



Особенности молекулярно-генетической и морфологической идентификации грибов подотдела *Glomeromycotina*

Юрков А.П.^{1,2}, Крюков А.А.¹, Горбунова А.О.^{1,2}

Докладчик:

к. б. н., н.с. ФГБНУ ВНИИСХМ

Крюков Алексей Анатольевич

rainniar@rambler.ru

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

- Исследование посвящено изучению грибов арбускулярной микоризы (АМ) подотдела *Glomeromycotina*, образующих один из самых распространенных в природе симбиозов с высшими растениями (92% семейств)

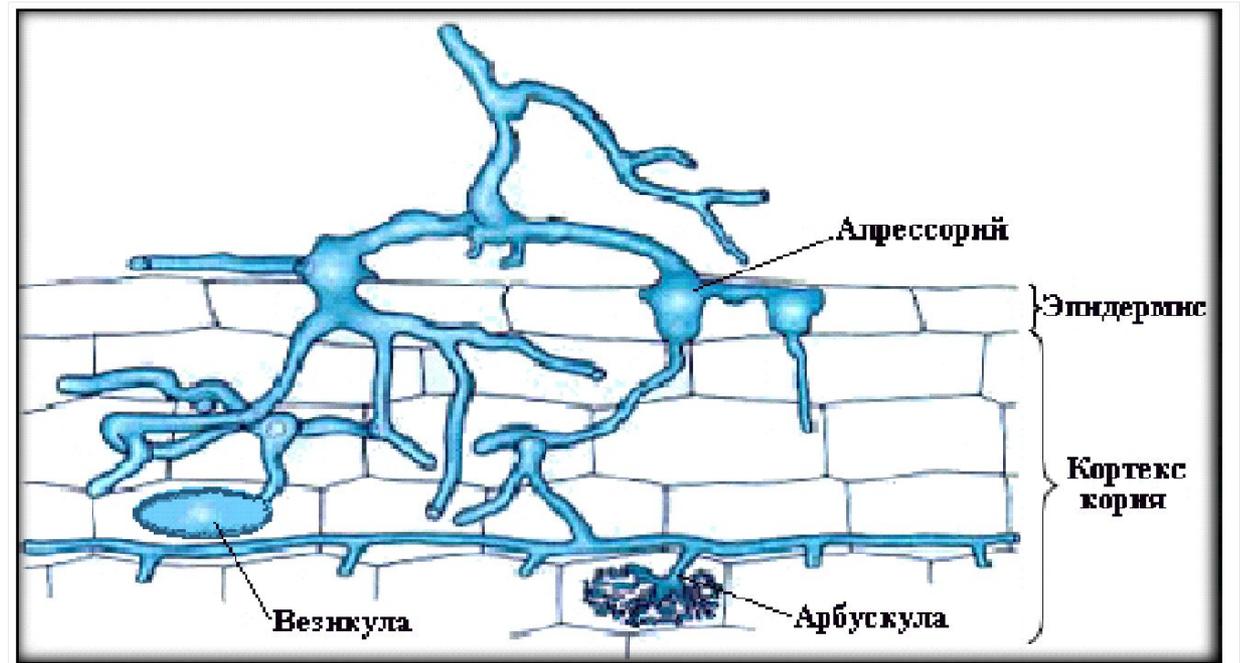


Схема проникновения и развития эндомикоризного гриба в корне (E. Wegel et al., 1998) с ред. Юркова А.П.

- Полагают, что ключевым симбиотическим органом, участвующим в симбиотрофном поступлении фосфора в ткани растения-хозяина, являются арбускулы. АМ гриб при этом получает от растения продукты фотосинтеза. Растение взамен получает фосфор – один из важнейших элементов для питания растений

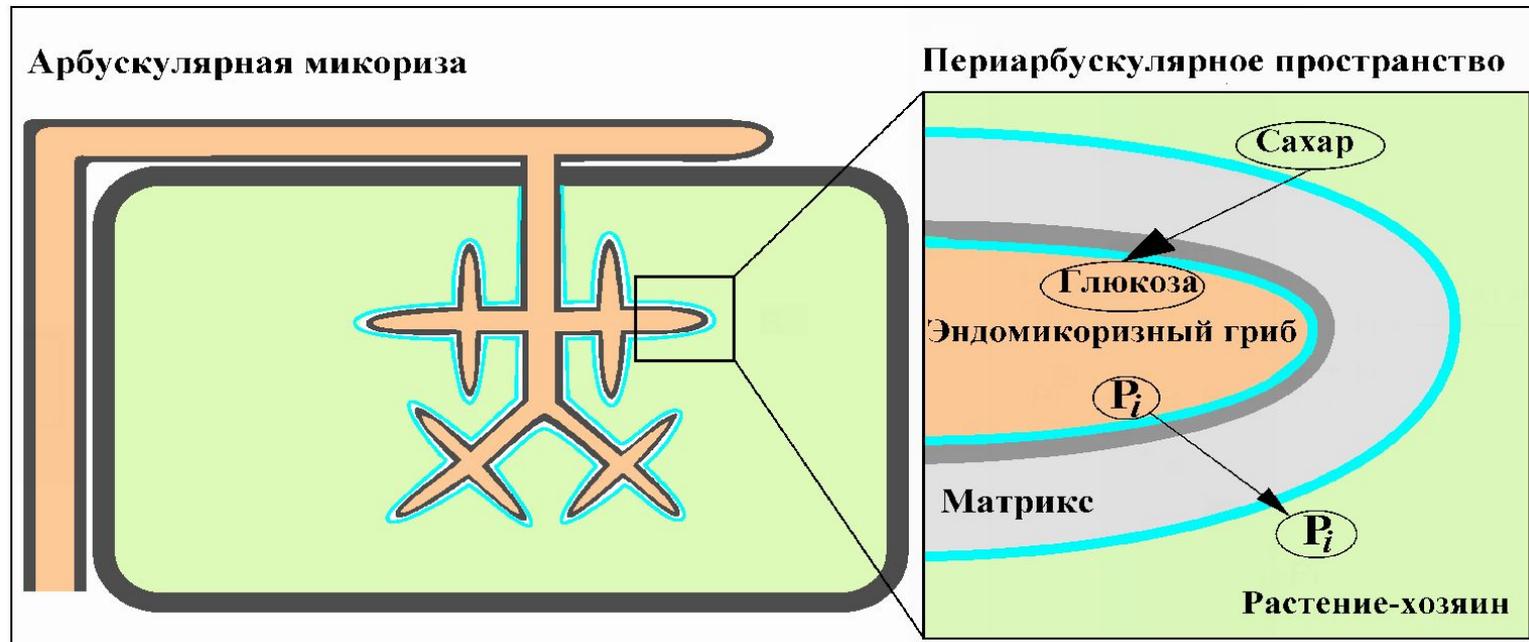


Схема трансмембранного транспорта в арбускулярной микоризе (M. Nahn et al., 2001) с изм. и доп. Юркова А.П.

Применение препаратов грибов арбускулярной микоризы



Повышение
урожайности с/х
культур



Решение
продовольственной
проблемы



Уменьшение
количества
применяемых
химикатов



Получение
экологически чистых
продуктов



Улучшение работы
«зеленых легких»
России



Улучшение
качества
жизни

Культуры, для которых показана достоверная симбиотическая эффективность АМ-инокулята в рамках полевой ГСО*

*Согласно постановлению МСХ
СССР от 05.08.66 во ВНИИСХМ с
1967 г. действует географическая
сеть опытов (ГСО)

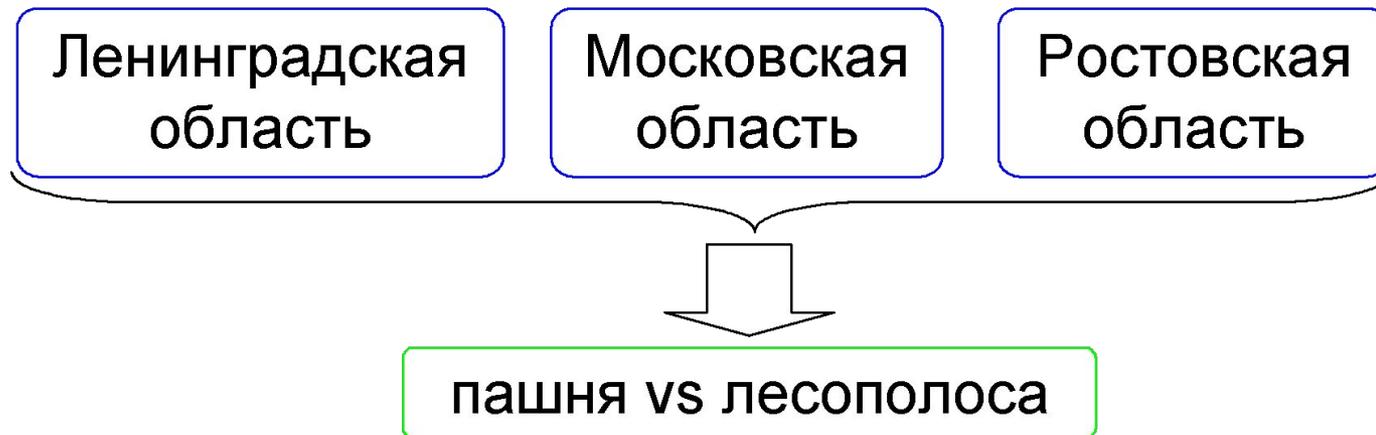
№п/п	Культура (вид)	Сорт	Регион	Опытное поле
1	Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	Спартак, Темп, Фараон	Орловская область	ОГАУ и ВНИИЗБК
2	Люцерна изменчивая (<i>Medicago x varia</i>)	Вега 87, Сорготип С-4-3, Агния	Калининградская, Московская область	Калининградский НИИСХ, ВНИИ кормов
3	Овсяница красная (<i>Festuca rubra</i>)	Сигма	Московская область	ВНИИ кормов
4	Пшеница мягкая (<i>Triticum aestivum</i>)	Московская 39 (озимая)	Московская область	ВНИИ кормов
5	Пшеница мягкая (<i>T. aestivum</i>)	Степная волна (яровая), Новосибирская 29 (яровая)	Алтайский край, Кемеровская область	Алтайский ГАУ
6	Пшеница твердая (<i>T. durum</i>)	Алейская, Алтайский янтарь (яровые)	Алтайский край, Республика Казахстан	Алтайский ГАУ
7	Рис посевной (<i>Oryza sativa</i>)	Хазар, Гарант, Флагман	Краснодарский край	ВНИИ риса
8	Рожь посевная (<i>Secale cereale</i>)	Альфа (озимая)	Новгородская область	Новгородский НИПТИСХ
9	Соя культурная (<i>Glycine max = G. hispida</i>)	Надежда, Солнечная, Спринт	Алтайский край, Ленинградская область	Алтайский ГАУ, СПбГАУ
10	Гексаплоидная тритикале (xTriticosecale Wittmack)	Гермес (озимая)	Новгородская область	Новгородский НИПТИСХ
11	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Сакса без волокна 615	Ленинградская область	ВНИИСХМ
12	Ячмень обыкновенный (<i>Hordeum vulgare</i>)	Сигнал, Нур	Алтайский край, Московская область	Алтайский ГАУ, ЦОС ВНИИА

