

УДК 582.24; 58.083

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ВЛАЖНЫХ КАМЕР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ МИКСОМИЦЕТОВ

А.В. Матвеев, В.И. Гмошинский, В.П. Прохоров

Полевые сборы спороношений не обеспечивают полного выявления видового разнообразия миксомицетов. В качестве дополнительного следует использовать относительно простой метод инкубирования во влажных камерах фрагментов коры, гниющей древесины, подстилки и других типов органических субстратов для получения плазмодиев и спорокарпов в лабораторных условиях. Описаны методы сбора образцов, особенности и продолжительность инкубирования, наблюдения за появлением спороношений миксомицетов. Отмечена необходимость совместного применения полевых сборов и получения спороношений во влажных камерах для выявления полного видового разнообразия миксомицетов. Показано, что флористический анализ следует проводить по отдельности для метода полевых сборов и влажных камер.

Ключевые слова: Миксомицеты, метод влажной камеры, биоразнообразие.

Миксомицеты – группа амeboидных простейших, которые имеют сложный жизненный цикл, включающий подвижные трофические (зооспоры, миксамебы и надклеточные агрегаты – плазмодии), покоящиеся (микросклероции, склероции, сферулы) и расселительные (спорокарпы) стадии. Определение видовой принадлежности миксомицетов возможно только по спороношениям (Martin, Alexopoulos, 1969).

В регионах с умеренным климатом спорокарпы миксомицетов в полевых условиях можно обнаружить, как правило, в течение всего бесснежного периода. В зимние месяцы, они могут встречаться в виде старых спороношений, сохраняющихся в природе от нескольких недель до месяца и более, однако в большинстве случаев спорофоры миксомицетов довольно хрупки, и обычно являются эфемерными структурами.

Сбор спорокарпов миксомицетов в полевых условиях не обеспечивает полного выявления их видового разнообразия. В качестве вспомогательного приема можно использовать относительно простой метод для получения плазмодиев и спорокарпов в лабораторных условиях. Этот метод заключается в сборе фрагментов коры, гниющей древесины, подстилки и других типов органических остатков с последующим инкубированием их во влажных камерах (ВК). Метод относительно легко осуществим, так как не требует сложного специального оборудования. Более того, его можно использовать в любое время года и в любой точке мира (Stephenson, 1985, Stephenson, Stempen, 2000).

Метод влажных камер основан на наличии в жизненных циклах миксомицетов покоящихся стадий, из которых при благоприятных условиях развиваются плазмодии. Покоящиеся стадии формируются из миксамеб, зооспор и плазмодиев при высыхании субстрата. В отличие от спор они не переносятся ветром и могут быть маркерами наличия в биотопах активных трофических стадий. Это дает возможность интерпретировать результаты опытов с влажными камерами как отражение присутствия вида в природе, а не просто заноса спор извне (Новожилов, 2005).

Применение метода ВК особенно важно для выявления миксомицетов эпифитного субстратного комплекса, так как заметить мелкие и неярко окрашенные спорокарпы многих видов в складках коры в полевых условиях крайне сложно, в результате чего многие из них не учитываются при таких сборах (Ing, 1999). Использование ВК наряду с полевыми сборами является эффективным методом выявления видового разнообразия миксомицетов во флористических и экологических исследованиях.

Метод ВК используют наряду с традиционным отбором спороношений миксомицетов в полевых условиях. Несомненным преимуществом этого метода является возможность легко стандартизировать в лаборатории условия культивирования вне зависимости от сезона и выявлять даже малозаметные в природе виды (Новожилов, 1988; Harkoenen, 1977a, 1977b; Harkoenen, Ukkola, 2000; Harkoenen et al., 2004).

Впервые этот метод был использован в Шотландии Краном в 1917 г. (Новожилов, 2005). Однако тех-

ника ВК в том виде, в котором она применяется сейчас к миксомицетам, была использована впервые Х. Джильбертом и Дж. Мартином (Gilbert, Martin, 1933), которые изучали водоросли, обитающие на коре живых деревьев. К их удивлению, вместе с водорослями было обнаружено множество мелких плодовых тел двух ранее неописанных видов миксомицетов. Многие живые организмы (мхи, печеночники, лишайники, микромицеты, макромицеты, нематоды, тихоходки, раковинные амебы, насекомые, клещи) развиваются на коре живых деревьев во влажных камерах помимо водорослей и миксомицетов (Keller, Braun, 1999). Этот метод широко используется в фитопатологии для стимулирования спороношений патогенных микромицетов (Наумов, 1937; Keyworth, 1951), а также выявления копротрофных организмов (Прохоров, Линник, 2011). В результате последующих экспериментов было обнаружено, что появление миксомицетов в таких условиях обычное явление. Кроме того, некоторые виды, считавшиеся до этого редкими, регулярно выявлялись при инкубировании во влажных камерах.

Адекватность метода ВК для выявления таксономического и экологического разнообразия миксомицетов первоначально вызывала сомнения. Дж. Петерсон (Peterson, 1952) в результате своих исследований пришел к выводу, что обнаружение миксомицетов в ВК демонстрирует лишь наличие спор и не несет информации о приуроченности трофических стадий к данному субстрату. Но эксперименты, проведенные Пендерграссом (Pendergrass, 1976), убедительно подтвердили результаты, полученные этим методом: несмотря на искусственную изоляцию в природных условиях участков коры деревьев полиэтиленовой пленкой, под ней впоследствии выявляли плазмодии и спорокарпы миксомицетов. Косвенным подтверждением развития миксомицетов во влажной камере из микроцист и склероциев, а не из спор являются проведенные Ю.К. Новожиловым и соавторами наблюдения за развитием спорофоров видов родов *Echinostelium* и *Licea*. Спорокарпы этих миксомицетов единожды развивались во влажной камере одними из первых и редко появлялись в другие периоды инкубации субстратов (Novozhilov et al., 2000). В случае прохождения представителями этих родов полного жизненного цикла в процессе инкубирования наблюдалось бы несколько пиков спороношения (Новожилов, 2005). Этим методом выявляются комплексы видов не только на коре живых растений, но и на других субстратах. Это было показано при параллельном проведении полевых исследований и опытов

