

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРИБОВ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ

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

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

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

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

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

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

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

Поступила в редакцию: 19.03.2018

Принята к печати: 18.06.2018

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

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

MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI

© A.P. Yurkov^{1,2,3}, A.A. Kryukov¹, A.O. Gorbunova^{1,2}, A.P. Kojemyakov¹, G.V. Stepanova⁴,
E.M. Machs⁵, A.V. Rodionov^{2,5}, M.F. Shishova²

¹ All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia;

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia;

³ Russian State Hydrometeorological University, Saint Petersburg, Russia;

⁴ Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology, Lobnya, Moscow region, Russia;

⁵ Botanical Institute RAS, Saint Petersburg, Russia

For citation: Yurkov AP, Kryukov AA, Gorbunova AO, et al. Molecular genetic identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecological genetics*. 2018;16(2):11-23. doi: 10.17816/ecogen16211-23.

Received: 19.03.2018

Accepted: 18.06.2018

✿ Arbuscular mycorrhiza (AM) is a widespread symbiosis formed by most land plants with fungi from Glomeromycotina subdivision. The main problem in study of AM fungi is the complication in identification, associated with high intra- and interspecific genetic polymorphism, as well as obligate status of AM fungi in relation to host plant. The methodology for AM fungi identification is constantly undergoing major changes. In the review the selection of optimal methods of molecular genetic identification for AM fungi is carried out. The sample preparation, selection of species-specific marker DNA fragments and primers design, amplification including nested PCR are considered. The prospects for cloning and next generation sequencing for AM fungi identification are analyzed and substantiated.

✿ **Keywords:** Glomeromycotina; arbuscular mycorrhiza; next-generation sequencing; NGS.

ВВЕДЕНИЕ

Арбускулярная микориза (АМ) повсеместно распространена в таежных экосистемах и встречается во всех природных зонах России — от полярной пу-

стыни до субтропических лесов, а также в регионах с высотной поясностью вплоть до альпийских лугов. Несмотря на это, биоразнообразие АМ-грибов невелико. По разным оценкам, известно от 240 [1] до 348 [2]

видов, относящихся к одному отделу *Glomeromycota* [3], или, как следует из анализа 192 генов, к одному подотделу *Glomeromycotina Spatafora et Stajich* в пределах отдела *Mucoromycota* Doweld [4]. При этом АМ-грибы образуют микоризу с более чем 200 000 видов наземных растений [5]. Изучение систематики *Glomeromycotina* связано с рядом трудностей, среди которых следует отметить высокий генетический полиморфизм, включая полиморфизм на внутривидовом уровне по маркерам, которые используются для молекулярно-генетической идентификации, как правило, проводимой по участку SSU – ITS1 – 5.8S rRNA – ITS2 – LSU [6, 7]. Показано, что в некоторых случаях идентификация становится невозможной из-за высокого полиморфизма внутренних транскрибируемых спейсеров [6, 8]. Причинами этой изменчивости может быть: 1) способность АМ-грибов к формированию анастомозов и обмену генетическим материалом [9]; 2) формирование значительного количества ядер — от 576 до 35 000 на 1 спору [10]. Следует заметить, что среди АМ-грибов выявляют криптические виды, неразличимые по морфологическим признакам, и в ряде случаев мы можем воспринимать межвидовой полиморфизм как внутривидовой [11].

С другой стороны, морфологическая идентификация также не позволяет провести четкое разделение близкородственных видов. Более того, сами определения «вид», «популяция» и «особь» для *Glomeromycotina* не имеют в настоящее время ясных границ [2]. Морфологическую идентификацию проводят с учетом более 20 параметров: цвет, прозрачность, размеры, форма внекорневых спор; цвет, размеры, прозрачность, плотность, форма, место расположения спорокарпов, или скоплений спор; форма места прикрепления споры к несущей гифе; число, толщина, плотность, эластичность или ломкость, цвет в растворах (раствор Мельцера, раствор поливиниллактоглицерина, раствор трипанового синего и др.) слоев оболочки споры и несущей гифы; наличие/отсутствие/исчезновение/появление слоев оболочки споры и несущей гифы в процессе онтогенеза (от ювенильной споры к зрелой); наличие/отсутствие септы в месте прикрепления споры к несущей гифе; параметры структуры АМ и внутрикорневых спор, описание прорастания спор [12, 13].

Ярким примером таксономических проблем с идентификацией видов и родов *Glomeromycotina* служит род *Glomus*, многие виды которого за последние 20 лет были перенесены в 14 иных родов: *Ambispora*, *Claroideoglossum*, *Corymbiglossum*, *Diversispora*, *Dominikia*, *Entrophospora*, *Funneliformis*, *Kamienskia*, *Pacispora*, *Paraglossum*, *Redeckera*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, *Septoglossum* [3]. Причем имеют место и примеры неоднократной ошибочной идентификации АМ-грибов [14, 15]. Все эти особенности делают актуальной задачу поиска и подбора оптимальных инструкций к идентификации родов и видов *Glomeromycotina*.

Другой проблемой для точной идентификации АМ-грибов является то, что они не способны расти на искусственных средах, потому получить монокультурные культуры — штаммы зачастую представляется весьма трудновыполнимой задачей. Например, виды *Rhizophagus fasciculatus* и *R. intraradices* занимают в природе одну и ту же экологическую нишу. При попытках выделения *R. fasciculatus* в чистую культуру споры *R. intraradices* интенсивно развивались в корнях растений и тем самым, вероятно, вытесняли микоризу, формируемую видом *R. fasciculatus* [13, 16, 17]. Получение чистой культуры *R. fasciculatus* до сих пор представляет собой актуальную проблему [13]. По этой причине многие виды АМ-грибов не изучены, в том числе не идентифицированы по морфологическим признакам [2, 18–20]. В этих условиях методы молекулярно-генетической идентификации *Glomeromycotina* приобретают особое значение. Развитие методов привело к существенному росту в базах данных количества последовательностей ДНК АМ-грибов (в 100 раз за последние 10 лет) [21–23]. Между тем в молекулярной филогении АМ-грибов остается ряд нерешенных вопросов. Сложность идентификации АМ-грибов методом Сэнгера определяет необходимость тщательного подбора эффективных и высокоспецифических праймеров, а также использования метода вложенной ПЦР. Отмечено, что все известные праймеры имеют различную эффективность для разных семейств АМ-грибов [18]. Для некоторых семейств или родов большинство грибных праймеров не подходит, а в ряде случаев некоторые из них работают некорректно, способствуя появлению химерных последовательностей [22]. До настоящего времени нет общепринятого маркерного участка для ДНК-штрихкодирования АМ-грибов [24, 25], несмотря на активное развитие методов секвенирования нового поколения [25–28]. Решению поставленных проблем идентификации посвящен настоящий обзор.

ПРОБОПОДГОТОВКА И ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

Получение качественного генетического материала АМ-грибов во многом зависит от пробоподготовки. Существенная проблема этого этапа заключается в «низкой чистоте» ДНК АМ-грибов, обусловленной тем, что эти грибы являются облигатными симбионтами растений, а потому не растут на искусственных средах в чистой культуре и должны культивироваться *in vivo* с растением-хозяином (горшечная культура [29–31], либо *in vitro* на культуре ткани корня — Root Organ Culture (ROC) [30, 32]. Создано несколько мировых коллекций, поддерживающих АМ-грибы на растениях (*in vivo*) и методами *in vitro*: в США [13], Франции [33], Индии [34], Канаде [35], Швейцарии [36], Бельгии [37, 38], Бразилии [39] и России [7]. Обзор коллекций показал, что в большинстве случаев поддержание чистых культур АМ-грибов осуществляют *in vivo*.

