

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Бибиков Никита Михайлович

**Микобиота, ассоциированная с корневой системой, и анатомия
микоризы орхидных на примере тропических и бореальных видов**

Специальность 1.5.18. Микология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова.

Научный руководитель:

Воронина Елена Юрьевна,
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Онипченко Владимир Гертрудович,
доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВО Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра экологии
и географии растений, заведующий кафедрой

Ткаченко Олег Борисович,
доктор биологических наук
ФГБУН Главный ботанический сад имени
Н.В. Цицина Российской академии наук,
научно-исследовательский отдел
экспериментальной ботаники и патологии
растений, главный научный сотрудник

Волобуев Сергей Викторович,
кандидат биологических наук
ФГБУН Ботанический институт имени В. Л.
Комарова Российской академии наук,
лаборатория систематики и географии
грибов, старший научный сотрудник

Защита диссертации состоится «24» октября 2025 г. в 17 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: dissovet_00155@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3446>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Д.М. Гершкович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Коэволюция растений и грибов в микоризном симбиозе является важнейшим определяющим фактором для формирования структуры экосистем. Одним из значимых показателей, который определяет функциональную и таксономическую составляющие микоризы, является специфичность, а именно биоразнообразие организмов, способных формировать микоризу определенного типа. Арбускулярная микориза (АМ), появившаяся раньше других типов, обладает широкой специфичностью. Более узко специфичными являются типы микоризы, появившиеся позже остальных – орхидная (ОМ), арбуроидная (АрМ) и эрикоидная (ЭрМ), образуемые представителями отдельных семейств растений (Strullu-Derrien et al, 2018).

Биоразнообразие грибов, вовлеченных в поздно возникшие типы микоризы, на данный момент изучено недостаточно. Так, для ОМ показано участие базидиомицетов порядков Cantharellales (семейства Ceratobasidiaceae, Tulasnellaceae) (Herrera et al., 2017) и Sebaciniales (Fritsche et al., 2020), а также некоторых сапротрофов и микобионтов эктомикоризы (ЭкМ). Чаще всего биоразнообразие ассоциированной микобиоты изучается в сравнении на примере различных популяций одного вида орхидных в разных местообитаниях или различных видов одного местообитания, что позволяет наглядно показать особенности и адаптации конкретной группы орхидных.

На данный момент неясна филогения микобионтов ОМ, в частности семейства Ceratobasidiaceae. Это семейство включает фитопатогенов, эндофитов, сапротрофов и микобионтов ОМ, и неясна связь трофического статуса и таксономического положения изолятов. Большинство культурально-морфологических признаков также не имеет таксономической значимости, и в большинстве исследований выявленные изоляты не идентифицируются на уровне ниже родового. В связи с этим, изучение морфологических признаков культур, ареала и распространенности микобионтов, а также их приуроченности к тому или иному местообитанию поспособствует внесению ясности в таксономию и экологию представителей этого семейства.

Помимо изучения биоразнообразия ассоциированных микобионтов и эндофитов, пониманию эволюционных адаптаций орхидных способствуют исследования анатомии ОМ. Процесс колонизации корней орхидных микобионтом зависит от строения корня. В связи с этим наиболее интересны адаптации эпифитных орхидных, корни которых приспособлены для запасания воды. Сочетание эпифитами функций транспирации и депо микобионтов изучено

недостаточно, и изучение этого феномена позволит лучше понять эволюционные адаптации этой уникальной группы растений (Olatunji, Nengim, 1980; Ramesh et al., 2020).

Таким образом, пониманию природы микоризного симбиоза способствует определение экологических факторов, влияющих на специфичность ОМ на примере отдельных видов орхидных, изучение конкурентных преимуществ микобионтов по сравнению с другими видами и визуальной анатомии микоризы.

Цель и задачи диссертационного исследования

Цель работы – изучить микобиоту, ассоциированную с корневой системой, и структурные особенности грибной колонизации орхидных на примере тропических и бореальных видов.

В рамках цели поставлены следующие задачи:

1. Изучить биоразнообразие грибов, ассоциированных с бореальными и тропическими орхидными на примере *Goodyera repens*, *Zeuxine strateumatica*, *Eulophia graminea* и *Spiranthes hongkongensis*.
2. Установить факторы, влияющие на состав грибного сообщества корней орхидных различных экологических групп.
3. Изучить культурально-морфологические и экологические особенности микобионтов исследуемых видов орхидных.
4. Изучить структурные особенности грибной колонизации тропических эпифитных орхидных в сравнении с наземным бореальным видом *G. repens*.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования являются орхидные, корни которых были изучены на предмет биоразнообразия микобионтов и анатомии микоризы. Биоразнообразие микобионтов орхидной микоризы изучено на образцах корней орхидных *Eulophia graminea*, *Spiranthes hongkongensis* и *Zeuxine strateumatica* и *Goodyera repens*. Изучение анатомии микоризы орхидных проведено на образцах корней орхидных подсемейства *Epidendroideae*: *Dendrobium* sp., *Gastrochilus* sp., *Thrixspermum* sp. и *Epidendroideae* gen. sp., а также на образцах корней *Goodyera repens*.

Научная новизна и теоретическая значимость работы

В ходе работы впервые был изучен состав ассоциированной микобиоты корней орхидных *Eulophia graminea*, выявлены неизвестные ранее микобионты и эндофиты, ассоциированные с корнями *Zeuxine strateumatica*, *Spiranthes hongkongensis* и *Goodyera repens*, такие как *Ceratobasidium* spp., *Pithomyces cynodontis*, *Scytalidium circinatum*, *Curvularia lunata*, *Diaporthe phaseolorum*, *Nigrospora oryzae* и *N. sphaerica*. Предположена трофическая, географическая и экологическая приуроченность ассоциированных грибов. Впервые использован метод высокопроизводительного секвенирования для изучения состава ассоциативной микобиоты *Goodyera repens* на территории России и выявлены факторы, влияющие на состав грибного сообщества в корнях *G. repens* разных регионов России. Получены новые данные по антибиотической активности микобионтов и эндофитов орхидных и выявлены изоляты родов *Penicillium*, *Fusarium*, *Umbelopsis* и *Trichoderma*, обладающие высокой антибиотической активностью. Впервые показано влияние гетерогенных элементов кортекса корней эпифитных орхидных на процесс колонизации корня микобионтом.

Таким образом, научная новизна работы состоит в углублении представлений о биоразнообразии, специфичности и экологии микобионтов и эндофитов орхидных, установлении факторов, влияющих на состав ассоциированной микобиоты и регуляции колонизации корней эпифитных орхидных.

