

УДК 581.524.2:581.557.24

## ОБИЛИЕ И РАЗНООБРАЗИЕ АРБУСКУЛЯРНЫХ ГРИБОВ У ИНВАЗИВНОГО *SOLIDAGO CANADENSIS* И МЕСТНОГО *S. VIRGAUREA*

© 2016 г. А. А. Бетехтина<sup>а,\*</sup>, Т. А. Мухачева<sup>а</sup>, С. Ю. Ковалев<sup>а</sup>,  
А. П. Гусев<sup>б</sup>, Д. В. Веселкин<sup>а, с</sup>

<sup>а</sup> Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина,  
620083 Екатеринбург, просп. Ленина, 51

<sup>б</sup> Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины,  
246019 Гомель, ул. Советская, 104

<sup>с</sup> Институт экологии растений и животных УрО РАН,  
620144 Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

\*e-mail: betechtina@mail.ru; andi\_gusev@mail.ru; denis\_v@ipae.uran.ru

Поступила в редакцию 26.05.2016 г.

**Ключевые слова:** биологические инвазии, инвазивные растения, арбускулярная микориза, разнообразие грибов арбускулярной микоризы, *Solidago canadensis*.

**DOI:** 10.7868/S0367059716060032

Микоризообразование может быть одним из критических процессов при расширении ареалов растений, в том числе инвазивных. Оценки успешности развития микоризы у инвазивных растений противоречивы. Активность формирования микориз у пришлых видов может быть пониженной (Stinson et al., 2006; Endresz et al., 2013; Бетехтина, Веселкин, 2015), но успешные инвазивные виды могут быть высоко микоризны (Kovács, Bagi, 2001; Kovács, Szigetvári, 2002; Fumanal et al., 2006; Веселкин, Прокина, 2015). Инвазивные растения могут влиять на местные сообщества грибов арбускулярной микоризы (АМГ): уменьшать их разнообразие и обилие (Stinson et al., 2006; Bunn et al., 2013) или специфически влиять на состав АМГ (Zhang et al., 2010). В целом существует значительная изменчивость как степени распространения арбускулярных микориз (АМ) у чужеродных растений, так и стратегий их взаимодействия с АМГ, возможно, определяемая географически (Callaway et al., 2008).

Цель настоящей работы – анализ особенностей развития микоризы и сообществ АМГ, ассоциированных с двумя видами *Solidago*, – местным *S. virgaurea* L. и инвазивным *S. canadensis* L. – в близко расположенных местообитаниях Белорусского Полесья. Проверяемые гипотезы заключались в предположении, что инвазивный, т.е. чужеродный для района исследования, *S. canadensis* в меньшей степени адаптирован к взаимодействию с местными видами АМГ и обладает пониженным обилием АМ и пониженным разнообразием АМГ по сравнению с местным *S. virgaurea*. Выбор в качестве модельных видов представителей рода *Solidago* обусловлен актуальностью всесторон-

него анализа эколого-биологических свойств *S. canadensis* – инвазивного вида североамериканского происхождения, который распространился в Европе, Азии, Австралии и Новой Зеландии (Weber, 2001; Lu et al., 2007). Немаловажно, что во вторичном ареале показана активность *S. canadensis* в отношении аборигенных АМГ (Zhang et al., 2007; Yang et al., 2014).

*S. virgaurea* и *S. canadensis* – многолетние травянистые корневищные растения из сем. Asteraceae. Оба вида формируют АМ (Wang, Qiu, 2006). По ценотической приуроченности *S. virgaurea* – лесное и лесолуговое растение. *S. canadensis* активно расселяется в Беларуси по обочинам дорог, краям полей, заброшенным карьерам и другим нарушенным местообитаниям (Гусев, 2015).

Материал собран вблизи г. Гомель (Беларусь). Местообитания *S. virgaurea* и *S. canadensis* сходны по эдафотопу, микроклимату, составу и структуре растительных сообществ. *S. virgaurea* собран на нарушенном лугу в 5 м от края соснового леса (52°23'24" с.ш., 30°54'45" в.д.). Почва дерново-палево-подзолистая песчаная, механически нарушенная, глубина грунтовых вод 2–3 м. Общее проективное покрытие 90%. Доминанты растительного покрова: *Achillea millefolium*, *Calamagrostis epigeios*, *Elytrigia repens*, *Poa pratensis*, *Trifolium pratense*. *S. canadensis* собран в раннесукцессионной растительной группировке на средней части склона песчаного карьера в 500 м от местообитания *S. virgaurea*. Почва песчаная. Общее проективное покрытие 70%. Доминант *S. canadensis*; с незначительным покрытием встречаются *Achillea millefolium*, *Artemisia campestris*, *A. vulgaris*, *Calama-*

*grostis epigeios*, *Conyza canadensis*, *Corynephorus canescens*, *Helichrysum arenarium*, *Jasione montana*, *Koeleria glauca*, *Oenothera biennis*, *Poa pratensis*, *Saponaria officinalis*, *Trifolium arvense*, *T. pratense*. В начале августа 2014 г. загербаризировано по 5 особей каждого вида с целыми корневыми системами.