Методы получения спорового материала не ограничиваются горшечной культурой и ROC. К ним также относят аэропонную культуру с применением вермикулита [40], гидропонную культуру без субстрата [41], гидропонную культуру на песке [29], Nutrient Film Technique — NFT-метод с применением перлита [42] и траншейный способ *in vivo* на нестерилизованной почве. Из всех способов получения спор AM-грибов существует только один способ *in vitro*. Причина этого ясна — высокая стоимость и трудозатраты. Так, например, стоимость продукции одной споры AM-грибов методом ROC составляет \$28,5–50,0 [30, 43], а в коммерческом инокулюме, полученном на накопительной культуре растения-хозяина, — \$0,0005–0,0011 за 1 спору [44, 45], что на 4–5 порядков дешевле. Таким образом, выгоднее проводить наработку спор AM-грибов для исследований методом горшечной культуры, что и является наиболее распространенным вариантом. Недостаток данной методики заключается в том, что выделяемые споры могут быть загрязнены органическими соединениями из почвы и других субстратов, корневыми выделениями растения-хозяина и собственно растительной корневой массой с вероятными иными эндо- и эктосимбионтами бактериальной и грибной природы. Решение этой проблемы требует особых процедур на этапе пробоподготовки ДНК.

На основании анализа литературных источников приведем общую схему этапов молекулярно-генетической идентификации AM-грибов (рис. 1). Выделение ДНК из спор и микоризованных корней имеет свою специфику. Для выделения генетического материала из корней необходимо от 30 [46] до 1000 мг [47] сухого веса. В случае работы со спорами AM-грибов рекомендуется не менее 50 спор на пробу по данным А. Голлот и др. [47].

Самым распространенным методом экстракции является СТАВ-метод, именуемый по компоненту буфера СТАВ (цетилтриметиламмония бромид), в состав которого обычно входит 2 % СТАВ, 1,4 М NaCl, 20 мМ ЭДТА (рН 8), 100 мМ Трис-НСl (рН 8) [48]. СТАВ-метод имеет множество модификаций. Для почвенных образцов в буфер с целью удаления гуминовых кислот, мешающих ПЦР, рекомендуется добавить поливинилпирролидон (ПВП), либо поливинилполипирролидон (ПВПП), либо активированный уголь [49]. Наилучшие результаты при очистке ДНК AM-грибов показало применение ПВПП в сравнении с использованием ПВП и активированного угля [49]. В ряде методов в буферах для экстракции используют додецилсульфат натрия (SDS) для инактивации ферментов, например нуклеаз [50].

Несмотря на частое применение СТАВ-метода при выделении ДНК-матриц из спор и корней, существует ряд иных эффективных методов экстракции [49, 50], основанных на применении буфера ТЕ (10 мМ Трис-

НСl рН 8,0 и 1 мМ ЭДТА); буфера ROSE (Rapid one-step extraction, 10 мМ Трис-НСl рН 8,0, 312,5 мМ ЭДТА рН 8,0, 1 % лаурилсаркозината натрия; 1 % ПВПП); а также буфера с Chelex 100 (10 % w/v Chelex 100 (100–200 меш), 0,1 % w/v SDS, 1 % v/v Nonidet P-40, 1 % v/v Tween 20; [51]); буфера с протеиназой К 5:1 (содержащим 40 мМ Трис-НСl рН 8,0; 1 % Tween 20; 0,2 % Nonidet P-40; 0,2 мМ ЭДТА, 1 мг/мл протеиназы К) [52]; буфера с NaOH (200 мкл 0,5 М NaOH; [53]).

Сравнение различных модификаций буфера СТАВ и ТЕ с добавлением β-меркаптоэтанола, ПВП, ПВПП и активированного угля показало, что по чистоте ДНК лучшие результаты наблюдались в варианте использования ТЕ-буфера с добавлением активированного угля вместо ПВПП [49]. С другой стороны, Т. Осмундсон и др. обратили внимание на высокую эффективность буфера на основе NaOH [50]. В то же время буферы на основе NaOH используются и в наборах: например, МИНИПРЕП (Sileks) содержит 0,2 М NaOH и 1 % SDS. При сохранении высокой эффективности ПЦР метод экстракции на основе NaOH отличается высокой скоростью и дешевизной. Д. Редкер предлагает следующие модификации методики для выделения ДНК с использованием NaOH: отбор фрагментов корней длиной 1–2 см, которые выдерживают 10 мин в 0,25 М NaOH (20 мл); инкубация образцов при +90 °С 10 мин; добавление 10 мл 0,5 М Трис-НСl и 20 мл 0,25 н HCl и инкубация 10 мин; центрифугирование 14000 об/мин в течение 5 мин; разбавление супернатанта в ТЕ-буфере 1 к 100 для дальнейшего использования образцов для ПЦР [54]. Другой эффективный способ экстракции предложили А. Голлот и др.: корни весом 1 г гомогенизируют в чашках с жидким азотом; ДНК выделяют в 1 мл буфера (0,2 М Трис-НСl рН 8,0, 0,25 М NaCl, 0,025 М ЭДТА, 0,5 % SDS, 1 % ПВП, 29 мМ β-меркаптоэтанола) [47].

Перед экстракцией растительный материал может быть измельчен в фарфоровой ступке или чашке с применением жидкого азота и затем смыт буфером. Но если объем корневой массы небольшой (менее 100 мг), он обрабатывается в микропробирке, в этом случае закрытая пробирка с корнями в буфере на 1–2 мин погружается в жидкий азот, после чего замороженная масса перетирается [55]. Лизис проводят либо при комнатной температуре, либо при нагревании до 65–100 °С.

Измельчение материала возможно встряхиванием (например, FastPrep-24, США, диапазон скорости 4,0–6,5 м/с либо Precellys-24, Франция, 5000–6500 об/мин) в микропробирке с добавлением шариков (стекло / металл) диаметром 0,1–3,0 мм. Другим эффективным способом является перетирание материала с оксидом алюминия в ступках или фарфоровых чашках. Этот метод подобен по эффекту перетиранию в жидком азоте, но может и совмещаться с ним. С дру-

