

## БИОРАЗНООБРАЗИЕ, СИСТЕМАТИКА, ЭКОЛОГИЯ

УДК 582.28. + 582.272.74

© О. П. Коновалова,<sup>1</sup> Е. Н. Бубнова,<sup>1</sup> И. И. Сидорова<sup>2</sup>БИОЛОГИЯ *STIGMIDIUM ASCOPHYLLI* — ГРИБА-СИМБИОНТА ФУКУСОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ В КАНДАЛАКШСКОМ ЗАЛИВЕ БЕЛОГО МОРЕKONOVALOVA O. P., BUBNOVA E. N., SIDOROVA I. I. BIOLOGY OF *STIGMIDIUM ASCOPHYLLI* — FUNGAL SYMBIONT OF FUCOIDS IN KANDALAKSHA BAY, WHITE SEA<sup>1</sup>Беломорская биологическая станция им. Н. А. Перцова

Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Исследована биология *Stigmidium ascophylli* — гриба-симбионта фукусовых водорослей *Ascophyllum nodosum* и *Pelvetia canaliculata* в Белом море. Вследствие установления ледового покрова на Белом море в зимний период жизненный цикл популяций этого гриба сильно сокращен по сравнению с ранее исследованными популяциями в других морях. Формирование ассоциации *Stigmidium ascophylli*—*Pelvetia canaliculata* происходит другим способом, нежели с *Ascophyllum nodosum*, у которого происходит синхронизация размножения гриба-симбионта и водоросли. Впервые были обнаружены микобионты в талломах экологических форм — экад *Ascophyllum nodosum*. Несмотря на сходство расположения мицелия в тканях этих форм, выяснилось, что исходный микобионт *S. ascophylli* может быть замещен другими биотрофными видами грибов. Для подтверждения нынешнего таксономического положения *S. ascophylli* исследована морфология структур размножения гриба и его филогения. В жизненном цикле гриба-симбионта анаморфная стадия не была обнаружена.

Ключевые слова: симбиоз, *Stigmidium*, *Ascophyllum*, *Pelvetia*, бурые водоросли, экада, Белое море.

*Stigmidium ascophylli* is a symbiotic fungus which lives in brown algae *Ascophyllum nodosum* and *Pelvetia canaliculata*. We studied biology of this species in White Sea. Life cycle of *S. ascophylli* is much shorter in White Sea because of winter ice cover, then in other studied regions. Reproduction of *Stigmidium* and *Ascophyllum* is synchronized as was known, while establishment of *Stigmidium*—*Pelvetia* association takes place in other way. We first found mycelium of symbiotic fungus in thalli of vegetative ecological forms (ecads) of *Ascophyllum*. Morphologically mycelia in all forms of *Ascophyllum* are the same, but *Stigmidium* may be replaced by other species of biotrophic fungi in thalli of *Ascophyllum*'s vegetative ecads. We investigated morphology of pseudothecia and phylogeny for refinement of taxonomical position of *S. ascophylli*. Pycnidial stage wasn't detected in the life cycle of *S. ascophylli*.

Key words: symbiosis, *Stigmidium*, *Ascophyllum*, *Pelvetia*, brown algae, ecad, White Sea.

Известно, что грибы могут участвовать в образовании различных ассоциаций с живыми водорослями как патогены или симбионты, а также как сапротрофы на внеклеточных выделениях (Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1979). Из всего разнообразия ассоциаций морских водорослей с грибами одной из самых важных является облигатная симбиотическая связь. Примером такой ассоциации является сожительство эндофитного аскомицета *Stigmidium ascophylli* (Cotton) Artroot с доминантами литоралей северных морей — фукусовыми водорослями *Ascophyllum nodosum* (L.) LeJolis и *Pelvetia canaliculata* (L.) Dcne et Thur. Эта

ассоциация называется микофикобиозом, в котором водоросль — формообразующий элемент, а присутствие гриба предположительно позволяет ей выдерживать длительное осушение при отливе. Мицелий гриба пронизывает весь таллом хозяина, а его органы размножения развиваются на рецептакулах водоросли (Webber, 1967; Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1979; Garbary, Deckert, 2001). Считается, что *Stigmidium ascophylli* имеет анаморфную пикнидиальную стадию *Septoria ascophylli* Melnik et Petrov (Webber, 1967; Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1972). Пикниды на талломах *Ascophyllum nodosum* были обнаружены дважды



Рис. 1. Экологические формы (экады) *Ascophyllum nodosum*.

*a* — типичная скальная форма, *б* — *A. nodosum* ecad scorpioides, *в* — *A. nodosum* ecad muscoides. Масштаб — 5 см.

