

Налян Армен Григорьевич

Влияние экологических факторов на качественный и количественный состав микробиоты в почвах различных типов ландшафта

03.02.08 - экология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа – 2010

Работа выполнена в Отделе биотехнологии государственного университета им. Стивена Остина (Техас, США) и на кафедре биохимии ГОУ ВПО «Башкирский государственный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Ибрагимов Ринат Исмагилович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Кураков Александр Васильевич

доктор биологических наук, профессор
Усманов Искандер Юсуфович

Ведущее учреждение: ГОУ ВПО "Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева".

Защита диссертации состоится “3 ” декабря 2010 г. в “ 14:00” часов на заседании Объединенного диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 69. Тел. /факс (3472) 235-53-62. E-mail: ib@anrb.com

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии УНЦ РАН, с авторефератом в сети интернет по адресу:

<http://www.anrb.ru/inbio/dissovet/index.htm>

Ученый секретарь
Объединенного диссертационного совета,
к.б.н., доц.



Уразгильдин Р.В.

1. Общая характеристика работы

Актуальность темы. Микроорганизмы (грибы, водоросли, простейшие, бактерии, актиномицеты) являются важнейшим компонентом почвы и вносят значительный вклад в формирование структуры наземных экосистем (Звягинцев, 1987; Бахнов, 2002; Звягинцев, 2005). Масса почвенной микробиоты составляет большую часть общей массы всех микроорганизмов нашей планеты. Однако, сведения о биологии почвенных микроорганизмов, о видовом разнообразии, об их относительном обилии в различных типах почв, весьма ограничены (Алехина и др. 2002; Полянский и др. 2002; Добровольский, Никитин, 2006). Получение новых экспериментальных данных ограничивается тем, что до недавнего времени отсутствовали адекватные высокоинформативные методы исследования микроорганизмов почвы в естественной среде их обитания.

Как известно, большинство почвенных микроорганизмов не способны к культивированию в искусственных условиях вне их естественного места обитания (Muzyer et al., 1993). Соответственно, истинное количество видов микроорганизмов и их относительное изобилие в почве до сих пор не известны. Предполагается, что в почве могут обитать десятки тысяч видов бактерий, но лишь небольшая доля этих бактерий выделена и охарактеризована (Muzyer, Smalla, 1998; Whitman, Coleman, 1998; Ward, 2006). По оценкам некоторых авторов, разнообразие почвенных грибов может достигать до 1,5 млн. видов (Hawksworth, Rossman, 1997; Mueller, Schmit, 2007). Мало изученными остаются и вопросы, касающиеся количественного и качественного состава, структуры различных микробных сообществ в зависимости от физических и химических свойств почвы, при действии различных экологических факторов, таких как влажность, рельеф и т.д. Следует отметить, что в последние годы были разработаны молекулярно-генетические методы, позволяющие идентифицировать и определить разнообразие микроорганизмов в различных средах, включая и организмы, которые не поддаются изучению при помощи традиционных микробиологических методов (Dunbar et al., 1999; Roesch et al., 2007). К таким методам относится технология параллельного высокопроизводительного пиросеквенирования, которая позволяет анализировать последовательности ДНК генов 18S и 16S рРНК (Rothberg, Leamon, 2008). Другой молекулярный метод денатурирующего градиентного геля - электрофореза продуктов ПЦР позволяет сравнивать состав различных микробных сообществ в целом, без таксономической идентификации (Muzyer, 1999).

В нашей работе были разработаны методические подходы, позволяющие использовать эти технологии для анализа генетического разнообразия сообществ почвенных микроорганизмов и оценки влияния факторов окружающей среды на состав и структуру этих сообществ.

Цели и задачи работы. Целью настоящей работы является определение генетического разнообразия и изобилия бактерий, грибов в почвах различных типов ландшафта и оценка степени влияния экологических факторов на качественный и количественный состав почвенной микробиоты.

Были поставлены следующие **задачи**:

Разработка методических подходов применения денатурирующего градиентного геля - электрофореза и пиросеквенирования для измерения генетического разно-

образия, идентификации (классификации) эукариотических и прокариотических организмов в почвенных образцах.

Идентификация и таксономическая классификация почвенных микроорганизмов, в т.ч. и из ризосферы растений, по первичной последовательности ДНК (генов 18S и 16S рРНК).

Определение относительного количества таксонов прокариот и выявление доминирующих групп организмов в бактериальных сообществах почв различных типов ландшафта в зависимости от экологических факторов.

Определение относительного количества таксономических групп почвенных грибов и выявление доминирующих таксонов в ризосфере в зависимости от вида растений и условий их произрастания. Оценка степени влияния экологических факторов на уровень генетического многообразия и изобилия различных таксонов почвенных микроорганизмов.

Измерение и анализ параметров качественного и количественного состава арбускулярно - микоризных грибов в зависимости от вида растения-хозяина и экологических факторов.

Научная новизна. Впервые, с использованием метода пиросеквенирования, проведен анализ генетического разнообразия и изобилия микробиоты в ризосфере растений естественных сообществ и определена степень зависимости этих параметров от экологических факторов. Впервые выявлены доминирующие таксоны микроорганизмов в составе естественных микробсообществ почвы различных типов ландшафтов.

Практическая значимость. Разработаны методические подходы, позволяющие применять технологии пиросеквенирования и денатурирующего градиентного гель - электрофореза ПЦР - продуктов для анализа генетического разнообразия сообществ и идентификации почвенных микроорганизмов. Предложенные методики можно использовать для мониторинга состояния естественных экосистем, агроценозов, урбанизированных территорий. Результаты исследований могут быть использованы в качестве учебного материала для освоения теоретических курсов и проведения лабораторных занятий на биологических, экологических, агрономических специальностях ВУЗов.

Положения, выносимые на защиту.

Технология идентификации почвенных бактерий и грибов, определения степени генетической гетерогенности и изобилия почвенной микробиоты по анализу первичной структуры ДНК генов 18S и 16S рРНК.

Методики использования статистических методов многомерного анализа для характеристики сообществ почвенных микроорганизмов.

Степень влияния экологических факторов на генетическое разнообразие бактерий и грибов, на структуру сообществ этих микроорганизмов.

Зависимость структуры почвенного микробсообщества в ризосфере от видовых особенностей растения-хозяина.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были доложены: на Международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск, 2010); на 4-х международных симпозиумах Международной ассоциации наук о растительности (IAVS): 52-ой (г. Ханья, Греция, 2009), 51-ый (г. Стеленбош, Южная Африка, 2007), 49-ый (г. Пал-

мерстон, Новая Зеландия, 2007), 47-ой (г. Кона, Гавайи, 2004): на 6-и конференциях Техасской Академии Наук: 112-ой (г. Джанкшон, 2009), 111-ой (г. Корпус Кристи, 2008), 110-ой (г. Вейко, 2007), 109-ой (г. Бомонд, 2006), 108-ой (г. Эдинбург, 2005), 107-ой (г. Кервиль, 2004).

Публикация результатов работы. По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в т. ч. 5 статей в изданиях, включенных в перечень ВАК РФ.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методов исследования, результатов и их обсуждений, выводов, списка литературы включающего 174 наименований отечественных и зарубежных авторов. Диссертация изложена на 144 страницах, иллюстрирована 28 рисунком, 12 таблицами и приложением.

Объекты исследований. Объектом исследования служили ДНК, выделенные из образцов почвы и растений естественного леса в восточной части штата Техас (США). Экспериментальные участки для отбора образцов почвы и растений (размер участка 1000 м²) были подобраны в соответствии с разработанной экологической системой для классификации национальных лесов западных прибрежных равнин США (Turner et al., 1999; Van Kley et al., 2007). Участки леса располагались в одной из трех основных типов ландшафта: возвышенности с преобладанием сосны (ВПС), умеренно пологие склоны (УС) и затопляемые поймы рек (ЗП). Для характеристики влажности почвы на различных участках ландшафта нами был использован показатель топовлажности, характеризующий соотношение влажности и топографического положения участка. На каждом участке были определены физические и химические параметры почвы: относительное содержание глины, песка и т. д.), содержание минеральных элементов (N, Mg, K, P), (Jones, 2001), а также параметр (PCTPOS), отражающий относительную позицию участка (угол склона, высоту над уровнем моря). Коэффициент PCTPOS определяли по следующей формуле: $100 \times (hS-hL)/(hH-hS)$, где hS – высота изучаемого участка, hL-высота самой низкой точки в радиусе 1км, hH - высота самой высокой точки в радиусе 1 км. Всего было учтено девятнадцать экологических факторов, характеризующих место обитания микроорганизмов. Образцы почвы и корней были взяты из ризосферы 3-х видов растений, доминирующих в исследуемых фитоценозах: *Chasmanthium sessiliflorum* (Poir.) Yates (CHSE), *Callicarpa americana* L. (СААМ), *Toxicodendron radicans* (L.) Kuntze (TORA). Для анализов, с каждого исследуемого участка ландшафта, было отобрано по три экземпляра растения каждого вида и образцы почвы в трехкратной повторности.

