

УДК 574.472

МИКОБИОТА КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ *GOODYERA REPENS* (ORCHIDACEAE) В ПОПУЛЯЦИЯХ ИЗ ТРЕХ РЕГИОНОВ РОССИИ

© 2024 г. Н. М. Бибиков^{1,*}, Е. Ю. Воронина^{1,**}, А. В. Кураков^{1,***}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия

*e-mail: bibik0808@mail.ru

**e-mail: mvsadnik@list.ru

***e-mail: kurakov57@mail.ru

Поступила в редакцию 28.10.2023 г.

После доработки 15.06.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г.

Goodyera repens — представитель семейства орхидных, широко распространенный и массовый в хвойных лесах северного полушария. Как и прочие орхидные, в природных условиях существует в облигатном микоризном симбиозе, но, несмотря на длительную историю изучения, для популяций, произрастающих на территории России, до настоящего времени не были получены данные о микобиоте, ассоциированной с корневой системой этого вида. В связи с этим стоит задача оценить все разнообразие грибов-ассоциантов, включая некультивируемые виды, а также получить количественные характеристики и оценить региональную специфичность грибных сообществ. В данной работе с применением высокопроизводительного секвенирования впервые качественно и количественно проанализирована микобиота корневой системы *G. repens*, произрастающей на территории Ленинградской и Московской областей и республики Карачаево-Черкесия. В общей сложности выявлено 438 операционально-таксономических единиц, в основном относящихся к отд. *Basidiomycota* с количественным преобладанием последовательностей родов *Russula*, *Ceratobasidium*, *Piloderma*, *Mycena*, *Tomentella*. Установлены значимые различия между грибными сообществами почвы и корневой системы *G. repens* во всех изученных регионах. Показана региональная специфика таксономического состава микобиоты: значимое отличие спектра таксонов в образцах из Карачаево-Черкесии от такового для Ленинградской и Московской областей и отсутствие заметного различия между двумя последними. В отношении распределения экологических групп грибов существенные различия между регионами не выявлены.

Ключевые слова: метагеномный анализ, микробиологическое профилирование, орхидная микориза, FUNGuild, *Goodyera repens*, ITS2

DOI: 10.31857/S0026364824030025, **EDN:** vjaebw

ВВЕДЕНИЕ

Будучи одним из крупнейших семейств сосудистых растений и включая представителей с различной экологией, *Orchidaceae* единообразны в необходимости установления микоризного симбиоза (орхидная микориза, ОМ) на самых ранних стадиях развития. Длительное время они полностью зависимы от питания (в том числе органического), поставляемого микобионтом, а некоторые виды сохраняют частичную или полную зависимость от углерода, поставляемого посредством микоризы, на протяжении всего жизненного цикла (Cameron et al., 2006; Smith, Read, 2012).

Одним из насущных вопросов в исследовании экологии и эволюции ОМ является специфичность симбионтов. Относительно малое время коэволюции обуславливает отсутствие филогенетической

обособленности микобионтов, а специфический спектр экспрессируемых генов и секретируемых ферментов соответствует переходным стадиям между сапротрофной и симбиотрофной экологическими стратегиями (Martin et al., 2016; Martino et al., 2018). Чаще всего микобионтами ОМ являются представители семейств *Ceratobasidiaceae* и *Tulasnellaceae* порядка *Cantharellales* (Fuller, 1909; Oberwinkler et al., 2017). Многие виды орхидных также способны формировать микоризу с микобионтами, обладающими широким спектром симбиотических активностей, такими как представители порядков *Sebacinales*, *Russulales*, *Agaricales* (Girlanda et al., 2006; Weiß et al., 2016; Li et al., 2022) и *Pezizales* (Suetsugu et al., 2017). Реже в корнях орхидных в качестве микобионтов выявляют представителей других экологических и таксономических групп (Wang et al., 2022).

Goodyera repens (L.) R. Br. in W.T. Aiton относится к трибе *Cranichidae* и является единственным видом этой трибы, произрастающим на территории европейской части России (Averyanov, 2000; Maevskiy, 2014). *G. repens* – клональный сциофитный вид, произрастающий в хвойных лесах Северного полушария. Наиболее распространенными микобионтами *G. repens* считаются представители семейства *Ceratobasidiaceae* (*Cantharellales*, *Agaricomycetes*, *Basidiomycota*) (Costantin, Dufour, 1920; Cameron et al., 2006). На примере нескольких видов рода *Goodyera* показано, что на уровне популяции они способны формировать ОМ с несколькими представителями *Ceratobasidiaceae* (Shefferson et al., 2010).

В корнях *G. repens* выявляются и микобионты эктомикоризы (ЭкМ) из порядков *Russulales* и *Thelephorales*, что предполагает способность этого вида к образованию микоризных сетей с древесными породами (Voronina et al., 2018).

Микориза *G. repens* является объектом исследований на протяжении 80 лет (Downie, 1943). Тем не менее, данные по структуре ассоциированного грибного сообщества и разнообразию микобионтов на данный момент неполные. В работах, направленных на исследование биоразнообразия микобионтов и эндофитов *G. repens* методами секвенирования (Shefferson et al., 2010; Voronina et al., 2018), либо ограничена выборка популяций, либо отсутствуют количественные данные по составу корневой микобиоты. Исследование таксономического состава грибного сообщества корней *G. repens* с использованием методов высокопроизводительного секвенирования существенно расширит современные представления об экологии ОМ, в частности вида-специалиста *G. repens*.

Целью данной работы является анализ таксономического состава и экологических групп грибов в корнях *G. repens* и выявление таксонов, обуславливающих специфичность корневой микобиоты и региональные различия в структуре грибного сообщества.

Таблица 1. Характеристики точек сбора образцов

Регион	Точка	Координаты (°с.ш., °в.д.)	Примечания
Ленинградская обл.	Л1	60.800425, 28.941970	Среди мха, под <i>Picea abies</i>
	Л2	60.801061, 28.950757	Под мертвой <i>Pinus</i> sp.
Московская обл.	М1	55.691680, 36.715776	Под <i>Pinus</i> sp.
	М2	55.691485, 36.714948	
	М3	55.694775, 36.739656	
Карачаево-Черкесия	К1	43.441397, 41.711269	На разложившейся древесине <i>Pinus</i> sp.
	К2	43.447487, 41.694842	На вывороте <i>Pinus</i> sp.
	К3	43.439822, 41.710351	Под <i>Pinus</i> sp.
	К4	43.438488, 41.714561	На валуне
	К5	43.260450, 41.427480	Под <i>Abies nordmanniana</i>
	К6	43.438966, 41.718041	Под <i>Picea abies</i>

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала. Образцы корней *G. repens* и прилегающей к ним почвы были собраны в августе 2022 г. в хвойных лесах на территории трех регионов России: Ленинградской обл. (две точки, подзолистая почва, сосняк с елью, Выборгский р-н, окрестности оз. Большое Лесное), Московской области (три точки, дерново-подзолистая почва, сосняк с елью, Звенигородская биостанция МГУ) и республики Карачаево-Черкесия (шесть точек, бурая горно-лесная почва, пихтарник с сосной, Тебердинский заповедник). В общей сложности было изучено 11 точек, с каждой из которых было отобрано по одному образцу корневой системы *G. repens* и по одному образцу прилегающей почвы. Описание точек сбора представлено в табл. 1.

