

*На правах рукописи*

Зуев Андрей Георгиевич

**ТРОФИЧЕСКИЕ СВЯЗИ МИКОРИЗНЫХ ГРИБОВ И  
ПОЧВЕННЫХ МИКОФАГОВ В ЛЕСНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ**

Специальность 1.5.15 – экология (биологические науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в лаборатории почвенной зоологии и общей энтомологии Федерального бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова Российской академии наук.

**Научный руководитель**

**Тиунов Алексей Владимирович**  
Член-корреспондент РАН  
доктор биологических наук,  
заведующий лабораторией почвенной  
зоологии и общей энтомологии ИПЭЭ РАН

**Официальные оппоненты**

**Кузнецова Наталия Александровна**  
доктор биологических наук, доцент, профессор  
кафедры зоологии экологии Института биологии  
и химии, ФГБОУ ВО «Московский педагогический  
государственный университет»

**Кураков Александр Васильевич**  
доктор биологических наук, доцент, заведующий  
кафедрой микологии и альгологии  
Биологического факультета ФГБОУ ВО  
Московский государственный  
университет им. М.В. Ломоносова

**Ведущая организация**

Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки  
Институт экологии растений и животных  
Уральского отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г. в \_\_\_ часов \_\_\_ мин.  
на заседании диссертационного совета 24.1.109.01 при Федеральном  
бюджетном учреждении науки Институт проблем экологии и эволюции им.  
А.Н. Северцова Российской академии наук по адресу: 119071, Москва,  
Ленинский проспект, д. 33, тел./факс +7(495)952-35-84, e-mail: admin@sev-in.ru.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Отделения  
биологических наук Российской академии наук по адресу 119071, Москва,  
Ленинский проспект, д. 33; на сайте ИПЭЭ РАН по адресу [www.sev-in.ru](http://www.sev-in.ru) и на  
сайте Высшей аттестационной комиссии по адресу [www.vak.minobrнауки.gov.ru](http://www.vak.minobrнауки.gov.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ Г.

Ученый секретарь диссертационного совета, к.б.н.

Е.А. Кацман

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования**

Функционирование лесных экосистем во многом определяется взаимодействиями, происходящими в почве и на границе почвы и наземных местообитаний. Энергетическую основу сконцентрированных в почве детритных пищевых сетей составляют не только растительные остатки и осваивающие их сапротрофные микроорганизмы, но и соединения, поступающие почву с корнями живых растений и ассоциированными с ними микоризными грибами. Концепции «грибного» и «бактериального» каналов входят в набор ключевых представлений о структуре детритных пищевых сетей (De Ruiter et al., 1993, 1995; Hunt et al., 1987; Wardle, 2002), хотя экспериментальные исследования последних лет показали, что грибной и бактериальный каналы тесно переплетаются (Geisen et al., 2016; Potapov et al. 2021). Тем не менее, очень значительная часть почвенных беспозвоночных, прежде всего микроартроподы, в той или иной степени специализированы к питанию грибами (Стриганова, 1980). Специализированная мицетофагия требует соответствующих адаптаций, таких как устойчивость к токсинам грибного происхождения (Staadén et al., 2010) и особое строение ротового аппарата: грызущего типа у большинства членистоногих (Shaw, 1992), либо стилетного – у грибоядных нематод (Yeates, 1979).

Наиболее привлекательны для беспозвоночных темноокрашенные сапротрофные микромицеты (Scheu, Folger, 2004), одна из массовых групп почвенных грибов (Звягинцев и др., 2005). Сапротрофные грибы играют ключевую роль в деструкции растительного опада; с ними легко работать в лаборатории и ставить эксперименты. В силу этого трофические связи почвенных микофагов и сапротрофных грибов исследованы достаточно подробно. Напротив, эксперименты с микоризными грибами сталкиваются со множеством технических трудностей; взаимодействия этой функциональной группы грибов с почвенными микофагами остаются плохо исследованными.

