

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

КОНОВАЛОВА Ольга Петровна

**МИКОБИОТА ВОДОРΟΣЛИ *ASCOPHYLLUM NODOSUM*
(PHAEOPHYCEAE, FUCACEAE) В БЕЛОМ И БАРЕНЦЕВОМ МОРЯХ**

03.02.12–микология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2012

Работа выполнена на кафедре микологии и альгологии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, на Беломорской Биологической станции имени Н.А. Перцова МГУ имени М.В. Ломоносова и в лаборатории экспериментальной эмбриологии Института Биологии Развития имени Н.К. Кольцова РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор

Сидорова Ирина Ивановна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор

Чернов Иван Юрьевич

кандидат биологических наук, с.н.с.

Семенова Татьяна Александровна

Ведущая организация:

Ярославский государственный педагогический университет имени К.Д. Ушинского

Защита состоится 27 апреля 2012 года в 15 ч 30 мин на заседании Диссертационного совета Д 501.001.46 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата биологических наук при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, аудитория М-1, тел./факс (495) 939-39-70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Отзывы (в двух экземплярах) просим отправлять по адресу: 119991 Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, МГУ, Биологический факультет, Кафедра физиологии растений, ученому секретарю Диссертационного совета Д 501.001.46. Факс (495) 939-39-70. А также просим высылать электронную копию отзыва на e-mail: oljakonovalova@gmail.com.

Автореферат разослан 27 марта 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,



кандидат биологических наук

М.А. Гусаковская

Актуальность темы

Фукусовые водоросли являются эдификаторами литоральных сообществ в арктических морях (Baardseth, 1970). Их заросли – укрытие для огромного числа морских животных, а поверхность их талломов – субстрат для развития своеобразных ценозов перифитона. Грибы могут участвовать в образовании различных ассоциаций с живыми водорослями, как патогены или симбионты, и сапротрофы (Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1979).

Из всего разнообразия ассоциаций морских водорослей с грибами одной из наиболее важных является облигатная симбиотическая связь. Примером такой ассоциации является сожительство эндофитного аскомицета *Stigmidium ascophylli* (Cotton) Aptroot с доминантами литоралей северных морей – фукусовыми водорослями *Ascophyllum nodosum* (L.) LeJolis и *Pelvetia canaliculata* (L.) Dcne et Thur. Такой тип сосуществования аскомицета и водоросли-макрофита называют микофикобиозом (Kohlmeyer, Volkmann-Kohlmeyer, 1972). Несмотря на то, что эта ассоциация давно известна, многие аспекты ее биологии остаются неизученными (Garbary, Deckert, 2001).

Вид *A. nodosum* интересен не только тем, что образует микофикобиоз с грибом, но и тем, что он образует несколько бентоплейстонных экологических форм (экад), которые обычно обитают в условиях, нехарактерных для типичной прикрепленной формы (Максимова, Мюге, 2007). Это, а также анатомическое строение *A. nodosum*, отличное от других фукоидов, позволяет предполагать, что присутствие гриба в талломе водоросли влияет на эволюцию и адаптивные способности данного вида.

Помимо симбионта, в талломах водоросли обитает множество других грибов – сапротрофов. Видовой состав и функции этого сообщества ранее не изучались. В целом, микобиота бурых водорослей, в том числе, фукусовых, исследовалась мало и несистематически (Zuccaro, 2008). На филогению морских грибов и их роль в сообществах существуют разные точки зрения, однако несомненно, что морские грибы являются неисследованным еще резервуаром новых для науки видов и биологически активных веществ (Пивкин, 2010).

В связи с многообразием функций, выполняемых грибами в морских сообществах, изучение морских грибов представляется крайне важным, как с теоретической точки зрения (для понимания их эволюции, экологии и функционирования морских сообществ), так и для их возможного практического применения.

Цель работы: изучить грибы, ассоциированные с водорослью *Ascophyllum nodosum* (Ochrophyta, Phaeophyceae) в Белом и Баренцевом морях.

Задачи:

1. Изучить видовой состав грибов на поверхности и внутри талломов *Ascophyllum nodosum* из разных географических точек.
2. Сравнить видовой состав грибов с водоросли с микобиотой сопутствующих грунтов.
3. Создать коллекцию культур мицелиальных грибов.
4. Изучить характер роста доминирующих видов при различных условиях (соленость, температура) и способность их спор прорасти в морской воде.
5. Изучить экспрессию генов-индикаторов осмотического стресса у некоторых галотолерантных видов.
6. Изучить морфологию и биологию *Stigmidium ascophylli* в талломах различных экологических форм *Ascophyllum nodosum* и *Pelvetia canaliculata* в Белом море.
7. Уточнить молекулярными методами филогенетическую позицию симбиотического гриба *Stigmidium ascophylli* и видов, определение которых по морфологическим данным проблематично

Научная новизна и практическая значимость

Для выделения микроскопических грибов из внутренних частей талломов водорослей на питательные среды нами была разработана оригинальная методика. Суть метода заключается в применении питательной среды на основе вытяжки из *A. nodosum* в качестве селективного субстрата. Помимо этого мы подобрали сроки инкубирования посевов так, чтобы выявить основные группы видов, растущих с разной скоростью.

Впервые было исследовано сообщество мицелиальных грибов бурой водоросли *A. nodosum*. Настолько полное и всестороннее исследование микобиоты – как поверхностной, так и эндофитной, с использованием широкого спектра прямых, культуральных и молекулярных методов, проведено впервые для морских водорослей-макрофитов. Были выявлены виды, ранее не отмечавшиеся в море. Микобиота водоросли характеризуется большим разнообразием и высокой частотой изолятов формального рода *Acremonium* и других анаморф из пор. Нуротреалес. Многие такие изоляты не поддавались определению стандартными методами, а в результате молекулярной идентификации некоторые из них не могли быть причислены ни к одному из известных видов. Впервые достоверно показано, что среди морских анаморфных грибов существует большое количество новых видов, не обладающих явными отличительными морфологическими признаками вследствие вторичного упрощения конидиальных структур в водной среде. В результате нашей работы был выделен и исследован новый для науки галофильный вид рода *Emericellopsis* sp.1. Создана коллекция изолятов морских мицелиальных грибов. Эта коллекция включает в себе

большой потенциал для поиска новых биологически активных веществ и для исследования физиологических свойств морских грибов, а также для выявления и описания новых для науки видов.

В результате исследования характера роста на средах разной солености у двух видов рода *Acremonium* (*A. fuci*, *A. dichromosporum*) и *Emericellopsis* sp. 1. впервые показано, что при повышении солености виды с простым строением конидиеносных структур тяготеют к усложнению их строения.

Изменение уровня экспрессии гена белка теплового шока коррелировало со скоростью роста и изменениями морфологии у вида *Emericellopsis* sp. 1. Данный вид можно использовать в дальнейшем в качестве модельного для изучения адаптаций грибов к экстремальным условиям обитания.

В нашей работе впервые была исследована ассоциация симбиотического гриба *Stigmatidium ascophylli* с фукусовой водорослью *A. nodosum* в Белом море. Выяснилось, что жизненный цикл этой ассоциации в условиях установления зимнего ледового покрова отличается от жизненного цикла из ранее исследованных территорий. Впервые грибной эндосимбионт был обнаружен и исследован у вегетативных экологических форм *A. nodosum* ecad *scorpioides* и *A. nodosum* ecad *muscooides*. Обнаружено, что разные экады водоросли могут иметь грибных симбионтов разных видов, то есть сожительство с грибом необходимо для существования *A. nodosum*, даже если гриб-эндобионт не является исходно симбиотическим. С помощью методов геносистематики уточнено таксономическое положение *S. ascophylli*; впервые для этого вида получены последовательности генов ITS1-5.8S-ITS2.

Апробация работы. Основные положения были доложены на VII конференции молодых ученых «Ломоносов» (2008); конференции, посвященной 70-летию Беломорской Биологической станции им. Н.А. Перцова (2008); 11 Международном Симпозиуме по Морским и Пресноводным грибам (IMFMS 11, Тайвань, Taichung, 2009); на заседании лаборатории микологии Ботанического Института РАН (Санкт-Петербург, 2009); на семинарах Беломорской биостанции МГУ (2009-2011 гг.), а также заседаниях кафедры микологии и альгологии Биологического факультета МГУ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание материалов, методов и результатов работы, выводов и приложений. Диссертация изложена на ____страницах, содержит ____иллюстраций (рисунки, таблицы). Список литературы включает ____источника.

Обзор литературы

В обзоре литературы приведены общие сведения о морских грибах и методических подходах к изучению их разнообразия. Рассмотрены основные признаки морфологии и физиологии, свойственные морским грибам. Особое внимание уделено грибам, обитающим на бурых водорослях-макрофитах, и особенностям сообществ, формирующихся на фукусовых водорослях. Приведена история изучения и вся существующая информация об ассоциации аскомицета *S. ascophylli* с водорослью *A. nodosum*.

Материалы и методы исследований

Отбор образцов. Всего было заложено три трансекты (табл. 1). Для сбора образцов в Белом море, в окрестностях Беломорской Биологической Станции (ББС) МГУ им. Н.А. Перцова в 2009 году были выбраны участки побережья, на которых были представлены все существующие экологические формы (экады) *A. nodosum*: губа Кислая на полуострове Киндо (66°32'10" СШ, 33°04'43" ВД) и губа Нильма (66°30'13" СШ, 33°05'38" ВД). В Баренцевом море в районе биостанции Мурманского Морского Биологического института (ММБИ) РАН Дальние Зеленцы вегетативные экады не были обнаружены, поэтому для закладывания трансекты была выбрана губа Ярнышная (69°05'18" СШ, 36°03'26" ВД), где литораль могла быть подразделена на зоны. Все три местообитания похожи – это закрытые губы с относительно широкой зоной аккумулятивной литорали. На каждой трансекте было выделено 7 уровней, где 1 – сублитораль, 7 – супралитораль. На каждом уровне отбирали в стерильные пакеты по три образца, на небольшом расстоянии друг от друга, каждый образец состоял из 5 талломов *A. nodosum*. Также на каждом уровне стерильно отбирали образец грунта для сравнительного анализа микобиоты (табл.1).