Микробиологическое профилирование. Корни *G. repens* были очищены от почвы и стерилизованы путем последовательного погружения в 70%-й этанол (1 мин), моющее средство Fairy (30 сек), 0.1%-й р-р амоксициллина (1 мин) и стерильную дистиллированную воду. Образцы почвы и корней были измельчены в ступке и хранились в абсолютном этаноле до проведения анализа.

Выделение ДНК и метагеномный анализ по участку ITS2 проведены в компании БиоСпарк (Троицк, Московская обл.) в соответствии с методикой фирмы. Геномная ДНК выделена из образцов с использованием набора FastDNA SPIN Kit for soil (MP). Для секвенирования использованы праймеры NR_5.8SR (прямой) и NR ITS4R (обратный):

праймер	последовательность
NR_5.8SR	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATCTCGATGAAGAACGCAGCG
NR ITS4R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCATCCTCCGCTTATTGATATGC

Амплификация проведена в амплификаторе в реальном времени CFX96 Touch (Bio-Rad).

Подготовленные библиотеки проанализированы методом высокопроизводительного секвенирования на секвенаторе нового поколения Illumina MiSeq (Illumina). Полученные прочтения обработаны с использованием алгоритма QIIME 1.9.1.

Обработка данных. Для подтверждения таксономического статуса, присвоенного алгоритмом QIIME, последовательности были дополнительно идентифицированы с использованием баз данных GenBank и UNITE. Принадлежность последовательности к референтному виду предполагалась исходя из сходства не менее 97%. Актуальные названия таксонов приведены в соответствии с базой данных MycoBank (MycoBank, 2023).

Экологическая принадлежность таксономических единиц определена с помощью базы данных FUNGuild (Nguyen et al., 2016) в программе Anaconda. Статистическая обработка и визуализация многомерного шкалирования проведены в программе RStudio, визуализация остальных данных проведена в программе MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Параметры биоразнообразия

В общей сложности методом микробиологического профилирования по участку ITS2 в исследованных образцах выявлено 21 460 последовательностей, сгруппированных в 438 операционально-таксономических единиц (ОТЕ), относящихся к 262 родам, 168 семействам, 75 порядкам и 26 классам из 6 отделов грибов.

Суммарно во всех образцах подавляющая доля ОТЕ (98.3%) представлена отделами *Ascomycota* (28.0%) и *Basidiomycota* (70.3%). Из аскомицетов доминируют классы *Leotiomycetes* (*Helotiales*: *Hyaloscyphaceae*), *Dothideomycetes* (*Mytilinidiales*: *Gloniaceae*), *Eurotiomycetes* (*Eurotiales* и *Chaetothyriales*: *Herpotrichiellaceae*) и *Sordariomycetes*. Из базидиомицетов 97.2% составляет класс *Agaricomycetes* с доминирующими порядками *Cantharellales* (*Ceratobasidiaceae*, *Oliveoniaceae*), *Agaricales* (*Tricholomataceae*, *Hygrophoraceae*), *Russulales* (*Russulaceae*), *Atheliales* (*Atheliaceae*) и *Thelephorales* (*Thelephoraceae*) (рис. 1).

Наибольшим числом ОТЕ были представлены роды *Russula* (3235), *Ceratobasidium* (2620), *Piloderma* (1564), *Mycena* (1344), *Tomentella* (970), *Hyaloscypha* (673), *Tylospora* (637), *Cenococcum* (599), *Oliveonia* (513) и *Hygrophorus* (502). На видовом уровне преобладали *Ceratobasidium* sp. 7 (1480), *Piloderma sphaerosporum* Jülich (1021), *Russula recondita* Melera et Ostellari (939),



Рис. 1. Суммарный таксономический состав микобиоты всех образцов до ранга семейств (приведены таксоны, представленные более 500 ОТЕ, 2%):

1 — *Sordariomycetes*, 2 — *Thelephorales*, 3 — *Mytilinidiales*, 4 — *Chaetothyriales*, 5 — *Eurotiales*, 6 — *Hyaloscyphaceae*, 7 — *Gloniaceae*, 8 — *Herpotrichiellaceae*, 9 — *Oliveoniaceae*, 10 — *Hygrophoraceae*.

R. laricina Velen. (864), *Ceratobasidium* sp. 5 (743), *Tomentella bryophila* (Pers.) M.J. Larsen (615), *Cenococcum geophilum* Fr. (599) и *Oliveonia pauxilla* (H.S. Jacks.) Donk (513).

Выявленные ОТЕ объединены в экологические группы с использованием базы данных FUNGuild. С помощью FUNGuild определены экологические группы 350 из 438 ОТЕ (80%). В тексте приведена следующая версия перевода терминов:

экологическая группа по FUNGuild	перевод
endophyte	эндофит
endomycorrhizal	эндомикориза
ectomycorrhizal	эктомикориза
ericoid mycorrhizal	эрикоидная микориза
animal pathogen	патоген животных
plant pathogen	фитопатоген
leaf saprotroph	сапротроф на листе
litter saprotroph	подстилочный сапротроф
wood saprotroph	ксилосапротроф
undefined saprotroph	сапротроф на неидентифицированном субстрате (НС)

Для установления экологических групп была использована база данных FungalTraits (Pölme et al., 2020), однако полученные данные практически не отличались, в связи с чем не приведены в тексте. Базы

данных FUNGuild и FungalTraits предписали экологическую роль примерно с равной эффективностью (80 и 82% ОТЕ соответственно). Основное различие в их применении обусловлено разной интерпретацией экологической роли представителей рода *Ceratobasidium*, составляющих существенную долю в изучаемых образцах. По данным FUNGuild представители рода *Ceratobasidium* относятся к экологической группе “Эндомикориза/Фитопатоген/Сапротроф на неидентифицированном субстрате (НС)”. Учитывая характер исследуемых образцов и преобладание ОТЕ рода *Ceratobasidium*, в тексте они рассмотрены как микобиоты эндомикоризы, а именно ОМ. В остальном обе базы данных выявили в качестве доминирующих групп микобионтов ЭкМ, а также почвенных, подстилочных сапротрофов и ксилосапротрофов (рис. 2).

