

Санкт-Петербургский государственный университет

Серикова Елена Николаевна

Исследование таксономической структуры почвенного и ризосферного микробиомов различных сортов *Triticum aestivum* (Пшеница мягкая) и *Secale cereale* (Рожь посевная), культивируемых в двух типах почв

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Работа выполнена в лаборатории
микробиологического мониторинга
и биоремедиации почв
ФБГНУ Всероссийского научно-исследовательского
института сельскохозяйственной микробиологии
(зав.лаб. – к.б.н. Андронов Евгений Евгеньевич)

Научный руководитель:
к.б.н. Першина Елизавета Владимировна

Санкт-Петербург

2016

Список сокращений

АПК	агропромышленный комплекс
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДП	дерново-подзолистая почва, контроль
ОТЕ	операционная таксономическая единица
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота
ЧЗ	чернозем, контроль
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
EMP	earth microbiome project
MAMBA	marine metagenomics for new biotechnological applications
MER	microarray expression profiling
OUT	operational taxonomic unit
PCoA	principal components analysis
PGPR	plant growth-promoting rhizobacteria
R1	ризосфера ржи, сорт К-6469 по каталогу ВИР
R3	ризосфера ржи, сорт К-7856 по каталогу ВИР
TGGE	temperature gradient gel electrophoresis
T-RFLP	terminal restriction length polymorphism
W2	ризосфера пшеницы, сорт К-9084 по каталогу ВИР
W5	ризосфера пшеницы, сорт ВИР К-54609 по каталогу ВИР

Оглавление

Список сокращений.....	2
Введение.....	4
Обзор литературы.....	7
1. История развития исследований микробного сообщества ризосферы. Ассоциативные микроорганизмы.....	7
2. Развитие метагеномного подхода к исследованию биоразнообразия.....	10
3. Биоинформационный анализ данных по таксономической структуре микробиомов 15	
4. Особенности исследования ризосферного микробиома.....	17
5. Современные исследования ризосферного микробиома.....	18
Материалы и методы исследования	22
1. Объекты исследования.....	22
2. Методы исследования	23
2.1. Постановка вегетационного опыта.....	23
2.3. Выделение и очистка ДНК	23
2.3. Биоинформационный анализ данных.....	24
Результаты и обсуждение	26
1. Биоинформационный анализ результатов секвенирования	26
нуклеотидных последовательностей.....	26
2. Метагеномная характеристика ризосферного эффекта.	31
2.1. Анализ показателей альфа-разнообразия.....	31
2.2. Анализ показателей бета-разнообразия (кластерный анализ PCoA).	32
2.3. Анализ таксономической структуры сообществ.....	36
Заключение.....	42
Выводы	43
Список литературы.....	44

Введение

Разнообразие микроорганизмов, ассоциированных с корнями растений, огромно и составляет десятки тысяч видов. Однако лишь недавно была признана колоссальная роль микробиома в жизни растения и выдвинута идея о рассмотрении его в качестве второго генома растения (Berendsen et al., 2012). Понимание механизмов формирования и функциональной нагрузки ризосферного микробиома позволит разработать эффективные системы повышения продуктивности растений, обогатит наши знания в области экологии растительно-микробных взаимодействий.

Первые работы в области растительно-микробных взаимодействий появились около 150 лет назад, большая часть из них была направлена на поиски микробиологических факторов продуктивности культурных растений. Прежде всего ученых интересовали азотфиксирующие, рост стимулирующие микроорганизмы, а также патогенная микробиота. Особое внимание уделялось изучению морфологических и физиологических свойств полученных штаммов и их влияния на растение, предоставляющее ризосферную нишу.

Однако вскоре стало понятно, что в ризосфере существуют так называемые некультивируемые бактерии и археи, присутствие которых невозможно детектировать традиционными методами культивирования на питательных средах (Hugenholtz et al., 1998; Oliver et al., 2005; Handelsman et al., 2004). Появление новых методов, основанных на секвенировании выделяемых из среды нуклеотидных последовательностей, позволило перейти к анализу этой многочисленной группы микроорганизмов (по разным оценкам некультивируемые микроорганизмы могут составлять от 90% до 99% состава сообщества). При исследовании некультивируемой части микробного сообщества, объектом исследования становится метагеном – совокупный генетический материал экосистемы (Vogel et al., 2009; Riesenfeld et al., 2004). Последующий анализ позволяет в зависимости от задач исследования произвести оценку таксономической и/или функциональной структуры сообщества посредством выбора ген-специфичных праймеров и/или секвенирования полно-размерных геномов. В качестве филогенетического маркера для прокариотов в подавляющем большинстве работ используется структура переменных участков гена 16S рРНК.

Использование метагеномных технологий при исследовании сообществ ризосферы имеет ряд преимуществ, связанных с возможностью более полной детекции состава сообщества, меньшей трудоемкостью и быстротой анализа. Кроме того, метагеномные методы позволяют проводить исследование биологических объектов на геномном и геномном уровне, исследовать метаболические пути, вовлеченные во взаимодействие отдельных компонентов микробного сообщества и предполагать их функции. Все это позволяет постепенно

выходить на системный уровень понимания закономерностей функционирования почвенных микробных сообществ. В перспективе ожидается появление проектов по комплексному исследованию метагенома, транскриптома, протеома, метаболома, что обеспечит дальнейшее развитие идеи объединенного анализа.

На данный момент эта тема чрезвычайно актуальна в зарубежной науке – организованы проекты по изучению ризосферного микробиома модельных объектов, таких как *Arabidopsis thaliana*, активно изучается ризосферный микробиом сельскохозяйственно-значимых культур – *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Lactuca sativa*.

Однако метагеномный подход к исследованию разнообразия находится сегодня на стадии становления и ставит перед учеными ряд сложных задач, основными из которых являются воспроизводимость данных секвенирования, зависящая от глубины секвенирования и числа повторностей, а также биологическая интерпретация получаемых результатов. Поскольку метагеномные исследования ризосферного микробиома практически не представлены в отечественной научной литературе, одной из задач данного исследования стал анализ воспроизводимости данных высокопроизводительного секвенирования при проведении такого рода анализа.

Новизна данной работы также обусловлена выбранными объектами исследования – ризосферными комплексами, наиболее характерными для территории России и состоящими из почв и сортов культурных растений, типичных для российского агропромышленного комплекса (АПК).

Таким образом, **целью** данной работы является исследование таксономической структуры почвенного и ризосферного микробиомов различных сортов *Triticum aestivum* (Пшеница мягкая) и *Secale cereale* (Рожь посевная), культивируемых в черноземной и дерново-подзолистой почвах.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести постановку модельного опыта по культивированию двух сортов *Triticum aestivum* (Пшеница мягкая) и двух сортов *Secale cereale* (Рожь посевная) в дерново-подзолистой почве и черноземе.
2. Выделить ДНК из образцов контрольной и ризосферной почвы и провести секвенирование гена 16S рРНК почвенных бактерий и архей
3. Определить таксономический состав микробиомов в образцах почвы и ризосферы растений.
4. Провести биоинформационный анализ данных с расчетом индексов альфа и бета разнообразия.

5. Сравнить таксономический состав ризосферного и почвенного микробиомов и выявить группы бактерий, достоверно изменяющих свою долю в ризосферах культивируемых растений.

Обзор литературы

1. История развития исследований микробного сообщества ризосферы. Ассоциативные микроорганизмы

Отечественная микробиология растительно-микробных взаимодействий имеет богатую историю. Накопление данных о растительно-микробных взаимодействиях началось около 150 лет назад в контексте инфекционных болезней растений (Проворов, Воробьев, 2012). Дальнейшие работы в области растительно-микробных симбиозов велись в двух направлениях, - изучение мутуалистических и антагонистических отношений, возникающих между растением и почвенными микроорганизмами (Тихонович, Проворов, 2009). Прежде всего, исследователей интересовали азотфиксирующие микроорганизмы (Доросинский, 1970; Яковлева, 1975; Израильский и др., 1933), а также фитопатогены, что обусловлено их практической важностью для сельского хозяйства.

Феномен «ризосферного эффекта» был признан уже в начале XX века Хилтнером (1904). Он отметил появление колоний микроорганизмов на поверхности корней, а прилегающую непосредственно к корню почву назвал ризосферой (Hiltner, 1904).

Это открытие подняло ряд весомых и ранее не заявленных вопросов, касающихся закономерностей формирования таксономической и функциональной структуры сообществ (Мишустин, 1966; Шильникова, 1989), механизмов их функционирования, роли ассоциативных микроорганизмов в развитии и эволюции растений.

В результате работы с использованием методов классической микробиологии были выделены основные группы и роды микроорганизмов, принимающих участие в «ризосферном эффекте». Большая часть этих микроорганизмов входит в группу ассоциативных и рассматривается в качестве стимуляторов роста растения, осуществляя поставки питательных веществ, защиту от патогенов, адаптацию к стрессу. В зарубежной литературе для их описания пользуются аббревиатурой PGPR – plant growth-promoting rhizobacteria. Ассоциативные микроорганизмы в отличие от симбиотических (в традиционном понимании) способны осуществлять взаимодействия на уровне метаболизма, не формируя специализированных структур.

Были исследованы как таксономический состав (Жуковская, 1949; Еникеева и др., 1960), так и функциональные свойства (Сергеева, 1960) сообществ, огромное количество работ было посвящено исследованию азотфиксирующих представителей из группы ризобий (Умаров, 1984). Была продемонстрирована принадлежность к PGPR таких микроорганизмов, как *Pseudomonas* (Боронин, 1998), *Azotobacter* и *Beijerinckia* (Vančura, 1965), ряда

родов актинобактерий (Калакуцкий, 1982), *Bacillus* (Куан, 1999) и др. Также большую роль в минеральном питании растения играют грибы-микоризообразователи, например, такие группы, как *Glomeromycota* – монофилетическая группа, формирующая арбускулярную микоризу (Siqueira et al., 2002), базидиомицеты, аскомицеты и зигомицеты – образуют эктомикоризы преимущественно с голосеменными и двудольными растениями. По-видимому, ассоциации растений с грибами являются эволюционно более древними и способствовали в свое время появлению наземных растений.

Вскоре было убедительно показано, что разнообразие ассоциативных микроорганизмов не исчерпывается вышеперечисленными группами. Симбиотические организмы, способные взаимодействовать с растениями встречаются практически во всех филах, таких как, например, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*. Так, например, цианобактерии, в частности *Nostoc* и *Anabaena*, обладают способностью фиксировать азот при наличии фотосинтетической активности, вступая во взаимодействия с широким кругом растений (Fogg et al., 1973).

Наземные растения, произрастающие в почве, находятся в непосредственной близости от огромного пула микроорганизмов. Многолетняя история сосуществования привела к появлению взаимной адаптации, направленной на использование этой тесной связи для обеспечения преимуществ, таких как защита от патогенов, регуляция развития. Прежде чем быть ассимилированными растением, источники жизненно необходимых минеральных веществ трансформируются микроорганизмами в более доступные для растения формы (Zhang et al. 2009; Long, 1989). Растение, в свою очередь, предоставляет экологическую нишу для микроорганизмов, обеспечивая их различными органическими субстратами.

Микроорганизмы главным образом получают от растения питание. Вспышка численности микроорганизмов у поверхности корня обусловлена большей концентрацией субстратов, обеспечивающих конструктивный и энергетический метаболизм микроорганизмов. В состав корневых экссудатов – сложных комплексов углеродных метаболитов растений – входят как низкомолекулярные (сахара, органические кислоты, аминокислоты), так и высокомолекулярные вещества (пектины, целлюлоза клеточных стенок слущивающейся ризодермы и др.) (Badri and Vivanco, 2009; Bais et al., 2006). Качественный и количественный состав такого рода выделений зависит от стадии онтогенеза, условий культивирования и таксономической принадлежности растения. При этом уровень экссудации является не только видоспецифическим, но и сортоспецифическим признаком. Все вышеперечисленные факторы влияют на состав формируемого сообщества (Bais et

al.;2006). Так, было показано, что концентрация пролина в корневых экссудатах кукурузы напрямую влияет на численность *Pseudomonas putida* (CS-4) (Dillewijn et al., 2004).

Таким образом растение создает селективные условия для микроорганизмов. Это явление связано не только с повышением концентрации питательных субстратов в прикорневой зоне, но и с изменением физико-химических параметров среды, в частности значительное влияние на формирование бактериальных сообществ в прикорневой зоне оказывают изменения pH и окислительно-восстановительного потенциала (Schmidt et al., 2011).

Растения также получают целый ряд адаптивных преимуществ, что крайне важно в связи с их жизненной стратегией прикрепленного существования. Растения зависимы от выгодных взаимодействий с микроорганизмами, стимулирующими их рост посредством секреции гормонов и способствующими водообеспеченности и резистентности к некоторым патогенам (Mendes et al., 2011; Verendsen et al., 2012; Bulgarelli et al., 2013).

Ассоциативные микроорганизмы влияют на развитие растения, выделяя фитогормоны, такие как ауксины, цитокинины, гиббереллины (Arkhipova et al., 2004). Идентифицирован целый ряд представителей корень-ассоциированных сообществ, способных синтезировать индолил-3-уксусную кислоту, например *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* (Spaere et al., 2007).

Следующий эффект, о котором известно достаточно давно, связан с минеральным питанием растения. Он заключается в снижении pH и переходе неорганических веществ в более доступную для растения форму. Метаболизируя субстраты, некоторые бактерии выделяют органические кислоты, что делает ионообменные процессы в почве более интенсивными. Так происходит, например, с органическими и неорганическими соединениями фосфора (Rodriguez and Fraga, 1999). Наиболее изученным вопросом в области растительно-микробных взаимодействий является азотфиксация прокариотических организмов как способ обеспечения растения доступным азотом (Проворов, Воробьев, 2012).

Защита от фитопатогенов обеспечивается прямыми и опосредованными путями. Во-первых, вышеперечисленные эффекты повышают жизнеспособность растения, с чем связана его большая устойчивость к патогенной микробиоте и абиотическим стрессам (Шапошников и др., 2011). Во-вторых, любая экологическая ниша имеет ограничения по ресурсам, с которыми связана конкуренция между патогенными микроорганизмами и PGPR (Neilands, 1995). В-третьих, некоторые микроорганизмы продуцируют такие биологически активные вещества, как антибиотики, фунгициды, токсины и литические ферменты (Whipps, 2001), угнетающие активность патогенной микробиоты.

Итак, способность объединяться в высокоинтегрированные системы в адаптивных целях есть одно из главных эволюционно значимых свойств растительного организма.

Понимание и изучение этой проблемы позволит более широко взглянуть на роль микроорганизмов в жизни растения, а также использовать полученные знания на практике, повышая продуктивность растений не только за счет искусственных и весьма травматичных для окружающей среды приемов – использования удобрений и пестицидов, но и за счет использования природного потенциала ассоциативного микробного сообщества. По современным представлениям перспективным является переход к так называемому адаптивному земледелию с использованием различных сочетаний промышленных штаммов ассоциативных бактерий, подобранных индивидуально в каждом конкретном случае (Проворов, Воробьев, 2012). Однако для реализации этих амбициозных планов необходимо проделать еще много работы. Современные исследования лишь закладывают фундамент будущих проектов.