**Проект “Оценка видового состава и экологической
значимости арбускулярных микоризных грибов
естественных и агроэкосистем
Европейской территории России”**

РФФИ №15-29-02753 офи_м (рук. Юрков А.П.)

Ключевые задачи:

-) выделить и идентифицировать изоляты АМ-грибов до вида или рода из естественных экосистем и агроэкосистем, встречающихся в отдельных регионах ЕТР;
-) оценить их симбиотический потенциал (симбиотическую эффективность), интенсивность роста в условиях различного обеспечения доступного фосфора в почве.



Мировые коллекции грибов арбускулярной микоризы

- 1) International Culture Collection of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM), США <http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification>
- 2) Banque Europeenne des Glomeromycota (BEG), Франция <http://www.i-beg.eu>
- 3) Centre for Mycorrhizal Culture Collection (CMCC), Индия http://mycorrhizae.org.in/cmcc/prod_res.php
- 4) The Glomeromycetes in vitro Collection, Canada (GINCO-Can), Канада <http://www.agr.gc.ca/eng/science-and-innovation/research-centres/ontario/eastern-cereal-and-oilseed-research-centre/the-glomeromycetes-in-vitro-collection/?id=1236786816381>
- 5) Swiss Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (SAF), Швейцария <http://www.agroscope.admin.ch/grandes-cultures-systemes-pastoraux/05911/06653/index.html?lang=en>

.. И мы тоже создаем коллекцию (на данный момент более 150 изолятов, которые требуют идентификации)

Проблемы идентификации грибов арбускулярной микоризы

- облигатный статус АМ-грибов по отношению к растению-хозяину;
- высокий генетический полиморфизм грибов АМ, включая полиморфизм на внутривидовом уровне (в т. ч. участок SSU–ITS1–5.8SrRNA–ITS2–LSU);
- трудность разграничения “популяция” и “особь” для *Glomeromycotina*;
- наличие криптических видов, не различимых по морфологическим признакам

Glomus

Ambispora, Claroideoglomus, Corymbiglomus, Diversispora, Dominikia, Entrophospora, Funneliformis, Kamienskia, Pacispora, Paraglomus, Redeckera, Rhizophagus, Sclerocystis, Septoglomus

Таксономия

отдела

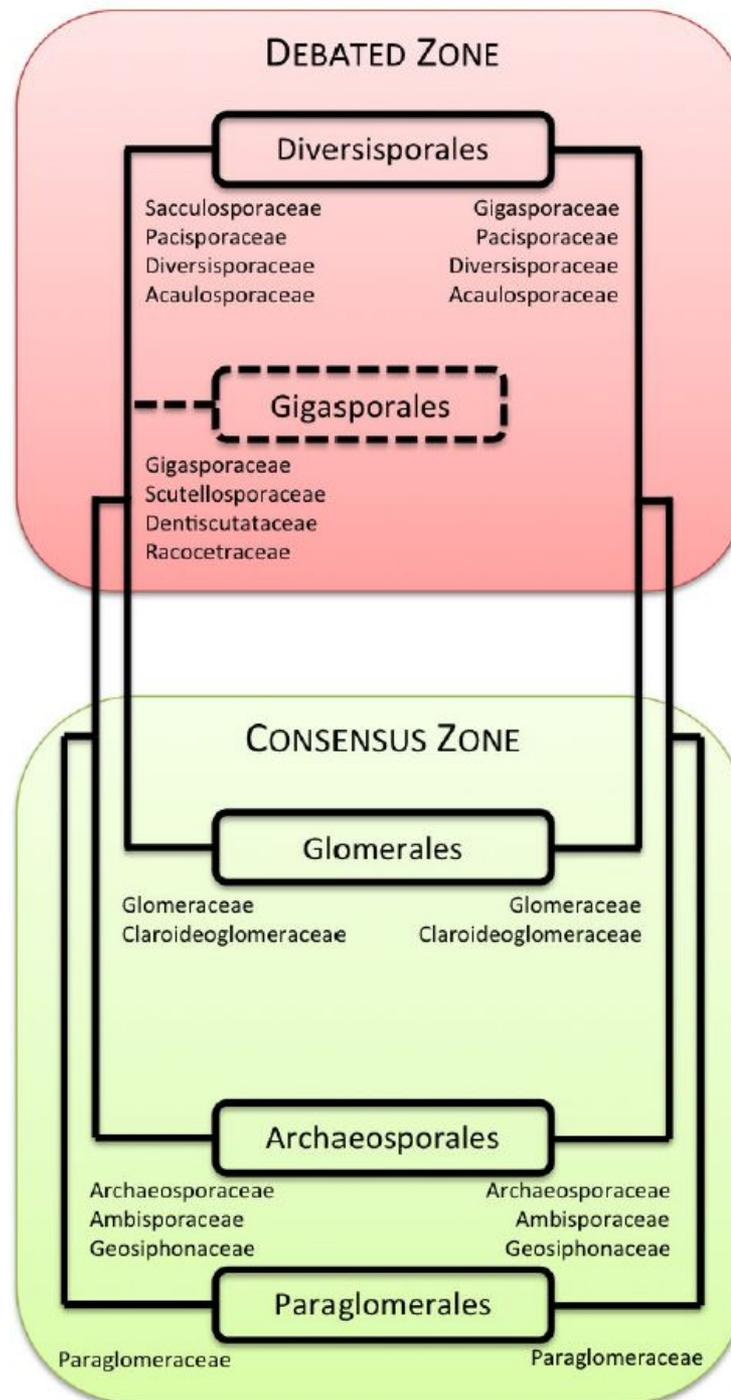
Glomeromycota

В 2016 г. данный отдел преобразован в подотдел Glomeromycotina отдела Мисоромycota

От 120 до 360 видов

Oehl et al.
(2011)
5 orders
14 families
29 genera

Krüger et al.
(2012)
4 orders
10 families
19/20 genera



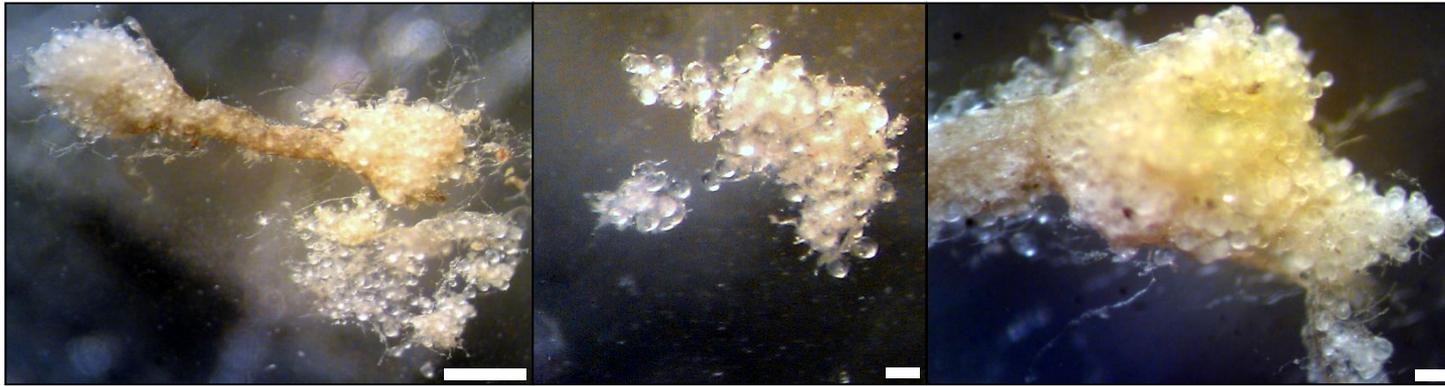
Schüßler A. *Glomeromycota species list*.
Last updated May 1, 2018.
http://www.amf-phylogeny.com/amphylo_species.html

Berruti A., Borriello R., Orgiazzi A. et al.
Arbuscular mycorrhizal fungi and their value for ecosystem management // Biodiversity – The Dynamic Balance of the Planet. Ed. O. Grillo. IntechOpen. 2014. P. 159-192

Пример морфологической идентификации АМ-гриба

По результатам морфологической оценки спор, гиф и симбиотических структур штамм №30 отнесен к виду *Rhizophagus diaphanus* (ранее называемый *Glomus diaphanum* Morton & Walker, 1984; Schenk, Perez, 1988).

