РЕДКИХ ВИДОВ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ НА ТЕРРИТОРИИ ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

Распространение редких видов ксилотрофных базидиомицетов в Пензенской области носит очаговый характер и связано со специфическими комплексами факторов, формирующимися в их местообитаниях (состав и состояние фитоценоза, возраст, физиологическое состояние и степень разложения характерного древесного субстрата).

Распространение *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. связано со старовозрастной дубравой в пойме р. Суры (Пензенский район) и липодубравой волосистоосоковой в пойме р. Хопра (Сердобский район) (рис. 1). Вид – моновалентный факультативный сапротроф, связанный с дубом

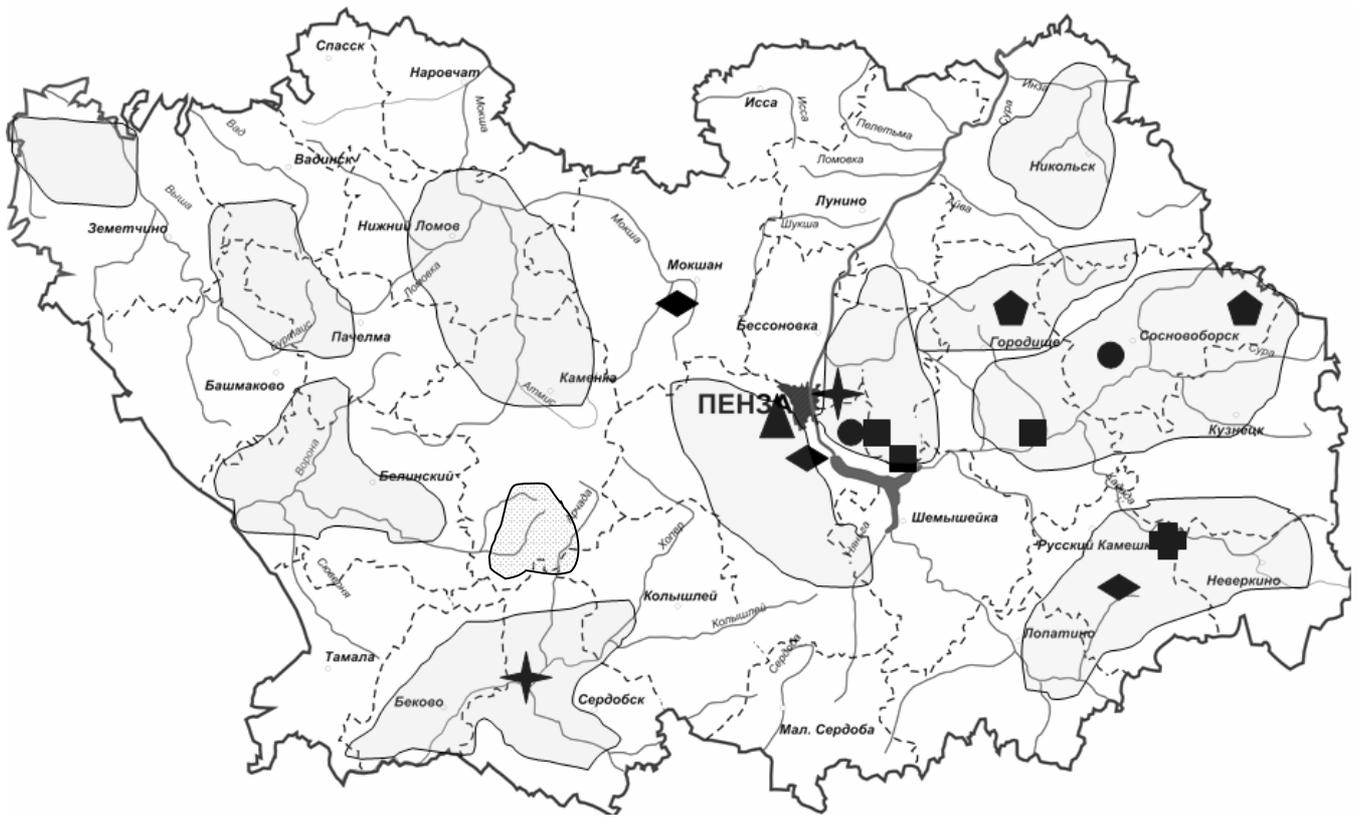
черешчатым (*Quercus robur*). Появление базидиом отмечено в 2000, 2010 и 2011 гг. на дубовых пнях со степенью разложения III по шкале П.В. Гордиенко (1979), время плодоношения – август-сентябрь. Распространение вида лимитирует вырубка и сокращение площадей старовозрастных дубрав.

Распространение в области вида *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray также связано с перестойными дубравами. Вид – корневой паразит, отмечен в дубраве паркового типа с разнотравно-злаковым травяным покровом и отсутствующим подлеском в черте г. Пензы (см. рис. 1). Здесь сохранились растения дуба в возрасте 180–220 лет с диаметром ствола 150–170 см. Поскольку на территории области отмечается тенденция к сокращению площадей, занятых старовозрастными дубравами, под угрозу ставятся и популяции *G. frondosa*, приуроченного в условиях рассматриваемого региона к старым деревьям дуба. Согласно нашим данным, *G. frondosa* в условиях области следует рассматривать как исчезающий и требующий специальных мер охраны.