У каждой особи микоризную колонизацию определяли на 15 случайно отобранных 1-см фрагментах тонких корней двух последних порядков. Корни мацерировали 1 ч в КОН, окрашивали анилиновым синим и делали давленные препараты (Селиванов, 1981). В каждом фрагменте в 5 полях зрения микроскопически (Leica DM 5000;  $\times 100$ ) регистрировали структуры АМГ (375 полей зрения для каждого вида). Характеристики развития АМ: тотальная колонизация ( $F$ , %) — доля полей зрения с любыми грибными структурами; колонизация везикулами ( $V$ , %) и арбускулами ( $A$ , %) — доли полей зрения с везикулами и арбускулами соответственно. Одновременно определяли встречаемость корневых волосков как долю полей зрения с ними.

Для оценки видового разнообразия АМГ в корнях и почве информативно секвенирование последовательностей ДНК маркерных генов (18S рРНК, 25S рРНК, внутренний транскрибируемый спейсер или комбинация этих генов) (Gorzalak et al., 2012). Анализ последовательностей фрагмента гена 18S рРНК позволяет выделять виртуальные таксоны (VT) АМГ, которыми обозначают филогенетически связанные группы последовательностей (сходство более 97%), соответствующие видovому уровню (Opik et al., 2010).

Фрагменты тонких корней двух последних порядков индивидуально каждой особи (массой 100–200 мг) измельчали с жидким азотом и гомогенизировали в лизирующем буфере (1.4 М NaCl, 2% СТАВ, 0.1 М Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA). Выделение ДНК проводили методом осаждения двукратным объемом 95%-ного этанола в присутствии NaAc и EDTA с промывкой осадка 70%-ным этанолом. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для амплификации фрагмента 18S рРНК длиной около 530 п.н. проводили с праймерами NS31 (TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC) и AML2 (GAACCCAAACACTTGGTTTC) (Simon et al., 1992; Lee et al., 2008) в объеме 25 мкл на амплификаторе Терцик (ДНК-технология, Россия). Условия проведения ПЦР: предварительная денатурация 95°C — 3 мин; 42 цикла: денатурация 95°C — 10 с, отжиг 64°C — 10 с, синтез ДНК 72°C — 15 с; дополнительный синтез ДНК 72°C — 5 мин. Визуализацию накопления продукта ПЦР проводили электрофорезом в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. ПЦР-продукты очищали набором ДНК-сорб АМ (ИнтерЛабСервис, Россия), клонировали в вектор pAL-TA (Евроген, Россия) и трансформировали в компетентные клетки *Escherichia coli* Top10 с отбором трансформантов путем бело-голубой селекции. Для каждого образца отбира-

ли по 10 клонов, часть из которых содержала нецелевые вставки. Секвенирование полученных целевых фрагментов проводили на секвенаторе ABI 310 Prizm (Applied Biosystems, США) в двух направлениях с использованием реагента BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit согласно инструкции производителя.

Построение филогенетического дерева и расчет генетических дистанций выполнены с помощью программы MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Номера VT присваивали в соответствии с типовыми последовательностями, зарегистрированными в базе MaarjAM (<http://maarjam.botany.ut.ee>) (Opik et al., 2010). Для оценки различий характеристик развития микоризы и корневых волосков использовали  $t$ -критерий, при этом признаки, выраженные в долях, использовали после арксинус-преобразования, а учетной единицей были значения признака у особи. Разнообразию VT АМГ оценивали в целом для вида растения. Сравнение индексов Шеннона выполняли согласно Э. Мэггган (1992).

