

**ЭКСПЕРИМЕНТ СО СТАНДАРТНЫМ СУБСТРАТОМ
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СООБЩЕСТВ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ
ГРИБОВ (АНАЛИЗ МЕТАБАРКОДИНГА)**

Добрынина Алевтина Сергеевна

студент,

Югорский государственный университет,

РФ, г. Ханты-Мансийск

E-mail: alevtina.dobrynina86@yandex.ru

Научный руководитель:

Филиппова Нина Владимировна

канд. биол. наук, зав. лабораторией разработки

методики метагеномного анализа, доцент,

Югорский государственный университет,

РФ, г. Ханты-Мансийск

E-mail: filippova.courlee.nina@gmail.com

USE OF STANDARD SUBSTRATE TO STUDY

COMMUNITY OF WOOD-DECAY FUNGI

(METABARCODING-BASED ANALYSIS)

Dobrynnina Alevtina

student,

Yugra State University,

Russia, Khanty-Mansiysk

E-mail: alevtina.dobrynnina86@yandex.ru

Scientific advisor:

Filippova Nina

candidate of biological sciences,

head of the laboratory of metagenomic analysis methodology development,

associate professor,

Yugra State University

Russia, Khanty-Mansiysk

E-mail: filippova.courlee.nina@gmail.com

АННОТАЦИЯ

В работе представлены описание и результаты первого года эксперимента по изучению ксилотрофных сообществ мертвой древесины методом метабаркодинга, начавшегося в июне 2022 г. За основу был взят метод стандартных субстратов, которым в рамках исследования являлись чопики трех типов

древесины *Pinus sylvestris*, *Larix sibirica* и *Betula*. В результате эксперимента общий список выявленных таксонов составил 859 операционных таксономических единиц (520 таксонов). Показано, что на структуру сообщества в большей степени влияет тип местообитания и фактор времени, нежели тип древесины. Исследование будет продолжено в течение двух лет, и на основе полученных данных будут сделаны выводы о динамике и факторах, определяющих сообщество ксилотрофов мелкого древесного опада на ранних стадиях разложения.

ABSTRACT

*This paper presents the first-year results of study of xylotrophic community in small wood litter using standardized substrate, analysed by metabarcoding. The standard substrates were wooden dowels of three types: *Pinus sylvestris*, *Larix sibirica* and *Betula*, exposed on the forest floor in July 2022 and retrieved each consecutive 2 weeks. As a result of the experiment, the total list of identified taxa amounted to 859 OTUs and 520 taxa. The community structure was more influenced by habitat type and time, than wood type. The study will continue for two years, which will help to describe the dynamics and environmental parameters determining the wood-decay community of small wood litter in the early stages of decomposition.*

Ключевые слова: микология, древесина, ксилотроф, Западная Сибирь.

Keywords: mycology, wood, Western Siberia.

Введение

Древесные растения и древесные сообщества играют огромную роль в экосистемах планеты: в древесине сохраняются значительные запасы наземного углерода [1]. Древесина как промышленный объект имеет широкий спектр прикладных значений, однако ее изъятие влияет на стабильность экосистемы [2]. Наряду с древесными сообществами грибные также играют важную роль, участвуя в сукцессии древесных субстратов и возвращении элементов питания в почву, выполняя роль биологических деструкторов [3, 4].

Изучение сообществ грибов мертвой древесины – одно из активно развивающихся направлений в экологии грибов. Ранее для изучения применялись классический или культуральный подходы – наблюдение и учет плодовых тел грибов и выделение чистых культур из древесного субстрата соответственно. В последние десятилетия активно развиваются представления о ДНК и совершенствующиеся технологии секвенирования. Для получения точной информации о видовом составе и функциях грибов, населяющих древесину, исследователи всё чаще стали использовать молекулярно-генетические методики. Они позволяют описать скрытое разнообразие неплодоносящих видов на разных стадиях сукцессии разложения древесины. Метод активно используется для описания сообществ различных видов древесины в ряде стран [5-7].

Изучение ксилотрофных грибов на территории Западной Сибири имеет сравнительно недолгую историю. На территории работали несколько выдающихся специалистов, обследована большая часть природоохранных зон, получены данные о широтном распределении видового разнообразия и консортивной связи ксилотрофов с деревьями-хозяевами [8, 9]. Все исследования проводились классическим методом наблюдения и сбора плодовых тел.