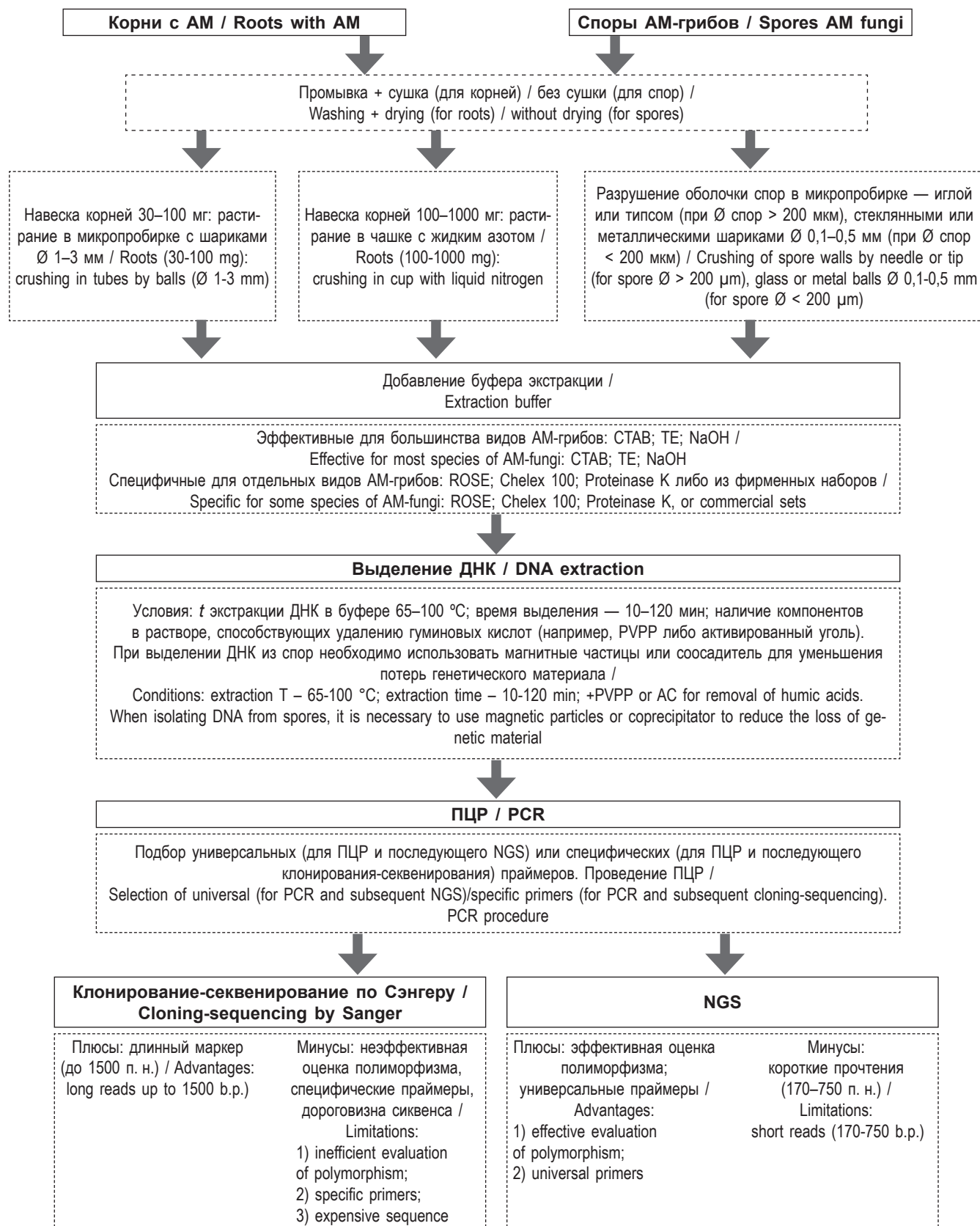


Рис. 1. Схема молекулярно-генетической идентификации AM-грибов
Fig. 1. The scheme of molecular genetic identification for AM fungi

гой стороны, согласно данным Д. Редекера [54], споры АМ-грибов достаточно инкубировать в буфере при температуре 65 °С без жесткой механической обработки.

Дж. Ли и др. предложили новый способ повышения выхода ПЦР-продукта АМ-грибов путем разрушения прочной оболочки спор в микропробирке иглой малого диаметра без дополнительных процедур очистки ДНК [56]. Следует полагать, что разрушение оболочки спор тонкой медной проволокой диаметром 30–50 мкм будет более эффективным.

В случае отсутствия необходимого количества материала (для единичных спор либо для корней, имеющих сухой вес менее 30 мг) можно рекомендовать метод выделения ДНК на магнитных частицах Dynabeads (ThermoFisher, UK), успешно примененный Д. Шварцотт и А. Шуслером [57]. Методика состоит из следующих этапов: 1) разрушение споры в микропробирке с помощью стерильного носика пипетки в 200 мкл Dynabeads solution (Dynabeads DNA Direct System 1, Dynal A.S., Oslo, Norway); 2) проводят сорбцию ДНК с использованием магнитных частиц; 3) промывание удерживаемого с помощью магнита на стенке микропробирки осадка с частицами растворами, содержащими спирт, затем чистым 75 % этанолом и подсушивание; 4) смыв ДНК с магнитных частиц с помощью воды или раствора Трис-НСl. Также применяют соосадиители ДНК (например, Satellite Red, Евроген, Москва) для снижения ее потерь на этапе выделения. Споры, так же как и корни, инкубируют в буфере при комнатной температуре или чаще при нагревании. Реже споры могут быть заморожены в жидком азоте и/или обработаны в шейкере с шариками диаметром 0,1–0,5 мм [55, 58]. Впервые выделение из единичной споры для идентификации АМ-гриба до вида было проведено И.Р. Сандерсом и др. [59]. Дж. Блазковски и др. предлагают использовать модифицированный протокол выделения спор [55] с последующей их заморозкой в 1,5 мл пробирках и разрушением микропестиком; к каждому образцу добавляют 100 мкл буфера (200 мМ Трис-НСl рН 7,5, 250 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и 1 % SDS, w/v); образцы нагревают до 100 °С, замораживают жидким азотом и снова нагревают и инкубируют при 100 °С в течение 10 мин; далее образцы очищают на колонках (QIAquick, Qiagen); ДНК смывают нагретым до 55 °С раствором 1 мМ Трис-НСl (рН 8).

В случае использования готовых наборов для выделения ДНК пользуются протоколами, рекомендованными производителем. Например, Р. Бориелло и др. предлагают выделение ДНК из 10–30 спор с использованием FastDNA Kit (MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA): споры разрушают микропестиком в микропробирке в 100 мкл CLS-У лизирующего буфера; суспензию переносят в 2 мл колонки, содержащие 400 мкл CLS-У буфера, и встряхивают 30 с в FastPrep120 (USA), далее следуют протоколу производителя набора [58].

Помимо указанных выше, часто используют следующие наборы: innuPREP Plant DNA Kit (Analytik Jena, Jena, Germany), FastDNA Spin Kit [19], the Nucleospin® 96 Plant kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) [26].

Важный результат был получен в исследовании А.Г. Дьеду и др. Было показано, что качество продуктов амплификации положительно коррелирует с чистой ДНК ($r = +0,73$, $p < 0,05$) и обратно коррелирует с концентрацией ($r = -0,74$, $p < 0,05$) [49]. Это утверждение означает, что в ряде случаев для получения качественного продукта ПЦР ДНК требует разбавления в 100–1000 раз для снижения концентрации ингибирующих ПЦР примесей.

БАРКОДИНГ

Одной из главных проблем идентификации АМ-грибов является их высокий ядерный полиморфизм [2, 18]. Это касается не только межвидовой, но и внутривидовой изменчивости. Так, показан высокий полиморфизм генетического материала штаммов *R. irregularis* [7, 60]. Более того, при выделении ДНК из разных ядер одного изолята АМ-гриба получаемые нуклеотидные последовательности маркерных регионов также могут значительно различаться [60]. Происхождение обнаруженной высокой изменчивости АМ-грибов обсуждается в двух конфликтующих теориях. Согласно первой гипотезе, генетический материал разных ядер одной споры АМ-гриба однороден (гомокариоз), что было продемонстрировано на *Glomus etunicatum* [61]. Согласно второй гипотезе, генетический материал имеет существенные отличия даже внутри одной споры (гетерокариоз), что было продемонстрировано на *Glomus irregulare* [62] и *Glomus etunicatum* [63] (виды в настоящее время перенесены в другие роды и переименованы в *Rhizophagus irregularis* и *Claroideoglomus etunicatum* соответственно). Результаты М. Тиссерант и др. свидетельствовали в пользу первой гипотезы, поскольку впервые проведенное полногеномное секвенирование АМ-гриба (*Rhizophagus irregularis*) показало низкий уровень геномного полиморфизма — 0,43 замены на 1000 п. н. [64]. С другой стороны, полиморфизм отдельных участков ДНК существенно варьирует.

В качестве ДНК-маркеров для идентификации видов АМ-грибов использовали несколько участков ядерного и митохондриального геномов. Это участки из кластера генов 35S рРНК генома ядра (участки генов 18S и 26/28S рДНК, районы *ITS1* и *ITS2*, 5.8S рДНК) [23, 65–67], ген *LSU* митохондриальной рРНК [68], гены *RPB1* и *RPB2* субъединиц I и II РНК полимеразы II [2, 69], ген *PTG* — фосфатный транспортер [70], ген *H+* АТФазы [71], ген β -тубулина [72], а также генов, кодирующих фактор элонгации 1-альфа (EF 1- α) [69, 73]. Известна и попытка использовать в качестве ДНК-штрихкода АМ-грибов ген *COX1* (митохондриальный ген, кодирующий субъединицу I цитохром

с-оксидазы) [6] — баркод, повсеместно применяемый для идентификации видов животных. Однако оказалось, что для грибов этот маркер не подходит, так как этот ген у грибов имеет много интронов и к нему трудно подобрать универсальные для грибов праймеры [67]. Кроме того, известно, что ДНК-баркодинг на основе малокопийных консервативных генов неэффективен для близких видов из-за низкой межвидовой изменчивости [24]. На практике ITS-регион является основным участком для баркодинга, он наиболее представлен в базах данных, среди которых надо выделить UNITE (User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza) Database [66, 67], включающую сейчас 817 130 последовательностей ITS грибов, и базу данных MaarjAM [74]. Следует заметить, что ITS-маркер также используется в молекулярно-филогенетических исследованиях высших растений [75].

