

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ РИЗОСФЕР ЗЛАКОВ, ВЫРАЩЕННЫХ НА КОНТРАСТНЫХ ПОЧВАХ

© 2020 г. А. О. Зверев^{a, *}, Е. В. Першина^a, В. М. Шапкин^a, А. К. Кичко^a, О. П. Митрофанова^b,
В. Д. Кобылянский^b, О. С. Юзихин^c, А. А. Белимов^a, Е. Е. Андронов^{a, d}

^aФедеральное государственное бюджетное научное учреждение “Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии”, Санкт-Петербург, 196608 Россия

^bФедеральный исследовательский центр “Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова”, Санкт-Петербург, 190000 Россия

^cФедеральное государственное бюджетное научное учреждение “Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений”, Санкт-Петербург, 196608 Россия

^dСанкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: azver.bio@gmail.com

Поступила в редакцию 19.03.2018 г.

После доработки 25.07.2019 г.

Принята к публикации 29.09.2019 г.

В работе изучали изменения микробного состава ризосферных сообществ при выращивании различных видов и сортов сельскохозяйственных злаков (ржи и пшеницы) в контрастных по ряду агрохимических признаков почвах. Представлены результаты анализа микробного сообщества ризосфер (секвенирование V4-вариабельного участка гена 16S рДНК), а также данные ионного и масс-спектрометрического состава почвенной вытяжки. Индексы альфа-разнообразия ризосферных и контрольных почвенных сообществ практически не различались. Анализ бета-разнообразия показал большую изменчивость микробных сообществ ризосфер растений, выращенных на черноземе. Ризосферные сообщества растений, выращенных на дерново-подзолистой почве, различались меньше и обособлены в отдельные кластеры. Были выявлены таксоны, достоверно принимающие участие в формировании специфического ризосферного микробиома ржи и пшеницы. Найдены как общие ризосферные таксоны (*Sphingobacteriia*, *Betaproteobacteria*), так и видо- и сортоспецифичные (*Oxalobacteraceae*, *Sphingobacteriaceae*). Содержание ионов в составе почвенной вытяжки существенно зависело от типа почвы, а сходство масс-спектральных профилей в большей степени определялось видом растения, чем типом почвы.

Ключевые слова: почвенная метагеномика, ризосферный эффект, контрастные почвы, рожь, пшеница

DOI: 10.31857/S0026365620010188

Изучению воздействия растения на сообщество микроорганизмов почвы посвящено большое количество работ. Тем не менее, лишь с появлением высокопроизводительного секвенирования и развития метагеномики стало возможно наиболее полно описывать микробные сообщества, с учетом не только культивируемых, но и некультивируемых форм микроорганизмов (Handelsman, 2004).

В настоящее время исследованию структуры прикорневых микробных сообществ с использованием метагеномных методов посвящено множество статей и крупных научных проектов (Gotel et al., 2011; Knief et al., 2012; Mendes et al., 2014). Исследователями отмечены различия в таксономическом составе ризосферных микробных сообществ однодольных и двудольных растений. Так в сообществах двудольных, изучаемых, главным образом, на примере *Arabidopsis thaliana*, показано

увеличение числа представителей *Actinobacteria* (*Streptomicetaceae*), протеобактерий (главным образом *Pseudomonadaceae*), однодольные же растения характеризовались сравнительно большей долей *Bacteroidetes* и *Rhizobiales* (Bulgarelli et al., 2015).

Основная масса работ посвящена исследованию двудольных, и, в частности, модельного объекта *A. thaliana*. Одним из самых значимых исследований является работа Лундберга и соавт. (Lundberg et al., 2012). В работе с использованием методов высокопроизводительного секвенирования было проведено исследование таксономической структуры микробиомов в исходных почвах, ризосфере и эндосфере различных сортов *A. thaliana*. Наиболее выраженные изменения в составе микробиомов были связаны с действием растительного фактора (с изменением состава сообщества микроорганизмов под действием развивающегося растения), следующим по силе воздей-

ствия были тип почвы, а затем стадия развития и его генотип (Lundberg et al., 2012). Было показано, что микробные сообщества эндосфер в значительной степени обособлены от сообществ почвы и ризосферы. По сравнению с эндосферой, почвенные и ризосферные микробные сообщества демонстрировали выраженное сходство таксономических составов. Таксономический анализ показал присутствие в сообществах исходных почв большого количества представителей *Proteobacteria* (35%), *Bacteroidetes* (20%), *Acidobacteria* (18%), также отмечено присутствие *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadates*. В ризосферных сообществах достоверно увеличивалась доля протеобактерий за счет появления в сообществе бактерий из сем. *Pseudomonadaceae* (Lundberg et al., 2012).

Значительная часть сельскохозяйственных культур (пшеница, рожь, просо и т.д.), являются однодольными. Изучению микробных сообществ таких культур посвящено меньшее количество работ. Тем не менее, на сегодняшний день существуют исследования, описывающие микробиомы пшеницы (Donn et al., 2015), кукурузы (Peiffer et al., 2013), риса (Edwards et al., 2015), ячменя (Bulgarelli et al., 2015).

Результаты, полученные в целом ряде исследований однодольных растений, оказались схожи. Наиболее показательной можно назвать работу по изучению закономерностей формирования ризосферного сообщества ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare*) (Bulgarelli et al., 2015), в которой было показано снижение показателей альфа- и бета-разнообразия в ряду почва–ризосфера–эндосфера. Исходная почва была богата представителями фил *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, и *Proteobacteria*; они составляли до 92% сообщества. В ризосферном сообществе, по сравнению с сообществами исходной почвы, увеличивалась доля филы *Bacteroidetes*, в частности, *Flavobacteriaceae*, *Rizobiaceae* и *Commatomonadaceae*. При этом численность бактерий из фил *Firmicutes* и *Chloroflexi* уменьшалась (Bulgarelli et al., 2015).

Как уже упоминалось выше, наиболее выраженные изменения в составе микробиомов были связаны с развитием растения и локализацией сообщества (почва, ризосфера, ризоплана). Вторым по силе воздействия на ризосферное сообщество являлся почвенный фактор (Berg et al., 2009; Girvan et al., 2013). Ряд исследований показывают, что в зависимости от того, насколько различаются почвы, воздействие этого фактора объясняет от 7.5 (Edwards et al., 2015) до 27% (Winston et al., 2014) различий в структуре микробиомов ризосферы. В контрастных почвах, микробный состав которых сильно различается, сильно различаются между собой и таксономические составы ризосферных сообществ на этих почвах (Peiffer et al., 2013).