с ВК в пустыне Сонора (Blackwell, Gilbertson, 1980), в пустынях п-ва Мангышлак (Schnittler, 2001b) и плато Колорадо (Novozhilov et al., 2003). В условиях арктических и аридных районов это единственный метод, позволяющий относительно легко и быстро проводить оценку частоты встречаемости миксомицетов на основе массового анализа образцов субстратов (Novozhilov et al., 2002).

Выбор подходящей территории и субстрата для постановки ВК

Первым этапом в ходе опыта с ВК является выбор места и сбор образцов субстратов. Обычно в естественных биотопах образцы субстратов собирают случайным образом на участках площадью 500–1000 м² с относительно гомогенной растительностью. Проводят геоботаническое описание участка, указывают растительный покров, видовой состав и численность всех присутствующих видов сосудистых растений (Schnittler, 2001b). Необходимо указывать привязку изучаемого биотопа к местности. Для каждого образца следует отмечать точные географические координаты, а также словесное описание места проведения сбора. Однако при отсутствии GPS (либо GLONASS) приемника, допустимо использование лишь словесного описания. В парках, оранжереях, ботанических садах и других территориях при наличии подробных высокодетализированных планов желательно использовать привязку к конкретным точкам на плане, так как погрешность навигационного оборудования может достигать 5–10 м в зависимости от модели устройства, погодных условий и особенностей ландшафта.

Было показано, что метод влажной камеры в той или иной степени подходит для миксомицетов, относящихся к эпиксильному, эпифитному, копрофильному и подстилочному субстратному комплексу. При этом нивальные, бриофильные и некоторые другие высокоспециализированные экологические группы этим методом не выявляются (Novozhilov et al., 2000). Таким образом, в качестве субстрата для постановки ВК следует использовать образцы коры живых деревьев и одревесневших частей кустарников и полукустарничков; кусочки мертвой коры и древесины в различной степени разложения; опавших листьев, мелких веточек, плодов, остатки травянистых растений с различных горизонтов; образцы выветрившегося помета растительноядных животных. Показано, что метод ВК также подходит для выявления спороношений миксомицетов из помета птиц: куропаток, глухарей, гусей (Eliasson, Lindqvist, 1979) и большого баклана

(Adamonyte et al., 2011). Существуют только отрывочные сведения о возможности получения спороношений миксомицетов с помета рептилий (Eliasson, 2013). В некоторых случаях в опытах с ВК используют и другие (более специфичные) субстраты, например печеночники (Schnittler, 2001a).

Микроместообитание представляет собой локальный участок с относительно гомогенными условиями в отношении как биотических, так и абиотических факторов (Stephenson, 1988), например, участок ствола дерева или кустарника, участок бревна или небольшая затененная площадка с листовым опадом с относительно схожими консистенцией, влажностью и пр. Для синэкологических исследований в пределах учетной площадки все микроместообитания желательно классифицировать в соответствии со схемой М. Шниттлера (Schnittler, 2001b). Для каждого образца субстрата набор параметров среды измеряется или классифицируется по 4–10 предопределенным критериям/пунктам (для коры – вид растения, его возраст и место произрастания, тип структуры коры, экспозиция на свету, режим влажности, кислотность; для опада – степень разложения и горизонт, характеристики биотопа, степень гетерогенности, виды растений, листья и другие части которых являются компонентами опада; для копромы – таксономическое положение ее оставившего животного, степень выветренности; для древесины – степень разложения, кислотность, порода дерева, место). При сборе образцов желательно, насколько возможно, сохранять эти параметры постоянными для каждых 5–10 отдельных фрагментов субстрата с одного микроместообитания в данном участке, которые будут использованы для постановки одной влажной камеры. При описании микроместообитания указывают его характеристики.

Было показано, что помимо породы дерева на видовое разнообразие выявленных методом ВК миксомицетов оказывает влияние структура коры. Ю.К. Новожилов (Новожилов, 2005) использует следующую классификацию коры: морщинистая складчатая (r), глубокоморщинистая с удлиненными глубокими складками (r+), мелкоморщинистая (r-), мелкочешуйчатая (sc), крупночешуйчатая (sc+), шероховатая с крупными отслаивающимися кусочками (sh), гладкая (s), с отслаивающимися, закрученными кусочками (ro), спадающая расщепляющаяся на длинные пряди (p).

Сбор образцов

При сборе образцов с живых деревьев отделяют куски наружного мертвого слоя коры размером не-

сколько квадратных сантиметров. При сборе одревесневших частей полукустарничков (например, полыней) срезают всю надземную часть растения, с которой затем удаляют все листья и молодые побеги. У некоторых деревьев (*Pinus*, *Juniperus*) этот слой можно снять вручную, просто оторвав его, но у большинства пород для этого необходимо использовать нож или другой инвентарь (любой пригодный ручной инструмент). Например, С. Стефенсон в своем пособии рекомендует заточенную отвертку (Stephenson, Stempen, 2000). При этом надо следить, чтобы живые ткани дерева не попали в образец, так как на них быстро развивается мицелий грибов, который мешает развитию миксомицетов (Новожилов, 2005).