Для изучения таксономического состава и сукцессии сообщества грибов мертвый древесины нами был использован новый подход – извлечение тотальной ДНК (метабаркодинг) с последующим секвенированием. Исследование было построено на эксперименте со стандартным субстратом – древесными чопиками трех пород деревьев, которые закапывались на два года с последующей выемкой через промежутки времени (каждые 2 недели). Протокол эксперимента был основан на методе MycoPins, описанном в статье М. Шумской [10].

Целью исследования являлось описание видового состава и структуры ксилотрофных грибов методом метабаркодинга в ходе сукцессии на стандартном субстрате.

Были поставлены следующие задачи:

1. Постановка эксперимента со стандартным субстратом в четырех типах экосистем (и три породы дерева) в течение 2-х лет.
2. Выделение и секвенирование тотальной ДНК.
3. Анализ полученных данных сиквенсов.
4. Анализ структуры сообществ и выводы о ее динамике в ходе сукцессии субстрата.
5. Сравнение полученных результатов методом метабаркодинга с подобными исследованиями с помощью классического подхода.

Методика

Поскольку основой эксперимента являются упрощенные протоколы, существенно облегчающие задачу исследователю, то и подход к выбору материалов должен быть упрощен. Для изучения сукцессии сообществ грибов в разных типах древесины были выбраны и приобретены в строительном магазине чопики трех видов, исходя из распространения соответствующих деревьев в регионе (сосна, береза, лиственница). Чтобы отследить динамику колонизации субстрата с учетом параметров среды, было принято решение разместить экспериментальные площадки в четырех биотопах, в каждом из которых ранее проводился мониторинг сообществ макромицетов (рисунок 1). На площадках в каждом биотопе были установлены трансекты с колышками, интервал между которыми составлял 5 м.

Непосредственно перед процедурой закладки производили процесс подготовки материала, служащего стандартным субстратом:

1. Автоклавирование при температуре 120°С и давлении 1,1 бар.

1. Автоклавирование при температуре 120°C и давлении 1,1 бар.
 2. Чопики закреплялись на проволоку в заранее оговоренном порядке: *Pinus sylvestris*, *Larix sibirica*, *Betula*.
- Чопики закреплялись на проволоку в заранее оговоренном порядке: *Pinus sylvestris*, *Larix sibirica*, *Betula*.

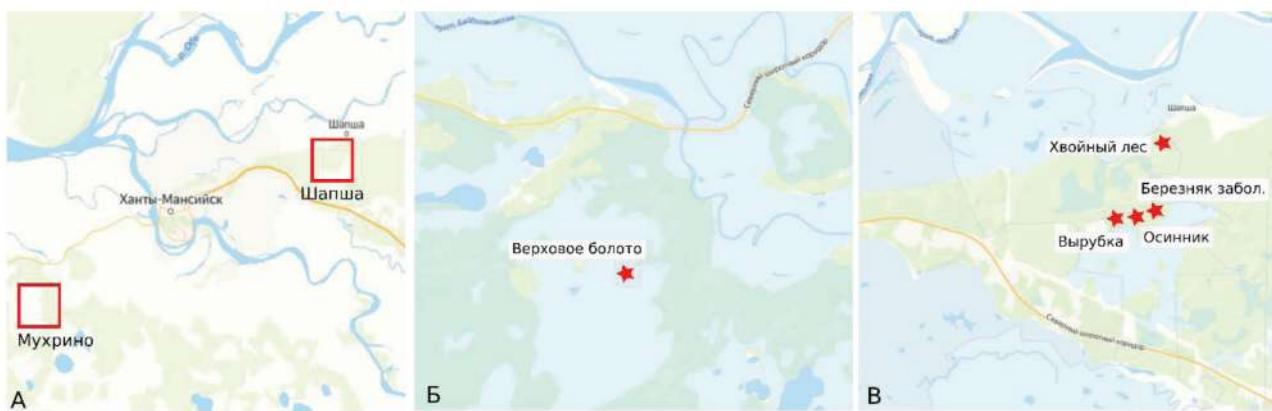


Рисунок 1 – Карта расположения площадок: А – общая схема двух ключевых участков в районе Ханты-Мансийска, Б – участок «Мухрино», В – участок «Шапша»

После подготовки в июне 2022 года следовал процесс закладки, во время которого стандартный субстрат помещался под подстилку на глубину около 2-3 см. В последующие периоды чопики вынимались на каждой площадке раз в две недели (всего 6 чопиков на одну площадку на одну дату). После выемки образцы упаковывались в переносную упаковку из пакета на заводе и хранятся при температуре 40°C в течение суток для последующего хранения при комнатной температуре вплоть до выделения.