Фактор вида и сорта растения – его генотипа – рассматривается в ряде экспериментов наряду с типом почвы и растительным фактором. Примером может служить изучение ризосферных сообществ трех видов агав – *Agave tequilana*, *A. salmiana* и *A. deserti* (Coleman-Derr et al., 2016). В ризосферном сообществе *A. tequilana*, используемого в сельскохозяйственных посадках, было обнаружено существенное увеличение доли *Pseudomonadales* (около 25% общего состава сообщества), а также *Enterobacteriales* (около 40%). Дикие агавы показывали большее разнообразие. По сравнению с сообществом исходной почвы, доля представителей *Bacilliales*, *Actinomycetales* и *Xanthomonadales* увеличивалась (Coleman-Derr et al., 2016). Анализ ризосферных сообществ ячменя (Bulgarelli et al., 2015) и кукурузы (Peiffer et al., 2013) свидетельствует о том, что влияние генотипа растения сказывается не столько на присутствии тех или иных таксонов (как это показано для фактора растения и типа почвы) в ризосфере, сколько на изменении их частоты. При анализе микробиомов ячменя генотип растения оказался достоверно значимым фактором (5.7% различий в структуре микробиомов), определяющим состав ризосферного микробиома, в то время как для *A. thaliana* этот эффект выражен меньше (Lundberg et al., 2012). Эту же концепцию подтверждает исследование нескольких сортов *Cannabis sativa* и *C. indica* (Winston et al., 2014).

Влияние генотипа растения может сказываться не только на таксономической структуре сообщества, но и на показателях альфа- и бета-разнообразия сообщества. Так, анализ ризосферных сообществ пяти сортов риса, принадлежащих трем разным видам, продемонстрировал значительные (до полутора раз) различия в показателях альфа-разнообразия между микробными сообществами (Edwards et al., 2015).

Стоит подчеркнуть, что все представленные выше результаты должны восприниматься с осторожностью, поскольку методологическая база для подобного рода исследований пока разработана слабо. Особенно существенно сказывается отсутствие единой методики дифференциального фракционирования микробиомных сообществ в ряду почва–ризосфера–ризоплана–эндосфера.

В настоящее время большинство исследований микробных сообществ прикорневой зоны растений проводится на модельных объектах, таких, как *A. thaliana* (Chaparro et al., 2013) или *Zea mays* (Aira et al., 2010). При этом сравнительно малый процент составляют работы, посвященные исследованию хозяйственно-ценных однодольных культур, таких как рожь и пшеница.

Целью настоящей работы было изучить изменения микробного сообщества ржи и пшеницы в двух контрастных, широко распространенных в

сельском хозяйстве почвах, а также выяснить, существует ли видо- и сортоспецифичные изменения в ионном и молекулярном составе почвенных вытяжек.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Для работы были отобраны почвы, принадлежащие к группам черноземных и дерново-подзолистых. Выбор объектов был обусловлен их контрастными свойствами и широким распространением на территории России. Данные почвы количественно различаются по общему содержанию органического вещества, гранулометрическому составу и другим физико-химическим показателям. Главной особенностью дерново-подзолистой почвы является кислая реакция среды. Чернозем, в свою очередь, содержит большое количество органических веществ, обладает высокой влагоемкостью и рН близким к нейтральному.

Для выявления влияния типа почвы на формирование ризосферного микробиома сравнивали образцы, принадлежащие разным типам почв (контролей), с образцами почв ризосфер всех растений; для выявления видовых и сортовых различий сравнивали 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).

Отбор почв для проведения экспериментов производили 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 5 мм, 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).

Постановка вегетационного опыта. Закладка вегетационного опыта по культивированию двух контрастных сортов *Triticum aestivum* (Пшеница мягкая) и двух сортов *Secale cereale* (Рожь посевная) была произведена в дерново-подзолистой

почве и черноземе. В сосуды с почвой вносили семена из расчета 25 шт. на сосуд на глубину 3–5 см. На один сорт использовали по два сосуда с каждым типом почв.

Эксперимент проводили в течение 42 сут. 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 50-мл флакон с водой для дальнейшего встряхивания в течение 1 мин. 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. Поскольку во всех случаях навеска почвы была ориентировочная, дальнейший анализ включал только качественные характеристики микробных сообществ.

Выделение и очистку ДНК осуществляли в соответствии с методикой, разработанной во ВНИИСХМ (Андронов и соавт., 2011). Разрушение образца производили на гомогенизаторе FastPrep с использованием высокоскоростного встряхивания по орбите, исключаяющей возникновение стационарно закрученных потоков в пробирке. Средняя концентрация ДНК составила 18 нг/мл. Очищенный препарат ДНК использовали в качестве матрицы в реакции ПЦР с универсальными праймерами к вариабельному участку V4 гена 16S рРНК F515 GTGCCAGCMG-CCGCGGTAА и R806 GGACTACVSGGG-TATCTAAT (Bates, 2011). Подготовку проб и секвенирование проводили на приборе GS Junior (“Roche”, США) согласно рекомендациям производителя.

Биоинформационный анализ данных. Анализ полученных по результатам секвенирования нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК производил с использованием программы QIIME (версия 1.8.0) (Caporaso et al., 2010). Были исключены последовательности длиной менее 200 нуклеотидов, имеющие параметр качества прочтения (qualityscore) менее 25, химерные и небактериальные/неархейные последовательности. Последовательности с процентом сходства, превышающим 97%, объединяли в операционные таксономические единицы (ОТЕ) с использованием алгоритма *de novo* (Caporaso et al., 2010). В качестве базы нуклеотидных последовательностей использовалась база GreenGenes версии 12.8 (DeSantis et al., 2006).

Для оценки биоразнообразия и проведения сравнительного анализа сообществ при помощи того же пакета QIIME были рассчитаны парамет-

ры альфа- и бета-разнообразия. Альфа-разнообразии оценивали с использованием индексов видового богатства (число ОТЕ в образце) и индекса Шеннона, а достоверность различий по индексам альфа-разнообразия среди микробиомов – с использованием *t*-теста. Для оценки бета-разнообразия использовали методы “weighted unifrac” и “unweighted unifrac”, позволяющие 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).

Для подсчета индексов разнообразия и проведения кластерного анализа использовали критерий Bray-Curtis, вычисления осуществляли в программе PAST (Hammer et al., 2001).