Лабораторный анализ. Образцы корней погружались в воду для очистки от больших комков почвы и высушивали, ~ 0,5 г корней гомогенизировали в ступке с жидким азотом. Экстракция ДНК производилась по методике Ultra Clean™ Soil DNA Kit (Mo Bio Laboratories, Inc). Пиросеквенирование ДНК (454 Life Sciences™) осуществляли в научно-исследовательском Институте Биопленок (Medical Biofilm Research Institute (Lubbock, TX) при помощи Genome Sequencer FLX System (Roche, Nutley, New Jersey). В целом, методом пиросеквенирования было проанализировано 5 образцов почвы (16S rDNA) и 20 образцов ризосферы (18S rDNA). ПЦР-анализ ДНК генов бактериальной 16S рРНК с последующим денатурирующим градиентным гель электрофорезом (ДГГЭ) проводили использованием двух универсальных праймеров. Для амплификации 18S рРНК арбускулярно-микоризных грибов использовали два специфичных праймера. (Simon et al., 1992; Helgason et al., 1993). ДГГЭ

проводили в 8 % в ПАА-геле с ТАЕ буфером при $T=60^{\circ}\text{C}$, на приборе C. V. S. Scientific Company, Inc., Del Mar, CA. Гели окрашивали в SYBR Green (Sigma) и фотографировали в ультрафиолете с использованием программы QuantityOne 4.1 software (Bio-Rad). В целом, методом ДГГЭ было проанализировано 29 почвенных, 137 ризосферных (корневых) образцов ДНК, методом пиросеквенирования - 5 почвенных и 20 ризосферных образцов.

Математическая обработка результатов. Для анализа результатов ДГГЭ и пиросеквенирования нами были разработаны программы и составлена база данных на языке программирования Python (<http://python.org>) и MySQL (<http://www.mysql.com>). Для статистического анализа использовался статистический язык программирования R, версия 2.6.2 (Free Software Foundation, Inc Boston, MA), а также пакет программ Vegan (Oksanen, 2005). Преобразование изображения гелей (1000 пикселей в высоту) в цифровую форму осуществляли при помощи библиотеки Python Imaging Library (PIL). Коэффициент сходства (S_i) между двумя профилями измерялся при помощи формулы Брейя-Куртиса (Beals, 1984): $S_i = 2C / (A + B)$, где A и B число уникальных полос в профилях A и B , соответственно, C - число общих полос в двух образцах. Эукариотические последовательности, полученные после пиросеквенирования, были классифицированы с использованием программы BLAST (Basic Local Alignment Tool) (Altschul et al., 1990). Пользовательская база данных была подготовлена с использованием эукариотических последовательностей, с известными таксономическими данными, полученными из GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov>). Прокариотические последовательности были классифицированы с помощью программы RDP classifier (Wang, 2007). Видовое богатство (S) рассчитывалось как общее количество найденных видов в образце. Разнообразие (H) рассчитывалось по индексу Шеннона-Винера (Thomas, Krebs, 1997). Выравненность рассчитывалась по формуле $H/\log(S)$. Для определения наиболее значимых экологических факторов использовали методы ординации: анализ избыточности - Redundancy Analysis (RDA) или ограниченный анализ соответствий Constrained Correspondence Analysis (CCA). (Jongman et al., 1995; Ter Braak, Verdonschot, 1995). В случае, когда данные содержали много нулей, или исключений, данные были проанализированы при помощи "non-metric multidimensional scaling" (NMDS) (Jongman et al., 1995; Kruskal, 1964). Выборка, экологических переменных для RDA или CCA, была осуществлена при помощи "forward selection" и 10,000 перестановок Монте-Карло. Для моделирования связи между видовым богатством и экологическими переменными применялись линейные регрессии и обобщенные аддитивные модели (GAM), используя пакет mgcv (Wood, 2008).

2. Результаты и обсуждение

2.1. Генетическая гетерогенность бактериальных сообществ почвы в зависимости от эдафических факторов

2.1.1. Анализ бактериальных сообществ в почве по результатам пиросеквенирования ДНК генов 16S рРНК

Было осуществлено пиросеквенирование пяти образцов почвы. С каждого образца было получено в среднем около шести тысяч последовательностей. Абсолютно большая часть (более 99 %) обнаруженных последовательностей принадлежит к истинным бактериям. Относительная доля выявленных последовательностей, принадлежащих к царству Archaea, было весьма невелико, от 0,09 до 0,5 %. Наибольшее число родов *Archaea* (17) было обнаружено в глинистой почве затопляемых пойм (ЗП). Наименьшее число видов (всего 3) было обнаружено в образцах почвы из сухих возвышенностей (ВПС). Всего удалось идентифицировать 28 родов археобактерий. Из представителей царства *Bacteria*, было идентифицировано 766 видов, принадлежащих к 32 типам, 40 классам, 86 порядкам, 178 семьям, 611 родам. В почвах исследуемых участков выявилось относительно равномерное распределение таксономических групп бактерий, за исключением представителей родов *Planctomycetes* и *Nitrospira*. Представители первого рода были обнаружены только в глинистых сухих почвах ВПС, второго рода – в почвах ЗП. В таблице 1 приведены данные о количественном распределении представителей видов (обилии) десяти наиболее распространенных таксономических типов в почвах исследуемых участков.

Таблица 1

Относительная доля (%) распределения видов десяти наиболее распространенных таксономических типов бактерий в почвах

Таксон	Экспериментальные участки				
	А	В	С	Д	Е
<i>Acidobacteria</i>	41.4	31.9	16.8	18.8	22.4
<i>Proteobacteria</i>	23.9	31.8	45.2	28.5	40.1
<i>Actinobacteria</i>	23.0	18.6	20.1	36.9	19.5
<i>Firmicutes</i>	4.9	4.1	4.4	5.0	5.6
<i>Verrucomicrobia</i>	2.1	3.8	9.1	4.4	6.4
<i>Chloroflexi</i>	1.3	3.7	0.8	2.2	1.5
<i>Chlamydiae</i>	0.7	0.5	0.5	0.5	1.1
<i>Bacteroidetes</i>	0.4	0.5	1.0	0.7	0.8
<i>Nitrospira</i>	0.4	2.9	0.2	0.0	0.0
<i>Planctomycetes</i>	0.1	0.1	0.3	1.3	0.5

Примечание: А – сезонно регулярно затопляемые болота с глинистой почвой; В – сезонно затопляемые поймы; С – пологие склоны и русла дождевых потоков; Д – умеренно-сухие возвышенности сосново-лиственного леса с глинистой почвой; Е – умеренно-сухие возвышенности сосново-лиственного леса с песчаной почвой.

Как видно из таблицы, в изучаемых сообществах бактерий, доминируют представители типов *Acidobacteria*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. Относительная доля обилия представителей этих типов в почве составляла 16 - 45 %. Обилие видов *Acidobacteria* в пойменных почвах было 1,5 - 2 раза выше, чем в почвах возвышенностей и склонов. Представители типа *Firmicutes* были более равномерно распределены в изучаемых образцах (относительная доля ~ 5 %). Нитритоксилирующие бактерии (*Nitrospira*) были обнаружены только в почвах сезонно затопляемых участков. Представители типа *Planctomycetes* были найдены только в сухих возвышенных участках рельефа. Анализ модели, описывающей видовой богатство бактериальных сообществ, показал, что ни один из изученных почвенных факторов не является значимым. Видовое разнообразие оказалось зависимым от содержания фосфатов в почве ($P=0,015$) (рис. 1, E). Как видно, коэффициент видового разнообразия в почвах с низким и высоким уровнем содержания фосфатов выше, чем в образцах со средними значениями концентрации ионов фосфора.