Были специально проведены исследования, убедительно показывающие, что видовой состав миксомицетов не зависит от высоты, с которой была взята кора дерева (Snell, Keller, 2003). Однако можно предположить, что на видовое разнообразие миксомицетов могут оказывать влияние положение точки отбора образца относительно сторон света и роза ветров (обычно на коре, которая обращена на север имеется повышенная влажность и, как следствие, развиваются особые группировки организмов, например мхи, водоросли и т.д.). Для избегания подобных ошибок обычно рекомендуют собирать кору с дерева небольшими фрагментами по кругу, в результате чего получается смешанный образец, содержащий кору со всех частей ствола.

Опад представляет собой довольно сложную и разнородную смесь растительных остатков, включающую в себя листья, плоды, семена, соцветия, фрагменты коры, веточки, сучья, находящиеся на разных стадиях разложения и постепенно переходящие в почву. Сбор образцов опада желательно осуществлять из каждого выбранного микроместообитания с нескольких горизонтов:

1) верхний слой опада слабой степени разложения, где для листьев можно определить видовую или родовую принадлежность,

2) промежуточный слой со средней степенью разложения листьев,

3) нижний горизонт, представляющий собой смесь гумуса и верхнего слоя минеральной почвы,

4) фракция крупных элементов опада – веточек, сучьев, фрагментов коры, которые могут присутствовать во всех выше перечисленных горизонтах.

Отбор образцов с нескольких горизонтов позволяет наиболее полно и эффективно выявить разнообразие (Rollins, Stephenson, 2012).

Образцы можно помещать в полиэтиленовые пакеты. Однако они пригодны только для кратковременного хранения. Если субстрат будет храниться в течение более чем нескольких дней, то образцы следует помещать в отдельные бумажные пакеты или конверты, снабженные этикетками с указанием даты и места сбора, вида растения-хозяина и некоторых других характеристик местообитаний в зависимости от субстрата и биотопа. В полевых условиях, где отсутствуют оптимальные условия для инкубирования, собранные образцы субстрата высушивают на воздухе вдали от прямых солнечных лучей и впоследствии работают с ними в лаборатории (Новожилов, 1993).

Инкубирование во влажных камерах

Образцы субстрата для одной влажной камеры (ВК) собирают из одного микрестообитания (одного ствола дерева, с одного фрагмента подстилки и т.д.) и обычно помещают в стандартные стеклянные чашки Петри, диаметром 10 см (с площадью дна 78,5 см²). В некоторых случаях для полного выявления видового разнообразия оказывается удобным ставить по три повторности камер с каждого образца субстрата (Гмошинский, 2013). Сейчас часто применяют пластиковые (полистироловые) чашки диаметром 9 см (площадью 64 см²), однако из-за конструктивных особенностей влага из них быстро испаряется, в связи с чем желательнее использовать такие чашки в которых по краям отсутствуют риски, обеспечивающие свободный воздухообмен (так называемые «невентилируемые чашки»), либо проводить герметизацию обертыванием чашки по краю полиэтиленовой или пластичной парафиновой пленкой «Parafilm M». Однако в последнем случае воздухообмен может оказаться чрезмерно ограниченным, и устранение испарения воды может привести к нарушению технологии, так как по результатам многих исследований для успешного формирования спороношений необходимо наличие смены периодов увлажнения и высушивания.

Пластиковые контейнеры обладают важным преимуществом над стеклянной тарой. Иногда во влажных камерах плодовые тела миксомицетов развиваются либо на боковой стороне чашки, либо на крышке. Когда это происходит, единственным способом собирать плодовые тела является вырезание фрагментов чашки, на которых они развились. Это довольно трудно сделать со стеклянной емкостью, но относительно легко – с пластиковой (Stephenson, Stempen, 2000).

При многократном использовании емкостей необходимо проводить стерилизацию, чтобы воспрепят-

ствовать занесению в культуру посторонних пропагул, особенно это важно при исследовании приуроченности видов к определенным субстратам. Если единственная цель инкубирования – просто получение разных миксомицетов, стерилизация не является необходимой. Обычно считается достаточным помещение стеклянных чашек в бьюксах в сушильный шкаф при 240°C на 2–3 ч. Данная процедура необходима также для минимизации переноса клещей и спор грибов с предыдущих постановок ВК. По тем же причинам необходимо принимать меры предосторожности при использовании приборов (например, рН-метры с плоскими электродами при измерениях с непосредственным соприкосновением с субстратом). Поскольку стерилизация пластиковых чашек термическим способом невозможна, то их следует использовать либо одноразово, либо подвергать другим способам стерилизации (УФ-излучение, ионизирующее излучение, химические агенты). Однако их воздействие на культуры миксомицетов не всегда прогнозируемо.

В методе ВК кроме чашек Петри можно использовать любые пластмассовые или стеклянные контейнеры подходящего размера (Keller et al., 2008). Каждую чашку обозначают особым номером, который заносят в базу данных. На дно помещают диск фильтровальной бумаги (допустимо использование бумажного полотенца или другого материала, обладающего адсорбционными свойствами и способного в течение длительного времени поддерживать влажный микроклимат в камере). Важно обеспечить легкую доступность воды организмам, не имеющим мощного осмотического давления, какими являются как миксомицеты, так и остальные простейшие (например, гидрогель для этих целей не подходит). На бумагу помещают образцы субстрата так, чтобы они не накрывали друг друга, но занимали площадь чашки максимально плотно. Куски коры располагают наружной стороной вверх. Субстрат должен быть полностью увлажнен, для чего добавляют немного (10–15 мл) воды. Оптимальное количество воды зависит от количества субстрата и его адсорбционной способности (Keller, Braun, 1999). Используют стерильную дистиллированную и деионизированную воду или буферный раствор с рН 7,0 (воду также часто доводят до нейтрального рН путем добавления КОН). Однако в некоторых случаях допустимо использование бутилированной, минеральной, талой, дождевой и охлажденной кипяченой водопроводной воды (Ing, 1999). Некоторые авторы рекомендуют использовать воду, набранную в водоемах поблизости от мест сбора об-

разцов (Новожилов, 1993). После этого чашку Петри закрывают до полного насыщения образца водой. На следующий день избыток жидкости аккуратно сливают, стараясь не нарушить положение фрагментов субстрата. При необходимости вода наоборот может быть добавлена (Keller, Braun, 1999). Гигроскопичность субстрата оценивают как разницу веса чашек с субстратами до и после окончательного пропитывания образцов субстрата водой. При сливе излишков воды измеряют кислотность субстрата рН-метром.

