

Метабаркодинг сообщества грибов мертвой древесины: стандартный субстрат как метод изучения сукцессии

Научный руководитель – Филиппова Нина Владимировна

Добрынина Алевтина Сергеевна

Студент (бакалавр)

Югорский государственный университет, Ханты-Мансийск, Россия

E-mail: alevtina.dobrynina86@yandex.ru

Видовое разнообразие ксилотрофных грибов на севере Западной Сибири хорошо изучено, что показано в ряде работ [1]. Однако до сих пор это был классический подход, основанный на регистрации плодовых тел на субстратах. Более глубокое изучение функционального сообщества грибов гнилой древесины дает метод выделения тотальной ДНК (метабаркодинг), позволяющий регистрировать присутствие мицелия и/или покоящихся пропагул непосредственно в субстрате [2, 3, 4]. Использование стандартных субстратов (стерильных отрезков древесины) позволят получать модельные характеристики о структуре и сукцессии сообщества.

Для изучения структуры и динамики сообщества мелкомерной древесины нами был использован метод стандартных субстратов и выделения тотальной ДНК (метабаркодинг) из древесины (сосна, лиственница и береза) в зоне средней тайги Западной Сибири. Были заложены площадки, где субстраты прикапывались в верхний слой подстилки, в четырех типах местообитаний: хвойный и лиственный лес, заболоченный лес и верховое. Всего в июле 2022 года в районе стационаров «Мухрино» и «Шапша» Югорского государственного университета (г. Ханты-Мансийск) заложено около 600 чопиков: 5 площадок, в каждой по 20 точек, в каждой точке по 2 чопика трех видов древесины. В первый год выполнения проекта (лето 2022 года) были экстрагированы стандартные субстраты первого года разложения (2-8 недель с момента закладки), всего 78 чопиков.

Основным результатом работы в настоящее время является разработка протокола экстракции тотальной ДНК из древесины, включающий следующие процедуры: 1) чопики очищают от прилипшего листового опада и почвы (рис. 1), помещают в стерильные бумажные пакеты, этикетировывают и высушивают при температуре 40°C; 2) для получения экстракта из внутренней части чопика (для избежания контаминации почвенными грибами), деревянные опилки высверливают с помощью шуруповерта и 3-мм сверла, перед каждым новым чопиком сверло стерилизуют на пламени горелки; 3) полученные опилки (примерно 0,3 мл по объему) пересыпают в микропробирки (рис. 2) и заливают лизис-буфером; 4) гомогенизацию субстрата проводят с помощью шуруповерта с прикрученным на него микропестиком (новый для каждой пробирки) в лизис-буфере со стеклянными шариками.

Выделение тотальной ДНК проводили с помощью набора для выделения тотальной ДНК из почвы (в нашем случае - «Sileks», по протоколу производителя). Для проверки результатов выделения тотальной ДНК проводили ПЦР, электрофорез и делали измерение концентрации ДНК с помощью флуориметра Qubit 4.0. Для ПЦР использовали регион ITS1, амплифицированный с помощью праймеров ITS3_KY02, ITS4_KY02 [6]. Для проведения электрофореза использовали стандартную процедуру; длину полученных отрезков определяли с помощью маркера длины ДНК (рис. 3). Проверку концентрации полученной ДНК (после проведения ПЦР) проводили с помощью флуориметра Qubit 4.0 (полученные значения находились в диапазоне 6-20 нг/мкл, что является достаточным для дальнейших процедур секвенирования).

Полученные пробы выделенной тотальной ДНК были отправлены на пробоподготовку и высокопроизводительное секвенирование по технологии Illumina. Обработка и анализ полученных данных будет производиться с использованием программных пакетов для анализа данных секвенирования NGS [5] в Python и R, а также готовых информационных систем SKATA [8] и Knomics.biota [7].