Практическая значимость работы обусловлена интересом к орхидной микоризе в связи широким применением орхидных как декоративных и лекарственных растений. На данный момент культивирование орхидных совместно с микобионтами не распространено в промышленных масштабах, однако лабораторные исследования показывают эффективность этого подхода. Биоразнообразие ассоциированных грибов интересно с точки зрения получения новых изолятов грибов, продуцирующих биологически активные вещества. С целью поиска новых биологически активных веществ все чаще изучается антимикробная активность изолятов из неизученных ранее местообитаний, в частности корней орхидных. Высокая антимикробная активность имеет и биологический смысл, свидетельствуя о конкурентоспособности изолята. Более того, установление биотических и абиотических факторов, влияющих на биоразнообразие микобионтов в корнях орхидных, поспособствует не только более глубокому пониманию механизмов функционирования и коэволюции популяций орхидных и их микобионтов, но и позволит найти правильный подход к сохранению и реинтродукции популяций исчезающих видов растений.

Методология и методы исследования

В диссертационной работе использованы классические и современные методы изучения биоразнообразия, анатомии и антибиотической активности. Изучение биоразнообразия ассоциированных грибов проведено с использованием комплексного подхода, включающего как метод чистых культур, так и микробиологическое профилирование методом высокопроизводительного секвенирования. Для обработки данных высокопроизводительного секвенирования использовано программное обеспечение R. Антибиотическая активность изолятов грибов исследована методом диффузии в агар. Для изучения анатомии и морфологии были использованы методы микроскопии: световая, флуоресцентная и конфокальная микроскопия использованы для изучения анатомии микоризы, сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопия использованы для наблюдения ультраструктур гиф микобионтов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Относящиеся к роду *Ceratobasidium* микобионты *Zeuxine strateumatica*, *Spiranthes hongkongensis* и *Goodyera repens* являются гемибиотрофами и обладают географической и таксономической специфичностью.
2. При доступе *Goodyera repens* к корням хвойных растений, микобионты семейства *Ceratobasidiaceae* частично замещаются микобионтами эктомикоризы.
3. Водозапасающие клетки кортекса корней эпифитных орхидных могут быть колонизированы микобионтом.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты работы были воспроизведены не менее, чем в трех повторностях и представлены в виде средних значений со стандартными ошибками среднего. При сравнении выборок были рассчитаны соответствующие коэффициенты сходства или корреляции, значения коэффициентов приведены. Методология работы соответствует заявленным задачам, что говорит о достоверности и воспроизводимости полученных данных. Основные результаты работы представлены на конференциях: «National Congress on Plant Biology» (г. Шэньчжэнь, Китай, 2020), XI Международная конференция «Проблемы лесной фитопатологии и микологии» (г. Петрозаводск, Россия, 2022), «Actual problems of the chemistry of natural compounds» (г. Ташкент, Узбекистан, 2023), Молодежная школа-конференция «Экстремофильные микроорганизмы и их сообщества» (г. Москва, Россия, 2023) и «Геномика, метагеномика и молекулярная биология микроорганизмов» (г. Москва, Россия, 2023).

Личный вклад автора

Соискатель проявил личное участие на всех этапах выполнения диссертационной работы. Он осуществил планирование исследования, непосредственно участвовал в сборе образцов на территории России и Китая, самостоятельно выполнил выделение чистых культур и пробоподготовку для метабаркодинга и секвенирования, поставил эксперименты, осуществил обработку данных, внес основной вклад в подготовку публикаций, отражающих результаты работы, и лично представил некоторые данные на конференциях в виде устных докладов или постеров.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в российских научных журналах, индексируемых в ядре РИНЦ.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства Науки и Высшего Образования (проект № 075-15-2021-1396).

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 135 страницах, содержит 30 рисунков, 19 таблиц и 3 приложения. Диссертационная работа включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение и выводы и список литературы, который включает 284 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе «**введение**» приведена степень разработанности и актуальность изучаемой темы, а также сформулирована **цель** работы: изучить микобиоту, ассоциированную с корневой системой, и структурные особенности грибной колонизации орхидных на примере тропических и бореальных видов и **задачи**:

1. Изучить биоразнообразие грибов, ассоциированных с бореальными и тропическими орхидными на примере *Goodyera repens*, *Zeuxine strateumatica*, *Eulophia graminea* и *Spiranthes hongkongensis*.
2. Установить факторы, влияющие на состав грибного сообщества корней орхидных различных экологических групп.
3. Изучить культурально-морфологические и экологические особенности микобионтов изучаемых видов орхидных.
4. Изучить структурные особенности грибной колонизации тропических эпифитных орхидных в сравнении с наземным бореальным видом *G. repens*.

В **главе 1** приведены данные, имеющиеся на данный момент касаясь микоризы орхидных (ОМ). Дана общая характеристика ОМ, эволюционные адаптации орхидных, приобретенные в связи с микотрофным образом жизни. Подробно рассмотрены таксономические группы грибов, выявленные в ассоциации с орхидными в качестве микоризообразователей и эндофитов с акцентом на основные объекты исследования – представителей подтрибы *Goodyerinae*. Приведены данные по анатомии колонизации грибом корней орхидных, генетической регуляции формирования ОМ, а также описаны методы, применяемые при изучении ОМ и перспективы практического применения.

В **разделе 1.1** приведена общая информация про микоризу орхидных. Орхидные (*Orchidaceae* Juss.) – одно из крупнейших семейств сосудистых растений, все представители которого на ранних стадиях развития получают питательные вещества от гриба-микобионта посредством специфичного эндосимбиоза – орхидной микоризы (Смит, Рид, 2012). Орхидные развиваются из мелких (пылевидных) семян без эндосперма, прорастающих в недифференцированный микогетеротрофный протокорм (Arditti, Ghani 2000). На стадии дифференцированного побега орхидные разделяются на три трофические группы: автотрофы получают органические вещества исключительно путем фотосинтеза, микогетеротрофы получают питательные вещества через микоризу, и миксотрофы получают органику из обоих источников (Dearnaley et al., 2012).

В разделе 1.2 описаны группы грибов, формирующих микоризу с орхидными. Орхидные способны формировать микоризу с грибами-микобионтами различных таксономических групп. Первыми микобионтами, выявленными в ассоциации с орхидными, являются базидиомицеты семейства Ceratobasidiaceae (Cantharellales, Agaricomycetes) (Fuller, 1909). Представители этого семейства обладают скудной морфологией, в связи с чем для описания новых таксонов и построения филогении используются различные косвенные признаки, такие как таксономическая принадлежность растения-хозяина (Constantin, Dufour, 1920), ядерный статус и анастомозная группа изолятов. С представителями этого семейства часто ассоциированы определенные группы орхидных, в частности представители трибы Cranichidae (Porter, 1942).

Помимо семейства Ceratobasidiaceae, OM способны формировать представители семейства Tulasnellaceae (Oberwinkler et al., 2017) и порядка Sebaciniales (Warcup, Talbot, 1967; Weiß et al., 2016). Представители этих таксономических групп считаются наиболее распространенными микобионтами OM (Qin et al., 2021a). Также в корнях орхидных зачастую выявляются другие представители отделов Ascomycota и Basidiomycota (Wang et al., 2022).

В разделе 1.3 приведены имеющиеся данные об анатомии микоризы орхидных. Анатомия структур, образуемых микоризным грибом, находящимся в ассоциации с корнем растения, является прямым отражением эволюционных адаптаций к симбиотическому образу жизни, а также остается наиболее явным способом установить тип микоризы, образуемый определенным видом растений.