Для образцов опада нижнего горизонта подстилки следует использовать модифицированный метод. Сначала удаляют фракцию крупного песка и гравия и помещают почвенную смесь на фильтровальную бумагу в чашки Петри, увлажняют и оставляют на 24 ч, после чего измеряют рН. Сверху на почву помещают автоклавированную солому, создавая градиент влажности в камере, что позволяет миксомицетам мигрировать из почвы и сформировать спорокарпы. В несколько камер в качестве контроля помещают солому без образцов субстрата (Rollins, Stephenson, 2012).

Обычно культуры содержат при комнатной температуре (20–24°C) при рассеянном дневном свете. Рекомендуют нормальный 24-часовой цикл смены периодов освещенности и темноты, по 12 часов каждый (Keller, Braun, 1999). Существуют также методы, при которых культуры помещают в термостат без специального освещения, но и в этом случае температуру поддерживают на уровне 21–23 °С (Новожилов, 1993).

Каждая ВК должна быть уникально и недвусмысленно обозначена, обычно идентификационным номером. Для каждой камеры необходимо иметь информацию о типе субстрата, о биоценозе, виде дерева и прочих характеристиках микроместообитания. Идентификационный номер наклеивают сбоку непосредственно на чашку Петри, во избежание заслонения поля зрения через крышку (Keller, Braun, 1999). Это позволяет также предотвратить перепутывание чашек со схожими внешне образцами субстрата при неаккуратной и невнимательной работе.

Важно наблюдать цвет и тип плазмодия, поскольку именно из него развиваются плодовые тела. В настоящее время информация о типе и цвете плазмодия отсутствует примерно для 25% видов.

В некоторых случаях плазмодий может очень длительное время (до 2–3 лет) переходить к стадии образования спорокарпов (Ing, 1999). При этом пищевые ресурсы, необходимые для поддержания жизнеспособности плазмодия в ВК, постепенно иссякают, и спороношения не образуются вовсе. В этом случае

имеет смысл перейти к культивированию плазмодия по методу Кэмпса. При этом тонкий срез субстрата с передней частью плазмодия перемещают в другую чашку Петри на влажную фильтровальную бумагу с небольшим количеством овсяных хлопьев (Camp, 1936). Плазмодий продолжает передвигаться, и через некоторое время он может сформировать спорокарпы.

В некоторых ВК на образцах коры образуются плазмодии, не формирующие спорокарпы. В таких случаях можно попробовать удалить крышку чашки и дать субстрату подсохнуть. Повторное увлажнение может стимулировать образование новых спорокарпов у таких видов. Однако следует учитывать, что в некоторых случаях плазмодии, переходящие в стадию склероция, не восстанавливают своей жизнеспособности. Таким образом, представляется целесообразным разделить плазмодий на несколько частей, отсадив их в новые камеры.

Интервалы просмотра ВК сильно варьируют даже у одних и тех же исследователей в разных экспериментах. В наших экспериментах камеры с образцами опада и коры ставили на период от 3 до 4 мес. и проверяли каждые десять дней под биноклем, на более поздних сроках частоту осмотров снижали. Культуры с образцами помета обычно ставят на более длительные промежутки времени, так как плазмодий копрофильных видов часто трансформируется в спорокарпы только к концу третьего месяца (Новожилов, 2005).

При просмотрах культур время от времени добавляют воду, чтобы поддерживать влажность субстрата в течение всего инкубационного периода. В некоторых случаях воду во влажные камеры доливают только после полного высыхания (Новожилов, 1993), но в большинстве исследований стараются поддерживать постоянно высокую влажность на протяжении всего периода культивирования (Keller, Braun, 1999).

Очень важно тщательно обследовать чашки, чтобы обнаружить все образовавшиеся спорокарпы. Иногда развиваются только один или несколько спорофоров. В других случаях – сотни. Очень часто в одной чашке развиваются спорокарпы нескольких видов одновременно. В некоторых случаях плодовые тела хорошо видны невооруженным глазом. Иногда рекомендуется не снимать крышку с чашки Петри при просмотре камер, поскольку резкое изменение условий влажности может помешать развитию еще не совсем зрелых спорокарпов, культуры лучше по возможности осматривать через крышку (Stephenson, Stempen, 2000). Однако, как показывает наш опыт, это неудобно, по-

сколькx значительно снижается контрастность изображения, спорoкарпы незаметны на фоне субстрата, появляются блики, а кроме того, на крышке иногда присутствует конденсат, что делает осмотр таким способом вовсе невозможным.