Источники и литература

- 1) Филиппова Н.В., Арефьев С.П., Бульонкова Т.М., Звягина Е.А., Капитонов В.И., Макарова Т.А., Мухин В.А., Ставищенко И.В., Тавшанжи Е.И., Ширяев А.Г. История микологических исследований в Ханты-Мансийском автономном округе: 1) период разрозненных исследований, изучение сообществ ксилотрофных базидиомицетов и фитопатология // ДОСиГИК. 2017. Т. 8. No. 2. С. 18-28.
- 2) Heine P., Hausen J., Ottermanns R., Ross-Nickoll M. Comparing eDNA metabarcoding with morphological analyses: Fungal species richness and community composition of differently managed stages along a forest conversion of Norway spruce towards European beech in Germany // Forest Ecology and Management. 2021. Vol. 496: 119429.
- 3) Lunde L.F., Birkemoe T., Kauserud H., Boddy L., Jacobsen R.M., Morgado L., Sverdrup-Thygeson A., Maurice S. DNA metabarcoding reveals host-specific communities of arthropods residing in fungal fruit bodies // Proc. R. Soc. B. 2022. Vol. 289: 20212622.
- 4) Runnel K., Drenkhan R., Adamson K., Lohmus P., Rosenvald K., Rosenvald R., Rähn E., Tedersoo L. The factors and scales shaping fungal assemblages in fallen spruce trunks: A DNA metabarcoding study // Forest Ecology and Management. 2021. Vol. 495: 119381.
- 5) Taberlet P., Bonin A., Zinger L., Coissac E. Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring. Oxford University Press. 2018.
- 6) Toju H., Tanabe A.S., Yamamoto S., Sato H. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples // PLoS ONE. 2012. Vol. 7. No. 7: e40863.
- 7) Knomics.biota - Online service for exploratory analysis of microbiome sequencing data: <https://biota.knomics.ru/>
- 8) SKATA - Sequence Clustering and Analysis of Tagged Amplicons: <https://scata.mykopt.sl.se/>

Иллюстрации



Рис. 1. Общий вид чопиков, экстрагированных после периода разложения в лесной подстилке в течении 2-х месяцев.

