

Налян А.Г.¹, Ван Клей Д.¹, Ибрагимов Р.И.², Мартынова-Ван Клей А.¹

¹Государственный университет им. С.Ф. Остина, США

³Башкирский государственный университет, Уфа

УРОВЕНЬ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ СООБЩЕСТВ ВЕЗИКУЛО– АРБУСКУЛЯРНЫХ ГРИБОВ В РИЗОСФЕРЕ *CHASMANTHIUM* *SESSILIFORUM* (POIR.) YATES И *CALLICARPA AMERICANA*

Изучали видовое разнообразие везикуло-арбускулярной микоризы на корнях растений *Chasmanthium sessiliforum* (Poir.) Yates и *Callicarpa Americana*, произрастающих в естественных лесах восточного Техаса. Методом ПЦР выявлены значительные различия в видовом составе ризосферных арбускулярных микоризных грибов исследованных растений. Показано, что генетическое разнообразие грибных сообществ зависит и от условий произрастания растений.

Ключевые слова: микориза, арбускулярные грибы, ризосфера, симбиоз, растение-симбионт, ПЦР, электрофорез.

Введение

Везикуло-арбускулярная микориза (ВАМ) – широко распространенная в природе форма микробо-растительного симбиоза, играющая важную роль в обеспечении растений питательными элементами, водой и способствующая выживанию растений при неблагоприятных условиях окружающей среды [1,2,3,4]. По некоторым данным, более 90% видов наземных растений вступают в симбиотические отношения с микоризными грибами (Phylum Glomeromycota) [5,6]. Арбускулярные микоризные грибы являются облигатными симбионтами и не способны размножаться в культуре *in vitro*. Известно, что присутствие ВАМ-грибов на корнях растений оказывает существенное влияние на разнообразие и плотность растительных сообществ [7, 8, 9]. Имеются сведения о том, что степень микоризации корней и разнообразие видового состава грибов в значительной степени определяется видом растения-симбионта, типом почвы, ее механическим и химическим составом, влажностью, показателем рН– почвы [10, 11, 12]. Тем не менее, некоторые исследователи считают, что ВАМ – грибы не обладают специфичностью по отношению к растениям-хозяевам и случайно распределены в природных экосистемах [13].

В связи с вышесказанным, исследование генетической гетерогенности сообществ ВАМ в ризосфере различных видов растений, произрастающих в неодинаковых условиях, является актуальным, представляет научный и практический интерес.

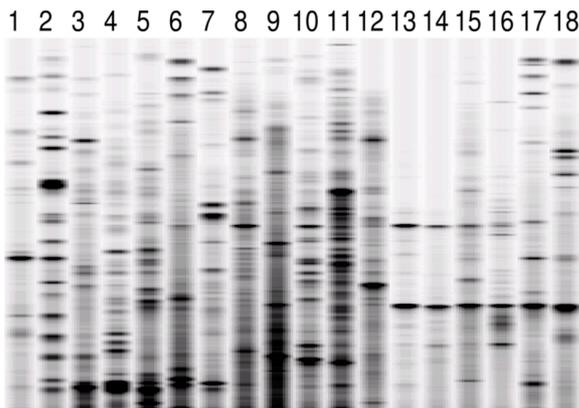
Материалы и методы

Для исследований были использованы растения дикорастущих популяций *Callicarpa*

americana L. (Verbenaceae) и *Chasmanthium sessiliforum* (poir.) Yates (Poaceae), произрастающие в естественном смешанном лесу на востоке штата Техас (США). Образцы корней растений с почвой (по три экземпляра) были отобраны с верхней, средней и нижней частей склона. Наличие ВАМ-грибов на корнях растений определяли микроскопическим методом [15]. ДНК выделяли из 0.3 г почвенно-корневого материала, используя набор UltraClean™ Soil DNA Kit, согласно методике производителя (Mobio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA). Для характеристики генетического разнообразия ВАМ-сообществ, использовали метод ПЦР с Glomeromycota-специфичными праймерами (Operon Biotechnologies, Inc., Alabama) и с последующим разделением ПЦР-продуктов методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ). ПЦР осуществляли на амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Inc., Westbury, NY). Электрофоретическое разделение ампликонов проводили в 40% полиакриламидном геле с 40-60% концентрационным градиентом формамида (Sigma Inc.,) и мочевины (EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ) в течение 4 часов при 250 В. В качестве маркеров были использованы образцы ДНК, выделенные из бактерий и грибов. Для идентификации ДНК-полос на гелевой пластине использовали краситель Sybr Green (Invitrogen Corp., California 90028). Пластины фотографировали при помощи Imager System (BioRad Inc., Hercules, CA) и изображение геля преобразовывали в шкалу серого цвета в программе GIMP (GNU Image Manipulation Program). ДНК-треки изученных образцов были конвертированы в бинарную форму (присутствие/отсутствие) с помощью