Колонизация корней орхидных грибом происходит через корневые волоски и эпидермальные клетки. В клетках кортекса корней формируются гифальные клубки для обмена питательными веществами – пелотоны (Смит, Рид, 2012). Ряд морфологических особенностей, требующих специфических приспособлений для колонизации грибом, присущ эпифитным орхидным в связи с обитанием в засушливых местах. В связи с наличием анатомических барьеров для контроля водообмена, колонизация корней эпифитных орхидных отличается от таковой у наземных орхидных и остается малоизученной.

В главе 2 описаны материалы и методы, использованные в ходе данной работы. В разделе 2.1 Приведена характеристика изучаемых местообитаний. Сбор орхидных *Zeuxine strateumatica*, *Spiranthes hongkongensis* и *Eulophia graminea* проводился на территории кампуса Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэне, Китай. Местообитание характеризуется антропогенно преобразованной красноземной почвой с преобладанием травянистых растений *Euphorbia* spp. и злаков.

Биоразнообразие ассоциированной микобиоты *Goodyera repens* исследовано на территории трех регионов России: Ленинградская область, Московская область и республика Карачаево-Черкесия. Сбор материала в Ленинградской области проводили в сосняке с елью в подзолистой почве. Точки сбора в Московской области находились в сосняке с елью на дерново-подзолистой почве. Точки в Карачаево-Черкесии находились в сосняке с пихтой и пихтарнике на бурых горно-лесных почвах (Рожков и др., 2010).

Сбор корней эпифитных орхидных подсемейства Epidendroideae проведен в тропическом лесу, исследуемые орхидные собраны с ветвей деревьев-форофитов.

В разделе 2.2 описана методика сбора материала. Корни *E. graminea*, *S. hongkongensis* и *Z. strateumatica* собраны на месте произрастания на территории Университета МГУ-ППИ в г. Шэньчжэнь в период цветения в марте и апреле 2021 г. Для выделения чистых культур участки корней были помещены в бумажные пакеты и сохранены при +4°C в течение не более чем 7 суток.

В точках сбора *G. repens* были извлечены и помещены в контейнеры участки почвы с побегами размером ориентировочно 10*10*10 см. Затем из образцов были извлечены корни *G. repens* и свободная почва. Материал для метагеномного анализа был помещен в пробирки с абсолютным этанолом. Материал для выделения чистых культур был сохранен при +4°C в бумажных пакетах.

Образцы корней эпифитных орхидных для изучения анатомии микоризы собраны в национальном парке Кат-Тьен. Субстратные и воздушные корни были отделены от растения и помещены в емкости с 70% этиловым спиртом, где хранились до востребования.

В разделе 2.3 описаны методы микроскопии, применявшиеся в ходе работы. Методами микроскопии были исследованы продольные и поперечные срезы корней орхидных, подготовленные вручную, а также культуры грибов.

Срезы были исследованы под конфокальным микроскопом Olympus FV-1000. Флуоресцентная микроскопия проведена с использованием микроскопа Axioskop 40 FL (Carl Zeiss, Германия). Исследования методом сканирующей электронной микроскопии выполнены с использованием микроскопа JSM-6380 (JEOL Inc, США).

Раздел 2.4 посвящен методам выделения и идентификации чистых культур грибов. Для выделения чистых культур грибов использованы питательные среды сусло-агар и картофельно-декстрозный агар. Корни были разделены на фрагменты длиной 0,5–1 см, тщательно промыты,

очищены от почвы и поверхностно стерилизованы этанолом, бытовым детергентом и амоксициллином, после чего были перенесены на питательную среду.

Из образцов свободной почвы готовились суспензии с 1000- и 10000-кратным разведением в стерильной дистиллированной воде. При помощи пипетки 0,5 мл суспензии переносились на питательную среду и распределялись стерильным шпателем.

Чашки Петри помещались в термостат при 26°C на 7 суток. По истечении 7 суток проводилось визуальное выделение морфотипов грибов и их отсев.

Таксономическая идентификация грибов осуществлялась либо по морфологическим признакам, либо по последовательности ITS. Для морфологической идентификации использовались стандартные определители, такие как «Compendium of soil fungi» (Domsch et al., 1980).

В разделе 2.5 приведена методика метагеномного анализа, использовавшаяся в ходе работы. Корни, отобранные для метагеномного анализа, были очищены от почвы и подвергнуты поверхностной стерилизации. Образцы почвы и корней были измельчены в ступке и хранились в абсолютном этаноле до проведения анализа. Выделение ДНК и метагеномный анализ по участку ITS2 проведены в компании БиоСпарк (Троицк, Московская область) в соответствии с методикой фирмы.

Раздел 2.6 посвящен использованным методам изучения антимикробной активности культур грибов. Биологическая активность изолятов изучена методом диффузии в агар с использованием фрагментов мицелия на агаризованной среде, культуральной жидкости и экстрактов культур против тест-культур *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Диаметр зон подавления измерялся при проявлении роста тест-культур. Результаты ранжировались следующим образом: 0 мм – активность не наблюдается; 1–6 мм – слабая активность, 6–14 мм – заметная активность, 14–20 мм – выраженная активность, ≥ 20 мм – высокая активность

В разделе 2.7 описана методика анализа патогенности изолятов грибов. Патогенность изолятов проанализирована на ломтиках клубня картофеля. Здоровые клубни были вымыты, простерилизованы, почищены, нарезаны стерильным лезвием и помещены в стерильные влажные камеры. Агаровые блоки с активно растущим мицелием помещались на центр ломтика. Инкубацию проводили в течение 7 суток при 12°C, а затем дополнительно 7 суток при

24°C (Mertely, Legard, 2004, с изменениями). Эксперимент проводили в трех повторностях для каждого изолята.

Глава 3 посвящена результатам работы и их обсуждению. В **разделе 3.1** приведены данные по микобиоте корней наземных орхидных *Zeuxine strateumatica*, *Spiranthes hongkongensis* и *Eulophia graminea*. На антропогенном газоне территории Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэне в период март-апрель 2021 г. были собраны корни трех видов наземных орхидных: *Zeuxine strateumatica*, *Spiranthes hongkongensis* и *Eulophia graminea*. В чистую культуру выделены 76 изолятов, относящиеся к 19 видам, принадлежащим к отделам Ascomycota (классы Sordariomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Leotiomycetes) и Basidiomycota (класс Agaricomycetes)

Отдел Ascomycota в изученных образцах представлен 17 изолятами. Отдел Basidiomycota представлен двумя штаммами рода *Ceratobasidium* (порядок Cantharellales, класс Agaricomycetes), выявленными в корнях *Z. strateumatica* и *S. hongkongensis*.