(Мельник, Петров, 1966; Webber, 1967), однако другими исследователями не отмечались (Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1972; Stanley, 1992; Garbary, Deckert, 2001).

Относительно ассоциации эндофитного гриба с *Pelvetia canaliculata* в литературе имеется крайне мало сведений. Ассоциация, образованная *Ascophyllum nodosum*, исследована несколько лучше (Webber, 1967; Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1972; Kingham, Evans, 1986; Garbary, Deckert, 2001), хотя детали взаимоотношения гриба с водорослью-хозяином из-за трудностей экспериментальной работы с симбиотическими организмами не изучены. Сведения относительно жизненного цикла гриба в литературе противоречивы, что может быть связано и с реальными различиями цикла у ассоциаций из разных географических областей. Сведения о жизненном цикле гриба в морях с зимним ледовым покровом, как в Белом море, в литературе отсутствуют.

Как и многие другие фукоиды, *A. nodosum* образует особые экологические формы — экады. В Белом море распространены бентоплейстонная форма — *A. nodosum* ecad scorpioides и маршевая — *A. nodosum* ecad muscoides (рис. 1). Экады существенно отличаются от типичной скальной формы по морфологии, экологии и способу размножения. На их талломах отсутствуют воздушные пузыри, они обитают на участках литорали и супралиторали со значительным опреснением и осушением, а размножаются исключительно вегетативным путем (Максимова, Мюге, 2007). О существовании ассоциаций экад *A. nodosum* со *Stigmidium ascophylli* ничего не известно.

Хотя сейчас считается, что в талломах *Pelvetia canaliculata* и *Ascophyllum nodosum* обитает один и тот же гриб, в действительности идентичность грибов из этих водорослей пока точно не установлена. Кроме того, литературные данные относительно таксономического положения *S. ascophylli* достаточно противоречивы. На основании морфологии псевдотециев его могут помещать в разные роды и семейства аскомицетов: *Mycosphaerella*, *Mycosphaerellaceae* — Cotton (1908) по: Webber (1967); *Mycophycias*, *Verrucariaceae* — Kohlmeyer, Volkmann-Kohlmeyer (1998), *Stigmidium*, *Mycosphaerellaceae* — Aptroot (2006). Очевидно, что установить его точное таксономическое положение в настоящее время возможно только с использованием молекулярно-генетических методов.

Задача нашей работы — обнаружение, описание морфологии и жизненного цикла *Stigmidium ascophylli* в Белом море на водорослях, образующих симбиоз с ним (*Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata*, *Ascophyllum nodosum* ecad muscoides), уточнение его таксономического положения и поиск несовершенной стадии — *Septoria ascophylli*.

## Материалы и методы

Отбор образцов производили в районе Беломорской биологической станции (ББС) им. Н. А. Перцова МГУ им. М. В. Ломоносова в Кандалакшском заливе Белого моря. Местами сбора были преимущественно Кислая губа (66°32'10" с. ш., 33°04'43" в. д.) и Еремеевский порог (66°32'55" с. ш., 33°07'18" в. д.) на

п-ве Киндо. Материал для микроскопирования и изучения жизненного цикла *S. ascophylli* собирали с июня по ноябрь, а затем в январе, марте и мае с 2008 по 2010 г. В образцах, собранных летом и осенью, на месте проводили обследование на предмет обнаружения стром и псевдотеций гриба-эндофита. Затем их фиксировали либо 4%-м формалином для дальнейшего изучения морфологии, либо этанолом для последующего выделения ДНК. В этом случае образцы сначала отмывали в свежей морской воде. Удаление слизистого чехла вместе с эпифитными грибами и водорослями проводили механически, счищая слизь и промывая таллом в 20%-м растворе лимонной кислоты. Затем кусочки талломов ополаскивали дистиллированной водой и фиксировали в 96%-м этаноле. По прошествии 24 ч спирт полностью заменяли на свежий. Выделение образцов ДНК и последующую работу с ними проводили в Институте биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН и на ББС МГУ (табл. 1).

ДНК из водорослей выделяли по протоколу СТАВ (Kidwell, Osborne, 1992). Для удаления посторонних организмов счищали с образцов стерильным скальпелем коровый слой водоросли. Таким образом, в работе с образцами ДНК использовали только центральную часть таллома водорослей, в которой предположительно присутствует только мицелий симбионта, а другие виды грибов, если и присутствуют, то в небольших количествах. Кроме того, ДНК подвергали переосаждению и очистке от полисахаридов методом PEG (Hattori et al., 1987). Для амплификации были выбраны праймеры ITS-1 F (Gardes, Brunes, 1993) и ITS-4 (White et al., 1990).