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

Для исследования таксономического состава сообщества использовали только те ОТЕ, суммарное количество сиквентов которых (для всех исследуемых образцов) было больше 8. Это эмпирически найденное ограничение необходимо для исключения из анализа ОТЕ, присутствующих в образцах в незначительном количестве.

Масс-спектрометрия. Для получения данных о молекулярном составе почвы использовали водную экстракцию. Полученную почвенную суспензию центрифугировали, осаждая твердые частицы. Супернатант использовали для анализа масс-спектрального состава, проводившегося на установке WatersAcquityHPLC при помощи прямого ввода; ионизация в электроспрее (напряжение 3.8 кВ). Для регистрации использовался времяпролетный детектор. Обработку результатов производили в программе BioNumerics 7 (“BioNumerics”).

Анализ ионного состава. Содержание доступных растениям форм питательных (биогенных) и токсичных (абиогенных) элементов в ризосферной почве изучали в лабораторных условиях путем получения почвенных вытяжек 0.1 М раствором HNO₃. Вытяжки центрифугировали 10 мин при 7000 g и в супернатантах определяли содержание питательных макро- и микроэлементов (P, K, Ca, Mg, S, Fe, B, Zn, Mn, Na, Co, Cr, Cu, Ni), а также токсичных элементов (Cd, Pb, Hg) с помощью оптического эмиссионного спектрометра параллельного действия с индуктивно-связанной плазмой ICPE-9000, по методикам производителя. Контролем служили образцы неризосферной почвы. Обработку результатов проводили в программе BioNumerics 7 (“BioNumerics”).

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 *S. cereale* (ВИР К-6469) на черноземе;

ДП R3 – ризосфера *S. cereale* (ВИР К-7856) на дерново-подзолистой почве;

ЧЗ R3 – ризосфера *S. cereale* (ВИР К-7856) на черноземе;

ДП W2 – ризосфера *Triticum aestivum* (ВИР К-9084) на дерново-подзолистой почве;

ЧЗ W2 – ризосфера *T. aestivum* (ВИР К-9084) на черноземе;

ДП W5 – ризосфера *T. aestivum* (ВИР К-54609) на дерново-подзолистой почве;

ЧЗ W5 – ризосфера *T. aestivum* (ВИР К-54609) на черноземе.

Каждый вариант рассмотрен в 4 повторностях.

Анализ нуклеотидного полиморфизма популяций

В результате секвенирования было получено 149132 нуклеотидных последовательности, из которых после проверки качества и фильтрации в дальнейшем анализе использовали 119306. Среднее количество нуклеотидных последовательностей в библиотеке на образец составляло 2508.

В результате секвенирования всех образцов была достигнута относительно небольшая глубина секвенирования (2500 последовательностей в образце). Анализ разнообразия показал, что ни одна из кривых насыщения не вышла на плато. Это ожидаемый результат, поскольку почва является крайне гетерогенным объектом (Berg et al., 2009). Микробные сообщества почвы различаются даже в пределах нескольких миллиметров, а также в различных участках почвенных агрегатов и между горизонтами (Ивлев, 2005).

Чтобы количественно оценить, какую часть сообщества удалось детектировать в эксперименте, наиболее часто используют отношение числа выявляемых ОТЕ к индексу Chao1, который, в свою очередь, оценивает теоретически возможное количество видов в природном сообществе (генеральной совокупности) (табл. 1, 2). При анализе воспроизводимости таксономического состава микробиомов в повторностях опыта были получены сравнительно высокие показатели – больше половины таксонов в составе сообщества (69.3%) достоверно не изменяли свои частоты в повторностях. Данный показатель был в среднем ниже в повторностях черноземных почв, что свидетельствует о его зависимости от типа почвы. В

Таблица 1. 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	68.0
ДП R1	80.1	83.2
ДП R3	84.1	78.1

дальнейшем для получения репрезентативных библиотек различных природных сообществ стоит использовать разную глубину секвенирования и количество проб. Параметры эти рекомендуются определять в ходе установочных экспериментов, однако можно рекомендовать увеличить количество повторностей в случае черноземной почвы до 7, а в случае дерново-подзолистой почвы можно ограничиться и 5–6 повторностями.

Также при сравнении повторностей опыта было отмечено снижение доли “воспроизводимых” так-

сонов в ризосфере пшеницы: доля “воспроизводимых” ОТЕ в различных вариантах опыта составила в среднем 69.3%, в то время как в сообществах ризосферы пшеницы на черноземе этот параметр составлял 52.6%. Этот феномен может быть связан с большим разнообразием микробиомов, населяющих ризосферу пшеницы, которое, в свою очередь, определяется особенностями корневой экссудации этого растения.

Важно подчеркнуть, 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 – 79.3% (табл. 1).

Анализ показателей альфа-разнообразия. Для оценки альфа-разнообразия сообществ были рассчитаны индекс видового богатства и индекс Шеннона (табл. 2). Ризосферные сообщества демонстрируют снижение уровня разнообразия в сравнении с контрольными почвами, хотя достоверные различия в показателях альфа-разнообразия были обнаружены только для сообществ ризосферы пшеницы на черноземной почве (ЧЗ W5; ЧЗ W2).

Такое снижение разнообразия хорошо согласуется с известными литературными данными. В исследованиях ризосферного микробиома нескольких сортов риса также были продемонстрированы различия в альфа-разнообразии (Edwards et al., 2015). Небольшое, не всегда достоверное, снижение числа ОТЕ и индекса разнообразия

Таблица 2. Показатели альфа-разнообразия с учетом стандартного отклонения (между повторностями)

Образец	ОТЕ	Индекс Шеннона	Chao-1	Филогенетическое разнообразие Фейта (PDWholeTree)	Репрезентативность выборки
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

Шеннона в ризосфере, по сравнению с контрольными почвами, также отмечалось многими авторами (Winston et al., 2014, Edwards et al., 2015). Различия в численных показателях снижения разнообразия, по-видимому, обусловлены влиянием различных спектров корневых экссудатов на микробное сообщество черноземной почвы.

Снижение микробного разнообразия в ризосферных сообществах, возможно, связано с селективным действием растительных факторов, т.е. растение “отбирает” определенные функциональные группы микроорганизмов, в том числе филогенетически не связанные друг с другом. К этим группам могут быть отнесены и микроорганизмы с высокой метаболической пластичностью, быстро адаптирующие клеточный метаболизм к изменившимся условиям.