В общей сложности в корнях *Z. strateumatica* выявлено 7 видов грибов, в корнях *S. hongkongensis* – 8 видов, в корнях *E. graminea* – 9 видов. Два вида (*Fusarium oxysporum* и *Curvularia lunata*) выявлены из трех растений и один вид обнаружен у *E. graminea* и *S. hongkongensis* (*Nigrospora* sp.). Остальные 16 видов являются специфичными для одного из трех видов орхидных (см. рис. 1).

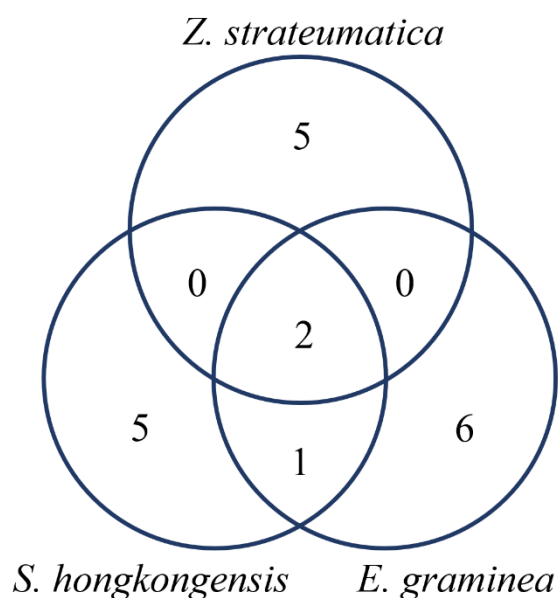


Рисунок 1. Число общих и специфичных видов грибов, ассоциированных с исследованными орхидными г. Шэньчжэнь

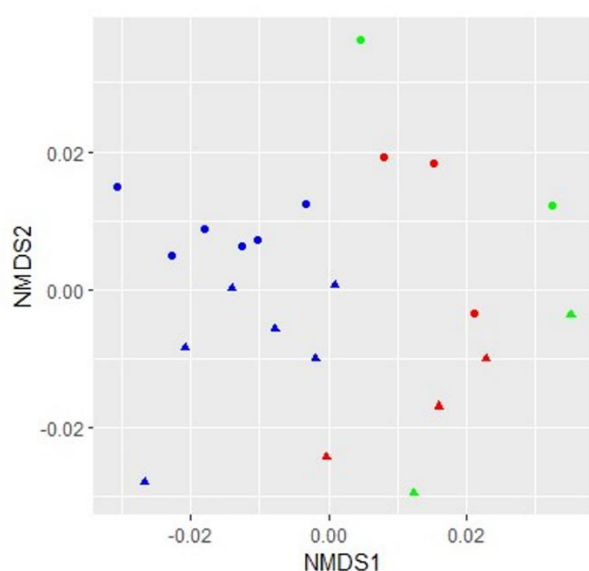
Изоляты *Fusarium oxysporum* и *Curvularia lunata*, выявленные в корнях всех трех видов орхидных, обладают соответственно высокой и заметной активностью против культуры мицелиального гриба *Aspergillus niger*. Помимо этих культур, рост *A. niger* способны подавлять только факультативно микотрофные изоляты рода *Trichoderma*.

Таким образом, все 19 выявленных видов отмечались ранее в ассоциации с растениями как эндофиты, патогены или микоризообразователи. Впервые показано присутствие видов *Pithomyces cynodontis*, *Scytalidium circinatum*, *Curvularia lunata*, *Diaporthe phaseolorum*,

Nigrospora oryzae и *Nigrospora sphaerica* в корнях орхидных в качестве бессимптомных эндофитов. Изоляты видов *F. oxysporum* и *C. lunata* выявлены в корнях всех трех видов орхидных в качестве эндофитов, что свидетельствует о высокой конкурентоспособности этих изолятов в антропогенной почве, а способность подавлять рост мицелиальных грибов предположительно является конкурентным преимуществом при колонизации корней орхидных. В корнях *Z. strateumatica* и *S. hongkongensis* выявлены микобионты рода *Ceratobasidium*.

Раздел 3.2 включает данные о корневой микобиоте *Goodyera repens*. Образцы корней *G. repens* собраны в трех регионах России. Методом метагеномного анализа выявлено 73424 последовательности, сгруппированные в 453 оперативные таксономические единицы (ОТЕ) на основании сходства выше 97% (Бибиков и др., 2024). Путем посева корней получены чистые культуры, относящиеся к 25 видам отделов Mucoromycota, Ascomycota и Basidiomycota. Только 11 видов выявлено обоими методами, что предположительно связано с присутствием большого числа некультивируемых видов, а также с наличием в образцах спор грибов, не фиксирующихся молекулярными методами, но прорастающих на питательной среде.

Общая характеристика грибного сообщества в исследованных образцах приводится исходя из данных, полученных методом метабаркодинга. Во всех образцах почвы биоразнообразие выше, чем в соответствующих образцах корней *G. repens*. При сравнении



таксономического состава продемонстрировано значимое различие между регионами ($p = 0,014$). При попарном сравнении выявлено существенное отличие сообщества в корнях *G. repens* из Карачаево-Черкесии от Московской ($p = 0,010$) и Ленинградской ($p = 0,030$) областей. Значимого различия между Московской и Ленинградской областями не выявлено ($p = 0,130$). Таким же способом показано достоверное различие между образцами корней и почвы ($p = 0,01$) (см. рис. 2).

Рисунок 2. Ординация образцов по таксономическому составу. Зеленый – Ленинградская область, красный – Московская область, синий – Карачаево-Черкесия. Круглые точки – корни *G. repens*, треугольные точки – почва. NMDS1, NMDS2 – координаты точек в двумерном пространстве.

Различия в таксономическом составе грибного сообщества между образцами корней и почвы подтверждают имеющиеся данные об уникальном составе микобиоты корней растений (Waud et al., 2016). Отсутствие различий между Московской и Ленинградской областями свидетельствует о влиянии на структуру сообщества лесообразующих пород: местообитания в обоих регионах представляли собой сосняк с елью, тогда как в Карачаево-Черкесии, образцы откуда показали существенное отличие, основной лесообразующей породой является пихта. Полученные данные показывают региональную специфичность ассоциативной микобиоты *G. repens*.

Различие в таксономическом составе корневой и почвенной микобиоты выявляются на уровне порядков. В корнях *G. repens* большей долей представлено семейство Ceratobasidiaceae, и порядок Sebaciales – группы, включающие специфичных микобионтов орхидной микоризы (Weiß et al., 2016). Таксономический состав почвенной микобиоты отличается большей долей сапротрофных представителей отделов Ascomycota и Basidiomycota.

Таким образом, отличие в составе микобиоты между объединенными образцами корневой системы *G. repens* и почвы обусловлено в первую очередь грибами-микоризообразователями рода *Ceratobasidium* – микобионтами *G. repens*. Различия микобиоты экотопов связаны также с некоторыми таксонами эктомикоризообразователей: *Senecosium geophilum*, *Elaphomyces* spp., преобладающими в образцах корневой системы *G. repens*, а также сапротрофами порядков Helotiales и Trechisporales, обильнее представленными в почве.