На территории области известно два местообитания *Lenzites warnieri* Durieu & Mont.: в Пензенском и Сосновоборском районах, в пойменных ильмодубняках снытево-осоковых по долине р. Суры. Плодоношение ежегодно в июле-сентябре. Вид – моновалентный факультативный сапротроф, приуроченный к усыхающим и валежным растениям вяза шершавого (*Ulmus glabra*). В связи с массовой гибелью от голландской болезни экземпляров старых вязов, *L. warnieri* выпадает из лесных сообществ.

Отмечены три местообитания *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr.: в Пензенском и Городищенском районах (окр. ст. Шнаево), в дубравах с примесью мелколиственных пород, в лесах, сформированных на старых вырубках в пойме р. Суры. Вид – поливалентный корневой паразит старых растений дуба черешчатого (*Q. robur*), березы повислой (*Betula pendula*), ивы белой (*Salix alba*), вызывающий малоактивную гниль. Базидиомы появляются во второй половине августа – начале сентября, раз в 4–5 лет. Лимитирующими факторами является вырубка старых лесов.

В Никольском и Кузнецком районах обнаружены местообитания вида *Sparassis crispa* (Wulfen) Fr. в сосняках разнотравно-злаковых в возрасте 70 лет (подстилка, травяной покров на момент проведения описания в 2010 г. были выжжены низовыми пожарами). Гриб – моновалентный облигатный паразит корней старовозрастных растений сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*), вызывающий бурую гниль. Базидиомы формируются в августе-сентябре, всегда единичны. Плодоношение зависит от комплекса ненаправленных факторов и происходит спорадично.



Ganoderma lucidum ✦



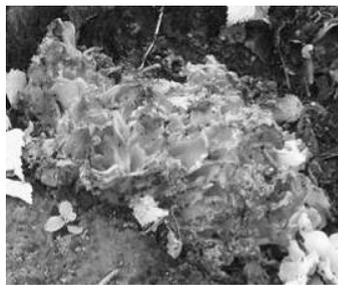
Grifola frondosa ▲



Polyporus umbellatus ■



Sparassis crispa ◆



Sparassis nemecii ⊕



Polyporus rhizophilus ◆



Lenzites warnieri ●

Рис. 1. Места находок базидиом редких видов ксилотрофных базидиомицетов на территории Пензенской области (серым цветом показаны районы маршрутных исследований; значками указаны виды грибов)

Близкий к *S. crispa* вид – *Sparassis nemecii* Pilát & Veselý впервые обнаружен нами в Пензенской области в 2010 г. Это корневой паразит лиственных пород; два плодовых тела найдены на растениях тополя дрожащего (*Populus tremula*) в Камешкирском районе Пензенской области на территории ГПЗ «Приволжская лесостепь» на участке осинника разнотравно-злакового. Находки малочисленны и не позволяют судить о закономерностях распространения и экологии данного вида на территории Пензенской области.

В Пензенском, Мокшанском и Камешкирском районах отмечены местообитания *Polyporus rhizophilus* Pat. (Ильин и др., 2012). Это паразит ковыля волосатика (тырсы, *Stipa capillata*), растущий в основании дерновин и вызывающий стерильность растений. Появление базидиом отмечается с июля до сентября, раз в 4–5 лет. Лимитирующий распространение фактор – распашка степей. Вид сохраняется в ГПЗ «Приволжская лесостепь» – участок «Кунчеровская степь», в ботаническом заказнике «Степь Большой Ендовы» и памятнике природы «Ольшанские склоны».

Нами проведен анализ многолетней динамики в действии основных микроклиматических факторов, результаты которого сопоставлены с периодами, когда отмечалось плодоношение редких видов грибов (рис. 2).