Поднятый в серии работ М. Pollierer с соавторами (2007, 2012, 2019) вопрос о ключевой важности углерода, поступающего в детритные пищевые сети через корни живых растений и микоризу, способствовал резкому росту числа новых исследований в этой области. Потенциально, микоризные грибы представляют собой обильный и легко доступный пищевой ресурс в лесах бореальной зоны. По разным оценкам, продукция мицелия эктомикоризных грибов достигает 800 мкг сухой биомассы / г почвы в месяц (Wallander et al., 2013) или 350 – 9540 кг сухой биомассы на гектар в год (Ekblad et al., 2016). Углерод, полученный микоризными грибами от корней растений, составляет от четверти до половины всего углерода, сосредоточенного в грибном мицелии в почве (Godbold et al., 2006). С другой стороны, пищевая ценность мицелия микоризных грибов может быть снижена

наличием токсичных вторичных метаболитов и относительно низким, по сравнению с плодовыми телами, содержанием легкодоступных белков и нуклеиновых кислот (Cohen et al., 2014).

Значимость мицелия микоризных грибов в питании почвенных микофагов остается спорным вопросом. В полевых и лабораторных экспериментах с использованием разных методов устойчивые трофические связи с микоризными грибами были установлены пока только для очень немногих видов панцирных клещей (Remén, 2010; Remén et al., 2008; Schneider, Maraun, 2005) и коллембол (Díaz-Aguilar et al., 2021; Fujii et al., 2021), а также для протур (Bluhm et al., 2019). Сведения о влиянии почвенных микофагов на микоризные грибы также фрагментарны. Для некоторых грибов, образующих арбускулярную микоризу, показано незначительное снижение (Warnock и др., 1982) или увеличение (Finlay, 1985) снабжения растений фосфором в присутствии коллембол. В лабораторных условиях показано повреждение коллемболами мицелия эктомикоризных грибов, однако влияние коллембол на биомассу мицелия отмечено не было (LeFait et al., 2019). В то же время, коллемболы, панцирные клещи и другие животные могут способствовать распространению спор микоризных грибов (Fitter, Sanders, 1992; Klironomos, Moutoglis, 1999; Vašutová et al., 2019). Описаны также некоторые косвенные взаимодействия: предполагается, что предпочтительное употребление почвенными беспозвоночными темноокрашенных сапротрофных микромицетов может приводить к увеличению доли микоризных грибов в почве, за счет снижения конкуренции (Hättenschwiler et al., 2005; Maraun et al., 2003).

Мы предполагаем, что слабое воздействие почвенных микофагов на микоризные грибы, а также ограниченность данных о питании почвенных беспозвоночных микоризными грибами (Bluhm et al., 2019; Pollierer, Scheu, 2021; Ротаров, Тиунов, 2016) могут быть связаны либо с низкой интенсивностью, либо с низкой специфичностью трофических связей почвенных микофагов и микоризных грибов. Микоризные грибы плохо поддаются культивированию в лабораторных условиях, а полевые эксперименты требуют специфического дизайна и использования новых аналитических подходов (Wallander et al., 2013). В связи с этим данная работа направлена не только на получение новых данных о трофических связях почвенных микофагов с микоризными грибами, но и на совершенствование методов исследования микоризных грибов и микофагов *in situ*. В работе сочетаются классические методы почвенной зоологии, полевые манипуляционные эксперименты и современные инструментальные методы (изотопный анализ, метабаркодинг).

#### **Цель исследования:**

Экспериментально оценить распространенность и интенсивность трофических связей между мицелием микоризных грибов и почвенными беспозвоночными – микофагами в лесных экосистемах.

Для достижения этой цели поставлены следующие **задачи**:

1. Усовершенствовать существующие полевые методы оценки биомассы мицелия микоризных грибов и трофических связей беспозвоночных животных с грибами.
2. В полевых экспериментах выявить таксоны почвенных беспозвоночных, трофически связанные с мицелием микоризных грибов.
3. В полевом эксперименте оценить влияние почвенных беспозвоночных-микофагов на биомассу мицелия микоризных грибов.