Образцы водорослей, собранные в зимние и весенние месяцы из-под льда, сохраняли при  $-20^{\circ}\text{C}$ , не размораживая. Замороженные фрагменты талломов помещали в колбы с морской водой из места сбора образцов и ставили в холодильник при  $6^{\circ}\text{C}$ . Через 7—10 суток на рецептакулах водоросли наблюдали развитие псевдотеций. В то же время из фиксированных образцов изготавливали срезы толщиной около 20 мкм и микроскопировали в воде. Работу с замороженными и фиксированными формалином образцами проводили на кафедре микологии и альгологии МГУ им. М. В. Ломоносова.

Таблица 1

**Образцы водорослей, использованные для выделения тотального препарата ДНК**

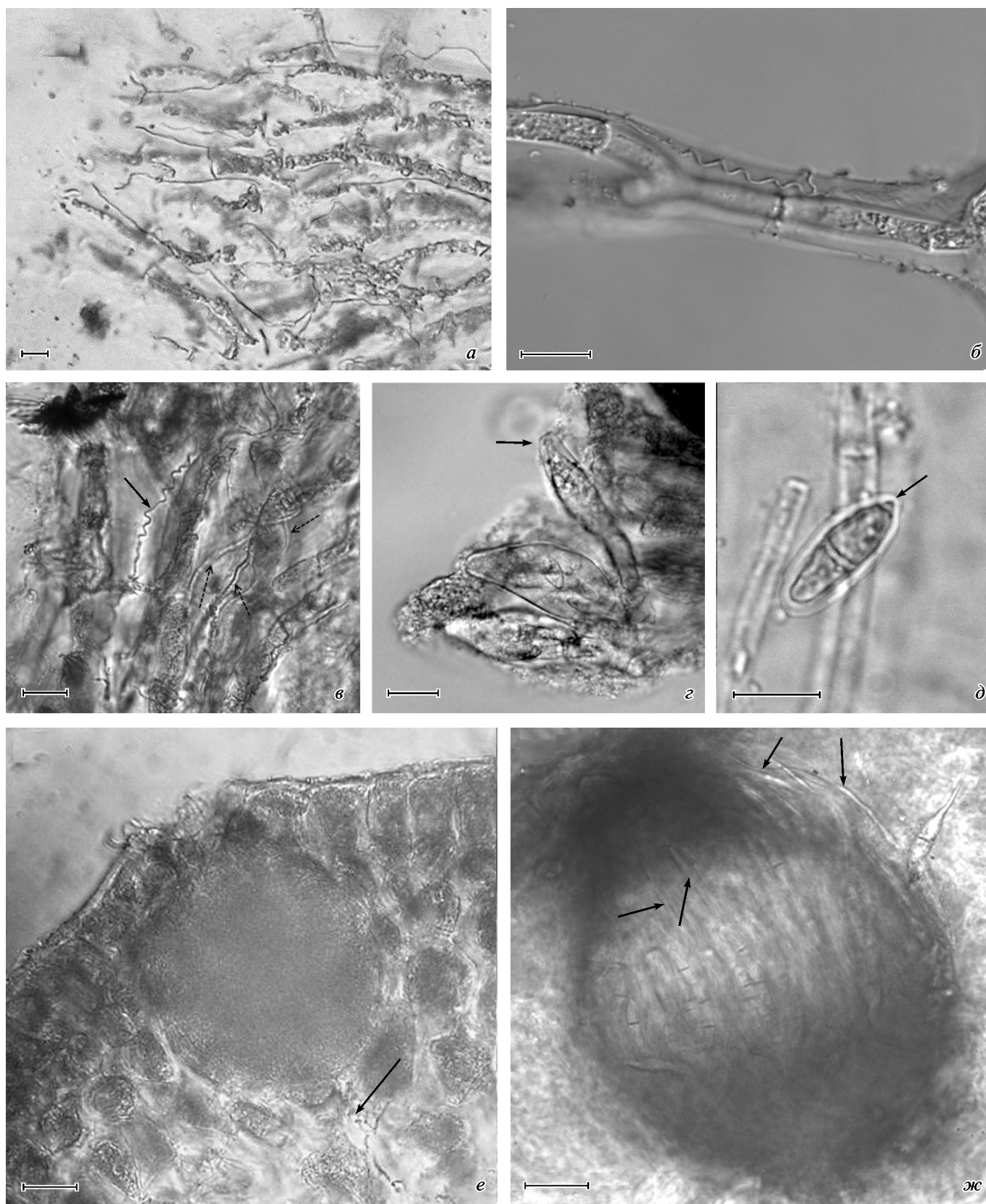
Вид водоросли	Место сбора	Код ДНК
<i>Ascophyllum nodosum</i> (по 2 образца)	ББС, Еремеевский порог ББС, Кислая губа	Ае Ак
<i>A. nodosum ecad muscoides</i> (по 2 образца)	ББС, Еремеевский порог ББС, Кислая губа	Ме Мк
<i>Pelvetia canaliculata</i> (по 2 образца)	Кандалакшский залив, о. Кокоиха	П
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Баренцево море, губа Дальнезеленцкая (гербарий Т. А. Михайловой)	Аб