При исследовании ризосферного микробиома возникают 2 ключевые методологические проблемы: с одной стороны, для понимания всего спектра взаимодействий мы должны как можно более полно описать состав почвенного и ризосферного микробиома, с другой стороны, для того чтобы понять, насколько тесно интегрированы организмы и, соответственно, насколько сильны их взаимодействия, – выяснить их локализацию по отношению к растению. Эти проблемы будут подробно рассмотрены в следующих главах (см. Раздел 4).

2. Развитие метагеномного подхода к исследованию биоразнообразия

До недавнего времени исследования в области почвенной микробиологии базировались на классических методах выделения и идентификации микроорганизмов, таких как микроскопирование, использование стекол обрастания, получение накопительных и чистых культур почвенных микроорганизмов. Широкое применение имел метод стекол обрастания, предложенный в 30-е годы XX века Николаем Григорьевичем Холодным. Метод претерпевал модификации, повышающие численность и разнообразие изолируемых микроорганизмов. Так, было предложено покрытие поверхности стекол тонким слоем питательной среды (по Рыбалкиной А.В. и Кононенко Е.В.), а также изменение микрорельефа стекла путем нанесения царапин различного размера, что способно значительно изменять физико-химические показатели среды (Корляков и др., 2011). Подобные методы позволяют делать срез структуры сообщества в его естественной форме, но не позволяют исследовать функциональную роль почвенных микроорганизмов. Поэтому постепенно этот метод был полностью замещен методом получения культур микроорганизмов с использованием почвенной вытяжки или набора разнообразных питательных сред. Основная направленность научных работ этого периода – исследование функциональных групп микроор-

ганизмов и отдельных штаммов. Однако вскоре стало понятно, что в полной мере охватить весь спектр природных факторов, в которых исторически складывались все таксономические группы микроорганизмов, и, следовательно, необходимых для составления соответствующих питательных сред, принципиально невозможно.

Исследователи столкнулись с неразрешимой на первый взгляд проблемой – невозможностью учета большей части разнообразия. Оказалось, что до 99% микроорганизмов, обитающих в естественных природных условиях, не способны расти на питательных средах, используемых в лабораторной практике. Сейчас задача выделения всего биоразнообразия не ставится при работе с традиционными методами культивирования, однако именно такой подход позволяет максимально полно и детально исследовать морфологические и физиологические характеристики изучаемого объекта, экологию функциональных групп микроорганизмов. Сегодня мы снова возвращаемся к необходимости системного взгляда на проблему формирования почвенного и ризосферного микробиома, но теперь уже с появлением новых методических возможностей, в частности молекулярно-биологических методов. Развитие молекулярных методов анализа и постепенное совершенствование их технического обеспечения привело к возможности исследования *in situ* генетических и метаболических особенностей как отдельных почвенных микроорганизмов (в том числе некультивируемых), так и всего сообщества в целом, включая механизмы интеграции его компонентов.

В настоящее время в мире намечается устойчивая тенденция к переходу к системной биологии, которая ярко выражена в области экологии микробных сообществ. Признание невозможности рассмотрения целостной системы с точки зрения свойств ее отдельных компонентов (эмерджентность) позволило совершенно иначе взглянуть на подходы, используемые в биологических исследованиях. Свидетельством этого является появление все большего числа «омик» – метагеномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика – как самостоятельных областей научного знания, основанных на исследовании совокупного биологического материала сообщества, в частности ДНК, РНК, белков и др.

Исторически первые «омики» были направлены на изучение ДНК как класса достаточно устойчивых, а значит и удобных в работе соединений. Исследования транскриптома, протеома и метаболома пока не столь распространены, как метагеномный анализ, ввиду методологических сложностей работы с соответствующим биологическим материалом.

Термин «метагеномика» был предложен в 1998 году Джо Гендельсман (Handelsman et al., 1998), которая определила его как науку, изучающую совокупный генетический материал, напрямую получаемый из природных образцов – метагеном. Метагеномный анализ в зависимости от поставленных целей и выбранного подхода может состоять из раз-

личных этапов, однако любое метагеномное исследование начинается с выделения ДНК из образца окружающей среды, что в теории соответствует срезу сообщества в его нативной форме.

С использованием метагеномных технологий были получены данные о колоссальных количествах генетической информации, содержащейся в одном грамме почвы – до 1Tb (Simon et al., 2011) – и высоком видовом разнообразии прокариот, исчисляемом тысячами видов.

Почвенный метагеном имеет сложный состав. В него ходит как ДНК физиологически активных, так и ДНК покоящихся стадий микроорганизмов. Значительный пул (по разным сведениям составляющий от 20 до 60% от всей почвенной ДНК) составляет внеклеточная почвенная ДНК (Ху, 2006). Известно, что внеклеточная ДНК способна в течение длительного времени сохраняться в почве, стабилизируясь путем связывания с почвенными гуминовыми кислотами, алюмосиликатами (глинистыми минералами), и частицами песка, чему в значительной степени содействует присутствие катионов, таких как Ca^{2+} и Mg^{2+} , а также низкие значения pH (Lorenz and Wackernagel, 1987; Romanowski et al., 1991). Источником внеклеточной почвенной ДНК могут служить как отмершие прокариотические, так и растительные клетки (хлоропластная ДНК) (Levy-Booth et al., 2007), кроме того, внеклеточная ДНК является одним из компонентов экстрацеллюлярного матрикса, активно секретируемого при формировании биопленок (Nielsen et al., 2006; Böckelmann et al., 2007). Как правило, комплексность почвенного генетического материала в современных исследованиях не принимается во внимание, в связи с методическими сложностями дифференциальной экстракции описанных пулов почвенной ДНК (Nielsen et al., 2006).

Нуклеотидный состав почвенной ДНК исследует так называемая структурная метагеномика, посредством секвенирования фрагментов генома или отдельных генов, являющихся филогенетическими маркерами биоразнообразия. В качестве филогенетического маркера для прокариотов наиболее часто используется ген 16S рРНК (Forney et al., 2004). Такой выбор обусловлен рядом причин, в числе которых универсальность (присутствие в любом прокариотическом геноме), наличие достаточно протяженных варибельных участков наряду с высокой консервативностью гена в целом и широкая представленность последовательностей 16S рРНК в мировых базах данных (Forney et al., 2004; Pace et al., 2009).

Для исследования структуры метагенома наиболее часто используется метод ПЦР с последующим анализом нуклеотидных последовательностей. Работа с амплифицированными нуклеотидными последовательностями может производиться набором методов, раз-

личающихся по точности определения состава нуклеотидных последовательностей и, как следствие, состава микробного сообщества. Наиболее распространены следующие методы: 1) клонирование фрагментов в вектор с последующей трансформацией компетентных клеток *E. coli*, получение и секвенирование ампликонной библиотеки (Lane et al., 1985; Stahl et al., 1985; Amann et al., 1995); 2) градиентный электрофорез, например DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, TGGE – Temperature Gradient Gel Electrophoresis (Muyzer et al., 1995; Ferris et al., 1996); 3) анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (T-RFLP – Terminal Restriction Length Polymorphism); 4) высокопроизводительное секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК. Наиболее точным методом для исследования состава почвенной ДНК является метод секвенирования нуклеотидных последовательностей, который практически полностью вытеснил другие методы с появлением эффективных технологий высокопроизводительного секвенирования (Hodkinson and Grice, 2015).

Помимо так называемой структурной метагеномики, описывающей нуклеотидный состав почвенной ДНК, активно развивается и функциональная метагеномика, направленная на изучение конкретных генов посредством их экспрессии в бактериальном векторе и определение функций образующихся белковых продуктов. Таким образом, белковые продукты генов некультивируемых микроорганизмов могут быть изучены с использованием лабораторных штаммов. Функциональная метагеномика также активно использует самые современные подходы, в том числе анализ транскриптома, протеома и метаболома микробного сообщества. Применяемые при анализе транскриптов методы условно можно разделить на узконаправленные, такие как нозерн-гибридизация, ПЦР в реальном времени и методы, позволяющие анализировать одновременно целый спектр транскриптов, такие как МЕР (Microarray expression profiling, ДНК-микрочипирование), SAGE (Serial analysis of gene expression, последовательный анализ экспрессии генов) и RNA-seq (Transcriptome Sequencing, высокопроизводительное секвенирование транскриптома). Анализ протеома и метаболома микробных сообществ осуществляется в основном с использованием методов масс-спектрометрии. В частности, структурная протеомика осуществляет разделение выделенных белков и их очистку, секвенирование белков, установление вторичной и третичной структуры белков, выявление функциональных доменов на основании строения. Функциональная протеомика занимается поиском функций белка (экспериментальным или *in silico*), идентификацией взаимодействий между белками, в том числе при помощи дрожжевой двугибридной системы (Y2H) для анализа взаимодействий и масс-спектрометрии для идентификации.

Первые работы, произведенные с использованием метагеномного подхода, носили описательный характер, в результате чего был накоплен большой массив данных по таксономическому разнообразию микроорганизмов, в том числе были открыты новые филы, состоящие исключительно из некультивируемых бактерий и архей (Ranjan et al., 2005).

На следующем этапе развития метагеномики были поставлены более частные вопросы, касающиеся мониторинга состава сообществ и его изменения в градиенте какого-либо фактора окружающей среды, поиск биоиндикаторных видов, определение «корового» (общего для образцов, принадлежащих к определенному биому) компонента микробных сообществ др. (Рыбчин В.Н., 1986). Но современная метагеномика находится в процессе перехода на следующий этап своего развития, связанный не только с описанием таксономической структуры, но и с исследованием функции микробного сообщества.

С развитием технологий для проведения молекулярно-биологических исследований сегодня на первый план выходят исследования полноразмерных геномов. Для этого используются как новейшие методы секвенирования, такие как, например, нанопоровое секвенирование (Branton et al., 2008), так и методы секвенирования геномов отдельных клеток некультивируемых микроорганизмов - «single cell genomics» (Kalisky and Quake, 2011).

Важным аспектом этого этапа является прогнозирование функциональных характеристик микробиомов. Современные методы позволяют уже сейчас переходить от исследования структуры метагенома к изучению функций отдельных его элементов – посредством аннотации геномов и поиска генов-гомологов в соответствующих базах данных (<http://www.kegg.jp>), а также разработки на основе этих данных методов культивирования некультивируемых микроорганизмов (Cohan, 2002; Gevers et al., 2005; Cohan and Perry, 2007; Gao et al., 2012).

Основным преимуществом метагеномного подхода является его всеобъемлющий характер – он позволяет изучать не только функции отдельных компонентов микробиома, но и интегральные функции микробного сообщества в целом, рассматривая его как совокупность взаимодействующих микроорганизмов. В перспективе метагеномный подход позволит исследовать такие интегративные функции сообществ как «чувство кворума» (quorum sensing), секреторные и регуляторные пути межвидового взаимодействия, механизмы сигнальной трансдукции, ассоциированные с генами интереса и многие другие.

3. Биоинформационный анализ данных по таксономической структуре микробиомов

Почва является одним из самых сложных природных объектов в отношении размеров микробного сообщества и разнообразия представленных видов. При количественном анализе состава почвенного сообщества с использованием методов культивирования было показано, что численность микроорганизмов в одном грамме почвы составляет приблизительно $10^6 - 10^7$ клеток, при этом количество видов не превышает нескольких сотен (Richter, 1995). Использование молекулярно-генетических методов в оценке численности почвенных микроорганизмов показало увеличение этих значений на два-три порядка. В частности, было показано, что общий объем генетической информации, заключенный в одном грамме почвы составляет несколько терабайт (что соответствует, примерно, 10^9-10^{10} кл/гр почвы), а число видов исчисляется тысячами (Першина и др., 2013). Очевидно, что при столь огромных размерах метагеномов анализ и интерпретация получаемых данных представляет собой весьма непростую задачу. Единой методики обработки метагеномных данных не существует, что значительно затрудняет работу с крупными массивами данных и попытки сопоставления результатов аналогичных исследований. Критическому анализу существующих биоинформационных методов обработки метагеномных данных, а также разработке новых, более эффективных алгоритмов биоинформационного анализа посвящен целый ряд научных работ (Порозов и др., 2012; Wigginton and Abecasis, 2005; Fu et al., 2010), в данной главе мы ограничимся лишь описанием наиболее часто используемого метода для анализа таксономического портрета сообщества.

На первом этапе происходит проверка качества полученных нуклеотидных последовательностей. Из анализа исключаются последовательности, имеющие низкий параметр качества прочтения (quality score), содержащие неправильно «прочитанные» последовательности праймеров и мультиплексных идентификаторов (олигонуклеотидных последовательностей маркирующих анализируемые образцы ДНК), а также протяженные гомополимерные повторы. В процессе секвенирования не удастся точно детектировать количество последовательно стоящих одноименных нуклеотидов, если их число превышает определенные пределы, поэтому наличие таких участков может провоцировать ошибки секвенирования.

Затем для таксономического анализа производят объединение нуклеотидных последовательностей в группы - ОТЕ – операционные таксономические единицы (operational taxonomic units, OTUs) – условные единицы анализа, которые в зависимости от установленного критерия сходства между нуклеотидными последовательностями могут быть соотнесены с таксономическими рангами вида, рода, семейства и т. д. На этом этапе необхо-

димо выбрать коэффициент сходства между нуклеотидными последовательностями для их объединения (традиционно используют критерий 97%, а полученные ОТЕ считают «видами»).

Далее необходимо провести выбор и выравнивание репрезентативных последовательностей (представительных нуклеотидных последовательностей, выбранных с использованием определенного алгоритма из всего набора последовательностей составляющих ОТЕ). Следующим этапом является построение матрицы генетических дистанций между последовательностями и определение их таксономической принадлежности с помощью разнообразных баз данных, среди которых наиболее популярны Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>), Silva (<http://silva.se/>), RDP (<https://rdp.cme.msu.edu/>) и GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). На заключительном этапе формируется таблица представленности ОТЕ в анализируемых образцах – это ключевая, так называемая биомная таблица (biom table).

Далее следует традиционный экологический анализ полученных данных, связанный с расчетом показателей альфа и бета-разнообразия. Оценка параметров альфа-разнообразия (сообщества в пределах одного биогеоценоза) включает различные индексы, отражающие видовое богатство (richness) и обилие видов (evenness). Более разнообразным и устойчивым является сообщество с наибольшими значениями данных показателей (Wittebolle et al., 2009). Бета-разнообразие подразумевает сравнение видового состава сообществ различных биогеоценозов и оценивается по показателям сходства между сообществами, в частности путем вычисления «условных дистанций» между сообществами по методу «UniFrac» (Lozupone1 and Knight, 2005). Гамма-разнообразие сообществ, «биогеография микробных сообществ», рассматривает изменения сообществ в градиенте условий среды на длительных временных промежутках. Для его оценки необходима интеграция данных многих экспериментов, поэтому сейчас для реализации таких исследований созданы крупные международные проекты, такие как, например, EMP (Earth microbiome project) (Gilbert et al., 2010), TerraGenome (Vogel et al. 2009), МАМВА (Marine Metagenomics for New Biotechnological Applications) (Kennedy et al., 2008).