В контексте влияния на функционирование экосистемы наибольший интерес представляют симбионты ОМ, ЭкМ и эндофиты. С целью определения тяготения определенной ОТЕ к корням *G. repens*, последовательности в каждом образце были ранжированы по процентной доле от общего числа ОТЕ в образцы и разделены на квартили от I (минорный таксон) до IV (доминантный таксон).

Доминирующими экологическими группами в образцах корней *G. repens* являются микобионты ОМ и ЭкМ. К доминирующей квартили из специфичных микобионтов ОМ в образцах корней относятся представители семейства Ceratobasidiaceae, а также ОТЕ порядка Sebaciales. Из микобионтов ЭкМ выявлены представители порядков Atheliales, Russulales, Thelephorales, Agaricales и Trechisporales. Микобионты ОМ и ЭкМ выявляются как в образцах корней, так и в почве.

Доля микобионтов ОМ во всех образцах корней *G. repens* существенно выше, чем в соответствующих образцах свободной почвы, тогда как доля микобионтов ЭкМ не зависит от типа образца: ОТЕ эктомикоризообразователей могут быть представлены в доминирующей

квартили как образцов корней, так и почвы. В IV квартили девяти из одиннадцати образцов корней выявляются одновременно микобионты ОМ и ЭкМ (см. рис. 3).

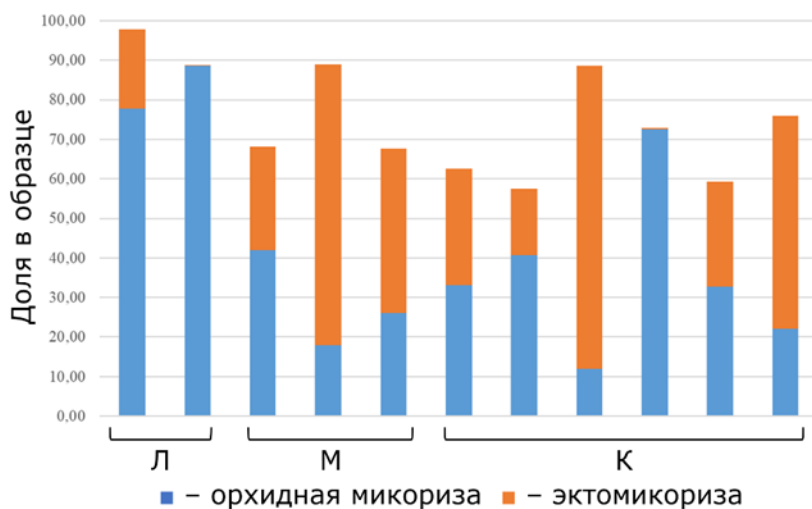


Рисунок 3. Доля микобионтов ОМ и ЭкМ в образцах корней *G. repens*. Л – Ленинградская область, М – Московская область, К – Карачаево-Черкесия. Цифры соответствуют номерам точек сбора.

На рис. 3 заметно, что при более высокой доле микобионтов ЭкМ снижается доля микобионтов ОМ. Значения коэффициентов корреляции Спирмена и Пирсона указывают на сильную обратную зависимость ($-0,95$ и $-0,86$ соответственно). В точках Л2 и К4, находившихся вне доступа корней хвойных деревьев, микобионты ЭкМ представлены наименьшими долями. Обратная корреляция, обусловленная доступностью корней ЭкМ деревьев, указывает на возможность зависимости микобиоты *G. repens* от хвойных и указывает на возможность получения орхидеями питательных веществ посредством микоризных сетей. Эти данные свидетельствуют о том, что доступность корней хвойных деревьев является одним из значимых факторов, влияющих на функционирование микоризы *G. repens*.

В общей сложности анализ выявил 5 ОТЕ, относящихся к семейству Ceratobasidiaceae: 4 ОТЕ рода *Ceratobasidium* и одна ОТЕ рода *Thanatephorus*. В силу неясности филогении семейства Ceratobasidiaceae ОТЕ рода *Ceratobasidium* не идентифицированы до уровня вида и обозначены цифровыми индексами (см. рис. 4).

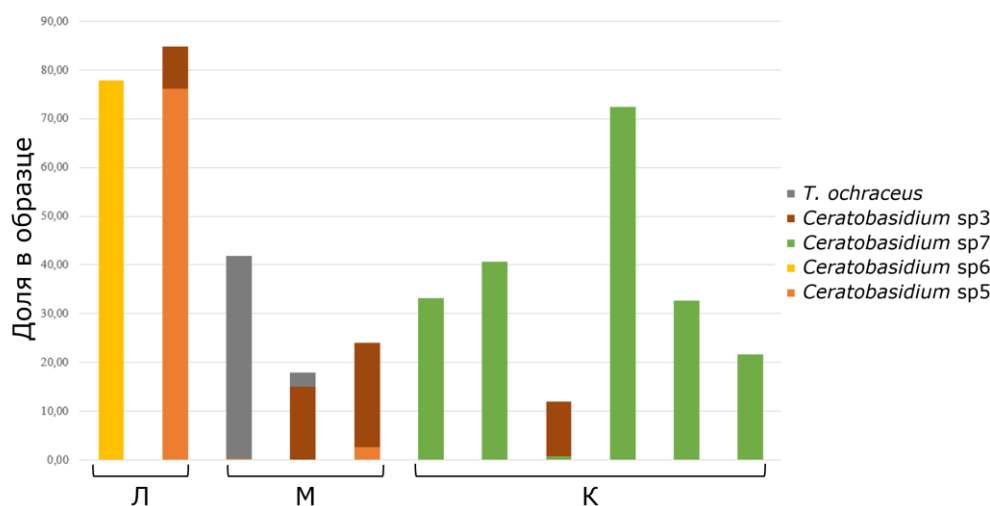


Рисунок 4. Доля ОТЕ представителей семейства Ceratobasidiaceae в образцах корней *G. repens*

Представители семейства Ceratobasidiaceae являются основными микобионтами *G. repens* на изучаемых территориях. Стабильность этой ассоциации была неоднократно продемонстрирована другими исследователями (Constantin, Dufour, 1920; Cameron et al., 2006; Voronina et al., 2018).

ОТЕ *Ceratobasidium* sp5 впервые обнаружена в ассоциации с орхидными, ОТЕ *Ceratobasidium* sp5, 7 и *T. ochraceus* – в ассоциации с видом *G. repens*.

Зависимость распределения популяций орхидных от наличия доступного микобионта (Waud et al., 2016) предполагает, что микобионты могут быть распределены кластерно и обуславливают мозаичность популяций *G. repens* по отношению к микобионтам. Такая мозаичность хорошо видна на примере популяций Ленинградской и Московской областей, где сложно выявить доминирующего микобионта. Популяция в Карачаево-Черкесии по большей части единообразна, что характерно для видов-специалистов и может наблюдаться на уровне популяций (Rammitsu et al., 2019; Qin et al., 2021a). Поскольку *G. repens* является бореальным видом, условия его произрастания: пихтарник и высотная зональность, могут не быть оптимальными, что обуславливает специализацию и сужение диапазона микобионтов. Формирование ОМ с микобионтом *Ceratobasidium* sp7 может обуславливаться широким ареалом микобионта и потенциальной доступностью в субоптимальных для *G. repens* местообитаниях (Бибиков и др., 2024).