Установлено (см. таблицу), что АМ хуже развивается в корнях *S. canadensis* по сравнению с *S. virgaurea*. Это видно при сравнении значений  $F$  ( $t = 2.34$ ;  $P = 0.047$ ; для  $t$ -критерия всегда  $dF = 8$ ) и  $A$  ( $t = 5.99$ ;  $P < 0.001$ ). Различия по  $A$  достигают двух раз, различия  $V$  незначимы ( $t = 1.09$ ;  $P = 0.308$ ). Поскольку арбускулы — основная структура для этого типа микориз, вывод о пониженной активности формирования АМ у инвазивного вида по сравнению с местным можно считать надежным. Корневые волоски значимо чаще встречаются у *S. canadensis* по сравнению с *S. virgaurea* ( $t = 7.89$ ;  $P < 0.001$ ).

Нами получены 39 клонированных последовательностей ДНК фрагмента 18S рРНК (длина 523–529 п.н.) АМГ, выделенных из 10 образцов корней *S. virgaurea* и *S. canadensis*, а для каждого растения — от 1 до 5 трансформантов, содержащих целевые вставки фрагмента гена 18S рРНК грибов *Glomus* *glomus*. Эти последовательности относились к 11 VT родов *Acaulospora* (VT28), *Claroideoglossum* (VT276) и *Glomus* (VT113, VT115, VT130, VT137, VT156, VT166, VT172, VT214, VT423). Из-за неполного соответствия классификаций АМГ по морфологическим и молекулярно-генетическим признакам, видовая принадлежность установлена только для трех VT: *Glomus fasciculatum* (VT113), *G. vesiculiferum* (VT115) и *Acaulospora longula* (VT28). Дендрограмма, построенная на основе полученных последовательностей, приведена на рисунке.

Разнообразию VT грибов, ассоциированных с *S. virgaurea*, ниже, чем ассоциированных с *S. canadensis*. У двух видов *Solidago* установлен только один общий таксон (VT115), не доминирующий ни у *S. virgaurea*, ни у *S. canadensis*. Наряду с низким разнообразием VT у *S. virgaurea* установлен высокий уровень доминирования — доля самого обильного таксона (VT113) составляет 68%,

Характеристики развития арбускулярной микоризы и разнообразия микоризных грибов, ассоциированных с *Solidago virgaurea* и *Solidago canadensis*

Параметр	Вид	
	<i>Solidago virgaurea</i>	<i>Solidago canadensis</i>
Колонизация ( $m \pm SE$ ), %:		
общая	99.3 $\pm$ 0.9	93.4 $\pm$ 2.4
арбускулами	96.0 $\pm$ 1.7	45.8 $\pm$ 9.1
везикулами	65.3 $\pm$ 11.2	48.8 $\pm$ 11.2
Встречаемость корневых волосков ( $m \pm SE$ ), %	3.4 $\pm$ 1.6	44.0 $\pm$ 4.9
Число клонированных последовательностей	19	20
Богатство, число виртуальных таксонов	4	8
Разнообразие, индекс Шеннона	0.90	1.96
Доминирование, индекс Бергера–Паркера	0.68	0.25

у *S. canadensis* (VT156) – 25%. Последовательности, полученные от двух особей *S. canadensis* (три – у одной особи и пять – у другой), были идентичны и принадлежали таксонам VT423 и VT156, которые не встретились более ни у одной особи. Другие особи были колонизированы более чем одним таксоном АМГ. У *S. virgaurea* по сравнению с *S. canadensis* значимо меньше и индекс разнообразия Шеннона ( $t = 4.29$ ;  $dF = 34$ ;  $P < 0.001$ ).