Анализ показателей бета-разнообразия. Для интегральной оценки различий в составе сообществ обычно используют различные варианты многомерных статистических анализов, в частности, анализ главных компонент РСоА. На рис. 1 представлены данные РСоА почвенных контрольных и ризосферных образцов, для данных взвешенного (учитывающего численность ОТЕ) – weighted (рис. 1а, 1б) и невзвешенного (учитывающего только представленность ОТЕ) – unweighted (рис. 1в, 1г) Unifrac.

Существенные различия в составе ризосферных и почвенных сообществ подтверждаются высоким процентом объясненной вариации данных. Для РСоА анализа с использованием взвешенного Unifrac этот показатель составлял до 40% (рис. 1а, 1б).

Тип почвы оказался первым по значимости фактором, влияющим на состав микробного сообщества. С этим фактором ассоциировано более 20% различий в таксономическом составе микробиомов. Сообщества черноземной и дерново-подзолистой почвы различались по своей таксономической структуре, что выражается в присутствии кластеров на графиках РСоА (рис. 1а, 1в). Сообщества черноземной почвы проявляли некоторую гетерогенность по количественному составу микробиомов, что может быть связано с физико-химическими параметрами, создающими многообразие экологических ниш (рис. 1а, 1в). Микробные сообщества дерново-подзолистой почвы хорошо вторгаются друг друга и образуют хорошо выраженный кластер (рис. 1а). Выраженное влияние типа почвы обусловлено физико-химическими различиями почвы – именно эти факторы в значительной мере определяют разнообразие прокариот.

Вторым по значимости фактором, определяющим состав ризосферного микробиома, является вид растения. Отчетливо этот фактор проявляется при сравнении сообществ дерново-подзолистой почвы и ризосфер, сформированных на ней, – на

графике РСоА отчетливо видны кластеры ризосфер ржи и пшеницы (рис. 1а, 1б). В случае чернозема этот эффект также присутствует, но является менее выраженным, что, возможно, связано с уже упомянутой ранее высокой гетерогенностью этой почвы.

Микробные сообщества ризосфер и пшеницы, и ржи на дерново-подзолистой почве отличаются от исходных почв, и отличия эти для обоих растений одинаково выражены. На дерново-подзолистых почвах также хорошо заметно влияние сорта растения. Так, ризосферные сообщества ржи сорта R1 оказываются ближе к исходным почвам, чем ризосферные сообщества ржи сорта R3. Аналогичный эффект можно наблюдать и для сортов пшеницы (рис. 1б). Такая разная дистанция между сообществами исходной почвы и ризосферными сообществами разных сортов в большей мере определяется количественным соотношением таксонов, поскольку по данным unweighted unifrac (учитывающим только наличие/отсутствие ОТЕ) дистанции между сообществами ДП–ДП R1 и ДП–ДП R2 существенно не отличаются.

Для микробиомных сообществ чернозема и ризосферных сообществ, сформированных на его основе, в целом характерны те же тенденции (рис. 1). Сообщества ризосфер ржи и пшеницы отличаются от сообществ исходных почв, дистанции между сообществами также зависят от сорта растения. Однако в рамках этого анализа однозначно разрешить эти изменения не удалось, вероятнее всего, из-за высокой агрохимической и биологической гетерогенности почвы.

Полученные результаты согласуются с опубликованными ранее работами. В ряде работ демонстрируется выраженное влияние растения на микробное сообщество уже в ризосфере (Vulgarelli et al., 2015; Edwards et al., 2015). В других работах, однако, указывается на отсутствие каких-либо изменений в составе сообществ ризосферы (по сравнению с сообществами контрольной почвы), и различия показаны только для сообществ ризопланов (Aira et al., 2010). Такое явное противоречие в оценках связано как с различной силой влияния растения на микробиом почвы, так и с уже упомянутой во введении проблемой фракционирования микробных сообществ (почва–ризосфера–ризоплана).

Анализ таксономической структуры сообществ. Как уже упоминалось в разделе Материалы и методы, для проведения таксономического анализа нами использовались только ОТЕ, достоверно не различающиеся между повторностями.

Преобладающим в сообществах являлся домен *Bacteria*, однако *Archaea*, представленный преимущественно филой *Crenarchaeota*, составлял значительную долю микробиома – 11% в случае черноземных и 5% в случае дерново-подзолистых