Различия в таксономическом составе и распределении экологических групп грибных сообществ показаны при помощи анализа PERMANOVA. Выявлено существенное различие в таксономическом составе грибных сообществ корней *G. repens* и прилегающей почвы ($p = 0.010$). При сравнении образцов из разных регионов выявлено существенное отличие микобиоты корней *G. repens* из Карачаево-Черкесии от Ленинградской ($p = 0.030$) и Московской ($p = 0.010$) областей. Достоверное различие между образцами корней *G. repens* в Ленинградской и Московской областях выявлено не было ($p = 0.130$).

При сравнении образцов по распределению экологических групп выявлено существенное отличие образцов корней *G. repens* от почвы ($p = 0.001$). Вместе с тем различий в представленности экологических групп

в сообществах грибов, ассоциированных с *G. repens* в изученных регионах, выявлено не было ($p = 0.363$). Отличия визуализированы с использованием метода неметрического многомерного шкалирования, оси графика отражают условные координаты точек в двухмерном пространстве (NMDS1, NMDS2) (рис. 3).

Существенное различие в таксономическом составе микобиоты как по типу материала, так и по региону продемонстрировано на рис. 3, А. Отсутствие отличий в таксономическом составе корневой микобиоты *G. repens* Московской и Ленинградской областей, возможно, обусловлено тем, что в двух точках сбора из Ленинградской обл. *G. repens* формирует микоризу с разными представителями семейства *Ceratobasidiaceae*. Учитывая высокую долю представителей этого семейства в образцах, различие между образцами из Ленинградской обл. оказывается существенно различий между регионами.

Грибное сообщество почвы б.ч. единообразно и не имеет региональной специфичности, тогда как соотношение экологических групп грибов в корневой системе *G. repens* неоднородно и также не зависит от региона произрастания (рис. 3, Б).

Таким образом, таксономический состав и распределение экологических групп микобиоты корней *G. repens* в каждом регионе отличаются от состава почвенной микобиоты. Географический фактор может обуславливать различие лишь в таксономическом составе как корневой, так и почвенной микобиоты, в то время как распределение экологических групп остается постоянным вне зависимости от региона.

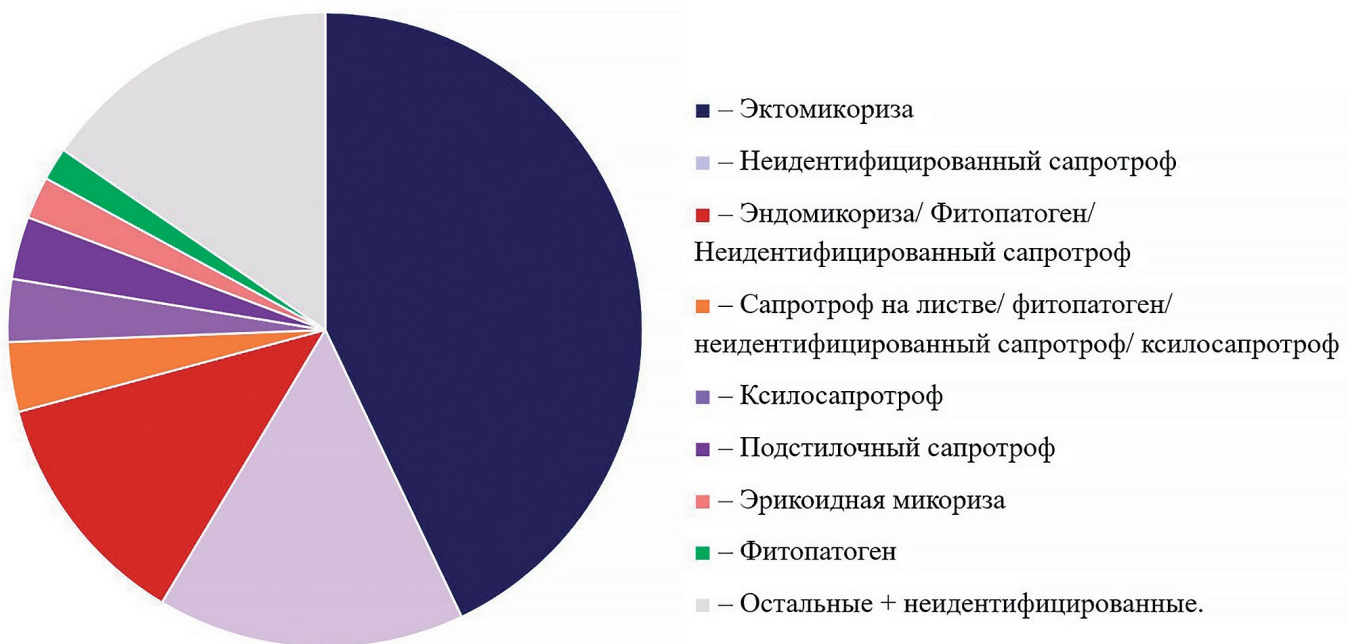


Рис. 2. Распределение экологических групп грибов для всех образцов по данным FUNGuild.