Заключительный и наиболее сложный этап биоинформационного анализа заключается в обобщении полученных данных и их интерпретации. Сюда относится поиск «корового» компонента микробиомов (обнаружение специфических компонентов микробиомов и микроорганизмов-космополитов), поиск стабильных микробных ассоциаций в биосфере, которые воспроизводятся в различных местообитаниях, выявление экологических факторов определяющих формирование микробиомов различных местообитаний и пр.

4. Особенности исследования ризосферного микробиома

При исследовании микробиома, ассоциированного с растением, выделяют три основные пространственно обособленные зоны: эндосфера (внутри корня), ризоплана (поверхность корня) и ризосфера (почва, близкая к корневой поверхности). Поскольку методически данные зоны достаточно сложно разделить между собой, возникают проблемы в интерпретации данных, относящихся к структурным особенностям микробиома этих экологических ниш.

Еще на этапе планирования эксперимента возникает проблема поиска границ ризосферы и почвы, не подверженной влиянию корневой системы растения. Другой немаловажной проблемой является разделение ризосферной почвы и ризопланы. Размер ризосферы по-прежнему остается спорным вопросом ввиду его изменчивости в зависимости от вида растения, стадии онтогенетического развития, типа почвы и связанных с ним физико-химических свойств, влажности и других факторов. Универсального метода выделения ризосферной почвы не существует. Оригинальная идея была выдвинута в работе Витли с соавторами (2001), где удалость показать отчетливые различия в гидрофобности органических оболочек почвенных частиц ризосферы и почвы, не подверженной влиянию растения (Wheatley et al., 2001).

Для определения границ распространения ассоциированных с растением микробиомов можно использовать биохимические (поиск границ влияния корневых экссудатов растения), а также биологические методы (измерение градиента численности микроорганизмов, в том числе ризосферных групп микроорганизмов, на разной удаленности от корня (Diepeningen et al., 2005),

Несмотря на то, что данные подходы являются более точными и биологически обоснованными, большинство авторов придерживается исключительно формальной методики, связанной с механическим разделением посредством встряхивания. Почва, которая после встряхивания в течение определенного константного для всех образцов промежутка времени остается связанной с корнем растения, считается ризосферной. При использовании последнего подхода значительные вариации методики в различных работах зачастую не позволяют сравнивать полученные данные.

Наибольшую трудность на этапе отбора образцов представляет собой объективное разделение зон ризосферы и ризопланы. На начальном этапе разработки методической базы существовал прием, сходный с вышеописанным: в качестве ризосферы рассматривался слой почвы, смытый с корней в стерильной воде (200 об/мин, в течение 3 мин). Поверхности корня после данной процедуры присваивался статус ризопланы (Жебрак и др., 1998).

Следует отметить, однако, существенную погрешность этого и других сходных подходов, которая выражается в значительном риске контаминации ризосферных образцов представителями сообщества ризопланы при отмывке. Другая стратегия используется в методах сухого разделения: стерильной иглой частицы почвы удаляются с поверхности корня, которая после окончания процедуры считается ризопланой. Этот метод имеет другое ограничение – даже после тщательной очистки на поверхности корня остаются частицы ризосферной почвы.

Все эти методические сложности волновали научное сообщество 150 лет назад и в наши дни при использовании метагеномного анализа по-прежнему не устранены. Тем не менее, в перспективе метагеномный подход дает потенциальное решение для этих методологических проблем, поскольку позволяет в короткие сроки получать данные о составе и структуре микробиомов, находящихся на разном удалении от корня, а также развивающихся вдоль его поверхности (Оразова М.Х., 1994). В частности, в работе Дипенингена с соавторами (2005) была исследована динамика микроструктуры ризосферного микробиома с использованием метода DGGE, в результате чего удалось построить графики изменения численности отдельных групп микроорганизмов в зависимости от выбранного расстояния до поверхности корня (Diepeningen et al., 2005).

5. Современные исследования ризосферного микробиома

Разнообразие ассоциативных микроорганизмов растений велико, однако лишь недавно была признана колоссальная роль микробиома в жизни растения и выдвинута идея о рассмотрении его в качестве второго генома растения (Berendsen et al., 2012). Возникает ряд фундаментальных вопросов, требующих решения в ходе дальнейшей работы по изучению микробиома ризосферы, а именно, подробное выяснение экологической роли отдельных микроорганизмов в развитии растения, функций представителей «корового» компонента микробного сообщества, (микроорганизмов являющихся общими для многих видов растений), принципов молекулярного диалога между растением, предоставляющим ризосферную нишу, и ассоциированными с ним микроорганизмами. Также возникает практический вопрос – сможем ли мы извлечь сельскохозяйственную выгоду путем повышения урожайности, устойчивости растений и контроля патогенной нагрузки? (van der Heijden et al., 2015)

Сейчас ведется активная работа по изучению микробиомов ризосферы, в особенности культурных растений, с использованием методов секвенирования ДНК. Тем не менее, процессы рекрутирования ризосферной микробиоты, ее устойчивости к стрессовым воз-

действиям и окончательные экологические функции не до конца ясны. (Edwards et al. 2015) Интересно, что у растений, несмотря на наличие развитой иммунной системы (Dodds et al., 2010), происходит активное заселение корневых компартментов, что предполагает присутствие точной системы узнавания и различения мутуалистических и комменсальных микроорганизмов от патогенных (Lundberg et al., 2012).

Авторам ряда работ удалось продемонстрировать различия в структуре ризосферных микробиомов у видов (Hardoim et al., 2008; Redford et al., 2010) и сортов растений (Inceoglu et al., 2010; Inceoglu et al., 2011; Bonito et al., 2014). Однако полученные результаты зачастую требуют дополнительного подтверждения в связи с применением методов низкого разрешения и анализом недостаточного числа повторностей. Перечисленные недочеты не позволяют воссоздать полную картину микробиома и уменьшают точность данных.

Особого внимания заслуживает работа Эдвардса с соавторами, которая объединила научный подход с глубоким пониманием прикладных аспектов (Edwards et al., 2015). В указанной статье представлена подробная характеристика корень-ассоциированных микробиомов риса (*Oryza sativa*) по данным, полученным путем глубокого секвенирования генов 16S rRNA. В исследовании было детектировано более 250 000 ОТЕ. Для проведения эксперимента был заложен опыт по культивированию растений, выращенных из поверхностно стерилизованных семян риса в контролируемых условиях на почвах, отобранных с трех рисовых полей, а также в различных полевых условиях в Калифорнии. Длительность эксперимента составила 42 дня. Было проведено исследование трех корень-ассоциированных компартментов: эндосферы, ризопланы и ризосферы, каждый из которых имел специфический состав микробиома. Как было установлено, в тепличных условиях состав микробиомов варьирует в зависимости от двух наиболее существенных факторов – типа почвы и генотипа (вида и сорта) растения. В полевых же условиях влияние на формирование отчетливо отличающихся сообществ оказывали также географическое положение и режим землепользования. Таким образом, наблюдалось совместное воздействие на состав микробиома как биотических, так и абиотических факторов.

Также в работе Эдвардса с соавторами (2015) было произведено описание ранних этапов процесса формирования микробиома эндосферы (Edwards et al., 2015). С целью понимания динамики заселения был проведен серийный эксперимент, для чего стерильные проросшие семена пересаживали в почву и анализировали с 1 по 13 день. Уже после 1 дня наблюдалось заселение эндосферной ниши, однако максимальное разнообразие, приближенное к сообществам растений, выращенных в течение всего срока вегетации (42 дня) в тепличных условиях, достигалось на 13 день.

Выращивание риса является основным источником глобальных выбросов метана, и метаногенные археи действительно были обнаружены во всех пространственных корень-ассоциированных компартментах риса, выращиваемого в полевых условиях. Полученная информация была использована для идентификации предполагаемых микробных консорциумов, вовлеченных в процесс биогеохимического цикла метана.

Целая серия работ была посвящена подробной характеристике корневого микробиома *Arabidopsis thaliana* и близких видов (Bulgarelli et al., 2012; Lundberg et al., 2012; Schlaeppi et al., 2014). Полученные данные убедительно свидетельствуют в пользу того, что разнообразие бактерий на уровне фил достоверно ниже в эндосфере по сравнению с ризосферной почвой.

В работе Лундберга с соавторами (2012) были проанализированы результаты пироквенирования бактериального гена 16S рРНК более чем у 600 растений *Arabidopsis thaliana* (Lundberg et al., 2012). Была выдвинута гипотеза о том, что ризосферная и эндосферная микробиота растений, выращенных в контролируемых условиях на природных почвах, зависит от сорта и генотипа растения, предоставляющего ризосферную нишу, была предпринята попытка идентифицировать «коровый» компонент микробного сообщества, – микроорганизмов, характерных для ризосферных микробиомов различных типов почв и сортов растений. В работе был охарактеризован таксономический состав сообществ, выделенных из ризосферы и эндосферы корней растений, выращенных на двух различных по геохимическим параметрам почвах, и представлены данные, показывающие сильную зависимость сообществ от типа почвы. Также было показано, что таксономический состав эндофитных сообществ отличается бедностью по сравнению с ризосферными микробиомами. Дополнительно авторы отметили, что состав микробиомов эндосфер в значительной степени перекрываются при выращивании на обоих типах почв. Последние два факта объясняются большей специфичностью предоставляемых микроорганизмам условий в результате усиления влияния растения.

Эндофитные сообщества оказались обогащены представителями филы *Actinobacteria* и отдельными семействами других фил, в частности *Proteobacteria*. Кроме того, были выделены рода, доля которых в сообществе сильно варьировала в зависимости от стадии развития растения-хозяина. Авторы работы также отмечают удачный выбор модельного объекта для исследования ризосферного эффекта – *Arabidopsis*, как и другие *Brassicaceae*, не слишком обильно колонизируется микоризообразующими грибами, что создает дополнительную возможность для заселения прокариотическими микроорганизмами этой ниши.

Большинство работ, посвященных исследованию ризосферного эффекта, показало, что наиболее сильное влияние на состав микробиома оказывает тип почвы, из которой

растение производит «рекрутинг» ризосферных микроорганизмов (Lundberg et al., 2012; Piffer et al., 2013). Однако при выращивании в условиях открытого грунта оценить роль типа почв, отделив его от влияния других факторов, таких как климат, было невозможным (Costa et al., 2006). Для подтверждения и иллюстрации этого положения Шрейтер с соавторами (Schreiter et al., 2015) использовали почвы различных типов, характер землепользования которых не изменялся в течение 10 лет. Таким образом в работе были нивелированы факторы климата и аграрной истории и убедительно показано, что именно тип почв является главным фактором, детерминирующим состав ризосферного микробиома.

Применение высокопроизводительного секвенирования в исследованиях ризосферного эффекта позволило убедительно показать роль типа почвы, продолжительности роста и сорта растения (Hardoim et al., 2008; Redford et al., 2010) на таксономический состав микробиомов ризосферы. Во всех исследованиях отмечалось, что наибольшее влияние на ризосферный эффект оказывает именно тип почвы (Lundberg et al., 2012; Schreiter et al., 2015).

Материалы и методы исследования

1. Объекты исследования

Для исследования были отобраны почвы, принадлежащие к группам черноземных и дерново-подзолистых. Выбор данных объектов был обусловлен их контрастными свойствами и широким распространением на территории России. Данные почвы количественно отличаются по общему содержанию органического вещества, гранулометрическому составу и другим физико-химическим показателям. Главной особенностью дерново-подзолистой почвы является высокое содержание катионов водорода и, следовательно, кислая реакция среды. Чернозем, в свою очередь, имеет ярко выраженную структуру, высокую влагоемкость и рН близкий к нейтральному.

Для выявления влияния типа почвы на формирование ризосферного микробиома сравнивались образцы, принадлежащие разным типам почв (контролей) с образцами почв ризосфер всех растений, для выявления видовых и сортовых различий сравнивались образцы почвы ризосфер растений. Различия выявлялись как между отдельными образцами, так и между образцами, объединенными по одному из признаков (тип почвы, вид или сорт растения).

Дерново-подзолистая почва была предоставлена Псковским НИИСХ и совхозом «Родина» Псковской области (координаты точки сбора – 57°50'44.2"N 28°12'03.7"E). Чернозем получен из заповедника «Каменная степь» Воронежской области (51°01'41.6"N 40°43'39.3"E). Расположение точек отбора было зафиксировано с помощью системы GPS.

Отбор почв для проведения экспериментов производился на участках сельскохозяйственного назначения, на разделительных кромках полей (свободных от посевов в течение последних 50 лет), с глубины 3-15 см.

С целью усреднения проб полученная почва была просеяна на грохоте с ячейкой 5мм, подсушена, расфасована в пластиковые сосуды – 5 кг для чернозема и 5,5 кг для дерново-подзолистой почвы. Почва была увлажнена из расчета 75% максимальной влагоемкости.

Семена получены из коллекции ВИР. Сорта пшеницы: по каталогу ВИР К-54609 (далее обозначен как W5) и К-9084(далее обозначен как W2).Сорта ржи: по каталогу ВИР К-6469 (далее обозначен как R1) и К-7856 (далее обозначен как R3).

2. Методы исследования

2.1. Постановка вегетационного опыта

Была произведена закладка вегетационного опыта по культивированию двух контрастных сортов *Triticum aestivum* (Пшеница мягкая) и двух сортов *Secale cereale* (Рожь посевная) в дерново-подзолистой почве и черноземе. В сосуды с почвой вносились семена из расчета 25 на сосуд на глубину 3-5см. На один сорт использовалось по два сосуда с каждым типом почв.

Эксперимент проводился в течение 42 дней. Средняя дневная температура за время проведения эксперимента составляла +13°C, ночная – +4°C. Влажность почвы поддерживалась на уровне 75% от полной влагоемкости.

После завершения вегетационного опыта из каждого сосуда были отобраны по 2 образца корневой массы: отделенные от почвы корни были поделены на 2 части, после чего помещены в 50мл флакон с водой для дальнейшего встряхивания в течении 1 минуты. Таким образом, для каждого варианта опыта было отобрано 4 повторности. Из полученной однородной почвенной суспензии были отобраны по 2 мл для центрифугирования. Осадок был использован для выделения тотальной ДНК ризосферы. Масса почвы, содержащейся на поверхности корня, была определена путем взвешивания корневой массы сразу после отделения от почвы и после отмывки с последующим усреднением результатов. В дальнейшем в качестве контроля использовалась навеска почвы соответствующей массы, после чего она подвергалась тем же процедурам, что и ризосферные образцы. Поскольку во всех случаях бралась ориентировочная навеска почвы, дальнейший анализ включал только качественные характеристики микробных сообществ.

Из образцов почвы была выделена тотальная ДНК. Исследование проводилось на основании разнообразия таксономически значимого маркера V4 участка гена 16S рРНК.