Внекорневой спорокарп шт. 30 в воде (на фото слева – спорокарп, образован из омертвевшего корня; на фото по центру – фрагмент внекорневого спорокарпа; на фото справа – фрагмент внутрикорневого спорокарпа)



Масштабная линейка равна 500 мкм (фото слева) и 100 мкм (фото по центру и справа).

Цвет спор в воде: от бесцветных (гиалиновых) и лимонно-кремовых до белых. Внекорневые спорокарпы представляют собой небольшие скопления спор без слизистого материала, количество спор – около 100, образовались из внутрикорневых спорокарпов (числом спор более 1000), формируемых в омертвевших корнях плектрантуса южного (*Plectranthus australis*). Прозрачность спор в воде: прозрачные.

Также фиксируются еще 21 параметр: форма и размеры внекорневых и внутрикорневых спор, цвет, толщина и структура слоев оболочки спор в реактиве Мельцера, цвет, толщина и форма несущих гиф, а также толщина их каналов и наличие септы, видовые особенности у спор, например, изогнутость слоя L3 у места прикрепления, форма и размеры образуемых внутрикорневых структур – арбускул, везикул, мицелия и спор.

В результате морфологического анализа спор, микоризы и спорокарпов проведена идентификация 30 из 65 выделенных штаммов АМ грибов

Видовая принадлежность, координаты отбора 30 штаммов АМ-грибов, определенных по морфологическим признакам спор и спорокарпов

№ п.п.	№ штамма АМ-гриба	Видовое название	Координаты места взятия изолята АМ-гриба	Экоотоп
1	8	<i>Rhizophagus irregularis</i> (Blaszk., Wubet, Renker & Buscot, 2008) C. Walker & A. Schusler comb. nov. (ранее называемый <i>Glomus intraradices</i> N.C. Schenck & G.S. Smith, 1982)	59°20'54" с.ш. (59.348326), 30°6'22" в.д. (30.106014)	пашня
2	30	<i>Rhizophagus diaphanus</i> (C. Cano & Y. Dalpe, 1984) C. Walker & A. Schusler comb. nov. (ранее называемый <i>Glomus diaphanum</i> Morton & Walker, 1984)	58°34' с.ш. (58.566729), 49°41' в.д. (49.683261)	пашня
3	34	<i>Glomus aggregatum</i> Schenck & Smith, 1982 (филогенетическая позиция вида на сегодняшний день неизвестна)*	56°2'34" с.ш. (56.042796), 37°29'22" в.д. (37.489389)	пашня
4	7	<i>Rhizophagus irregularis</i> (Blaszk., Wubet, Renker & Buscot, 2008) C. Walker & A. Schusler comb. nov. (ранее называемый <i>Glomus intraradices</i> N.C. Schenck & G.S. Smith, 1982)	59°43'42" с.ш. (59.728414), 30°23'42" в.д. (30.395095)	залежь, луг
5	32	<i>Glomus invertium</i> Hall, 1977 (по новой классификации <i>Rhizophagus invertium</i> C. Walker, 2016)	54°44'53" с.ш. (54.748038), 25°17'35" в.д. (25.292930)	естественный луг
6	16	<i>Rhizophagus diaphanus</i> (C. Cano & Y. Dalpe) C. Walker & A. Schusler comb. nov. (ранее называемый <i>Glomus diaphanum</i> Morton, 1984)	59°42'59" с.ш. (59.716415), 30°26'7" в.д. (30.435384)	естественный луг
7	31	<i>Funneliformis coronatum</i> (Giovann.) C. Walker & A. Schusler comb. nov. (ранее называемый <i>Glomus coronatum</i> Giovann., 1991)	59°44'12" с.ш. (59.736671), 30°25'46" в.д. (30.429402)	залежь, луг
8	45	<i>Glomus microcarpum</i> Tulasne & Tulasne, 1844	59°44'12" с.ш. (59.736666), 30°25'48" в.д. (30.430097)	залежь, луг
9	76	<i>Glomus microaggregatum</i> Koske, Gemma & Olexia, 1986	60°23'46" с.ш. (60.396126), 29°7'36" в.д. (29.126585)	лес смешанный (сосна, ольха, ель, береза)
10	33	<i>Funneliformis mosseae</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schusler comb. nov. (ранее называемый <i>Glomus mosseae</i> Nicolson & Gerdemann, 1968)	59°44'12" с.ш. (59.736671), 30°25'46" в.д. (30.429402)	залежь, луг
11	153	<i>Rhizophagus irregularis</i> (ранее называемый <i>Glomus intraradices</i> Schenck & Smith, 1982)	46°52'2" с.ш. (46.867095), 40°16'8" в.д. (40.268968)	лесополоса (дуб, клён, ольха)
12	192	<i>Sclerocystis rubiformis</i> (Dalpé, 1984). Синонимы: <i>Glomus rubiforme</i> R.T. Almeida & N.C. Schenck (1990), <i>Sclerocystis indica</i> Bhattacharjee & Mukerji (1980), <i>Sclerocystis pachycaulis</i> C.G. Wu & Z.C. Chen (1986), <i>Glomus pachycaulis</i> C.G. Wu & Z.C. Chen (1986)	56°02'33.80" с.ш. (56.042723), 37°29'13.70" в.д. (37.487128)	естественный луг
13	167	<i>Claroideoglomus etunicatum</i> Becker & Gerd. (ранее называемый <i>Glomus etunicatum</i> W.N. Becker & Gerd., 1977)	56°02'24.30" с.ш. (56.040093), 37°29'20.00" в.д. (37.488888)	пашня (поле овсяницы)
14	160(3)	<i>Rhizophagus irregularis</i> (ранее называемый <i>Glomus intraradices</i> Schenck & Smith, 1982)	46°52'7" с.ш. (46.868531), 40°16'8" в.д. (40.268968)	пашня (поле кукурузы)
15	197	<i>Glomus ambisporum</i> Smith (1985)	56°02'33.80" с.ш. (56.042723), 37°29'13.70" в.д. (37.487128)	естественный луг

Видовая принадлежность, координаты отбора 30 штаммов AM-грибов, определенных по морфологическим признакам спор и спорокарпов (продолжение)

№ п./п.	№ штамма AM-гриба	Видовое название	Координаты места взятия изолята AM-гриба	Эколог
16	183	<i>Rhizophagus fasciculatus</i> (ранее называемый <i>Glomus fasciculatum</i> Gerd. & Trappe, 1974; переименованный в <i>G. fasciculatus</i> Walker & Koske, 1987)	56°02'35.30" с.ш. (56.043130), 37°29'16.40" в.д. (37.487892)	лес широколиственный (дуб, липа, клен и береза)
17	194	<i>Glomus hoi</i> S.M. Berch & Trappe (1985). Синоним: <i>Simiglomus hoi</i> G.A. Silva, F. Oehl & E. Sieverding (2011)	56°02'33.80" с.ш. (56.042723), 37°29'13.70" в.д. (37.487128)	естественный луг
18	166	<i>Dominikia minuta</i> Blaszk., Chwat & Kovács (2014), ранее называемый <i>Glomus minutum</i> Blaszk., Tadych & Madej (2000)	46°52'7" с.ш. (46.868531), 40°16'8" в.д. (40.268968)	пашня (поле кукурузы)
19	178	<i>Glomus aggregatum</i> Schenck & Smith, 1982 (филогенетическая позиция вида на сегодняшний день неизвестна)*	56°02'35.30" с.ш. (56.043130), 37°29'16.40" в.д. (37.487892)	лес широколиственный (дуб, липа, клен и береза)
20	190	<i>Glomus microaggregatum</i> Koske, Gemma & Olexia (1986)	56°02'33.80" с.ш. (56.042723), 37°29'13.70" в.д. (37.487128)	естественный луг
21	243	<i>Rhizophagus intraradices</i> (ранее называемый <i>Glomus intraradices</i> Schenck & Smith, 1982)	56°02'31.40" с.ш. (56.042059), 37°29'17.60" в.д. (37.488215)	пашня (поле люцерны)
22	247	<i>Rhizophagus irregularis</i> (ранее относимый к виду <i>Glomus intraradices</i> Schenck & Smith, 1982)	56°02'31.40" с.ш. (56.042059), 37°29'17.60" в.д. (37.488215)	пашня (поле люцерны)
23	241	<i>Rhizophagus fasciculatus</i> (ранее называемый <i>Glomus fasciculatum</i> Gerd. & Trappe, 1974; переименованный в <i>G. fasciculatus</i> Walker & Koske, 1987) (Schuessler, Walker, 2010)	56°02'24.30" с.ш. (56.040093), 37°29'20.00" в.д. (37.488888)	пашня (поле овсяницы)
24	248	<i>Paraglomus laccatum</i> Renker, Blaszk. & Buscot (ранее называемый <i>Glomus laccatum</i> Blaszk., 1988) (Renker et al., 2007; Blaszkowski, 1988)	56°02'31.40" с.ш. (56.042059), 37°29'17.60" в.д. (37.488215)	пашня (поле люцерны)
25	244	<i>Glomus microaggregatum</i> Koske, Gemma & Olexia, 1986)	56°02'35.30" с.ш. (56.043130), 37°29'16.40" в.д. (37.487892)	лес широколиственный (дуб, липа, клен и береза)
26	249	<i>Rhizophagus diaphanus</i> (ранее называемый <i>Glomus diaphanum</i> Morton & Walker, 1984; Schenk, Perez, 1988)	56°02'31.40" с.ш. (56.042059), 37°29'17.60" в.д. (37.488215)	пашня (поле люцерны)
27	237	<i>Glomus microcarpum</i> Tulasne & Tulasne, 1844 [Tulasne L.R., Tulasne C. 1844)	56°02'35.30" с.ш. (56.043130), 37°29'16.40" в.д. (37.487892)	лес широколиственный (дуб, липа, клен и береза)
28	233	<i>Rhizophagus diaphanus</i> (ранее называемый <i>Glomus diaphanum</i> Morton & Walker, 1984; Schenk, Perez, 1988)	56°02'24.30" с.ш. (56.040093), 37°29'20.00" в.д. (37.488888)	пашня (поле овсяницы)
29	211	<i>Rhizophagus irregularis</i> (ранее называемый <i>Glomus intraradices</i> Schenck & Smith, 1982)	46°52'22" с.ш. (46.867095), 40°16'78" в.д. (40.268968)	лесополоса (дуб, клен, ольха)
30	226	<i>Rhizophagus intraradices</i> (ранее называемый <i>Glomus intraradices</i> Schenck & Smith, 1982)	46°52'22" с.ш. (46.867095), 40°16'78" в.д. (40.268968)	лесополоса (дуб, клен, ольха)