Для исследования биологии гриба-симбионта *A. nodosum* и *P. canaliculata* талломы водорослей отбирали в окрестностях ББС круглогодично, с 2008 по 2010 годы. Отобранные образцы водорослей делили на две части: одна часть использовалась для прямых наблюдений под биноклем и микроскопом, а также для инкубирования методом влажных камер (Литвинов, Дудка, 1975); вторая часть образцов использовалась для посевов на культуральные среды. Талломы разных экологических форм *A. nodosum* были зафиксированы в 96% этаноле для выделения ДНК и изучения филогении *S. ascophylli*.

Культуральные методы. Для выделения мицелиальных грибов в культуру использовали оригинальную селективную среду на основе вытяжки из *A. nodosum*. Посевы для изучения поверхностной микобиоты водорослей проводили путем раскладывания промытых частей талломов на агаризованную среду. Эндофитные грибы выделяли так же, но талломы водорослей подвергали поверхностной стерилизации 70% этанолом и гипохлоритом натрия. Посевы грунтов производили методом серийных разведений по стандартной

Табл. 1. Количество отобранных на трансектах образцов. Номера трансект далее во всем тексте те же

трансекта	время сбора	№ трансекты	количество образцов водорослей	количество образцов грунтов
Белое море_Кислая губа	июнь	91	63	7
Белое море, Нильмогуба	июнь	92	63	7
Баренцево море, губа Ярнышная	июль	93	42	7
Всего образцов			168	21

методике (Методы..., 1991) на среды агар Чапека, сусло-агар и среду на основе вытяжки из *A. nodosum*. Чистые культуры пересеивали на сусло-агар или селективную среду.

Физиология полученных изолятов. Для экспериментов с ростом изолятов при различной солености использовали агар Чапека с добавлением NaCl или морской воды. Для исследования способности роста в море изоляты рода *Acremonium* тестировали на прорастание конидий в морской воде (Вугне, Jones, 1975). Изучали особенности роста полученных изолятов на средах разного состава: сусло, аскофиллум-агар, овсяный агар, голодный агар, среды с различными источниками углерода.

Помимо культуральных методов определения оптимумов роста, проводили исследование экспрессии гена Hsp12 (малый белок теплового шока, 70 кДа) у изолятов *Acremonium dichromosporum* Gams et Sivasith., *A. fuci* Summerb., Zuccaro et Gams и *Emericellopsis* sp.1. Культуры выращивали на средах с соленостью 0-30 ‰ с добавлением NaCl и на средах с морской водой с соленостью 0-60 ‰. В последнем случае инкубирование проводилось при температурах 8, 15 и 24 °C. Затем из мицелия выделяли РНК и делали библиотеку мРНК. Для ПЦР в реальном времени использовали праймеры Hsp12 RTF и Hsp12 RTR, специально сконструированные на основе предварительно полученных последовательностей этого гена у наших целевых изолятов.

Молекулярная идентификация изолятов проводилась стандартно на базе участка кластера рибосомальных генов ITS1-5.8S-ITS2. Для амплификации этого участка длиной около 600 п.н. использовали праймеры ITS-1 F (Gardes, Brunes, 1993) и ITS-4 (White et al., 1990). Полученные нуклеотидные последовательности представлены в базе данных GeneBank под номерами JQ796750-JQ796760. Дополнительно для уточнения видовой принадлежности некоторых изолятов рода *Acremonium* и *Embellisia* использовали участок гена β-тубулина. Этот участок, так же длиной около 600 п.н., амплифицировали с помощью праймеров T1-T2 (Glass, Donaldson, 1995). Обработку последовательностей делали в программе CodonCodAligner (<http://www.codoncode.com/aligner/>).

Построение филогенетических деревьев проводили на базе анализа последовательностей рибосомальных генов. Выравнивали с помощью программы ClustalW (Thompson et al., 1994). Для полученных выровненных последовательностей строили филогенетические деревья методом максимального правдоподобия (ML) с использованием GTR-модели (Swofford et al., 1996) в пакете программ MEGA 5 (Tamura, 2007). Статистическая поддержка ветвей проверялась с помощью Bootstrap-теста (Hillis, Bull, 1993). Итоговые деревья анализировали методом объединения соседних нуклеотидных пар NNI (Takahashi, Nei, 2000).

Результаты исследований

Результаты прямых наблюдений

Исследования поверхности водоросли. В результате прямых наблюдений и инкубирования талломов во влажных камерах были обнаружены мицелиальные грибы, дрожжи, бактерии и актиномицеты. На СЭМ фотографиях поверхность водоросли покрыта почти сплошным слоем микроорганизмов; при этом видны различия в обрастании на поверхности разных экологических форм *A. nodosum*. Поверхность типичной формы, обитающей в субиторали и нижней литорали, покрыта сплошным слоем диатомовых водорослей, встречаются нитчатые водоросли и мицелий грибов. На поверхности экады *A. nodosum* еcad *muscooides*, обитающей на супралиторали, видно большое количество мицелиальных структур, как эукариотных, так и прокариотных, и одноклеточных спор, похожих на конидии анаморфных грибов. Результаты инкубирования талломов во влажных камерах подтверждают этот результат: на талломах вегетативных форм чаще появляется спороношение гифомицетов, нежели на типичной форме, где можно наблюдать появление стерильных мицелиев после инкубации (табл. 2). Аскомицетов не было обнаружено, кроме известного симбионта *Stigmatidium ascophylli*. Помимо мицелиальных грибов в слизистых чехлах *A. nodosum* обитает большое количество различных дрожжей. В разрывах талломов поселяются бактерии. Разложение талломов при долгом экспонировании во влажных камерах осуществляется бактериями. Возможно, это объясняется тем, что в фукусовых водорослях действительно содержатся вещества, обладающие микостатическим действием (Chan, McManus, 1969).

Биология *S. ascophylli*, симбионта *A. nodosum*. Мицелий гриба-симбионта был обнаружен в тканях всех обследованных экологических форм *A. nodosum* (скальная форма *A. nodosum*, бентоплейстонная *A. nodosum* еcad *scorpioides* и маршевая *A. nodosum* еcad *muscooides*) и талломах *P. canaliculata*.

Мицелий во всех случаях был одного типа, тонкий, в разреженных тканях водоросли слегка вьющийся (рис. 1. А). Гифы образовывали сеть в межклеточном пространстве и

Табл. 2. Виды, обнаруженные в ходе наблюдений. + - обнаруженные виды. 91, 92, 93 – номера трансект

вид	91	92	93	метод обнаружения
<i>Acremonium</i> sp.	+			влажные камеры
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.		+		влажные камеры
<i>Cladosporium</i> sp.			+	влажные камеры
<i>Dendryphiella salina</i> (G.K. Sutherl.) Pugh et Nicot	+			влажные камеры
<i>Fusarium</i> sp.	+			влажные камеры
<i>Penicillium</i> sp.		+		влажные камеры
<i>Phoma</i> sp.	+			влажные камеры
<i>Stigmatidium ascophylli</i>	+	+	-	прямое наблюдение
<i>Verticillium</i> sp.	+			влажные камеры
Светлый стерильный мицелий	+	+	+	влажные камеры
Темный стерильный мицелий	+			влажные камеры

иногда встречались в клеточной стенке водоросли (рис. 1. Б). Плодовые тела *Stigmatidium ascophylli* как минимум по одному разу обнаружены на всех экологических формах *A. nodosum* и на *P. canaliculata*, в то время как анаморфная стадия (*Septoria ascophylli*) ни разу не была найдена.

Морфология структур размножения гриба (рис. 1. Г, Д, Е, Ж) описана нами на основании изучения живого материала *A. nodosum* и *P. canaliculata*. Видимо, это послужило причиной отличия некоторых найденных нами признаков аскоспор (наличие слизистого чехла, проростковой поры и капель масла в клетках) от ранее сделанных описаний других авторов (Webber, 1967; Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1972; Aptroot, 2006).

Жизненный цикл ассоциации описан нами только для Белого моря. Стромы гриба начинают развиваться на зачаточных рецептакулах водоросли к концу осени. После установления ледового покрова этот процесс останавливается и возобновляется после схода льда весной. Развитие и созревание псевдотециев *S. ascophylli* продолжается в течение июня, после чего происходит выброс половых продуктов водоросли одновременно с аскоспорами гриба. Уже через неделю прикрепленные проростки *A. nodosum* оказываются покрыты мицелием симбионта. Все эти процессы сильно ускорены по сравнению с ранее исследованными территориями вследствие установления ледового покрова в Белом море. Для сравнения исследовали образование ассоциации *S. ascophylli* с *P. canaliculata*. В последнем случае обнаружилось расхождение сроков размножения гриба и водоросли.