2.3. Выделение и очистка ДНК

Выделение и очистка ДНК производились в соответствии с методикой, разработанной во ВНИИСХМ (Андронов и др., 2011). В ее основе лежит прямой метод экстракции (без предварительного выделения клеточной фракции) - механическое разрушение клеток *in situ*. Разрушение образца производилось на гомогенизаторе FastPrep с использованием высокоскоростного встряхивания по орбите, исключая возникновение стационарно закрученных потоков в пробирке.

При этом выделяется ДНК не только бактерий и архей, но и эукариотических микроорганизмов. Полученная ДНК оказывается значительно фрагментированной (размер фрагментов не превышает 20kb), экстракт содержит примеси, ингибирующие ПЦР, в частности гуминовые кислоты, вследствие чего происходит неспецифическое исключение части молекул ДНК из анализа.

Наибольшую сложность при очистке представляет собой изоляция гуминовых кислот. Очистка полученного препарата ДНК осуществляется посредством электрофоретического разделения молекул с последующей сорбцией-десорбцией путем переосаждения на *Silica* (оксиде кремния).

Необходимо учитывать постоянный риск контаминации на всех этапах работы. С целью минимизации загрязнения рабочих поверхностей, реагентов, воздуха применялся ряд стандартных правил. При проведении ПЦР ставился отрицательный контроль, изначально не содержащий ДНК. Для постановки ПЦР, нанесения препарата ДНК на гель для электрофореза и выделения ДНК использовались три разных набора автоматических пипеток, а сами процессы были пространственно разнесены.

Средняя концентрация ДНК составила 18 нг/мл. Очищенный препарат ДНК использовался в качестве матрицы в реакции ПЦР с универсальными праймерами к переменному участку V4 гена 16S рРНК F515 GTGCCAGCMGCCGCGGTAA и R806 GGACTACVSGGGTATCTAAT (Bates, 2011) с добавлением олигонуклеотидных идентификаторов для каждой пробы и служебных последовательностей, необходимых для секвенирования. Используемые праймеры были сконструированы на основе анализа нуклеотидных последовательностей, как бактерий, так и архей и позволяют амплифицировать фрагмент гена 16S рРНК длиной примерно 400 п.н. Подготовку проб и секвенирование проводили на приборе GS Junior (Roche, США) согласно рекомендациям производителя.

2.3. Биоинформационный анализ данных

Дальнейший анализ полученных по результатам секвенирования нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК производился с использованием программы QIIME (версия 1.8.0). Обработка данных производилась в несколько этапов. Прежде всего была произведена проверка качества полученных нуклеотидных последовательностей. Из списков из анализа были исключены последовательности длиной менее 200 нуклеотидов, имеющие параметр качества прочтения (quality score) менее 25, содержащие неправильно прочитанные последовательности праймеров и мультиплексных идентификаторов (идентификационных последовательностей, маркирующих каждую из проб ДНК), а также про-

тяженные гомополимерные повторы (более 8 нуклеотидов) и неидентифицированные нуклеотиды. Из библиотек были исключены все небактериальные и химерные последовательности, библиотеки были нормализованы по числу последовательностей в библиотеке наименьшего размера (1500 нуклеотидных последовательностей).

Последовательности с процентом сходства, превышающим 97%, объединялись в операционные таксономические единицы, ОТЕ (подробнее см. Раздел 4 Обзора литературы) с использованием алгоритма *de novo* (в основе – метод «uclust»). Из каждой ОТЕ была выбрана одна нуклеотидная последовательность для составления набора репрезентативных нуклеотидных последовательностей. На следующем этапе проводили классификацию репрезентативных последовательностей с использованием программы RDP naïve Bayesian rRNA Classifier и выравнивание по алгоритму PyNast (Caporaso et al, 2010), в качестве матрицы для выравнивания использовали специально сконструированный набор последовательностей – «Greengenes core set» (De Santis et al., 2006). Выровненные последовательности были использованы для построения матрицы дистанций и филогенетического дерева. Для оценки биоразнообразия и проведения сравнительного анализа сообществ были рассчитаны параметры альфа- и бета-разнообразия. Альфа-разнообразие оценивалось с использованием индексов видового богатства (число ОТЕ в образце) и индекса Шеннона. Достоверность различий по индексам альфа-разнообразия среди микробиомов оценивалась с использованием t-теста. Для оценки бета-разнообразия использовался метод «weighted unifrac», позволяющий оценить процент сходств/различий между всеми парами сравниваемых микробиомов (Lozupone et al., 2007). Результаты были представлены с использованием методов многомерной статистики РСоА – principal components analysis (анализ главных компонент), визуализация данных осуществлялась в программе «Emperor».

Для подсчета индексов разнообразия и проведения кластерного анализа использовался критерий Bray-Curtis, вычисления осуществлялись в программе PAST. Статистическая поддержка кластеров вычислялась по методу bootstrap (1000 перестановок) (Hammer et al., 2001).

Различия в частотах таксонов между образцами опыта определялись посредством проведения точного теста Фишера с поправкой на множественные сравнения по процедуре Бенджамини-Хохберга на 5% уровне значимости.

Результаты и обсуждение

В работе были проанализированы микробиомы образцов со следующими сочетаниями факторов:

ДП – дерново-подзолистая почва, контроль

ЧЗ – чернозем, контроль

ДП R1 – ризосфера *Secale cereale* ВИР К-6469 на дерново-подзолистой почве

ЧЗ R1 – ризосфера *Secale cereale* ВИР К-6469 на черноземе

ДП R3 – ризосфера *Secale cereale* К-7856 на дерново-подзолистой почве

ЧЗ R3 – ризосфера *Secale cereale* К-7856 на черноземе

ДП W2 – ризосфера *Triticum aestivum* К-9084 на дерново-подзолистой почве

ЧЗ W2 – ризосфера *Triticum aestivum* К-9084 на черноземе

ДП W5 – ризосфера *Triticum aestivum* К-54609 на дерново-подзолистой почве

ЧЗ W5 – ризосфера *Triticum aestivum* К-54609 на черноземе

Каждый вариант рассмотрен в 4 повторностях.

1. Биоинформационный анализ результатов секвенирования

нуклеотидных последовательностей

По результатам секвенирования было получено 149132 нуклеотидных последовательностей, из которых после проверки качества и фильтрации, описанных в главе «Материалы и методы», в дальнейшем анализе использовалось 119306 – до удаления ОТЕ, представленных менее чем 8 сиквенсами, после их удаления – 100325. Среднее количество нуклеотидных последовательностей в библиотеке на образец составляло 2508.

В задачи исследования входило определение степени влияния типа почвы, вида и сорта растения на формирование ризосферного микробиома. С этой целью были рассчитаны показатели альфа- и бета-разнообразия, также был определен таксономический состав сообщества во всех образцах и выявлены таксоны, достоверно уменьшающие/увеличивающие свою численность в ризосферах исследуемых растений. Для выявления влияния типа почвы на формирование ризосферного микробиома сравнивались образцы, принадлежащие разным типам почв (контролей) с образцами почв ризосфер всех растений. Различия выявлялись как между отдельными образцами, так и между образцами, объединенными по одному из признаков (тип почвы, вид или сорт растения).

Кривые разрежения, показывающие величину выявляемых ОТЕ в зависимости от выборочного усилия (количества просеквенированных нуклеотидных последовательностей)

стей) не достигали плато ни в одном из вариантов опыта (Рис. 1). Чтобы количественно оценить, какую часть сообщества удалось детектировать в эксперименте, наиболее часто используют отношение числа выявляемых ОТЕ к индексу ChaoI, который, в свою очередь, оценивает теоретически возможное количество видов в природном сообществе (генеральной совокупности) и рассчитывается по формуле:

$$\text{Chao1} = S_{\text{obs}} + f_1^2/f_2$$

S_{obs} – число обнаруженных ОТЕ;

f_1 – число видов встреченных 1 раз;

f_2 – число видов встреченных 2 раза.

Среднее для всех образцов выборочное усилие составило 45,26% (Табл.1). Из этого следует, что было охвачено чуть менее половины истинного разнообразия сообществ.

Таблица 1. Показатели альфа-разнообразия с учетом стандартного отклонения (между повторностями)

	ОТЕ	Индекс Шеннона	Chao-1	Филогенетическое разнообразие Фейта (PD Whole Tree)	Выборочное усилие
ДП	1051,5±325,6	5,924±0,192	2198,5±778,3	2,991±0,406	47,83
ЧЗ	1519,8±606,4	6,022±0,440	3100,0±1415,9	2,929±0,2877	49,03
ДП R1	789,5±79,9	5,573±0,172	1751,5±290,0	2,938±0,095	45,08
ЧЗ R1	749,5±197,2	5,336±0,116	1854,8±613,4	3,49±0,208	40,41
ДП R3	836,8±145,0	5,145±0,427	1919,5±273,2	2,936±0,22	43,59
ЧЗ R3	734,5±111,2	5,225±0,344	1643,3±397,0	3,163±0,1703	44,70
ДП W2	557,0±95,7	4,613±0,523	1327,8±226,4	2,574±0,3315	41,95
ЧЗ W2	661,1±56,8	5,381±0,038	1313,0±328,3	3,161±0,44	50,35
ДП W5	611,0±151,8	4,707±0,273	1425,3±294,1	2,436±0,136	42,87
ЧЗ W5	501,5±25,1	5,051±0,200	1070,4±93,9	3,021±0,144	46,85

Такой результат свидетельствует о том, что для того чтобы получить максимально полную картину таксономического разнообразия микробного комплекса, необходимо уве-

личить число анализируемых нуклеотидных последовательностей, по крайней мере, в 2-3 раза.

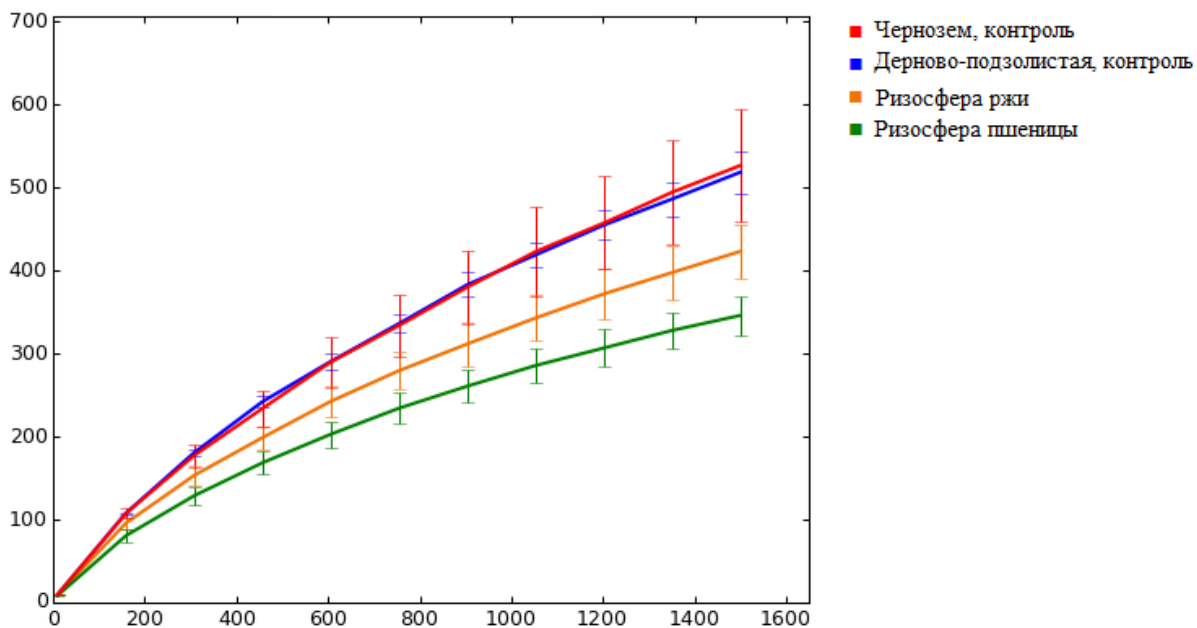


Рисунок 1. Кривые разрежения, построенные для анализируемых микробиомов. По оси абсцисс – число последовательностей в образце. По оси ординат – наблюдаемые ОТЕ.

В ходе анализа повторностей каждого варианта опыта было рассчитано число таксонов, доли которых достоверно не различаются между повторностями. В Таблице 2 указан процент, который занимают в сообществе последовательности, принадлежащие к таким ОТЕ, в среднем он составляет для дерново-подзолистой почвы – 77%, для чернозема – 62%. Таким образом, часть таксонов достоверно не воспроизводится в повторностях, при этом, по всей видимости, воспроизводимость опыта в повторностях сильно зависит от типа почв и уровней биоразнообразия микроорганизмов. При попарном сравнении долей «воспроизводимых» таксонов сообществ исходных почв и сообществ в варианте с одним из сортов растения, выращенного на разных типах почв – ЧЗ/ДП, ЧЗ R1/ДП R1, ЧЗ R3/ДП R3, ЧЗ W2/ДП W2, ЧЗ W5/ДП W5 – наблюдаемая воспроизводимость данных в случае дерново-подзолистых почв во всех группах сравнения оказывается выше, чем для черноземных (Рис. 2, Табл. 2).

Таблица 2. Достоверные различия между повторностями опыта.

Вариант	Доля таксонов, обнаруженных во всех 4 повторностях, % в сообществе	Доля таксонов, достоверно не изменяющих численность в 4 повторностях, % в сообществе
ЧЗ	76,3	69,3
ЧЗ W2	82,7	46,3
ЧЗ W5	81	59,3
ЧЗ R1	81,6	61,4
ЧЗ R3	82,3	73,7
ДП	78,0	87,6
ДП W2	76,4	69,7
ДП W5	78,1	68
ДП R1	80,1	83,2
ДП R3	84,1	78,1

Из приведенных выше данных следует, что при анализе микробиомов черноземных почв число повторностей должно быть увеличено, по меньшей мере, до 7, а в случае дерново-подзолистой почвы можно ограничиться и 5-6 повторностями.

Стоит отметить, что воспроизводимость данных сильно зависит и от самой природы изучаемого объекта, а не только от глубины секвенирования. Почва является крайне гетерогенным объектом. Микробные сообщества почвы различаются даже в пределах нескольких миллиметров, а также в различных участках почвенных агрегатов и между горизонтами (Ивлев, 2005). Поэтому для исчерпывающего описания этого сложного природного объекта число повторностей, по всей вероятности, должно быть намного выше.