Активность развития изолятов АМ-грибов в корнях плектрантуса южного по данным показателей микоризации на 90 сут от посадки (ранжирование по виду)	№ п./п.	№ штамма АМ-гриба	Видовое название	F, %	M, %	m, %	A, %	a, %	B, %	b, %
Встречаемость микоризной инфекции (F), интенсивность микоризации в корне и в микоризе (M и m), обилие арбускул (A и a) и везикул (B и b) в корне и в микоризе. "?" - видовое название уточняется.	1	204	<i>Acaulospora paulinae</i>	98,1	51,3	52,3	32,4	63,2	12,4	24,2
	2	167	<i>Claroideoglossum etunicatum</i>	64,0	25,3	33,0	15,8	35,5	0,6	3,3
	3	166	<i>Dominikia minuta</i>	65,1	27,1	41,3	16,2	63,2	6,3	21,5
	4	69	<i>Funneliformis badium ?</i>	76,6	44,0	56,6	20,2	47,5	9,9	21,9
	5	31	<i>Funneliformis coronatum</i>	1,8	0,5	21,6	0,3	33,4	0,02	3,0
	6	33	<i>Funneliformis mosseae</i>	3,7	1,8	16,7	0,7	12,2	0,0	0,0
	7	34	<i>Glomus aggregatum</i>	18,4	11,0	52,0	7,3	82,2	2,9	19,9
	8	178	<i>Glomus aggregatum</i>	81,6	41,1	50,2	9,0	21,8	26,4	61,9
	9	67	<i>Glomus aggregatum ?</i>	74,6	49,6	65,3	30,0	61,0	21,4	41,9
	10	71	<i>Glomus aggregatum ?</i>	2,3	1,0	14,5	0,7	24,0	0,1	3,4
	11	197	<i>Glomus ambisporum</i>	86,6	41,3	47,5	24,6	55,6	7,4	17,2
	12	84	<i>Glomus ambisporum ?</i>	23,4	9,9	34,3	7,1	59,5	0,5	3,9
	13	194	<i>Glomus hoi</i>	83,2	38,7	46,2	30,1	77,8	21,2	50,8
	14	32	<i>Glomus invermaium</i>	37,5	15,8	39,8	11,5	70,2	2,2	11,3
	15	11	<i>Glomus invermaium</i>	17,9	5,5	16,4	3,7	40,0	2,1	19,1
	16	76	<i>Glomus microaggregatum</i>	63,0	22,0	35,4	12,8	59,2	0,2	0,9
	17	190	<i>Glomus microaggregatum</i>	27,3	8,6	31,3	4,0	46,2	0,0	0,0
	18	244	<i>Glomus microaggregatum</i>	95,7	35,8	37,4	13,0	36,4	25,2	70,3
	19	45	<i>Glomus microcarpum</i>	0,5	0,2	16,1	0,1	16,2	0,02	3,2
	20	237	<i>Glomus microcarpum</i>	59,0	19,1	32,4	8,2	43,1	0,0	0,0
	21	248	<i>Paraglomus laccatum</i>	23,3	7,6	32,4	3,4	44,4	0,7	8,9
22	92	<i>Paraglomus laccatum ?</i>	66,4	31,3	48,0	18,3	58,5	4,7	16,4	
Зеленые ячейки со значениями достоверно не отличающимися от максимального (P<0.05), серые - достоверно не отличающимися от минимального (P<0.05).	23	16	<i>Rhizophagus diaphanus</i>	94,2	54,8	58,0	33,8	61,6	11,0	19,6
	24	30	<i>Rhizophagus diaphanus</i>	69,9	34,4	47,9	11,0	33,8	3,0	8,8
	25	233	<i>Rhizophagus diaphanus</i>	66,3	32,0	48,2	10,9	34,2	15,1	47,4
	26	249	<i>Rhizophagus diaphanus</i>	90,0	23,5	26,1	14,3	60,8	7,0	29,8
	27	183	<i>Rhizophagus fasciculatus</i>	17,2	2,4	14,0	0,6	24,8	0,5	21,1
	29	241	<i>Rhizophagus fasciculatus</i>	92,9	37,9	40,9	16,1	42,4	19,4	51,1
	30	86	<i>Rhizophagus intraradices</i>	72,9	42,8	57,6	25,4	59,0	10,6	25,4
	31	226	<i>Rhizophagus intraradices</i>	68,8	25,5	37,0	17,3	68,0	5,3	20,9
	32	243	<i>Rhizophagus intraradices</i>	74,3	25,6	34,4	17,1	66,9	10,4	40,7
	33	14	<i>Rhizophagus intraradices ?</i>	81,2	46,0	57,2	27,8	59,5	7,1	15,1
	34	50	<i>Rhizophagus intraradices ?</i>	0,9	0,3	9,3	0,1	16,2	0,0	0,0
	35	54	<i>Rhizophagus intraradices ?</i>	56,1	32,1	38,1	23,5	49,5	8,0	17,1

Активность развития изолятов АМ-грибов в корнях плектрантуса южного по данным показателей микоризации на 90 сут от посадки (ранжирование по виду)

Встречаемость микоризной инфекции (F), интенсивность микоризации в корне и в микоризе (M и m), обилие арбускул (A и a) и везикул (B и b) в корне и в микоризе.
 “?” - видовое название уточняется.
Зеленые ячейки со значениями достоверно не отличающимися от максимального (P<0.05),
серые - достоверно не отличающимися от минимального (P<0.05).

№ п./п.	№ штамма АМ-гриба	Видовое название	F, %	M, %	m, %	A, %	a, %	B, %	b, %
36	58	<i>Rhizophagus intraradices</i> ?	69,5	38,1	54,8	20,7	53,8	12,0	31,2
37	8	<i>Rhizophagus irregularis</i>	75,5	45,0	58,3	25,1	51,9	12,9	29,4
38	153	<i>Rhizophagus irregularis</i>	91,4	38,3	41,6	9,9	23,6	21,6	57,2
39	160(3)	<i>Rhizophagus irregularis</i>	81,4	45,3	54,6	0,2	0,6	40,7	89,2
40	168	<i>Rhizophagus irregularis</i>	84,9	58,4	68,8	0,0	0,0	49,4	84,7
41	156	<i>Rhizophagus irregularis</i>	93,0	42,5	45,6	14,5	35,4	9,8	22,6
42	176	<i>Rhizophagus irregularis</i> ?	90,5	38,6	42,7	3,2	8,3	17,6	45,7
28	177	<i>Rhizophagus irregularis</i>	78,1	37,4	47,9	21,9	52,1	27,0	68,2
43	211	<i>Rhizophagus irregularis</i>	86,3	34,8	40,3	13,8	39,7	12,2	35,1
44	247	<i>Rhizophagus irregularis</i>	68,6	26,8	39,0	17,4	64,8	4,0	14,8
45	23	<i>Rhizophagus irregularis</i> ?	78,4	41,2	51,6	24,7	58,9	11,1	27,1
46	52	<i>Rhizophagus irregularis</i> ?	83,3	47,5	57,0	20,4	42,4	14,2	29,6
47	56	<i>Rhizophagus irregularis</i> ?	52,1	24,5	44,3	15,3	62,5	5,6	19,0
48	60	<i>Rhizophagus irregularis</i> ?	78,3	46,0	58,6	22,7	49,3	11,1	22,5
49	192	<i>Sclerocystis rubiformis</i>	52,6	15,4	27,8	8,6	44,2	1,8	7,9
50	78	<i>Sclerocystis rubiformis</i> ?	58,9	25,3	42,2	12,5	47,2	0,2	1,1
51	200	идентифицируется	65,6	24,3	35,9	18,0	73,2	10,0	33,0
52	202	-/-	87,1	55,6	64,2	38,8	70,8	44,5	81,0
53	208	-/-	88,8	51,6	57,9	37,0	73,4	36,1	71,7
54	206	-/-	89,7	44,4	49,6	21,8	49,0	16,1	36,2
55	210	-/-	23,2	8,1	35,0	5,8	71,1	0,0	0,0
56	213	-/-	72,5	34,1	47,0	26,4	77,4	8,8	25,8
57	215	-/-	8,0	0,6	7,1	0,1	8,9	0,2	27,2
58	218	-/-	56,3	16,2	28,7	6,0	37,3	5,7	35,5
59	220	-/-	91,4	32,9	36,0	16,3	49,6	13,4	40,6
60	229	-/-	71,3	31,1	43,6	16,3	52,5	17,7	56,9
61	231	-/-	68,8	32,3	47,0	11,9	36,9	17,5	54,1
62	240	-/-	90,0	33,7	37,4	7,0	20,9	8,0	23,7
63	224	-/-	68,6	33,5	48,9	8,5	25,4	24,3	72,5
64	198	-/-	93,2	51,8	55,6	43,4	83,8	49,1	94,8
65	209	-/-	88,8	40,2	45,3	16,8	41,7	14,4	35,9
	Среднее значение		63,7	29,9	41,6	15,0	46,7	11,7	30,4
	Макс. значение		98,1	58,4	68,8	43,4	83,8	49,4	94,8
	Мин. значение		0,5	0,2	7,1	0,0	0,0	0,0	0,0

Система тестирования
симбиотической
эффективности грибов
арбускулярной
микоризы

Самоопылитель,
диплоид ($2n=16$),
размер генома ~ 500 Мб,
высокая семенная
продуктивность
до 2500 семян с растения,
короткий ЖЦ (однолетник)

Исходная линия MIS-1 *Medicago lupulina*
L. var. vulgaris Koch, выращенная на
почве с низким уровнем Рд с инокуляцией
(+AM) и без инокуляции (-AM) грибом
Rhizophagus irregularis штаммом 8
(= шт. RCAM00320)
(Юрков, Якоби, 2011)

Селектированная
облигатно
микотрофная
линия MIS-1
Medicago lupulina L.