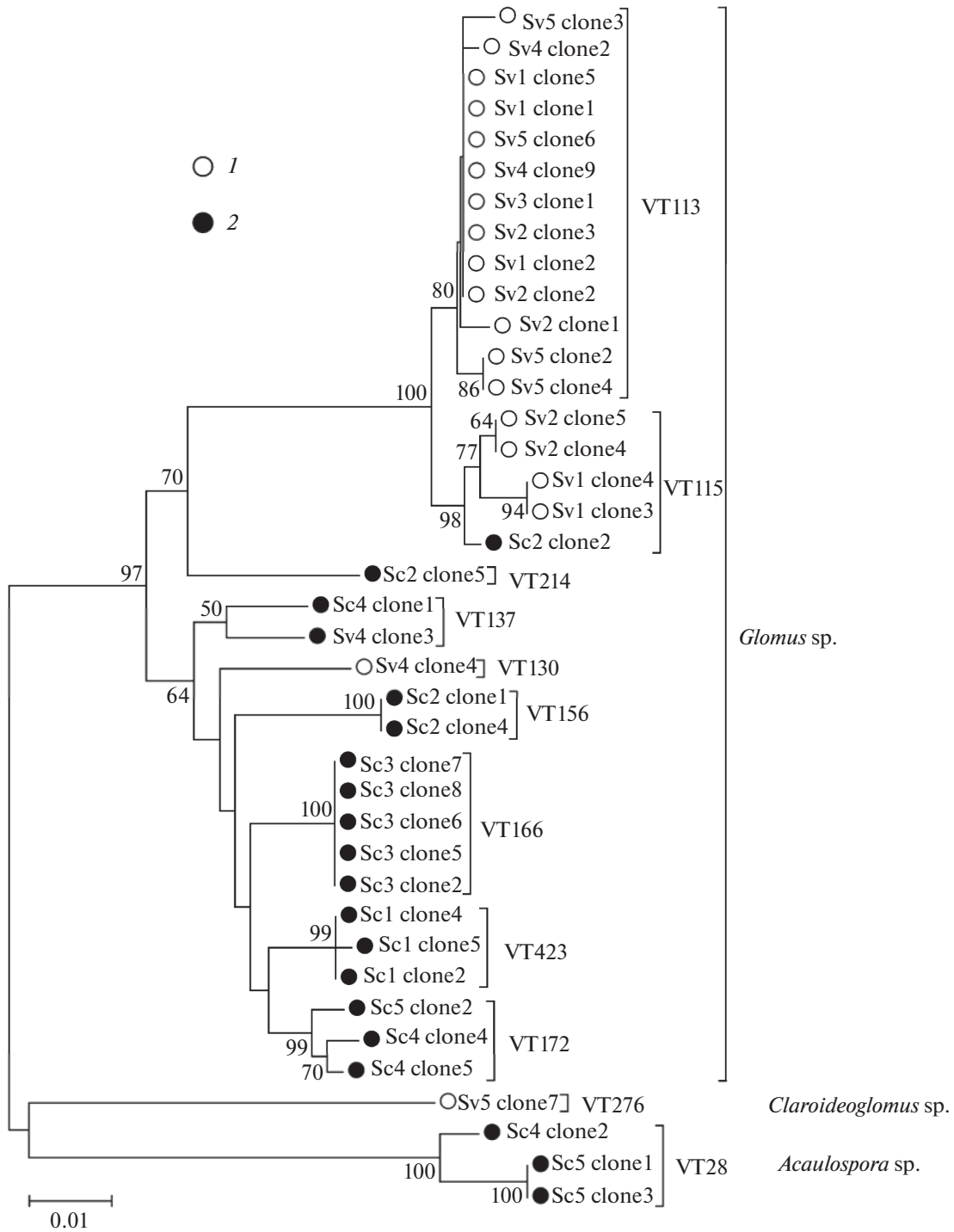
Различия уровней разнообразия АМГ у двух видов *Solidago* демонстрируют результаты оценки генетических дистанций ( $D$ ) внутри и между группами последовательностей 18S рРНК. Средние дистанции ( $\pm SE$ ) внутри *S. virgaurea* составили  $D = 0.024 \pm 0.003$ , внутри *S. canadensis* –  $D = 0.049 \pm 0.005$ . Разнообразие АМГ-сообщества инвазивного *S. canadensis* в два раза превышало таковое местного вида. Средняя генетическая дистанция между последовательностями АМГ из *S. virgaurea* и *S. canadensis* составила  $D = 0.069 \pm 0.008$ , что указывает на дифференцированность данных сообществ.

Различия особей *S. virgaurea* и *S. canadensis* по развитию микоризы, разнообразию и составу ассоциированных с ними АМГ неслучайны. Установленные реакции согласуются между собой и соответствуют части опубликованных данных.

Пониженная интенсивность формирования АМ у инвазивного *S. canadensis* по сравнению с аборигенным *S. virgaurea* согласуется с низким обилием АМГ в корнях чужеродных растений, высокой долей немикоризных видов среди них, низкой отзывчивостью на взаимодействие с АМГ (Fitter, 2005; Pringle et al., 2009; Shah et al., 2009; Endresz et al., 2013; Бетехтина, Веселкин, 2015). Таким образом, наши результаты поддерживают исходную гипотезу в части предположения о пониженной успешности микоризообразования у пришлых растений. С этим согласуется высокая встречаемость корневых волосков у инвазивного *S. canadensis*, поскольку АМ может отрицательно коррелировать с развитием корневых волосков (Muthukumar et al., 1999).