Стоит также отметить, что в данном исследовании мы приняли достаточно строгий критерий воспроизводимости данных секвенирования, при котором доля таксона не должна достоверно различаться между повторностями. Если принять за критерий воспроизводимости данных просто наличие таксона в повторности, воспроизводимость данных будет значительно выше, в среднем –72,34% (Табл. 2)

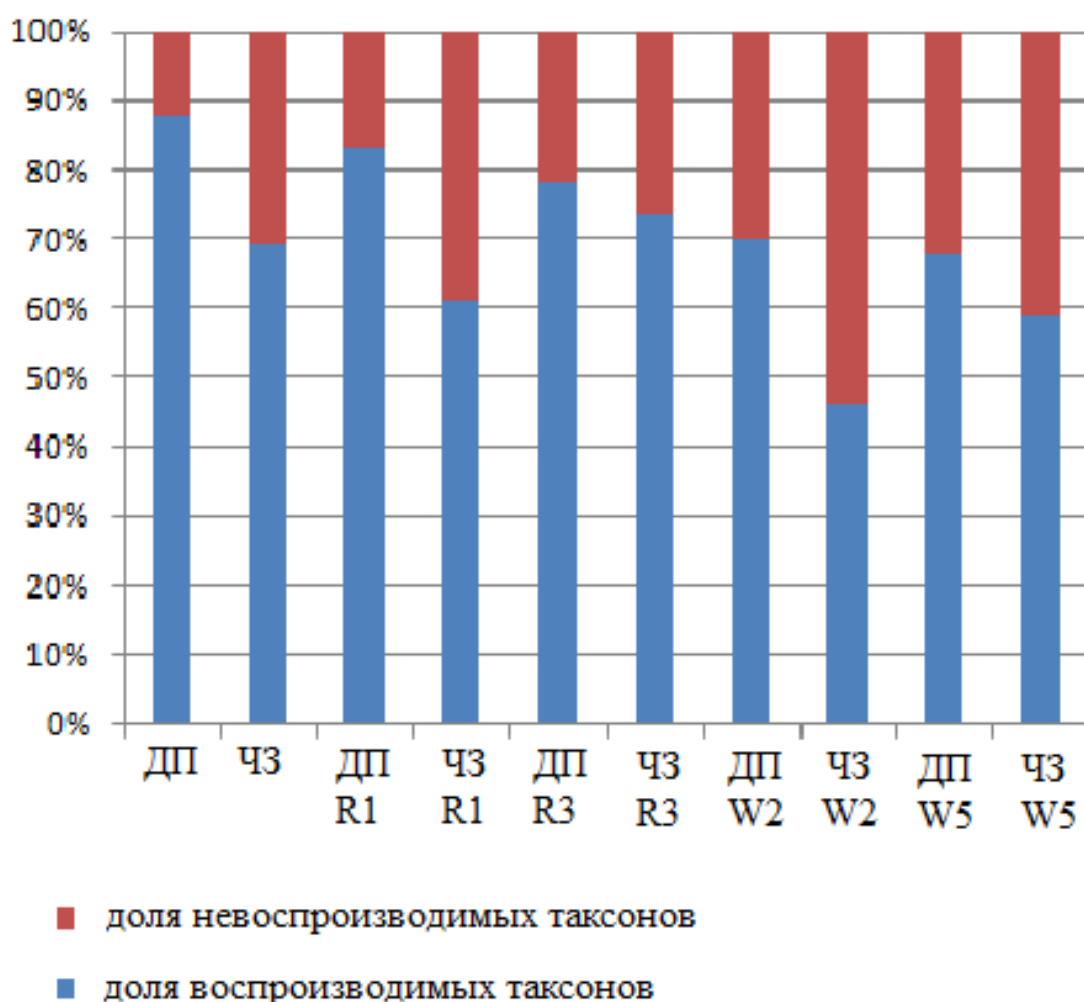


Рисунок 2. Воспроизводимость данных секвенирования. По оси ординат – доля ОТЕ в обнаруженном сообществе в пересчете на соответствующее им число нуклеотидных последовательностей.

2. Метагеномная характеристика ризосферного эффекта.

Для оценки ризосферного эффекта были проанализированы традиционные параметры альфа-разнообразия для восьми ризосферных и двух контрольных сообществ с учетом таксонов, воспроизводимых в повторностях, был проведен анализ бета-разнообразия по результатам кластерного анализа РСоА по трем факторам, влияющим на формирование микробного сообщества ризосферы, – типу почвы, виду и сорту растения, а также анализ таксономического состава сообществ с учетом таксонов, достоверно изменяющих свою долю в сообществах.

2.1. Анализ показателей альфа-разнообразия.

Для оценки альфа-разнообразия были рассчитаны индекс видового богатства и индекс Шеннона (Табл.1). Максимальное число ОТЕ обнаружено в сообществах исходных почв, в микробиомах ризосферных почв количество выявляемых ОТЕ значительно снижается. Показатель Шеннона также снижается в ризосферах по сравнению с контрольными почвами, однако не везде эти различия достоверны. Снижение разнообразия микробного сообщества в ризосфере, скорее всего, связано с селективным действием растения, однако в ряде исследований этой тенденции не было обнаружено. В частности, в ряде работ было показано, что достоверно индексы разнообразия ризосферных сообществ не отличаются от индексов разнообразия сообществ исходных почв как в случае анализа разных почв и сортов (Chaparro et al., 2014; Edwards et al., 2015), так и в случае анализа ризосфер растений разного возраста (Chaparro et al., 2014).

Показатели индекса Шеннона свидетельствуют о большем разнообразии микробиомов чернозема как в случае контрольных образцов почвы, не подверженной влиянию растения, так и при попарном сравнении микробиомов ризосферной почвы одного вида и сорта растения с микробиомами контрольных вариантов дерново-подзолистой почвы. Разнообразие микробных комплексов было ниже в дерново-подзолистых почвах, как в случае контрольных вариантов, так и в ризосфере. По-видимому, это связано со специфическим химизмом этих почв, в частности, низким содержанием в них органического вещества (Добровольский, 2005). Из приведенных результатов (Табл. 1) видно, что именно тип почвы оказывает наибольшее влияние на состав формируемого сообщества.

Наименьшее разнообразие, согласно показателям видового богатства и индекса Шеннона, обнаруживается в сообществах ризосферы пшеницы на обоих типах почв. Достоверные различия в показателях альфа-разнообразия были обнаружены только для сооб-

ществ ризосферы пшеницы на черноземной почве (ЧЗ W5; ЧЗ W2) – значения индексов разнообразия достоверно ниже, чем у сообществ исходного чернозема.

Однако более весомым показателем является показатель филогенетического разнообразия Фейта. В основе расчета данного индекса лежит анализ филогенетического древа найденных в ходе анализа ОТЕ. В качестве меры разнообразия здесь используется, условно говоря, суммарная длина всех ветвей. Таким образом, в случае если каждая новая ОТЕ будет филогенетически близка другой ОТЕ в образце, увеличение разнообразия будет незначительным. Тем не менее, если последующая ОТЕ окажется «далеким родственником» остальным ОТЕ, обнаруженным в образце, разнообразие существенно увеличится. Значение данного показателя было практически одинаковым для микробных сообществ контрольной дерново-подзолистой почвы и ризосферного сообщества дерново-подзолистой почвы в варианте с выращиванием ржи. При этом в ризосфере пшеницы, выращенной на почве того же типа, величина данного индекса была достоверно ниже, что может быть следствием сравнительно большей селективной роли корневых экссудатов пшеницы при формировании ассоциативного микробного комплекса ризосферных микроорганизмов. Для ризосферного сообщества чернозема показана тенденция к увеличению филогенетического разнообразия микробиома при уменьшении общего числа ОТЕ, при этом ризосферный микробиом включает широкий спектр микроорганизмов, в частности бактерий фил *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* и др. (см. Раздел 2.3. Анализ таксономической структуры сообществ).

2.2. Анализ показателей бета-разнообразия (кластерный анализ PCoA).

2.2.1. Сравнение сообществ чернозема и дерново-подзолистой почвы

На рисунке 3 представлены данные PCoA анализа почвенных контрольных и ризосферных образцов. Наблюдаются значительные различия между образцами черноземов и дерново-подзолистых почв, как в случае контрольных образцов, так и в почвах ризосферы растений. Кластер исходных образцов дерново-подзолистой почвы выделяется наиболее четко, что соответствует малому количеству достоверных различий между повторностями. В кластере чернозема наблюдается выраженный разброс по повторностям, при этом разделение на ризосферные и контрольные образцы проявляется не столь ярко.

Таким образом наглядно продемонстрировано наличие выраженного ризосферного эффекта, при этом степень его выраженности на разных почвах отличается: повторности ризосферных образцов на дерново-подзолистой почве демонстрируют большее сходство,

нежели повторности ризосферных микробиомов чернозема, что является ожидаемым результатом с учетом большего разнообразия микроорганизмов в черноземных почвах. При этом ризосферные сообщества, сформированные на различных типах почв, также существенно различаются между собой.

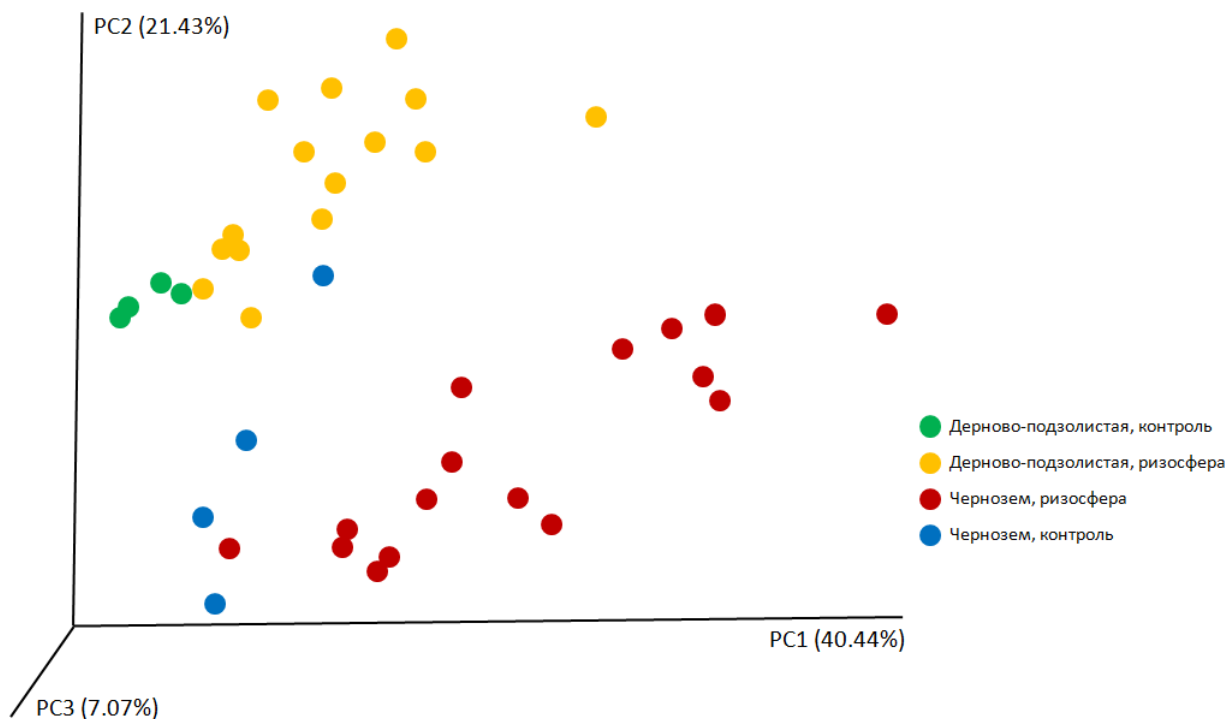


Рисунок 3. Анализ главных компонент (РСоА) для микробных сообществ с обозначением контрольных и ризосферных образцов. На осях указан процент объясненной вариации.

2.2.2. Влияние вида растения на формирование ризосферного микробиома

На Рисунке 4 представлены данные РСоА анализа почвенных контрольных и ризосферных образцов с цветовым обозначением видов анализируемых растений. Наблюдаются значительные различия между образцами черноземов и дерново-подзолистых почв, как в случае контрольных образцов, так и в почвах ризосферы растений. Показано, что ризосферные сообщества формируют по 2 кластера, соответствующие виду растения (рожь на дерново-подзолистой почве/пшеница на дерново-подзолистой почве, рожь на черноземе/пшеница на черноземе) (Рис.4). Заметно выделяются группы ризосферы ржи и пшеницы на дерново-подзолистой почве, т.е. разные растения в определенной степени модифицируют почвенный микробиом. Однако выявляемые различия между ризосферными со-

обществами различных видов культурных растений, проявляются только на уровне тенденции. Таким образом, по сравнению с влиянием типа почвы, воздействие растения на состав формируемого в ризосфере сообщества, выражено в значительно меньшей степени. Причиной этого может быть недостаточная длительность проводимого эксперимента. С целью выявления более значительных изменений в структуре ризосферного микробиома требуется проведение более долгосрочного опыта, или же мониторинг растений в природных условиях для выявления более устойчивой зависимости. Также известным фактом является влияние онтогенетической стадии растения на состав микробиома (Bais et al., 2006), которое также должно быть учтено при обсуждении межвидовых различий в составе ризосферного микробиома. Такого рода исследования планируются нами в ходе дальнейшей работы.

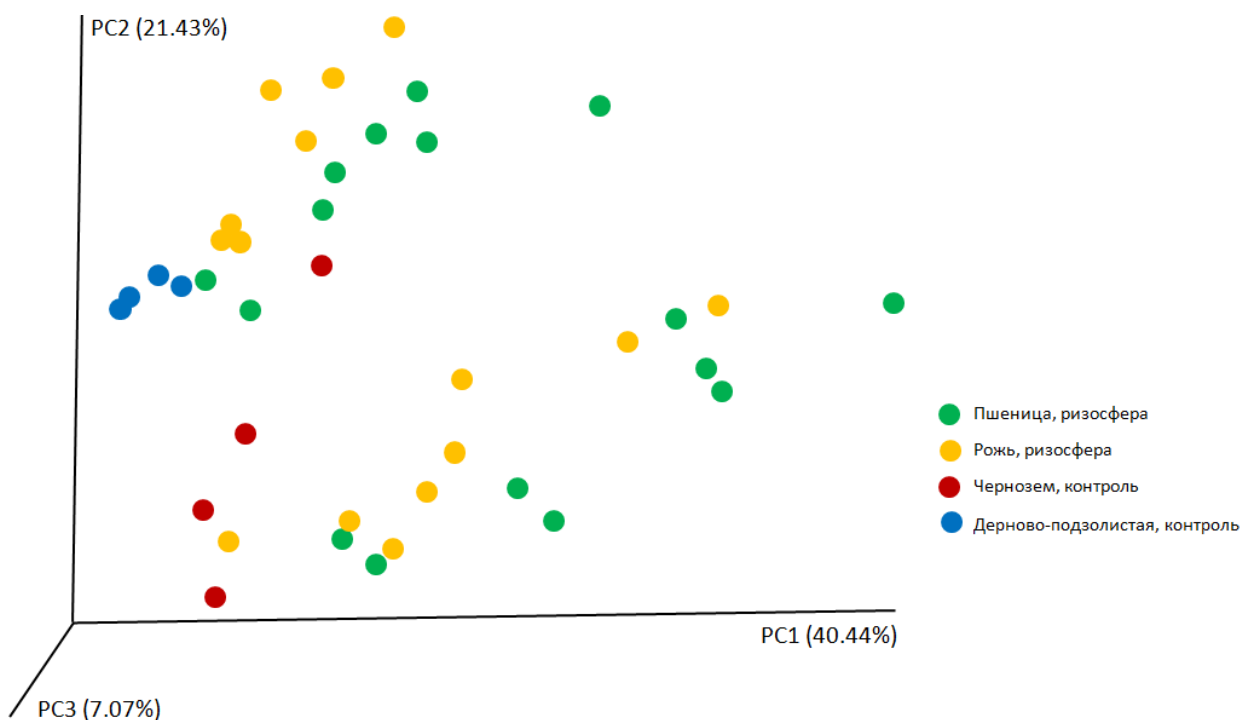


Рисунок 4. Анализ главных компонент (РСоА) для микробных сообществ с обозначением контрольных и ризосферных образцов различных видов культурных растений. На осях указан процент объясненной вариации.