233

Протокол выделения тотальной ДНК из древесины представляет из себя последовательность следующих действий:

1. Образец откручивается от проволоки и очищается от внешнего мусора.
2. Чопик закрепляется на тисках.
3. Стерильным сверлом высверливается приблизительно 1 мл опилок, часть из которых помещается в эппendorф (около 0,3 мл), а другая упаковывается в предварительно простерилизованную фольгу для дальнейшего хранения.
4. Часть, помещенная в эппendorф, заливается лизис-буфером, после чего оставляется на сутки.
5. Далее процесс выделения тотальной ДНК проводится по протоколу производителя комплекта реагентов для выделения тотальной ДНК (в нашем случае это SileksMagNA KIRSL0100).

Для секвенирования тотальной ДНК пробы отправлялись в аутсорсинговую компанию (Евроген <https://evrogen.ru/>), где осуществлялся следующий протокол секвенирования:

1. Качество полученных образцов метагеномной ДНК было проверено с помощью электрофореза в агарозном геле. Количественная оценка проводилась путем измерения концентрации ДНК на приборе Qubit 2.0 с использованием набора реактивов Qubit dsDNA HS.

2. Подготовка библиотек к секвенированию проводилась в соответствии с протоколом, описанным в руководстве «16S Metagenomic Sequencing Library Preparation» (Part # 15044223 Rev. B; Illumina).

3. Амплификация вариабельных регионов ITS осуществлялась с использованием праймеров, Next-fITS7_For: 5'-GTGARTCATCGAATCTTG-3' и Next-ITS4_Rev: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'.

4. После получения ампликонов библиотеки были очищены и объединены эквимолярно с помощью SequalPrep™ Normalization Plate Kit (ThermoFisher, Cat # A10510-01).

5. Пул библиотек был секвенирован на Illumina MiSeq (длина прочтений – 300 п.о. с двух сторон фрагментов) с использованием реактивов MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles). Файлы FASTQ были получены с помощью ПО bcl2fastq v2.17.1.14 Conversion Software (Illumina).

Биоинформационный анализ полученных ридов осуществлялся по следующему протоколу:

1. Удаление индексов с помощью команды trim-paired (QIIME cutadapt trim-paired).

2. Слияние прямых и обратных ридов с помощью команды merge-pairs (QIIME vsearch merge-pairs).

3. Фильтрация ридов по качеству с помощью команды q-score (QIIME quality-filter q-score).

4. Слияние дубликатов с помощью команды derepelicate-sequences (QIIME vsearch derepelicate-sequences).

5. Кластеризация де-ново с порогом 99% (QIIME vsearch cluster-features-de-novo).

6. Кластеризация с базой данных сиквенсов UNITE (версия 9.0 October 16, 2022), используя алгоритм cluster-features-closed-reference с порогом идентичности 97% (QIIME vsearch cluster-features-closed-reference).

7. Удаление химер с помощью команды uchime-ref (QIIME vsearch uchime-ref).

8. Классификация с помощью команды classify-sklearn (QIIME feature-classifier classify-sklearn) на классификаторе, который был обучен с помощью алгоритма «naive Bayes classifier algorithm» (QIIME feature-classifier fit-classifier-naive-bayes).

Результаты

Таксономическая структура. В результате биоинформационического анализа выявлено 859 операционных таксономических единиц (OTU), которые были привязаны к 520 таксонам. Уровень таксономической привязки и число таксонов каждого уровня отражены в таблице 1 и на рисунке 2А.