70-е сут
от посадки



КОНТРОЛЬ

ИНОКУЛЯЦИЯ

Коэффициенты корреляции между параметрами активности и эффективности штаммов АМ-грибов различного происхождения

	F	F _{безР}	F _{+Р}	Эh _{безР}	Эh _{+Р}	Эw _{безР}	Эw _{+Р}	Вид	ЭкостоП
F	1	0,46	0,32	0,72	0,44	0,83	0,43	0,61	-0,14
F _{безР}	0,46	1	0,79	0,75	0,64	0,72	0,61	0,28	0,35
F _{+Р}	0,32	0,79	1	0,43	0,68	0,46	0,62	0,27	0,33
Эh _{безР}	0,72	0,75	0,43	1	0,53	0,95	0,48	0,53	0,22
Эh _{+Р}	0,44	0,64	0,68	0,53	1	0,57	0,96	0,12	0,33
Эw _{безР}	0,83	0,72	0,46	0,95	0,57	1	0,56	0,57	0,23
Эw _{+Р}	0,43	0,61	0,62	0,48	0,96	0,56	1	0,07	0,31
Вид	0,61	0,28	0,27	0,53	0,12	0,57	0,07	1	-0,17
ЭкостоП	-0,14	0,35	0,33	0,22	0,33	0,23	0,31	-0,17	1

Жирным шрифтом выделены существенные по *t*-критерию на 5%-ном уровне значимости значения коэффициентов корреляции. “Вид” – порядковый номер вида АМ-гриба (виды пронумерованы в порядке возрастания по алфавиту, способ ранжирования при этом не влияет на итоговую корреляцию), “Экотоп” – порядковый номер экотопа, из которого был выделен изолят АМ-гриба (номер экотопа рассчитан по возрастанию степени антропогенной нагрузки: 1 – лес, 2 – лесополоса, 3 – естественный луг, 4 – залежь, 5 – пашня.). “F” – встречаемость АМ в корнях *P. australis* R.Br.; “F_{безР}” и “F_{+Р}” – встречаемость АМ в корнях *M. lupulina* L. при низком (“безР”) и среднем (“+Р”) уровне Рд в почве, соответственно; “Эh_{безР}”, “Эh_{+Р}”, “Эw_{безР}” и “Эw_{+Р}” – эффективность АМ, рассчитанная по средней высоте (h – “height”) и сухому весу (w – “weight”) надземных частей растений *M. lupulina* при низком и среднем уровне Рд в почве, соответственно.

Выводы:

- 1) Наиболее существенным параметром, определяющим формирование эффективной АМ на растениях, является F - встречаемость АМ в корнях накопительной культуры.
- 2) При среднем уровне Рд в почве (7мг Р2О5 /100 г почвы) все показатели корреляции снижаются относительно варианта с низким уровнем Рд в почве.
- 3) В условиях низкого Рд в почве неэффективными штаммами были 8 из 25 проанализированных штаммов, относящиеся к родам *Glomus* и *Funneliformis*, в условиях среднего Рд – *Glomus* и *Sclerocystis*, т.е. штаммы рода *Funneliformis* переходят в группу эффективных. Все грибы родов *Rhizophagus* и *Paraglomus* были эффективными на обоих фонах Рд.

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 532.281 : 581.557.24 : 57.083.18

© А. А. Крюков,¹ А. П. Юрков^{1, 2, 3}

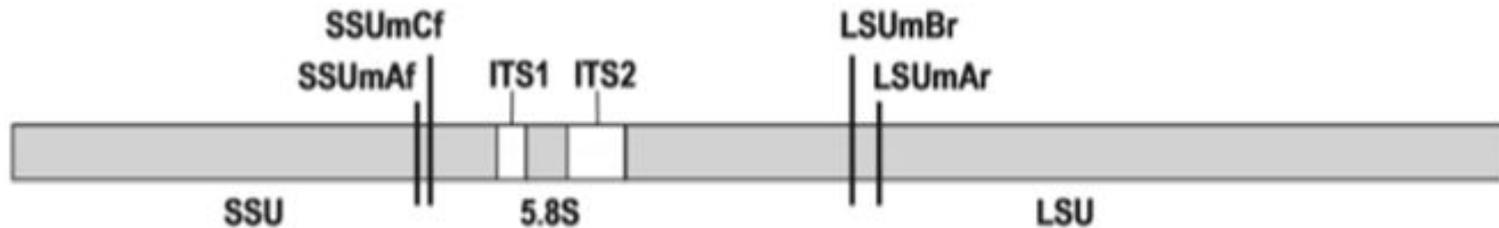
ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕДУРЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ В СИМБИОТИЧЕСКУЮ ФАЗУ НА ПРИМЕРЕ ДВУХ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ

KR YUKOV A. A., YURKOV A. P. OPTIMIZATION PROCEDURES FOR MOLECULAR-GENETIC IDENTIFICATION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN SYMBIOTIC PHASE ON THE EXAMPLE OF TWO CLOSELY KINDRED STRAINS

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербурге, Россия² Российский государственный гидрометеорологический университет, Санкт-Петербург, Россия³ Санкт-Петербургский государственный университет, Россия¹ All-Russia research institute for agricultural microbiology, St. Petersburg, Russia² Russian State Hydrometeorological university, St. Petersburg, Russia³ Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia
rainniar@rambler.ru

Объектом исследования являются грибы арбускулярной микоризы (АМ) отдела *Glomeromycota*. В работе решаются проблемы молекулярной идентификации АМ грибов, связанные с высоким межвидовым и внутривидовым полиморфизмом генетического материала, а также со сложностью выделения чистых препаратов ДНК грибов АМ в связи с их высокой зависимостью в развитии от растения-хозяина, что не позволяет поддерживать и исследовать грибы АМ на искусственных средах. Для решения этих проблем проводится подбор маркерных участков генома для молекулярной идентификации и специфических праймеров к ним, подбор оптимальных способов процедуры выделения, амплификации и клонирования ДНК АМ грибов. Анализ литературных данных показал, что наиболее часто в последние годы исследуемым маркерным участком генома грибов АМ для идентификации до вида является регион SSU—ITS1—5.8SrRNA—ITS2—LSU. Методика изучения филогении АМ грибов претерпела значительные изменения, в последние годы проведено перестроение всей системы отдела *Glomeromycota*. В частности, широко известным тестовым видом АМ гриба во многих исследованиях растительно-микробных взаимодействий являлся вид *Glomus intraradices*, штаммы которого в настоящее время попадают в два вида: *Rhizophagus irregularis* и *R. intraradices*. Два основных тестовых штамма коллекции ВНИИСХМ были отнесены по морфологическим признакам к *Glomus intraradices*. В связи с этим целью настоящего исследования является подбор оптимальной процедуры выделения ДНК АМ грибов, амплификации маркерных участков и подготовки их к секвенированию в симбиотическую фазу с последующей молекулярно-генетической идентификацией двух штаммов, ранее отнесенных к виду *G. intraradices*. Впервые в России проведена работа по оптимизации процедуры молекулярно-генетической идентификации АМ грибов в симбиотическую фазу. В результате были оптимизированы следующие процедуры: 1) для улучшения растирания материала перед выделением ДНК из микоризованных корней необходимо избавиться от излишков влаги просушиванием в твердотельном термостате; 2) для снижения потерь ДНК АМ гриба при разрушении материала лучше использовать гомогенизатор, чем проводить растирание в жидком азоте; 3) для более качественного осаждения ДНК АМ грибов лучше использовать изопропанол, чем этиловый спирт; 4) для более высокого выхода ДНК во время ее осаждения желательно вымораживать пробы при -20°C в течение 12—24 ч, чем сразу проводить финальное осаждение; 5) для получения амплификатов ДНК АМ грибов необходимо использовать специфические праймеры, универсальные праймеры же можно использовать только при секвенировании; 6) оптимальные условия ПЦР для ДНК АМ грибов определяются более высоким количеством циклов (35—40 циклов против стандартных в таких случаях 30—35) и более длительной элонгацией (для фрагмента 1500—1800 п. н. — 2—2.5 мин против стандартных 1.5—2 мин) со стандартной Taq-полимеразой; 7) для повышения вероятности получения читаемых сиквенсов желательно про-

Молекулярно-генетическая идентификация АМ-грибов



First PCR (1.8 kb)

SSUmAf1 TGGGTAATCTTTTGAAACTTYA
 SSUmAf2 TGGGTAATCTTRTGAAACTTCA
 LSUmAr1 GCTCACACTCAAATCTATCAAA
 LSUmAr2 GCTCTAACTCAATTCTATCGAT
 LSUmAr3 TGCTCTTACTCAAATCTATCAAA
 LSUmAr4 GCTCTTACTCAAACCTATCGA

Nested PCR (1.5 kb)

SSUmCf1 TCGCTCTTCAACGAGGAATC
 SSUmCf2 TATTGTTCTTCAACGAGGAATC
 SSUmCf3 TATTGCTCTTNAACGAGGAATC
 LSUmBr1 DAACACTCGCATATATGTTAGA
 LSUmBr2 AACACTCGCACACATGTTAGA
 LSUmBr3 AACACTCGCATAACATGTTAGA
 LSUmBr4 AAACACTCGCACATATGTTAGA
 LSUmBr5 AACACTCGCATATATGCTAGA

Krüger, M., Stockinger H., Krüger C., Schübler A. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. // *New Phytology*. 2009. V. 183. P. 212-223.