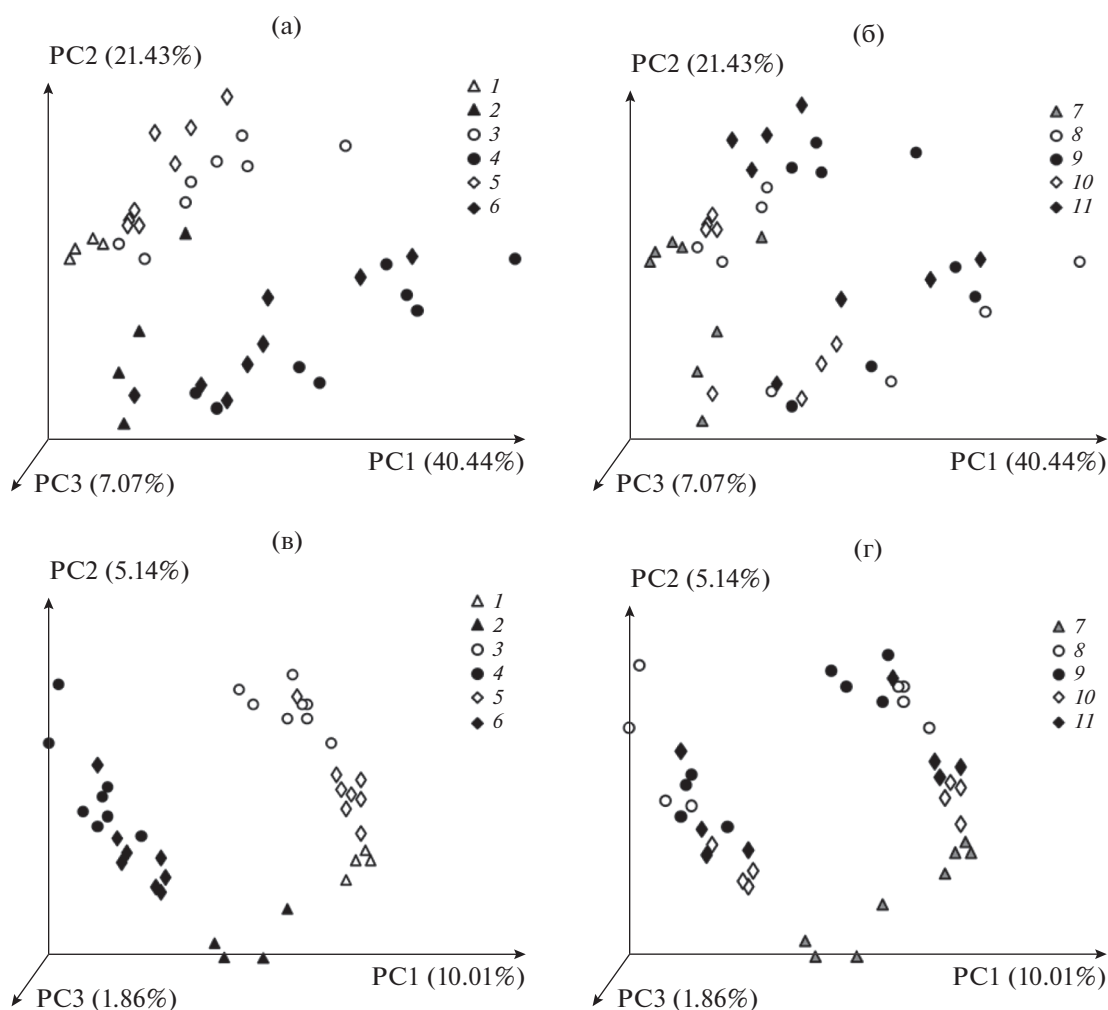


Рис. 1. Анализ главных компонент (PCoA) для микробных сообществ с обозначением контрольных и ризосферных образцов различных видов культурных растений. На осях указан процент объясненной вариации. А, Б – weighted Unifrac (1 – ДП; 2 – ЧЗ; 3 – пДП; 4 – пЧЗ; 5 – рДП; 6 – рЧЗ), В, Г – unweighted Unifrac (7 – исходная почва; 8 – ризосфера пшеницы W2; 9 – ризосфера пшеницы W5; 10 – ризосфера ржи R1; 11 – ризосфера ржи R2).

образцов. Это соотношение практически не изменялось при рассмотрении ризосферных сообществ.

На уровне фил в почвенных и ризосферных образцах большую часть сообщества составляли представители *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, а также упомянутые выше *Crenarchaeota*. Такая картина в целом типична для почвенных сообществ. В литературе есть указания на присутствие большого количества *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* даже в разных по своему происхождению и типу почвах (Lundberg et al., 2012).

При сравнении исходной почвы и ризосферных сообществ, сформированных на черноземе, наблюдалось увеличение доли филы *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*. Этот же эффект, даже в большей степени, присутствовал и у ризосферных образ-

цов на дерново-подзолистой почве. Доля представителей фил *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi* и *Actinobacteria*, при сравнении обоих типов контрольных почв с соответствующими ризосферными сообществами, сокращалась. На уровне классов в переходах почва– ризосфера наблюдалось значительное увеличение числа *Sphingobacteriia* (*Bacteroidetes*) – с 0.6 до 8% на черноземе и с 0.6 до 6.4% на дерново-подзолистой, а также *Betaproteobacteria* (*Proteobacteria*) – с 6.8 до 19.4% на дерново-подзолистой почве и с 8.4 до 16.9% на черноземе (табл. 3).

Также 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 –

Таблица 3. Доли таксонов, достоверно изменяющих свою численность в попарных сравнениях ризосферных и почвенных сообществ ($p < 0.05$)

Чернозем – ризосфера ржи на черноземе		
	Доля таксона в ЧЗ	Доля таксона в рЧЗ
f__ <i>Oxalobacteraceae</i>	0.0058	0.0438
f__ <i>Micrococcaceae</i>	0.0051	0.0298
c__ <i>Acidobacteria-6</i>	0.0194	0.0067
Чернозем – ризосфера пшеницы на черноземе		
	Доля таксона в ЧЗ	Доля таксона в пЧЗ
f__ <i>Oxalobacteraceae</i>	0.0058	0.0624
c__ <i>Acidobacteria-6</i>	0.0194	0.0058
Дерново-подзолистая почва – ризосфера ржи на дерново-подзолистой почве		
	Доля таксона в ДП	Доля таксона в рДП
f__ <i>Oxalobacteraceae</i>	0.0066	0.1116
f__ <i>Gaiellaceae</i>	0.0518	0.0220
o__ <i>Solirubrobacterales</i>	0.0338	0.0152
f__ <i>Comamonadaceae</i>	0.0264	0.0113
f__ <i>Micrococcaceae</i>	0.0086	0.0213
Дерново-подзолистая почва – ризосфера пшеницы на дерново-подзолистой почве		
	Доля таксона в ДП	Доля таксона в пДП
f__ <i>Oxalobacteraceae</i>	0.0066	0.0577
f__ <i>Gaiellaceae</i>	0.0518	0.0303
c__ <i>Acidobacteria-6</i>	0.0172	0.0056
Ризосфера ржи и ризосфера пшеницы на черноземе		
	Доля таксона в рЧЗ	Доля таксона в пЧЗ
f__ <i>Micrococcaceae</i>	0.02983	0.01103
Ризосфера ржи и ризосфера пшеницы на дерново-подзолистой почве		
	Доля таксона в рДП	Доля таксона в пДП
f__ <i>Oxalobacteraceae</i>	0.1116	0.0577
g__ <i>Rhodoplanes</i>	0.0224	0.0434
f__ <i>Comamonadaceae</i>	0.0077	0.0204
f__ <i>Sphingobacteriaceae</i>	0.0507	0.0287
Ризосферы двух сортов ржи на черноземе		
	Доля таксона в рЧЗ R1	Доля таксона в рЧЗ R3
f__ <i>Chthoniobacteraceae</i>	0.04756	0.0207
Ризосферные сообщества двух сортов пшеницы на черноземе		
	Доля таксона в пЧЗ W2	Доля таксона в пЧЗ W5
f__ <i>Oxalobacteraceae</i>	0.0741	0.0507
Ризосферы двух сортов ржи на дерново-подзолистой почве		
	Доля таксона в рДП R1	Доля таксона в рДП R3
f__ <i>Oxalobacteraceae</i>	0.0412	0.1821
f__ <i>Chitinophagaceae</i>	0.0438	0.0227
Ризосферы двух сортов пшеницы на дерново-подзолистой почве		
	Доля таксона в пДП W2	Доля таксона в пДП W5
f__ <i>Sphingobacteriaceae</i>	0.0429	0.0144