## Результаты и обсуждение

Первоочередной задачей было обнаружение вегетативных структур *S. ascophylli* в тканях исследуемых водорослей. На поперечных и продольных срезах талломов *Pelvetia canaliculata* и *Ascophyllum nodosum*, включая *A. nodosum ecad scorpioides* и *A. nodosum ecad muscoides*, хорошо видны гифы гриба-симбионта. Мицелий сильно ветвится и регулярно образует анастомозы, образуя сеть в межклеточном пространстве внутренней части таллома водоросли (рис. 2, а). При этом гифы прямые, тонкие, 1—2 мкм, в участках таллома с разреженными клетками водоросли (сердцевина рецептакулов, апексов и молодых частей таллома) мицелий спиралевидно извивается. Нами также впервые для *Stigmatidium ascophylli* отмечен тот факт, что мицелий может присутствовать не только в межклеточном пространстве, но и в клеточной стенке хозяина (рис. 2, б). При рассмотрении срезов разных экологических форм *Ascophyllum nodosum* и *Pelvetia canaliculata* не заметно различий в количестве мицелия ни в разных экадах, ни в разных видах водорослей. Во всех случаях гифы образуют сеть, оплетающую клетки хозяина. В норме мицелий всегда одного типа и, по всей видимости, принадлежит исключительно *S. ascophylli*. В разрушающихся тканях (например, отмирающих рецептакулах) появляется толстый вакуолизованный мицелий, принадлежащий грибам-сапротрофам, а гифы *S. ascophylli* деградируют вместе с хозяином — становятся очень сильно извитыми, с большим количеством пустых и спавшихся клеток (рис. 2, в).

Следующим этапом работы стало обнаружение плодовых тел на талломах всех исследуемых водорослей. На талломах *Pelvetia canaliculata* и типичной формы *Ascophyllum nodosum* псевдотеции *Stigmatidium ascophylli* находили в летние месяцы как на рецептакулах, так и на апикальных участках. В результате обследования талломов *Ascophyllum nodosum ecad muscoides* и *A. nodosum ecad scorpioides* были обнаружены единичные псевдотеции *Stigmatidium ascophylli* только на апикальных участках веточек. В первый год исследований плодовые тела вообще не были обнаружены. В дальнейшем неоднократно были найдены псевдотеции на талломах *Ascophyllum nodosum ecad scorpioides* в разных точках сбора. На апексах талломов *A. nodosum ecad muscoides* псевдотеции были отмечены за все время исследования всего дважды в одной точке сбора — Кислой губе.

В литературе встречается предположение, что вторичные метаболиты, образующиеся в старых частях талломов водоросли, ингибируют образование псевдотеций гриба, а ростовые факторы в молодых частях водоросли, наоборот, стимулируют (Garbary, Gautam, 1989). Однако исходя из наших данных скорее можно сделать предположение о том, что на развитие псевдотеций оказывают влияние вещества, регулирующие половое размножение *A. nodosum*. Помимо всего прочего для *A. nodosum ecad scorpioides* в Северном море было показано, что рецептакулы у этой вегетативной экады формируются не каждый год в зависимости от средней температуры летнего сезона (Chock, Mathie-

Рис. 2. Морфология *Stigmatidium ascophylli*.

*a* — мицелий *S. ascophylli* в тканях *Ascophyllum nodosum* *ecad muscoides*; *б* — мицелий *S. ascophylli* в клеточной стенке *A. nodosum*; *в* — сильно извитой мицелий *S. ascophylli* (показан сплошной стрелкой) и более толстый мицелий сапротрофного гриба (пунктирная стрелка) в деградировавшем рецептакуле *A. nodosum*; *г* — сумки *S. ascophylli* (стрелкой показан канал в экзотунике); *д* — аскоспора *S. ascophylli* с проростковой порой (указана стрелкой); *е* — незрелый псевдотеций с трихогонами, торчащими из остиоли и питающей гифой (показана стрелкой), выходящей из основания плодового тела; *ж* — зрелый псевдотеций с псевдоперифизами (показаны стрелками). Масштаб — 10 мкм.

son, 1976). Возможно, температурный фактор влияет и на спорадичность развития плодовых тел *Stigmatidium ascophylli*. Поэтому чрезвычайно любопытно будет сопоставить количество псевдотец на талломах экад *Ascophyllum nodosum* и динамику температуры воды в летние месяцы.