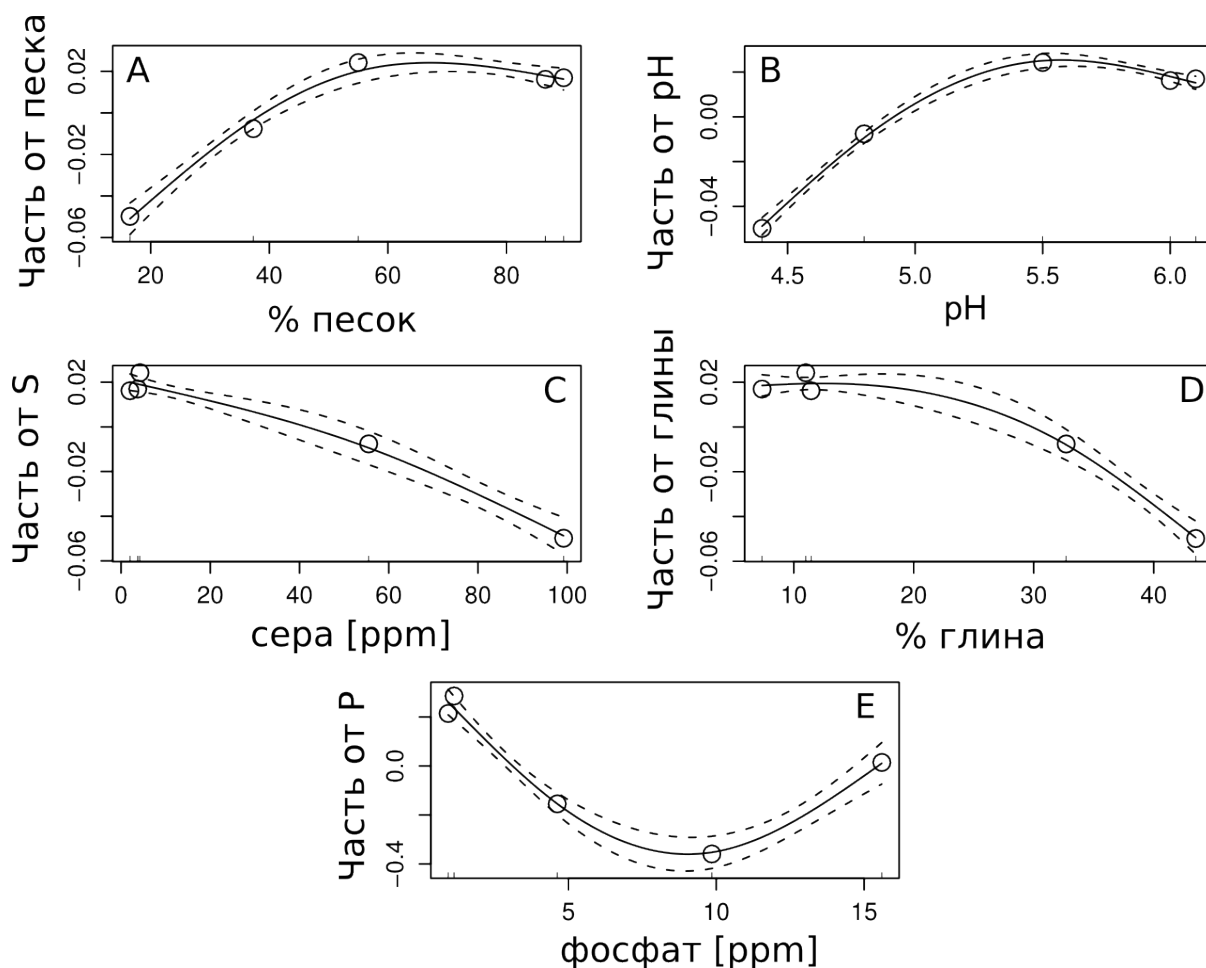


Рис. 1. Зависимость бактериального разнообразия и равномерности распределения от почвенных факторов.

Примечание: А - содержание песка - равномерность; В - значение рН - равномерность; С - содержание серы - равномерность; D - содержание глины - равномерность; E – содержание фосфатов - бактериальное разнообразие. Примечание: По оси X - почвенные факторы; по оси Y- доля влияния соответствующего фактора. Пунктиром показан 95 % доверительный интервал.

Существенное влияние на показатель равномерности распределения видов оказывали: содержание песка в почве ($P = 0,011$), глины ($P = 0,008$), серы ($P = 0,006$), а также кислотность почвы ($P = 0,003$) (рис. 1).

Самые высокие показатели равномерности распределения выявлены в образцах с относительно высоким содержанием песка (более 60 %) и относительно низкими значениями кислотности ($pH \geq 5,5$). В кислых почвах с низким содержанием песка значения коэффициента равномерности были невысокими. Кривые корреляции между коэффициентами равномерности и содержанием глины, серы показали обратную зависимость. Показатели равномерности оказались самыми высокими в почвах с низким содержанием серы и глины, и их значения уменьшались в почвах с низким содержанием глины и серы. На рисунке 2 представлены результаты факторного анализа, проведенного по методу главных компонент (РСА) с использованием ковариационной матрицы и с учетом видов с высокими коэффициентами избытия.

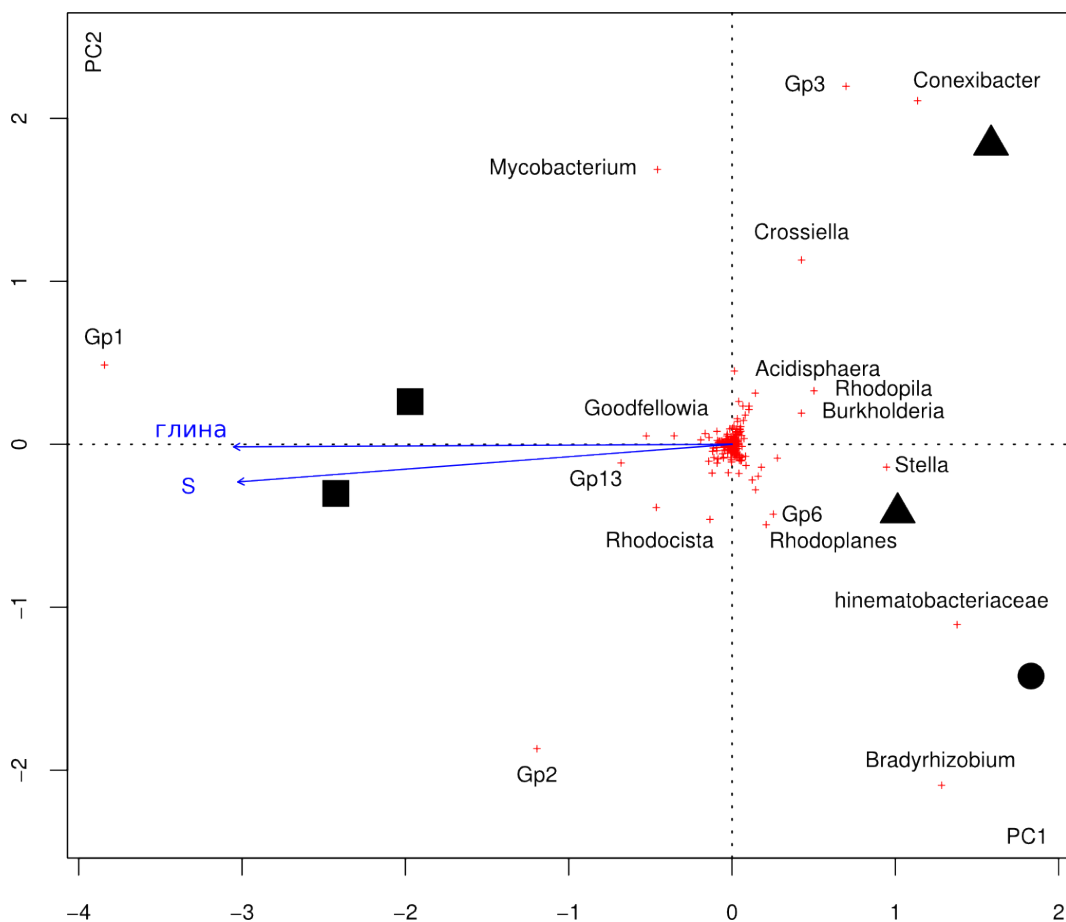


Рис. 2. Диаграмма РСА бактериальных сообществ в исследуемых почвах.

● - Пологие склоны; ▲ – высотные участки соснового леса, ■ - затопляемые поймы.

Примечание: Положения популяций изображены в пространстве двух главных осей (PC1, PC2) максимального варьирования. Чем ближе друг к другу располагаются на графике координатные точки, тем выше генетическое сходство популяций бактерий. Значимые векторы показаны как стрелки, показывающие направления увеличения переменной.

Сумма полученной вариации (дисперсии) между первыми двумя осями составляет 89,9 %. Показатель регрессия экологических параметров по оси ординат свиде-

тельствуют о том, что содержание серы ($P=0.069$), глины ($P=0.086$) и вид ландшафта ($P=0,068$) оказывают существенное влияние на структуру бактериальных сообществ. В почвах с высоким содержанием азота (УС) выявлен высокий показатель изобилия бактерий типа *Bradyrhizobium*, являющихся симбиотическими азотофиксаторами. Участки с ландшафтом ВПС обладали высоким обилием родов *Conexibacter* и *Mycobacterium*, из типа *Actinobacteria*, а также рода Gr3, принадлежащего к типу *Acidobacteria*. PCA анализ также был проведен с использованием корреляционной матрицы. В этом случае, мы рассматривали все обнаруженные в образцах виды бактерий, включая и редко встречающиеся виды. Оказалось, что первые две оси показали только 60 % дисперсию. Это свидетельствует о том, что при анализе всех обнаруженных видов, различия в структуре бактериальных сообществ различных исследованных участков, менее значимы. Была обнаружена корреляция уровня разнообразия сообществ бактерий с типом ландшафта ($P < 0,0001$), и маргинальные значения коэффициента корреляции для факторов: содержание фосфатов ($P = 0,0179$), содержание ионов кальция ($P = 0,0161$).

2.1.2. Изменения в структуре бактериальных сообществ в зависимости от почвенных факторов (по результатам денатурирующего градиентного гель-электрофореза ДНК генов 16S рРНК)

При помощи ДГГ-электрофореза было проанализировано 29 образцов ДНК выделенных из исследованных почв. Максимальное количество полос (таксонов) на электрофореграмме составило 50, минимальное – 34. Дисперсионный анализ (ANOVA) показал существенные различия по числу таксонов между образцами почв различных типов ландшафта ($P = 0,0125$). Наиболее бедными по числу таксонов бактерий ($P = 0,0325$) оказались сухие песчаные почвы. Количество выявленных таксонов в этих почвах составило от 34 до 46. Дисперсионный анализ показал, что наиболее существенное влияние на видовое богатство прокариот оказывают следующие экологические факторы: тип ландшафта ($P = 0.009$), топовлажность ($P = 0,037$), РСТРОС ($P = 0,015$) и значение рН ($P = 0,002$) (рис.3). Эти параметры определяют 81 % дисперсии показателя видового богатства сообществ. Можно констатировать, что с повышением величины РСТРОС, число таксонов в почвах снижается, минимальное их количество обнаружено в сухих почвах возвышенностей. Видовое разнообразие бактерии увеличивается с понижением кислотности почвы от рН 4,2 до 5,5. Функция зависимости видового разнообразия от топовлажности оказалась не линейной. Можно предположить, что такая зависимость выявляется вследствие использования в модели недостаточного количества экологических параметров.