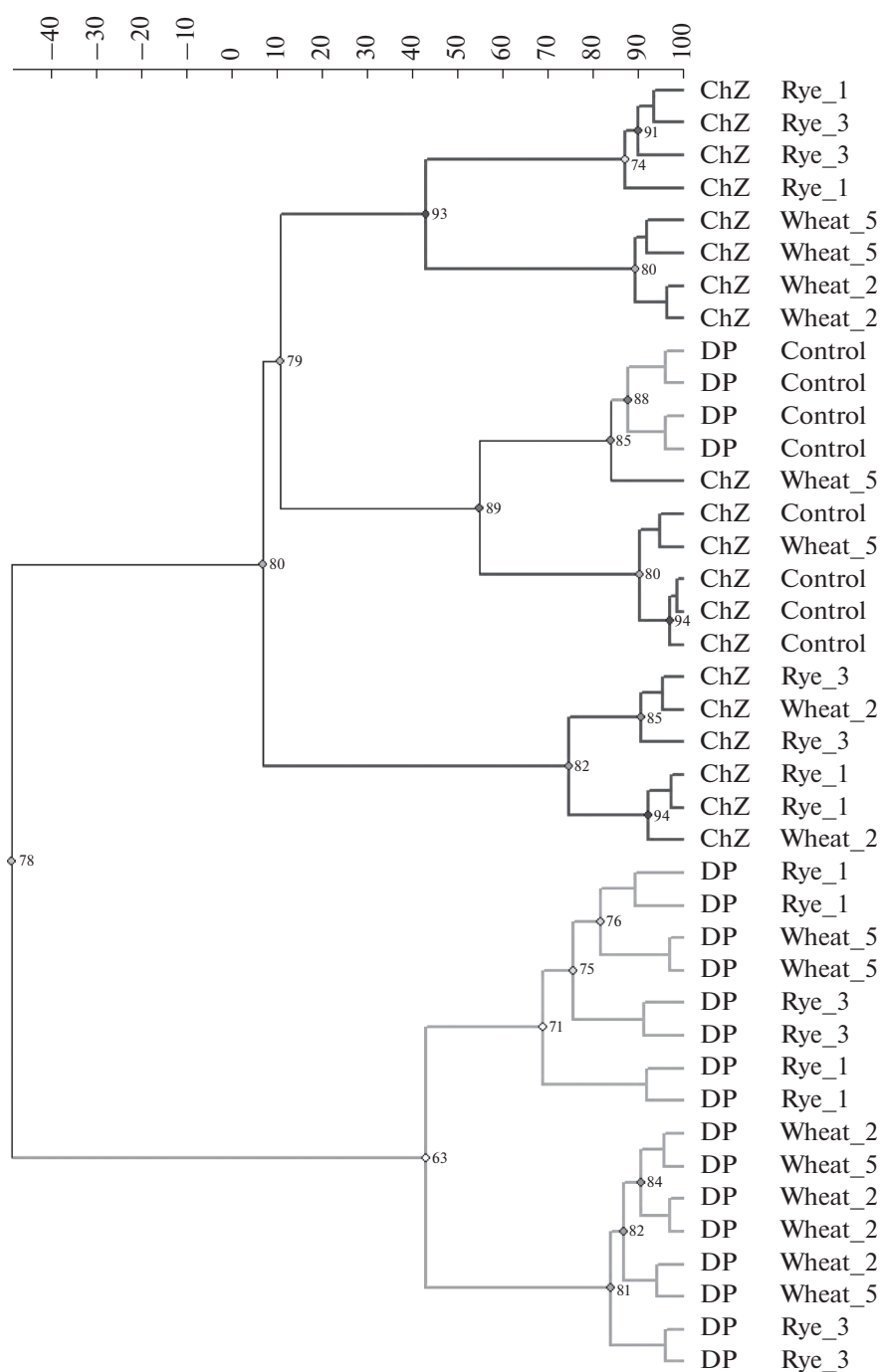


Рис. 2. Дендрограмма, построенная по данным ICPE (Curtiss, алгоритм кластеризации Ward). Темными линиями отмечены образцы, полученные из чернозема, светлыми – из дерново-подзолистой почвы.

уменьшение в сообществе доли семейства *Oxalobacteraceae* и достоверное увеличение доли *Acidobacteria* (табл. 3).

Сравнение различных сортов одного вида растения позволяют выделить несколько сортспецифических таксонов. Так между сортами ржи на черноземной почве достоверные различия долей в сообществе были выявлены в группе *Chthonio-*

bacteraceae, а при аналогичном сравнении сортов пшеницы – в группе *Oxalobacteraceae* и *Sphingobacteriaceae*. Стоит отметить, что *Sphingobacteriales* также упоминается в литературе как сортспецифичный таксон для различных сортов конопли (Winston et al., 2014).

В ряде исследований отмечается специфичность ризосферных таксонов. Так, уже упоминавшиеся