Таблица 1

Число таксонов на каждом таксономическом уровне и число OTU, классифицированных до каждого уровня

Таксономический уровень	Число OTU, классифицированных до уровня	Общее число таксонов на этом уровне
kingdom	6	1
phylum	27	6
class	40	22
order	76	67
family	104	169
genus	243	286
species	363	309

Количественная структура. Выявленные таксоны имеют разный вклад по обилию (числу видов) в структуру сообщества. Около половины списка представлено таксонами с единичными видами (от 1 до 100), 30% видов имеют обилие от 100 до 1000 видов, и около 15% – более 1000 видов (суммарно по всем пробам) (рисунок 2Б). Таким образом, без учета редких таксонов (число видов меньше 100) общий список сообщества может быть сокращен в четыре раза (до 200 таксонов).

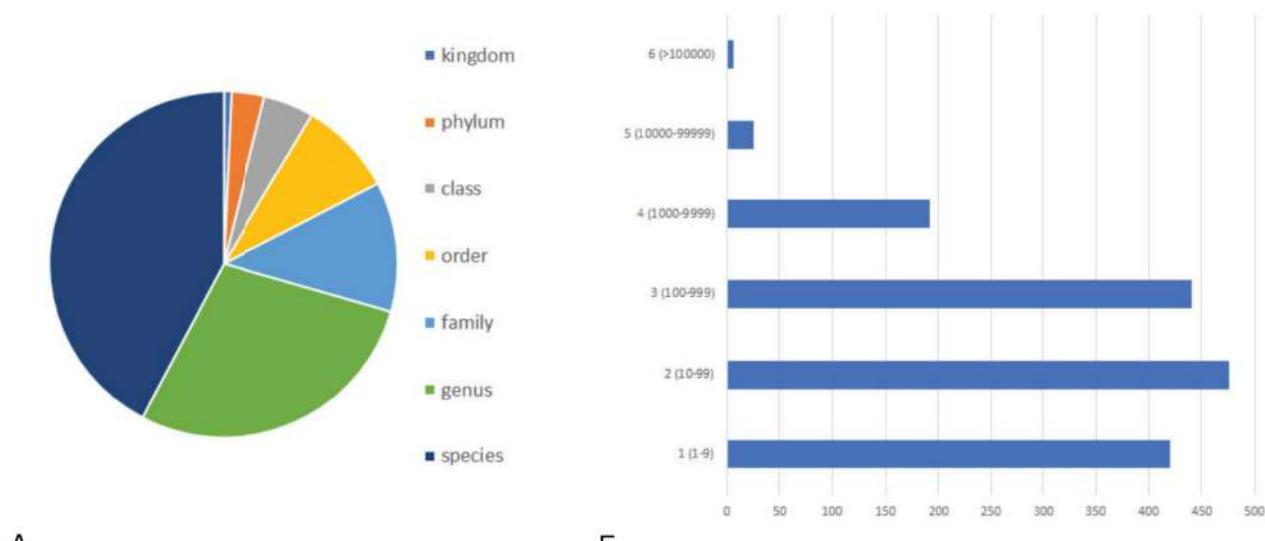


Рисунок 2 – Таксономическая и количественная структура сообщества: А – число OTU, классифицированных до определенного таксономического ранга, Б – диаграмма распределения обилия видов на логарифмической шкале

Анализ структуры сообщества по параметрам среды. В результате анализа сообществ получено представление о влиянии разных факторов на структуру сообщества. Показано, что тип древесины слабо или совсем не влияет на структуру сообщества.

Анализ структуры сообщества по параметрам среды. В результате анализа сообществ получено представление о влиянии разных факторов на структуру сообщества. Показано, что тип древесины слабо или совсем не

структурой грибного сообщества. В небольшой степени на формирование кластеров влиял тип местообитания, особенно тип местообитания верховых болот и хвойных лесов (рисунок 3). Фактор времени также слабо влиял на изменение структуры сообществ. Тем не менее среди проб выделяется 3 кластера, где таксономический состав и количество таксонов существенно различаются (рисунок 4, таблица 2).