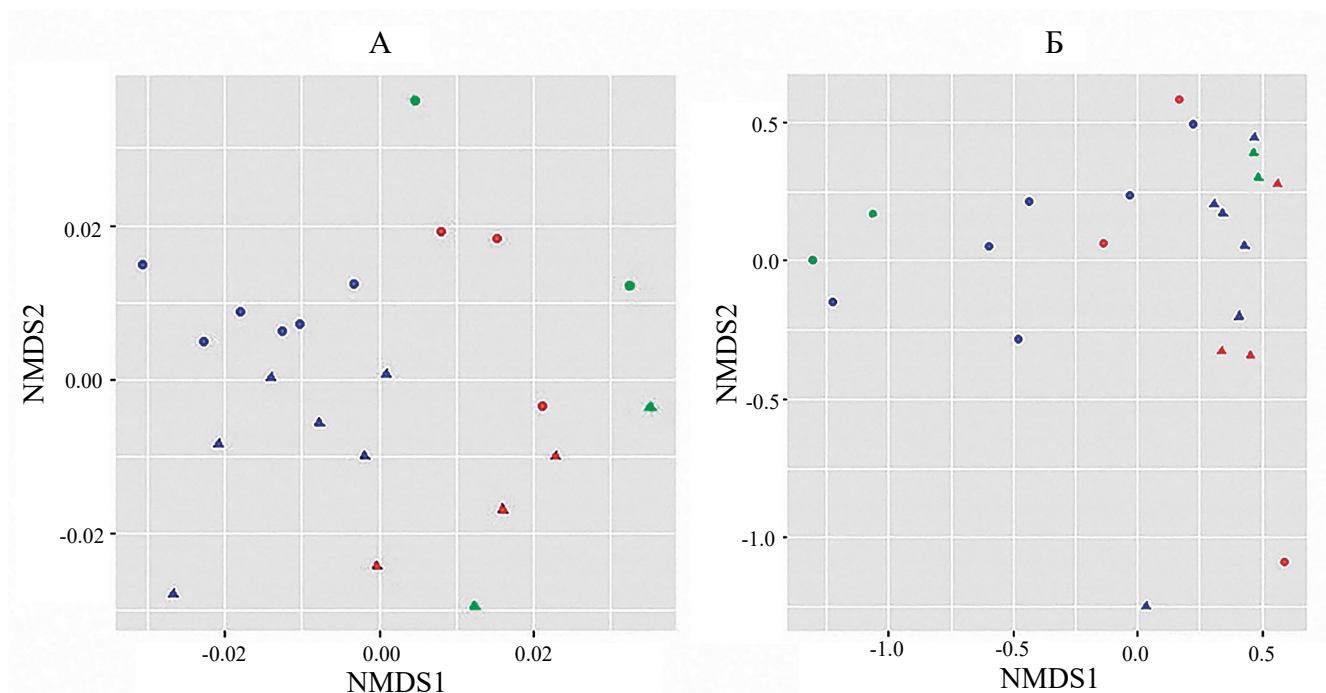


Рис. 3. Ординация образцов с использованием дистанции Брея – Кертиса: А – по таксономическому составу (значение стресса 0.20); Б – по распределению экологических групп (значение стресса 0.08). Зеленый цвет – Ленинградская обл., красный – Московская обл., синий – Карачаево-Черкесия. Кругочком обозначены корни *G. repens*, треугольником – почва.

Различия корневой и почвенной микобиоты

С целью выявления таксонов и экологических групп, обуславливающих отличия корневой микобиоты от почвенной, был проанализирован таксономический состав и распределение экологических групп грибов в образцах почвы и корней *G. repens* (рис. 4, 5).

Различие в таксономическом составе корневой и почвенной микобиоты выявляются на уровне порядков. В корнях *G. repens* большей долей представлен порядок *Cantharellales*, существенную часть которого (99.5%) составляет семейство *Ceratobasidiaceae*, и порядок *Sebacinales* – группы, включающие специфичных микобионтов ОМ (Weiß et al., 2016). Преобладание микобионтов ОМ в корнях *G. repens* обуславливает отличие в составе экологических групп корневой и почвенной микобиоты. В силу разнообразия экологических стратегий внутри семейства *Ceratobasidiaceae* (Pilshchikova, Gannibal, 2016), его представители классифицируются по базе данных FUNGuild в группу “Эндомикориза/Фитопатоген/НС”, являющуюся доминирующей в образцах корней *G. repens*. Представителям порядка *Sebacinales* не присвоена экологическая группа с помощью FUNGuild. В корнях *G. repens* присутствует также экологическая группа “фитопатоген”, представленная преимущественно (65.2%) ОТЕ *Rhizoctonia ochracea* (Masse) Oberw., R. Bauer, Garnica et R. Kirschner. Этот вид относится к семейству *Ceratobasidiaceae* и способен

формировать ОМ (Roberts, 1998). Несмотря на это, далее этот вид будет рассмотрен как фитопатоген в соответствии с данными FUNGuild для объяснения различий между образцами.

Таксономический состав почвенной микобиоты отличается большей долей представителей отдела *Ascomycota*: порядков *Helotiales*, *Mytilinidiales* и *Eurotiales*, а также порядка *Trechisporales*. Представители порядков *Helotiales* и *Trechisporales* (*Trechispora* spp.) классифицированы как сапротрофы на различных субстратах, что обуславливает большую долю этой экологической группы в почве. Среди порядка *Helotiales* доминируют сапротрофы *Hyaloscypha* spp. и микобионты эрикоидной микоризы *Oidiodendron* spp. Порядки *Mytilinidiales* и *Eurotiales* представлены соответственно ОТЕ *Cenococcum geophilum* (99.0% ОТЕ порядка) и *Elaphomyces* spp. (65.5% ОТЕ порядка), классифицированными как микобионты Эк М. Грибы этих таксонов на исследуемых территориях развиваются локально и составляют существенную долю в одном или двух образцах почвы. Тем не менее они вносят вклад в доминирующую долю микобионтов ЭкМ в почвенной микобиоте. Подавляющая доля микобионтов ЭкМ как в почвенном, так и в корневом сообществе представлена базидиомицетами порядков *Agaricales*, *Russulales*, *Atheliales* и *Thelephorales*.

Таким образом, отличие в составе микобиоты между объединенными образцами корневой системы *Goodyera*