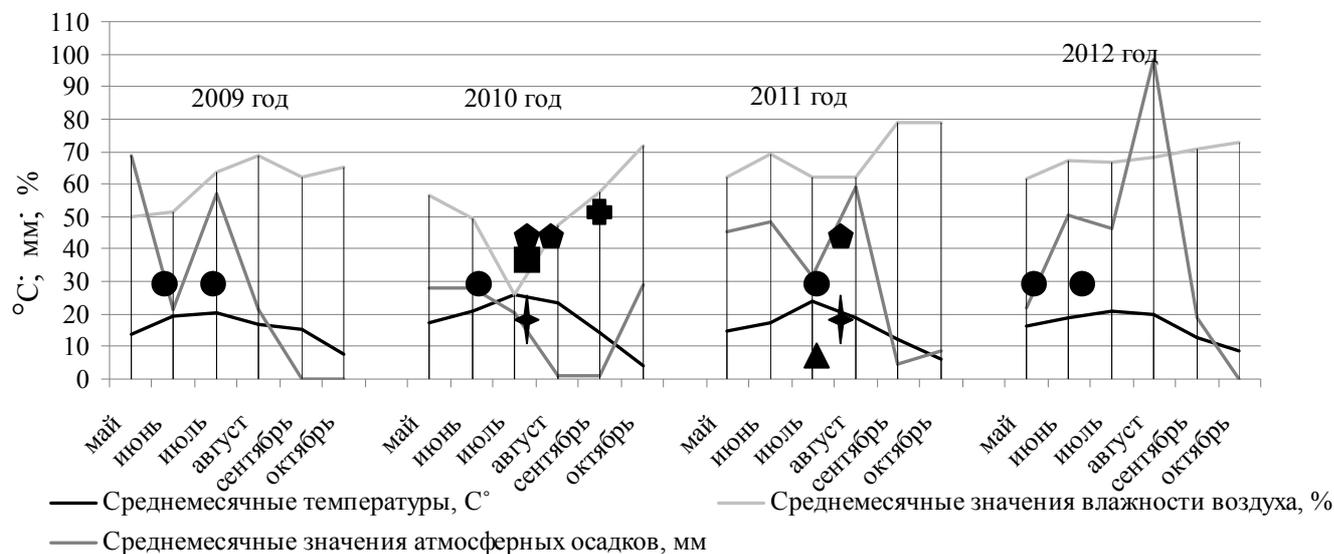


Рис. 2. Динамика действия климатических факторов и факты обнаружения базидиом некоторыми видами ксилотрофных базидиомицетов на территории Пензенской области за период 2009-2012 гг. Значками показаны находки базидиом: ✦ - *G. lucidum*, ▲ - *G. frondosa*, ■ - *P. umbellatus*, ◆ - *S. crispa*, ● - *L. warnieri*, ■ - *S. nemecii*

Таким образом, процесс плодоношения был стимулирован влиянием аномально высоких температур воздуха и пирогенным эффектом (на территории большинства местообитаний в 2010 г. происходили обширные низовые пожары). Следовательно, плодоношение связано с действием микроклиматических факторов, сочетания которых можно рассматривать как стрессогенные.

Глава 4. РЕДКИЕ И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ ВИДЫ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ В УСЛОВИЯХ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

Объектами лабораторных исследований стали штаммы редких видов ксилотрофных базидиомицетов – перспективных объектов биотехнологии: *Ganoderma lucidum* (штаммы GI+, GD-10, GM-11), *Sparassis crispa* (штаммы SC-10, АИ-10, АИ-11), *Grifola frondosa* (штамм Grf-11). Изучены культурально-морфологические и продуктивные свойства штаммов, в результате чего были установлены их отличительные особенности (табл. 1).

Таблица 1

Ростовые и продуктивные свойства изученных культур
(сусло-агар, 22°C, 10 суток, p<0,05, повторность трехкратная)

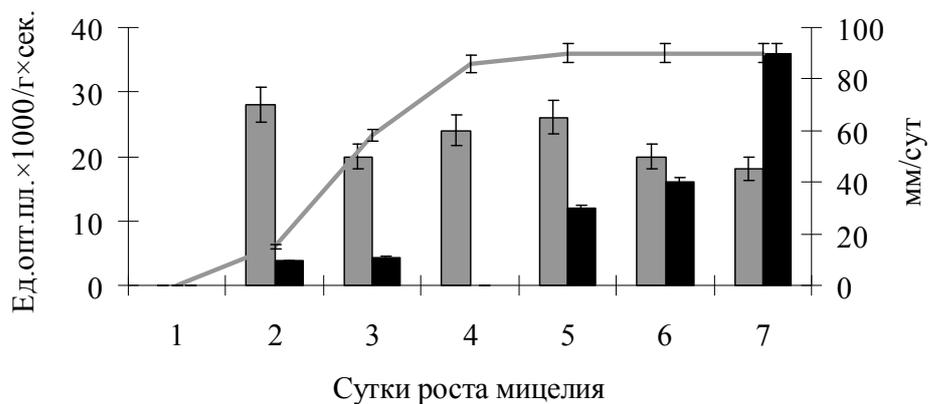
Вид	Штамм	Показатели				
		скорость роста, мм/сут	биомасса мицелия, г/л	качественная реакция на фермент*		
				тирози-наза	лакказа	перокси-даза
<i>G. lucidum</i>	GI+	9,10±0,11	4,9±0,15	+	+	+
	GD-10	8,7±0,07	3,9±0,07	+	+	+
	GM-11	7,5±0,3	1,8±0,10	+	+	+
<i>S. crispa</i>	SC-10	0,56±0,02	1,1±0,01	+	–	+
	АИ-10	0,87±0,03	1,8±0,09	–	–	+
	АИ-11	0,65±0,07	1,5±0,03	–	–	+
<i>G. frondosa</i>	Grf-11	1,35±0,05	3,7±0,12	+	+	+

*Результат качественной реакции («+»– активность фермента обнаруживается, «–»– активность не обнаруживается)

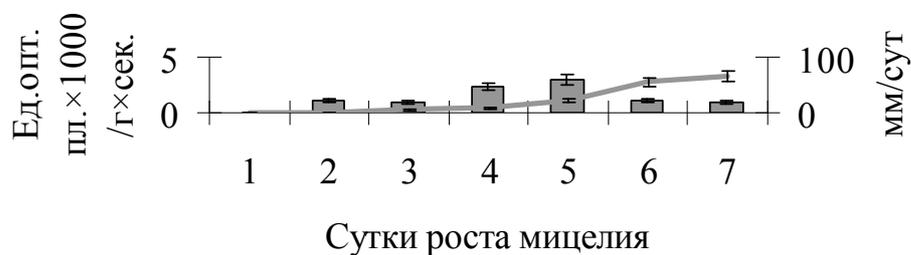
Качественная оценка ферментативных свойств позволила установить наличие у одного из штаммов *S. crispa* слабой тирозиназной, у других штаммов этого вида – пероксидазной активности, а у изученных штаммов *G. lucidum* и *G. frondosa* – тирозиназной, пероксидазной и лакказной активности.