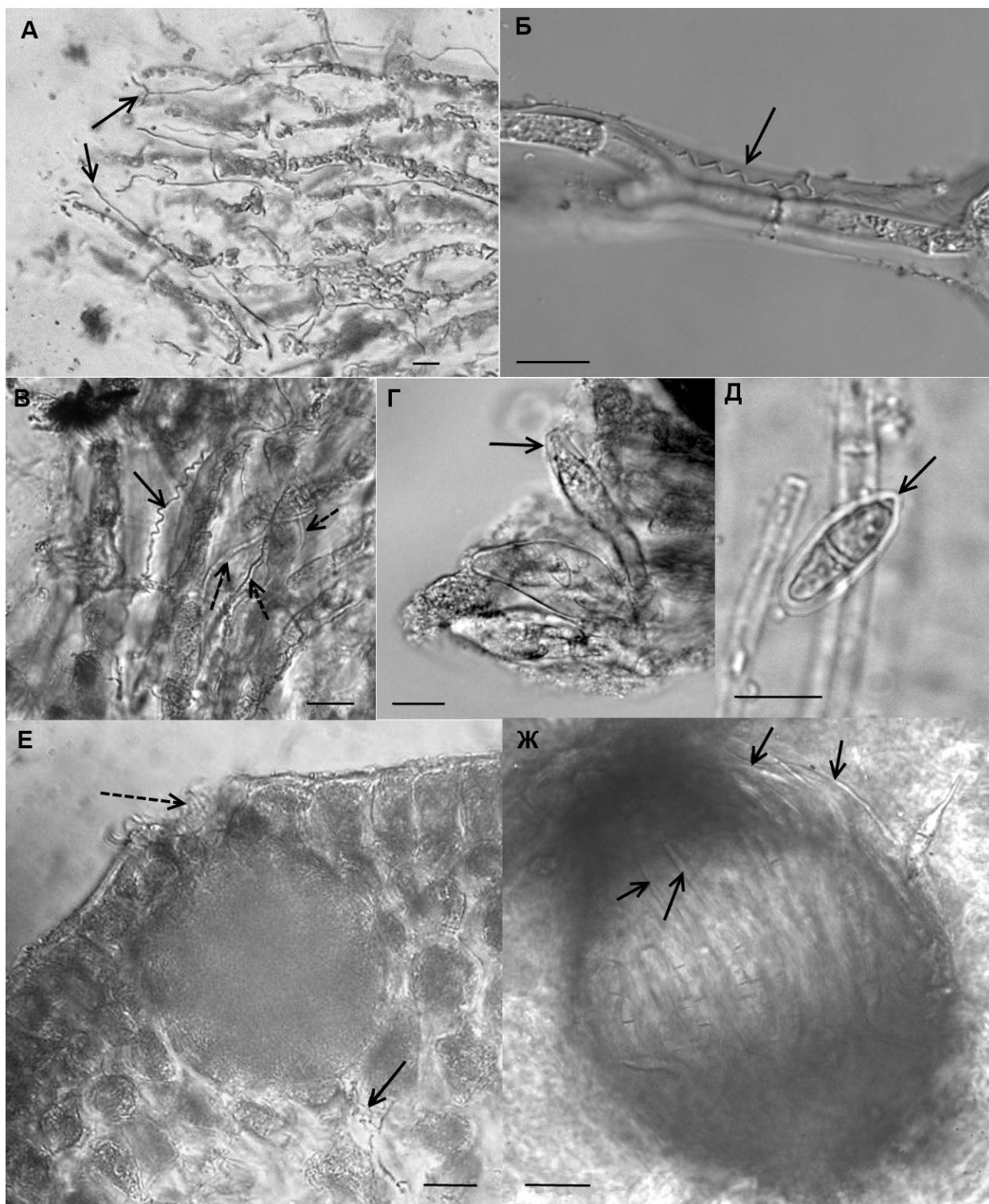


Рис. 1. А – мицелий в тканях *A. nodosum* *ecad muscoides* (указан стрелкой); Б – мицелий *S. ascophylli* в клеточной стенке *A. nodosum* (указан стрелкой); В – сильно извитой мицелий *S. ascophylli* (показан сплошной стрелкой) и более толстый мицелий сапротрофного гриба (пунктирная стрелка) в деградирующей 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 трихогинами, торчащими из остиоли (пунктирная стрелка) и питающей гифой (сплошная стрелка), выходящей из основания плодового тела; Ж – зрелый псевдотеций с псевдоперифизами (показаны стрелками). Все масштабные линейки на фотографиях имеют размер 10 мкм

Результаты посевов

Общая характеристика. При использовании культуральных методов на питательные среды были выделены различные микроорганизмы (рис. 2). Помимо мицелиальных грибов, из грунтов выделялось большое количество дрожжей, как аскомицетных, так и базидиомицетных.

На поверхности водорослей встречались бактерии и дрожжи, а после поверхностной стерилизации талломов преимущественно выделялись грибы и медленнорастущие актиномицеты. Такое распределение объясняется, по всей видимости, тем, что бактерии грунтов анаэробны, а бактерии, обитающие на поверхности водорослей – аэробны и потому могут быть выделены на среды. Актиномицеты, выделенные после поверхностной стерилизации, росли только в ассоциации с грибами, и представляют собой неизвестную ранее экологическую группу.

Всего выделено 439 изолятов мицелиальных грибов, которые относятся к 101 виду. Из них 2 вида принадлежат к отделу Zygomycota, остальные – аскомицеты. Из 99 видов отдела Ascomycota 3 – телеоморфных вида и 96 анаморфных. Самый представленный род – *Acremonium* (20 видов и морфотипов). Пор. Нуросcreales включает наибольшее число выделенных видов (43). Выделено 7 облигатно морских видов, 8 других видов ранее отмечались в морских местообитаниях (Jones et al., 2009).

Микобиота сопутствующих грунтов. Из 21 образца грунтов выделено 146 изолятов, относящихся к 46 видам. Небольшое количество видов мицелиальных грибов, возможно, связано с массовым развитием бактерий и дрожжей на питательных средах. В посевах из Нильмогубы наибольшее количество изолятов (рис. 3) принадлежит *Mucor hiemalis* Wehmer (24%) и *Dendryphiella* spp. (22%), в губе Ярнышной – видам рода *Penicillium* (21%) и *Acremonium* (24%). Суммарно в посевах из грунтов наиболее разнообразен род *Penicillium*. Мы не обнаружили представителей рода *Aspergillus*, в отличие от других работ по морским грунтам (Бубнова, 2005; Пивкин, 2009), где они отмечены среди доминирующих. По нашим данным, как уже отмечалось и ранее (Бубнова, 2005; Пивкин, 2009), количественный и качественный состав микобиоты зависит от гранулометрического состава грунтов и наличия пресного стока.

Поверхностная микобиота водорослей. Всего с поверхности водорослей из 168 образцов был выделен 241 изолят, относящихся к 54 видам, и 17 изолятов стерильных мицелиев (рис. 4). Среди 54 видов 3 – совершенные стадии аскомицетов, 51 вид – анаморфные грибы. Поверхностная микобиота водорослей из Белого моря характеризуется наличием зигомицетов (обилие вида *M. hiemalis* в Нильмогубе – до 23%), темноокрашенных грибов (*Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries, *D. salina*, *Cadophora fastigiata* Lagerb.

et Melin) и видов рода *Fusarium* и *Cylindrocarpon* (суммарно в посевах из Кислой губы до 30% обилия). Поверхностная микобиота водорослей из Баренцева моря резко отличается от беломорской тем, что в ней доминируют виды рода *Acremonium* (61% обилия). Для микобиоты поверхности *A. nodosum* в целом характерно большое количество изолятов темноокрашенных грибов из подотдела Dothideomycetidae. Только в поверхностных посевах были отмечены анаморфные пикнидиальные грибы. В сравнении с микобиотой сопутствующих грунтов снижается количество изолятов рода *Penicillium* и *Dendryphiella* spp., но увеличивается обилие видов родов *Acremonium* и *Fusarium* (рис. 5). В целом, общая картина грибного сообщества поверхности водорослей типична для таковых на других растительных субстратах (Dighton et al., 2005).

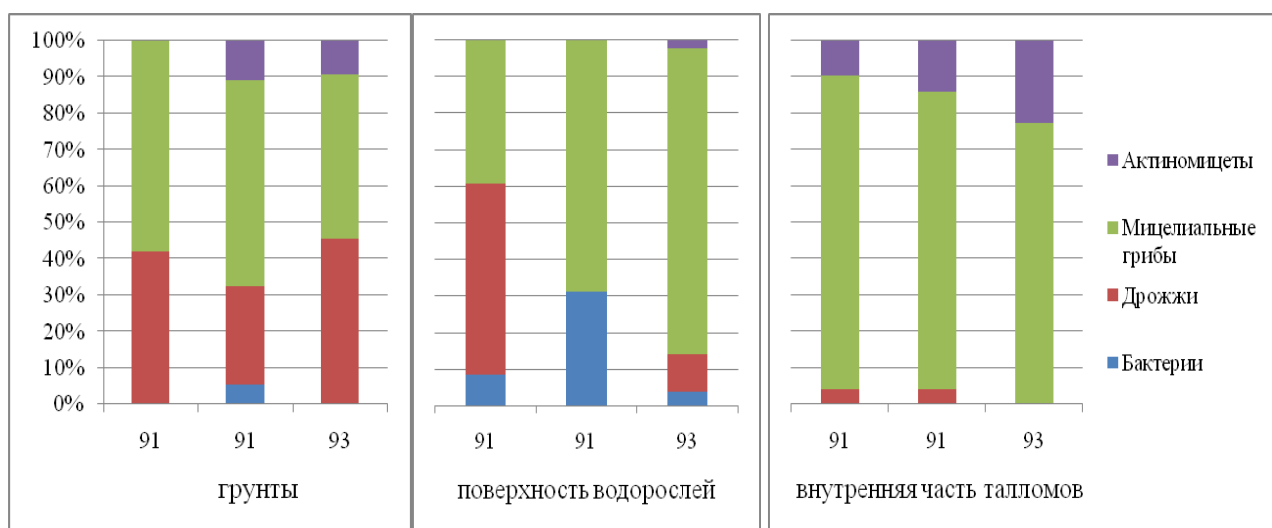


Рис. 2. Обилие выделенных микроорганизмов на трех трансектах. 91, 92 и 93 – номера трансект (см. табл. 1)