### **Научная новизна**

Впервые оценено влияние гранулометрического состава минерального субстрата на продукцию мицелия микоризных грибов в природных условиях. На основании этих результатов предложена модификация метода вегетационных мешочков. Впервые детально исследован изотопный состав азота и углерода мицелия микоризных и сапротрофных грибов. Впервые оценены величины трофического фракционирования стабильных изотопов углерода и азота грибоядными личинками двукрылых, питающихся на разных экологических группах грибов: микоризных, сапротрофных и паразитических. Впервые выявлен ряд таксонов (семейства, роды, виды) почвенных коллембол и орибатид, трофически связанных с мицелием микоризных грибов. Экспериментально установлено, что мицелий микоризных грибов потребляют преимущественно животные, обитающие в минеральных горизонтах почвы (собственно-почвенные, эуэдафические). Показано поступление вещества и энергии через микоризные грибы (микоризный грибной канал вещества и энергии) на более высокие трофические уровни почвенных пищевых сетей. Впервые экспериментально показано ограниченное влияние почвенных микофагов на биомассу микоризного мицелия в почве.

### **Научная и практическая значимость**

Исследование детализирует структуру грибного канала вещества и энергии в почвенных пищевых сетях лесных экосистем. Получены новые знания о трофической экологии некоторых наиболее обильных групп почвенной микро- и мезофауны, в том числе коллембол семейств *Isotomidae*, *Entomobryidae* и *Hurogastruridae*, панцирных клещей семейств *Oppiidae* и *Phthiracaridae*. Установленные в работе закономерности распределения изотопного состава между различными тканями грибов, а также рассчитанная изотопная ниша беспозвоночных-микофагов позволят облегчить будущие исследования структуры трофических сетей.

Предложенные усовершенствования метода вегетационных мешочков позволяют получить достаточную для наиболее популярных инструментальных и

молекулярно-генетических анализов биомассу мицелия микоризных грибов при проведении краткосрочных и среднесрочных (10-30 суток) полевых экологических исследований.

Установленные трофические связи почвенных беспозвоночных с мицелием микоризных грибов необходимы для оценки интенсивности процессов эмиссии и депонирования углерода в лесных экосистемах, участия сообщества почвенных беспозвоночных и мицелия микоризных грибов в процессах почвообразования. Эти знания необходимы для эффективного управления лесными экосистемами.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Закономерности трофического обогащения беспозвоночных изотопами  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  схожи при питании микоризными и сапротрофными грибами. Тем не менее, микофаги, потребляющие микоризные грибы, существенно обогащены  $^{15}\text{N}$ , что обусловлено различием изотопного состава разных функциональных групп грибов. Это позволяет дифференцировать беспозвоночных-участников «микоризного» и «сапротрофного» грибных каналов в почвенных и наземных пищевых сетях.

2. Очень небольшая часть таксонов почвенных беспозвоночных имеет трофические связи с мицелием микоризных грибов. Однако нами установлены регулярные трофические связи с мицелием микоризных грибов отдельных видов эуэдафических коллембол семейства *Hypogastruridae* и панцирных клещей семейства *Phthiracaridae*. Подтверждено питание мицелием микоризных грибов отдельных видов коллембол семейств *Isotomidae* и *Onychiuridae*, а также панцирных клещей семейства *Opriidae*.

3. Исключение почвенных беспозвоночных не оказывает значительного воздействия на биомассу мицелия микоризных грибов в хвойных лесах.

### **Личный вклад автора**

Планирование исследования осуществлялось совместно автором диссертации и его научным руководителем. Автором выполнены сбор основной части материала, подготовка образцов, проведен изотопный анализ грибов, животных и растительных материалов; молекулярно-генетический анализ; анализ литературных данных, статистическая и графическая обработка данных, их интерпретация, подготовка текстов публикаций. Таксономическая идентификация и сбор плодовых тел и мицелия грибов отчасти проведены д.б.н. А.В. Александровой (МГУ) и Е.С. Правдолюбовой (Сколтех). Сбор и идентификация гамазовых клещей проведены к.б.н. О.Л. Макаровой (ИПЭЭ РАН). Идентификация двукрылых проведена д.б.н. М.Г. Кривошеиной (ИПЭЭ РАН). Идентификация коллембол проведена А.К. Сараевой (Институт леса КарНЦ РАН). Идентификация орибатид проведена к.б.н. В.Д. Леоновым (ИПЭЭ РАН).