2.2.3. Влияние сорта растения

На Рисунке 5 приведены результаты РСоА анализа для выявления различий в таксономической структуре микробиома между различными сортами растений. Более четкие

кластеры формируются при анализе ризосферных микробиомов сортов, выращенных на дерново-подзолистой почве. Отмечено, что разные сорта модифицируют состав сообществ в разной степени. Эти различия подтверждаются высоким процентом объясненной вариации данных (40,44%). Уровень кластеризации, как и в описанном выше анализе влияния различных видов растений на состав формируемых микробиомов, выше на дерново-подзолистой почве. «Группирующий» эффект дерново-подзолистой почвы может быть связан с меньшим разнообразием ее сообществ, их меньшей гетерогенностью по сравнению с черноземом, следовательно, можно предположить, что в случае дерново-подзолистых образцов посредством полученной выборки удалось извлечь большую часть разнообразия.

Для того чтобы утверждать, что кластеризация образцов дерново-подзолистой почвы выражена сильнее, нежели кластеризация черноземных образцов, необходимо в дальнейшем увеличить число повторностей для черноземных образцов, а также проанализировать большее число сортов.

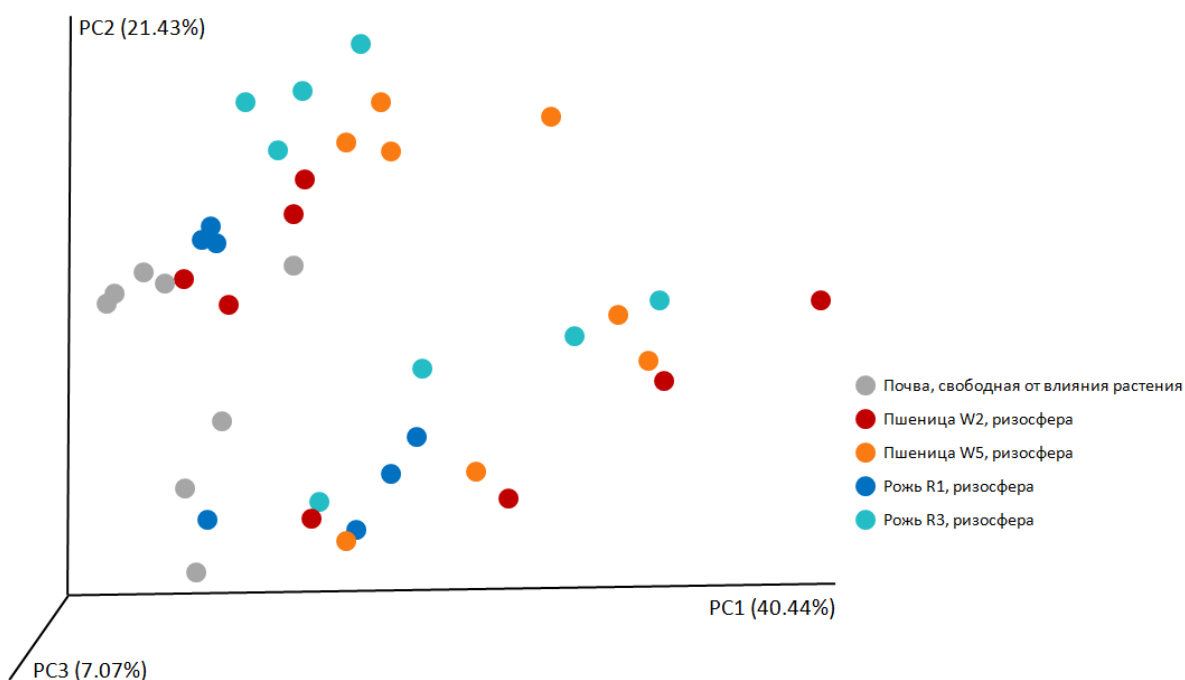


Рисунок 5. Анализ главных компонент (РСоА) для микробных сообществ с обозначением контрольных и ризосферных образцов различных видов культурных растений. На осях указан процент объясненной вариации.

Таким образом, мы можем заключить, что наиболее сильным фактором формирования ризосферного микробиома является тип почвы, менее выражено влияния видов и

сортов растений. Стоит подчеркнуть, что все различия, обнаруживаемые нами при анализе графиков РС₀A, имеют высокие значения статистической поддержки – процент объясненной вариации данных всегда превышает 40%.

2.3. Анализ таксономической структуры сообществ

Преобладающим в сообществах является домен *Bacteria*, однако *Archaea*, представленный филой *Crenarchaeota*, составляет значительную долю микробиома – 11% в случае черноземных и 5% в случае дерново-подзолистых образцов. Это соотношение практически не изменяется при рассмотрении ризосферных сообществ. 0,9% ОТЕ не были идентифицированы даже до уровня домена.

В таксономическом составе контрольных почвенных и ризосферных микробиомов доминировали бактерии из фил *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria* и археи из филы *Crenarchaeota*. В составе ризосферного микробиома на черноземе наблюдается увеличение доли филы *Proteobacteria*, тот же эффект присутствует даже в большей степени и у ризосферных образцов на дерново-подзолистой почве. Аналогичная ситуация наблюдается в случае с *Bacteroidetes*. Доля представителей фил *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi* и *Actinobacteria* напротив, сократилось при сравнении обоих типов контрольных почв с сообществами ризосферной почвы.

На уровне классов в ризосферах наблюдается значительное увеличение числа *Sphingobacteriia* (*Bacteroidetes*) с 0.6 до 8% на черноземе и с 0.6 до 6.4% на дерново-подзолистой, *Betaproteobacteria* (*Proteobacteria*) с 6.8 до 19.4% на дерново-подзолистой почве и с 8.4 до 16.9%..

При сравнении между собой микробиомов ризосфер ржи и пшеницы хорошо заметно, что ризосферные сообщества ржи в меньшей степени отличаются от контрольных, нежели сообщества пшеницы. Следовательно, на уровне тенденции можно обозначить более выраженный ризосферный эффект в случае пшеницы. Итак, таксономическая структура ризосферного микробиома отличается в различных типах почв, а группа ассоциативных микроорганизмов ризосферы гораздо шире, чем она воспринималась ранее, так как в ризосферных сообществах присутствует огромное количество некультивируемых форм, функции и роль в жизни растений для которых еще предстоит установить.

Для выявления достоверных различий в микробиомах контрольных и ризосферных почв на уровне семейства и рода, использовались только те таксоны, доля которых достоверно не различалась между повторностями (Табл. 2, Рис.6, 7). В частности, в ризосфере

ржи наблюдалось достоверное уменьшение доли бактерий семейств *Oxalobacteraceae* на обоих типах почв (на дерново-подзолистой почве более чем в 12 раз и более чем в 5 раз на черноземе), *Micrococcaceae* (на дерново-подзолистой более чем в 2 раза, на черноземе – более чем в 4 раза), а в ризосфере пшеницы – уменьшение в сообществе доли семейства *Oxalobacteraceae* и достоверное увеличение доли *Acidobacteria*.

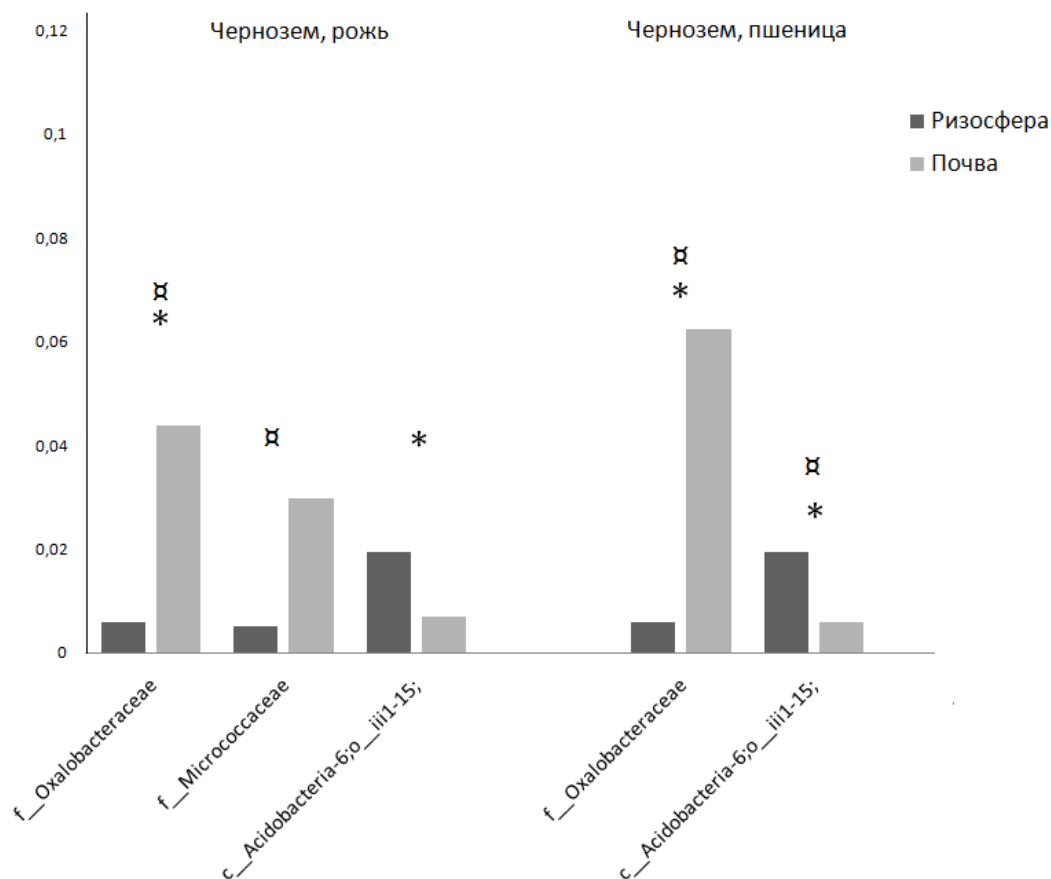


Рисунок 6. Качественный состав и доля в сообществе таксонов, достоверно изменяющих свою численность в ризосферах анализируемых растений. По оси ординат – доля в сообществе, * отмечены микроорганизмы, присутствующие на данном типе почв в ризосферах обоих видов, ☒ отмечены микроорганизмы, присутствующие на обоих типах почв в ризосфере одного из видов.

При рассмотрении ризосферного микробиома ржи, выращенной на дерново-подзолистой почве, наблюдается достоверное увеличение доли представителей сем. *Gaiellaceae*, *Comamonadaceae* и пор. *Solirubrobacterales*, в сообществе пшеницы при тех же условиях увеличилась доля групп *Gaiellaceae* и *Acidobacteria* (Рис.7).

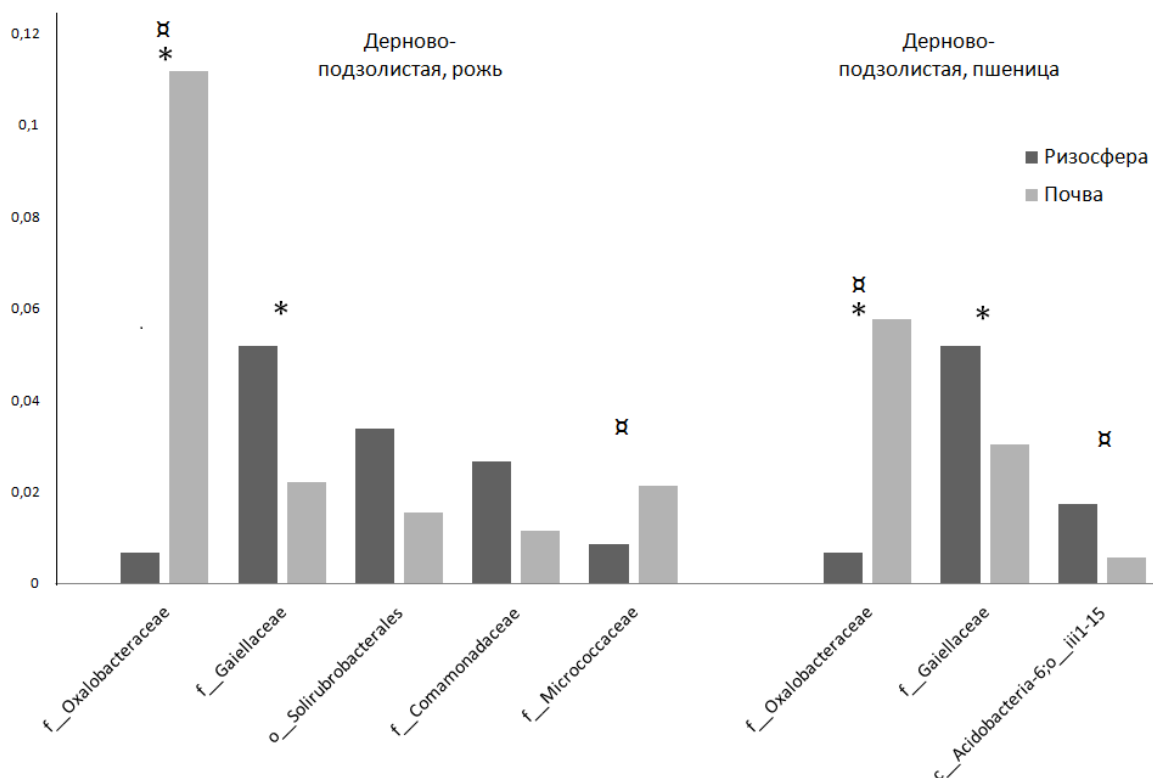


Рисунок 7. Качественный состав и доля в сообществе таксонов, достоверно изменяющих свою численность в ризосферах анализируемых растений. По оси ординат – доля в сообществе, * отмечены микроорганизмы, присутствующие на данном тип почв в ризосферах обоих видов, □ отмечены микроорганизмы, присутствующие на обоих типах почв в ризосфере одного из видов

При сравнении ризосфер ржи и пшеницы (Рис.8) на черноземе отличия были выявлены в группах *Micrococcaceae* и *Pedobacter*, чья доля в сообществе достоверно выше для ризосферы ржи, а также был отмечен род *Delftia*, достоверно увеличивающий свою долю в ризосфере пшеницы на обоих типах почв. На дерново-подзолистой почве большее число групп показало достоверные различия в вариантах опыта. Так, в ризосфере пшеницы доля представителей *Comamonadaceae*, *Pedobacter*, *Rhodoplanes* и вышеупомянутого рода *Delftia* достоверно выше, нежели в ризосфере ржи на той же почве. В ризосфере ржи на дерново-подзолистой почве обнаружена сравнительно большая доля представителей *Sphingobacteriaceae* и *Oxalobacteriaceae*. Интересно, что тенденция к уменьшению в ризосферных сообществах доли сем. *Oxalobacteriaceae* на обоих типах почв (Рис.6,7), более выражена под влиянием пшеницы, что, по-видимому, связано со значительно большим селективным действием ее корневых экссудатов. Эти данные согласуются со значениями показателя филогенетического разнообразия Фейта (Табл.1).