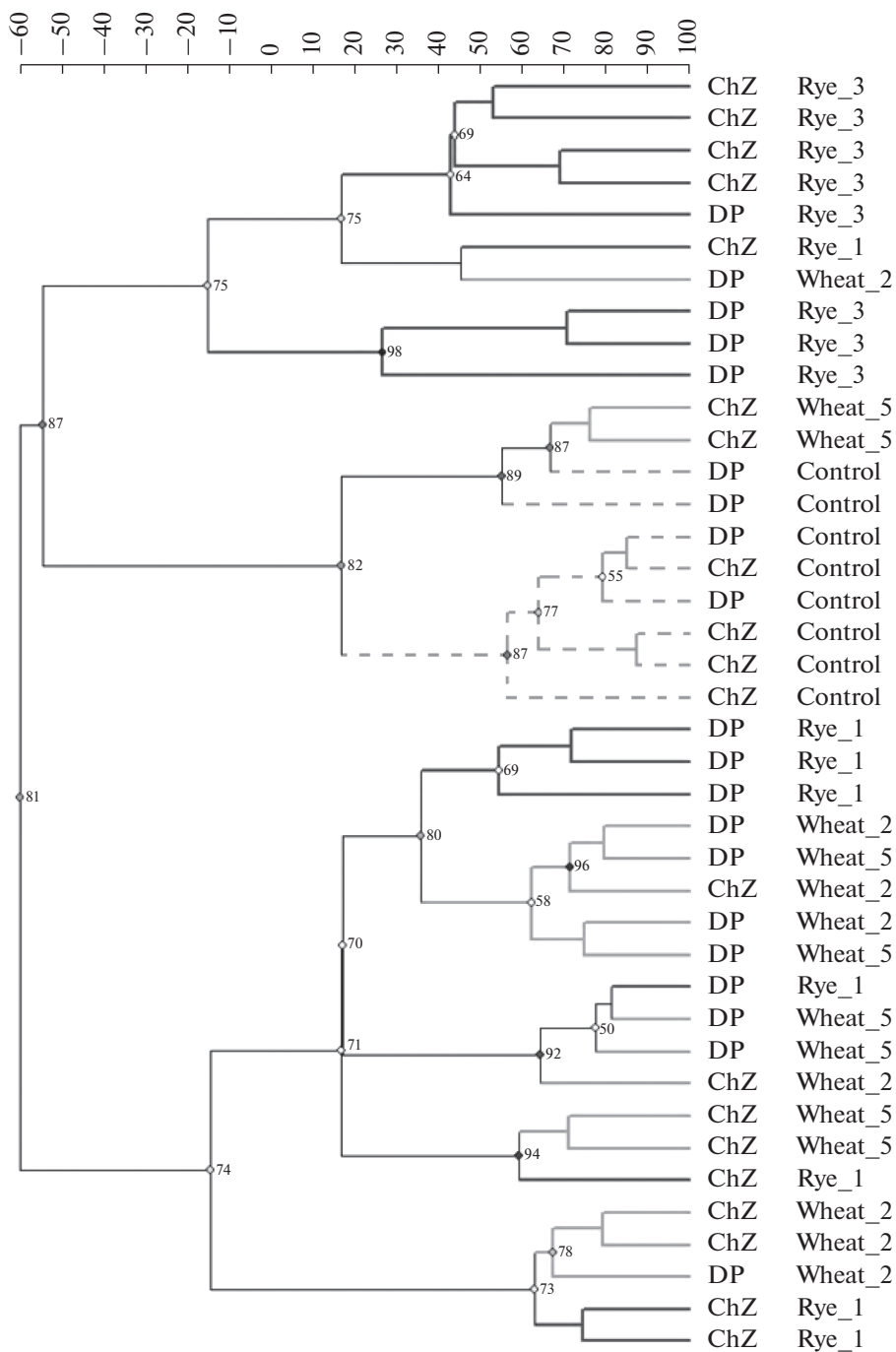


Рис. 3. Дендрограмма, построенная по данным масс-спектрометрии (Jaccard, алгоритм кластеризации Ward). Темными линиями отмечены образцы, полученные из ризосфер ржи, светлыми – из ризосфер пшеницы. Пунктирные линии отмечают образцы, взятые из контрольных почв.

исследования ризосферных сообществ ячменя указывают на увеличение доли *Comamonadaceae* (Bulgerelli et al., 2015), а ризосфер конопли – на увеличение доли *Sphingomonadales* (Winston et al., 2014).

Видоспецифичность некоторых ризосферных таксонов также отражена в литературе (Ed-

wards et al., 2015; Coleman-Derr et al., 2016), однако ни в одном из проанализированных литературных источников не было обнаружено тех таксонов, которые изменяли свою долю в проанализированных микробиомах ризосфер ржи и пшеницы.

Характеристика ризосферного эффекта с использованием данных масс-спектрометрии и ионного состава

Массив данных, полученных при анализе ионного и масс-спектрального состава, очень велик и требует детального рассмотрения. В рамках данной работы мы охарактеризуем сходство или различие ионных и масс-спектральных профилей.

В графике, построенном по результатам кластерного анализа профилей масс-спектров (рис. 2), несмотря на отсутствие четкой кластеризации, можно выделить отдельную кладу, принадлежащую масс-спектрам исходных почвенных образцов. Также хорошо обособленной является клада, принадлежащая масс-спектрам ризосфер ржи. По-видимому, состав масс-спектров, в большей степени зависит от вида растения, а не от типа почвы. Это может быть связано с присутствием большого количества органических соединений – продуктов корневой экссудации.

Кластерный анализ ионного состава (рис. 3) показывает несколько иную картину. Дендрограмма, построенная по данным ионного состава, характеризуется высокими значениями поддержки кластеров, а сам состав кластеров демонстрирует выраженную зависимость ионного состава почвенной вытяжки от типа почвы. Образцы ризосфер дерново-подзолистых почв группируются в отдельный кластер с высоким значением поддержки. Второй кластер включает в себя ризосферы, сформированные на черноземе, и обе исходные почвы (чернозем и дерново-подзолистая).

Таким образом, в качестве дальнейшей гипотезы можно считать, что именно тип почвы определяет ионный состав ризосферы. В целом химический состав (определяемый масс-спектрально) ризосферной почвы зависит от большего числа факторов, и одним из оказывающих существенное влияние является вид растения.

Исследование стало первой попыткой анализа ризосферных сообществ ржи и пшеницы на контрастных почвах с использованием системного подхода к анализу биоразнообразия. В ходе работы была применена комплексная методика отбора ризосферных образцов, а также дополнены методы статистической поддержки метагеномного анализа сообщества, позволяющие рассчитать требуемое количество повторностей эксперимента.

В ходе исследования было показано, что именно почвенное микробное сообщество является основой для формирования растением ризосферного микробиома. Также были выявлены таксоны, достоверно принимающие участие в формировании специфического ризосферного микробиома ржи и пшеницы. Были выявлены как общие ризосферные таксоны (*Oxalobacteriaceae*), так и видо-специфические (*Micrococcaceae*, *Sphingobacteriaceae* и др.) и сорто-специфические. Изменение состава микробиома отчетливее проявляется на бедных почвах. Мож-

но предположить, что растение “отбирает” из почвенного сообщества те или иные бактериальные таксоны, основываясь не на их таксономическом положении, но на функциональной роли в новой, формирующейся экологической системе.