### **Апробация работы**

Результаты работы представлены в устных и стендовых докладах на российских и международных конференциях и совещаниях: XVIII (Москва, 2018) и XIX (Улан-Удэ, 2022) Всероссийских совещаниях по почвенной зоологии; международной конференции «Building Bridges. Micro-, Meso- and Macrofauna processes across systems» (Геттинген, 2019); VI (Нальчик, 2019) и VII (Екатеринбург, 2021) Полевых школах по почвенной зоологии и экологии для молодых ученых; IV Всероссийской научно-практической конференции «Окружающая среда: комфортность и экологическая безопасность» (Курск, 2021); XXVIII и XXIX Всероссийских молодежных научных конференциях «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2021 и 2022); на международных конференциях «EGU General Assembly» (Вена, 2022 и 2023).

### **Публикации автора по теме диссертации**

По теме работы опубликовано 19 печатных работ, включая 10 статей из журналов «списка ВАК», индексируемых в международных базах данных Scopus и/или Web of Science и 9 публикаций в материалах и тезисах конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 169 страницах, содержит 19 рисунков, 5 таблиц и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материал и основные методы исследования, четыре главы с результатами и их обсуждением, общее заключение, выводы, благодарности, список литературы. Список литературы включает 498 работ (из них 56 на русском и 442 на иностранных языках).

### **Благодарности**

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю А.В. Тиуну за неоценимую помощь на всех этапах работы. Автор благодарит А.И. Зуеву за помощь в проведении полевых и лабораторных работ, обсуждении результатов, а также корректуру фрагментов текста. Автор благодарит А.В. Александрову и Е.С. Правдолюбову за идентификацию и сбор части плодовых тел грибов, О.Л. Макарову – за сбор и идентификацию гамазовых клещей, М.Г. Кривошеину – за идентификацию двукрылых, А.К. Сараеву – за идентификацию коллембол и помощь в организации работ на территории заповедника Кивач, В.Д. Леонова – за идентификацию орибатид, А.А. Гончарова – за помощь в проведении статистических анализов, А.М. Потапова и А.В. Уварова – за ценные комментарии при обсуждении результатов, а также С.М. Цурикова, О.Л. Розанову и Д.И. Коробушкина – за всестороннюю поддержку при выполнении работ по диссертации. Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 20-34-90088), отдельные исследования выполнены при поддержке Alexander von

Humboldt Foundation (проект № 3.4-1071297-RUS-IP) и KEYSOM COST Action (проект STSM #43171).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ВВЕДЕНИЕ

Сформулированы цель и задачи исследования, приведено обоснование актуальности и научная новизна, теоретическое и практическое значение исследования. Обозначены положения, выносимые на защиту.

### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассматриваются современные представления о структуре и функционировании почвенных пищевых сетей. Подробно рассмотрен грибной энергетический канал в почвенных пищевых сетях, описана роль микоризных и сапротрофных грибов в трансформации основных биогенных элементов в почве. Приведена подробная информация о трофической экологии почвенных беспозвоночных-микофагов. Сделан обзор основных методов исследований почвенных пищевых сетей, описан метод изотопного анализа и его применение для определения трофических связей.

### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа содержит результаты экспериментов, выполненных на разных территориях с помощью широкого набора подходов; детальные описания площадок и методических деталей представлены в теле соответствующих глав. Основные методы включали классические почвенно-зоологические методики экстракции и учета почвенных беспозвоночных, полевые манипуляционные эксперименты, вегетационные мешочки для получения мицелия микоризных грибов, изотопный анализ углерода и азота, а также молекулярно-генетические методы.