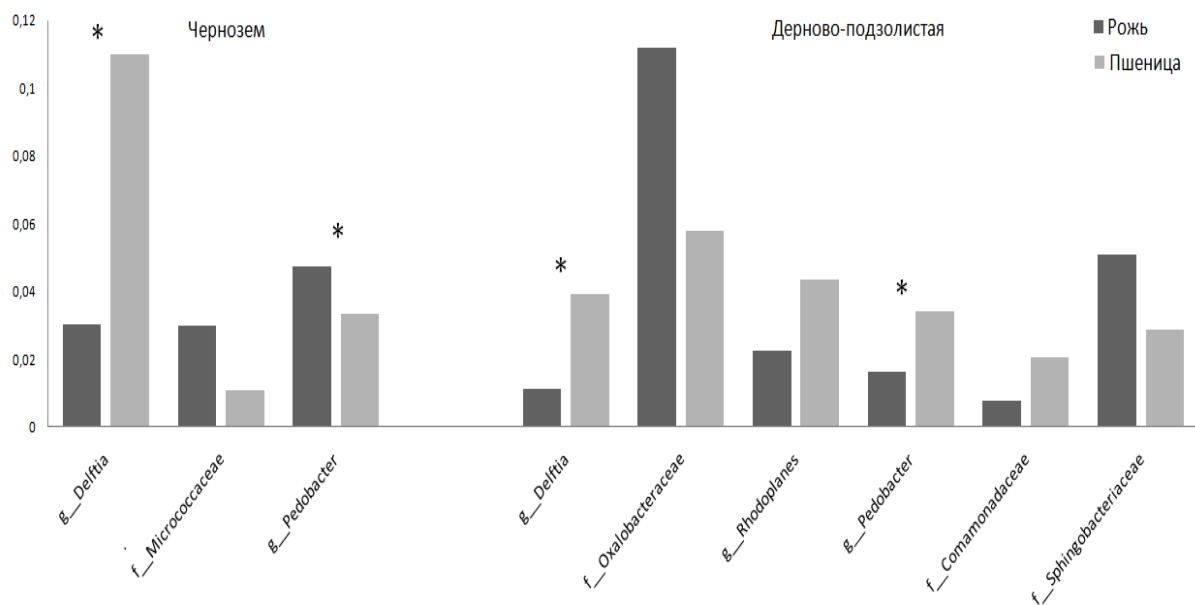


Рисунок 8. Качественный состав и доля в сообществе таксонов, достоверно изменяющих свою численность в ризосферах ржи и пшеницы. По оси ординат – доля в сообществе, * отмечены микроорганизмы, численность которых достоверно различается между ризосферами обоих видов на обоих типах почв.

Сравнение различных сортов одного вида растения (Рис. 9,10) при прочих равных условиях показало наличие достоверных различий в структуре их микробиомов. Так, между сортами ржи на черноземной почве достоверные различия долей в сообществе выявлены в группах *Chthoniobacteraceae* и *Delftia*. При аналогичном сравнении сортов пшеницы – в группах *Oxalobacteraceae* и *Pedobacter*.

Сравнение микробиомов, сформировавшихся на дерново-подзолистой почве (Рис.10), как и при анализе влияния на состав сообщества типа почвы (Рис.7), показало больше достоверно отличающихся групп микроорганизмов. так, сорта ржи в значительной степени отличаются по содержанию в сообществах таких микроорганизмов, как *Oxalobacteraceae* (4 и 18% в R1 и R3 соответственно), в меньшей степени – *Candidatus Nitrososphaera*, *Chitinophagaceae*. Контрастные сорта пшеницы демонстрируют различия в долях *Bacillales*, *Sphingobacteriaceae*, *Candidatus Nitrososphaera*, *Delftia* и *Janthinobacterium*.

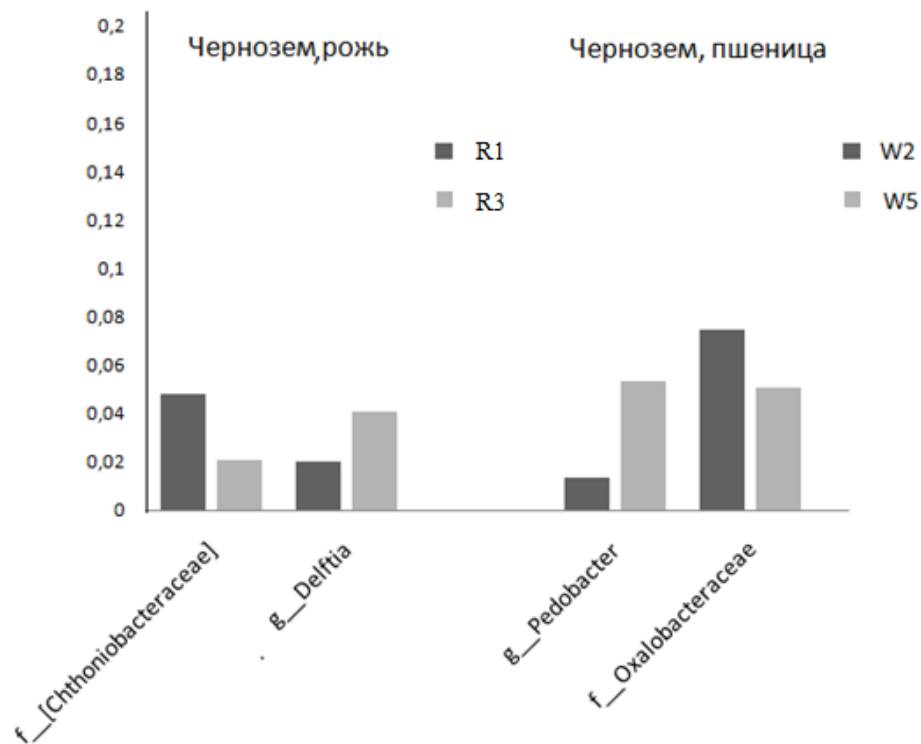


Рисунок 9. Качественный состав и доля в сообществе таксонов, достоверно изменяющих свою численность сортспецифично. По оси ординат – доля в сообществе.

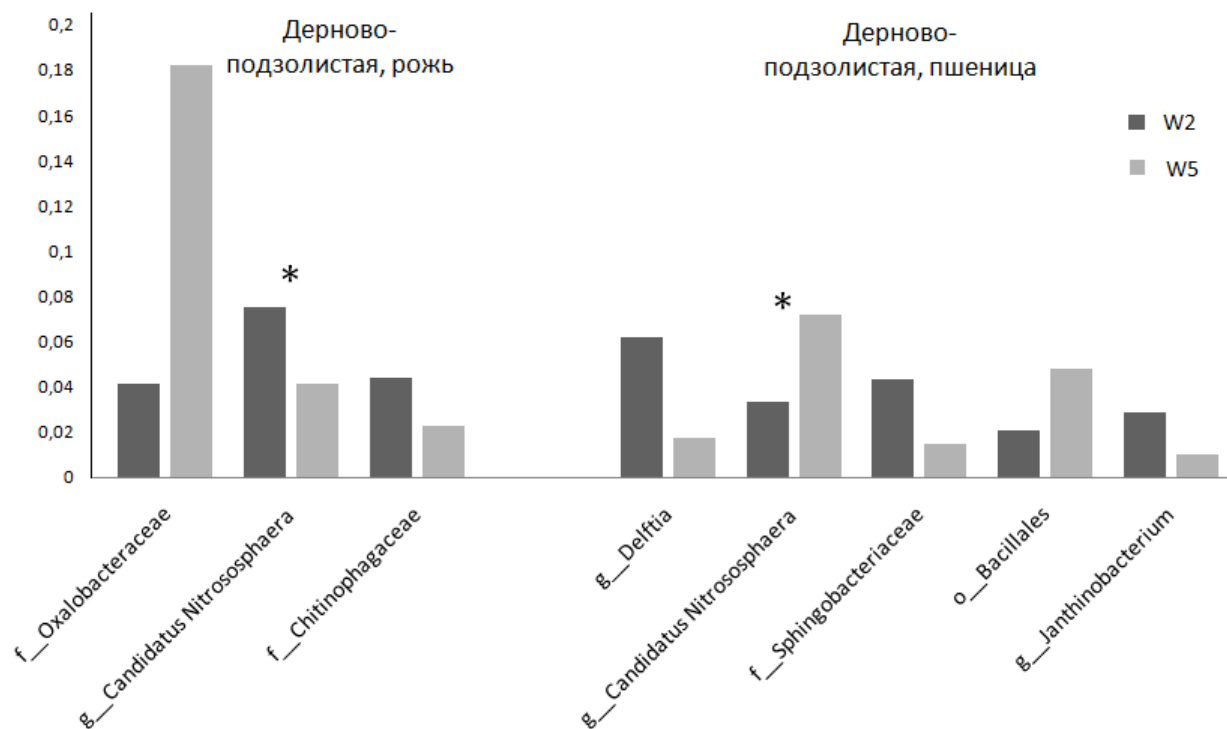


Рисунок 10. Качественный состав и доля в сообществе таксонов, достоверно изменяющих свою численность сортспецифично. По оси ординат – доля в сообществе.

Итак, выявление групп организмов, доля которых в сообществе ризосферы различных сортов одного вида достоверно отличается, свидетельствует наличии сортспецифичности микробных сообществ ризосферы. Сравнительный анализ микробиомов различных сортов культурных растений может быть использован для поиска и селекции линий, наилучшим образом реагирующих на конкретный тип почвы, что может значительно способствовать увеличению продуктивности и устойчивости к патогенам в рамках концепции адаптивного земледелия.

Заключение

Данная работа представляет собой первый этап в выявлении закономерностей формирования ризосферного микробиома в зависимости от типа почвы, а также от вида и сорта растения.

Следует отметить, что на основании расчетов выборочного усилия было охвачено чуть менее половины истинного разнообразия сообществ, что объясняет значительные отличия между повторностями. При сравнении выявленных в повторностях микробиомов были обнаружены достоверные различия, что, по всей вероятности, обусловлено низкой глубиной секвенирования, а также высокой степенью структурной гетерогенности почвы. На основании этих данных был сделан вывод о необходимости увеличения числа повторностей для наиболее точного описания структуры сообществ, при этом величина выборочного усилия должна определяться отдельно для каждого типа почв.

Традиционный экологический анализ показателей разнообразия показал, что основным фактором, влияющим на разнообразие ризосферных микробиомов, является тип почвы, в меньшей степени влияние на состав микробиомов ризосферы оказывают вид и сорт культивируемых растений.

Среди выявленных таксонов в «ризосферном эффекте» достоверно принимают участие микроорганизмы, принадлежащие к группам *Comamonadaceae*, *Solirubrobacterales*, *Gaiellaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Acidobacteria*, *Micrococcaceae* и др., при этом часть их присутствовала как в ризосфере ржи, так и в ризосфере пшеницы, в частности *Oxalobacteraceae*, *Gaiellaceae*, *Acidobacteria*.

В ходе дальнейших исследований нами планируется предварительный учет разнообразия нативного микробиома почвы для увеличения детектируемой части сообщества с помощью увеличения числа повторностей. Другим интересным направлением представляется изучение влияния на «рекрутируемые микробиомы» стадии онтогенетического развития растения, а также увеличение числа сортов для подтверждения некоторых выявленных в данной работе тенденций.

Таким образом, в работе показано, что для интерпретации метагеномных данных недостаточно проведения одного опыта, а необходим ряд предварительных экспериментов, выявляющих определенный круг проблем, таких, к примеру, необходимая и достаточная величина выборки. Вместе с тем в ходе работы были получены результаты, которые будут использованы для оптимального планирования будущих экспериментов в данном исследовательском направлении.

Выводы

1. Показатели альфа разнообразия снижались в ризосферных почвах по сравнению с контрольными. Достоверные различия в показателях альфа разнообразия были выявлены для ризосфер пшеницы на черноземной почве.
2. В ходе анализа бета разнообразия было показано, что определяющее влияние на формирование ризосферного микробиома оказывает тип почвы, вид и сорт растения оказывают заметно меньшее воздействие.
3. В таксономическом составе контрольных почвенных и ризосферных микробиомов доминировали бактерии из фил *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* и археи из филы *Crenarchaeota*. В сообществе ризосфер обоих растений увеличивалась доля бактерий из фил *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*.
4. В случае дерново-подзолистой почвы, в ризосфере ржи достоверно увеличивают свою долю микроорганизмы из групп *Comamonadaceae*, *Solirubrobacterales*, и *Gaiellaceae*, в ризосфере пшеницы – *Gaiellaceae* и неидентифицированные представители класса *Acidobacteria-6*. Микроорганизмы, относящиеся к группе *Acidobacteria-6*, также увеличивают свою долю в ризосфере ржи и пшеницы, культивируемых на черноземе.
5. Были обнаружены микроорганизмы, которые достоверно изменяют свою долю как в ризосфере ржи, так и пшеницы среди них бактерии из семейств *Oxalobacteraceae*, *Gaiellaceae* и класса *Acidobacteria-6*. На обоих типах почв наблюдалось снижение доли бактерий из семейства *Oxalobacteraceae* в почвах ризосферы обоих растений по сравнению с контрольной почвой.