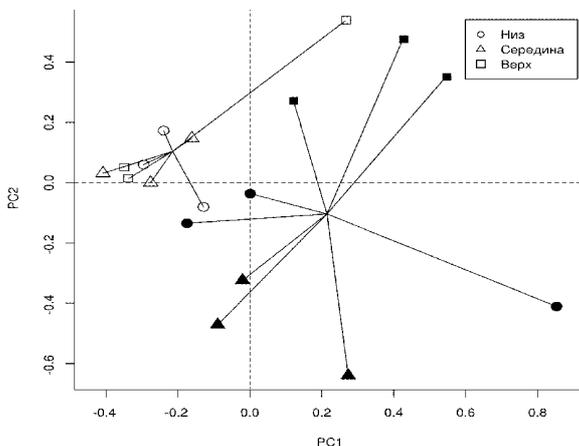
программы Python Imaging (PIL). Локальные максимумы были отмечены как 1 и остальные данные были отмечены как 0.

Статистический анализ был проведен в программе R [14] при помощи библиотеки VEGAN [15] и ADE4 [16]. Для оценки зависимости внутрипопуляционного полиморфизма ВАМ-сообществ от вида и условий произрастания растения-хозяина был использован факторный анализ по методу главных компонент (РСА). Ста-



1,2, 13 – *C. americana* (верхняя часть склона);
16,17,18 – *C. americana* (средняя часть склона);
12,14,15 – *C. americana* (нижняя часть склона);
3, 5,6 – *C. sessiliflorum* верхняя часть склона;
8,9,11 – *C. sessiliflorum* (средняя часть склона);
4,7,10 – *C. sessiliflorum* (нижняя часть склона)

Рисунок 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов гена 18S – рРНК микоризных грибов растений, произрастающих на различных участках склона



Положения популяций изображены в пространстве двух главных осей максимального варьирования, полученных методом главных компонент по матрице корреляции электрофоретических треков ПЦР-продуктов. Чем ближе к друг другу располагаются на графике координатные точки, тем выше генетическое сходство популяций грибов. Белыми символами обозначены *C. americana*, черными – *C. sessiliflorum*.

Рисунок 2. Сходство популяций ВАМ-грибов растений, произрастающих на различных участках склона

статистическая значимость разницы оценивалась в масштабе 10000 случайных перестановок

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлено изображение электрофореграммы продуктов ПЦР после разделения их в денатурирующем геле. Как видно, исследованные растения значительно различаются по количественному составу ризосферных грибных сообществ. Независимо от места произрастания, в ризосфере *C. sessiliflorum* выявляется значительно больше ДНК-компонетов, чем у *C. americana*. Так, среднее значение количества полос в профиле на электрофореграмме в образцах, взятых с различных точек склона (верхняя, срединная и нижняя часть) для *C. sessiliflorum* составляет 43, для *C. americana* этот показатель почти в два раза меньше (23).

Корреляционная связь между растением-симбионтом и составом корневой микробиоты четко прослеживается при проведении факторного анализа методом главных компонент (РСА). В нашем случае, этим методом мы определяли также степень сходства грибных сообществ в зависимости от местообитания растительного организма. Из рисунка 2 видно четкое разделение образцов *C. americana* и *C. sessiliflorum* по первой оси (PC1). По второй оси (PC2) происходит разделение образцов по их месту обитания растений.

Необходимо отметить, что пробы *C. sessiliflorum*, отобранные с разных участков склона, имели существенные различия по количественному составу ВАМ-грибов, тогда как профили *C. americana* не были четко разделены. Между показателями «вид растения» и «число полос на электрофореграмме» выявляется статистически достоверная корреляция ($p=0,0026$).

Локальные условия произрастания растений по профилю холма отличались по влажности, значению рН почвы, по содержанию в составе почвы химических элементов (таблица 1). Почвы верхней и средней части холма по этим показателям различались между собой незначительно. Почва в нижней части холма отличалась низким содержанием химических элементов и низким значением рН.