Особый интерес представляет присутствие в изученных образцах последовательностей представителей класса Archaeorhizomycetes (подотдел Taphrinomycotina, Ascomycota) (Bibikov et al., 2023). Класс был описан в 2011 году, и на данный момент описано всего два вида рода

Archaeorhizomyces: *A. borealis* и *A. finlayi*, выявленных в корнях сосны и не формирующих структур микоризы (Rosling et al., 2011; Menkis et al., 2014).

С целью установления родства таксонов, соответствующих выявленным ОТЕ, с тремя последовательностями класса Archaeorhizomycetes, выявленными ранее на территории России, был проведен филогенетический анализ. В анализ также была включена последовательность вида *A. borealis* (NR_126144.2) (Menkis et al., 2014). В качестве внешней группы были взяты последовательности представителей классов подотдела Taphrinomycotina (см. рис. 5).

Рисунок 5. Филогенетическая связь выявленных ОТЕ с известными видами *Archaeorhizomyces* и видами, выявленными на территории России.

(MH248043.1), ранее описанной для Московской области (Voronina et al. 2018), и близка *Archaeorhizomyces* sp. (LC574773.1, Якутия). ОТЕ A10 и A12 образуют отдельную кладу на филогенетическом древе класса.

Находка в изучаемых местообитаниях последовательностей класса *Archaeorhizomycetes* является крайне важным с точки зрения выявления скрытого биоразнообразия, а также для последующего описания видов этого класса.

С целью исследования таксономической специфичности микобиоты было проведено сравнение грибного сообщества, выявленного методом метабаркодинга в корнях *G. repens* на территории Звенигородской биостанции, с микобиотой представителей трибы грушанковые (*Pyroleae*), произрастающих на той же территории, выявленной методом чистых культур и прямым секвенированием корней. Для исследования взяты данные по микобиоте трех представителей грушанковых: *Orthilia secunda*, *Pyrola media* и *P. rotundifolia* (Malysheva et al., 2017).

Триба *Pyroleae* относится к семейству *Ericaceae*, и ее представители, подобно орхидным, являются частичными микотрофами, но формируют микоризу с представителями других таксономических групп. Помимо схожего трофического статуса, конвергентное сходство грушанковых и орхидных отражается в формировании пылевидных семян (Hashimoto et al., 2012).

Всего в корнях представителей трибы *Pyroleae* выявлено 44 вида грибов, в корнях *G. repens* – 83 вида. При сравнении видового состава грибов, выявленных в корнях изучаемых растений, было выявлено 5 видов, присутствующих одновременно в корнях *G. repens* и представителей трибы *Pyroleae*: микобионты эктомикоризы *Russula laricina*, *Luellia recondita*, *Piloderma sphaerosporum* и *Tylospora fibrillosa*, а также сапротроф *Mycena cinerella*. Полученные данные позволяют предположить универсальность выявленных микобионтов и их способность формировать микоризные сети как с орхидными, так и с грушанковыми.

В разделе 3.3 приведена характеристика выявленных изолятов рода *Ceratobasidium*. В общей сложности получено 3 культуры представителей рода *Ceratobasidium* из корней *Z. strateumatica*, *S. hongkongensis* и *G. repens* (Московская область). Анастомозная группа по возможности определена по наиболее схожей доступной последовательности. Для сравнения взяты изоляты фитопатогенов, выделенные из клубней и побегов пораженного картофеля.

С целью выявления признаков, способных предсказать трофику изолятов, были поставлены эксперименты по способности изолятов вызывать патогенез картофеля, а также

зафиксированы морфологические признаки: число ядер и степень развитости полисахаридного чехла (см. табл. 1).

Таблица 1. Морфологические характеристики и патогенность изолятов семейства *Ceratobasidiaceae*. Патогенность измерялась как диаметр мицелия на ломтике (мм).

№	Таксон	Растение-хозяин	Число ядер	Полисахаридный чехол	Патогенность, 12°, 0–7 сут	Патогенность, 24°, 7–14 сут
Zs	<i>Ceratobasidium</i> sp.	<i>Z. strateumatica</i>	2	Явный	Нет роста	9,3
Sh		<i>S. hongkongensis</i>			Нет роста	9,3
Gr		<i>G. repens</i>			4,3	7,0
P1		<i>Solanum tuberosum</i>			5,0	8,0
P2					Нет роста	12,3
K3-3	<i>Thanatephorus cucumeris</i>		>2	Слабый	4,2	6,6
R156		6,0			30,8	

Число ядер в клетках мицелия представителей семейства *Ceratobasidiaceae* считается важным таксономическим признаком. Существуют одно-, дву- и многоядерные изоляты. Часто двуядерные изоляты объединяют в род *Ceratobasidium*, а многоядерные – в род *Thanatephorus*. Такое разбиение коррелирует с филогенией по участку ITS, однако имеются и исключения (Veldre et al., 2013). Также предполагается, что двуядерные изоляты тяготеют к формированию ОМ, тогда как многоядерные являются фитопатогенами (Пильщикова, Ганнибал, 2016). Кроме того считается, что симбиотрофные изоляты накапливают на поверхности гиф полисахариды (Elsharkawy et al., 2014; Aydin, 2022).

Показано, что ядерный статус и степень развитости полисахаридного чехла не отражают трофику изолятов, но могут быть использованы для установления различий на родовом уровне: для рода *Ceratobasidium* характерны двуядерные клетки и явно выраженный полисахаридный чехол, тогда как для рода *Thanatephorus* характерны многоядерные клетки и слабо развитый полисахаридный чехол.

Все изоляты показали патогенность при 24 градусах, однако различия между таксономическими и экологическими группами не выявлено. Патогенность при 12 градусах показали все изоляты кроме изолированных из южных регионов: Шэньчжэнь и Астраханская область. Таким образом, изученные морфологические признаки не отражают трофику изолятов, однако имеют ценность как таксономические признаки. Способность изолятов заражать

клубень картофеля указывает на их гемибиотрофность и способность существовать в виде факультативных фитопатогенов.

Кладограмма микобионтов подтрибы *Goodyerinae* построена методом максимального правдоподобия с 1000-кратной проверкой bootstrap-анализом на основе последовательностей микобионтов, выявленных в корнях орхидных родов подтрибы *Goodyerinae*, полученных из базы данных GenBank.

Внешняя группа составлена из последовательностей представителей родственных семейств порядка *Cantharellales*. Идентичные последовательности из растений одного вида с одной территории объединены. Клады с поддержкой >80% рассмотрены как единая эволюционная ветвь для предположения специфичности по отношению к растению-хозяину и региону. Географические регионы выделены следующим образом: тихоокеанский (Япония, запад США), атлантический (Норвегия, запад России, восток США) и тропический (Тайвань, юг Китая, Таиланд, Индия, Гавайи, Пуэрто-Рико) (см. рис. 6).