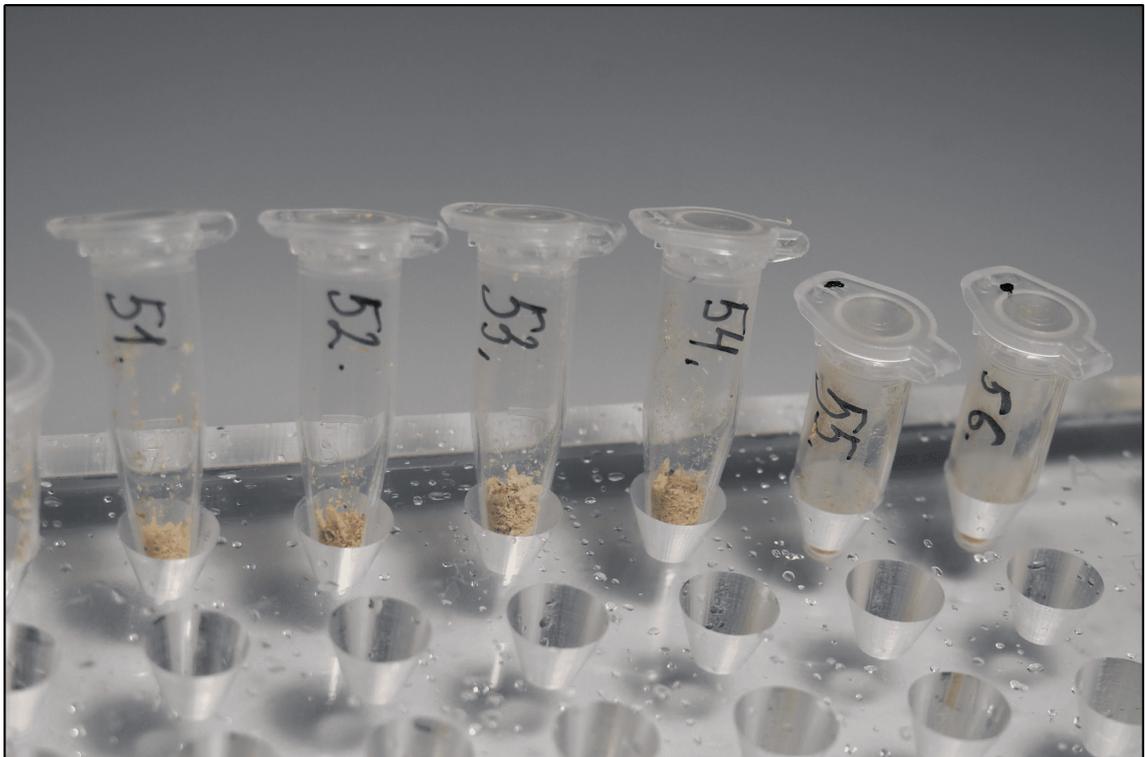


Рис. 2. Пример высверленных опилок в эппендорфах перед выделением тотальной ДНК из древесины.

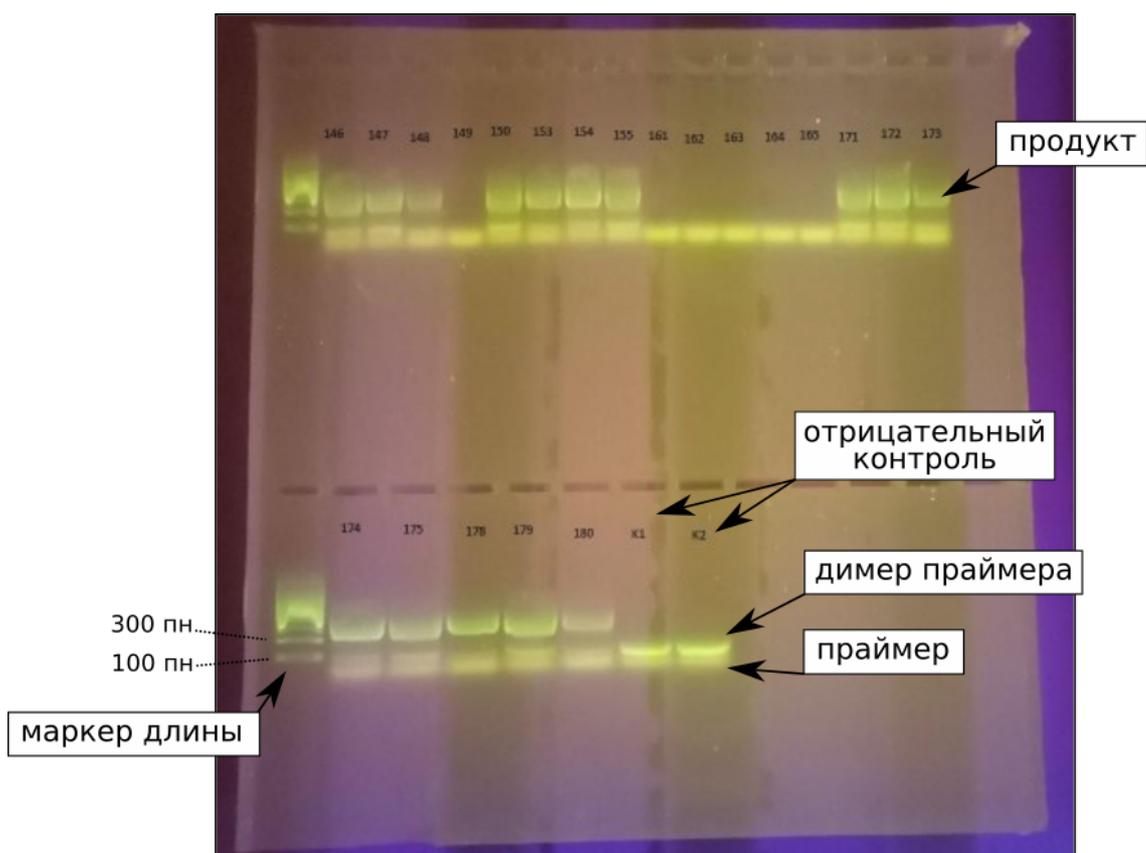


Рис. 3. Пример результатов электрофореза образцов тотальной ДНК, выделенной из древесины: положительный и отрицательный результат ПЦР, и отрицательный контроль.