Полученные нами результаты представляют интерес для понимания механизмов взаимоотношений растений с ВАМ-сообществами, влияния на них локальных экологических факторов. По

Таблица 1. Содержание химических элементов, влажность и кислотность почвы на различных участках произрастания растений

Локализация участка	Влажность (%)	pH	P (м.д.)	K (м.д.)	Ca (м.д.)	Mg (м.д.)
Нижняя часть склона	4,70	4,86	1	29	115	47
Средняя часть склона	4,57	5,34	2	56	127	127
Верхняя часть склона	6,28	5,35	2	74	127	127

нашим данным оказалось, что видовой фактор растения-симбионта является доминирующим при формировании микробного сообщества ризосферы. Растение-хозяин оказывает, по-видимому, специфическое воздействие на образование и функционирование грибной микрофлоры корней. Как известно, процесс образования ВАМ-сообществ у растений контролируется комплексом симбиотических генов (например, СУМ-гены гороха) [6]. Факторы окружающей среды, в частности, почвенные факторы в наших экспериментах, оказывали менее значимое влияние на видовой состав ВАМ-сообществ. Тем ни менее, результаты экспериментов свидетельствуют о том что, что в естественных условиях обитания, даже на относительно небольшой площади (в нашем случае,

около 10000 м²) наблюдаются различные комбинации видов ВАМ в ризосфере растения-хозяина одного и того же вида. Вероятно, что даже небольшие изменения состава грибного сообщества способствуют адаптации и выживанию отдельных индивидуумов внутри популяции.

Таким образом, генетический полиморфизм и количественный состав ВАМ-грибов в большей степени зависит от вида растения-хозяина и, в меньшей степени, от условий произрастания растений. Удобным и высокоинформативным методом для изучения генетического разнообразия микоризных грибов является ПЦР-анализ с последующим электрофоретическим разделением продуктов в градиентном полиакриламидном геле.

Список использованной литературы:

1. Auge R.M., Moore J.L., Cho K., Stutz, J.C., Sylva, D.M., Al-Agely A.K., Saxton, A.M. Relating foliar dehydration tolerance of mycorrhizal *Phaseolus vulgaris* to soil and root colonization by hyphae // J. Plant Physiol., 2003, vol. 160, pp. 1147-1156.
2. Игнатов В.В. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями. М.: Наука, 2005, с.262
3. Marulanda A., Porcel R., Barea J.M., Azcon R. Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive *Glomus* Species // Microb. Ecol., 2007, vol. 54, pp. 543-552.
4. Кутепев М.П., Казакова А.С. Влияние микоризации озимой пшеницы грибами везикулярно-арбускулярной микоризы на фосфатазную активность чернозема обыкновенного / Материалы международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем», Сыктавкар, ИБ Коми НЦ УрО РАН, 2007, с. 51-53
5. Helgason T., Watson I.J., Young J.P.W. Phylogeny of the *Glomerales* and *Diversisporales* (fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences // FEMS Microbiol. Lett., 2003, vol. 229, pp. 127-132.
6. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиогенетика микробно-растительных взаимодействий // Экологич. генетика. 2004. Т. 1, N 10, с. 36-46.
7. Wu Q.S., and Xia R.X. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions // J. Plant Physiol., 2006, vol. 163, pp. 417-425.
8. Van der Heijden M.G.A., Boller, T., Wiemken A., Sanders I.R. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure, *Ecology*, 1998, vol 79, pp. 2082-2091.
9. Gange A.C., Brown V.K., and Farmen L.M. A test of mycorrhizal benefit in an early successional plant community // New Phytol., 1990, vol. 115, pp. 85-91.
10. Eom A.H., Hartnett D.C., Wilson G.W.T. Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie // Oecologia, 2000, vol. 122, pp. 435-444.
11. Asghari H.R., Amerian M.R., Gorbani, H. Soil salinity affects arbuscular mycorrhizal colonization of halophytes // Pak. J. Biol. Sci., 2008, vol. 11, pp. 1909-1915.
12. Abe J., Katsuya K. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in coastal dune plant communities // Mycoscience, 1995, vol. 36, pp. 113-116.
13. Klironomos J.N., McCune J., Hart M., Neville J. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity // Ecology Lett., 2000, vol. 3, pp. 137-141.
14. Lerman L.S., and Silverstein K. Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis // Methods Enzymol., 1987, vol. 155, pp. 482-501.
15. R development core team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2008, ISBN 3-900051-07-0.
16. Oksanen J., Kindt R., Legendre P., and O'Hara R.B., vegan: Community // Ecology Package, 2008, R package version 1.15-0.

Исследования были поддержаны государственным университетом
им. С.Ф. Остина и спонсорской программой.