Результат идентификации из микоризованных корней плектрантуса южного – накопительной культуры АМ-грибов

Штамм	Вид
7	<i>Rhizophagus irregularis</i>
8 (=RCAM00320)	<i>Rhizophagus irregularis</i>

Крюков А.А., Юрков А.П. Оптимизация процедуры молекулярно-генетической идентификации грибов арбускулярной микоризы в симбиотическую фазу на примере двух близкородственных штаммов. // *Микология и фитопатология*. 2018. Т. 52. № 1. С. 38-48.

Проблема: Выделение ДНК АМ-грибов осложнено ее низким содержанием в пробе, а также наличием ДНК растения-хозяина.

Решение: Применение колонок Dynabeads позволит выделять ДНК из одной споры.

Дополнительный раунд вложенной ПЦР предотвратит контаминацию.

В качестве ДНК-маркеров для идентификации видов АМ-грибов за последние 10 лет использовались несколько участков ядерного и митохондриального геномов.

участки из кластера генов 35S рРНК генома ядра (участки генов 18S и 26/28S рДНК, районы ITS1 и ITS2, 5.8S рДНК),

ген LSU митохондриальной рРНК,

гены RPB1 и RPB2 субъединиц I и II РНК полимеразы II,

ген PTG — фосфатный транспортер,

ген H⁺ АТФазы,

ген β-тубулина,

а также генов, кодирующих фактор элонгации 1-альфа (EF 1-α).

Известна и попытка использовать в качестве ДНК-штрихкода АМ-грибов ген COX1 (митохондриальный ген, кодирующий субъединицу I цитохром с-оксидазы)

Основные используемые для идентификации АМ грибов праймеры и амплифицируемые фрагменты

Прямой праймер (ссылка)	Последовательность прямого праймера	Обратный праймер (ссылка)	Последовательность обратного праймера	Амплифицируемый фрагмент
NS31 (Simon et al., 1992)	TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC	AM1 (Helgason et al., 1998)	GTTTCCCCTAAGGCGCCGAA	SSU
AMV4.5NF (Sato et al., 2005)	AAGCTCGTAGTTGAATTTTCG	AMDGR (Sato et al., 2005)	CCCAACTATCCCTATTAATCAT	SSU
AML1 (Lee et al., 2008)	ATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGA	AML2 (Lee et al., 2008)	GAACCCAAACACTTTGGTTTCC	SSU
GeoA1 (Schwarzott, Schüsler, 2001)	GGTTGATCCTGCCAGTAGTC	ART4 (Schwarzott, Schüsler, 2001)	TCCGCAGGTTACCTACGG	SSU
NS1 (White et al., 1990)	GTAGTCATATGCTTGTCTC	Geo10 (Schwarzott, Schüsler, 2001)	ACCTTGTTACGACTTTTACTTC	SSU
GeoNS1 (Schwarzott, Schüsler, 2001)	ATGGCTCATTAATCAGTTAT			
GeoA2 (Schwarzott, Schüsler, 2001)	CCAGTAGTCATATGCTTGTCTC	Geo11 (Schwarzott, Schüsler, 2001)	ACCTTGTTACGACTTTTACTTCC	SSU
ITS1F (Gardes, Bruns, 1993)	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	GLOM5.8R (Redecker, 2000)	TCCGTTGTTGAAAGTGATC	SSU—ITS1—5.8S
		GIGA5.8R (Redecker, 2000)	ACTGACCCTCAAGCAKGTG	
		Различные варианты		5.8S—ITS2—LSU
ITS70 (Ihrmark et al., 2012)	GTG AAT CAT CRA ATY TTT	FLR4 (Golotte et al., 2004)	TACGTCAACATCCTTAACGAA	LSU
FLR3 (Golotte et al., 2004)	TTGAAAGGGAAACGATTGAAGT	NDL22 (van Tuinen et al., 1998)	TGGTCCGTGTTTCAAGACG	LSU
Glo454 (Lekberg et al., 2012)	TGAAAGGGAAACGATTGAAGT	Различные варианты		LSU
LR1 (Stockinger et al., 2010)	GCATATCAATAAGCGGAGGA	ITS4 (White et al., 1990)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	SSU—ITS—LSU (обратный праймер на границе с ITS)
NS5 (White et al., 1990)	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG			
ARCH1311 (Redecker, 2000)	TGCTAAATAGCTAGGCTGY			
ACAU1660 (Redecker, 2000)	TGAGACTCTCGGATCGGG			
LETC1670 (Redecker, 2000)	GATCGGCGATCGGTGAGT			
GLOM1310 (Redecker, 2000)	AGCTAGGCTTAACATTGTTA			
Различные варианты		LR4+2 (Stockinger et al., 2009)	ACCAGAGTTTCTCTGGCT	SSU—ITS—LSU
SSUmAf1 (Krüger et al., 2009)	TGGGTAATCTTTTGAACCTTYA	LSumAr1 (Krüger et al., 2009)	GCTCACACTCAAATCTATCAAA	SSU—ITS—LSU, 1
SSUmAf2 (Krüger et al., 2009)	TGGGTAATCTTRTGAAACTTCA	LSumAr2 (Krüger et al., 2009)	GCTCTAACTCAATTCTATCGAT	
		LSumAr3 (Krüger et al., 2009)	TGCTCTTACTCAAATCTATCAAA	
		LSumAr4 (Krüger et al., 2009)	GCTCTTACTCAAACCTATCGA	
SSUmCf1 (Krüger et al., 2009)	TCGCTCTTCAACGAGGAATC	LSumBr1 (Krüger et al., 2009)	DAACACTCGCATATATGTTAGA	SSU—ITS—LSU, 2
SSUmCf2 (Krüger et al., 2009)	TATTGTTCTTCAACGAGGAATC	LSumBr2 (Krüger et al., 2009)	AACACTCGCACACATGTTAGA	
SSUmCf3 (Krüger et al., 2009)	TATTGCTCTTNAACGAGGAATC	LSumBr3 (Krüger et al., 2009)	AACACTCGCATAACATGTTAGA	
		LSumBr4 (Krüger et al., 2009)	AAACACTCGCACATATGTTAGA	
		LSumBr5 (Krüger et al., 2009)	AACACTCGCATATATGCTAGA	
GlomerWT0 (Wubet et al., 2006)	CGATGDWTCATTCAAATTTCTGCC	Glomer1536 (Wubet et al., 2006)	RTTGCAATGCTCTATCCCCA	SSU—ITS—LSU, 1
		GlomerWT2 (Wubet et al., 2006)	CAAACCTCCATCGGTTARACACCG	SSU—ITS—LSU, 2
SSU-Glom1 (Renker et al., 2003)	ATTACGTCCCTGCCCTTTGTACA	LSUGlom1 (Renker et al., 2003)	CTTCAATCGTTTCCCTTTCA	SSU—ITS—LSU
M13 (Helicon) прямой	GTAAAACGACGGCCAGT	M13 (Helicon) обратный	CAGGAAACAGCTATGAC	Праймеры на плазмиду по флангам встраиваемого фрагмента

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРИБОВ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ

© А.П. Юрков^{1,2,3}, А.А. Крюков¹, А.О. Горбунова^{1,2}, А.П. Кожемяков¹, Г.В. Степанова⁴, Э.М. Мачс⁵,
А.В. Родионов^{2,5}, М.Ф. Шишова²

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»,
Санкт-Петербург;

²ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург;

³ФГБОУ «Российский государственный гидрометеорологический университет», Санкт-Петербург;

⁴Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса, Лобня Московской обл.;

⁵Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург

Для цитирования: Юрков А.П., Крюков А.А., Горбунова А.О., и др. Молекулярно-генетическая идентификация грибов арбускулярной микоризы // Экологическая генетика. – 2018. – Т. 16. – № 2. – С. 11–23. doi: 10.17816/ecogen16211-23.

Поступила в редакцию: 19.03.2018

Принята к печати: 18.06.2018

✿ Арбускулярная микориза (АМ) представляет собой широко распространенный симбиоз, который формируется большинством наземных растений с грибами подотдела *Glomeromycotina*. Одной из основных проблем в изучении АМ-грибов является сложность их идентификации, связанная с высоким внутри- и межвидовым генетическим полиморфизмом, а также с облигатным статусом АМ-грибов по отношению к растению-хозяину. Методология идентификации АМ-грибов постоянно претерпевает серьезные изменения. В обзоре дан анализ оптимальных методов молекулярно-генетической идентификации АМ-грибов. Рассматриваются этапы пробоподготовки, обсуждаются выбор маркерных участков, подбор праймеров и различные методы амплификации, включая применение вложенной ПЦР. Анализируется и обосновывается перспективность методов клонирования и секвенирования нового поколения в применении к идентификации АМ-грибов.

✿ **Ключевые слова:** *Glomeromycotina*; арбускулярная микориза; секвенирование нового поколения; NGS.