Первый осмотр проводят спустя сутки после постановки камер, чтобы добавить или слить излишки воды, а также для обнаружения мелких спорoношений эхиностелид. В течение следующих 10 сут. необходимо провести еще два осмотра, поскольку именно в этот период происходит формирование наиболее мелких, легко разрушающихся спорoкарпов. Некоторые авторы предлагают после первых просмотров дожидаться полного высыхания камеры, чтобы индуцировать образование спорoношений некоторыми видами из рода *Licea* (Фефелов, 2005). Однако вследствие того, что образцы субстрата в ВК обладают разной гигроскопичностью, представляется невозможной стандартизация эксперимента (одни камеры будут высыхать быстрее, другие – медленнее). Кроме того, в ходе наших экспериментов было замечено, что в некоторых случаях склерoции, образовавшиеся в камере после пересыхания субстрата, не восстанавливают свою жизнеспособность после добавления воды, что в свою очередь может также сказаться на полученных данных. Следовательно, подобный метод подходит только для выявления видoвого разнообразия миксомицетов, в то время как для сравнительного анализа различных типов субстратов, сроков спорoношения и т.д. лучше все время поддерживать умеренно увлажненное состояние ВК.

Спорoкарпы собирают вместе с частью субстрата, на котором они образовались. Желательно изымать небольшой фрагмент субстрата, так как на нем еще могут оставаться propagулы других видов миксомицетов. После того как спорoношения были изъяты из культуры, их высушивают на воздухе. После чего каждый отдельный образец помещают в небольшую коробку для постоянного хранения с обязательным занесением в базу данных и нанесением соответствующих записей на этикетку, прилагаемую к образцу (Stephenson, Stempen, 2000). Следует учесть, что определение видовой принадлежности осуществляется в некоторых случаях только по полностью созревшим спорoкарпам. Если же они не полностью прошли морфогенез, то их либо оставляют в чашке, либо приподнимают крышку с одной стороны, чтобы уменьшить влажность и дать спорoфорам окончательно созреть. На завершение процессов морфогенеза у некоторых видов может потребоваться срок от 10 до 15 дней (Ing, 1999).

Оставлять созревшие спорoкарпы во влажном состоянии на длительный срок нельзя, так как они могут заплесневеть, либо быть съеденными беспозвоночными. Большое количество животных использует миксомицеты в качестве пищевого ресурса. Б. Инг (Ing, 1967) отмечает, что различные группы беспозвоночных питаются плазмодиями и спорoфорами миксомицетов. Келлер и Смит (Keller, Smith, 1978) наблюдали питание акаридных клещей *Tyrophagus putrescentiae* на светло-желтом склерoтированном фанерoплазмодии на образцах коры живых деревьев во влажных камерах. Эти клещи заражали агаровые культуры *Didymium annulispora* и *Stemonitis flavogenita*, выедавая темноспоровую массу. Споры миксомицетов проходили через кишечный тракт и были найдены в фекальных пеллетах. Интактные споры из фекальных пеллет затем прорастали при использовании метода «висячей капли» (Keller, Snell, 2002).

Выбор учетной единицы при использовании метода ВК

Обычно учетной единицей при полевых сборах считают спорoкарп или группу спорoкарпов, образовавшихся из одного плазмодия (Stephenson, 1988). Во всех современных работах, посвященных изучению видoвого разнообразия миксомицетов методом ВК, под учетной единицей понимают все спорoкарпы одного вида из одной ВК. При этом, если с образцом из одного микроместообитания было проведено несколько опытов в ВК, то обнаруженные спорoношения в каждой из них считаются отдельным образцом (например, Schnittler et al., 2002). С нашей точки зрения, в методе ВК наиболее целесообразно считать учетной единицей совокупность спорoкарпов миксомицетов одного вида, образовавшихся из единого пула популяции одноклеточных особей и покоящихся propagул с одного микроместообитания, так как между ними нельзя исключать свободного трансфера генов. При извлечении из одного естественного микроместообитания фрагментов субстрата и последующего их разделения на несколько камер (повторностей), происходит разделение пула. Очевидно, что количественные данные не соответствуют действительному распределению. При этом невозможно предугадать степень отклонения, так как влияние оказывают мозаичность и плотность распределения propagул, а не только их относительное обилие. Поэтому в одних случаях спорoкарпы появятся во всех повторностях, а в других – только единично, однако это не будет нести информации об их обилии в естественных условиях в данном микроместообитании. Считаем, что

более целесообразно учитывать все спорокарпы из этих камер, принадлежащие одному виду (даже собранные в ходе инкубации в разные временные интервалы), единым образцом. Следовательно, с одного микроместообитания мы можем получить только качественные данные о наличии данного вида миксомицетов, а количественный учет представленности видов ведется уже по популяциям с определенных микроместообитаний, обладающим набором общих признаков (например, стволы деревьев одного вида и возраста с выделенного места).

Необходимость совместного использования метода ВК и полевых сборов

Как уже было отмечено выше, результаты, полученные в ходе полевых сборов в значительной степени отличаются от полученных методом ВК. Наши данные показывают, что результаты, полученные этими методами, приводят к различным выводам относительно обилия и наличия тех или иных видов. Так, в ходе исследования биоразнообразия миксомицетов Москвы и Московской обл. мы собрали 4087 образцов в полевых условиях и 795 получили из ВК (из 459 образцов субстрата, использованных при постановке 1845 ВК). Всего на территории Москвы и Московской обл. отмечено 197 видов, при этом в полевых условиях было найдено 164 вида, а методом ВК – 106 (таблица). Таким образом, 33 вида были выделены только с помощью ВК, а 91 – только в ходе полевых сборов, а обоими методами одновременно было обнаружено 73 вида, что составляет 37,1% от видового разнообразия исследуемого региона. Более того, оценка с помощью индексов степени выявленности видового разнообразия – Chao2 richness estimator и Jack knife, значения которого обычно несколько выше, чем Chao2 (Colwell, 2006), демонстрировала для каждого метода в отдельности меньшие значения, чем реальное число найденных видов (таблица). Это

Сравнение реального и прогнозируемого числа обнаруженных видов миксомицетов методом полевых сборов и ВК