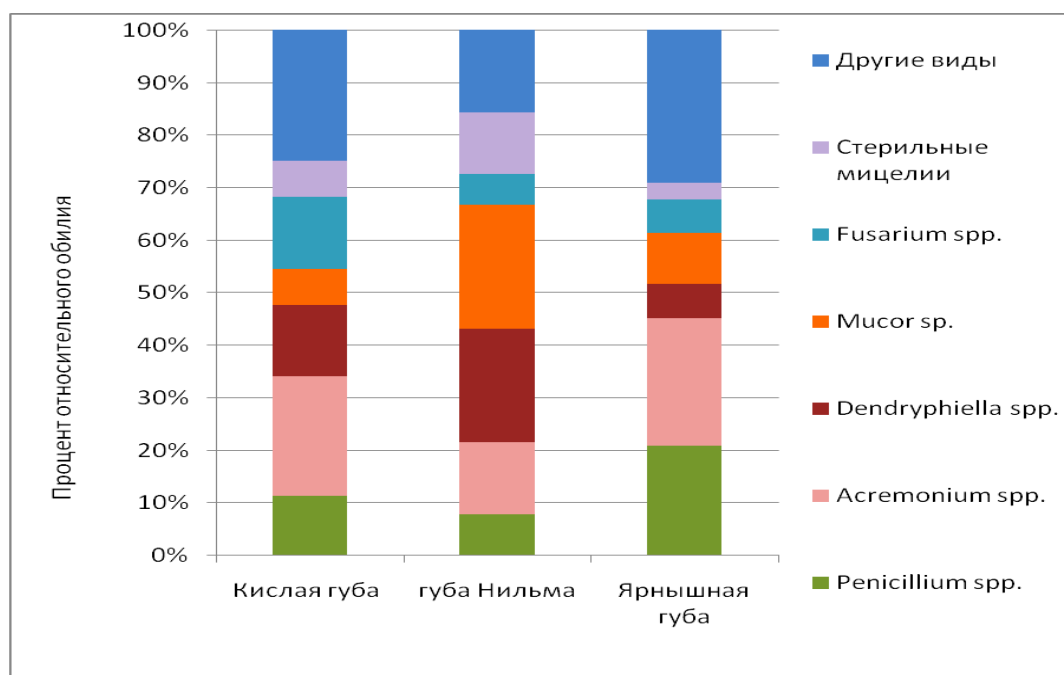


Рис. 3. Соотношение обилия (%) грибов, выделенных из сопутствующих грунтов по трансектам

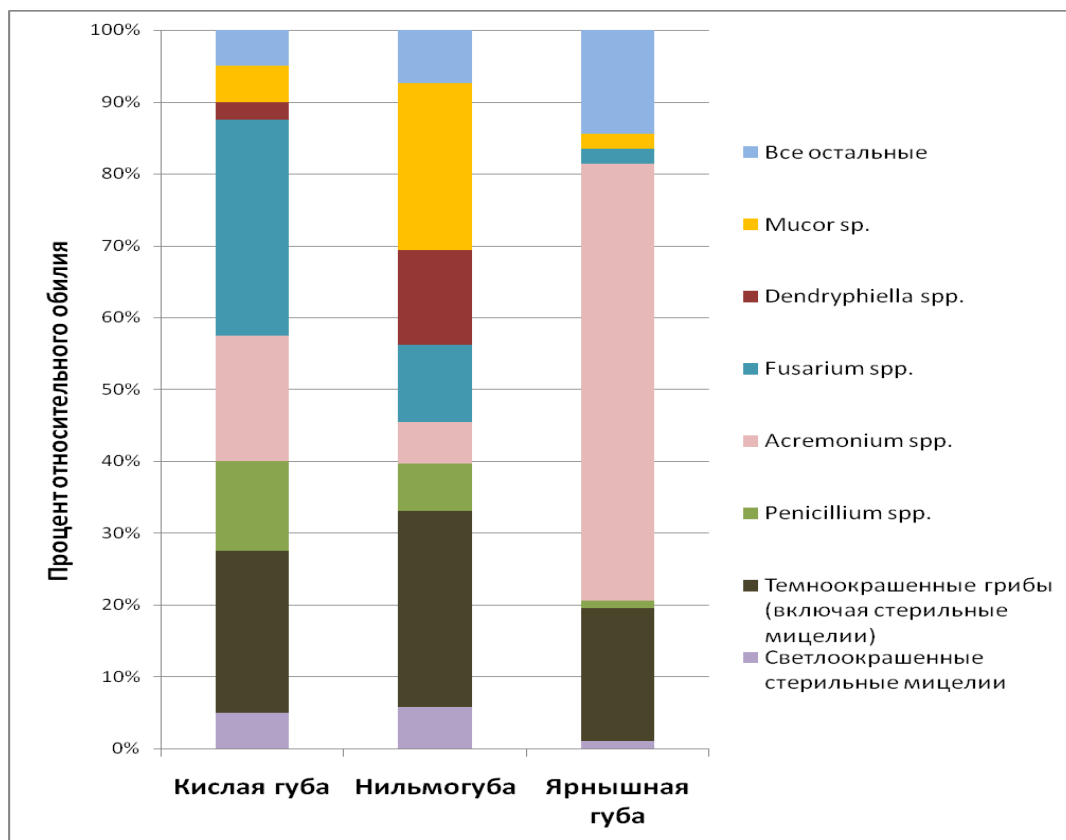


Рис. 4. Соотношение обилия (%) грибов поверхностной микобиоты водорослей по трансектам

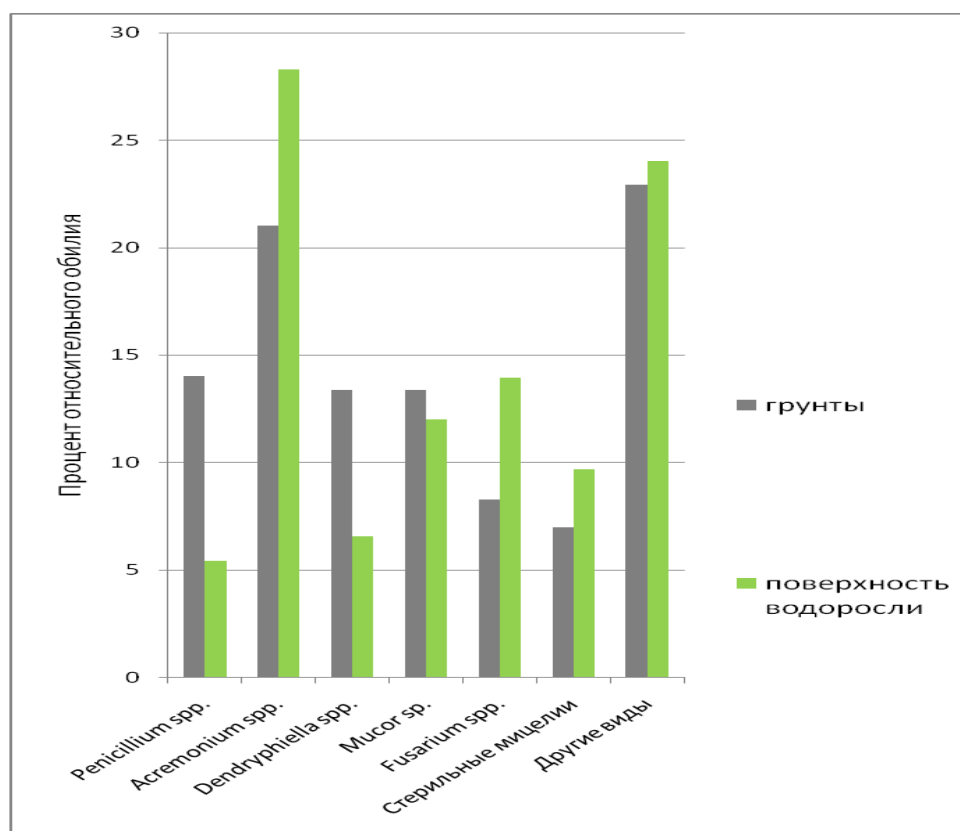


Рис. 5. Соотношение обилия (%) основных групп микромицетов в посевах из сопутствующих грунтов и поверхности водорослей