Существует множество исследований, в которых авторы разрабатывали новые праймеры на разные информативные участки гена *35S* рРНК [18, 47, 54, 56, 76] и сравнивали специфичность отжига праймеров для АМ-грибов [24, 77]. Если использовать универсальные праймеры ITS1F и ITS4, то амплифицируются районы ITS1-5.8SpДНК-ITS2 не только грибов, но и растений [78, 79]. Разработанные А. Голлот и др. [47] праймеры FLR3 и FLR4 для амплификации переменного района LSU оказались разной специфичности: FLR4 был специфичен исключительно для АМ-грибов, а FLR3 показал низкую специфичность к АМ-грибам и отжигался на ДНК базидиомицетов также хорошо. В 2008 г. Дж. Ли и др. [56] разработали праймеры AML1 и AML2, которые, по их утверждению, оказались на тот момент наиболее специфичными для последовательностей SSU АМ-грибов. Тем не менее в 2015 г. С. Жанг и др. [77] указали, что эта пара праймеров даже менее специфична, чем универсальные грибные праймеры NS31 и AM1, полученные Т. Хелгасон и др. в 1998 г. [80]. Таким образом, требуется проверка эффективности и специфичности праймеров при расширении круга исследуемых объектов. Наиболее часто в настоящее время используется набор праймеров М. Крюгер и др. (к региону SSU – ITS – LSU), поскольку охватывает наибольшее число семейств АМ-грибов: в первом раунде применяется смесь праймеров SSUmAf вместе с LSUmAr, а во втором — SSUmCf с LSUmBr [18]. Один из наиболее полных списков всех используемых для идентификации АМ-грибов наборов праймеров дан в работе А. Крюкова и А. Юркова [7].

Следует отметить, что последовательности центрального участка SSU у видов из родов *Ambispora*, *Diversispora*, *Gigaspora* и *Scutellospora* часто не имеют видоспецифичных замен [20]. Д. Редекер и др. отмечают проблемы идентификации по коротким фрагментам SSU также и для таксонов более высокого ранга, например, на уровне родов [81]. Напротив, в ряде случаев ITS-район плохо подходит для иден-

тификации видов АМ-грибов вследствие избыточно высокой изменчивости [60]. К аналогичным выводам пришли М. Оп де Беек и др. [24] в результате анализа эффективности различных наборов праймеров к региону SSU – ITS – LSU.

ВЛОЖЕННАЯ ПЦР

На этапе проведения ПЦР ключевой проблемой является загрязнение ДНК АМ-грибов чужеродными нуклеиновыми кислотами. Многократные попытки идентифицировать АМ-грибы с применением универсальных грибных праймеров оказались неудачными. Проблему загрязнения чужеродной ДНК удалось решить с помощью проведения вложенной ПЦР в 2 или 3 раунда со специфическими праймерами [54, 57, 72]. Д. Редекер одним из первых применил вложенную ПЦР для идентификации АМ-грибов с разработанными праймерами на SSU и ITS участки [54]: в первом раунде вложенной ПЦР использованы универсальные праймеры NS5 и ITS4 [78], во втором — специфические праймеры ARCH1311, ACAU1660, LETC1670, GLOM1310 с ITS4 [78], ITS1F [79] с GLOM5.8R и GIGA5.8R [54]. В более позднем исследовании эффективной оказалась вложенная ПЦР, проведенная с применением праймеров на SSU-регион, таких как: GlomerWT0 с Glomer1536 в первом раунде [55] и GlomerWT0 с GlomerWT2 во втором раунде ПЦР [76]. Важным следствием этих работ стало то, что для ПЦР ДНК АМ-грибов с дальнейшим секвенированием по Сэнгеру рекомендуется использование специфических праймеров, поскольку иначе реакция идет не только на целевой ДНК, и даже не только на ДНК ризосферных грибов, но и также на ДНК растения-хозяина. С другой стороны, универсальные праймеры удобно использовать в методах секвенирования нового поколения при оценке генетического полиморфизма [7].

ОПТИМИЗАЦИЯ ПЦР И РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ «ХИМЕРНЫХ» ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Обычно результаты ПЦР хорошо прогнозируемы и повторяемы. Полной неожиданностью для ряда исследователей оказалось появление «химер» [19, 22, 82], к которым относят искусственные последовательности, непреднамеренно генерируемые в ПЦР и обычно состоящие из фрагментов от двух различных организмов [83]. П. Кохот и др. [22] показали, что: 1) наибольшее количество химер (19,6 %) выявляется при использовании праймеров М. Крюгер и др. [18], при том что эти праймеры наиболее специфичны к АМ-грибам; 2) при использовании праймеров Д. Редекера и др. [84] было зарегистрировано 0,9 % химер при наличии 46,4 % нецелевых последовательностей [22]; 3) отсутствие химер и нецелевых последовательностей было выявлено при использовании в первом раунде вложенной ПЦР праймеров SSUmAf с LSUmAr [18], а во втором — моди-

фицированного ITS7о [85] с ITS4 [78]. Для уменьшения вероятности получения химер К. Сенес-Гуэрреро и др. [19] рекомендуют использование в ПЦР высоко точной Phusion ДНК-полимеразы (Finnzymes, Espoo, Finland). В то же время разработаны специальные компьютерные программы для обнаружения химерных последовательностей и исключения их из анализа: например, программа Mallard [86] или UCHIME [87].

На основании литературных данных можно рекомендовать следующие варианты оптимизации проведения ПЦР ДНК АМ-грибов. Целесообразно увеличение числа повторностей ПЦР в 2 раза, поскольку показано, что ее эффективность не всегда является высокой, снижаясь до 60 % в ряде случаев [19]. Помимо этого, Т. Осмундсоном и др. отмечено, что через 2,5 года хранения ДНК АМ-грибов эффективность ПЦР падает в 2–3 раза [50]. Для того чтобы идентифицировать виды из максимального числа семейств АМ-грибов (например, в образцах почвы), рекомендуется использовать отдельные пары праймеров, описанные М. Крюгер и др., с проверкой результатов на наличие химерных последовательностей [22].

В результате исследования А. Крюкова и А. Юркова [7] предложены следующие модификации ПЦР: 1) увеличение числа циклов ПЦР до 40, чтобы добиться достаточного для секвенирования и анализа количества генетического материала АМ-грибов, при этом первые циклы следует проводить при повышенной температуре отжига для улучшения его специфичности (Touchdown PCR); 2) при проведении ПЦР длинных фрагментов с использованием праймеров М. Крюгер и др. [18] SSUmAf – LSUmAr и SSUmCf – LSUmBr рекомендуется увеличивать время элонгации на 30 с. В случае неудачной ПЦР целесообразно оптимизировать амплификацию подбором альтернативных пар праймеров с проведением идентификации по ITS2-фрагменту.

МЕТОД КЛОНИРОВАНИЯ-СЕКВЕНИРОВАНИЯ

При секвенировании по Сэнгеру последовательностей ДНК АМ-грибов по SSU – ITS – LSU региону наблюдается высокая вариабельность, обусловленная наличием делеций и инсерций в генетическом материале [7]. Помимо полиморфизма еще одной причиной высокой вероятности получения последовательностей с ошибками является то, что в смеси после ПЦР может присутствовать ДНК как растения-хозяина, так и других грибов, количество видов которых может составлять не один десяток [28], что приводит к невозможности чтения последовательностей либо неоднозначному их прочтению без этапа клонирования. С учетом высокой вариабельности и присутствия смесей в ПЦР-продукте необходим анализ значительного числа клонов: по данным М. Крюгер и др., до 48 на одну пробу [18], поэтому в рамках одного исследования может анализироваться более 1000 клонов, что требует зна-

чительных затрат. Клонирование последовательностей ДНК АМ-грибов можно проводить с применением различных наборов, таких как: 1) pCR2.1-TOPO vector, Invitrogen, Netherlands [57]; 2) Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Invitrogen, Netherlands [18]; 3) StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit, Agilent Technologies, Mississauga, ON [88]; 4) pGEM-T Easy vector, Promega, Madison, WI, USA [26]. Рекомендуется после очистки ДНК отобранные клоны сразу секвенировать, не применяя дополнительную ПЦР с колонии [7].