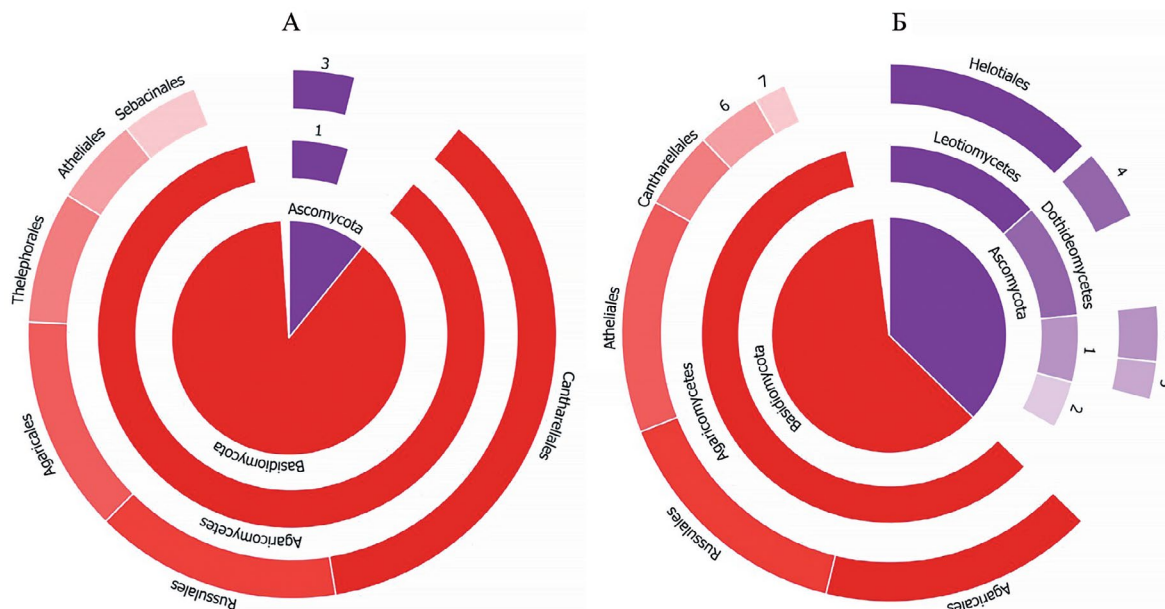


Рис. 4. Таксономический состав микобиоты корней *Goodyera repens* (А) и почвы (Б) до ранга порядков (приведены таксоны, представленные более 2% – 150 ОТЕ для корней и 250 для почвы): 1 – *Eurotiomycetes*, 2 – *Sordariomycetes*, 3 – *Chaetothyriales*, 4 – *Mytilinidiales*, 5 – *Eurotiales*, 6 – *Thelephorales*, 7 – *Trechisporales*.

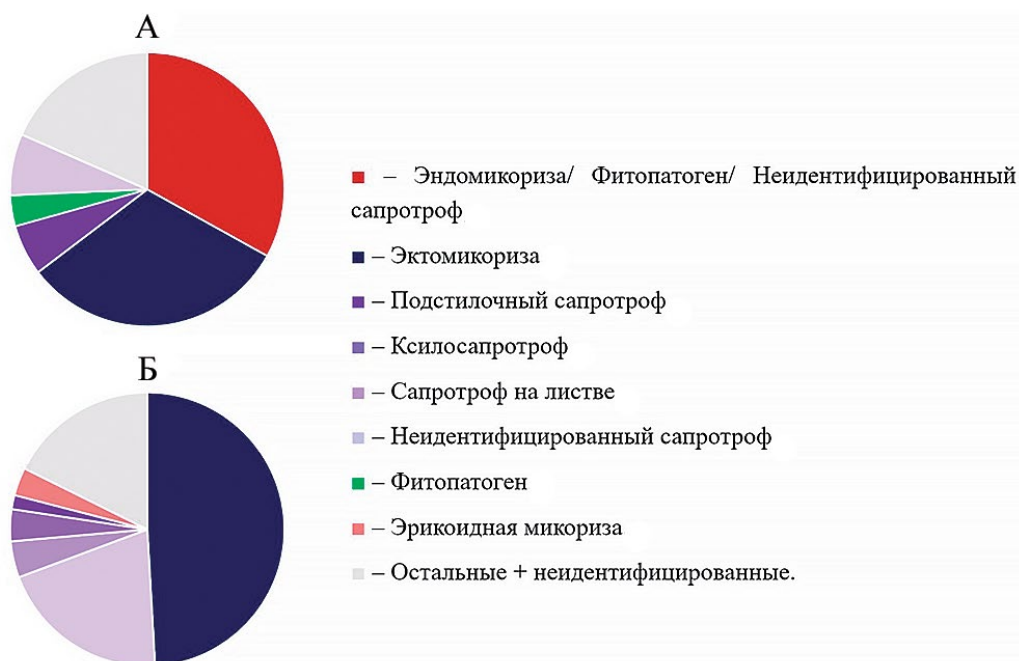


Рис. 5. Состав экологических групп грибов в корнях *Goodyera repens* (А) и в почве (Б) по данным FUNGuild.

repens и почвы прослеживается как в таксономическом составе, так и в распределении экологических групп и обусловлено в первую очередь грибами-микоризообразователями рода *Ceratobasidium* – микобионтами *G. repens*, отнесенными к экологической группе “Эндомикориза/Фитопатоген/НС”. Различия микобиоты этих экотопов связаны также с некоторыми таксонами эктомикоризообразователей: *Cenococcum geophilum*, *Elaphomyces* spp., преобладающими в образцах почвы,

а также сапротрофами порядков *Helotiales* и *Trechisporales*, обильнее представленными в почве.

Региональная специфичность корневой микобиоты

Регион произрастания *Goodyera repens* определяет различия в таксономическом составе корневой микобиоты, но не в распределении экологических групп. В отличие от образцов почвы, единообразных

по экологическому распределению грибов, корневая микобиота разнородна, и различия между точками внутри одного региона могут быть существеннее различий между точками в разных регионах (рис. 3). В связи с этим таксономический состав рассмотрен для точек, объединенных по регионам, а распределение экологических групп обсуждено отдельно для каждой точки (рис. 6, 7).

Таксономический состав грибного сообщества в корнях *G. repens* из разных регионов схож на уровне отделов и классов, а существенные различия наблюдаются на уровне порядков класса *Agaricomycetes*. В образцах корневой системы *G. repens* из Ленинградской обл. доминирует единственный порядок этого класса — *Cantharellales* (семейство *Ceratobasidiaceae*) (рис. 6, А). Доля представителей этого порядка в образцах составляет 98.6% ОТЕ класса. В образцах из Московской обл. значительную долю также составляют порядки *Agaricales* (31.6%), *Atheliales* (15.8%) и *Trechisporales* (11.1%) (рис. 6, Б). В образцах корней *G. repens* из Карачаево-Черкесии, помимо вышеуказанных порядков, доминируют также порядки *Russulales* (25.2%) и *Sebacinales* (8.0%) (рис. 6, В).

Таким образом, наиболее яркие различия в таксономическом составе на уровне порядков в микобиоте корней *G. repens* обусловлены таксонами микобионтов Эк М. Отсутствие отличий в таксономическом составе корневой микобиоты *G. repens* из Московской и Ленинградской областей обусловлено существенным различием таксономического состава двух образцов Ленинградской области: в обоих образцах грибы семейства *Ceratobasidiaceae* составляют более 79% при отсутствии микобионтов ЭкМ, однако представлены разными ОТЕ рода *Ceratobasidium* (табл. 2).