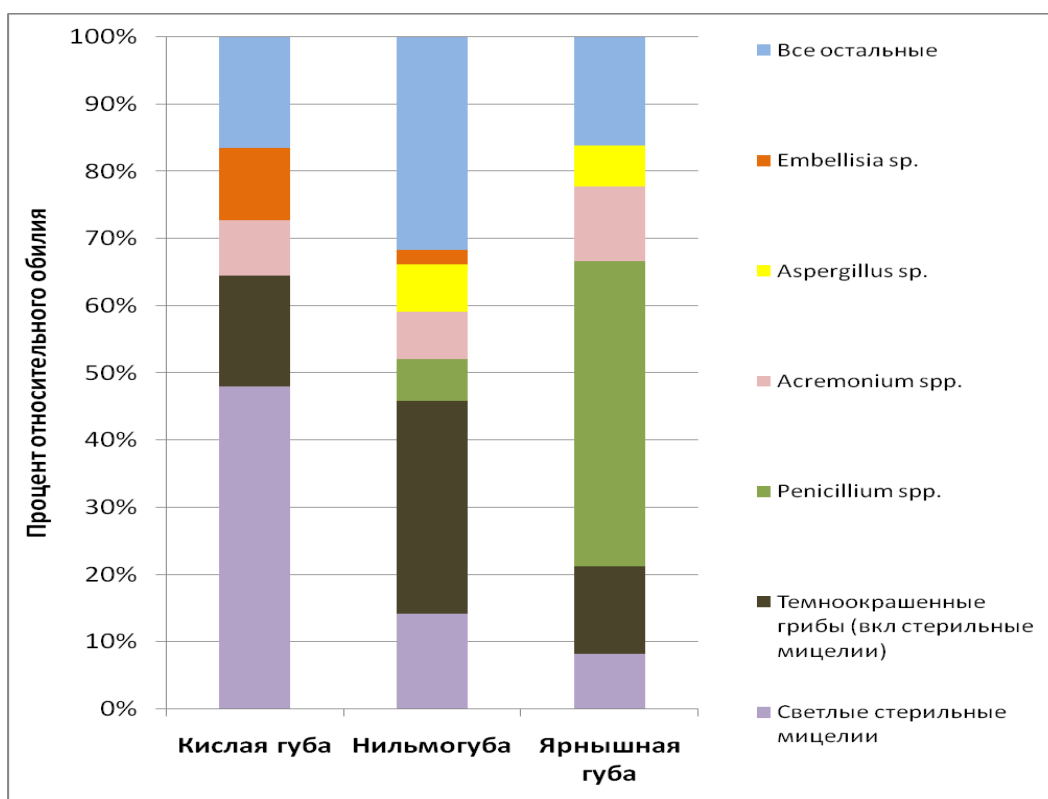


Рис. 6. Соотношение обилия (%) грибов в эндофитной микобиоте водорослей с разных трансект

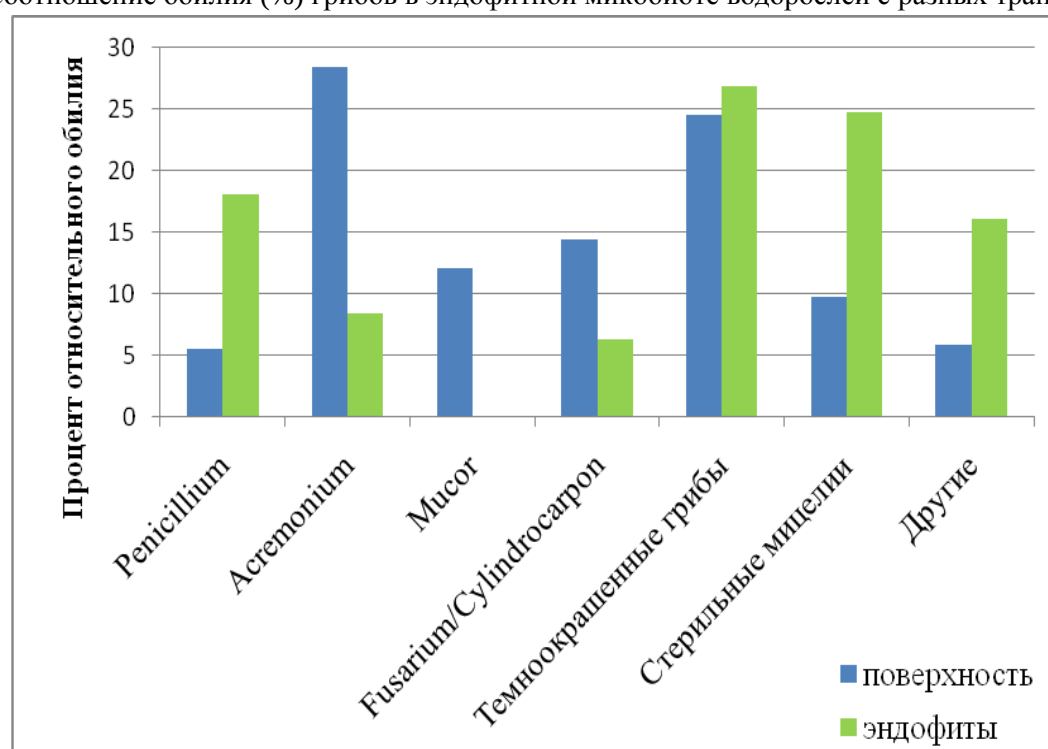


Рис. 7. Соотношение обилия (%) основных групп микромицетов в посевах поверхностной и эндофитной микобиоты талломов водорослей

Эндофитная микобиота водорослей. После применения метода поверхностной стерилизации из 168 образцов выделено 288 изолятов эндофитных грибов. Среди них 71 изолят относится к темным и светлым стерильным мицелиям, остальные принадлежат к 64

видам. В этом разделе исследований хорошо заметны различия результатов на разных трансектах (рис. 6). В Кислой губе максимальное обилие принадлежит светлым стерильным мицелиям (48%). В посевах из Нильмогубы Белого моря 30% обилия представлены темноокрашенными грибами и 15% - изолятами светлых стерильных мицелиев. В эндофитной микобиоте губы Ярнышной доминируют виды рода *Penicillium* (47% обилия), относящиеся всего к 4 видам. Также в баренцевоморских посевах наименьшее количество светлых стерильных мицелиев (8%), и по-прежнему относительно высокое обилие *Acremonium* spp. (10%).

Интересно, что в отношении рода *Acremonium* мы наблюдаем снижение количества изолятов (с 28 до 8% обилия) при увеличении видового разнообразия – с 6 видов на поверхности до 11 видов в эндофитной микобиоте (рис. 7).

Сравнение результатов всех посевов и обсуждение. На поверхности водорослей и внутри талломов часто встречаются разные виды одного и того же рода (*Cladosporium* spp., *Cylindrocarpon* spp., *Ulocladium* spp. и т.д.). *Dendryphiella salina* встречается во всех исследованных локальных экотопах. Во всех экотопах встречаются энтомопатогенные виды родов *Beaveria* и *Tolytocladium*, что характерно для биоценозов с большим количеством беспозвоночных животных (Domsh et al., 1980).

При сравнении всех посевов (табл. 3), видно, что наибольшее количество видов и изолятов выделилось из водорослей Нильмогубы, вследствие чего индекс разнообразия здесь наибольший из всех трансект. Микобиота *A. nodosum* губы Кислой наиболее бедная во всех отношениях. В посевах из губы Ярнышной четко выделяются доминирующие группы – *Acremonium* spp. с поверхности и *Penicillium* spp. из внутренней части талломов. Несмотря на общее сходство выбранных местообитаний, типы грунта и растительности в локальных местообитаниях оказывают большое влияние на микобиоту литоральных водорослей. Поверхность и внутренняя часть талломов водорослей на каждой трансекте более схожи по значениям индексов Сьеренсена-Чекановского, чем поверхностные или эндофитные списки видов между собой (табл. 4). Таким образом, сравнение результатов по разным морям представляется не очень корректным, так как микобиота водорослей различается от трансекты к трансекте, и количество исследованных трансект очень мало.

Существует представление о том, что в морской среде анаморфные грибы переходят к дрожжевому росту и формированию таллоконидий, потому что поверхность бластоконидий часто гидрофобна (Jones, 2000). Действительно, многие из видов, обнаруженных нами, обладают способностью к дрожжевому росту (*Acremonium* spp., *Cadophora* spp., и т.д.), образованию спороношений в слизистом чехле (*Cylindrocarpon* spp.), либо конидиями, эффективно распространяющимися в морской среде (*Embellisia* spp., *Dendryphiella* spp.,

Табл. 3. Количественные данные и индексы разнообразия микобиоты водорослей из различных экотопов. Номера трансект см. в табл. 1

	91		92		93	
	поверх	эндофиты	поверх	эндофиты	поверх	эндофиты
количество выделенных изолятов	40	62	121	124	97	101
Количество видов(морфотипов)(S)	24	21	35	40	26	33
Индекс Шеннона (H _H)	2,99	2,49	2,93	3,26	2,68	2,91
Выровненность (E= H/ln S)	0,94	0,82	0,82	0,88	0,82	0,83
количество выделенных изолятов	102		245		198	
Количество видов(морфотипов)	39		61		46	
Индекс Шеннона (H _H)	3,14		3,54		3,26	
Выровненность (E= H/ln S)	0,86		0,86		0,85	
Количество общих видов	6		14		13	

Табл. 4. Индексы сходства исследованных экотопов по Сьерсену-Чекановскому. Сверху – качественный индекс, снизу - количественный

		91		92		93	
		поверхность	эндофиты	поверхность	эндофиты	поверхность	эндофиты
91	поверхность		0,27	0,39	0,35	0,32	0,36
	эндофиты	0,18		0,29	0,30	0,29	0,35
92	поверхность	0,22	0,17		0,38	0,30	0,34
	эндофиты	0,18	0,27	0,38		0,39	0,40
93	поверхность	0,13	0,15	0,13	0,21		0,41
	эндофиты	0,18	0,20	0,21	0,30	0,19	

Ulocladium spp.) за счет увеличения плавучести (Pugh, Nicot, 1964; Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1979). Увеличение количества стерильных мицелиев в эндофитной микобиоте объясняется тем, что внутри многолетних талломов водорослей образование спорозонных структур вообще бессмысленно.