СЕКВЕНИРОВАНИЕ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Значительный интерес в решении проблемы идентификации АМ-грибов представляют методы секвенирования нового поколения (NGS). На сегодня существует несколько методов NGS: 454 Life Sciences, Illumina-SOLEXA, IonTorrent, SOLiD и Helicos [27, 89]. Одним из наиболее ранних методов NGS был метод пиросеквенирования 454, с помощью которого получали короткие прочтения (~160 п. н.). С 2009 г. методы NGS начали использовать в практике идентификации АМ-грибов [26]. С использованием универсальных грибных праймеров NS31 с AM1 М. Опик и др. [26] провели анализ 179279 последовательностей, из которых 77,5 % принадлежали к 47 таксонам АМ-грибов, выделенных из корней 10 видов растений. Однако, по данным Т. Хелгасон и др., [80] эти праймеры не подходят для анализа семейств Archaeosporaceae и Paraglomeraceae по участку SSU. М. Опик и др. [26] показали, что применение метода 454 позволило выявить в 1,5 раза больше таксонов грибов в корнях печеночницы благородной (*Hepatica nobilis* Mill.), чем секвенирование по Сэнгеру. Это подтвердило неэффективность метода клонирования-секвенирования при идентификации АМ-грибов.

В работе К. Сенес-Гуэрреро и др. [28] использовали метод 454 GS-FLX+ для идентификации по LSU региону (в первом раунде вложенной ПЦР — праймеры М. Крюгер и др. [18], во втором — модифицированный праймер LSU-D1f [28] с LSUmBr [18]). Интересным результатом этой работы стало то, что ~60 % исследованных растений образовывали симбиоз не менее чем с 10 видами АМ-грибов каждое, а 2 % растений имели в корневой системе более 25 видов АМ-грибов [28]. Применение данного протокола идентификации позволило получить 698297 последовательностей, из которых 0,17 % целевых последовательностей АМ-грибов имели длину от 760 п. н. и были отнесены к 41 виду, из которых 15 — неизвестные таксоны, не зарегистрированные в базах данных. Данная проблема является распространенной для царства грибов в целом, не ограничиваясь филой АМ-грибов. По мнению С. Кивлин и др., большинство грибов до сих пор никак не описано и не охарактеризовано [21]. В 2014 г. К. Сенес-Гуэрреро и др. [19] также указали, что ~50 % видов

АМ-грибов региона Анд не были ранее идентифицированы молекулярно-генетическими методами.

М. Ван Гил и др. [90] провели одно из наиболее детальных сравнений эффективности работы различных комбинаций праймеров для 454 пиросеквенирования с длиной фрагментов 200–400 п. н. Результаты показали, что с наибольшим отрывом от остальных лидирует пара FLR3 [47] с LSumBr4 [18] с получением 142734 сиквенсов, из которых 92,3 % обладали высоким качеством для анализа при длине более 250 п. н. Менее эффективными были пары AMV4.5NF [91] с AMDGR [91] и Glo454 [92] с NDL22 [93] с получением 156857 и 158003 последовательностей, из которых 61,3 и 61,4 % соответственно обладали высоким качеством. Следует отметить, что эффективность секвенирования резко падала (в 4,2–12,0 раз) с увеличением длины секвенируемых фрагментов с 200 до 400 п. н.

БАЗЫ ДАННЫХ ГЕННЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГРИБОВ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ

Идентификация АМ-грибов по полученным в результате секвенирования последовательностям осуществляется с применением различных баз данных: 1) INSDC, включающая сервис NCBI, в том числе ГенБанк (США) [23], EMBL-EBI (ЕС) [94] и DDBJ (Япония) [95], при этом номера сиквенсов АМ-грибов в базах ГенБанка NCBI, EMBL и DDBJ совпадают [18]; 2) база данных последовательностей ДНК АМ-грибов MaarjAM [22, 65, 74], предназначенная для работы с «виртуальными таксонами»; 3) база данных по ITS для эктомикоризных и АМ-грибов UNITE [22, 66]. С 2009 г. развитие методов NGS в идентификации АМ-грибов [26] ведет к значительному росту в базах данных количества их сиквенсов. На начало 2018 г. общее количество последовательностей ДНК АМ-грибов только в базе ГенБанка уже составило 233580, из которых более 18000 сиквенсов имеют размер 1350–1900 п. н., то есть получены по целому региону SSU – ITS – LSU (в подавляющем числе случаев) [23]. Очевидно, что методы NGS будут способствовать существенному развитию таксономии грибов АМ, причем они продолжают совершенствоваться. Так, стоимость секвенирования 1 млн п. н. относительно новым методом Illumina MiSeq составляет \$0,5 [27], что в 20 раз дешевле, чем методом 454 GS FLX [89]. При этом оба метода демонстрируют высокую эффективность в определении таксонов АМ-грибов [96]. Однако проблемы, связанные с морфологической оценкой спор АМ-грибов, с неспособностью их роста на искусственных средах, привели к опережающему развитию филогенетических исследований над морфологическими методами идентификации и таксономии. В работе А. Беррути и др. [97] описано сравнение двух филогенетических схем отдела *Glomeromycota* (ныне *Glomeromycotina*), которое показало, что в настоящее время идет активное построение

всей филогении АМ-грибов от вида и до отдела. С другой стороны, создание базы данных последовательностей ДНК АМ-грибов MaarjAM связано с накоплением значительного количества «виртуальных таксонов», не описанных по морфологическим признакам [2]. Так, М. Опик и др. сообщают, что широко распространенный и включающий наибольшее количество видов род *Glomus* содержит 113 «морфовидов», а также 239 виртуальных таксонов [2], тем самым морфологически определены только 32 % видов рода *Glomus*. Виды данной таксономической группы в 2010 г. были разделены на 4 рода — *Glomus*, *Funneliformis*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, а к 2017 г. уже на 15 родов [3], многие виды которых не определены морфологическими методами.

Таким образом, исследования в области филогении АМ-грибов в настоящее время направлены на анализ проблемы высокой внутри- и межвидовой изменчивости изучаемых последовательностей: подбираются новые участки для ДНК-штрихкодирования и праймеры к ним, а также развиваются методы NGS. С другой стороны, необходима разработка адекватных принципов разделения филогенетических таксонов АМ-грибов. Для этой цели необходимо дальнейшее накопление последовательностей новыми высокопроизводительными методами секвенирования для АМ-грибов. Применение специализированной базы MaarjAM [74], по мнению авторов, может стать удобным инструментом в стандартизации виртуальных таксонов АМ-грибов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследователи при идентификации АМ-грибов молекулярно-генетическими методами сталкиваются с проблемами на всех этапах, начиная с выделения ДНК и заканчивая обсуждением результатов секвенирования. Экстракция ДНК из спор и микоризованных корней имеет свои особенности, которые определяются возможными ее потерями при выделении из спор и существенным загрязнением материала при выделении из корней. Повышение чистоты выделяемой ДНК положительно коррелирует с эффективностью ПЦР. В связи с этим заслуживает внимания идея применения тонкой иглы или проволоки для аккуратного разрушения оболочки спор, а также применение PVPP для снижения влияния на прохождение ПЦР ингибирующих примесей. Следующий важный фактор, влияющий на результат ПЦР, — выбор генетического маркера и праймеров. Наиболее эффективным для ДНК-штрихкодирования АМ-грибов является регион SSU – ITS – LSU35S рПНК. С учетом развития в последние годы высокопроизводительных методов NGS появилась возможность более глубоко исследовать диапазон изменчивости ITS-маркера и наработать по нему достаточную базу сиквенсов для более точной идентификации. В сравнении с методом клонирования-секвенирования методы NGS показывают более высо-

кую эффективность по выявлению таксонов AM-грибов. Это ставит под сомнение целесообразность использования метода клонирования-секвенирования в будущем как для идентификации, так и для оценки генетического полиморфизма AM-грибов. Эволюция новых методов идентификации способствует быстрому росту баз данных сиквенсов в последние годы. С 2010 г. помимо основной базы данных INSDC появилась база MaagjAM, специально предназначенная для работы с виртуальными таксонами AM-грибов. Возможно, применение ДНК-штрихкодирования и NGS позволит уточнить понятия «вид» и «популяция» для AM-грибов, разработать более логичную и устойчивую их таксономию. Тем не менее, несмотря на достижения в высокопроизводительном секвенировании, до сих пор большинство видов AM-грибов остается не определено по морфологическим признакам, и без развития и стандартизации методов морфологического анализа виртуальные таксоны могут такими и остаться, причем не только на видовом уровне, но и на уровне родов и целых семейств AM-грибов.