Высокие скорости роста штаммов *G. lucidum* определяются короткой фазой адаптации, что объясняется, по-видимому, богатым спектром конститутивных ферментов (рис. 3 а). Причина более низких значений средней

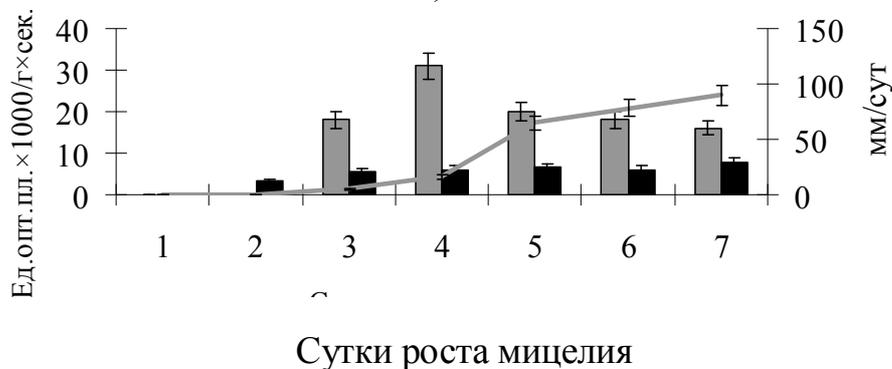
скорости роста штаммов двух других видов (*S. crispa* и *G. frondosa*) заключается в длительном периоде адаптации мицелия (см. рис. 3 б, в).



а)



б)



в)

- Скорость роста мицелия, мм/сут
- Пероксидазная активность, ед.опт.пл.×1000/г×сек.
- Лакказная активность, ед.опт.пл.×1000/г×сек.

Рис. 3. Динамика роста и ферментативной активности мицелия изученных видов на сусло-агаре, диаметр чашки Петри 90 мм ($p < 0,05$, повторность трехкратная): а) *G. lucidum*, штамм Gl+; б) *S. crispa*, штамм AI-10; в) *G. frondosa*, штамм Grf-11

Пики ферментативной активности у разных видов служат иллюстрациями этапов развития мицелия (см. рис. 3). Нарастание лакказной активности у *G. lucidum* может свидетельствовать о переходе культуры к стадии телеоморфы. Для всех видов по окончании фазы адаптации к субстрату характерны подъемы пероксидазной активности.

При изучении влияния стрессовых факторов на развитие мицелия в качестве индуктора окислительного стресса было использовано соединение металла переменной валентности ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$), которое вносили в питательную среду в количестве 0,2, 1,0 и 5,0 мМоль/л. В качестве маркера стресса использовали МДА, содержание которого в мицелии определяли фотометрически. Окислительный стресс показал снижение скорости роста мицелия, активности дегидрогеназ и накопление МДА (табл. 2).

Таблица 2

Реакция мицелия на присутствие в среде различных концентраций $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ в качестве индуктора окислительного стресса (сусло-агар, 22°C, 10 сут., $p < 0,05$, повторность трехкратная)

Оцениваемые показатели	Виды, штаммы						
	G. lucidum			S. crispa			G. frondosa
	Gl+	GD-10	GM-11	AI-10	SC-10	AI-11	Grf-11
Контроль							
Средняя скорость роста, мм/сут	9,10 ±0,11	8,7 ±0,07	7,5 ±0,3	0,87 ±0,03	0,56 ±0,02	0,65 ±0,07	0,65 ±0,07
Активность дегидрогеназ, баллы	5	5	5	4	3	5	5
Концентрация МДА, нмоль/г	77,1 ±0,11	68,2 ±0,11	75,5 ±0,11	48,5 ±0,11	32,3 ±0,11	33,1 ±0,11	67,4 ±0,11
0,2 мМоль/л							
Средняя скорость роста, мм/сут	11,3 ±0,07	8,2 ±0,30	8,1 ±0,27	0,33 ±0,77	0,29 ±0,01	0,42 ±0,01	0,77 ±0,01
Активность дегидрогеназ, баллы	5	5	5	4	3	5	5
Концентрация МДА, нмоль/г	104,5 ±2,14	111,2 ±3,31	122,8 ±3,42	69,5 ±2,17	77,0 ±1,03	63,9 ±3,33	100,1 ±2,73
1,0 мМоль/л							
Средняя скорость роста, мм/сут	3,2 ±0,03	2,1 ±0,01	4,4 ±0,11	0,13 ±0,01	0,0 ±0,0	0,02 ±0,01	0,39 ±0,01
Активность дегидрогеназ, баллы	2	1	1	1	1	0	1
Концентрация МДА, нмоль/г	167,1 ±4,54	163,1 ±3,28	177,8 ±3,31	124,7 ±2,63	нет	112,9 ±3,41	152,9 ±4,09
5,0 мМоль/л							
Средняя скорость роста, мм/сут	1,10 ±0,11	1,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,11 ±0,07
Активность дегидрогеназ	1	0	0	0	0	0	1
Концентрация МДА, нмоль/г	154,6 ±4,3	146,5 ±2,7	нет	нет	нет	нет	113,1 ±6,3

Другой, не менее показательной иллюстрацией стресса стало изменение пропорций насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в мицелии (рис. 4).

