

Пайплайн обработки данных метагенома грибов верховых болот**Научный руководитель – Звягина Елена Анатольевна*****Ишманов Тагир Флюрович****Студент (бакалавр)*

Санкт-Петербургский Академический университет - научно-образовательный центр нанотехнологий Российской академии наук, Ленинградская область, Россия

E-mail: ishmanov2003tagir@mail.ru

Одной из актуальных задач в области экологии болотных экосистем является изучение грибных сообществ. Нашей целью было создание пайплайна анализа сырых данных метабаркодинга для изучения грибных сообществ верховых болот. Для анализа данных использовали результаты секвенирования 192 образцов тотальной ДНК из проб торфа, растительного опада, древесины и микоризных корневых окончаний, отобранных в 2022 году на верховом болоте Мухрино в окрестностях города Ханты-Мансийска. ДНК выделяли набором SileksMagNA. Для метабаркодинга использовали регион ITS как наиболее информативный и традиционный для метабаркодинга грибов [6] и обеспеченный курируемыми референсными базами, например, UNITE [1]. Секвенировали участок ITS2 в границах праймеров Next-fITS7_For и Next-ITS4_Rev по протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation [5] на платформе Illumina MiSeq. Были получены сырые данные с разбросом от 1000 до 280000 прочтений на 1 пробу ДНК, из которых были отброшены образцы с числом < 10000. Начальные данные были обработаны при помощи пакета QIIME 2 [3], который позволяет модифицировать параметры обработки образцов в зависимости от целей исследования и качества сырых данных. Пайплайн подготовлен на Python 3 в интерфейсе Artifact API.

Анализ последовательностей выявил 1259 OTU, классифицированных на 471 вид, 423 рода, 223 семейства, 86 отрядов, 30 классов, 7 типов и одно царство с уровнем сходства 99%. Около 42% таксонов идентифицированы на уровне вида, 21% — на уровне рода, остальные — на более высоких таксономических уровнях. Основные порядки: *Leotiomyces*, *Dothideomyces*, *Eurotiomyces* и др. (*Ascomycota*) и *Agaricomycetes*, *Tremellomyces*, *Microbotriomyces* и *Exobasidiomyces* (*Basidiomycota*).

Для проверки качества работы пайплайна была произведена ручная классификация последовательностей, принадлежащих макромицетам. Данную группу грибов предварительно изучали на участке Мухрино в течение 9 лет на постоянных площадках, была создана референсная база последовательностей ITS, и опубликован список видов [4]. При помощи BLAST [2] сравнивали с референсной базой метабаркодинговые последовательности грибов основных семейств *Agaricaceae*, *Auriscalpiaceae*, *Boletaceae*, *Clavariaceae*, *Cortinariaceae*, *Crepidotaceae*, *Entolomataceae*, *Hygrophoraceae*, *Inocybaceae*, *Lycoperdaceae*, *Lyophyllaceae*, *Mycenaceae*, *Omphalotaceae*, *Paxillaceae*, *Physalacriaceae*, *Pluteaceae*, *Psathyrellaceae*, *Russulaceae*, *Strophariaceae*, *Suillaceae*, *Thelephoraceae*, *Tricholomataceae*, принадлежащих к трем основным порядкам *Agaricales*, *Boletales* и *Russulales*. Результаты ручной классификации полностью совпали с полученными посредством пайплайна на уровне класса, порядка, семейства и рода. Однако на видовом уровне 23% (27 из 118 видов) получили другие названия. В результате изучения проб грунта и опада список макромицетов на модельном участке верхового болота пополнился на 44 вида. Таким образом, подготовленный пайплайн позволяет проанализировать секвенированные данные и с уверенностью определить до рода большинство последовательностей ITS2 грибов, полученных из проб

грунта и растительных остатков. Классификация видового уровня может быть успешно осуществлена с использованием ручной проверки на небольших датасетах.

Работа выполнена в рамках государственного задания ЮГУ "Молекулярно-генетические методы в изучении и оценке состояния биоразнообразия Северных регионов (FENG-2024-0003)" №1023041300017-6-1.6.4 от 13.03.2024.

Источники и литература

- 1) Abarenkov K., Nilsson R.H., Larsson K.-H., Taylor A.F.S., May T.W., Frøslev T.G., Pawlowska J., Lindahl B., Põldmaa K., Truong C., Vu D., Hosoya T., Niskanen T., Piirmann T., Ivanov F., Zirk A., Peterson M., Cheeke T.E., Ishigami Y., Jansson A.T., Jeppesen T.S., Kristiansson E., Mikryukov V., Miller J.T., Oono R., Ossandon F.J., Paupério J., Saar I., Schigel D., Suija A., Tedersoo L., Kõljalg U. The UNITE database for molecular identification and taxonomic communication of fungi and other eukaryotes: Sequences, taxa and classifications reconsidered // *Nucleic Acids Research*. 2024. V. 52. No. D1. P. D791–D797.
- 2) Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // *Journal Molecular Biology*. 1990. V. 215. No. 3. P. 403–410.
- 3) Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // *Nature Biotechnology*. 2019. V. 37. P. 852–857.
- 4) Filippova N., Zvyagina E., Rudykina E., Dobrynina A., Bolshakov S. The diversity of macromycetes in peatlands: nine years of plot-based monitoring and barcoding in the raised bog "Mukhrino", West Siberia // *Biodiversity Data Journal*. 2023. V. 11: e105111.
- 5) Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System Protocol. Illumina, 2013. P. 28.
- 6) Tedersoo L., Bahram M., Zinger L., Nilsson R.H., Kennedy P.G., Yang T., Anslan S., Mikryukov V. Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results // *Molecular Ecology*. 2022. V. 31. No. 10. P. 2769–2795.