Региональные различия в составе экологических групп корневой микобиоты *G. repens* обусловлены группами “Эндомикориза/Фитопатоген/НС” (семейство *Ceratobasidiaceae*), а также микобионтами ЭкМ и фитопатогенами. В корнях *G. repens* из Ленинградской обл. доля микобионтов ЭкМ ниже, чем в остальных регионах. Высокая доля фитопатогенов в корнях *G. repens* из Московской обл. обусловлена отнесением к этой группе ОТЕ *Rhizoctonia ochracea*. Однако было показано, что представители этого вида способны формировать ОМ наряду с *Ceratobasidium* (Roberts, 1998).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в ходе данной работы, впервые количественно характеризуют структуру грибного сообщества, ассоциированного с корневой системой *Goodyera repens* на примере популяций из различных типов леса: сосняк с елью (Ленинградская и Московская области) и пихтарник с сосной (республика Карачаево-Черкесия). Показано, что представители *Ceratobasidiaceae*, являющиеся основными микобионтами видов *Goodyera* (Shefferson et al., 2010), составляют наибольшую долю в корневой микобиоте, причем ОМ способны формировать как *Ceratobasidium*, так и *Thanatephorus* (*Rhizoctonia ochracea*). Эти микобионты в наибольшей степени обуславливают различие таксономического и экологического состава корневой и почвенной микобиоты. Малая доля представителей семейства *Ceratobasidiaceae* в образцах почвы под куртинами *Goodyera repens* указывает на их тяготение к ассоциации с растениями и предпочтение симбиотического образа жизни сапротрофному. Грибы семейства *Ceratobasidiaceae* обуславливают региональную специфичность корневой микобиоты, будучи

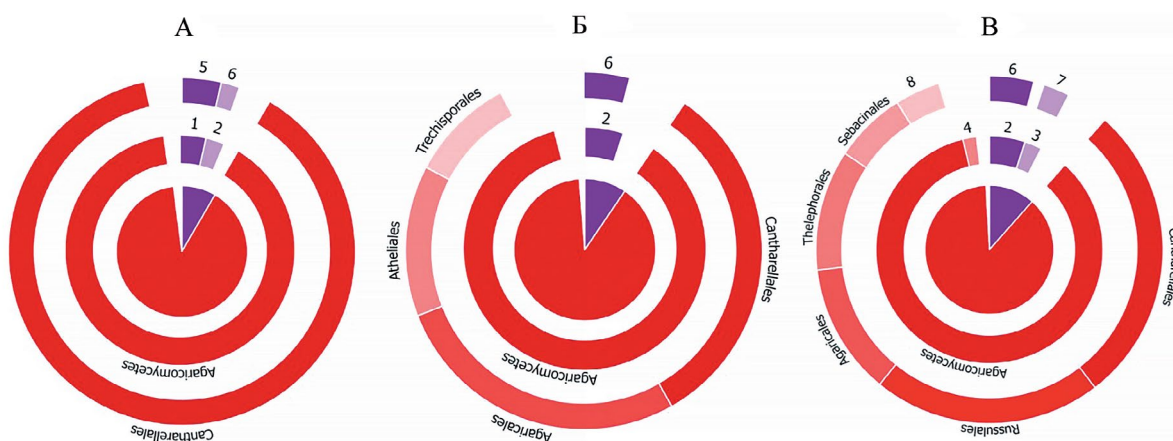


Рис. 6. Таксономический состав микобиоты корней *Goodyera repens* в Ленинградской обл. (А), Московской обл. (Б) и Карачаево-Черкесии (В) до ранга порядков (приведены таксоны, представленные более 2% от общего числа ОТЕ в образце): 1 — *Leotiomycetes*, 2 — *Eurotiomycetes*, 3 — *Pezizomycetes*, 4 — *Tremellomycetes*, 5 — *Helotiales*, 6 — *Chaetothyriales*, 7 — *Pezizales*, 8 — *Atheliales*.

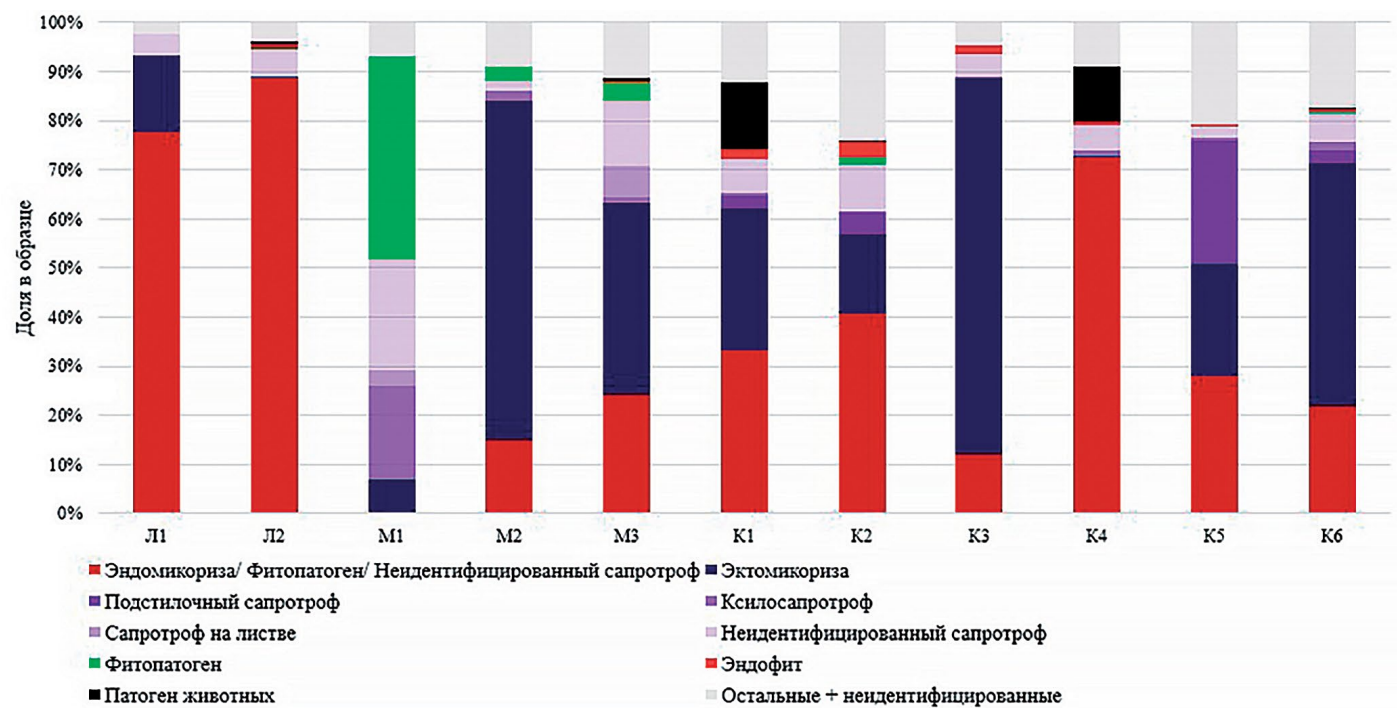


Рис. 7. Распределение экологических групп грибов в корнях *Goodyera repens* из разных регионов по данным FUNGuild: Л – Ленинградская обл.; М – Московская обл.; К – Карачаево-Черкесия. Описания точек сбора приведены в табл. 1.