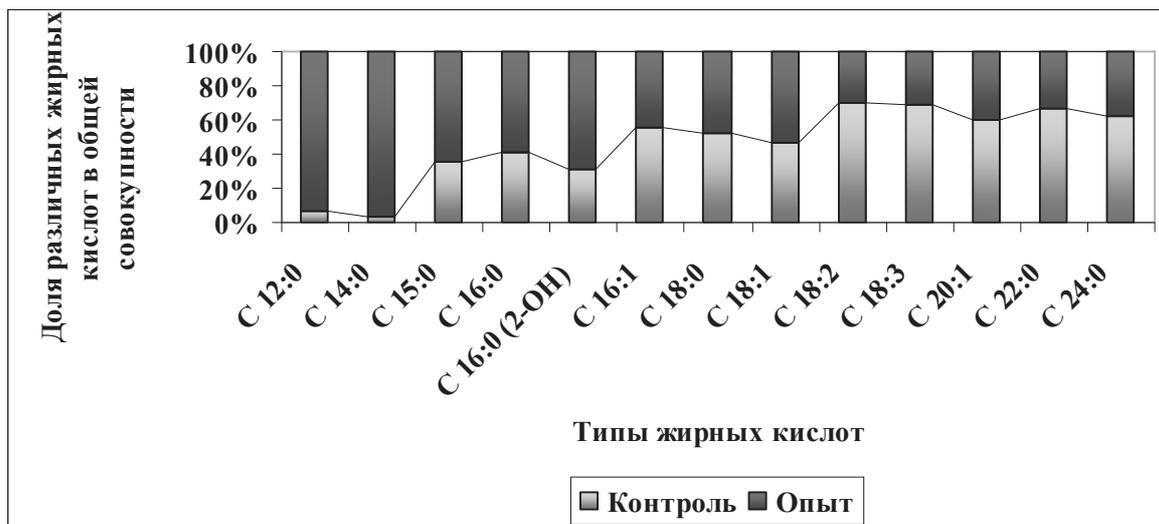


Рис. 4. Доли содержания различных типов жирных кислот в мицелии в контрольном варианте (на обычной питательной среде) и в опыте (концентрация $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ в среде 5,0 мМоль/л) у штамма GD-10 *G. lucidum*

Микроскопическое исследование мицелия, выросшего на средах с концентрацией вещества 1,0 мМоль/л, выявило стимуляцию образования анаморфных структур в форме бластоспор у *G. lucidum* и *S. crispa* (рис. 5).

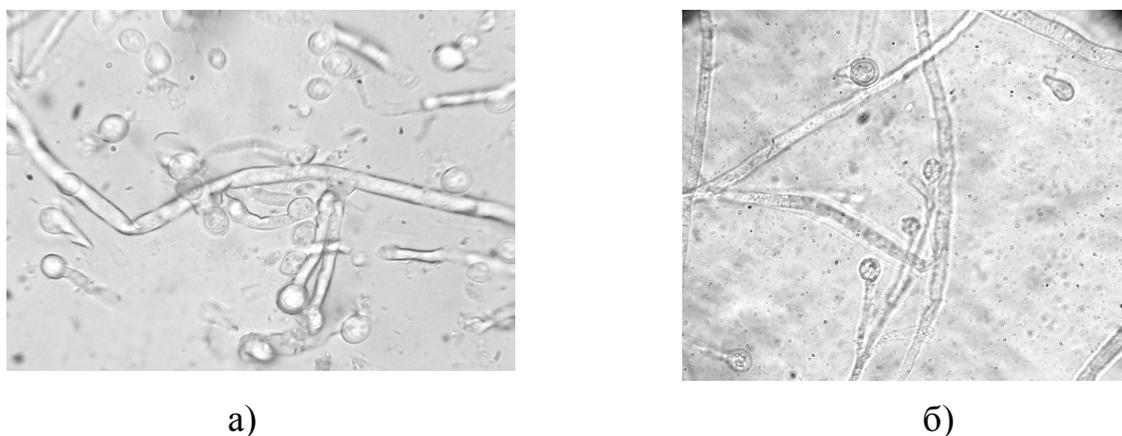


Рис. 5. Бластоконидии на мицелии изученных видов: а) *G. lucidum*, штамм GI+; б) *S. crispa*, штамм AI-10

В результате культивирования на средах с указанным содержанием нитрата никеля, анаморфы в форме хламидоспор отмечены на мицелии некоторых штаммов *S. crispa*, зафиксированы также артроспоры на мицелии *G. frondosa*. Таким образом, для большинства изученных культур показана связь между стрессовой реакцией мицелия и формированием анаморф.

Аналогичные закономерности выявлены при использовании в качестве индуктора стресса повышенных температур. При культивировании штаммов

при +32°C наблюдалось угнетение дегидрогеназной активности мицелия, изменение жирнокислотного состава в сторону увеличения доли насыщенных жирных кислот (табл. 3).