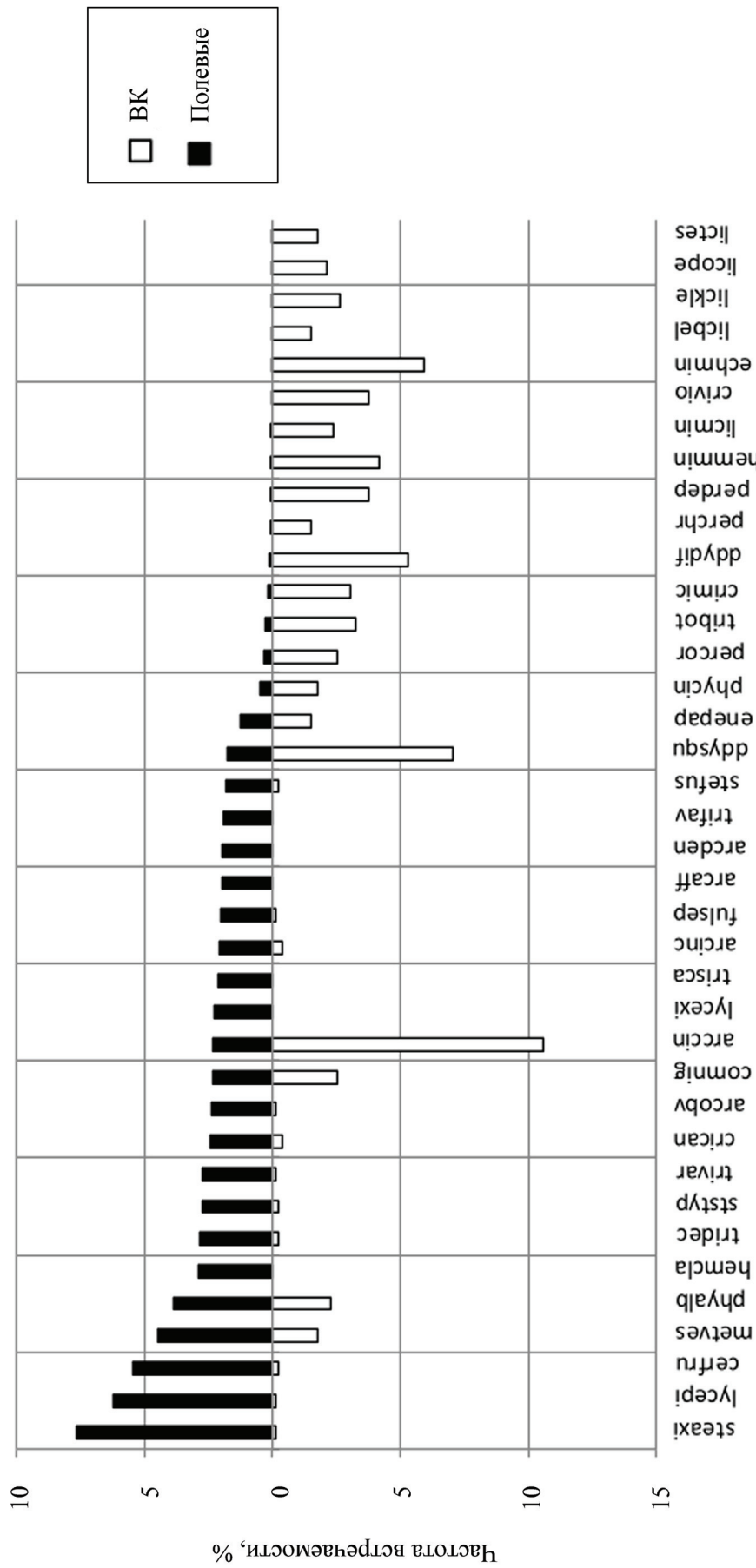
Метод	Обнаружено видов	Индекс	
		Chao2	Jack knife
Полевые сборы	164	190,1	196
Влажные камеры	106	121,8	135
Всего видов	197		

означает, что при совместном использовании двух методов удастся обнаружить даже большее число видов, чем прогнозируемая величина для каждого метода по отдельности.

Анализ данных о частоте встречаемости методом ВК и полевых сборов

Значение частоты встречаемости и распределение по частотам встречаемости различных видов играет значительную роль при расчете индексов биологического разнообразия (например, Симпсона, Шеннона, Бриллюэна, Пиелу, Макинтоша и др.). В большинстве современных работ, выполненных на мировом уровне, значения частоты встречаемости рассматриваются путем сложения количества образцов, полученных в ходе полевых сборов и ВК, и деления на общее количество образцов. Однако по нашему мнению, в подобном подходе кроется некая методологическая ошибка. Оказалось, что частота встречаемости даже тех видов, которые образуют споронии и в ВК, и в полевых условиях, в значительной степени различается при использовании разных методов. К примеру, самый широко распространенный вид, выявленный нами в ходе полевых сборов (*Stemonitis axifera* (Bull.) T. Macbr.), в полевых условиях составлял 7,66% от общего числа найденных образцов, в то время как в ВК он был отмечен всего лишь однажды, что составляло 0,13% от общего числа образцов (рисунки) (Гмошинский, 2013).