Нами были исследованы морфологические признаки псевдотец *Stigmatidium ascophylli*. Морфология псевдотец была исследована на препаратах рецептакулов *Ascophyllum nodosum* и *Pelvetia canaliculata*. Единственное различие состояло в том, что псевдотец на *P. canaliculata* были на 5—10 мкм меньше по длине и ширине, чем на *Ascophyllum nodosum*.

Размер зрелых псевдотец гриба 75—110 × 50—60 мкм. Остиола 10 мкм в диам., темная; остальная часть псевдотец светло-коричневая. Присутствуют стерильные элементы — нитевидные псевдоперифизы, 2 × 15—20 мкм, отходящие от стенок псевдотец (рис. 2, ж). От основания псевдотец отходит питающая гифа толщиной 3 мкм (рис. 2, е).

Сумки *Stigmatidium ascophylli* битуникатные, восьмиспоровые, булабовидной формы. Около верха сумки имеется узкий канал в эндотунике (рис. 2, з). При выходе аскоспор экзотуника разрывается, эндотуника вытягивается и аскоспоры располагаются в ряд (рис. 2, ж). Аскоспоры 20—22 × 4—5 мкм, двуклеточные, клетки неравные, верхняя клетка больше, с закругленной верхушкой, нижняя клетка с сильно сужающимся верхом. Аскоспоры коричнево-зеленые, с многочисленными каплями масла. В большей клетке есть проростковая пора (рис. 2, д). Аскоспоры в тонком слизистом чехле толщиной около 1.5 мкм.

По результатам морфологических исследований, признаки исследуемого гриба (табл. 2) соответствуют более всего описанию *S. ascophylli* (Aptroot, 2006), это

название на данный момент является действительным ([www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)). Однако в отличие от указанного описания мы можем сказать, что аскоспоры имеют слизистый чехол, хотя и не очень явно выраженный, и проростковую пору. Эти признаки не являются ключевыми, но в целом важны для идентификации видов группы *Mycosphaerella sensu lato*, к которой относится род *Stigmatidium*. Можно предположить, что данные признаки могли быть не учтены Aptroot (2006), который составлял описание *S. ascophylli* по старым гербарным образцам.

После выхода аскоспор псевдотец уменьшаются в размерах. Так как рецептакулы *Ascophyllum nodosum* опадают, пустые псевдотец можно найти только на вегетативных апексах этого вида вплоть до конца августа. На талломах водорослей, собранных в октябре, зачатки псевдотец не обнаружены.

Развитие плодовых тел *Stigmatidium ascophylli* было рассмотрено на рецептакулах типичной формы *Ascophyllum nodosum*. Особенность полового размножения *A. nodosum* заключается в том, что выход гамет у него происходит практически одновременно по всей популяции, в короткий промежуток времени (примерно в течение недели) в конце июня—начале июля; после выхода гамет происходит массовый сброс рецептакулов. Мы обнаружили, что созревание аскоспор и их освобождение происходит одновременно с созреванием и выходом половых продуктов водоросли в этот же короткий промежуток времени. Таким образом, в Белом море жизненные циклы *Stigmatidium ascophylli* и типичной формы *Ascophyllum nodosum* скоррелированы между собой. Ранее подобная стратегия была отмечена и в других морях (Webber, 1967; Garbary, Deckert, 2001). Очевидно, такая корреляция необходима для образования данной ассоциации (Garbary, Gautam, 1989).

Таблица 2

Сравнение основных признаков *Stigmatidium ascophylli* в описаниях различных авторов

Описание	Материал	Размер псевдотец, мкм	Наличие стерильных элементов	Размер сумок, мкм	Размер аскоспор, мкм	Признаки аскоспор
<i>Mycosphaerella ascophylli</i> Cotton (Webber, 1967)	Свежесобранные образцы	75—85 × 115—155	Стерильные элементы отсутствуют	45—64 × 17—21	17—22 × 4—5	Зеленые, неравноклетные, с большим количеством масла
<i>Mycophycias ascophylli</i> (Cotton) Kohl. et Volkm.-Kohl. (Kohlmeyer, 1972; Kohlmeyer, Volkmann-Kohlmeyer, 1998)	Срезы, полученные методом замораживания	60—90 × 55—77	Остиолярные перифизы	—	—	Прозрачные
<i>Stigmatidium ascophylli</i> (Cotton) Aptroot (Aptroot, 2006)	Гербарий	—	Слабосептированные остиолярные перифизы 15—20 × 2 мкм	—	16—20 × 5—6	Отсутствие слизистого чехла
Авторские данные	Свежесобранные образцы	75—110 × 50—60	Нитевидные псевдоперифизы на стенках псевдотец, 15—25 × 2 мкм	45—55 × 20—25	17—22 × 4—7	Зеленые с проростковой порой, неравноклетные; тонкий слизистый чехол 1.5—2 мкм