Таблица 3

Реакция мицелия разных видов на воздействие повышенной температуры культивирования (32°C, сусло-агар, 15 сут., $p < 0,05$, повторность трехкратная)

Оцениваемые показатели	Сутки развития						
	3	5	7	9	11	13	15
<i>G. lucidum</i> , GD-10							
Средняя скорость роста, % от контроля*	98,5	78,5	77,4	43,9	37,2	33,0	30,1
Активность дегидрогеназ, баллы	5	4	4	3	3	2	2
Концентрация МДА, % от контроля	122,8	147,3	109,5	99,4	67,4	53,3	51,1
Доля непредельных жирных кислот, % от контроля	102,1	82,0	55,3	49,3	39,1	29,0	31,8
<i>S. crispa</i> , SC-10							
Средняя скорость роста, % от контроля	76,4	60,3	47,1	33,3	30,6	27,1	9,4
Активность дегидрогеназ, баллы	4	3	2	1	1	1	1
Концентрация МДА, % от контроля	158,2	121,6	102,1	100,6	79,4	60,4	68,2
Доля непредельных жирных кислот, % от контроля	88,0	75,3	64,7	58,3	41,2	30,3	30,6
<i>G. frondosa</i> , Grf-11							
Средняя скорость роста, % от контроля	104,5	98,8	75,7	66,6	68,3	62,1	57,8
Активность дегидрогеназ, баллы	5	4	4	4	4	3	2
Концентрация МДА, % от контроля	149,3	157,2	109,6	88,3	79,9	55,0	53,2
Доля непредельных жирных кислот, % от контроля	102,1	94,7	99,1	57,2	55,3	55,9	54,2

* в контроле мицелий развивается при оптимальной температуре (22°C), активность дегидрогеназ на уровне 5 баллов.

Наиболее существенные результаты получены в эксперименте с экспонированием мицелиальных культур в условиях температурных градиентов. Перед экспериментом культуры сначала подращивались до стационарной фазы роста, после чего помещались в условия холодильника, где находились в течение 168 ч. При этом во всех случаях достоверно возрастала доля ненасыщенных жирных кислот в мицелии. Эта закономерность распространяется на все изученные культуры, однако наиболее контрастные значения получены для штамма GI+ вида *G. lucidum* (табл. 4).

Таблица 4

Изменения в жирнокислотном составе мицелия *G. lucidum*, GI+ под влиянием пониженных температур ($p < 0,05$, повторность трехкратная)

Жирная кислота, % от сухой массы	Условия экспозиции		
	22°C (контроль)	4°C в течение 12 ч	4°C в течение 24 ч
C 12:0	0,005	нет*	нет
C 14:0	0,012	0,005	0,002
C 15:0	0,014	0,007	нет
C 16:0	0,142	0,100	0,110
C 16:0 (2-ОН)	0,009	нет	нет
C 16:1	0,019	0,025	0,039
C 18:0	0,128	0,121	0,086
C 18:1	0,156	0,188	0,169
C 18:2	0,312	0,431	0,439
C 18:3	0,009	0,034	0,051
C 20:1	0,006	0,013	0,015
C 22:0	0,001	нет	нет
C 24:0	0,011	0,010	0,005

*Концентрация ниже обнаружения прибором

После хранения в холодильнике часть культур выдерживалась в условиях возрастания температуры среды до 32°C быстрыми темпами – по 5,0°C/ч (первый вариант опыта), вторая часть – в условиях медленного ступенчатого повышения температуры – по 0,25°C/ч (второй вариант опыта). Контролем служили культуры, развивающиеся при температуре 22°C. По истечении 72 ч максимальная интенсивность окислительного стресса выявлена в первом варианте опыта (рис. 6).

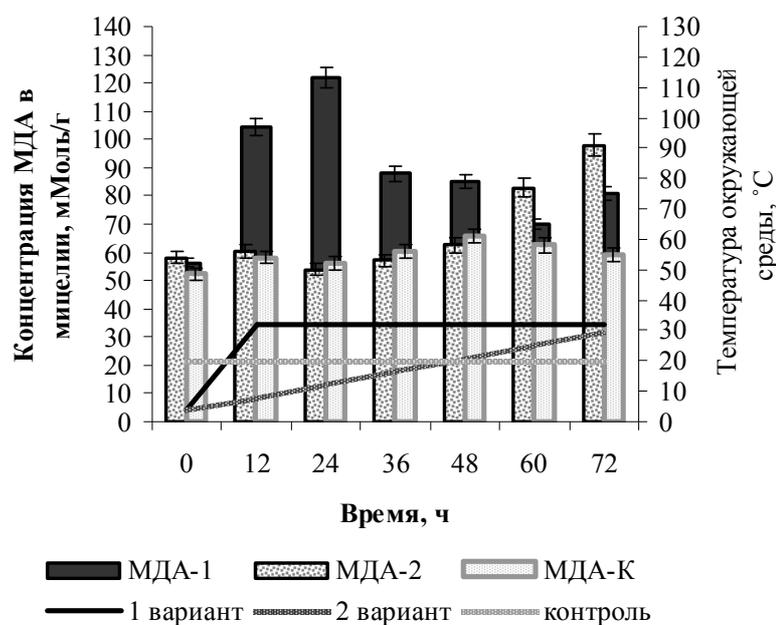


Рис. 6. Интенсивность окислительного стресса мицелия *G. frondosa* в зависимости от темпов роста температуры окружающей среды ($p < 0,05$, повторность трехкратная)

Таким образом, была установлена связь между темпами возрастания температуры и интенсивностью окислительного стресса культур.