Использование модели ССА показало, что наиболее важное значение для формирования структуры бактериальных сообществ имеют следующие факторы: тип ландшафта ($P = 0,021$), содержание фосфатов ($P = 0,045$) и топовлажность участка ($P = 0,061$) (рис. 4). Первая ось показывает разброс коэффициента структуры сообщества по типам ландшафта. Видно, что все изученные образцы (кроме двух из затопляемых пойм), находятся на правой стороне координат.

Эти два образца перекрываются с группами образцов почв из возвышенных участков и пологих склонов, которые находятся на левой стороне графика. Вторая ось разделяет образцы по содержанию фосфатов в почве и топовлажности.

Большинство образцов с нижней части ординации (-2 до 0) принадлежат сухим почвам пологих склонов и сосновых лесов (ВПС). В целом, оси ССА определяют 58 % дисперсии всех данных.

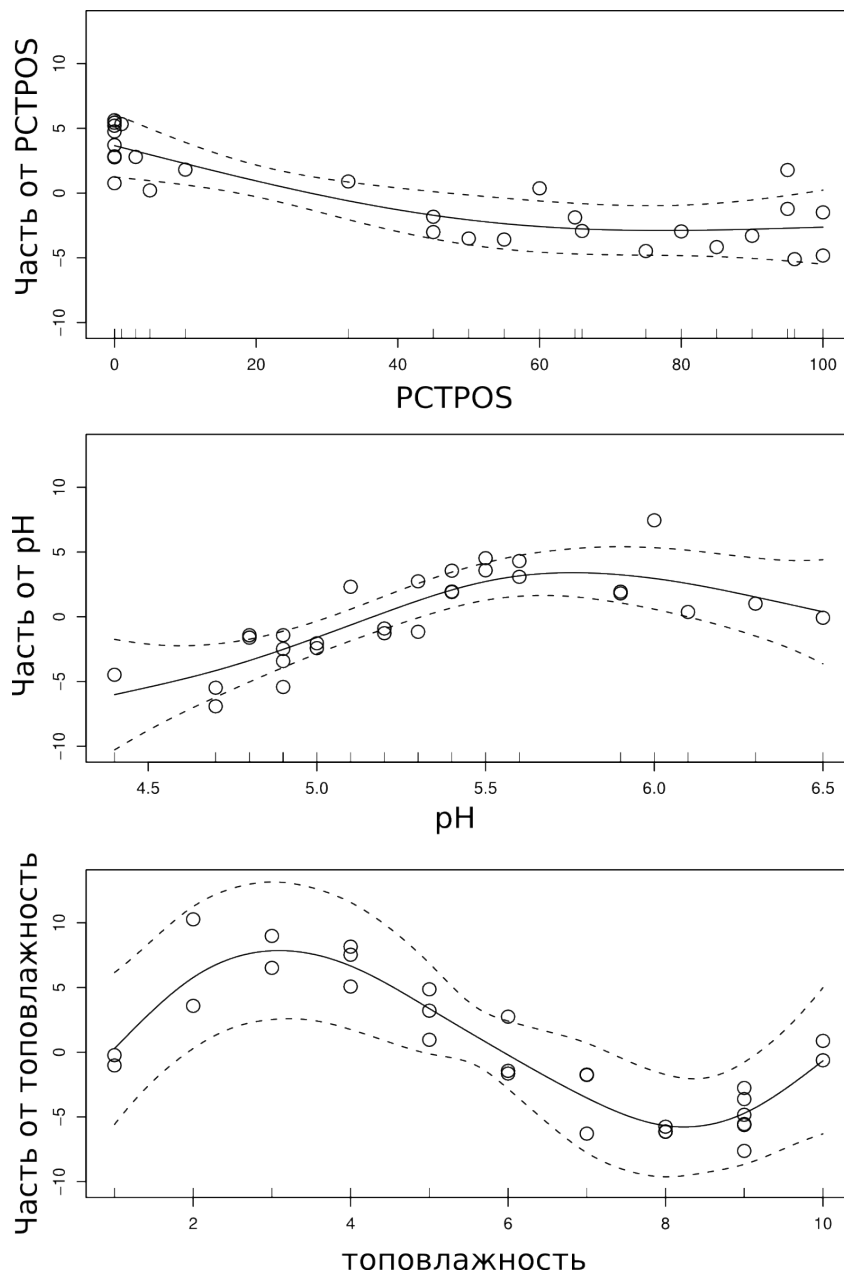


Рис. 3. Зависимость видового богатства сообществ почвенных бактерий от экологических факторов (рН, РСТРОС, топовлажность).

Примечание: По оси X - значения экологических факторов; по оси Y - доля влияния соответствующего фактора. Пунктиром показан 95 % доверительный интервал.

Предполагалось, что ДГГЭ - анализ позволяет обнаружить лишь 1 - 2 % видового состава бактериальных сообществ почв (MacNaughton, 1999). Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что разрешающая способность этого метода значительно выше. Так, ДГГ - электрофорезом во всех исследованных образцах почвы нами выявлено 77 уникальных таксонов бактерий, пиросеквенированием - 766 таксонов. Как видно, с помощью ДГГЭ - анализа нам удалось обнаружить около

10 % таксонов бактерий от числа таксонов, выявленных методом пиросеквенирования.

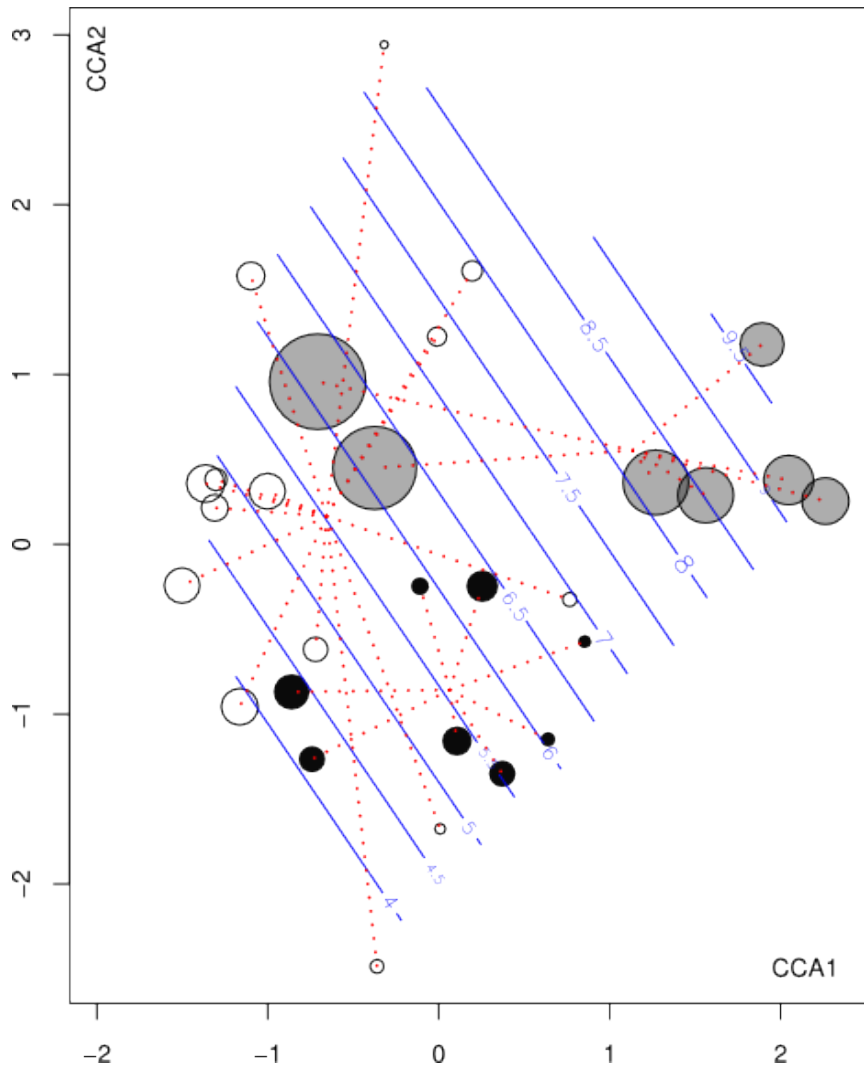


Рис. 4. Ординация результатов канонического анализа соответствий (ССА) ДГГЭ-профилей ДНК.

Примечание: Белые кружки - ВПС, серые кружки - ЗП, и черные кружки - УС. Размер символов соответствует содержанию фосфатов (1 - 20 м.д.), сплошные линии обозначают градиент то-повлажности.

2.2. Генетическая гетерогенность сообществ почвенных (микоризных) грибов ризосферы дикорастущих растений

2.2.1 Зависимость структуры сообществ ризосферных грибов от экологических факторов (по результатам пиросеквенирования ДНК генов 18S рРНК)

Всего было пиросеквенировано 20 образцов, представителей 3-х растений-хозяев отобранных из трех типов ландшафтов. Из каждого типа ландшафта были выбраны наиболее отличающиеся участки. Восемь образцов ДНК были выделены из ризосферы *T. radicans*, шесть образцов из ризосферы *C. americana*, и шесть образцов из ризосферы *C. sessiliflorum*. В результате было получено более 160 тысяч различных

последовательностей генов грибов (18S рРНК). В таблице 2 представлены данные об относительной доле представителей различных типов грибов в ризосферных сообществах изученных растений. Как видно, наибольшее распространение, имели представители типа *Ascomycota* (относительная доля 96 %). При этом, ризосферы изученных растений по относительному обилию грибов *Ascomycota* существенно не различались. Представители других типов грибов в ризосфере растений присутствовали в значительно меньших количествах: *Glomeromycota* ~ 5 %, *Basidiomycota* – 0,4 - 1 %, *Chytridiomycota* - 0,10 - 0,38 %. Необходимо отметить, что ризосферы изученных растений имеют значительные различия по относительному изобию грибов этих типов. Так, в ризосфере *C. americana* коэффициент обилия типа *Glomeromycota* был в пять раз выше, чем аналогичный коэффициент типа *Chytridiomycota*. Также этот коэффициент у *C. americana* оказался в пять раз выше, чем коэффициенты обилия грибов *Glomeromycota* в ризосфере двух других видов растений. Представители типа *Basidiomycota* преимущественно были выявлены в *C. sessiliflorum*. Коэффициент относительного обилия таксонов с неопределенным систематическим положением было сравнительно одинаковым для всех изученных растений.