Данное направление исследования, безусловно, является существенным как для разработки систем адаптивного земледелия, так и для расширения фундаментальных знаний о формировании и особенностях экологии ризосферных сообществ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российским Научным Фондом (грант РФФ 41-26-00049П, “Анализ генетического и эволюционного потенциала почвенного микробиома для повышения продуктивности растений и плодородия почв”), с использованием оборудования ЦКП “Геномные технологии и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ. Текст статьи подготовлен с использованием средств гранта РФФ 18-16-00073.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит материалов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андронов Е.Е., Пинаев А.Г., Першина Е.В., Чижевская Е.П. Научно-методические рекомендации по выделению высокоочищенных препаратов ДНК из объектов окружающей среды. Методические указания. С-Пб.: Российская академия сельскохозяйственных наук, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, 2011. 23 с.
- Ивлев А.М. Эволюция почв. Владивосток: Изд. Дальневосточного ун-та, 2005. 97 с.
- Aira M., Gómez-Brandón M., Lazcano C., Baath E., Domínguez J. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities // *Soil Biol. Biochem.* 2010. V. 42. P. 2276–2281.
- Bates S.T., Berg-Lyons D., Caporaso J.G., Walters W.A., Knight R., Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // *ISME J.* 2011. V. 5. P. 908–917.
- Berg G., Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2009. V. 68. P. 1–13.
- Bulgarelli D., Garrido-Oter R., Munch P.C., Weiman A., Dröge J., Pan Y., McHardy A.C., Schulze-Lefert P. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley // *Cell Host Microbe.* 2015. V. 17. P. 392–403.
- <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A.,

- Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat. Meth.* 2010. V. 7. P. 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Chaparro J.M., Badri D.V., Bakker M.G., Sugiyama A., Manter D.K., Vivanco J.M. Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions // *PLoS One*. 2013. V. 8: e55731.
- Coleman-Derr D., Desgarenes D., Fonseca-Garcia C., Gross S., Clingenpeel S., Woyke T., North G., Visel A., Partida-Martinez L.P., Tringe S.G. Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species // *New Phytol.* 2016. V. 209. P. 798–811. <https://doi.org/10.1111/nph.13697>
- De Santis T.Z., Jr., Hugenholtz P., Keller K., Brodie E.L., Larsen N., Piceno Y.M., Phan R., Andersen G.L. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. (Web Server issue) P. W394–W399.
- Donn S., Kirkegaard J.A., Perera G., Richardson A.E., Watt M. Evolution of bacterial communities in the wheat crop rhizosphere // *Environ. Microbiol.* 2015. V. 17. P. 610–621.
- Edwards J., Johnson C., Santos-Medellín C., Lurie E., Podishetty N.K., Bhatnagar S., Eisen J.A., Sundaresan V. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. P. E911–E920. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112>
- Girvan M.S., Bullimore J., Pretty J.N., Osborn A.M., Ball A.S. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 1800–1809. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12452>
- Gottel N.R., Castro H.F., Kerley M., Yang Z., Pelletier D.A., Podar M., Karpinets T., Uberbacher E., Tuskan G.A., Vilgalys R., Doktycz M.J., Schadt C.W. Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 5934–5944. <https://doi.org/10.1128/AEM.05255-11>
- Hammer O., Harper D., Ryan P. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis // *Paleontologia Electronica*. 2001. V. 4. Article 4. 9 p.
- Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004. V. 68. P. 669–685.
- Knief C., Delmotte N., Chaffron S., Stark M., Innerebner G., Wasmann R., von Mering C., Vorholt J.A. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice // *ISME J.* 2012. V. 6. P. 1378–1390. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.192>
- Lozupone C.A., Hamady M., Kelley S.T., Knight R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities // *Appl. Environ. Microbiol.* Mar. 2007. V. 73. P. 1576–1585.
- Lundberg D.S., Lebeis S.L., Paredes S.H., Yourstone S., Gehring J., Malfatti S., Tremblay J., Engelbrekton A., Kunin V., del Rio T.G., Edgar R.C., Eickhorst T., Ley R.E., Hugenholtz P., Tringe S.G., Dangl J.L. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome // *Nature*. 2012. V. 488. P. 86–90.
- Mendes L.W., Kuramae E.E., Navarrete A.A., van Veen J.A., Tsai S.M. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere // *ISME J.* 2014. V. 8. P. 1577–1587. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.17>
- Peiffer J.A., Spor A., Koren O., Jin Z., Tringe S.G., Dangl J.L., Buckler E.S., Ley R.E. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 6548–6553.
- Winston M.E., Hampton-Marcell J., Zarraonaindia I., Owens S.M., Moreau C.S., Gilbert J.A., Hartsel J.A., Kennedy S.J., Gibbons S.M. Understanding cultivar-specificity and soil determinants of the cannabis microbiome // *PLoS One*. 2014. V. 9. e99641.

Molecular Analysis of the Rhizosphere Microbial Communities from Gramineous Plants Grown on Contrasting Soils

A. O. Zverev^{1,*}, E. V. Pershina¹, V. M. Shapkin¹, A. K. Kichko¹, O. P. Mitrofanova², V. D. Kobylanskiy², O. S. Yuzikhin³, A. A. Belimov¹, and E. E. Andronov^{1,4}

¹All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, St.-Petersburg, 196608 Russia

²Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St.-Petersburg, 190000 Russia

³All-Russian Institute of Plant Protection, St.-Petersburg, 196608 Russia

⁴St.-Petersburg State University, St.-Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: azver.bio@gmail.com

Received March 19, 2018; revised July 25, 2019; accepted September 29, 2019

Abstract—The composition of rhizosphere microbial communities was studied for different species and varieties of agricultural gramineous plants (rye and wheat) grown in the soils contrasting in a number of agrochemical parameters. The data on analysis of the rhizosphere microbial communities obtained by sequencing of the V4 variable region of the 16S rRNA gene and on the ion and mass spectral composition of soil extracts are presented. Alpha diversity indices of the rhizosphere and control communities were almost the same. Analysis of beta diversity revealed higher variability of the rhizosphere microbial communities for chernozem-grown plants. Rhizosphere communities of the plants grown on sod-podzol soil were more similar and formed separate clusters. The taxa reliably involved in formation of specific rye and wheat rhizosphere microbiomes were established. Both common rhizosphere taxa (*Sphingobacteriia*, *Betaproteobacteria*) and species- or variety-specific ones (*Oxalobacteraceae*, *Sphingobacteriaceae*) were determined. Ion concentrations in soil extracts varied significantly depending on the soil type, while the similarity of mass spectral profiles depended more on the plant species than on the soil type.

Keywords: soil metagenomics, rhizosphere effect, contrasting soils, rye, wheat