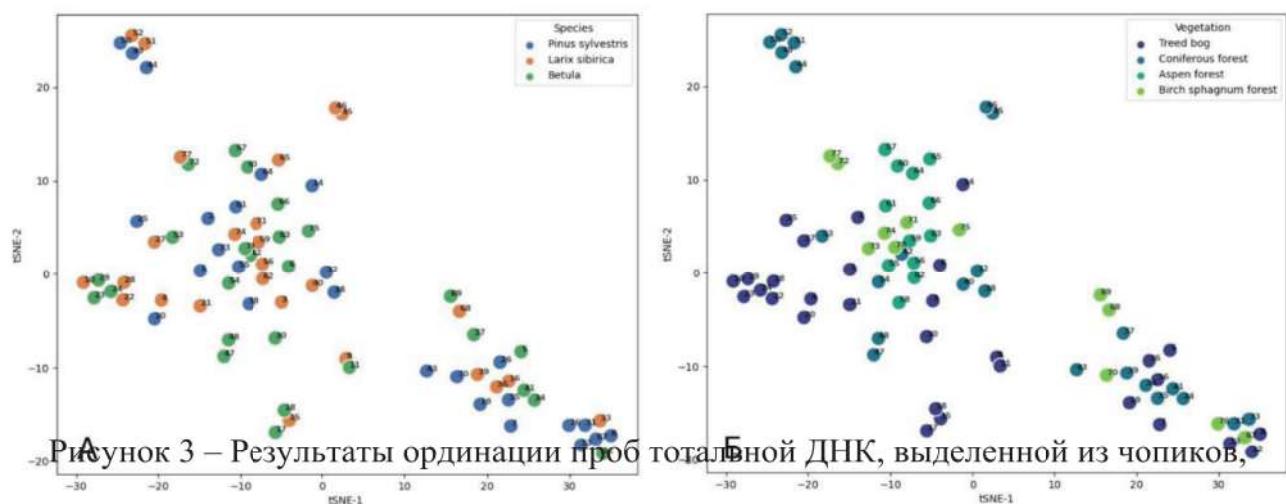


Рисунок 3 – Результаты ординации проб тотальной ДНК, выделенной из чопиков, по параметрам среды: А – тип древесины, Б – тип растительности
Рисунок 3 – Результаты ординации проб тотальной ДНК, выделенной из чопиков, из чопиков, по параметрам среды: А – тип древесины, Б – тип растительности по параметрам среды: А – тип древесины, Б – тип растительности

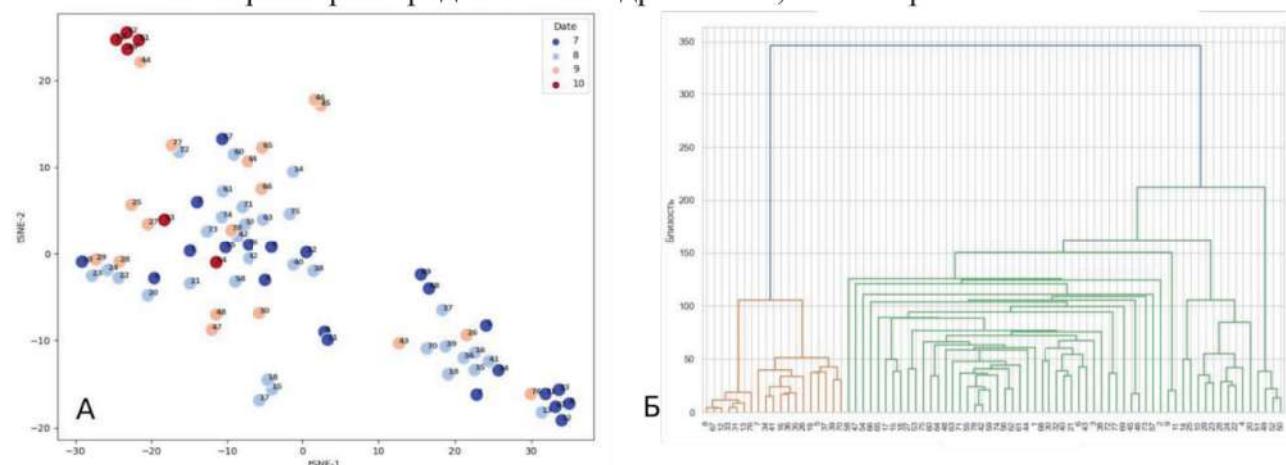


Рисунок 4А – результат ординации проб тотальной ДНК, выделенной из чопиков, по месяцам, 4Б – дендрограмма близости проб тотальной ДНК

Рисунок 4А – результат ординации проб тотальной ДНК, выделенной из чопиков, по месяцам, 4Б – дендрограмма близости проб тотальной ДНК