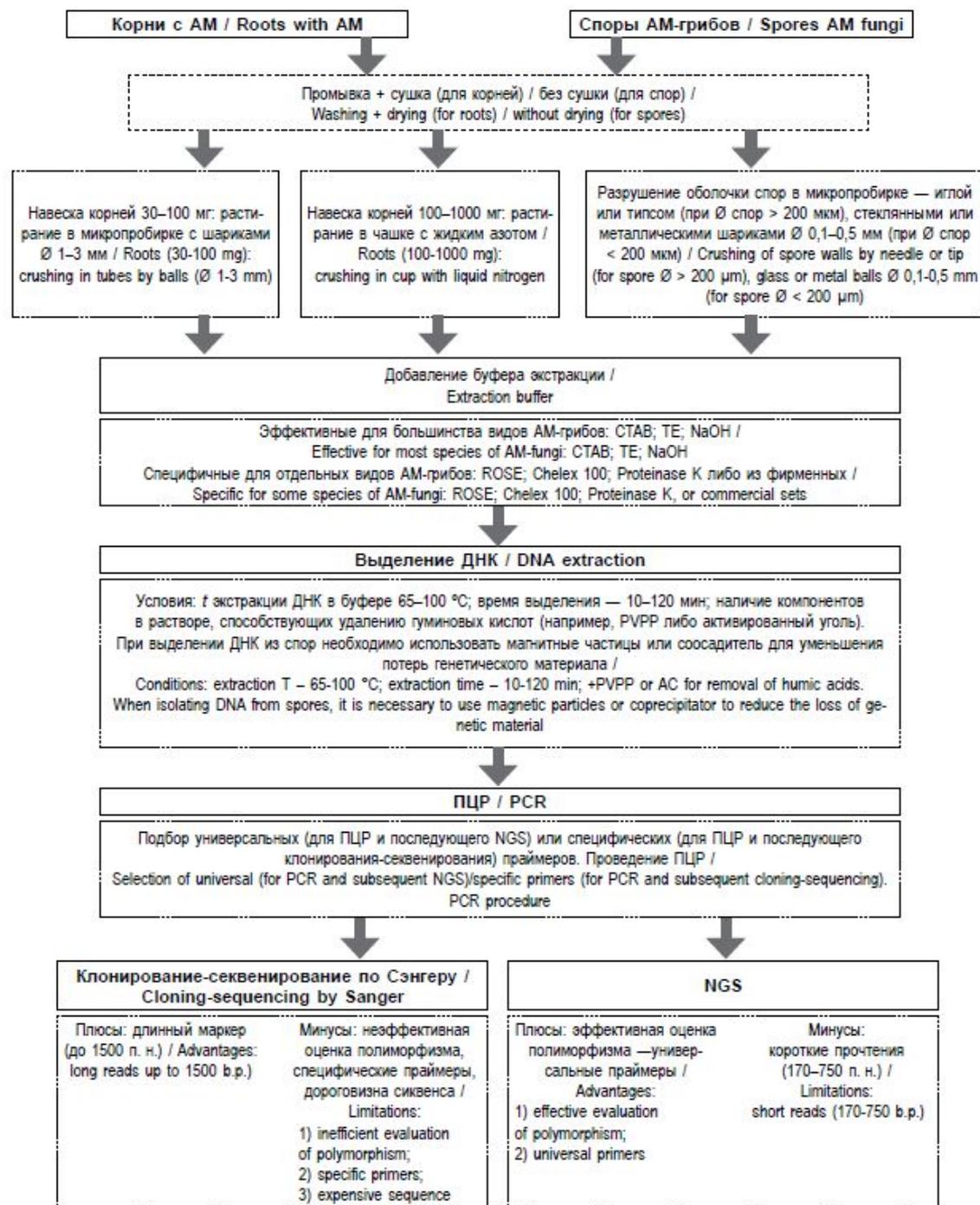


Рис. 1. Схема молекулярно-генетической идентификации AM-грибов

С 2009 г. методы NGS начали использоваться в практике идентификации АМ-грибов. С использованием универсальных грибных праймеров NS31 с АМ1 М. Опик с соавт. провели анализ 179279 последовательностей, из которых 77,5% принадлежали к 47 таксонам АМ-грибов, выделенных из корней 10 видов растений.

В этой же работе было показано, что методом 454 выявляется в 1,5 больше таксонов грибов, чем при секвенировании по Сэнгеру. Это подтвердило неэффективность метода клонирования-секвенирования при идентификации АМ-грибов.

Opik M, Metsis M, Daniell TJ, et al. Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytol.* 2009;184(2):424–437.
doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02920.x.

В работе К. Сенес-Гуэрреро с соавт. использовали метод 454 GS-FLX+ для идентификации по LSU региону.

Интересным результатом этой работы является то, что ~60% исследованных растений образовали симбиоз не менее чем с 10 видами АМ-грибов каждое, а 2% растений имели в корневой системе более 25 видов АМ-грибов

Применение данного протокола идентификации позволило получить 698297 последовательностей, из которых было обнаружено 0,17% целевых последовательностей АМ-грибов, отнесенных к 41 виду, **из которых 15 – неизвестные таксоны, не зарегистрированные в базах данных.**

Senes-Guerrero C, Schusler A. A conserved arbuscular mycorrhizal fungal core-species community colonizes potato roots in the Andes. *Fungal Divers.* **2015**;77(1): 317-33.
doi: 10.1007/s13225-015-0328-7.

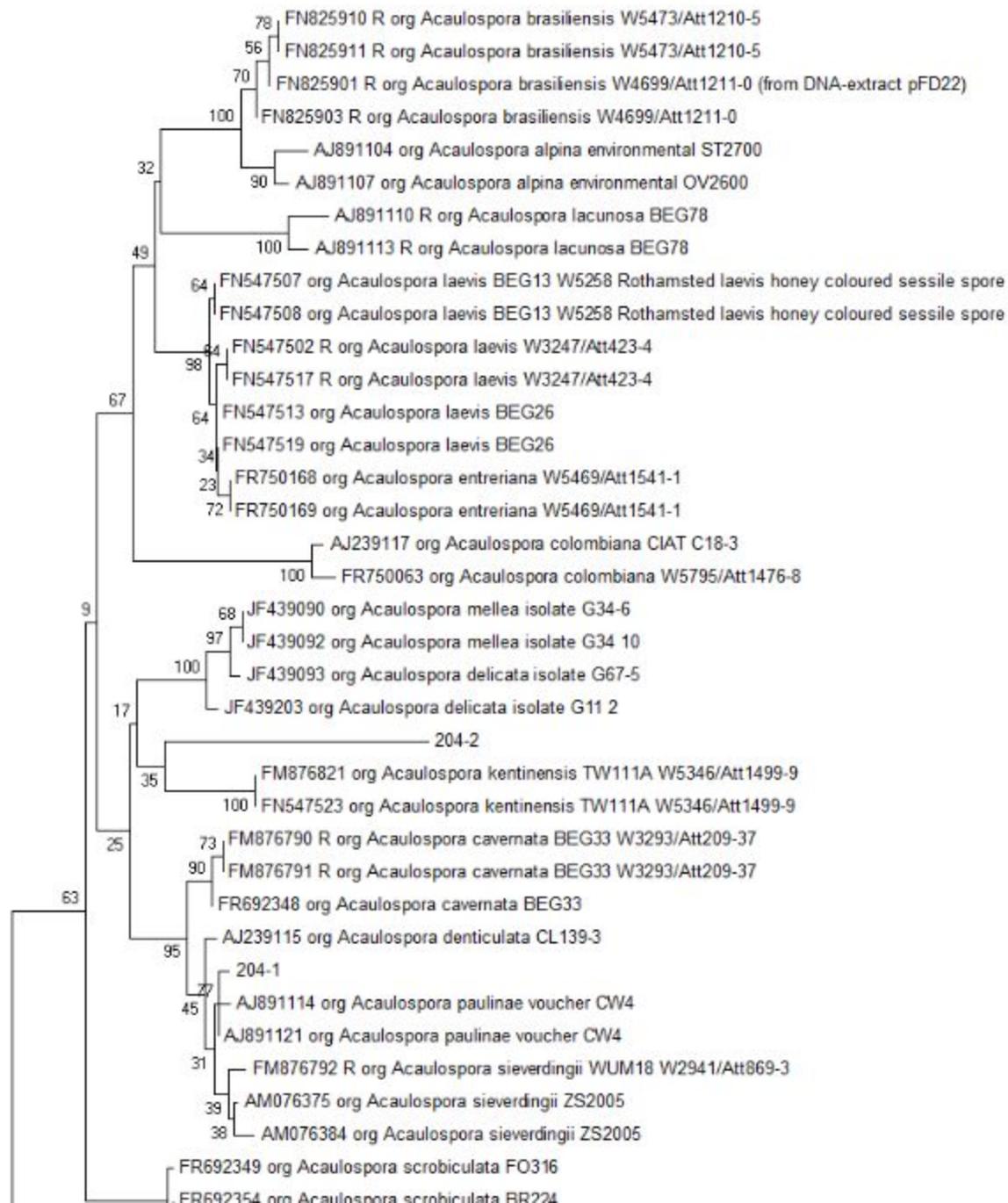
Выравнивание близкородственных видов грибов AM

M7: Alignment Explorer (167+204 новое-2.mas)