Новые рецептакулы закладываются на талломах *Ascophyllum nodosum* в июне—июле. До установления ледового покрова на рецептакулах появляются зачатки скафидиев — вместилищ половых продуктов водоросли, грибные структуры представлены стромами. С установлением ледового покрова рецептакулы и скафидии водоросли, и стромы гриба останавливаются в развитии. В тканях рецептакулов водоросли, собранных в январе, найдены зачаточные скафидии. Одновременно с этим мы обнаружили грибные темноокрашенные стромы размером до  $40 \times 30$  мкм, от поверхности до третьего слоя коровых клеток. После инкубирования рецептакулов водоросли в воде при  $6^\circ\text{C}$  в строме формируются аскогоны, и на поверхности открывается отверстие остиолы псевдотеция, из которой торчат трихогины гриба (Webber, 1967) либо стерильные элементы (рис. 2, е). В природе мы наблюдали процесс развития аскогонов после схода льда, в мае.

При сравнении наших данных о сроках созревания псевдотециев с литературными можно отметить, что в Белом море псевдотеция созревают на месяц позже, чем на побережье Канады (Garbary, Deckert, 2001), и на три месяца позже, чем на побережье Великобритании (Webber, 1967) (табл. 3). Это связано с тем, что из всех упомянутых морей только в Белом море устанавливается стабильный ледовый покров. В беломорском материале зачатки псевдотециев, появляющиеся в октябре—ноябре, после установления ледового покрова останавливаются в развитии. После схода льда они продолжают развиваться, причем очень быстро. Полное развитие и созревание псевдотециев происходит приблизительно за один месяц, выброс аскоспор — за одну неделю.

Пикниды *Septoria ascophylli* в зимнем, весеннем и летнем материале обнаружены нами не были. Как уже упоминалось, известны только два случая их нахождения на талломах *Ascophyllum nodosum* (Мельник, Петров, 1966; Webber, 1967). Таким образом, мы можем предположить, что если это и анаморфа *Stigmatium ascophylli*, то она не является необходимой в жизненном цикле. С другой стороны, возможно, это совершенно другой вид, не имеющий отношения к роду *Stigmatium*.

Жизненный цикл *S. ascophylli* на *Pelvetia canaliculata* не был исследован нами в течение всего года, мы прово-

дили наблюдение только с июня по сентябрь. Зрелые псевдотеции на рецептакулах этой водоросли были обнаружены тогда же, когда и у *Ascophyllum nodosum*, т. е. в конце июня. В более поздние сроки можно обнаружить только пустые псевдотеции. Между тем созревание половых продуктов в обоеполюх скафидиях *Pelvetia canaliculata* происходит последовательно, с июня по август, а не одновременно в течение короткого времени, как у *Ascophyllum nodosum*. Несовпадение сроков созревания аскоспор гриба и гамет водоросли может свидетельствовать о том, что образование ассоциации *Pelvetia canaliculata*—*Stigmatium ascophylli* происходит другим путем, нежели у *Ascophyllum nodosum*.

Для уточнения таксономического положения гриба-симбионта нами были исследованы образцы тотальной ДНК, выделенной из водорослей *A. nodosum*, *A. nodosum* ead muscoides и *Pelvetia canaliculata*.

Результатом использования избранной пары праймеров стало получение 14 последовательностей грибной ДНК, включающих области ITS1 гена 5.8S РНК и ITS2, амплифицированных из водорослей *Ascophyllum nodosum* (5 последовательностей), *A. nodosum* ead muscoides (4 последовательности) и *Pelvetia canaliculata* (5 последовательностей). Размер полученных последовательностей варьирует от 241 до 517 п. н.

Из всех исследованных образцов ДНК амплифицировалось по одной последовательности. Таким образом, мы получили в результате для каждой водоросли последовательность гриба-эндофита, клеток которого в талломе было максимальное количество. Наиболее вероятное предположение в данном случае, что мы получили последовательность, принадлежащую к *Stigmatium ascophylli*.