Рисунок 6. Кладограмма микобионтов семейства *Ceratobasidiaceae* с привязкой к растениям-хозяевам подтрибы *Goodyerinae* и географическим регионам. Фиолетовый – тихоокеанский

регион, зеленый – атлантический регион, красный – тропический регион, серый – смешанные группы.

В общей сложности было выделено 14 клад, имеющих сильную поддержку. Две клады объединяют изоляты из Европы и едины по приуроченности к растению-хозяину (*G. repens*). Две клады включают микобионтов родов *Goodyera* и *Hataeria* тихоокеанского региона. Пять клад специфичны для тропического региона и включают микобионтов *Anoectochilus* spp., *Zeuxine* spp. и *Erythrodes plantaginea*. Пять клад являются неспецифичными по региону. По отношению к виду растения-хозяина пять клад объединяют микобионтов *Goodyera* spp., три клад составлены микобионтами *Anoectochilus* spp. и 6 клад смешаны.

ОТЕ *Ceratobasidium* sp3 и sp6 принадлежат к консервативнымкладам, включающим микобионтов *G. repens* (клады II и III), *Ceratobasidium* sp5 находится на сестринской ветви клады I с низкой поддержкой (48%). *Ceratobasidium* sp7 кластеризуется на клade IV с микобионтами *G. repens*, *G. tessellata* и *G. schlechtendaliana* атлантического и тихоокеанского регионов. ОТЕ *T. ochraceus* находится на клade VIII, кластеризуясь с микобионтом *G. procera* из Японии.

Филогенетический анализ показал наличие клад микобионтов подтрибы Goodyerinae, единообразных по географическому региону и по растению-хозяину. Таким образом, географическая приуроченность родов и видов орхидных подтрибы Goodyerinae обуславливает обособление отдельных эволюционных клад микобионтов семейства Ceratobasidiaceae.

Раздел 3.4 посвящен данным, полученным в ходе исследования анатомии микоризы эпифитных и наземных орхидных. С целью изучения особенностей колонизации корней орхидных и механизмов контроля роста гиф в корне были исследованы образцы корней *G. repens* и эпифитных орхидных подсемейства Epidendroideae, собранные на территории национального парка Кат-Тьен во Вьетнаме. Исследование было проведено на поперечных и продольных срезах методами конфокальной и флуоресцентной микроскопии.

При сравнении паттерна колонизации корней эпифитных и наземных орхидных выявлены следующие различия: корни эпифитных орхидных *Dendrobium* sp., *Gastrochilus* sp., *Thrixspermum* sp. и Epidendroideae gen sp. колонизированы только со стороны, прилегающей к субстрату, и доля колонизированных клеток кортекса на поперечном срезе может составлять от 9 до 38% в зависимости от вида. В корнях *G. repens* колонизация полная, и на поперечном срезе зоны колонизации доля клеток, содержащих грибной пелотон, составляет более 98% (см. рис. 7).

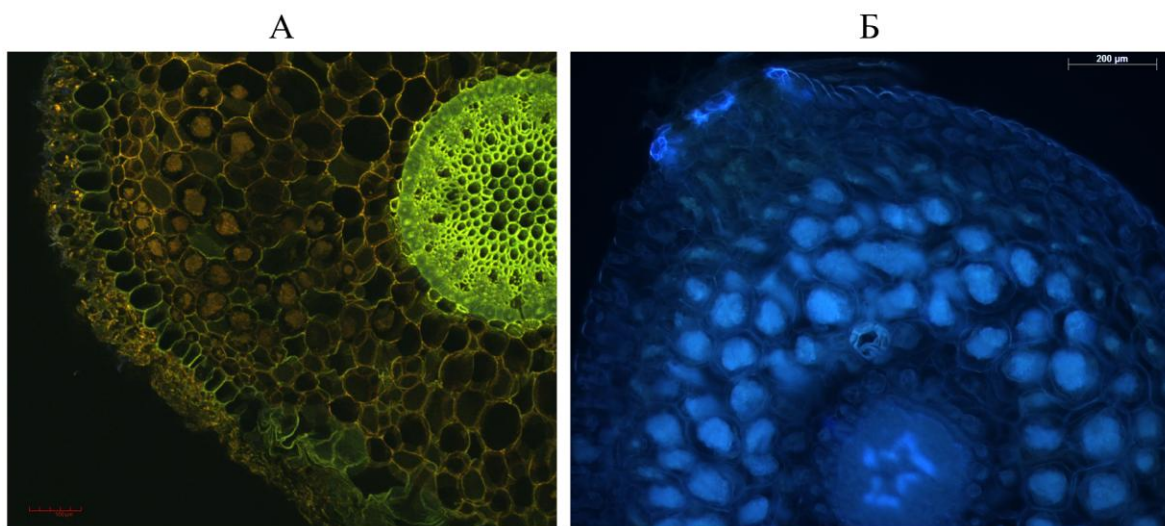


Рисунок 7. Анатомия колонизации корней *Epidendroideae* gen sp2 (А) и *G. repens* (Б)

Особое внимание в работе было уделено механизмам контроля роста гиф внутри корня. В корнях наземных видов проникновение гиф происходит через корневые волоски, а механизмы контроля отсутствуют. В корнях эпифитных орхидных проникновение гиф происходит через веламен и контролируется в экзодерме: гифы проходят в корень только сквозь нелигнифицированные пропускные клетки, тогда как толстостенные клетки экзодермы остаются неколонизированными. Несмотря на то, что способ проникновения гиф в корень эпифитных орхидных известен, остается неизученным механизм развития микоризы в кортексе корня. В кортексе корней эпифитных орхидных присутствуют лигнифицированные водозапасающие клетки (ВК), но возможность их колонизации гифами гриба оставалась неизученной.

С целью установления частоты колонизации ВК кортекса был проведен расчет долей колонизированных водозапасающих и тонкостенных клеток на срезе (см. рис. 8).