Физиология выделенных изолятов

Исследования роста некоторых изолятов на разных средах. Изоляты из родов *Cadophora* (9), *Fusarium* (11), *Cylindrocarpon* (4), *Acremonium* (30) и *Alternaria*-подобные (13) выращивали на различных средах. Изоляты рода *Cadophora* поделились на две группы: первые быстрее росли на среде сусло-агар и впоследствии были идентифицированы с

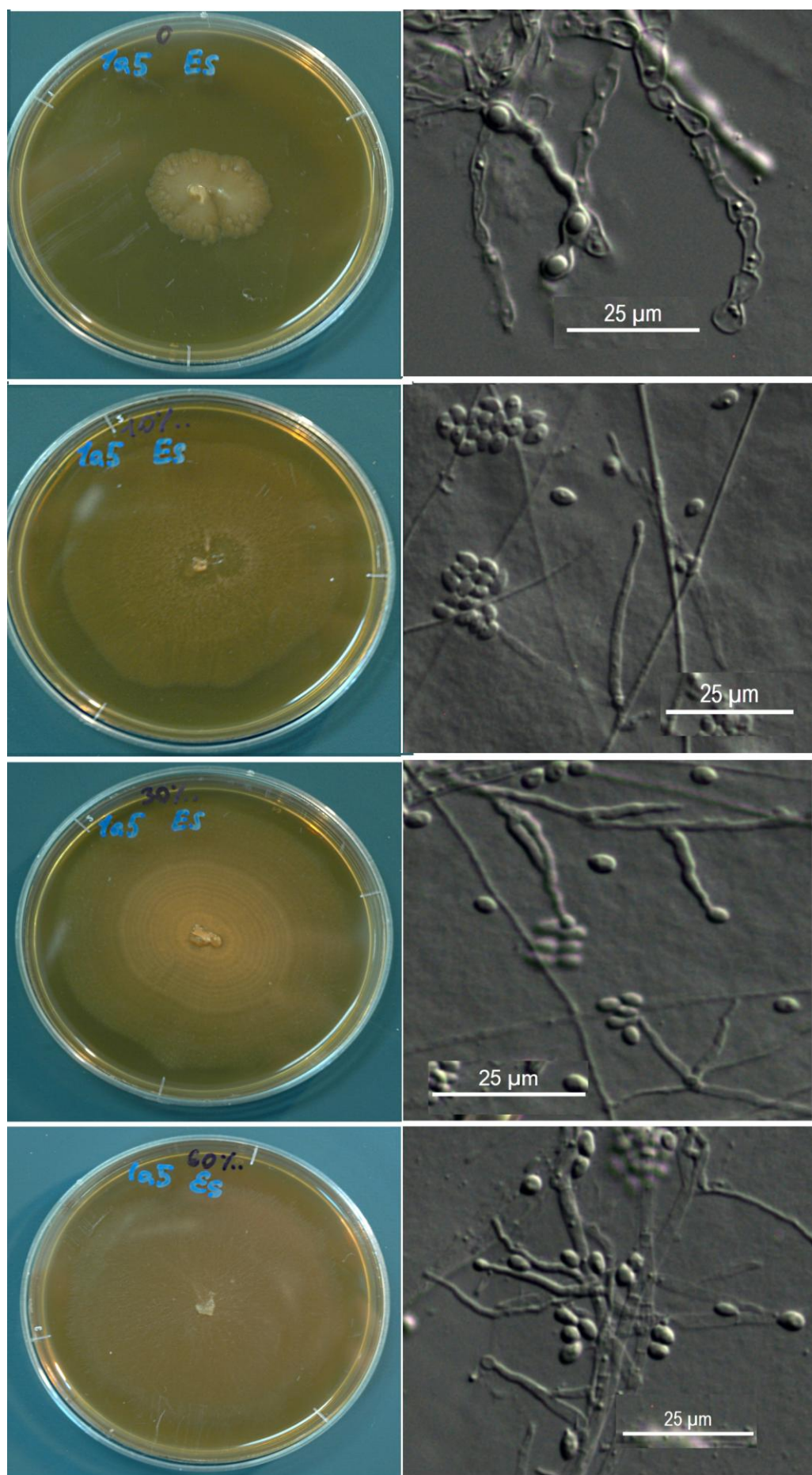


Рис. 8. Изменение характера роста и морфологии конидиального спороношения у *Emericellopsis* sp.1 при увеличении солёности среды (сверху вниз: 0, 10, 30, 60 ‰).

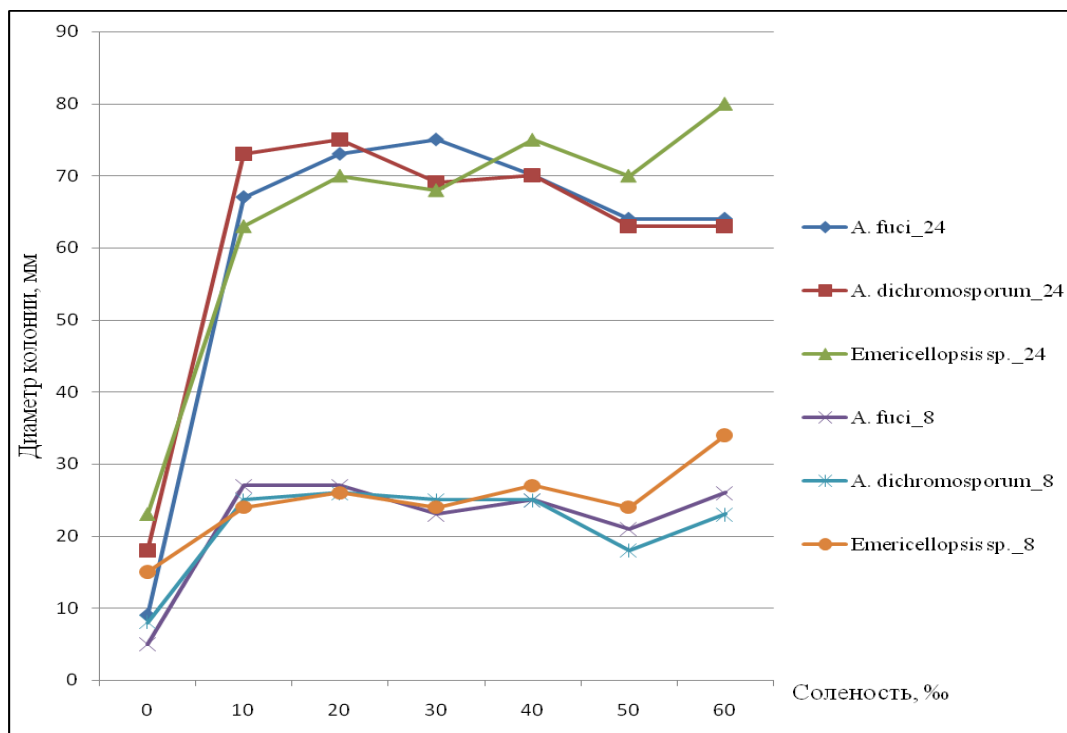


Рис. 9. График зависимости диаметра колоний на средах с различной соленостью после инкубирования в течение 10 дней при температурах +8° и +24°C. Статистическое отклонение не показано вследствие его незначительной величины

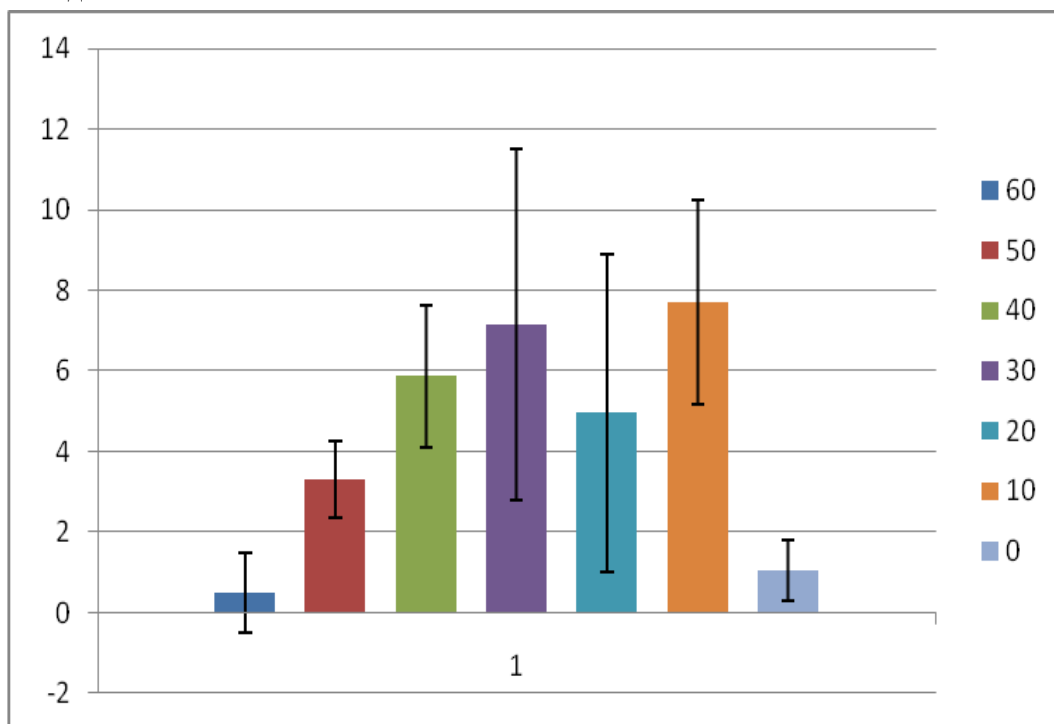


Рис. 10. Уровень относительной экспрессии гена Hsp12 в мицелии *A. fuci* на средах с соленостями от 60 до 0 ‰. Вертикальными линиями обозначено стандартное отклонение (n 27)

использованием молекулярно-генетических методов, как *Cadophora malorum* (Kidd et Beaumont) Gams; вторые быстрее росли на среде с вытяжкой из *A. nodosum*, а затем были отнесены к виду *Cadophora luteo-olivaceae* (Beuma) Harr. et McNew. Изоляты родов *Fusarium*

и *Cylindrocarpon* лучше всего росли на среде овсяной агар и на этой же среде давали спороношение, как микро-, так и макроконициальное. *Alternaria*-подобные изоляты лучше всего росли на среде голодный агар Чапека, но конидиальное спороношение было отмечено только на среде с вытяжкой из *A. nodosum*. Тестируемые изоляты видов рода *Acremonium* очень медленно росли на овсяном агаре и сусло-агаре, однако при добавлении NaCl в среды скорость их роста заметно увеличивалась. Некоторые из них (7 изолятов) выращивали на средах с разными источниками углерода. Все они лучше всего росли на сахарозе (при этом наблюдался дрожжевой рост) и манните. Тот факт, что маннит хорошо усваивается этими изолятами, говорит в пользу их успешного распространения на бурых водорослях (Bold, Wynne, 1985; Zuccaro, 2008).