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help

DNA Sequences Translated Protein Sequences

Species/Abbrv	Group Name	
5. AB048663 R org Ambispora callosa OK1 MAFF521		AATTAATTCGGCCCTCCAGTTT
6. AM268197 R org Ambispora fennica glomoid W3		AA--AAAATTCGGCCCTCCAGTTT
7. JF439210 org Ambispora gerdemannii isolate 1		GA--AAAATTCGGCCCTCCAGTTT
8. FN820282 org Ambispora granatensis JEP-2010		GA--AAAATTCGGCCCTCCAGTTT
9. AB048654 R org Ambispora leptoticha F3b MAF		GA--AAAATTCGGCCCTCCAGTTT
10. FR750022 org Archaeospora schenckii W5673/		CGATGATTTTGGCAATTCAGAT
11. FR750023 org Archaeospora schenckii W5673/		CGATGATTTTGGCAATTCAGAT
12. Filcons*05 org Archaeospora trappei NB112		CGATGATTTTGGCAATTCAGAT
13. JF439093 org Acaulospora delicata isolate 4		AACCGAATCTGASCTCCAAAGT
14. JF439203 org Acaulospora delicata isolate 4		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
15. JF439090 org Acaulospora mellea isolate G3		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
16. JF439092 org Acaulospora mellea isolate G3		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
17. AJ391104 org Acaulospora alpina environmen		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
18. AJ391107 org Acaulospora alpina environmen		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
19. FN825903 R org Acaulospora brasiliensis W4		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
20. FN825910 R org Acaulospora brasiliensis W5		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
21. FN825911 R org Acaulospora brasiliensis W5		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
22. FN825901 R org Acaulospora brasiliensis W4		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
23. FM876790 R org Acaulospora cavernata BEG33		AACCGAATCTGASCTCCAAAGT
24. FM876791 R org Acaulospora cavernata BEG33		AACCGAATCTGASCTCCAAAGT
25. FR692348 org Acaulospora cavernata BEG33		AACCGAATCTGASCTCCAAAGT
26. AJ239117 org Acaulospora colombiana CIAT C		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
27. 204-1		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
28. 204-2		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
29. FR750063 org Acaulospora colombiana W5795/		AACCGAATCTGASCTCCAAAGT
30. AJ239115 org Acaulospora denticulata CL139		AACCGAATCTGASCTCCAAAGT
31. FR750168 org Acaulospora entreriana W5469/		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
32. FR750169 org Acaulospora entreriana W5469/		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
33. FM876821 org Acaulospora kentinensis TW111		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
34. FN547523 org Acaulospora kentinensis TW111		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
35. AJ391110 R org Acaulospora lacunosa BEG78		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
36. AJ391113 R org Acaulospora lacunosa BEG78		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
37. FN547502 R org Acaulospora laevis W3247/At		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
38. FN547517 R org Acaulospora laevis W3247/At		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
39. FN547507 org Acaulospora laevis BEG13 W525		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
40. FN547508 org Acaulospora laevis BEG13 W525		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
41. FN547513 org Acaulospora laevis BEG26		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
42. FN547519 org Acaulospora laevis BEG26		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
43. AJ391114 org Acaulospora paulinae voucher 4		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
44. AJ391121 org Acaulospora paulinae voucher 4		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
45. FR692349 org Acaulospora scrobiculata F031		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
46. FR692354 org Acaulospora scrobiculata BR22		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
47. AM076375 org Acaulospora sieverdingii ZS20		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
48. AM076384 org Acaulospora sieverdingii ZS20		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
49. FM876792 R org Acaulospora sieverdingii WU		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
50. Filcons*03 org Acaulospora spinosa W3574/A		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
51. FR750151 R org Acaulospora spinosa EK-Type		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
52. FR750156 R org Acaulospora spinosa EK-Type		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
53. AJ349468 org Diversispora aurantia Holotyp		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
54. FN547658 R org Diversispora aurantia Ex-Typ		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
55. FN547659 R org Diversispora aurantia Ex-Typ		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
56. FN547665 R org Diversispora aurantia Ex-Typ		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
57. AM713402 R org Diversispora celata BEG231		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
58. AM713403 R org Diversispora celata BEG231		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
59. AM713405 R org Diversispora eburnea AZ420A		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
60. Filcons*10 org Diversispora eburnea AZ420A		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
61. AY842567 R org Diversispora epigaea BEG47		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
62. AY842568 R org Diversispora epigaea BEG47		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT
63. AY842569 R org Diversispora epigaea BEG47		AA--CGAATCTGASCTCCAAAGT



Видовая принадлежность штаммов АМ-грибов, определенная с применением молекулярно-генетической идентификации на Illumina Miseq

№ п./п.	№ штамма АМ-гриба	Вид АМ-гриба	Координаты места взятия образца	Эколог
1	32	<i>Glomus invermaium</i>	54°44'53"с.ш. (54.748038), 25°17'35"в.д. (25.292930)	естественный дуг
2	153	<i>Rhizophagus irregularis</i>	46°52'2"с.ш. (46.867095), 40°16'8"в.д. (40.268968)	лесополоса (дуб, клён, ольха)
3	156	<i>Rhizophagus irregularis</i>	46°52'2"с.ш. (46.867095), 40°16'8"в.д. (40.268968)	лесополоса (дуб, клён, ольха)
4	160(3)	<i>Rhizophagus irregularis</i>	46°52'7"с.ш. (46.868531), 40°16'8"в.д. (40.268968)	пашня (поле кукурузы)
5	166	не определен	46°52'7"с.ш. (46.868531), 40°16'8"в.д. (40.268968)	пашня (поле кукурузы)
6	167	<i>Claroideoglomus etunicatum</i>	56°02'24.30"с.ш. (56.040093), 37°29'20.00"в.д.	пашня (поле овсяницы)
7	168	<i>Rhizophagus irregularis</i>	56°02'24.30"с.ш. (56.040093), 37°29'20.00"в.д.	пашня (поле овсяницы)
8	177	<i>Rhizophagus irregularis</i>	56°02'31.40"с.ш. (56.042059), 37°29'17.60"в.д.	пашня (поле люцерны)
9	178	не определен	56°02'35.30"с.ш. (56.043130), 37°29'16.40"в.д. (37.487892)	лес широколиственный (дуб, липа, клен и береза)
10	183	не определен	56°02'35.30"с.ш. (56.043130), 37°29'16.40"в.д. (37.487892)	лес широколиственный (дуб, липа, клен и береза)
11	190	не определен	56°02'33.80"с.ш. (56.042723), 37°29'13.70"в.д.	естественный дуг
12	194	не определен	56°02'33.80"с.ш. (56.042723), 37°29'13.70"в.д.	естественный дуг
13	197	не определен	56°02'33.80"с.ш. (56.042723), 37°29'13.70"в.д.	естественный дуг
14	198	не определен	56°02'33.80"с.ш. (56.042723), 37°29'13.70"в.д.	естественный дуг
15	199	не определен	56°02'33.80"с.ш. (56.042723), 37°29'13.70"в.д.	естественный дуг
16	200	не определен	56°02'33.80"с.ш. (56.042723), 37°29'13.70"в.д.	естественный дуг
17	204	<i>Acaulospora paulinae</i>	56°02'33.80"с.ш. (56.042723), 37°29'13.70"в.д.	естественный дуг
18	206	не определен	56°02'33.80"с.ш. (56.042723), 37°29'13.70"в.д.	естественный дуг

По данным Опик с соавт. 2014 года было известно, что широко распространенный и включающий наибольшее количество видов род *Glomus* содержит 113 “морфовидов”, а также 239 виртуальных таксонов, тем самым морфологически определены только 32% видов рода *Glomus*.

Opik M, Davison J, Moora M, Zobel M. DNA-based detection and identification of Glomeromycota: the virtual taxonomy of environmental sequences. *Botany*. 2014;92(2):135-147. doi: 10.1139/cjb-2013-0110.

Виды данной таксономической группы в 2010 г. были разделены на 4 рода – *Glomus*, *Funneliformis*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, а к 2017 г. уже на 15 родов, многие виды из которых не определены морфологическими методами.

Amf-phylogeny.com [Internet]. Glomeromycota species list [cited 2018 Mar 1]. Available from: <http://www.amf-phylogeny.com>.

MaarjAM [Internet]. Database for studies on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. Available at: <https://maarjam.botany.ut.ee>.

UNITE [Internet]. Unified system for the DNA based fungal species linked to the classification Ver. 7.2. Available at: <URL:https://unite.ut.ee>.

Заключение.

1. Проведена морфологическая и молекулярно-генетическая идентификация более 35 штаммов грибов АМ из коллекции ФГБНУ ВНИИСХМ до вида и 49 штаммов – до рода.
2. Проведена оценка активности 65 штаммов АМ грибов и оценка симбиотической эффективности. Корреляционный анализ между параметрами активности и эффективности штаммов АМ грибов в условиях низкого и среднего уровня фосфора в почве показал, видоспецифичность этих параметров. Взаимосвязь с экотопом, из которого выделен штамм, отсутствует. Наиболее эффективные штаммы 14 и 16 принадлежат роду *Rhizophagus*.
3. Результаты работы свидетельствуют о перспективности внедрения биопрепаратов на основе АМ-инокулятов в сельское хозяйство России. Ряд штаммов рекомендованы к применению в качестве действующего начала биопрепаратов – усилителей роста растений.

Автор благодарит за помощь в проведении экспериментов и плодотворное обсуждение результатов к.б.н. Юркова А.П. д.б.н. Проворова Н.А., д.б.н. Шишову М.Ф.

Работа выполняется при финансовой поддержке гранта [РФФИ 15-29-02753 ОФИ-М](#) (идентификация АМ-грибов и др.), гранта [СПбГУ №1.37.534.2016](#) (метаболомный и ФГ-анализ АМ-растений), гранта [РНФ №16-16-00118](#) (транскриптомный анализ АМ-растений) с привлечением ресурсной базы ЦКП ФГБНУ ВНИИСХМ и РЦ МиКТ СПбГУ (НИР №109-98 от 13.04.2014)