Таблица 2

Характеристики кластеров, полученных в результате построения дендрограммы

Таблица 2

проб тотальной ДНК, выделенной из чопиков

Характеристики кластеров, полученных в результате построения дендрограммы

Параметр	Кластер 1	Кластер 2	Кластер 3
проб тотальной ДНК, выделенной из чопиков			

Параметр	Кластер 1	Кластер 2	Кластер 3
----------	-----------	-----------	-----------

Таблица 2

Характеристики кластеров, полученных в результате построения дендрограммы проб тотальной ДНК, выделенной из чопиков

Параметр	Кластер 1	Кластер 2	Кластер 3
Номера проб	7, 8, 12, 13, 16, 31, 33, 34, 36, 41, 67, 76, 5, 19, 26, 35, 37, 39, 70	49, 50, 51, 52	1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 32, 38, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 68, 69, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 78
Общее кол-во проб	19	4	55
Индикаторные виды	Hormonema macrosporum; Aureobasidium pullulans; Athelia sp. (SH1249795.09FU); Helotiales gen. sp. (SH1081027.09FU);		
Saitozyma podzolica	Coniophora arida; Lentinellus flabelliformis; Tremella encephala; Aequabiella effuse; Тympanidaceae (SH0956366.09FU)	Hyaloscypha variabilis; Hormonema macrosporum; Athelia sp. (SH1249795.09FU); Xenasmatella christiansenii; Saitozyma podzolica	
Экология индикаторных видов	Сапротроф листового опада и древесины; Эпифит, эндофит, сапротроф, на листьях растений; Сапротроф древесины; Широкая экология; Дрожжи, почва	Сапротроф древесин; Сапротроф древесины; Паразит грибов, дрожжи; Паразит растений; Сапротрофы, в том числе древесины	Сапротроф древесины; Сапротроф листового опада и древесины; Сапротроф древесины; Сапротроф древесины; Дрожжи, почва
Вклад индикаторных видов в общее обилие в рамках кластера	75%	90%	20%

Благодарности

Работа является частью проекта Д. Щигеля «ezDowels – a new method to study and monitor fungal colonization of boreal wood». Мы благодарим за поддержку полевой работы над проектом European Union's Horizon 2020 project INTERACT (ezDowels), а также грант для организации молодежной лаборатории в Югорском государственном университете.

Список литературы

1. Flores O., Coomes D. A. Estimating the wood density of species for carbon stock assessments // Methods in Ecology and Evolution. 2011. V. 2: 2. P. 214–220.
2. Keith H. [et al.]. Managing temperate forests for carbon storage: impacts of logging versus forest protection on carbon stocks // Ecosphere. 2014. V. 5: 6. P. 1–34.
3. Fukasawa Y., Matsukura K. Decay stages of wood and associated fungal communities characterise diversity-decomposition relationships // Scientific Reports. 2021. V. 11: 1. P. 8972.
4. Boddy L. Fungal community ecology and wood decomposition processes in angiosperms: from standing tree to complete decay of coarse woody debris // Ecological Bulletins. 2001. P. 43–56.
5. Anderson I. C. [et al.]. Diversity of fungi in organic soils under a moorland–Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient // Environmental Microbiology. 2003. V. 5: 11. P. 1121–1132.
6. Lindahl B. [et al.]. Translocation of 32P between interacting mycelia of a wood-decomposing fungus and ectomycorrhizal fungi in microcosm systems // The New Phytologist. 1999. V. 144.1. P. 183–193.
7. Müller M. [et al.]. Applying molecular and genetic methods to trees and their fungal communities // Applied Microbiology and Biotechnology. 2023. V. 107: 9. P. 2783–2830.
8. Filippova N. V. [et al.]. The history of mycological studies in Khanty-Mansi autonomous okrug: 1) the period of isolated studies, lignicolous basidiomycetes and phytopathological studies // Environmental dynamics and global climate change. 2017. V. 8: 2. P. 18–28.
9. Filippova N. V. [et al.]. The history of mycological studies in Khanty-Mansi autonomous okrug: 2) studies of Macromycetes, Lichens and Myxomycetes, state of mycological collections and fungal records database // Environmental dynamics and global climate change. 2017. V. 8: 2. P. 29–45.
10. Shumskaya M. [et al.]. MycoPins: a metabarcoding-based method to monitor fungal colonization of fine woody debris // MycoKeys. 2023. V. 96. P. 77.