Таблица 2

Относительная доля обилия представителей различных таксонов грибов в ризосферных сообществах трех видов растений

Тип грибов	<i>C. americana</i>	<i>C. sessiliflorum</i>	<i>T. radicans</i>
<i>Ascomycota</i>	91.3	96.1	96.1
<i>Glomeromycota</i>	5.6	0.6	1.2
<i>Basidiomycota</i>	0.4	1.2	0.1
<i>Chytridiomycota</i>	0.4	0.2	0.1
Не определенные грибы	2.3	1.8	2.4

Анализ относительного типового обилия грибов при помощи неметрического многомерного масштабирования показал, что сообщества ризосферных грибов изученных растений существенно различаются по составу (рис. 5). Как видно, образцы из ризосферы *T. radicans* расположены в нижней части, образцы из *C. sessiliflorum* - в средней части, и образцы из *C. americana* - в верхней части диаграммы. Таким образом, разделение образцов по вертикальной оси ординат демонстрирует гетерогенность грибных сообществ в ризосферах изученных растений. Регрессионный анализ экологических факторов показал, что статистически значимое влияние на состав грибных сообществ (на уровне типов) в ризосферах оказывают: кислотность почвы ($P = 0,042$), содержание песка ($P = 0,038$), РСТРОС ($P = 0,008$), топовлажность ($P = 0,002$), тип ландшафта ($P = 0,041$). Необходимо отметить, что разделение образцов по видам растений на диаграмме было не полным и несколько образцов из разных ризосфер имели сходную структуру грибных сообществ. Этот факт свидетельствует о важности вклада экологических факторов в формирование структуры микробных сообществ в ризосфере растительного организма.

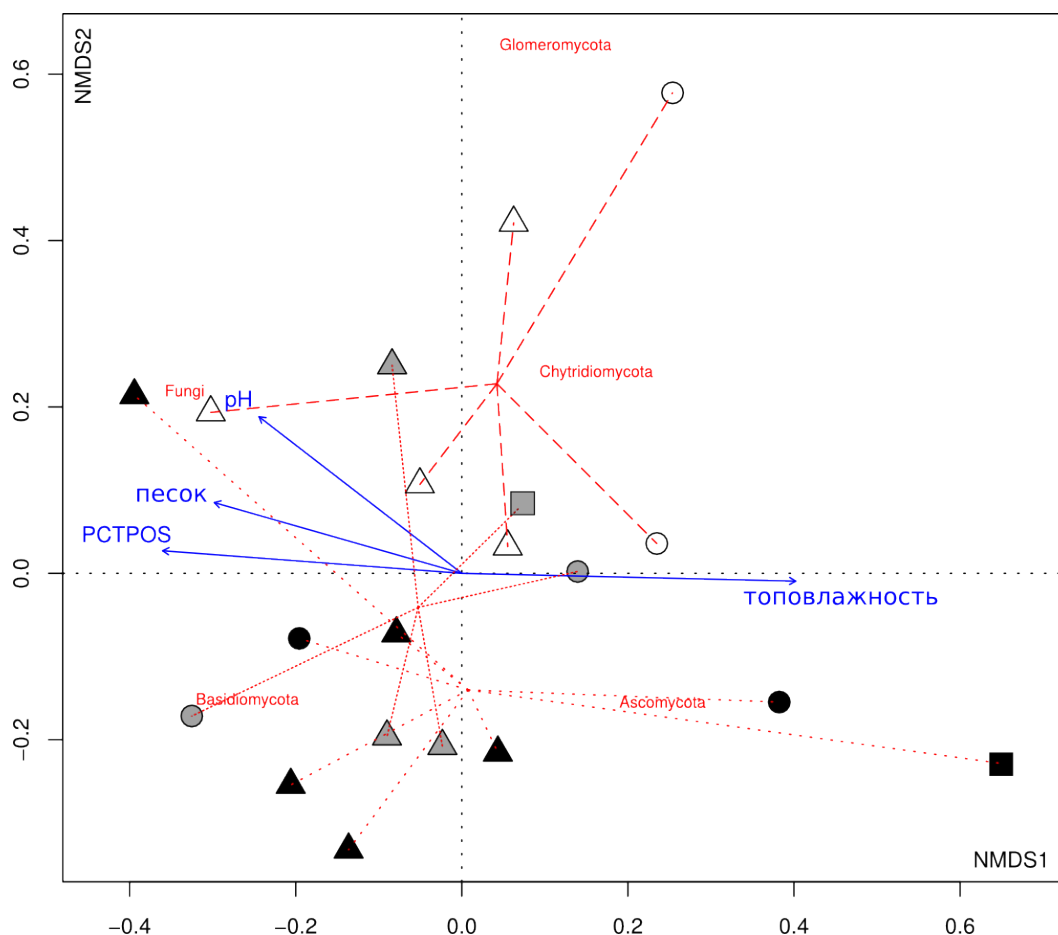


Рис. 5. Результаты неметрического многомерного масштабирования (NMDS) относительной доли обилия типов грибов.

Примечание: Образцы из умеренно покатых склонов (УС) показаны кружками, образцы из высоких участков (ВПС) показаны как треугольники, и затопляемых пойм (ЗП) как квадраты. Черный цвет - *T. radicans*, серый цвет - *C. sessiliflorum*, белый цвет - *C. americana*. Стрелки показывают направления увеличения значений градиентов.

Общее количество выделенных последовательностей ДНК, принадлежащих к типу *Ascomycota*, составило 118350. Из этого массива удалось идентифицировать 871 видов, относящихся к 18 классам, 61 порядку, 199 семействам и 574 родам. Таксоны, с коэффициентом относительного изобилия $\leq 0,5$ %, в последующих анализах не рассматривались.

До уровня видов были идентифицированы последовательности ДНК с уровнем идентичности с маркерными последовательностями из базы данных более 97 %. Количество таких экспериментальных последовательностей составило 87,4 % от общего числа всех обнаруженных 18S рДНК. Последовательности генов с уровнем идентичности 95 - 97 % были отнесены к видам с меньшей долей вероятности и классифицированы как «подобные виду» ("species like"). Таких последовательностей в наших экспериментах оказалось 9,3 % от общего количества. И лишь 3,3 % последовательностей имели коэффициент идентичности ниже 95 %, соответственно, эти генотипы были определены до уровня рода.

Моделирование видового разнообразия *Ascomycota* выявило что, структура сообществ почв высотных участков (ВПС) значительно отличается от структуры сообществ из других участков ландшафта ($P = 0,003$). Использование ССА - модели по-

казало, что определяющее влияние на структуру сообществ аскомицетов оказывают два основных фактора: фактор растения-хозяина ($P = 0,012$) и содержание ионов фосфора в почве ($P = 0,07$).

Как уже отмечалось, грибы-базидомицеты в ризосфере изученных растений были представлены значительно меньшим количеством форм, чем *Ascomycota*. Так, всего нами выявлено 8210 последовательностей генетических структур, принадлежащих к типу *Basidiomycota* (112 родов, 59 семей, 28 порядков, 9 классов). Виды, встречающиеся реже, чем в 0,5 % и ниже случаев, не учитывались в дальнейших анализах. Всего было идентифицировано 94 вида базидомицетов, причем 59 из них были обнаружены в единичном экземпляре. Видовое богатство этих микроорганизмов в различных образцах изменялось от 2 до 27. Среднее число видов в ризосфере *C. sessiliflorum*, произрастающих на высоких участках (ВПС) было значительно выше, чем в (ЗП) ($P = 0,006$). Моделирование ССА показало, что наибольшее влияние на структуру сообществ ризосферных базидомицетов оказывают два фактора: ландшафт ($P = 0,07$) и топовлажность ($P = 0,042$). Интересно отметить, что в почвах из сухих возвышенностей (ВПС) преобладали эктомикоризные грибы рода *Rhizopogon*: эти грибы имели наиболее высокие коэффициенты обилия. Тогда как почвы умеренных склонов и затопляемых пойм имели относительно высокое обилие пластинчатых эктомикоризных грибов рода *Russula*: виды *R. compacta* и грибы, подобные этому виду.