Обнаруженная ранее стимуляция образования анаморфных структур на мицелии в ответ на стрессовое воздействие приобрела особое значение при изучении плодоношения в чистой культуре. Зафиксирован вторичный рост желтоватого мицелия (поросшего из бластоспор) поверх первичного у штаммов *G. lucidum*, рост плотного комковатого мицелия (из хламидоспор) сверху паутинистого у штаммов *S. crispa*, на основе которых формировались зачатки плодовых тел (рис. 7 а, б, в).



а)

б)

в)

Рис. 7. Рост вторичного мицелия и формирование примордиев на стерильной питательной среде после температурного стресса: а) *G. lucidum*, штамм GI+; б) *S. crispa*, штамм АИ-10 на стадии появления вторичного мицелия; в) *S. crispa*, штамм АИ-10 на стадии формирования примордиев

Такие структуры были получены только на мицелии, подвергнутом температурному стрессу. Стимуляция плодоношения наиболее отчетливо проявилась в вариантах опыта в условиях резкого повышения температуры окружающей среды. Таким образом, в лабораторных условиях доказана связь между окислительным стрессом мицелия и стимуляцией процессов плодообразования.

Глава 5. ПУТИ СОХРАНЕНИЯ РЕДКИХ ВИДОВ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Важным направлением лабораторных исследований стала разработка приемов, обеспечивающих длительную сохранность культур редких видов грибов. Апробированы в применении к культурам *G. lucidum*, *G. frondosa* и *S. crispa* установленные нами ранее возможности использования неорганического (селенат натрия) и органического (9-фенил-симметричный-октагидроселеноксантен) соединений селена (Ильина, 2011). Изучено использование в качестве стресс-ингибирующего фактора натриевой соли тιοгерманиевой кислоты. Вещества вносили в среду в концентрации 10^{-4} г/л в

пересчете на соответствующий элемент. Указанные соединения при включении в состав сред для хранения способствуют сохранению физиологических параметров хранящихся культур в течение 18–20 месяцев. Содержание МДА, как маркера окислительного стресса, в хранящемся мицелии штаммов всех трех изученных видов в опытных вариантах, достоверно ниже контрольных показателей. Такие результаты свидетельствуют о целесообразности использования соединений селена и германия в практике хранения мицелиальных культур редких видов грибов для нивелирования процессов окислительной деструкции.

Одним из направлений исследований, предваряющих эксперименты по реинтродукции видов в природные условия, стало изучение взаимодействия культур с контаминантной микрофлорой в лабораторных условиях. Искусственное заражение культур мезофильными быстрорастущими культурами плесневых грибов родов *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* и актиномицетов рода *Streptomyces* выявило неоднозначные уровни конкурентоспособности у различных видов и на разных стадиях развития. Общей чертой для культур всех изученных видов была относительно низкая конкурентоспособность на стадии адаптации к субстрату и довольно значительная устойчивость на стадии логарифмического и стационарного роста. В связи с этим, в ходе экспериментов по реинтродукции инокуляция мицелия проводилась на предварительно стерилизованные древесные субстраты в лаборатории, которые впоследствии переносились в естественные условия.

В результате лабораторных исследований развитые плодовые тела на твердых органических субстратах удалось получить только у вида *G. lucidum* (что, вероятно, объясняется его сапротрофной стратегией развития). В условиях лаборатории был реализован полный цикл развития организма («от базидиоспоры до базидиоспоры»), характерный для условий *in situ*. Эксперименты по реинтродукции в природных условиях проводились с использованием в качестве инокулюма глубинного мицелия, выращенного в лаборатории на средах, обогащенных источниками лигнина, поскольку целесообразность именно таких приемов была определена при получении базидиом на древесном субстрате в лабораторных условиях. Посевным материалом в мае 2011 г. были инокулированы сухостойные растительные остатки дуба черешчатого, находящиеся на одинаковой стадии разложения по шкале П.В. Гордиенко (1979). Эксперимент проводился на территории старовозрастной дубравы в окр. с. Анновка Пензенского района Пензенской области, в экотопе, где ранее отмечалось присутствие популяции данного вида.

На пяти площадках было заложено 15 инокулированных равновеликих сухостойных фрагментов, которые были углублены в лесную подстилку. В июле 2012 г. на двух из пяти участков обнаружены зачатки плодовых тел, а в августе – две развитые базидиомы на стадии спороношения (рис. 8 а,б).



а)



б)

Рис. 8. Базидиомы *G. lucidum*, полученные в 2012 г. на искусственно инокулированных древесных остатках: а) единичная базидиома; б) сросшиеся базидиомы

Лабораторное исследование подтвердило видовую принадлежность базидиом, базидиоспоры характеризовались фертильностью. Наблюдения, проведенные в августе 2013 г. вновь позволили выявить наступление плодоношения вида на одном из участков (рис. 9).