Подводя итог, отметим, что корректное штрихкодирование, повышение репрезентативности базы данных ДНК-последовательностей, развитие морфологической идентификации и тщательный подход к систематике подотдела *Glomeromycotina* позволят глубже изучить филогенетические отношения AM-грибов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантами РФФИ № 16-16-00118 (разделы «Метод клонирования-секвенирования», «Секвенирование нового поколения» и «Базы данных геномных последовательностей грибов арбускулярной микоризы»), СПбГУ № 1.37.534.2016 (раздел «Оптимизация ПЦР и решение проблемы «химерных» последовательностей»), РФФИ-а № 18-016-00220 (раздел «Баркодинг»), РФФИ-офи м № 15-29-02753 (раздел «Вложенная ПЦР»), государственным заданием 0664-2015-0011 (раздел «Пробоподготовка и выделение ДНК»). Часть работы выполнена в рамках государственного задания 0126-2014-0028 и программы фундаментальных исследований РАН 41 «Биоразнообразие природных систем и биологические ресурсы России» на оборудовании ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» БИН РАН и ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stockinger H, Peyret-Guzzon M, Koenig S, et al. The largest subunit of RNA polymerase II as a new marker gene to study assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *PLoS one*. 2014;9(9):e107783. doi: 10.1371/journal.pone.0107783.
2. Öpik M, Davison J, Moora M, Zobel M. DNA-based detection and identification of Glomeromycota: the virtual taxonomy of environmental sequences. *Botany*. 2014;92(2):135-147. doi: 10.1139/cjb-2013-0110.
3. Amf-phylogeny.com [Internet]. Glomeromycota species list [cited 2018 Mar 1]. Available from: <http://www.amf-phylogeny.com>.
4. Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, et al. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*. 2017;108(5):1028-46. doi: 10.3852/16-042.
5. Lee E-H, Eo J-K, Ka K-H, Eom A-H. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Their Roles in Ecosystems. *Mycobiology*. 2018;41(3):121-125. doi: 10.5941/myco.2013.41.3.121.
6. Stockinger H, Krüger M, Schüßler A. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*. 2010;187(2):461-474. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x.
7. Крюков А.А., Юрков А.П. Оптимизация процедуры молекулярно-генетической идентификации грибов арбускулярной микоризы в симбиотическую фазу на примере двух близкородственных штаммов // Микология и фитопатология. — 2018. — Т. 52. — № 1. — С. 38–48. [Kryukov AA, Yurkov AP. Optimization procedures for molecular-genetic identification of arbuscular mycorrhizal fungi in symbiotic phase on the example of two closely kindred strains. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2018;52(1):38-48. (In Russ.)]
8. Thiéry O, Moora M, Vasar M, et al. Inter- and intraspecific nuclear ribosomal gene sequence variation within one isolate of arbuscular mycorrhizal fungus, *Diversispora* sp. *Symbiosis*. 2012;58(1-3):135-147. doi: 10.1007/s13199-012-0212-0.
9. Daubois L, Beaudet D, Hijri M, de la Providencia I. Independent mitochondrial and nuclear exchanges arising in *Rhizophagus irregularis* crossed-isolates support the presence of a mitochondrial segregation mechanism. *BMC Microbiology*. 2016;16(1). doi: 10.1186/s12866-016-0627-5.
10. Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H. Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. *Genome*. 1998;41(3):422-428. doi: 10.1139/g98-038.
11. Savary R, Masclaux FG, Wyss T, et al. A population genomics approach shows widespread geographical distribution of cryptic genomic forms of the symbiotic fungus *Rhizophagus irregularis*. *ISME J*. 2017;12(1):17-30. doi: 10.1038/ismej.2017.153.
12. Schenck NC, Pérez Y. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3rd ed. Gainesville: Synergistic Publications; 1990.
13. Fungi.invam.wvu.edu [Internet]. Species descriptions from reference cultures. West Virginia University [cited 2018 Mar 1]. Available from: <http://fungi.invam.wvu.edu>.

14. Stockinger H, Walker C, Schüßler A. 'Glomus intraradices DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytol.* 2009;183(4):1176-1187. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02874.x.
15. Schussler A, Kruger M, Walker C. Revealing natural relationships among arbuscular mycorrhizal fungi: culture line BEG47 represents *Diversispora epigaea*, not *Glomus versiforme*. *PLoS one.* 2011;6(8):e23333. doi: 10.1371/journal.pone.0023333.
16. Koske RE. *Glomus aggregatum* Emended: A Distinct Taxon in the *Glomus fasciculatum* Complex. *Mycologia.* 1985;77(4):619. doi: 10.2307/3793360.
17. Walker C, Koske RE. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: IV. *Glomus fasciculatum* redescribed. *Mycotaxon.* 1987;(30):253-262.
18. Kruger M, Stockinger H, Kruger C, Schussler A. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 2009;183(1):212-223. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x.
19. Senes-Guerrero C, Torres-Cortes G, Pfeiffer S, et al. Potato-associated arbuscular mycorrhizal fungal communities in the Peruvian Andes. *Mycorrhiza.* 2014;24(6):405-17. doi: 10.1007/s00572-013-0549-0.
20. Bruns TD, Corradi N, Redecker D, et al. Glomeromycotina: what is a species and why should we care? *New Phytol.* 2017. doi: 10.1111/nph.14913.
21. Kivlin SN, Hawkes CV, Treseder KK. Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem.* 2011;43(11):2294-2303. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.07.012.
22. Kohout P, Sudová R, Janoušková M, et al. Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: Is there a universal solution? *Soil Biol Biochem.* 2014;68:482-493. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.08.027.
23. Ncbi.nlm.nih.gov [Internet]. National Center for Biotechnology Information [updated 2018 Mar 1; cited 2018 Mar 1]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
24. Neilan B, Op De Beeck M, Lievens B, et al. Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *PLoS one.* 2014;9(6):e97629. doi: 10.1371/journal.pone.0097629.
25. Senes-Guerrero C, Schussler A. DNA-Based Characterization and Identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Species. *Methods Mol Biol.* 2016;1399:101-123. doi: 10.1007/978-1-4939-3369-3_6.
26. Öpik M, Metsis M, Daniell TJ, et al. Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytol.* 2009;184(2):424-37. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02920.x.
27. Quail M, Smith ME, Coupland P, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics.* 2012;13(1):341. doi: 10.1186/1471-2164-13-341.
28. Senés-Guerrero C, Schüßler A. A conserved arbuscular mycorrhizal fungal core-species community colonizes potato roots in the Andes. *Fungal Divers.* 2015;77(1):317-33. doi: 10.1007/s13225-015-0328-7.
29. Millner PD, Kitt DG. The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza.* 1992;2(1):9-15. doi: 10.1007/bf00206278.
30. Vassilev N, Nikolaeva I, Vassileva M. Polymer-based Preparation of Soil Inoculants: Applications to Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 2005;4(4):235-243. doi: 10.1007/s11157-005-2098-2.
31. Yurkov AP, Jacobi LM, Gapeeva NE, et al. Development of arbuscular mycorrhiza in highly responsive and mycotrophic host plant—black medick (*Medicago lupulina* L.). *Russ J Dev Biol.* 2015;46(5):263-275. doi: 10.1134/s1062360415050082.
32. Becard G, Fortin JA. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 1988;108(2):211-218. doi: 10.1111/j.1469-8137.1988.tb03698.x.
33. I-beg.eu [Internet]. The International Bank for the Glomeromycota [updated 2016 Aug 18; cited 2018 Mar 1]. Available from: <http://www.i-beg.eu>.
34. Mycorrhizae.org.in [Internet]. Centre for Mycorrhizal Culture Collection [updated 2017 Jun 01; cited 2018 Mar 1]. Available from: <http://mycorrhizae.org.in>.
35. Mycorrhizae.org.in [Internet]. The Glomeromycetes *in vitro* Collection, Canada [updated 2018 Feb 26; cited 2018 Mar 1]. Available from: <http://mycorrhizae.org.in>.
36. Agroscope.admin.ch [Internet]. Swiss Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi [updated 2015 Nov 24; cited 2018 Mar 1]. Available from: <https://www.agroscope.admin.ch>.
37. Mycorrhiza.be [Internet]. Glomeromycota *in vitro* Collection, Belgium [updated 2018 Jan 15; cited 2018 Mar 1]. Available from: <http://www.mycorrhiza.be>.
38. Bccm.belspo.be [Internet]. Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain: Belgian Coordinated Collections of Microorganisms [cited 2018 Mar 1]. Available from: <http://bccm.belspo.be>.
39. Furb.br [Internet]. International Culture Collection of Glomeromycota [updated 2015 Feb 18; cited 2018 Mar 1]. Available at: <http://www.furb.br>.
40. Hung LL, Sylvia DM. Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. *Appl Environ Microbiol.* 1988;54(2):353-357.
41. de Boulois HD, Voets L, Delvaux B, et al. Transport of radiocaesium by arbuscular mycorrhizal fungi to *Medicago truncatula* under *in vitro* conditions. *Environ Microbiol.* 2006;8(11):1926-1934. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01070.x.