Таблица 2. Таксоны, доминирующие в образцах корней *Goodyera repens* и обуславливающие различие между регионами

Таксон	Референс	Сходство	Регион	Экологическая группа (по FUNGuild)
<i>Cladophialophora</i> sp.	OW846714.1	99.7%	М	неидентифицированный сапротроф
<i>Ceratobasidium</i> sp. 3	MH248045.1	100%	Л, М	эндомикориза/ фитопатоген/ неидентифицированный сапротроф
<i>Ceratobasidium</i> sp. 5	OL437012.1	98.9%	Л2	
<i>Ceratobasidium</i> sp. 6	KP056302.1	99.5%	Л1	
<i>Ceratobasidium</i> sp. 7	MN006062.1	98.9%	К	
<i>Rhizoctonia ochracea</i> (Massee) Oberw., R. Bauer, Garnica et R. Kirschner	EU218892.1	97.4%	М	фитопатоген
<i>Russula laricina</i> Velen.	MF926568.1	99.7%	К	эктомикориза
<i>R. recondita</i> Melera et Ostellari	MT252520.1	97.0%	К	
<i>R. sanguinea</i> (Bull.) Fr.	KT934008.1	97.4%	К	
<i>Cortinarius casimiri</i> (Velen.) Huijsman	MG773833.1	99.7%	М	
<i>Mycena pura</i> (Pers.) P. Kumm.	MK309793.1	99.7%	К	подстильный сапротроф
<i>M. sanguinolenta</i> (Alb. et Schwein.) P. Kumm.	MH856662.1	99.7%	М	сапротроф на листе
<i>Xeromphalina setulipes</i> Esteve-Rav. et G. Moreno	NR_121458.1	99.4%	М	неидентифицированный сапротроф
<i>Athelopsis fusioidea</i> (Jülich) Tellería	KP814479.1	99.1%	М	
<i>Trechispora invisitata</i> (H.S. Jacks.) Liberta	KP814425.1	100%	М	ксилосапротроф
<i>Tylospora</i> sp.	MG597440.1	100%	М, К	эктомикориза
<i>Tylospora fibrillosa</i> (Burt) Donk	MH248063.1	100%	М	
<i>Tomentella bryophila</i> (Pers.) M.J. Larsen	AJ889981.1	100%	К	
<i>Sebacina incrustans</i> (Pers.) Tul. et C. Tul.	JQ665539.1	100%	К	НД
<i>Sebacina</i> sp.	MN265713.1	100%	К	

Примечание. НД – экологическая группа не идентифицирована.

представленными разными ОТЕ в зависимости от региона произрастания *G. repens* (табл. 2).

Помимо специфичных микобионтов, существенную долю в грибном сообществе корневой системы *G. repens* составляют микобионты ЭкМ. Грибы этой экологической группы ранее выявляли в корнях *G. repens* методами прямого секвенирования (Voronina et al., 2018), и количественные данные, полученные в ходе данной работы, подтверждают их важную роль в корнях орхидных. Наличие эктомикоризообразователей в корнях после тщательной поверхностной очистки и стерилизации свидетельствует о возможности их ассоциации с *G. repens* и формирования микоризных сетей с хвойными деревьями. Таксономическое разнообразие выявленных микобионтов ЭкМ выше по сравнению со специфичными микобионтами ОМ: выявлены представители порядков *Atheliales*, *Agaricales*, *Russulales*, *Thelephorales*, *Eurotiales* и *Mytilinidiales*. Доля эктомикоризообразователей в корнях варьирует от полного отсутствия до доминирующей доли в образце (76.6%). Отсутствие микобионтов ЭкМ в точках Л2 и К4 объясняется недоступностью корней хвойных деревьев (табл. 1), дополнительно свидетельствуя о возможности участия *G. repens* в формировании микоризных сетей.

Региональные различия в составе корневой микобиоты также отчасти обусловлены микобионтами ЭкМ и прослеживаются на уровне порядков. В Ленинградской обл. микобионты ЭкМ практически отсутствуют, в Московской представлены порядками *Agaricales* и *Atheliales*, а в Карачаево-Черкесии — порядками *Russulales*, *Agaricales*, *Thelephorales* и *Atheliales*.

Несмотря на существенную долю микобионтов ЭкМ в корнях *G. repens*, в почвенной микобиоте они представлены соизмеримыми, либо большими долями, что может быть связано с образованием мицелиальных тяжей в почве.

Помимо микобионтов ОМ и ЭкМ, различие состава корневой и почвенной микобиоты обусловлено представителями порядка *Helotiales*, включающего сапротрофов и микобионтов эрикоидной микоризы, и порядка *Trechisporales*, включающего сапротрофов. Эти порядки преобладают в почвенной микобиоте.

Таким образом, методом микробного профилирования была показана региональная специфичность корневой микобиоты *G. repens* и выявлены таксоны грибов, тяготеющие к корневой системе и обуславливающие региональную специфичность микобиоты. Показано, что состав грибного сообщества корней *G. repens* и почвы различается как по таксономическому составу, так и по распределению экологических групп. Отсутствие значимого отличия между составом грибного сообщества сосняков Московской и Ленинградской областей и отличие их от состава