Экспериментальными площадками при проведении исследований послужили территории, расположенные в зонах средней и южной тайги и смешанных лесов. Работа в зоне средней тайги проведена на базе заповедника Кивач (далее – «Кивач»), (республика Карелия; 62.28° С, 34.02° В). Исследования проведены в молодом сосняке брусничном (70 лет), и перестойном сосняке брусничном (180 лет). Почва определена как Albic Podzol (Arenic) (WRB 2017). Работа в зоне южной тайги проведена на биостанции ИПЭЭ РАН Оковский лес (далее – «ЦЛГЗ»), расположенной на территории Центрального лесного государственного заповедника (Тверская область; 56.43° С, 32.97° В). Исследования проводились в



перестойном зеленомошно-разнотравном ельнике возрастом около 120 лет. Почвы представлены Albic Retisol Loamic (WRB 2017). Работа в зоне смешанных лесов проведена на биостанции ИПЭЭ РАН Малинки (далее - «Малинки») (г. Москва; 55.46° С, 37.18° В). Исследования проведено в мертвопокровном ельнике возрастом около 50 лет и в зрелом смешанном лесу. Почва определена как Folis Retisol Loamic. Работа в зоне смешанных лесов также проводилась на Звенигородской биологической станции им. С.Н. Скадовского биологического факультета МГУ (далее – «ЗБС»), Московская область, 55.70° С, 36.73° В), в еловых и смешанных лесах на суглинистых почвах.

Подрезка корней на экспериментальных площадях в заповеднике Кивач (Глава 4) проводилась осенью 2016 года. Участки размером 1 x 2 м были огорожены от окружающей почвы листами нержавеющей стали, закопанными на глубину 0.6 м. Стенки возвышались над поверхностью почвы примерно на 5 см, поверхность почвы и «дно» монолита не нарушались. Пробы на данных площадях отбирались не ранее, чем через год после подрезки корней.

Эксперименты с углеродной меткой были проведены в Малинках и ЦЛГЗ (Глава 5) в 2017 году. В каждом лесу предварительно (в 2016 году) были выбраны и подготовлены пары экспериментальных и контрольных елей *Picea abies*, высотой около 5 м. Расстояние между контрольными и экспериментальными деревьями составляло 35-50 м. Деревья были окружены траншеями глубиной 50 см на расстоянии 2.5 м от ствола. Летом 2017 года вокруг экспериментальных деревьев были построены теплицы из пластикового каркаса (3.5 × 3.5 × 5.5 м) и плотной полиэтиленовой пленки (500 мкм). Пятнадцать литров меченого углекислого газа (99 АТ% <sup>13</sup>С-СО<sub>2</sub>, Isotop, Россия) были введены в каждую камеру с 9 до 11 часов утра безоблачным днём непосредственно после изоляции деревьев камерами. Камеры были разобраны спустя 48 часов после мечения, для наилучшей ассимиляции изотопной метки растениями (Epron et al., 2012). Пробы беспозвоночных, использованные для оценки поступления изотопной метки через мицелий микоризных грибов, отбирали следующим образом: вегетационные мешочки, размерами 12 x 12 см, изготовленные из полиэфирной ситовой ткани с размером ячеи 45-50 мкм, были заполнены 500 г почвы (0-10 см, влажность около 30%). Почва была предварительно просеяна через сито с размером ячеи 5 мм. Швы мешочков были запаяны с использованием акрилового клея UHU Creativ и термического запайщика PFS-300. Мешочки были заложены вокруг экспериментальных и контрольных деревьев на глубину 10 см. Срок экспозиции мешочков до внесения изотопной метки составил 1 год.

Дефаунирование почвы в полевых условиях (Глава 6) проводилась с использованием 2%-го водного раствора циперметрина (препарат «Клещевит Супер», Россия). Использованный в эксперименте препарат соответствует ГОСТ Р 51247-99. Почвенные монолиты (10 x 10 x 10 см) вместе с металлической рамкой помещались на металлическое сито (2 мм), вставленное в пластиковое ведро, и

насыщались раствором циперметрина под высотой столба раствора приблизительно 1 см до тех пор, пока избыток раствора не начинал сочиться с нижней стороны монолита. Контрольные монолиты были насыщены водопродонной водой аналогичным способом.