В исследуемых образцах почвы было обнаружено 2996 последовательностей ДНК 12 видов грибов (всего известно 214 видов), принадлежащих к типу *Glomeromycota*. Среди этих грибов были представители трех порядков: *Glomerales*, *Diversisporales*, *Paraglomerales* и четырех родов: *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Paraglomus*, *Glomus*. Наиболее распространенными оказались представители рода *Glomus*, найденные во всех исследованных образцах почвы, с коэффициентом обилия более 94 %. Относительная доля других родов не превышала 5 %. Представители рода *Paraglomus* были выявлены только в образцах ризосферы *T. radicans* (1,3 %). В ризосферах растений из затопляемых пойм грибы типа *Glomeromycota* практически отсутствовали. Моделирование видового богатства для этого типа показало, что число видов в ризосфере коррелирует с топовлажностью ($P = 0,002$) на уровне 40 % дисперсии (рис.6). По нашему мнению, лимитирующим фактором развития грибов этого типа является высокий уровень влажности почв затопляемых пойм. Анализ ССА показал, что на видовой состав грибов *Glomeromycota* значительное влияние оказывают фактор растение-хозяина ($P = 0,002$) и тип ландшафта ($P = 0,024$). К сожалению, выпадающие значения могут существенно исказить конечные результаты ССА. Поэтому данные были проанализированы при помощи анализа NMDS.

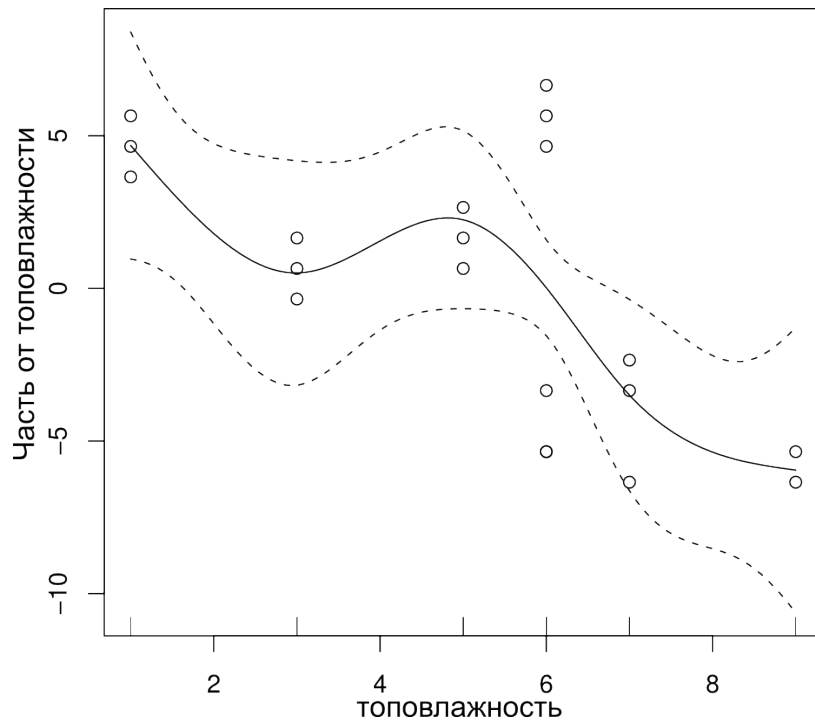


Рис. 6. Регрессионная кривая для GAM модели видового богатства типа *Glomeromycota* и топовлажности.

Проведенный анализ с использованием 10 осей сократил значение стресса до 0,11. Первые три диаграммы показаны на рисунке 7. Регрессионный анализ показал, что на видовой состав сообществ арбускулярно-микоризных грибов оказывают влияние следующие факторы: растение-хозяин ($P = 0,079$), тип ландшафта ($P = 0,057$), топовлажность ($P = 0,006$), содержание в почве песка ($P = 0,010$), глины ($P = 0,015$), магния ($P = 0,027$), и кальция ($P = 0,020$). Первая диаграмма показывает распределение образцов по вертикальной оси относительно топовлажности. Образцы, которые находятся в верхней части координат, распределились так же по горизонтальной оси, в зависимости от содержания магния и кальция в почве. Образцы, находящиеся в нижней части координат, сформировали маленький кластер, что свидетельствует на недостаточность количества изученных экологических параметров для определения корреляции. Из второй диаграммы видно, что по горизонтальной оси - существует корреляция с содержанием кальция, глины, по вертикальной - с растением-хозяином и топовлажностью. Третья диаграмма также отображает группирование образцов по растениям.

Всего в исследованных образцах было найдено 395 типов последовательностей ДНК грибов типа *Chytridiomycota*, относящихся к двум классам, к четырем порядкам, 11 семьям, 21 родам и 26 видам. Интересно отметить, что представители некоторых родов полностью отсутствовали в ризосфере растений (род *Diplochytridium* - в ризосфере *T. radicans*, род *Spizellomyces* - в ризосфере *C. sessiliflorum* и т.д.). В ризосферах некоторых растений были выявлены не типичные для этих условий виды грибов, например, в ризосфере *T. radicans* был обнаружен *Synchytrium endobioticum*, который является специфичным патогенным пасленовых, в частности картофеля (Curtis, 1921).

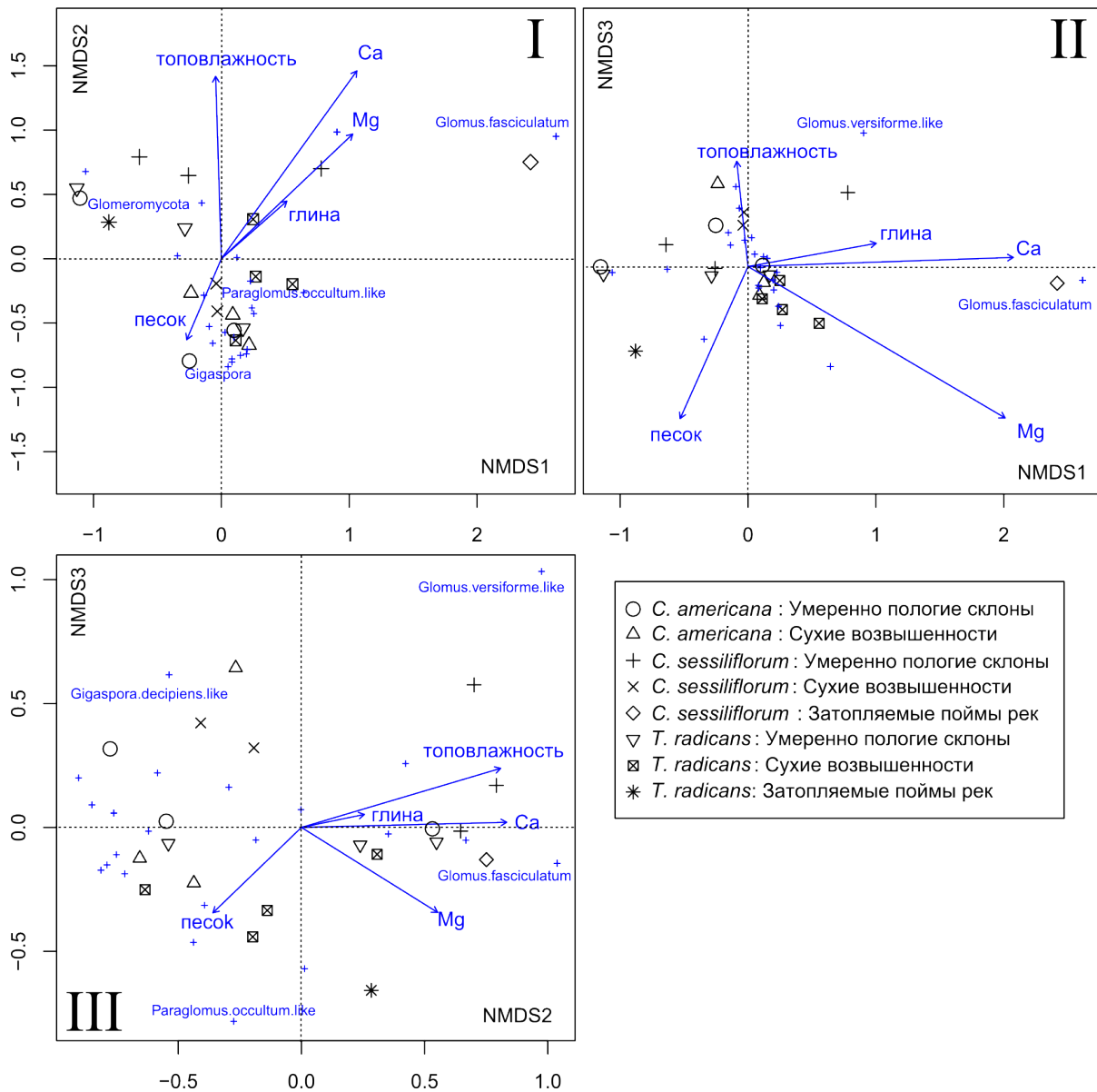


Рис. 7. Результаты неметрического многомерного масштабирования (NMDS) относительного количества таксонов типа *Glomeromycota* в ризосфере трех видов растений.

Примечание: представлены три диаграммы, отображающие распределение образцов в многомерном пространстве.

Моделирование зависимости видового богатства этого типа грибов от экологических факторов показало, что относительно значимым ($P = 0,051$) оказался лишь фактор растения-хозяина на уровне 21,8 % дисперсии. Корреляции между разнообразием видов и другими экологическими переменными не было обнаружено. Многомерный анализ ССА показал, что таксономический состав и структура сообществ грибов типа *Chytridiomycota* в значительной степени определяется содержанием в почвах глины ($P = 0,0011$) и песка ($P = 0,0017$). На глинистых почвах пойм рек доминировали представители вида *Monoblepharis macrandra*. Интересно отметить, что этот микроорганизм впервые был обнаружен в пресных водоемах и идентифицирован как водный гриб (Letcher et al., 2005). Возможно, что в пойменных почвах последовательности ДНК этого гриба оказались после высыхания временно затопленных

участков. К сожалению, значительную часть обнаруженных последовательностей грибов (более 4,5 %), не удалось идентифицировать, вследствие отсутствия сведений об этих последовательностях в базе данных GenBank. Соответственно, эти последовательности были объединены в группу неклассифицированных грибов.