42. Ijdo M, Cranenbrouck S, Declerck S. Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future. *Mycorrhiza*. 2011;21(1):1-16. doi: 10.1007/s00572-010-0337-z.
43. Verma A, Aldhoola A. Cost-economics of existing methodologies for inoculum production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: KG Mukerji, editor. *Concepts in Mycorrhizal Research*. Dordrecht: Kluwer Academic; 1996. p.179-194.
44. Naturalcommunities.net [Internet]. Natural Communities [updated 2018 Jan 15; cited 2018 Mar 1]. Available from: <https://naturalcommunities.net>.
45. Reforest.com [Internet]. Reforestation Technologies International [updated 2018 Jan 25; cited 2018 Mar 1]. Available from: <https://www.reforest.com>.
46. Opik M, Zobel M, Cantero JJ, et al. Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 2013;23(5):411-430. doi: 10.1007/s00572-013-0482-2.
47. Gollotte A, Van Tuinen D, Atkinson D. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza*. 2004;14(2):111-117. doi: 10.1007/s00572-003-0244-7.
48. Saghai-Marouf MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81(24):8014-8018. doi: 10.1073/pnas.81.24.8014.
49. Diédhiou AG, Borges WL, Sadio O, De Faria SM. Assessment of DNA extraction methods for detection of arbuscular mycorrhizal fungi in plant roots by nested-PCR. *Acta Sci Biol Sci*. 2014;36(4):433. doi: 10.4025/actasciobiolsci.v36i4.21689.
50. Osmundson TW, Eyre CA, Hayden KM, et al. Back to basics: an evaluation of NaOH and alternative rapid DNA extraction protocols for DNA barcoding, genotyping, and disease diagnostics from fungal and oomycete samples. *Mol Ecol Resour*. 2013;13(1):66-74. doi: 10.1111/1755-0998.12031.
51. de Lamballerie X, Zandotti C, Vignoli C, et al. A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex 100" suitable for gene amplification. *Res Microbiol*. 1992;143(8):785-790. doi: 10.1016/0923-2508(92)90107-y.
52. Hiraishi A. Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Lett Appl Microbiol*. 1992;15(5):210-213. doi: 10.1111/j.1472-765X.1992.tb00765.x.
53. Wang H, Qi M, Cutler AJ. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Research*. 1993;21(17):4153-4154. doi: 10.1093/nar/21.17.4153.
54. Redecker D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza*. 2000;10(2):73-80. doi: 10.1007/s005720000061.
55. Błaszowski J, Czerniawska B, Wubet T, et al. *Glomus irregulare*, a new arbuscular mycorrhizal fungus in the Glomeromycota. *Mycotaxon*. 2008;106:247-267. doi: 10.1139/B09-104.
56. Lee J, Lee S, Young JP. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol*. 2008;65(2):339-349. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00531.x.
57. Schwarzott D, Schüßler A. A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. *Mycorrhiza*. 2001;10(4):203-207. doi: 10.1007/pl00009996.
58. Borriello R, Bianciotto V, Orgiazzi A, et al. Sequencing and comparison of the mitochondrial COI gene from isolates of Arbuscular Mycorrhizal Fungi belonging to Gigasporaceae and Glomeraceae families. *Mol Phylogeny Evol*. 2014;75:1-10. doi: 10.1016/j.ympev.2014.02.012.
59. Sanders IR, Alt M, Groppe K, et al. Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol*. 1995;130(3):419-427. doi: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb01836.x.
60. Butler G, Lin K, Limpens E, et al. Single Nucleus Genome Sequencing Reveals High Similarity among Nuclei of an Endomycorrhizal Fungus. *PLoS Genet*. 2014;10(1):e1004078. doi: 10.1371/journal.pgen.1004078.
61. Pawlowska TE, Taylor JW. Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. 2004;427(6976):733-737. doi: 10.1038/nature02290.
62. Ehinger MO, Croll D, Koch AM, Sanders IR. Significant genetic and phenotypic changes arising from clonal growth of a single spore of an arbuscular mycorrhizal fungus over multiple generations. *New Phytol*. 2012;196(3):853-861. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04278.x.
63. Hijri M, Sanders IR. Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature*. 2005;433(7022):160-163. doi: 10.1038/nature03069.
64. Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, et al. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(50):20117-20122. doi: 10.1073/pnas.1313452110.
65. Maarjam.botany.ut.ee [Internet]. Database for studies on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi [updated 2010 Jun 01; cited 2018 Mar 1]. Available from: <https://maarjam.botany.ut.ee>.