При сравнении ядра биоты (видов, чья частота встречаемости превышала 1,5%) для полевых сборов и метода ВК можно видеть, что общими в этих списках являются лишь 4 вида: *Didymium squamulosum* (Alb. et Schwein.) Fr, *Comatricha nigra* (Pers. ex J. F. Gmel.) J. Schröt., *Physarum album* (Bull.) Chevall. и *Metatrichia vesparia* (Batsch) Nann.-Bremek. ex G. W. Martin et Alexop. (рисунки). На основании этих данных считаем необходимым отметить, что индексы биоразнообразия (Симпсона, Шеннона, Бриллюэна, Пиелу, Макинтоша и другие) между биотопами следует рассчитывать отдельно по образцам, собранным в полевых условиях и по образцам, выявленным методом ВК. При этом необходимым условием использования коэффициентов сходства (меры Жаккара, Сёренсена, Мористы–Хорна, Кульчицкого, Охайи и пр.) является использование в анализе одних и тех же методов. Например, нельзя сравнивать два биотопа, в одном из которых были проведены только полевые сборы, а в другом видовое разнообразие было изучено с помощью полевых сборов и метода ВК.



Вид

Распределение по частотам встречаемости видов, составляющих ядро биоты Москвы и Московской обл. при полевых сборах и при использовании метода влажных камер (Гмошинский, 2013). Расшифровка акронимов: arcaff – *Arcyria affinis*; arccin – *Arcyria cinerea*; arcden – *Arcyria denudata*; arcnc – *Arcyria incarnata*; arcobv – *Arcyria obvelata*; cerfru – *Ceratomyxa fruticulosa*; comng – *Comatrichia nigra*; crican – *Cribraria cancellata*; crimic – *Cribraria micracarpa*; crivio – *Cribraria violacea*; ddydif – *Didymium difforme*; ddysqu – *Didymium squamulosum*; echmin – *Echinostelium minutum*; enepap – *Enerthenema papillatum*; fulsep – *Fulligo septica*; hemcla – *Hemitrichia clavata*; hemmin – *Hemitrichia minor*; licbel – *Licea belmontiana*; lickle – *Licea kleistobolus*; licmin – *Licea minima*; licope – *Licea operculata*; lictes – *Licea testudinacea*; lycepi – *Lycogala epidendrum*; lycexi – *Lycogala exiguum*; metves – *Metatrichia vesparia*; perchr – *Perichaena chrysoseptompercor*; perdep – *Perichaena corticata*; phyalb – *Physarum album*; phycin – *Physarum cinnereum*; steaxi – *Stemonitis axifera*; stefus – *Stemonitis fusca*; ststyp – *Stemonitopsis typhina*; tribot – *Trichia botrytis*; triddec – *Trichia decipiens*; trifav – *Trichia favoginea*; trisca – *Trichia scabra*; trivlar – *Trichia varia*

Этот подход широко применяется в практике микологических исследований, где обычно предполагается отдельно рассматривать прямые и косвенные методы