Список литературы

1. Андронов Е.Е., Пинаев А.Г., Першина Е.В., Чижевская Е.П. Научно-методические рекомендации по выделению высокоочищенных препаратов ДНК из объектов окружающей среды. СПб, 2011
2. Боронин А. М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений //Соросовский образовательный журнал. – 1998. – Т. 10. – С. 25-31.
3. Добровольский Г. В. Почвы речных пойм центра Русской равнины. 2-е изд., перераб. и доп.–М.: Изд-во МГУ, 2005.–293 с. – 2005.
4. Доросинский Л. М. Клубеньковые бактерии и нитрагин. Л.: Колос, 1970. 191С.
5. Еникеева М. Г., Руднева В. Л., Сизова Т. П. О микофлоре сосняков разных типов. 1. видовой состав и представленность видов //Vestnik. – 1960. – С. 100.
6. Жебрак И.С., Скоробогатова Р.А., Кожевин П.А. Динамикапопуляции *Corynebacterium glutamicum* в почве и корневой зоне растений //Вест. МГУ им. М.В. Ломоносова. Сер 17. Почвоведение, – 1998. С48-51.
7. Жуковская П. Н. Состав ризосферных микроорганизмов культурных растений //Труды Всесоюзного научно-исследовательского института удобрений, агротехники и агропочвоведения им. К. К-Гедройца. – 1949. – №. 29.
8. Ивлев А. М. Эволюция почв // Владивосток. – Изд. Дальневосточного университета.–2005.–97 с. – 2005.
9. Израильский В.П., Рунов Е.В., Бернанд В.В. Клубеньковые бактерии и нитрагин. М.: Сельхозгиз, 1933. 232 с.
10. Калакуцкий Л. В., Парийская А. Н. Азотфиксирующие симбиозы актиномицетов с растениями //Изв. АН СССР. Сер.биол. – 1982. – №. 2. – С. 255-270.
11. Кордюм В.А., Мошинец Е.В., Цапенко М.В., Адамчук-Чалая Н.И., Иродов Д.М., Андриенко В.И. Микроорганизмы ризосферы – полный мониторинг // Почвоведение. – 2008. – Т. 9, № 1–2. – С. 53–63.
12. Корляков К.А., Арсентьева Н.Ю., Нохрин Д.Ю. Влияние сложности рельефа стекол на формирование монокультур микроорганизмов // Вестник уральской медицинской академической науки, 2011, № 4/1 (38). С. 35
13. Куан Ч. М., Егоров М. А. исследование ростостимулирующей активности штамма рода *Bacillus*, выделенного из клубеньков *Vigna cylindrical* //Журнал издается с 1999 г. – 1999. – С. 106.

14. Мишустин Е. Н. Географический фактор, почвенные типы и их микробное население //Микрофлора почв северной и средней части СССР. М.: Наука. – 1966. – С. 3-23.
15. Полянская Л. М., Оразова М. Х., Звягинцев Д. Г. Гетерогенность корня как местообитания микроорганизмов //Микробиология. – 1994. – Т. 63. – №. 4. – С. 706-714.
16. Першина Е.В., Андронов Е.Е., Самосоров Г.Г., Семенов А.Н. Генное досье микробиома //Наука из первых рук . 2013. №1
17. Порозов, Ю., Дольник, А., Тамазян, Г., Першина, Е., Вяткина, К., Пинаев, А. Г., & Андронов, Е. Е. Концепция универсальной ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ таксономической системы бактерий: эволюционное пространство гена 16S-rРНК V. 1.0. //Сельскохозяйственная биология. – 2012. – №. 5.
18. Проворов Н. А., Воробьев Н. И. Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза //ИА Тихоновича. СПб.: Информ-Навигатор. – 2012.
19. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии. – Минск: Высшая школа, 1986.
20. Сергеева Р. В. Основные формы ризосферных бактерий и динамика их развития на поверхности корней помидоров //Труды Плодоовощного ин-та им. Мичурина. – 1960. – Т. 11. – С. 169-171.
21. Тихонович И. А., Проворов Н. А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего //СПб.: Изд-во СПбГУ. – 2009.
22. Умаров М. М. Ассоциативная азотфиксация в биогеоценозах //Почвенные организмы как компонент биогеоценоза. М.: Наука. – 1984. – С. 185-199.
23. Шапошников А.И., Белимов А.А., Кравченко Л.В., Виванко Д.М. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 3. С. 16–22.
24. Шильникова В. К. Процесс инфицирования бобового растения клубеньковыми бактериями //Биол. азот в сельском хозяйстве СССР.–М.: Наука. – 1989. – С. 46-52.
25. Широких А. А., Мерзаева О. В., Широких И. Г. Методические подходы к изучению микроорганизмов прикорневой зоны растений (обзор) //Сельскохозяйственная биология. – 2007. – №. 1.
26. Яковлева З. М., Мишустин Е. Н. Бактероиды клубеньковых бактерий. – Наука, 1975. 172С.

27. Arkhipova T. N. et al. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants //Plant and Soil. – 2005. – T. 272. – №. 1-2. – C. 201-209.
28. Badri D. V., Vivanco J. M. Regulation and function of root exudates //Plant, Cell & Environment. – 2009. – T. 32. – №. 6. – C. 666-681.
29. Bais H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms //Annu. Rev. Plant Biol. – 2006. – T. 57. – C. 233-266.
30. Bates S. T. et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil //The ISME journal. – 2011. – T. 5. – №. 5. – C. 908-917.
31. Berendsen R. L., Pieterse C. M. J., Bakker P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health //Trends in plant science. – 2012. – T. 17. – №. 8. – C. 478-486.
32. Böckelmann U., Lünsdorf H., Szewzyk U. The detection of extracellular DNA as a structural component in the EPS of bacterial strains //Geophys Res Abstr. – 2007. – T. 9. – C. 01325.
33. Bonito G. et al. Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants //Molecular ecology. – 2014. – T. 23. – №. 13. – C. 3356-3370.
34. Bulgarelli D. et al. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota //Nature. – 2012. – T. 488. – №. 7409. – C. 91-95.
35. Bulgarelli D. et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants //Annual review of plant biology. – 2013. – T. 64. – C. 807-838.
36. Caporaso J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data //Nature methods. – 2010. – T. 7. – №. 5. – C. 335-336.
37. Chaparro J. M., Badri D. V., Vivanco J. M. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development //The ISME journal. – 2014. – T. 8. – №. 4. – C. 790-803.
38. Cohan F. M. What are bacterial species? //Annual Reviews in Microbiology. – 2002. – T. 56. – №. 1. – C. 457-487.
39. Cohan F. M., Perry E. B. A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity //Current Biology. – 2007. – T. 17. – №. 10. – C. R373-R386.
40. Costa R. et al. Cultivation-independent analysis of *Pseudomonas* species in soil and in the rhizosphere of field-grown *Verticillium dahliae* host plants //Environmental microbiology. – 2006. – T. 8. – №. 12. – C. 2136-2149.
41. Branton D. et al. The potential and challenges of nanopore sequencing //Nature biotechnology. – 2008. – T. 26. – №. 10. – C. 1146-1153.

42. DeSantis T. Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB //Applied and environmental microbiology. – 2006. – T. 72. – №. 7. – C. 5069-5072.
43. Diepeningen Van A. D. et al. DGGE fragments oscillate with or counter to fluctuations in cultivable bacteria along wheat roots //Microbial ecology. – 2005. – T. 50. – №. 4. – C. 506-517.
44. Dillewijn Pieter, van. Plant – dependent active biological containment system for recombinant rhizobacteria / Dillewijn Pieter van, Vilchez Susana, A. Paz Jose, L. Ramos Juan // Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 6.- № 1. – p 88 – 92.
45. Dodds P. N., Rathjen J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant– pathogen interactions //Nature Reviews Genetics. – 2010. – T. 11. – №. 8. – C. 539-548.
46. Dominguez-Bello M. G. et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – T. 107. – №. 26. – C. 11971-11975.
47. Edwards J. et al. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – T. 112. – №. 8. – C. E911-E920.
48. Fogg, G. E., Stewart, W. D. P., Fay, P., & Walsby, A. E. London and New York. The blue-green algae. Academic Press, London, 1973, 459 pp
49. Forney L.J., Zhou X., Brown C.J. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king // Current Opinion in Microbiology . 2004. № 7 P. 210-220
50. Fu, W. J., Stromberg, A. J., Viele, K., Carroll, R. J., & Wu, G. Statistics and bioinformatics in nutritional sciences: analysis of complex data in the era of systems biology //The Journal of nutritional biochemistry. – 2010. – T. 21. – №. 7. – C. 561-572.
51. Gilbert J. A. et al. Meeting report: the terabase metagenomics workshop and the vision of an Earth microbiome project //Standards in genomic sciences. – 2010. – T. 3. – №. 3. – C. 243-248.
52. Hammer O., Harper D., Ryan P. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis.// Palaeontologia Electronica 4. – 2001.
53. Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products //Chemistry & biology. – 1998. – T. 5. – №. 10. – C. R245-R249.
54. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms //Microbiology and molecular biology reviews. – 2004. – T. 68. – №. 4. – C. 669-685.

55. Hardoim P. R., van Overbeek L. S., van Elsas J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth //Trends in microbiology. – 2008. – T. 16. – №. 10. – C. 463-471.
56. Hiltner L. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache //Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft. – 1904. – T. 98. – C. 59-78.
57. Hodkinson B. P., Grice E. A. Next-generation sequencing: a review of technologies and tools for wound microbiome research //Advances in wound care. – 2015. – T. 4. – №. 1. – C. 50-58.
58. <http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>
59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
60. <https://rdp.cme.msu.edu/>
61. <http://silva.se/>
62. <http://qiime.org/>
63. Hugenholtz P., Goebel B. M., Pace N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity //Journal of bacteriology. – 1998. – T. 180. – №. 18. – C. 4765-4774.
64. Inceoğlu Ö. et al. Comparative analysis of bacterial communities in a potato field as determined by pyrosequencing //PLoS One. – 2011. – T. 6. – №. 8. – C. e23321..
65. Inceoğlu Ö. et al. Effects of plant genotype and growth stage on the betaproteobacterial communities associated with different potato cultivars in two fields //Applied and Environmental Microbiology. – 2010. – T. 76. – №. 11. – C. 3675-3684. Kalisky T., Quake S. R. Single-cell genomics //Nature methods. – 2011. – T. 8. – №. 4. – C. 311-314.
66. Kennedy J., Marchesi J. R., Dobson A. D. W. Marine metagenomics: strategies for the discovery of novel enzymes with biotechnological applications from marine environments //Microbial cell factories. – 2008. – T. 7. – №. 1. – C. 1.
67. Levy-Booth D. J. et al. Cycling of extracellular DNA in the soil environment //Soil Biology and Biochemistry. – 2007. – T. 39. – №. 12. – C. 2977-2991.
68. Long S. R. Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground //Cell. – 1989. – T. 56. – №. 2. – C. 203-214.
69. Lorenz M. G., Wackernagel W. Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA //Applied and environmental microbiology. – 1987. – T. 53. – №. 12. – C. 2948-2952.

70. Lozupone C., Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities //Applied and environmental microbiology. – 2005. – T. 71. – №. 12. – C. 8228-8235.
71. Lozupone C. A., Knight R. Global patterns in bacterial diversity //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – T. 104. – №. 27. – C. 11436-11440.
72. Lundberg D. S. et al. Defining the core Arabidopsis thaliana root microbiome //Nature. – 2012. – T. 488. – №. 7409. – C. 86-90.
73. Mendes R. et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria //Science. – 2011. – T. 332. – №. 6033. – C. 1097-1100.
74. Neilands J. B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds //Journal of Biological Chemistry. – 1995. – T. 270. – №. 45. – C. 26723-26726.
75. Nielsen K. M., Calamai L., Pietramellara G. Stabilization of extracellular DNA and proteins by transient binding to various soil components //Nucleic acids and proteins in soil. – Springer Berlin Heidelberg, 2006. – C. 141-157.
76. Oliver J. D. et al. The viable but nonculturable state in bacteria //J Microbiol. – 2005. – T. 43. – №. 1. – C. 93-100.
77. Pace N. R. Mapping the tree of life: progress and prospects //Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2009. – T. 73. – №. 4. – C. 565-576.
78. Palmer C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota //PLoS Biol. – 2007. – T. 5. – №. 7. – C. e177.
79. Paul, E. A. & Clark, F. E. Soil microbiology and biochemistry; Academic Press, San Diego, - 1989.
80. Peng J. et al. Graphene quantum dots derived from carbon fibers //Nano letters. – 2012. – T. 12. – №. 2. – C. 844-849.
81. Peiffer J. A. et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – T. 110. – №. 16. – C. 6548-6553.
82. Ranjan R. et al. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water //Biochemical and biophysical research communications. – 2005. – T. 335. – №. 1. – C. 57-65.
83. Redford A. J. et al. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves //Environmental microbiology. – 2010. – T. 12. – №. 11. – C. 2885-2893.

84. Richter D. D., Markewitz D. How deep is soil? //BioScience. – 1995. – T. 45. – №. 9. – C. 600-609.
85. Riesenfeld C.S., Schloss P.D., Handelsman J. Metagenomics, genomic analysis of microbial communities // Annual Review of Genetics. 2004. № 38. P. 525-552.
86. Rodriguez, H. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion / Rodriguez H., Fraga R. // Biotech. Adv. – 1999. – Vol. 17. – P. 319-339.
87. Romanowski G., Lorenz M. G., Wackernagel W. Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I //Applied and Environmental Microbiology. – 1991. – T. 57. – №. 4. – C. 1057-1061.
88. Schlaeppi K. et al. Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – T. 111. – №. 2. – C. 585-592.
89. Schmidt H., Eickhorst T., Tippkötter R. Monitoring of root growth and redox conditions in paddy soil rhizotrons by redox electrodes and image analysis //Plant and soil. – 2011. – T. 341. – №. 1-2. – C. 221-232.
90. Schreiter S. et al. Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce //The plant microbiome and its importance for plant and human health. – 2015. – C. 88.
91. Simon C., Daniel R. Metagenomic analyses: past and future trends // Appl Environ Microbiol. 2011. V. 4. № 77. P. 1153-1161
92. Siqueira J. O., Lambais M. R., Stumer S. L. Fungos micorrízicos arbusculares //Biologia, Ciência e Desenvolvimento. – 2002. – T. 25. – C. 12-21.
93. Spaepe, S. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling / Spaepe S., Vanderleyden J., Remans R. // FEMS Microbiol. Rev. – 2007. – Vol. 31. – P. 425-448.
94. Tournaa M., Stieglmeiera M., Spanga A. et al. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – V. 108. –P. 8420–8425.
95. Vančura V., Abd-el-Malek Y., Zayed M. N. Azotobacter and Beijerinckia in the soils and rhizosphere of plants in Egypt //Folia microbiologica. – 1965. – T. 10. – №. 4. – C. 224-229.
96. Vogel T.M., Simonet P., Jansson J.K., Hirsh P.R., Tiedje J.M., Van Elsas J.D., Bailey M.J., Nalin R., Philippot L. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome // Nat Rev Microbiol. 2009. № 7. P. 252.

97. Wheatley R., Bengough G., Hallett P., Griffiths B., Daniell T., Marshall B., Squire GR. Probing the soil-plant system? // Scottish Crop Research Institute. Annual Report. 2001/2002. P. 168-171.
98. Whipps, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere / J.M. Whipps // J. Exp. Bot. – 2001. – Vol. 52. – P. 487-511.
99. Wigginton J. E., Abecasis G. R. PEDSTATS: descriptive statistics, graphics and quality assessment for gene mapping data //Bioinformatics. – 2005. – T. 21. – №. 16. – C. 3445-3447.
100. Wittebolle L. et al. Initial community evenness favours functionality under selective stress //Nature. – 2009. – T. 458. – №. 7238. – C. 623-626.
101. Xu J. Invited review: microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances //Molecular ecology. – 2006. – T. 15. – №. 7. – C. 1713-1731.
102. Zhang H. et al. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms //The Plant Journal. – 2009. – T. 58. – №. 4. – C. 568-577.