Рис. 9. Базидиомы *G. lucidum*, сформированные в августе 2013 г. на древесных остатках, локализованных в месте проведения мероприятий по реинтродукции в 2011 г.

Таким образом, зафиксирована результативная попытка реинтродукции вида *G. lucidum* в естественное местообитание. О формировании относительно стабильной популяции можно будет судить на основании многолетних наблюдений.

ВЫВОДЫ

1. Распространение редких видов ксилотрофных базидиомицетов (*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray, *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr., *Sparassis crispa* (Wulfen) Fr., *Lenzites warnieri* Durieu & Mont., *Sparassis nemecii* Pilát & Veselý, *Polyporus rhizophilus* Pat.) в Пензенской области имеет очаговый характер, и связано, в основном, с комплексами факторов, формирующимися в их местообитаниях (состав и состояние фитоценоза, возраст и степень разложения древесного субстрата).

2. Плодоношение редких видов ксилотрофных базидиомицетов в естественных условиях связано с действием микроклиматических факторов (температуры воздуха, атмосферной влажности и количества осадков), сочетания которых в определенных границах могут быть стрессовыми. Эти факторы и факторы ненаправленного действия (пирогенный эффект) также могут стимулировать наступление стадии телеоморфы у таких видов. Связь между температурным стрессом мицелия и стимуляцией процессов плодообразования показана в лабораторных условиях.

3. Динамика ферментативной активности мицелиальных культур изученных видов служит иллюстрацией этапов развития мицелия. Нарастание лакказной активности у *G. lucidum* может свидетельствовать о переходе культуры к стадии телеоморфы. Для всех видов по окончании фазы адаптации к субстрату характерны подъемы пероксидазной активности.

4. Использование 9-фенил-симметричного-октагидроселеноксантина, селената натрия, а также натриевой соли тиогерманиевой кислоты в качестве компонентов сред для хранения мицелиальных культур редких видов ксилотрофных базидиомицетов в концентрациях 10^{-4} г/л в пересчете на селен и германий, позволяет в течение 18–20 месяцев сохранять физиологические параметры культур благодаря нивелированию процессов окислительной деструкции.

5. Показаны возможности реинтродукции вида *Ganoderma lucidum*, характеризующегося сапротрофной стратегией развития в природные условия. Оптимальным приемом инокуляции природного субстрата является использование в качестве посевного материала глубинного мицелия, выращенного на средах, обогащенных источниками лигнина.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

* – Публикации в печатных изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ

Ильина Г.В., Морозова М.И. Получение мицелия и плодовых тел гриба *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst – продуцента ценных метаболитов // Сборник материалов научной конференции «Инновационные идеи молодых исследователей для агропромышленного комплекса России». Пенза, 2009. С. 278.

Морозова М.И. *Ganoderma lucidum*: мощный фармакологический гриб // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции Пензенской ГСХА «Инновационные идеи молодых исследователей для АПК России», Пенза, 2011. Том 1, С. 183–184.

Морозова М.И. Возможности использования физиолого-биохимического потенциала *Ganoderma lucidum* // Материалы международной научно-практической конференции «Молодежь и наука: модернизация и инновационное развитие страны» Пенза, 2011. С. 67–70.

Ильин Д.Ю., Иванов А.И., Морозова М.И., Ильина Г.В. Использование биохимических маркеров для определения окислительного стресса грибных культур // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Мониторинг экологически опасных промышленных объектов и природных экосистем».- Пенза, 2011. С. 107–109.

Морозова М.И., Ильина Г.В. Возможности использования физиолого-биохимического потенциала *Ganoderma lucidum* // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Образование, наука, практика: инновационный аспект», Пенза, ПГСХА, 2011. С. 24–27.

Морозова М.И., Ильина Г.В., Ильин Д.Ю. Возможности использования соединений селена при хранении культур ксилотрофных базидиомицетов // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Образование, наука, практика: инновационный аспект», Пенза, ПГСХА, 2011. С. 17–18.

*Ильин Д.Ю., Ильина Г.В., Морозова М.И. Возможности использования соединений селена при хранении коллекционных культур ксилотрофных базидиомицетов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2012. Том 12. Выпуск 1. С. 56–60.

*Ильин Д.Ю., Ильина Г.В., Морозова М.И., Лыков Ю.С. Ферментативная активность ксилотрофных базидиомицетов при твердофазном культивировании // Нива Поволжья, № 2(23), 2012. С. 26–31.

Ильина Г.В., Морозова М.И., Ильин Д.Ю., Гарибова Л.В. Редкие виды ксилотрофных базидиомицетов Пензенской области и проблема их сохранения // Сборник тезисов 3 съезда микологов России, Москва, 2012. С. 110.

Ильин Д.Ю., Ильина Г.В., Морозова М.И., Гегележа Г.В. Влияние различных соединений селена и германия на развитие культур ксилотрофных базидиомицетов // Сборник тезисов 3 съезда микологов России, Москва, 2012. С. 375–376.

*Ильина Г.В., Ильин Д.Ю., Морозова М.И., Иванов А.И., Гарибова Л.В. Проблемы сохранения видов ксилотрофных базидиомицетов, занесенных в Красную книгу Пензенской области // Нива Поволжья, № 4(25), 2012. С. 20–26.