Тесты на прорастание конидий в слое морской воды. Исследованы изоляты 7 видов рода *Acremonium* (22 изолята) и *Plectosporium tabacinum* (Beyma) Palm, Gams et Nirenberg (7) на способность прорасти в слое морской воды. Эта способность раньше считалась показателем морского, а не терригенного, происхождения изолятов (Byrne, Jones, 1975). По результатам эксперимента, все изоляты разделились на три группы. Конидии первой группы (*Acremonium fuci*, *A. tubakii* Gams, *A. dichromosporum*) прорастают гифой в воде, причем их рост ингибируется при большом скоплении спор. Вторая группа состоит из изолятов видов *A. potronii* Vuill., *A. chrysogenum* (Thirum. et Sukapure) Gams, которые склонны к почкованию и переходу в дрожжевую стадию, концентрация пропагул никак не влияет на эту способность. У третьей группы изолятов (*Pl. tabacinum*) – конидии прорастают гифой в присутствии воздуха в морской воде; они могут считаться грибами терригенного происхождения, не склонными к конидиальному размножению в морских условиях. Конидии изолятов *A. strictum* Gams, *A. rutilum* Gams в слое морской воды почкуются, а в присутствии воздуха прорастают гифой, то есть склонны к третьему типу прорастания. Этот эксперимент может считаться более удобным и достоверным тестом на способность к росту в морских условиях, нежели обычный тест на рост на соленых средах.

Исследования роста некоторых изолятов на средах с разной соленостью. Скорость роста 9 изолятов рода *Cadophora* на соленых средах (0-30‰) статистически не менялась. При увеличении концентрации NaCl увеличивалось количество воздушного мицелия и фиалоконидий. *Alternaria*-подобные изоляты (13 изолятов) на соленых средах росли более разнообразно. Все они после непродолжительного инкубирования (7-10 дней) были подвержены автолизу. Мицелий 3 изолятов лизировался быстрее на средах с соленостью 10 и 20‰. Спороношение наблюдалось в одном случае на среде без NaCl. 4 других изолята на средах с любой соленостью росли одинаково, автолиз шел быстро, спороношение не наблюдалось. У остальных 6 изолятов с увеличением концентрации NaCl уменьшалась

скорость автолиза, увеличивалось количество воздушного мицелия, спороношение формировалось только при солености 10-20‰. У всех исследованных культур с увеличением солености повышалась пигментация субстратного и воздушного мицелия. Скорость роста изолятов не менялась при увеличении концентрации соли.

Был проведен эксперимент с 30 изолятами 10 видов рода *Acremonium*. На средах с соленостью 10-30‰ их скорость роста не уменьшалась по сравнению со стандартными.

Для большинства изолятов характерно увеличение количества конидий и ослизнение колоний. Изоляты *A. fuci* (8), *A. dichromosporum* (2), *Emericellopsis* sp.1 (3) в эксперименте показали способность лучше расти на средах с NaCl, поэтому дополнительно их выращивали на средах с более высоким содержанием соли (до 60‰). Три перечисленных вида образуют конидиальные слизистые головки на простых, неветвящихся фиалидах, однако при повышении концентрации NaCl в среде они начинают формировать воздушный мицелий и тяжи с ветвящимися фиалидами (10-40‰), далее (60‰) количество продуцируемых конидий уменьшается, а головки конидий становятся менее слизистыми (рис. 8). Таким образом, очевидно, что большинство часто встречающихся на водорослях видов имеет разнообразные адаптации для успешного роста и размножения в морских местообитаниях.

Изучение экспрессии гена малого белка теплового шока как показателя адаптации к морским условиям. Температурный оптимум исследованных изолятов *A. fuci* (8), *A. dichromosporum* (2), *Emericellopsis* sp.1 (3) – +24°C (рис. 9). У 3 изолятов вида *A. fuci* оптимумы роста (наименьший уровень экспрессии Hsp12) находятся при солености 0 и 60 ‰ (рис. 10). Это объясняет его массовую встречаемость на поверхности талломов водорослей, где поверхностный сток с одной стороны, и засыхание при отливе – с другой, формируют экстремальные и противоположные условия в разное время суток.

У *Emericellopsis* sp. 1. наименьший уровень экспрессии стрессового белка приходилась на 40, 10 и 20‰ (по возрастанию), что показывает его тяготение к засоленным условиям. Для третьего вида достоверных результатов получить не удалось.

Уточнение систематического положения некоторых видов и морфотипов

Молекулярная идентификация грибов-симбионтов разных экологических форм *A. nodosum*. Нами установлена принадлежность *S. ascophylli* к группе *Mycosphaerella* sensu lato, а именно его близость к семейству Teratosphaeriaceae. Предполагаемая анаморфа *S. ascophylli* – пикнидиальный вид *Septoria ascophylli* Melnic et Petrov. В то же время, все виды формального рода *Septoria* имеют телеоморфы в роде *Mycosphaerella* 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 *S. ascophylli*.

Мицелий грибов-эндофитов вегетативной экады *A. nodosum* екад *muscoides* по результатам молекулярной идентификации принадлежал к разным видам аскомицетов. В одном случае, это был вид *Plectosphaerella cucumerina* (Lindf.) Gams (анаморфа *Plectosporium tabacinum*), в другом - *Neonectria fuckeliana* (Booth) Castl. et Rossman (анаморфа *Cylindrocarpon cylindroides* Wollenw. var. *tenue*). Оба этих вида являются агрессивными биотрофами и, по всей видимости, замещают облигатно морской *S. ascophylli* в условиях обитания маршевой экады *A. nodosum*.

Виды рода *Cadophora*. Изоляты *C. fastigiata* были идентифицированы до вида по морфологии спороношения. Морфологические признаки всех остальных *Phialophora*-подобных морфотипов были очень разнообразны и нерегулярно изменялись в процессе культивирования. По результатам геносистематики все 16 исследованных изолятов этого рода поделились на три клады, очень близкие друг к другу: *C. malorum* (7 изолятов), *C. luteo-olivaceae* (5) и промежуточная ветвь, не относящаяся ни к одному виду (4 изолята). У последовательностей изолятов *C. luteo-olivaceae* в области ITS1 (105-137 п.н.) есть вставка 5'-cggggctaccctacttcggta-3', у последовательностей вида *C. malorum* эта вставка отсутствует. Последовательности изолятов промежуточной ветви *Cadophora* sp. также лишены вставки, однако по результатам поиска гомологии оказываются ближе к виду *C. luteo-olivaceae*.

После сопоставления распределения изолятов по видам рода *Cadophora* с их морфологическими признаками, оказалось, что самой стабильной характеристикой видов является цвет колонии на стандартных средах. Колонии *C. malorum* всегда проявляют только оттенки коричневого, а колонии *C. luteo-olivaceae* всегда имеют оливковую пигментацию.

***Alternaria*-подобные морфотипы.** Исследовано 17 *Alternaria*-подобных изолятов. Из них 9 оказались близки к виду *Embellisia phragmospora* (Emden) Simmons, остальные 8 со 100% поддержкой образуют отдельную ветвь, близкую с одной стороны к другим видам рода *Embellisia*, с другой – к видам рода *Ulocladium*. Современное состояние системы анаморфных грибов порядка Pleosporales даже на основе построения полигенной филогении (Pryor, Bigelow, 2003) не позволяет предположить, к какому роду могут быть отнесены изоляты из этой клады.

Все изоляты *E. phragmospora* были выделены из беломорских образцов водорослей, *Embellisia* sp. – из Белого и Баренцева морей. При сопоставлении распределения изолятов по кладам с исследованиями физиологии обнаружено, что культуры *Embellisia* sp. проявляют разные свойства: некоторые из них лучше растут на среде без добавления соли, другие – на всех средах демонстрируют слабый рост. Изоляты *E. phragmospora* относятся к группе грибов, лучше растущих на соленых средах и вытяжке из *A. nodosum*.

Виды рода *Acremonium*. Последовательности ITS рДНК 38 исследованных изолятов группируются в девять клад. Одна из них с вероятностью 96% объединила 12 изолятов, относящихся к виду *A. fuci* (6) с 6 близкими к ним. Другая ветвь объединила 4 изолята, на 97% соответствующих неизвестному виду *Emericellopsis* sp., и 4 изолята, родственных им. Остальные клады представлены еще 4 видами рода *Acremonium* (всего 9 изолятов), неидентифицированным изолятом из рода *Verticillium*, видом *P. tabacinum* (3 изолята), несколькими видами *Nectria* / *Cylindrocarpon* (5 изолятов). Таким образом, часть изолятов (10) близка к каким-то видам или родам, но не идентична им. Например, виду *A. fuci*, неизвестному виду из рода *Emericellopsis*, выделенному из гиперсалинных местообитаний. По всей видимости, существует ветвь экстремотолерантных видов формального рода *Acremonium*, которые отличаются от широко распространенных наземных или морских видов по молекулярным признакам. Бедная морфология не позволяет отличать эти виды друг от друга, но если бы была возможность получать последовательности и изучать физиологию всех выделяемых изолятов этого рода, возможно, было бы обнаружено множество новых видов.

