

Национальная Академия Микологии

ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

**СОВРЕМЕННАЯ
МИКОЛОГИЯ
В РОССИИ
Том 6**

www.mycology.ru

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ МИКОЛОГИИ
ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

СОВРЕМЕННАЯ МИКОЛОГИЯ В РОССИИ

ТОМ 6

МАТЕРИАЛЫ ЧЕТВЕРТОГО СЪЕЗДА
МИКОЛОГОВ РОССИИ

Москва
2017

ББК 28.591
УДК 58-616.5
С56

Главный редактор
Ю.Т. Дьяков

Заместитель главного редактора
Ю.В. Сергеев

Редакционная коллегия

Белозерская Т.А.	Левитин М.М.
Бибикова М.В.	Марфенина О.Е.
Биланенко Е.Н.	Мокиева В.Л.
Бурова С.А.	Озерская С.М.
Бондарцева М.А.	Сергеев А.Ю.
Воронина Е.Ю.	Сидорова И.И.
Гагкаева Т.Ю.	Ткаченко О.Б.
Еланский С.Н.	Тремасов М.Ю.
Журбенко М.П.	Толпышева Т.Ю.
Коваленко А.Е.	Шнырева А.В.
Кураков А.В.	Чекунова Л.Н.

С56 Современная микология в России. Ред.: Ю.Т. Дьяков, Ю.В. Сергеев.
М.: Нац. акад. микол. 2017. Том 6. 460 с.

УДК 58-616.5
ББК 28.591

*Издано в Российской Федерации в рамках программы
Национальной академии микологии*



СОВРЕМЕННАЯ МИКОЛОГИЯ В РОССИИ

Current Mycology in Russia

Том 6

Volume 6

Выпуск 1.

**Генетика, филогения
и систематика грибов**

Issue 1.

**Studies in fungal genetics, phylogeny
and systematics**

Глава 1.

Филогения и систематика грибов

Chapter 1.

Phylogeny and systematics of fungi

DOI: 10.14427/cmr.2017.vi.01

Глава 2.

Исследования генетики грибов

Chapter 2.

Fungal genetic studies

DOI: 10.14427/cmr.2017.vi.02

РАЗНООБРАЗИЕ ГРИБОВ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ У *ACER NEGUNDO* И *ACER PLATANOIDES* В ЮЖНОМ ПРЕДУРАЛЬЕ

Веселкин Д.В., Микрюков В.С.

Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург

Оценки микоризообразования у инвазивных растений контрастны: есть свидетельства как пониженной активности формирования микориз у чужеродных растений, так и противоположные. Инвазивные растения могут по-разному влиять на местные сообщества грибов арбускулярной микоризы (АМГ): снижать их разнообразие и обилие или специфически изменять состав АМГ. В целом, существует значительная изменчивость как степени распространения микоризы у чужеродных растений, так и стратегий их взаимодействия с АМГ.

Цель работы – анализ разнообразия сообществ АМГ, ассоциированных с двумя видами деревьев рода *Acer* (клен) разного инвазивного статуса – инвазивного (чужеродного) в Евразии *Acer negundo* L. и аборигенного *Acer platanoides* L. с учетом экологической изменчивости, т.е. в разных местообитаниях. Проверяемая гипотеза заключалась в предположении, что чужеродный *A. negundo* в меньшей степени адаптирован к взаимодействию с местными видами АМГ и обладает пониженным разнообразием АМГ по сравнению с аборигенным *A. platanoides*.

Сбор материала выполнен в третьей декаде июня 2016 г. в подзоне лесостепи предгорий Южного Урала. Местообитания расположены в окрестностях с. Ташла Тюльганского района Оренбургской области – (1) дендропарк в верхней части склона г. Шихан и (2) окраина широколиственного леса на шлейфе склона г. Лушная. В каждом местообитании образцы корней последних порядков отобраны у 4–5 генеративных особей. Образцы отмывали от почвы в растворе ПАВ и высушивали.

Экстракцию ДНК осуществляли с использованием набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Нидерланды) с предварительной заморозкой образцов в жидком азоте. Дополнительная очистка ДНК выполнена с использованием сорбции на поверхности магнитных частиц с карбоксильной группой (набор Клин-Маг, Евроген, Россия).

Состав сообществ АМГ устанавливали методом next-generation sequencing (NGS). Амплифицированы фрагменты ITS2 рибосомной РНК. ПЦР проведена в два этапа в соответствии с протоколом «16S Metagenomic Sequencing Library Preparation». Сначала была выполнена амплификация фрагмента ITS2 с использованием локус-специфичных праймеров fITS7 и ITS4, дополненных последовательностями адаптеров (Illumina adapter overhang nucleotide sequences). Один микролитр продукта первой ПЦР (ПЦР1), разведённого в 10 раз водой, использован в качестве ДНК-матрицы для следующего этапа (ПЦР2), который был поставлен с использованием праймеров NexteraXT с уникальной для каждого образца комбинацией баркодов (N7XX, S5XX). ПЦР проводили

с использованием высокоточной Tetsus полимеразы (Евроген, Россия). Очистку и нормализацию (выравнивание концентрации) продуктов ПЦР проводили с использованием набора Sequal Prep Normalization Plate Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Ампликоны были эквимольно смешаны и результирующий пул готовых к секвенированию библиотек был проверен на капиллярном электрофорезе с использованием Agilent 4200 TapeStation и HighSensitivity D1000 ScreenTape (AgilentTechnologies, США). Пул библиотек был отсекувенирован на IlluminaMiSeq (Illumina, США) с использованием реактивов MiSeqReagentKitv3 (600 циклов). Подготовка библиотек и секвенирование выполнены ЗАО Евроген (Москва). Файлы FASTQ были получены с помощью ПО MiSeqReporter (Illumina).