Все полученные последовательности ITS1 гена 5.8S РНК, ITS2 рДНК из типичной скальной формы *Ascophyllum nodosum* и *Pelvetia canaliculata* были практически идентичны. Максимальные различия составили 3—5 нуклеотидов, что может быть объяснено внутривидовым полиморфизмом и не является достаточным, чтобы говорить о межвидовых различиях. Таким образом, не только морфологические, но и генетические данные подтверждают, что *Ascophyllum nodosum* и *Pelvetia canaliculata* имеют один и тот же эндосимбионт.

Таблица 2

Сравнение сроков созревания плодовых тел в исследованных местообитаниях

Место сбора образцов	Время образования пикнид	Время образования псевдотециев	Источник
Западная Шотландия	—	Февраль—май	По: Webber (1967)
О. Новая Шотландия, Восточная Канада	—	Июнь—июль (зрелые)	Garbary, Gautam (1989); Garbary, Deckert (2001)
Аберсвит, Уэльс	Ноябрь (начало образования), январь—май (зрелые)	Декабрь (формирование), ян- варь—май (зрелые)	Webber (1967)
Губа Чупа, Кандалакшский залив, Белое море	Конец февраля (зрелые)	—	Мельник, Петров (1966)
Губа Кислая, Кандалакш- ский залив, Белое море	—	Конец апреля—май (формирова- ние), конец июня—июль (зре- лые)	Авторские данные

В результате проведенного поиска близких последовательностей данного гена оказалось, что в базе данных GeneBank отсутствуют виды, близкие к полученному нами эндوفиту. Однако большинство последовательностей с относительно высокой степенью гомологии относилось к группе *Mycosphaerella sensu lato*. Последовательность *Stigmatidium ascophylli* по результатам поиска гомологии ближе к анаморфному роду *Devriesia* (сходство с видом *D. strelitzicola* Arzanlou et Crous — 94 %) из семейства *Teratosphaeriaceae* (Crous et al., 2007), нежели к семейству *Mycosphaerellaceae* (*Mycosphaerella sensu stricto*). В то же время все виды формального рода *Septoria* имеют телеоморфы в роде *Mycosphaerella* Johanson и по последним данным полигенной молекулярной систематики (Feau et al., 2006) образуют монофилетическую кладу. Это дополнительный аргумент в пользу того, что *Septoria ascophylli* может являться отдельным видом, не имеющим отношения к *Stigmatidium ascophylli*.

Филогенетические исследования симбиотического гриба из *Ascophyllum nodosum* *ecad muscoides* дали совершенно иные результаты. Последовательности образцов из разных точек сбора (Кислой губы и Еремеевского порога) значительно отличались друг от друга и последовательности, общей для образцов из *A. nodosum* и *Pelvetia canaliculata*. Последовательности образцов из *Ascophyllum nodosum* *ecad muscoides* с Еремеевского порога имеют 99 % гомологии с грибом *Neonectria fockeliana* (Booth) Castl. et Rossman (анаморфная стадия *Cylindrocarpon cylindroides* var. *tenue* Wollenw.). Данный гриб известен как раневой паразит и возбудитель рака хвойных пород деревьев (Booth, 1959). Последовательности, полученные из образцов водорослей из Кислой губы, имеют 96 % гомологии с грибом *Plectosphaerella cucumerina* (Lindf.) Gams. Данный гриб является паразитом цветковых, например крестоцветных, встречается также в почвах и на растительных остатках. Его анаморфная стадия *Plectosporium tabacinum* (Beuma) Palm, Gams et Nirenberg [*Fusarium tabacinum* (Beuma) Gams] — широко распространенный почвенный сапротроф (Domsh et al., 1980). Последовательности, предположительно относящейся к *Stigmatidium ascophylli*, обнаружено не было. Здесь нужно отметить, что в результате посевов талломов *Ascophyllum nodosum* *ecad muscoides* после поверхностной стерилизации на питательные среды нами были получены изоляты, относящиеся к анаморфным стадиям *Plectosphaerella cucumerina* и *Neonectria fockeliana* (Коновалова, Бубнова, 2011), при этом *Plectosphaerella cucumerina* — из Кислой губы, *Neonectria fockeliana* — из образцов с Еремеевского порога.

Водоросль *Ascophyllum nodosum* *ecad muscoides* значительно отличается от типичной формы данного вида по своим местообитаниям. В частности, эта экада обитает на супралиторали в условиях длительного осушения. Кроме того, местообитания, в которых встречается *A. nodosum* *ecad muscoides*, часто имеют сток пресной воды. Талломы *A. nodosum* *ecad muscoides* отрастают от погруженных в ил или литоральный грунт кусочков *A. nodosum* или *A. nodosum* *ecad scorpioides*. На основании экологических отличий изучаемых во-

дорослей и исследования их грибных компонентов можно предположить, что так как *A. nodosum* *ecad muscoides* обитает в условиях, нехарактерных для типичной формы, *Stigmatidium ascophylli* внутри талломов данной экады может замещаться более активными видами, например факультативными патогенами (*Plectosphaerella cucumerina*) или агрессивными биотрофами (*Neonectria fockeliana*).