Заключение

Биология *S. ascophylli* в Белом море отличается от таковой в ранее исследованных географических точках. Морфологические и филогенетические исследования подтвердили его принадлежность к роду *Stigmatidium*. Анаморфная стадия этого гриба не была нами обнаружена.

Мы обнаружили, что в талломах водоросли обитает множество видов грибов-сапротрофов, некоторые из них в определенных условиях в талломах вегетативных экад *A. nodosum* могут вытеснять исходный вид *S. ascophylli*. В результате проведенного исследования мы получили достаточно полную картину грибного населения водоросли *A. nodosum*. Микобиота водоросли различается в зависимости от типа грунта и растительного окружения: видовой состав грибов из *A. nodosum*, растущего в условиях сильного сероводородного заражения грунта, беден, а сообщество грибов водорослей, обитающих на литорали вместе с высшими растениями обогащено факультативно фитопатогенными видами и видами, разлагающими растительные остатки. В эндофитной микобиоте водоросли на трансекте с обильным пресным стоком доминируют виды рода *Penicillium*.

Так как *A. nodosum* растет в самых разных условиях, многие из которых нельзя назвать истинно морскими, грибы, обитающие на нем, также относятся к различным экологическим группам. Многие из них – наземные виды, имеющие штаммовую адаптацию к морским условиям, морские виды или виды, ранее не описанные. Мы модифицировали тест на способность изолятов расти в морской среде, и можем считать его достаточно достоверным.

Кроме теста на прорастание конидий, выращивание изолятов на средах с высоким содержанием соли так же может быть информативно, так как в морских условиях морфология всех видов анаморфных грибов обедняется признаками.

Новый вид *Emericellopsis* sp.1, обнаруженный в результате наших исследований, является удобным объектом для изучения адаптаций грибов к экстремальным условиям. Этот гриб, растущий в широком диапазоне условий, реагирует на их изменения хорошо заметными признаками (тип спороношения, характер роста колоний, скорость роста). Ранее исследования проводили в основном на дрожжах, поэтому мицелиальный гриб такой экологической пластичности хоть и является нелегким для изучения объектом, но заслуживает всестороннего изучения.

Если сравнить все наши результаты с литературными данными, то основной причиной различий между ними будут климатические условия исследованных нами территорий. Белое и Баренцево моря холодны, и это накладывает отпечаток на видовой состав микобиоты, на жизненный цикл самих водорослей и на особенности адаптации грибов к морским условиям обитания.

Морские арктические и субарктические экосистемы практически не изучены с точки зрения микологии. Неизвестно не только как функционирует здесь круговорот органического вещества, но и участники этого круговорота также остаются пока практически неизвестными. Полученные новые знания о качественном и количественном составе микобиоты бурой водоросли *Ascophyllum nodosum* позволят нам уделить в дальнейшем больше внимания вопросам адаптации и функционирования грибов в морских экосистемах.

Выводы

1. С поверхности водорослей было выделено 54 вида грибов, из них анаморфных – 51. Поверхностная микобиота водорослей из Белого моря характеризуется наличием зигомицетов, темноокрашенных грибов и видов рода *Fusarium*. В поверхностной микобиоте водорослей из Баренцева моря доминируют виды рода *Acremonium*.
2. Эндофитная микобиота водорослей характеризуется высоким обилием стерильных мицелиев. В посевах из Белого моря доминируют светлые и темноокрашенные стерильные мицелии, а в талломах водорослей из Баренцева моря – виды рода *Penicillium* при небольшом видовом разнообразии.
3. Из сопутствующих грунтов выделено 44 вида анаморфных грибов. Наиболее многочисленные группы: *Penicillium* spp., *Acremonium* spp., *Mucor hiemalis*, *Dendryphiella salina*. 16 видов выделено только из грунтов. По сравнению с поверхностной микобиотой водорослей, в грунтах велико обилие и видовое разнообразие видов рода *Penicillium* и

обилие изолятов *Dendryphiella* spp. На поверхности водорослей выше обилие и видовое разнообразие родов *Acremonium* и *Fusarium*.

4. Изоляты из наиболее обильных групп грибов во всех физиологических экспериментах показали способность расти и размножаться в морских условиях, в частности, на бурых водорослях. Все они делятся на две группы: виды способные расти в море и на суше, такие как *Cadophora malorum*, *Plectosporium tabacinum*, *Embellisia* sp. и т.д; виды, лучше приспособленные к морским местообитаниям – *Cadophora luteo-olivaceae*, *Embellisia phragmospora*, виды рода *Acremonium*, *Emericellopsis* sp.1 и другие.

5. Исследование экспрессии гена Hsp12 показали, что оптимальная температура для трех выбранных видов рода *Acremonium* – +24°C. Наиболее благоприятная соленость для вида *A. fuci* - 60‰, для вида *Emericellopsis* sp.1 – 40‰. Эти свойства адаптируют данные виды к успешному распространению на поверхности и внутри талломов литоральных водорослей.

6. Молекулярно-филогенетические исследования показали, что помимо известных видов, в каждой из исследованных групп сомнительного таксономического положения (*Cadophora* spp., *Embellisia* spp., *Acremonium* spp.) есть морфотипы, идентификация которых практически невозможна ни по морфологическим, ни по генетическим признакам.

7. Впервые обнаружен мицелий симбионта в тканях вегетативных экад *A. nodosum*. Жизненный цикл ассоциации *S. ascophylli*-*A. nodosum* в Белом море сильно укорочен по сравнению с литературными данными, потому что развитие структур полового размножения останавливается на время установления ледового покрова зимой. Установление ассоциации *de novo* между *S. ascophylli* и *P. canaliculata* происходит несинхронно, в отличие от связи гриба с *A. nodosum*. Анаморфная стадия *S. ascophylli* не обнаружена.

8. Филогенетические построения с участием последовательности симбиотического гриба *S. ascophylli*, полученной из типовой формы *A. nodosum* и *P. canaliculata*, подтвердили его отношение к пор. Capnodiales. Этот вид близок к сем. Teratosphaeriaceae, что ставит под сомнение наличие у *S. ascophylli* анаморфной стадии рода *Septoria*. Последовательности, выделенные из маршевой экады *A. nodosum* ecad *muscoideae*, относились к двум видам биотрофных грибов пор. Nypocreales.

Благодарности. Выражаю искреннюю признательность моим научным руководителям Бубновой Екатерине Николаевне и Сидоровой Ирине Ивановне. Огромная благодарность Александровой Алине Витальевне за всестороннюю помощь в выполнении и написании работы. Бесконечно признательна коллективу ББС МГУ и особенно Неретиной Татьяне Владимировне за помощь и поддержку во всем. Особенная благодарность сотрудникам ИБР РАН (Мюге Николаю Сергеевичу, Минину Андрею Александровичу, Микаэлян Арсену

Суменовичу и другим) за неоценимую помощь в работе и неизменную доброту. Огромное спасибо всем коллегам, старшим и младшим, которые помогли мне совершить эту работу.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК для публикации основных положений по теме диссертации

1. **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.
2. **Коновалова О.П.**, Бубнова Е.Н., Сидорова И.И. Биология *Stigmatidium ascophylli* – гриба-симбионта фукусовых водорослей в Кандалакшском заливе Белого моря// Микология и Фитопатология. В печати

ТЕЗИСЫ, МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИЙ

1. Kireev J.V., **Konovlova O.P.**, Bubnova E.N. Brown algae of the White Sea intertidal zone: the fungal invasion // Abstracts of the XV Congress of European mycologists. Saint-Petersburg, Russia, Sept. 16-22. 2007. P. 77-78.
2. **Коновалова О.П.**, Бубнова Е.Н. Изучение гриба *Mycophycias ascophylli* - эндофита бурых водорослей *Ascophyllum nodosum* и *Pelvetia canaliculata* в Белом море // Материалы научной конференции, посвященной 70-летию Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова 9-10 августа 2008 года. М.: Изд. Гриф и К. С. 243-246.
3. Георгиева М.Л., **Коновалова О.П.**, Бубнова Е.Н., Биланенко Е.Н. Виды рода *Acremonium* Link в щелочных и морских местообитаниях // Материалы научной конференции, посвященной 70-летию Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова 9-10 августа 2008 года. М.: Изд. Гриф и К. С. 224-228.
4. **Коновалова О.П.**, Бубнова Е.Н. Изучение гриба *Mycophycias ascophylli* (Cotton) Kohlmeyer et Volkmann -Kohlmeyer, ассоциированного с водорослью *Ascophyllum nodosum* (L.) LeJolis в Кандалакшском заливе Белого моря // Материалы 2-го Съезда микологов России. Современная микология в России. Том 2. М.: Национальная академия микологии, 2008. С. 398.
5. **Konovlova O.P.**, Mugue N.S., Bubnova E.N. Mycobionts of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis and *Pelvetia canaliculata* (L.) Dcne et Thur. in the White Sea // Asian Mycological Congress 2009 & 11th International Marine and Freshwater Mycology Symposium Abstract Book. Nov. 15-19. 2009. National Museum of Natural Science. Taichung, Taiwan. P. 142-143.
6. **Konovlova O.**, Bubnova E. Fungi associated with brown seaweed *Ascophyllum nodosum* on White and Barentz Seas (Russia) // Asian Mycological Congress 2011 & 12th International Marine and Freshwater Mycology Symposium Abstract Book. Aug. 7-11. 2011. Incheon, Seoul, Korea.