Пробы для оценки обилия и биомассы почвенных животных отбирали буром диаметром 5 см или квадратной стальной рамки (10 x 10 см) на глубину 10 см. Пробы хранили в холодильнике при +8°C не дольше 72 часов перед экстракцией. Определение беспозвоночных произведено морфологически, в том числе с привлечением специалистов по соответствующим таксономическим группам. Классификация коллембол (Rusek 2007) и орибатид (Krivolutsky et al., 1995) по жизненным формам дана в соответствии с литературными данными.

Плодовые тела были собраны маршрутным методом на соответствующих площадках. Плодовые тела трутовых грибов собирались со стволов деревьев вместе с куском древесины в месте прикрепления. Части плодовых тел, предназначенные для изотопного анализа, высушивали в сушильном шкафу при температуре 50°C в течение 48 часов. Беспозвоночные-микофаги были получены из мягких плодовых тел грибов-макромицетов (кроме трутовиков) ручным разбором под бинокулярным микроскопом. Экстракция мезо- и макрофауны из почвы или плодовых тел трутовых грибов произведена с использованием сухих эклекторов (воронки Тульгрена) с нагревом и освещением при помощи галогеновых ламп в течение 10 суток. Беспозвоночные были зафиксированы в 70%-ном этаноле.

Для получения биомассы мицелия микоризных грибов в полевых условиях использовался метод вегетационных мешочков (Wallander et al., 2001) с некоторыми модификациями (см. Главу 3). Мешочки изготовлены из полиэфирной ситовой ткани с размером ячеек 45-50 мкм. Мешочки имели размеры 6 × 6 см (Главы 3, 4 и 6) или 12 x 12 см (Глава 5), и были наполнены 20 либо 700 г прокаленного кварцевого песка соответственно.

Оценка биомассы грибного мицелия, извлеченного из вегетационных мешочков, проводилась с помощью двух методов: флотации-фильтрации (Korkama et al., 2007) (Главы 3-5) и модифицированного метода эпифлуорисцентной микроскопии (Федоров, Капкова, 2006; Tiunov, Scheu, 1999) (Глава 6).

Для оценки влияния гранулометрического состава субстрата на продукцию мицелия микоризных грибов (Глава 3) был использован кварцевый песок (98.7% SiO<sub>2</sub>) трех фракций: 0.25–0.5, 0.5–0.8 и 0.8–1.2 мм. Две экспериментальные серии были заложены в начале (июнь) и конце (сентябрь) вегетационного сезона. В рамках каждой серии сроки экспозиции составили 10, 20 и 30 суток: короткие сроки экспозиции были выбраны во избежание аккумуляции некромассы мицелия микоризных грибов в мешочках (Godbold et al., 2006; Treseder et al., 2005). Повторность для каждого варианта (сезон × срок экспозиции × фракция песка) составила 10 мешков, общее количество повторностей – 180.

При флотации-фильтрации (Korkama et al., 2007) мицелий был извлечен из песка путем встряхивания в стерильной воде в течение 5 минут и фильтрования всплывшего мицелия через нейлоновую сетку. Образцы мицелия были высушены при температуре 50°C в течение 48 часов и взвешены с точностью до 1 мкг с помощью электронных весов Mettler Toledo MX5. Для коррекции на возможное загрязнение мицелия мелкими минеральными частицами, использовалась простая математическая поправка на содержание углерода, проведенная после изотопного и элементного анализа для каждой пробы отдельно. Использована средняя величина содержания С в мицелии грибов-макромицетов, равная 40.96% (Högberg, Högberg, 2002).

При подготовке проб к оценке биомассы с помощью эпифлуоресцентной микроскопии, содержимое вегетационного мешочка помещалось в пробирку с 40 мл стерильного физиологического раствора (0.9% NaCl) и встряхивалось в течение 1 минуты. Была отобрана аликвота объемом 100 мкл и профильтрована на вакуумной установке через черный нефлуоресцирующий мембранный фильтр Whatmann Cусlorore с диаметром пор 0.22 мкм. После этого на фильтр наносился 10%-ный водный раствор красителя калькофлуора белого. Длину гиф измеряли подсчетом числа пересечений с сеткой известного шага при увеличении  $\times 400$  с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Микромед, оснащенного системой визуализации TourCam 5.1 MP. Шаг сетки составлял 20 мкм. Для каждого образца был измерен диаметр от 20 до 50 гиф (20 полей зрения) с использованием утилиты TourTek View. Для расчета объема грибного мицелия было принято среднее значение диаметра мицелия для каждого образца. При пересчете объема мицелия в биомассу использовалось среднее значение плотности грибного мицелия равное 0.001063 г/мм<sup>3</sup> (Bakken, Olsen, 1983), а также среднее содержание углерода в мицелии (Högberg, Högberg, 2002).