Разнообразие АМГ у инвазивного *S. canadensis* повышено по сравнению с местным *S. virgaurea*. При этом сообщество АМГ *S. virgaurea* представлено в основном *Glomus fasciculatum* и *G. vesiculiferum* – филогенетически близкими и широко распространенными видами (Moora et al., 2011). В более разнообразном сообществе АМГ *S. canadensis* доминантов не выявлено. Вывод о широком спектре видов АМГ, с которыми взаимодействует чужеродный вид, не поддерживает исходную гипотезу в части предположения о пониженном разнообразии микоризных грибов у пришлых растений. Но этот вывод согласуется с опубликованными сведениями; например, подобные различия отмечены для инвазивного *Vincetoxicum rossicum* при сравнении с местными растениями (Bongard et al., 2013).

Различие видового состава АМГ, ассоциированных с местным и инвазивным видами, можно объяснить по-разному. Во-первых, можно предположить, что определенные виды грибов специфично колонизируют *S. canadensis* при отсутствии у него устойчивых связей с местными доминантными видами грибов. Во-вторых, инвазивный вид, возможно, изменяет состав АМГ в почве, стимулируя развитие одних видов грибов и угнетая другие. Возможность такого эффекта продемонстрирована экспериментально (Zhang et al., 2007): *S. canadensis*, будучи инвазивным видом в Китае, значительно изменял состав сообщества АМГ в почве предположительно за счет выделения соединений с аллелопатической активностью, а также способствовал повышению относительно обилия *Glomus geosporum* и *G. etunicatum* по сравнению с *G. mosseae* – основным доминантом в сообществе АМГ местного вида *Kummerowia striata* (Zhang et al., 2010; Yang et al., 2014). При этом трансформированное АМГ-сообщество способствовало более активному поглощению *S. canadensis* воды и солей из почвы, что давало ему конкурентное преимущество. Специфичность состава АМГ у инвазивного растения – общий момент для наших ре-



Филогенетическое дерево, построенное на основе частичной последовательности 18S рРНК (529 п.н.) методом Neighbor-Joining; значения бутстрепа (500 реплик) указаны рядом с соответствующими ветвями: 1 – клоны 18S рРНК АМГ, выделенные из *Solidago virgaurea*; 2 – клоны, выделенные из *Solidago canadensis*.

зультатов и опубликованных данных (Zhang et al., 2007, 2010; Yang et al., 2014).

Таким образом, наши результаты свидетельствуют об экологической индивидуальности двух видов *Solidago* – местного *S. virgaurea* и инвазив-

ного *S. canadensis* – в подземной сфере. Значимые различия между видами установлены по всем проанализированным признакам: количественным характеристикам развития арбускулярной микоризы, показателям развития корневых волосков, бо-