сообщества пихтарников Карачаево-Черкесии позволяет предположить, что тип леса является одним из факторов, обуславливающих различие в таксономическом составе ассоциированной микобиоты. В то же время экологическое распределение неоднородно в пределах региона.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования (грант № 075-15-2021-1396).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Averyanov L.V. Orchidaceae of Middle Russia. Turczaninowia. 2000. V. 3 (1). P. 30–53 (in Russ.).
- Cameron D.D., Leake J.R., Read D.J. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. New Phytol. 2006. V. 171 (2). P. 405–416. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01767>
- Costantin J., Dufour L. Sur la biologie du *Goodyera repens*. Rev. Gen. Bot. 1920. V. 32. P. 529–533.
- Downie D.G. Source of the symbiont of *Goodyera repens*. Trans. R. Soc. Edinburgh. 1943. V. 33. P. 383–390. <https://doi.org/10.1080/13594864309441392>
- Fuller G.D. Symbiosis in orchids. Bot. Gaz. 1909. V. 48 (6). P. 474. <https://doi.org/10.1086/330075>
- GenBank. National Center for Biotechnology Information. 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>. Accessed 16.08.2023.
- Girlanda M., Selosse M.A., Cafasso D. et al. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal *Russulaceae*. Mol. Ecol. 2006. V. 15 (2). P. 491–504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02770.x>
- Li Y.Y., Boeraeve M., Cho Y.H. et al. Mycorrhizal switching and the role of fungal abundance in seed germination in a fully mycoheterotrophic orchid, *Gastrodia confusoides*. Front. Plant Sci. 2022. V. 12. P. 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.775290>
- Maevskiy P.F. The flora of Middle European Russia. 11th edn. Tovarichestvo nauchnykh izdaniy KMK, Moscow, 2014 (in Russ.).
- Martin F., Kohler A., Murat C. et al. Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. Nat. Rev. Microbiol. 2016. V. 14 (12). P. 760–773. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.149>
- Martino E., Morin E., Grelet G.A. et al. Comparative genomics and transcriptomics depict ericoid mycorrhizal fungi as versatile saprotrophs and plant mutualists. New Phytol. 2018. V. 217 (3). P. 1213–1229. <https://doi.org/10.1111/nph.14974>
- Mycobank Database. <https://www.mycobank.org/>. Accessed 16.08.2023.
- Nguyen N.H., Song Z., Bates S.T. et al. FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. Fungal Ecol. 2016. V. 20. P. 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006>

- Oberwinkler F., Cruz D., Suárez J.P. Biogeography and ecology of *Tulasnellaceae*. In: L. Tedersoo (ed.). Biogeography of mycorrhizal symbiosis. Berlin: Springer. 2017. P. 237–271.
- Pilshchikova N.S., Gannibal Ph.B. Modern systematics of the genus *Rhizoctonia* sensu lato. Mikologiya i fitopatologiya. 2016. V. 50 (2). P. 75–88 (in Russ.).
- Põlme S., Abarenkov K., Henrik Nilsson R. et al. FungalTraits: a user-friendly traits database of fungi and fungus-like stramenopiles. Fungal Divers. 2020. V. 105. P. 1–16. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00466-2>
- Roberts P. *Thanatephorus ochraceus*: a saprotrophic and orchid endomycorrhizal species. Sydowia. 1998. V. 50. P. 252–256.
- Shefferson R.P., Cowden C.C., McCormick M.K. et al. Evolution of host breadth in broad interactions: mycorrhizal specificity in East Asian and North American rattlesnake plantains (*Goodyera* spp.) and their fungal hosts. Mol. Ecol. 2010. V. 19. P. 3008–3017. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04693.x>
- Smith S., Read D. Mycorrhizal symbiosis. Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK, Moscow, 2012 (in Russ.).
- Suetsugu K., Yamato M., Miura C. et al. Comparison of green and albino individuals of the partially mycoheterotrophic orchid *Epipactis helleborine* on molecular identities of mycorrhizal fungi, nutritional modes and gene expression in mycorrhizal roots. Mol. Ecol. 2017. V. 26 (6). P. 1652–1669. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- UNITE. 2022. <https://unite.ut.ee/index.php>. Accessed 16.08.2023.
- Voronina E.Y., Malysheva E.F., Malysheva V.F. et al. A mixotrophy is in question: new data on fungal community associated with photosynthetic terrestrial orchid *Goodyera repens*. Bot. Pac. 2018. V. 7. P. 51–61. <https://doi.org/10.17581/bp.2018.07106>
- Wang D., Lerou J., Nuytinck J. et al. Root-associated fungi in *Orchidaceae*: Diversity, phylogeny, ecology, and outstanding questions. BioRxiv. 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.12.16.519622>
- Weiß M., Waller F., Zuccaro A. et al. *Sebacinales* – one thousand and one interactions with land plants. New Phytol. 2016. V. 211. P. 20–40. <https://doi.org/10.1111/nph.13977>
- Аверьянов Л.В. (Averyanov) Орхидные (Orchidaceae) Средней России // Turczaninowia. 2000. Т. 3 (1). С. 30–53.
- Маевский П.Ф. (Maevskiy) Флора средней полосы европейской части России. 11-е изд. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014.
- Пильщикова Н.С., Ганнибал Ф.Б. (Pilshchikova, Gannibal) Современная систематика грибов рода *Rhizoctonia* sensu lato // Микология и фитопатология. 2016. Т. 50 (2). С. 75–88.
- Смит С., Рид Д. (Smith, Read) Микоризный симбиоз. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2012.

Root-Associated Mycobiota of *Goodyera repens* (Orchidaceae) Populations from Three Russian Regions

N. M. Bibikov^{a, #}, E. Yu. Voronina^{a, ##}, and A. V. Kurakov^{a, ###}

^a Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*e-mail: bibik0808@mail.ru

**e-mail: mvsadnik@list.ru

***e-mail: kurakov57@mail.ru

Goodyera repens is an orchid, widespread and abundant in the coniferous forests of the northern hemisphere. Along with other members of *Orchidaceae*, in natural conditions it exists in obligate mycorrhizal symbiosis. Despite a long history of study, no data on the mycobiota associated with the root system of this species have been obtained for populations growing in Russia. It is therefore necessary to assess the entire diversity of fungal associates, including non-cultivated species, as well as to obtain quantitative characteristics and evaluate the geographic specificity of fungal communities. In this work, the mycobiota of the root system of *G. repens* growing in the Leningrad and Moscow Regions and Karachay-Cherkess Republic was analysed qualitatively and quantitatively for the first time using high-throughput sequencing. A total of 438 operational taxonomic units were identified, with the majority belonging to the subdivision Basidiomycota. The quantitative predominance of sequences of the genera *Russula*, *Ceratobasidium*, *Piloderma*, *Mycena*, and *Tomentella* was observed. Significant differences between fungal communities of soil and the root system of *G. repens* were established in all studied regions. The regional specificity of the taxonomic composition of the mycobiota was demonstrated. The taxa spectrum of the samples from Karachay-Cherkessia differed significantly from that of the Leningrad and Moscow Regions, while no notable difference was observed between the latter two. With regard to the distribution of ecological groups of fungi, no significant differences were found between the regions.

Keywords: FUNGuild, *Goodyera repens*, ITS2, metagenome, microbiology profiling, orchid mycorrhiza