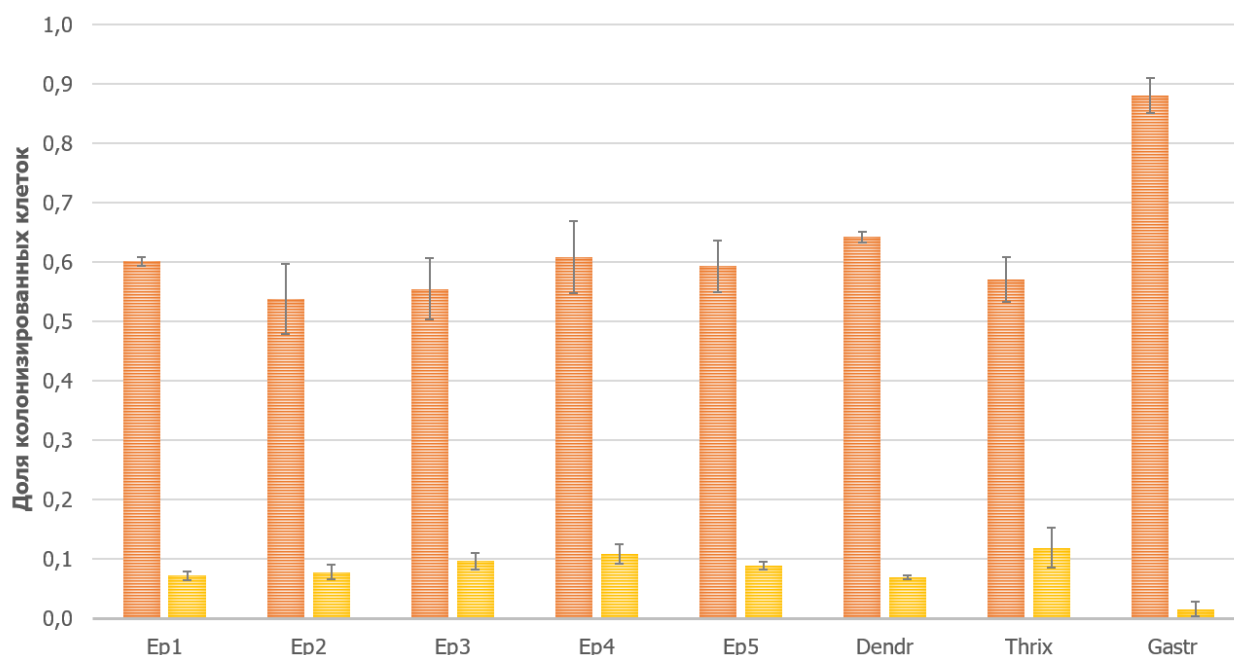


Рисунок 8. Доли колонизированных тонкостенных клеток (оранжевые столбцы) и доли колонизированных водозапасающих клеток (желтые столбцы) в изученных образцах

Доля колонизированных ВК в зоне колонизации разнится от 1,6% (*Gastrochilus* sp.) до 11,9% (*Thrixspermum* sp.), доля колонизированных тонкостенных клеток – от 53,9% (Epidendroideae gen sp2) до 88,1% (*Gastrochilus* sp.). Различие между долей колонизированных тонкостенных клеток и ВК значимо для всех образцов (p теста Стьюдента $<0,01$), что свидетельствует о значительно более редкой колонизации ВК по сравнению с тонкостенными клетками кортекса.

Таким образом, специализация эпифитных орхидных влияет на колонизацию корней микобионтом. Наличие водозапасающих клеток, веламена и пропускных клеток экзодермы строго контролируют процесс проникновения гиф в кортекс. Колонизация ВК свидетельствует о способности микобионта проникать сквозь лигнифицированные клеточные стенки. Сочетание функций удержания влаги и микоризы водозапасающих клеток так же контролируется неизученным физиологическим механизмом.

В заключении сформулированы основные результаты и выводы:

1. В общей сложности методами метабаркодинга и чистых культур в ассоциации с изучаемыми видами орхидных было выявлено 487 видов грибов, относящихся к 95 порядкам из 27 классов 7 отделов.
2. Орхидные *Zeuxine strateumatica*, *Spiranthes hongkongensis* и *Eulophia graminea* одного местообитания специфичны по составу ассоциативной микобиоты, а их наиболее

универсальные эндифиты обладают активностью против мицелиальных грибов, предположительно влияющей на способность грибов колонизировать корни орхидных.

3. Структура грибных сообществ, ассоциированных с *Goodyera repens*, обуславливается типом местообитания.
4. Микобионты эктомикоризы способны частично замещать микобионтов семейства Ceratobasidiaceae в корнях *Goodyera repens*, а их наличие обусловлено доступностью корней хвойных деревьев.
5. Представители рода *Ceratobasidium*, формирующие микоризу с *Zeuxine strateumatica*, *Spiranthes hongkongensis* и *Goodyera repens*, обладают географической и таксономической специфичностью и предположительно являются гемибиотрофами.
6. Лигнифицированные клетки кортекса корней эпифитных орхидных могут быть колонизированы микобионтом, в отличие от лигнифицированных клеток экзодермы, а доля колонизированных клеток кортекса корней эпифитов ниже по сравнению с наземными видами.

Список публикаций в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS, SCOPUS и базе ядра Российского индекса научного цитирования «eLibrary Science Index», рекомендованных для защиты МГУ имени М.В.

Ломоносова по специальности 1.5.18. Микология

1. Малышева В. Ф., Малышева Е.Ф., Воронина Е.Ю., Федосова А. Г., **Бибиков Н.М.**, Киселева Д. С., Тиунов А. В., Коваленко А. Е. Микориза грушанковых (*Pyrola rotundifolia*, *P. media* и *Orthilia secunda*): состав грибных симбионтов и трофический статус растений. Микология и Фитопатология. 2017. – Т. 51 (6). – С. 350–364. EDN: [ZVLZYX](#). Импакт-фактор 0,92 (РИНЦ). 1,85/0,50 п.л.
2. **Bibikov, N. M.**, Voronina, E. Yu., Kurakov, A. V. New records on Archaeorhizomycetes from Russia revealed by metagenomic approach. Mikologiya i Fitopatologiya. 2023. – V. 57 (2). – P. 79–85. EDN: [NIEPKA](#). Импакт-фактор 0,22 (SJR). 0,81/0,79 п.л.
3. **Бибиков Н. М.**, Воронина Е. Ю., Кураков А. В. Микобиота корневой системы *Goodyera repens* (Orchidaceae) в популяциях из трех регионов России. Микология и Фитопатология. 2024. – Т. 58 (3). – С. 195–204. EDN: [VJAEBW](#). Импакт-фактор 0,92 (РИНЦ). 1,16/1,05 п.л.
4. **Bibikov N. M.**, Voronina E. Yu., Eskov A. K., Ignatov M. S. Mycorrhizal colonization of root cortex water storage cells of epiphytic orchids. Botanicheskii Zhurnal. 2025. – V. 110 (1). – P. 64–70. EDN: [EMPHRF](#). Импакт-фактор 0,22 (SJR). 0,81/0,69 п.л.

Благодарности

Я выражаю глубочайшую благодарность Елене Юрьевне Ворониной за чуткое научное руководство и помощь на всех этапах выполнения работы, Владимиру Гертрудовичу Онопченко, Олегу Борисовичу Ткаченко и Сергею Викторовичу Волобуеву за рецензии на текст диссертации, а также Александру Васильевичу Куракову, Юлии Алексеевне Рошке, Фарходу Бакировичу Эшбоеву, Андрею Владимировичу Киташову, Цзя Шуньчао, Алену Кямаловичу Еськову, Михаилу Станиславовичу Игнатову, Андрею Григорьевичу Девятову, Ольге Владимировне Камзолкиной, Алине Витальевне Александровой, Людмиле Юрьевне Кокаевой, Ирине Ивановне Сидоровой и Олегу Анатольевичу Маракаеву за помощь на разных этапах работы.