Авторы выражают признательность за помощь в работе Т. В. Неретиной (ББС МГУ), Н. С. Мюге (Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН), А. В. Александровой (МГУ, кафедра микологии и альгологии биологического факультета), Т. А. Михайловой (Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН).

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант 11-04-02121-а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Коновалова О. П., Бубнова Е. Н. Грибы на бурых водорослях *Ascophyllum nodosum* и *Pelvetia canaliculata* в Кандалакшском заливе Белого моря // Микология и фитопатология. 2011. Т. 45, вып. 3. С. 240—248.
- Максимова О. В., Мюге Н. С. Новые для Белого моря формы фукоидов (Fucales, Phaeophyceae): морфология, экология, происхождение // Бот. журн. 2007. Т. 92, № 7. С. 965—985.
- Мельник В. А., Петров Ю. Е. Новый вид гриба с морской бурой водоросли *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis // Новости систематики низших растений. 1966. С. 211—212.
- Ap'troot A. *Mycosphaerella* and its anamorphs. 2. Conspectus of *Mycosphaerella* // CBS Biodiversity series. 2006. Vol. 5. 231 p.
- Booth C. Studies of Pyrenomycetes. IV. *Nectria* // Mycol. Papers. 1959. Vol. 73. P. 56—57.
- Chock J. S., Mathieson A. C. Ecological studies of the salt marsh *ecad scorpioides* (Hornemann) Hauck of *Ascophyllum nodosum* (L.) LeJolis // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1976. Vol. 23. P. 171—190.
- Crous P. W., Braun U., Groenewald J. Z. *Mycosphaerella* is polyphyletic // Stud. Mycol. 2007. Vol. 58. P. 1—32.
- Domsh K. H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of the soil fungi. London; Sydney: Acad. Press, 1980. 1070 p.
- Feau N., Hamelin R. C., Bernier L. Attributes and congruence of three molecular data sets: Inferring phylogenies among *Septoria*-related species from woody perennial plants // Molec. Phylogenet. Evolution. 2006. Vol. 40. Iss. 3. P. 808—829.
- Garbary D. J., Deckert R. J. Three part harmony — *Ascophyllum* and its symbionts / Symbiosis: Mechanisms and Model Systems / Ed. J. Seckbach. Dordrecht: Kluwer, 2001. P. 309—321.
- Garbary D. J., Gautam A. The *Ascophyllum/Polysiphonia/Mycosphaerella* symbiosis. I. Population ecology of *Mycosphaerella* from Nova Scotia // Bot. Marina. 1989. Vol. 32. P. 181—186.
- Gardes M., Bruns T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes — application for mycorrhizae and rusts // Molec. Ecol. 1993. Vol. 2. P. 113—118.
- Hattori J., Gottlob-McHugh S. G., Johnson D. A. The isolation of high-molecular-weight DNA from plants // Anal. Biochem. 1987. Vol. 165. Iss. 1. P. 70—74.

Kidwell K. K., Osborn T. C. Simple Plant DNA Isolation Procedures / Plant Genomes / Eds. J. S. Beckman, T. C. Osborn. Amsterdam: Kluwer, 1992. P. 1—13.

Kingham D. L., Evans L. V. The Pelvetia-Mycosphaerella interrelationship / The biology of marine fungi / Ed. S. T. Moss. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. P. 177—187.

Kohlmeyer J., Kohlmeyer E. Is Ascophyllum nodosum lichenized? // Bot. Marina. 1972. Vol. 15. P. 109—112.

Kohlmeyer J., Kohlmeyer E. Marine Mycology, the higher fungi. New York: Acad. Press, 1979. 691 p.

Kohlmeyer J., Volkman-Kohlmeyer B. Mycophycias, a new genus for the mycobionts of Apophlaea, Ascophyl-

lum and Pelvetia // Systema Ascomycetum. 1998. Vol. 16. Iss. 1—2. P. 1—7.

Stanley S. Observations on the seasonal occurrence of marine endophytic and parasitic fungi // Can. J. Bot. 1992. Vol. 70. P. 2089—2096.

Webber F. C. Observations on the structure, life history and biology of Mycosphaerella ascophylli // Trans. Brit. Mycol. Soc. 1967. Vol. 50 (4). P. 583—601.

White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / PCR protocols: A Guide to Methods and Applications. Cambridge: Acad. Press, 1990. 578 p.

Поступила 29 III 2012