2.2.2. Анализ арбускулярно-микоризных грибов при помощи метода денатурирующего градиентного гель-электрофореза.

При помощи ДГГЭ-метода в ризосфере растений был выявлен 101 таксон арбускулярно-микоризных грибов. Сравнительный однофакторный анализ (ANOVA) зависимости генетического многообразия грибов показал, что разнообразие арбускулярно - микоризных (АМ) грибных сообществ в значительной степени определяется типом ландшафта ($P = 0,008$). Корреляционной зависимости между средним количеством таксонов и видом растения-хозяина обнаружено не было. Построенная нами обобщенная аддитивная модель выявила 49,8 % дисперсии изученных данных с значимыми факторами: содержания фосфатов ($P = 0,004$), серы ($P = 0,003$), ионов кальция ($P = 0,006$) и топовлажности ($P = 0,03$) (рис.8).

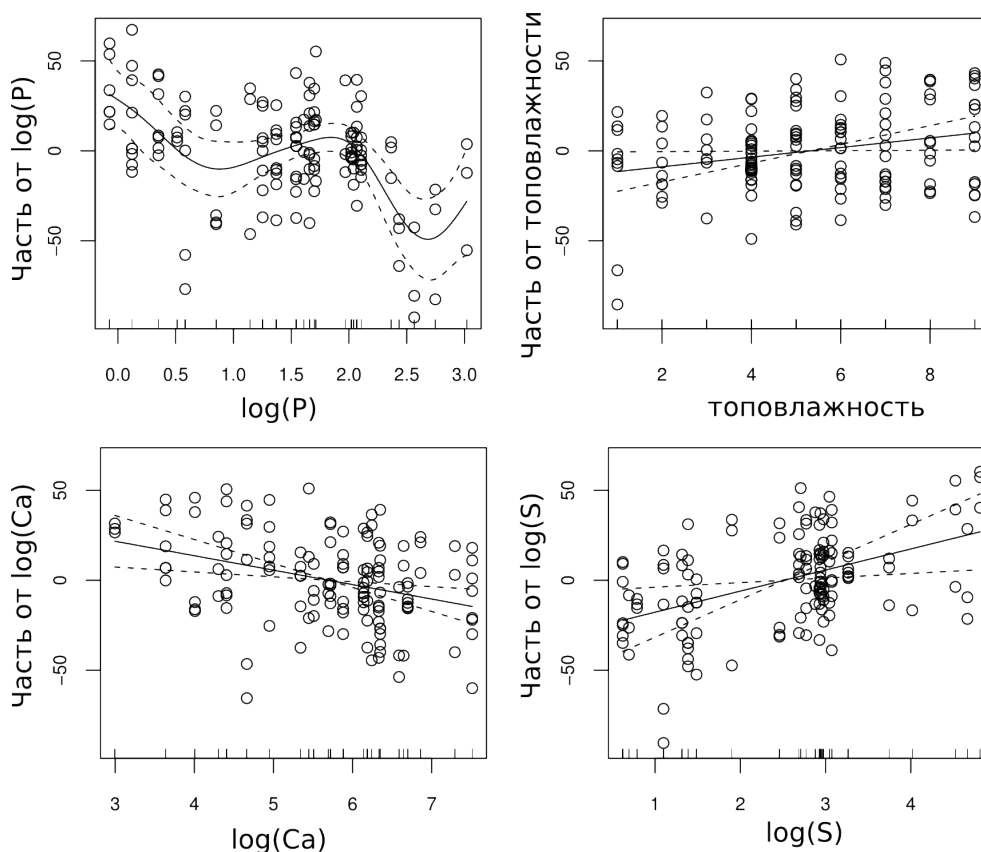


Рис. 8. Регрессионные кривые GAM модели, описывающие зависимость богатства таксонов типа *Glomeromycota* от экологических факторов.

Примечание: Пунктиром показан 95% доверительный интервал.

Формы полученных кривых предполагают, обратную зависимость количества таксонов от содержания кальция и фосфата: чем выше уровень этих элементов в почве, тем меньше количество таксонов. Надо заметить, что зависимость фосфата

была не линейной, а остальные переменные показали линейную зависимость. Другие параметры почвы (значение рН, содержание, песка, некоторых химических элементов) не оказывали влияние видовое богатство этих грибов. По-видимому, на уровень гетерогенности сообществ микоризных грибов оказывают большее влияние другие, не рассмотренные нами параметры. Также видно, что количество таксонов арбускулярно-микоризных грибов в ризосфере возрастает с повышением уровнем топовлажности и содержания серы в почве. Обобщенные аддитивные модели для каждого растения-хозяина в отдельности показали, что богатство таксонов АМ-грибов, найденных на корнях *C. americana* зависит от значения рН почвы ($P = 0,0008$) и топовлажности ($P = 0,04$). На видовое богатство АМ-грибов в ризосфере *T. radicans* значительное влияние оказывают содержание фосфатов ($P = 0,002$), серы ($P = 0,0005$) и топовлажность ($P = 0,02$). Ни одна из изученных экологических параметров не показала значительного влияния на богатство таксонов АМ-грибов, колонизирующих корни *C. sessiliflorum*.

Для характеристики взаимосвязи между структурой АМ-сообществ и экологическими факторами, мы использовали RDA (анализ избыточности). В результате показано, что существенное влияние на формирование структуры АМ-грибных сообществ оказывают следующие параметры: содержание фосфатов ($P = 0,012$), значение рН ($P = 0,056$), вид ландшафта ($P = 0,001$), растение-хозяин ($P = 0,001$), а также параметр, характеризующий связь между типом ландшафта и растением-хозяином ($P = 0,002$) (рис.9). Первые две оси RDA выявили только 8 % дисперсии использованных значений. Расчеты показывают, что модель включающая в себя все исследуемые нами экологические факторы, выявила бы только 15 % дисперсии. Поэтому мы считаем, что при 8 % дисперсии нами учтены наиболее важные экологические факторы оказывающие влияние на структуру сообществ АМ-грибов. Горизонтальная ось - ординации коррелирует с содержанием фосфатов, а вертикальная – со значением рН почвы. Большинство арбускулярно-микоризных сообществ *T. radicans* находятся на правой нижней части диаграммы, которая соответствует низкому уровню фосфатов и высоким или средним значениям рН. Тогда как, большая часть АМ-грибных сообществ из ризосферы *C. americana* находятся в середине верхней части диаграммы. Эта часть ординации соответствует низким и средним значениям рН. Около половины сообществ грибов *C. sessiliflorum* по структуре схожи с сообществами из ризосферы *C. americana*, даже если они и принадлежат к разным типам ландшафта. Самые большие различия в структуре выявлены между сообществами из затопляемых пойм и умеренных склонов. Образцы почв из ВПС на диаграмме разделились на 3 группы: *T. radicans* оказались в правой части диаграммы, *C. sessiliflorum* - в середине, а образцы *C. americana* обнаружили в верхней части диаграммы. Таким образом, результаты ДГГЭ показали, что на генетическое разнообразие АМ-грибов в ризосферах в первую очередь влияет фактор ландшафта.

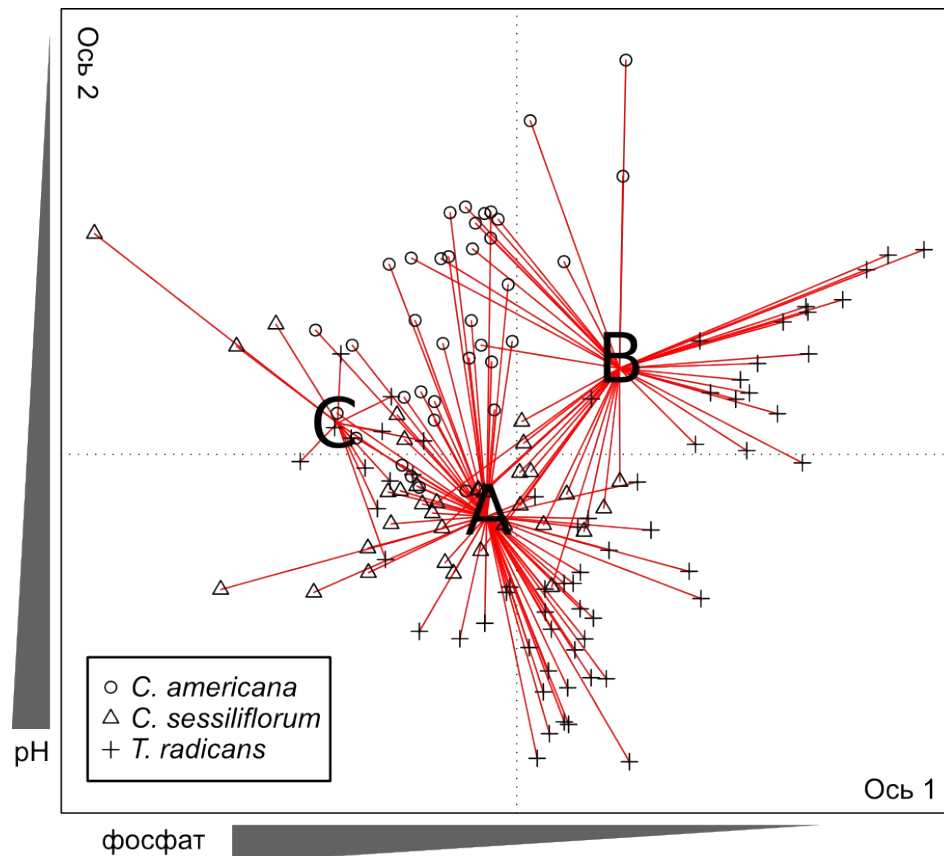


Рис. 9. Многомерный анализ (RDA) зависимости структуры сообществ АМ-грибов в ризосфере растений от экологических факторов.