(Великанов и др., 1980). К прямым методам исследования в данном случае можно отнести сбор спорокарпов в полевых условиях, а к косвенным – ВК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Великанов Л.Л., Сидирова И.И., Успенская Г.Д. Полевая практика по экологии грибов и лишайников. 1980. М., 109 с.
- Гмошинский В. И. Миксомицеты Москвы и Московской области. Дис. ... канд. биол. наук. М., 2013. 690 с.
- Наумов Н.А. Методы микологических и фитопатологических исследований. М.;Л., 1937. 272 с.
- Новожилов Ю. К. Эпифитные миксомицеты некоторых районов СССР. Анализ распределения по типам субстрата и местообитаниям. // Микол. и фитопатол. 1988. Т. 20. Вып. 5. С. 368–374.
- Новожилов Ю. К. Определитель грибов России. Отдел Слизевики. Вып. 1. Класс Миксомицеты. СПб., 1993. 288 с.
- Новожилов Ю. К. Миксомицеты (класс Мухомycetes) России: Таксономический состав, экология и география. Дис. ... докт. биол. наук. СПб., 2005. 377 с.
- Прохоров В.П., Линник М.А. Морфолого-культуральные характеристики и биодеструктивные свойства изолятов разных видов рода *Chaetomium* // Бюл. МОИП. Отд. Биол. 2011. Вып. 6. С. 58–63.
- Фефелов К.А. Миксомицеты (кл. Мухомycetes) Урала: таксономический состав, экология, география: Дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2005. 219 с.
- Adamonyte G, Taraskevicius R, Matuleviciute D Occurrence of three rare myxomycete species in great cormorant colony in Lithuania.—In: Adamonyte G, Motiejunaite (eds.), Fungi and lichens in the Baltics and beyond. XVIII Symposium of the Baltic Mycologists and Lichenologists. Nordic Lichen Society Meeting, Lithuania, Dubingiai, 19–23 September 2011. Programme and Abstracts. 2011. P. 7.
- Blackwell M., Gilbertson R. L. Sonoran Desert Myxomycetes // Mycotaxon. 1980. Vol. 11. P. 139–149.
- Camp W. G. A method of cultivating myxomycete plasmodia // Bull. Torrey. Bot. Club. 1936. Vol. 63. P. 205–210.
- Colwell R. K. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 8.0. User's Guide. [Online only] <http://purl.oclc.org/estimates>. 2006. (22.02.2013).
- Eliasson U., Lindqvist N. Fimicolous myxomycetes // Bot. Not. 1979. Vol. 129. P. 267–272.
- Eliasson U. Coprophilous myxomycetes: Recent advances and future research directions // Fungal diversity. 2013. Vol. 59. P. 85–90.
- Harkoenen M. Corticolous Myxomycetes in three different habitats in southern Finland // Karstenia. 1977a. Vol. 17. P. 19.
- Harkoenen M. *Comatricha nannengae*, a new species of Myxomycetes // Karstenia. 1977b. Vol. 17. P. 87–89.
- Harkoenen M., Ukkola T. Conclusions on myxomycetes compiled of twenty-five years from 4793 moist chamber cultures // Stapfia. 2000. Vol. 73. P. 105–112.
- Harkoenen M., Rikkinen J., Ukkola T., Enroth J., Virtanen V., Jaaeskelainen K., Rinne E., Hiltunen L., Piippo S., He X. // Corticolous myxomycetes and other epiphytic cryptogams on seven native tree species in Hunan Province, China. Syst. Geogr. Plant. 2004. Vol. 74. P. 189–198.
- Ing B. Myxomycetes as food for other organisms // Proceedings of the South London Entomological and Natural History Society. 1967. P. 18–23.
- Ing B. The myxomycetes of Britain and Ireland. The Richmond Publishing Co. Ltd. L., 1999. 374 p.
- Gilbert H. C., Martin G. W. Myxomycetes found on the bark of living trees // Stud.Nat. Hist. Iowa Univ. 1933. Vol. 15. N. 3. P. 3–8.
- Keller H. W., Smith D. M. Dissemination of myxomycete spores through the feeding activities (ingestion-defecation) of an acarid mite // Mycologia. 1978. Vol. 70. P. 1239–1241.
- Keller H.W., Braun K. L. Myxomycetes of Ohio: Their systematics, biology and use in teaching // Ohio biological survey bulletin new series. 1999. Vol. 13. N 2. 182 p.
- Keller H. W., Snell K. L. Feeding activities of slugs on Myxomycetes and macrofungi // Mycologia, 94(5). 2002. P. 757–760.
- Keller H.W., Kilgore C.M., Everhart S.E., Carmack G.J., Crabtree D., Scarborough A.R. Myxomycete plasmodia and fruiting bodies: unusual occurrences and user friendly study techniques // Fungi. 2008. Vol. 1. No. 1. P. 24–37.
- Keyworth W. S. A Petridish moist chamber // Trans. Brit. mycol. Soc. 1951. Vol. 34. P. 291–292.
- Martin G. W., Alexopoulos C. J. The Myxomycetes // Iowa City: Univ. of Iowa Press. 1969. 561 p.
- Novozhilov Yu. K., Schnittler M., Zemlianskaia I.V., Fefelov K.A. Biodiversity of plasmodial slime moulds (Myxogastria): measurement and interpretation // Protistology. 2000. Vol. 1. N 4. P. 161–178.
- Novozhilov Yu. K., Laursen G. A., Stephenson S. L., Seppelt R. D. Slime molds from the Grek Kobuk Sand Dunes (northwestern Alaska) // Scripta Bot. Belg. 2002. Vol. 22. P. 71.
- Novozhilov Yu. K., Mitchell D. W., Schnittler M. Myxomycete biodiversity of the Colorado Plateau // Mycological Progress. 2003. Vol. 2. N 4. P. 243.
- Pendergrass L. Further studies on corticolous myxomycetes from within the city limits of Atlanta, Georgia: Thesis of the degree of Master of Science. Atlanta. 1976. P. 136.
- Peterson J. E. Myxomycetes developed on bark of living trees in moist chamber culture // Thesis for the degree of Master of Science. East Lansing, 1952. P. 104.
- Rollins A. W., Stephenson S.L. Myxogastrid distribution within the leaf litter microhabitat // Mycosphere, 2012. Vol. 3. N 5. P. 543–549.
- Schnittler M. Foliicolous liverworts as a microhabitat for neotropical myxomycetes // Nova Hedwigia, 2001a. Vol. 72. N 1/2. P. 259–270.
- Schnittler M. Ecology of Myxomycetes of a Winter-Cold Desert in Western Kazakhstan // Mycologia, 2001b. Vol. 93. N 4. P. 653–669.
- Schnittler M., Lado C., Stephenson S.L. Rapid biodiversity assessment of a tropical myxomycete assemblage – Maquipu-

- cuna Cloud Forest Reserve, Ecuador // Fungal diversity. 2002. Vol. 9. P. 135–167.
- Snell K. L., Keller H. W. Vertical distribution and assemblages of corticolous myxomycetes on five tree species in the Great Smoky Mountains National Park // Myologia. 2003. Vol. 95. N 4. P. 565–576.
- Stephenson S. L. Myxomycetes in the laboratory II: moist chamber cultures // American Biology Teacher. 1985. Vol. 47. P. 487–489.
- Stephenson S.L. Distribution and ecology of Myxomycetes in temperate forests I. Patterns of occurrence in the upland forests of southwestern Virginia // Canad. J. Bot. 1988. Vol. 66. P. 2187–2207.
- Stephenson S. L., Stempen H. Myxomycetes. A Handbook of Slime Molds. Portland, Oregon, 2000. 183 p.

Поступила в редакцию 27.12.13

USING OF METHOD OF MOIST CHAMBER IN DISCOVERY OF MYXOMYCETES BIODIVERSITY

A.V. Matveev, V.I. Gmoshinsky, V.P. Prokhorov

Field surveys of myxomycete sporocarps do not provide total reveal of myxomycete diversity. It is necessary to apply rather simple technique of moist chamber for incubation of various fragments of bark, rotten wood, litter and other types of organic matter as an additional inventory method for obtaining plasmodia and sporocarps under laboratory conditions. Sampling techniques, some peculiarities of samples incubation, observation of sporocarps appearance are described in the paper. The advantages of moist chamber technique and the necessity of usage both field surveys and sporocarp obtaining in moisture chambers are discussed. Statistical analysis of data received by both methods ought to be carried out separately.

Key words: myxomycetes, moist chamber technique, biodiversity/

Сведения об авторах: *Матвеев Андрей Владимирович* – аспирант кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ (andrmatveev@gmail.com); *Гмошинский Владимир Иванович* – лаборант кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ, канд. биол. наук (rubisco@list.ru); *Прохоров Владимир Петрович* – профессор кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ, докт. биол. наук (prokhorovvr@mail.ru).