66. Unite.ut.ee [Internet]. Unified system for the DNA based fungal species linked to the classification Ver. 7.2 [updated 2017 May 04; cited 2018 Mar 1]. Available from: URL: <https://unite.ut.ee>.
67. Yahr R, Schoch CL, Dentinger BTM. Scaling up discovery of hidden diversity in fungi: impacts of barcoding approaches. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2016;371(1702):20150336. doi: 10.1098/rstb.2015.0336.
68. Böstler B, Thiéry O, Šýkorová Z, et al. Diversity of mitochondrial large subunit rDNA haplotypes of *Glomus* intraradices in two agricultural field experiments and two semi-natural grasslands. *Mol Ecol*. 2010;19(7):1497-1511. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04590.x.
69. James TY, Kauff F, Schoch CL, et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 2006;443(7113):818-822. doi: 10.1038/nature05110.
70. Sokolski S, Dalpé Y, Piché Y. Phosphate Transporter Genes as Reliable Gene Markers for the Identification and Discrimination of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Genus *Glomus*. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(5):1888-1891. doi: 10.1128/aem.00919-10.
71. Sokolski S, Dalpé Y, Séguin S, et al. Conspicuity of DAOM 197198, the model arbuscular mycorrhizal fungus, with *Glomus irregulare*: molecular evidence with three protein-encoding genes. *Botany*. 2010;88(9):829-838. doi: 10.1139/b10-050.
72. Msiska Z, Morton JB. Phylogenetic analysis of the Glomeromycota by partial β -tubulin gene sequences. *Mycorrhiza*. 2008;19(4):247-254. doi: 10.1007/s00572-008-0216-z.
73. Helgason T, Watson IJ, Young JPW. Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;229(1):127-132. doi: 10.1016/s0378-1097(03)00802-4.
74. Öpik 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;188(1):223-241. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x.
75. Родионов А.В., Гнутиков А.А., Котинян А.Р., и др. Последовательность ITS1–5.8S рДНК–ITS2 в генах 35S рРНК как маркер при реконструкции филогении злаков (сем. Poaceae) // Успехи современной биологии. – 2016. – Т. 136. – № 5. – С. 419–437. [Rodionov AV, Gnutikov AA, Kotsinyan AR, et al. Sequence ITS1–5.8S rDNA–ITS2 in 35S pRNA genes as a marker in grasses (Poaceae) molecular phylogeny. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2016;136(5):419-437. (In Russ.)]
76. Wubet T, Weiß M, Kottke I, et al. Phylogenetic analysis of nuclear small subunit rDNA sequences suggests that the endangered African Pencil Cedar, *Juniperus procera*, is associated with distinct members of Glomeraceae. *Mycol Res*. 2006;110(9):1059-1069. doi: 10.1016/j.mycres.2006.04.005.
77. Jiang S, Shi G, Mao L, et al. Comparison of different PCR primers on detecting arbuscular mycorrhizal communities inside plant roots. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2015;55(7):916-925.
78. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White, editors. PCR protocols, a guide to methods and applications. San Diego: Academic; 1990. p. 315-322.
79. Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol*. 1993;2(2):113-118. doi: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x.
80. Helgason T, Daniell TJ, Husband R, et al. Ploughing up the wood-wide web? *Nature*. 1998;394(6692):431-431. doi: 10.1038/28764.
81. Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, et al. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*. 2013;23(7):515-531. doi: 10.1007/s00572-013-0486-y.
82. Krüger M, Krüger C, Walker C, et al. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytol*. 2012;193(4):970-984. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03962.x.
83. Nilsson RH, Abarenkov K, Veldre V, et al. An open source chimera checker for the fungal ITS region. *Mol Ecol Resour*. 2010;10(6):1076-1081. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02850.x.
84. Redecker D, Hijri I, Wiemken A. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: Perspectives and problems. *Folia Geobotanica*. 2003;38(2):113-124. doi: 10.1007/bf02803144.
85. Ihrmark K, Bödeker ITM, Cruz-Martinez K, et al. New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012;82(3):666-677. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x.
86. Badger JH, Wang Y, Huang Y, et al. Flooding Greatly Affects the Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Communities in the Roots of Wetland Plants. *PLoS one*. 2011;6(9):e24512. doi: 10.1371/journal.pone.0024512.
87. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011;27(16):2194-2200. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381.
88. Beaudet D, de la Providencia IE, Labridy M, et al. Intraisolate Mitochondrial Genetic Polymorphism and Gene Variants Coexpression in Arbuscular Mycorrhizal

- zal Fungi. *Genome Biol Evol.* 2015;7(1):218-227. doi: 10.1093/gbe/evu275.
89. Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:1-11. doi: 10.1155/2012/251364.
90. Van Geel M, Busschaert P, Honnay O, Lievens B. Evaluation of six primer pairs targeting the nuclear rRNA operon for characterization of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities using 454 pyrosequencing. *J Microbiol Methods.* 2014;106:93-100. doi: 10.1016/j.mimet.2014.08.006.
91. Sato K, Suyama Y, Saito M, Sugawara K. A new primer for discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi with polymerase chain reaction-denature gradient gel electrophoresis. *Grassl Sci.* 2005;51(2):179-81. doi: 10.1111/j.1744-697X.2005.00023.x.
92. Lekberg Y, Schnoor T, Kjølner R, et al. 454-sequencing reveals stochastic local reassembly and high disturbance tolerance within arbuscular mycorrhizal fungal communities. *J Ecol.* 2012;100(1):151-160. doi: 10.1111/j.1365-2745.2011.01894.x.
93. Van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, et al. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol Ecol.* 1998;7(7):879-87. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00410.x.
94. Ebi.ac.uk [Internet]. The European Bioinformatics Institute [updated 2018 Feb 10; cited 2018 Mar 1]. Available from: <https://www.ebi.ac.uk>.
95. Ddbj.nig.ac.jp [Internet]. DNA Data Bank of Japan [updated 2018 Feb 23; cited 2018 Mar 1]. Available from: <https://www.ddbj.nig.ac.jp>.
96. Vasar M, Andreson R, Davison J, et al. Increased sequencing depth does not increase captured diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza.* 2017;27(8):761-773. doi: 10.1007/s00572-017-0791-y.

✿ Информация об авторах

Андрей Павлович Юрков — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории № 4, ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург; научный сотрудник кафедры физиологии и биохимии растений, ФГБУ ВПО СПбГУ, Санкт-Петербург; доцент кафедры экологии, ФГБОУ РГМУ, Санкт-Петербург. E-mail: yurkovandrey@yandex.ru.

Алексей Анатольевич Крюков — канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории № 4. ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург. E-mail: rainniar@rambler.ru.

Анастасия Олеговна Горбунова — инженер-исследователь лаборатории № 4, ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург; аспирант кафедры геоботаники и экологии растений, ФГБУ ВПО СПбГУ, Санкт-Петербург. E-mail: gorbunova.anastasia93@mail.ru.

Андрей Петрович Кожемяков — канд. биол. наук, заведующий лабораторией №4. ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург. E-mail: kojemyakov@rambler.ru.

Галина Васильевна Степанова — канд. с.-хоз. наук, доцент, заведующая лабораторией селекционных симбиотических технологий. ФНЦ кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса, Лобня Московской обл. E-mail: gvstep@yandex.ru.

Эдуард Модрисович Мачс — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория биосистематики и цитологии. Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург. E-mail: emachs@binran.ru.

Александр Викентьевич Родионов — д-р биол. наук, кафедра цитологии и гистологии, ФГБУ ВПО СПбГУ, Санкт-Петербург; зав. лабораторией, лаборатория биосистематики и цитологии, Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург. E-mail: avrodionov@mail.ru.

Мария Федоровна Шишова — д-р биол. наук, профессор кафедры физиологии и биохимии растений. ФГБУ ВПО СПбГУ, Санкт-Петербург. E-mail: mshishova@mail.ru.

✿ Information about the authors

Andrey P. Yurkov — Candidate of Biology, Assistant Professor, Senior Researcher, Laboratory No 4, All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia; Research Scientist, Dept. of Physiology and Biochemistry, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia; Docent, Department of Ecology, Russian State Hydrometeorological University, St. Petersburg, Russia. E-mail: yurkovandrey@yandex.ru.

Alexey A. Kryukov — Candidate of Biology, Assistant Professor, Researcher, Laboratory No 4. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia. E-mail: rainniar@rambler.ru.

Anastasia O. Gorbunova — Engineer-Researcher, Laboratory No 4, All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia; Postgraduate Student, Dept. of Geobotany and Plant Ecology, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: gorbunova.anastasia93@mail.ru.

Andrey P. Kojemyakov — Candidate of Biology, Head, Laboratory No 4. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia. E-mail: kojemyakov@rambler.ru.

Galina V. Stepanova — Assistant Professor, Candidate of Agricultural Sciences, Head, Lab. of Selection Symbiotic Technologies. Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology. Lobnya, Moscow region, Russia. E-mail: gvstep@yandex.ru.

Eduard M. Machs — Candidate of Biology, Senior Researcher, Lab. of Biosystematics and Plant Cytology, Komarov Botanical Institute RAS, Saint Petersburg, Russia. E-mail: emachs@binran.ru.

Alexandr V. Rodionov — Doctor of Biology, Professor, Dept. of Cytology and Histology, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia; Head, Laboratory of Biosystematics and Plant Cytology, Komarov Botanical Institute RAS, Saint Petersburg, Russia. E-mail: avrodionov@mail.ru.

Maria F. Shishova — Doctor of Biology, Professor, Dept. of Plant Physiology and Biochemistry. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: mshishova@mail.ru.