Примечание: Буквы на кластерах обозначают тип ландшафтов: А - возвышенности с преобладающей сосной, В - пологие склоны и С - затопляемые поймы.

На видовое богатство АМ-грибов в ризосфере наибольшее влияние имеют эдафические факторы (содержание микроэлементов и топовлажность). На структуру сообществ АМ-грибов в ризосфере оказывает существенное влияние содержание фосфатов, кислотность почвы, тип ландшафта, а также фактор растения-хозяина.

Таким образом, результаты наших исследований показывают, что использование методов денатурирующего градиентного гель-электрофореза и пиросеквенирования ДНК генов 18S и 16S рРНК позволяют оценить генетическое разнообразие сообществ почвенных бактерий и грибов. Нами предложены методические подходы, позволяющие применять технологии пиросеквенирования и денатурирующего градиентного гель-электрофореза ПЦР-продуктов для анализа генетического разнообразия сообществ и идентификации почвенных микроорганизмов. Высокой разрешающей способностью характеризуется метод пиросеквенирования ДНК. Этим методом в почвах различных биоценозов нами выявлено и идентифицировано 766 таксонов бактерий и 871 таксонов грибов. Проведен анализ генетического разнообразия и изобилия микробиоты в ризосфере растений естественных сообществ и определена степень зависимости этих параметров от экологических факторов. Оказалось, что в наибольшей степени, на формирование структуры бактериального сообщества оказывают тип ландшафта, кислотность почвы и содержание в ней фосфатов. Выявлена положительная корреляционная связь между количеством азотфиксирующих и

сульфатвосстанавливающих бактерий в почве и содержанием в ней минеральных питательных веществ. Структура сообществ почвенных ризосферных грибов, в первую очередь, зависит от вида растения-хозяина и типа ландшафта. В изученных почвенных сообществах грибов доминирующими видами были представители типа *Ascomycota*.

3. Выводы

Разработаны новые технологии идентификации и классификации почвенных микроорганизмов с использованием методов денатурирующего градиентного гель-электрофореза и пиросеквенирования ДНК генов 18S и 16S рРНК. Предложен новый оригинальный алгоритм для компьютерного анализа таксономических групп и измерения уровня генетического разнообразия почвенной микробиоты при действии различных экологических факторов.

В изученных образцах почв идентифицировано 766 видов бактерий (в т.ч. 28 видов архебактерий), принадлежащих к 611 родам, 178 семьям, 86 порядкам, 40 классам, 32 типам. Показано, что наибольшее влияние на формирование структуры бактериальных сообществ почв оказывают тип ландшафта, кислотность почвы и содержание в ней фосфатов.

Количество азотфиксирующих и сульфатвосстанавливающих бактерий в почве коррелирует с содержанием в ней минеральных питательных элементов. В пойменных почвах, богатых сульфат - ионами и бедных азотом, количество сульфатвосстанавливающих бактерий и ацидобактерий в 2,5 выше, а количество азотфиксирующих бактерии в 4 раза ниже, чем в сухих почвах склонов рек.

В изученных образцах почв выявлено 871 вид грибов, принадлежащих к 18 классам, 61 порядку, 199 семействам, 574 родам. Структура сообществ ризосферных грибов зависит, в первую очередь, от вида растения-хозяина и типа ландшафта.

Доминирующими в почвенных сообществах, среди идентифицированных видов грибов, оказались представители отдела *Ascomycota* (90-96%). По обилию зигомицетов, грибные сообщества в ризосфере трех видов исследованных растений, существенно не различались.

В почвенных образцах выявлено 12 видов грибов из отдела *Glomeromycota*, принадлежащих к 3 порядкам. Показано, что структура и обилие арбускулярно - микоризных сообществ определяется, в основном, типом ландшафта, видом растения-хозяина и значением топовлажности.

4. Список работ, опубликованных по теме диссертационной работы

Статьи в научных изданиях:

Налян А.Г., Ван Клей Д., Ибрагимов Р.И., Мартынова Ван Клей А. Уровень видового разнообразия сообществ везикуло-арбускулярных грибов в ризосфере *S.sessiliflorum* и *S.americana*// Вестник Оренбургского Университета, 2009. - № 6. - С. 269-271.

Hume, M., Scanlan C., Harvey R., Andrews K., Snodgrass J., Nalian A., Martynova-Van Kley A, Nisbet D. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis as a Tool to Determine Batch Similarity of Porcine Cecal Bacteria Probiotic Cultures// Applied Environmental Microbiology. - 2008; № 74(16). - P. 5233 - 5241.

Martynova-VanKley A., Syvyk A., Teplova I., Hume M., Nalian A. Rapid detection of avian *Eimeria* species using denaturing gradient gel electrophoresis //Poultry Science. - 2008 Sep; 87(9). - P. 1707-1713.

Syvyk A., Martynova-Van Kley A., Nalian A. A positive control for detecting heteroduplexes in DGGE for microbial community fingerprinting // The Texas Journal of Science. – 2008,№ 60(1)- P. 33-44.

Martynova-Van Kley A., Wang H., Nalian A., Van Kley J. Detection of arbuscular mycorrhizal fungi in an east Texas forest by analysis of SSU rRNA gene sequence //The Texas Journal of Science, 2006. 58(3). – P. 231-242.

Martyniuk O., Nalian A., Martynova-Van Kley A. Phylogenetic analysis of *Amaranthaceae* Juss. based on surface structure of pollen and sequences of maturase k and RBCL proteins// Biotechnology (Ukraine). - 2008; Т.2, № 2. - P. 98 - 104.

Статьи в материалах конференций:

Налян А.Г., Ибрагимов Р.И., Мартынова Ван Клей А., Ван Клей Д. Генетическое разнообразие грибов в почвах различных типов ландшафтов // Мат-лы Международной научной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии». – Минск, 2010. - С. 34-36.

Nalian A., D. Fakhretdinova, J. Van Kley, A. Martynova-Van Kley. 2009. Support vector machine classification of Denaturing Gradient Gel Profiles// Abstract and presentation on the 52nd International Association for Vegetation Science. Conference Proceedings, May 29 – June 4, 2009. University of Ioannina, Island of Crete (Chania), Greece, p. 89

Kurmaeva E., J. Van Kley, A. Nalian, A. Martynova-Van Kley, S. Dowd. 2009. Profiling of arbuscular mycorrhizal communities by high-throughput sequencing // Abstract and presentation on the 112th Annual meeting of the Texas Academy of Science, March 5-7, 2009, Texas Tech University at Junction, Llano River Field Station, Junction, TX. p.75.

Edwards J., A. Nalian, J. Van Kley, S. Down, A. Martynova-Van Kley. 2009. Bacterial composition in soil communities of contrasting east Texas ecotypes. // Abstract and presentation on the 112th Annual meeting of the Texas Academy of Science, March 5-7, 2009, Texas Tech University at Junction, Llano River Field Station, Junction, TX. p.73.

Martynova-Van Kley A., D. Fakhretdinova, A. Nalian, J. Van Kley. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in east Texas// In: Mucina, L. et al. (eds), *Frontiers of Vegetation science-An Evolutionary Angle*, Keith Phillips Images, Somerset West, p. 113-114.

Kurmaeva E., J. Van Kley, A. Nalian, A. Martynova-Van Kley. 2008. Phylogenetic differences of AMF inhabiting *Chasamanthium sessiliflorum* in east Texas// Abstract and presentation on the 111th Annual meeting of the Texas Academy of Science, March 6-8, Texas A&M University-Corpus Christi, Corpus Christi, TX. p.62.

Fakhretdinova D., J. Van Kley, A. Nalian, A. Martynova-Van Kley. 2008. Microbial population analysis as a tool for ecological classification// Abstract and presentation on the 111th Annual meeting of the Texas Academy of Science, March 6-8, Texas A&M University-Corpus Christi, Corpus Christi, TX. p.57.

Adams C., J. VanKley, A. Nalian, A. Martynova-Van Kley. 2008. Phylogenetic differences of AMF inhabiting *Toxicodendron radicans* in east Texas// Abstract and presentation on the 111th Annual meeting of the Texas Academy of Science, March 6-8, Texas A&M University-Corpus Christi, Corpus Christi, TX. p.64.

Martynova-Van Kley A., A. Syvyk, A. Nalian, I. Teplova, M. Hume. 2007. Identification of *Eimeria* species using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis// *Journal of Animal Science*. Vol.85. Suppl. 1/*J. Dairy Sci.* Vol.90,Suppl.1/*Poult.Sci.*Vol.86 Suppl.1. p.131

Martynova A., D. Fakhretdinova, J. Van Kley. 2007. Arbuscular Mycorrhiza Fungi and Microbial population analysis of natural east Texas habitat types// 49th International Association for Vegetation Science. Conference Proceedings, edited by R.A. van Essen, February 12-16, 2007. Massey University, Palmerston North, New Zeland. p.161.34