гатству и составу ассоциированных сообществ арбускулярных грибов. Это подтверждает важность микоризных взаимодействий для контроля протекания и успешности растительных инвазий.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты № 14-04-90019, 15-04-07770) и Правительства РФ (постановление № 211, контракт № 02.А03.21.0006). Авторы благодарны д.б.н. В.Л. Семерикову (Институт экологии растений и животных УрО РАН) за содействие при секвенировании образцов и д.б.н. Е.Л. Воробейчику (Институт экологии растений и животных УрО РАН), сделавшему замечания к рукописи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бетехтина А.А., Веселкин Д.В. По результатам не прямых сопоставлений инвазивные растения формируют микоризу с меньшей интенсивностью, чем аборигенные // Вестн. Оренбургского гос. ун-та. 2015. № 10(185). С. 7–9.
- Веселкин Д.В., Прокина Н.Э. Микоризообразование у клена ясенелистного (*Acer negundo* L.) в градиенте урбанизации // Российский журн. биологич. инвазий. 2016. Т. 9. № 1. С. 31–40.
- Гусев А.П. Воздействие инвазии золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) на восстановительную сукцессию на залежах (Юго-Восток Беларуси) // Российский журн. биологич. инвазий. 2015. Т. 8. № 1. С. 10–16.
- Мэггаран Э. Экологическое разнообразие и его изменение. М.: Мир, 1992. 181 с.
- Селиванов И.А. Микосимбиотрофизм как форма консортивных связей в растительном покрове Советского Союза. М.: Наука, 1981. 232 с.
- Bongard C.L., Navaranjan G., Yan W., Fulthorpe R.R. Fungal colonization of the invasive vine *Vincetoxicum rossicum* and native plants // Plant Ecol. Evol. 2013. V. 146. № 1. P. 45–52.
- Bunn R.A., Lekberg Y., Gallagher C. et al. Grassland invaders and their mycorrhizal symbionts: a study across climate and invasion gradients // Ecol. Evol. 2013. V. 4. № 6. P. 794–805.
- Callaway R.M., Cipollini D., Barto K. et al. Novel weapons: Invasive plant suppresses fungal mutualists in America but not in its native Europe // Ecology. 2008. V. 89. № 4. P. 1043–1055.
- Endresz G., Somodi I., Kalapos T. Arbuscular mycorrhizal colonisation of roots of grass species differing in invasiveness // Community Ecol. 2013. V. 14. № 1. P. 67–76.
- Fitter A.H. Darkness visible: reflections on underground ecology // J. Ecol. 2005. V. 93. № 2. P. 231–243.
- Fumanal B., Planchette C., Chauvel B., Bertagnolle F. Which role can arbuscular mycorrhizal fungi play in the facilitation of *Ambrosia artemisiifolia* L. invasion in France // Mycorrhiza. 2006. V. 17. № 1. P. 25–35.
- Gorzalak M.A., Holland T.C., Xing X., Hart M.M. Molecular approaches for AM fungal community ecology: a primer // J. Microbiol. Meth. 2012. V. 90. № 2. P. 108–114.
- Kovács G.M., Bagi I. Mycorrhizal status of plants in a mixed deciduous forest from the Great Hungarian Plain with special emphasis on the potential mycorrhizal partners of *Terfezia terfezioides* (Matt.) Trappe (Pezizales) // Phytion – Annales Rei Botanicae. 2001. V. 41. № 2. P. 161–168.
- Kovács G.M., Szigetvári Cs. Mycorrhizae and other root-associated fungal structures of the plants of a sandy grassland on the Great Hungarian Plain // Phytion – Annales Rei Botanicae. 2002. V. 42. № 2. P. 211–223.
- Lee J., Lee S., Young J.P. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi // FEMS Microbiol. Ecol. 2008. V. 65. № 2. P. 339–349.
- Lu J.Z., Weng E.S., Wu X.W. et al. Potential distribution of *Solidago canadensis* in China // Acta Phytotaxon. Sin. 2007. V. 45. № 5. P. 670–674.
- Moora M., Berger S., Davison J. et al. Alien plants associate with widespread generalist arbuscular mycorrhizal fungal taxa: evidence from a continental-scale study using massively parallel 454 sequencing // J. Biogeogr. 2011. V. 38. № 7. P. 1305–1317.
- Muthukumar T., Udaiyan K., Vasantha K. et al. Mycorrhizae in sedges as related to root character and its ecological significance // Pertanika J. Trop. Agric. Sci. 1999. V. 22. № 1. P. 9–17.
- Opik M., Vanatoa A., Vanatoa E. et al. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) // New Phytol. 2010. V. 188. № 1. P. 223–241.
- Pringle A., Bever J.D., Gardes M. et al. Mycorrhizal symbioses and plant invasions // Annu. Rev. Ecol. Evol. Systemat. 2009. V. 40. № 1. P. 699–715.
- Shah M.A., Reshi Z.A., Khosa D.P. Arbuscular mycorrhizas: drivers or passengers of alien plant invasion // Bot. Rev. 2009. V. 75. № 4. P. 397–417.
- Simon L., Lalonde M., Bruns T. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots // Appl. Environ. Microb. 1992. V. 58. № 1. P. 291–295.
- Stinson K.A., Campbell S.A., Powell J.R. et al. Invasive plant suppresses the growth of native tree seedlings by disrupting belowground mutualisms // Plos Biol. 2006. V. 4. № 5. P. 727–731.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. № 12. P. 2725–2729.
- Wang B., Qiu Y.-L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants // Mycorrhiza. 2006. V. 16. № 5. P. 299–363.
- Weber E. Current and potential ranges of three exotic goldenrods (*Solidago*) in Europe // Conserv. Biol. 2001. V. 15. № 1. P. 122–128.
- Yang R., Zhou G., Zan S. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi facilitate the invasion of *Solidago canadensis* L. in south-eastern China // Acta Oecol. 2014. V. 61. P. 71–77.
- Zhang Q., Yang R., Tang J. et al. Positive feedback between mycorrhizal fungi and plants influences plant invasion success and resistance to invasion // PLoS One. 2010. V. 5. № 8. P. e12380.
- Zhang Q., Yao L., Yang R. et al. Potential allelopathic effects of an invasive species *Solidago canadensis* on the mycorrhizae of native plant species // Allelopathy. J. 2007. V. 20. № 1. P. 71–78.