Объединение прямых и обратных прочтений ДНК выполнили с помощью ПО UFITS v.0.7.0. Фильтрацию прочтений по качеству, дерепликацию (объединение идентичных последовательностей с сохранением информации об их обилии), а также кластеризацию прочтений производили с помощью VSEARCHv.2.3.4. Выделение операционных таксономических единиц (operational taxonomic unit, OTU) АМГ выполнено с использованием 97% порога сходства последовательностей. Таксономическая классификация выполнена на основе сравнения последовательностей с референсной базой данных UNITEv.7.1 (<https://unite.ut.ee/>). Определение таксономической принадлежности ОТЕ проводили с помощью трех алгоритмов: глобального выравнивания с использованием VSEARCH, Байесовского классификатора UTAX b, классификации на основе сходства состава k-меров SINTAX.

Всего выделено 71 OTU, относящихся к трем идентифицированным семействам АМГ: Glomeraceae (53 OTU), Claroideoglomeraceae (7 OTU), Diversisporaceae (4 OTU). 7 OTU не идентифицированы до ранга семейства. Мера обилия таксонов – количество “прочтений” отдельных OTU в пробе. Максимальное число прочтений одного OTU в одной пробе – 2288, минимальное – 1. Максимальная сумма прочтений разных OTU в одной пробе – 3031. При дальнейшем анализе разнообразия АМГ у *A. negundo* и *A. platanoides* использовали данные только для 57 OTU, поскольку малообильные OTU с числом прочтений менее 10 не рассматривали.

20 OTU встречены и у инвазивного *A. negundo* и у местного *A. platanoides*. 24 OTU – только у *A. negundo*, 13 OTU – только у *A. platanoides*. Однако эти различия носят случайный характер и объясняются небольшим числом проанализированных проб, а отчасти – непропорциональностью числа проб *A. negundo* (9 проб) и *A. platanoides* (5 проб).

При анализе разнообразия OTU в отдельных пробах наиболее часто встречаются пробы с 1–3 OTU. Максимальное число OTU в пробе – 8. По числу прочтений преобладают пробы с диапазоном до 500 прочтений. Для ответа на вопрос, различается ли разнообразие АМГ у двух видов деревьев, силу влияния этого фактора сопоставили с силой влияния различий между двумя местообитаниями с помощью многомерного двухфакторного дисперсионного анализа.

Использовали пять характеристик разнообразия АМГ: число OTU в пробе; число уникальных (встреченных только в этой пробе) OTU в пробе; индексы Маргалёфа, Бергера-Паркера, Шеннона. Установлено, что параметры разнообразия АМГ не различаются ни в связи с инвазивным статусом растения ($p=0.492$), ни между разными местообитаниями ($p=0.236$). Следовательно, на уровне богатства таксонов АМГ в пробе местные и чужеродные виды кленов не демонстрируют каких-либо различий. Это справедливо также при анализе композиций (сходства – несходства состава) OTU в пробах. Судя по результатам ординации, специфика состава АМГ *A. negundo* и *A. platanoides* не обнаруживается.

Заключение. Разнообразие и состав сообществ грибов арбускулярной микоризы у *Acer negundo* и *A. platanoides* в двух местообитаниях Южного Предуралья качественно не различается. Не удалось установить особенности сообществ АМГ ни в связи

с инвазивным статусом кленов, ни между разными местообитаниями.

Таким образом, проверяемая гипотеза не подтвердилась. Это существенно расходится с результатом нашего предыдущего исследования, в котором была установлена специфичность разнообразия АМГ у двух видов *Solidago* (местного *S. virgaurea* и инвазивного *S. canadensis*) при повышенном общем разнообразии АМГ у инвазивного вида (Бетехтина и др., 2016). Несопоставимость результатов, полученных на разных модельных объектах (*Solidago* и *Acer*), свидетельствует о необходимости дальнейшего накопления эмпирических данных для уменьшения неопределенности представлений о роли микоризных взаимодействий в процессах растительных инвазий.

Работа проведена при поддержке РФФИ (проект 16–54–00105). Сбор полевых материалов выполнен совместно с к.б.н. А.А. Бетехтиной и С.В. Пьянковым (Уральский федеральный университет).

Список литературы

- Бетехтина А.А., Мухачева Т.А., Ковалев С.Ю., Гусев А.П., Веселкин Д.В. Обилие и разнообразие грибов арбускулярной микоризы у инвазивного *Solidago canadensis* и местного *S. virgaurea*. Экология. 2016; 6: 476–80.