Изотопный анализ углерода (соотношение  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , величина  $\delta^{13}\text{C}$ ) и азота (соотношение  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) грибов, почвенных животных и растительного опада был проведен на базе ЦКП «Инструментальные методы в экологии» ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН с использованием элементного анализатора Flash 1112 и изотопного масс-спектрометра Thermo Finnigan Delta V Plus. Температурный режим окислительного реактора - 1020°C, восстановительного реактора - 650°C. В качестве стандартов были использованы казеин (изотопный стандарт, Elemental Microanalysis) и люцерна (лабораторный стандарт). Аналитическая погрешность не превышала  $\pm 0.15$  ‰. В каждой пробе было также определено процентное содержание и массовое соотношение углерода и азота (величина C/N).

Молекулярно-генетические анализы были проведены на базе Геттингенского университета, Германия и Тартусского университета, Эстония. ДНК была выделена из высушенного (50°C, 48 часов) мицелия, полученного из вегетационных мешочков с помощью набора Qiagen DNEasy PowerSoil (Qiagen, США). Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была проведена для области ITS2 (Ihrmark et

al., 2012; Tedersoo et al., 2019). Секвенирование нового поколения было проведено на платформе Illumina (2 × 250 п.н.) Генетические данные были обработаны с помощью программных пакетов gDAT (Vasar et al., 2021), FLASH v1.21, (Magoč, Salzberg, 2011) и vsearch v2.14.1, (Rognes et al., 2016) Последовательности были кластеризованы с помощью vsearch (v 2.14.1) с использованием 97% идентичности. Поиск BLAST + (v 2.8, Camacho et al., 2009) был проведен для центроидов кластеров (OTUs) с целью их таксономической аффилиации с использованием базы данных UNITE (v 8.2).

Статистическая и графическая обработка данных выполнена в программной среде R (R Core Team, 2021). Факторный анализ проводился с использованием линейных моделей, реализованных в программном пакете *lme4* (Bates et al., 2015) попарные сравнения и пост-хок тесты (Tukey-adjusted Least-squared means test / LSMeans test) выполнены в пакете *emmeans* (Lenth, 2021). Попарные сравнения выборок бинарных данных выполнены с использованием Mood's median-test (Herve 2021). Сравнения численных выборок, включающие множественные нулевые значения, проведены с использованием Pairwise Test for Multiple Comparisons of Mean Rank Sums (Nemenyi-Tests) (Pohlert, 2014). Многомерные анализы выполнены с применением MANOVA/PERMANOVA в пакетах *stats* и *dplyr* (R Core Team, 2021; Wickham, 2014), а также PCA и MDS (Kassambara, Mundt, 2020; Oksanen, Simpson, 2009). Графическая обработка данных проведена в пакетах *ggplot2* (Wickham, 2011) и *vegan* (Oksanen and Simpson, 2009).

### ГЛАВА 3. ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ОЦЕНКИ БИОМАССЫ МИЦЕЛИЯ МИКОРИЗНЫХ ГРИБОВ И ИЗОТОПНЫХ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ ТРОФИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ С ГРИБАМИ

Исследование трофических связей почвенных микофагов с микоризными грибами потребовало совершенствования ряда стандартных методов. В главе представлены результаты преимущественно методических исследований: оптимизация метода вегетационных мешочков для оценки биомассы микоризного мицелия, оценка изотопного состава разных тканей (от мицелия до гименофоров) микоризных и сапротрофных грибов, оценка трофического фракционирования изотопов азота и углерода в системе гриб-микофаг.

#### **3.1 Оптимизация гранулометрического состава субстрата для оценки биомассы мицелия микоризных грибов.**

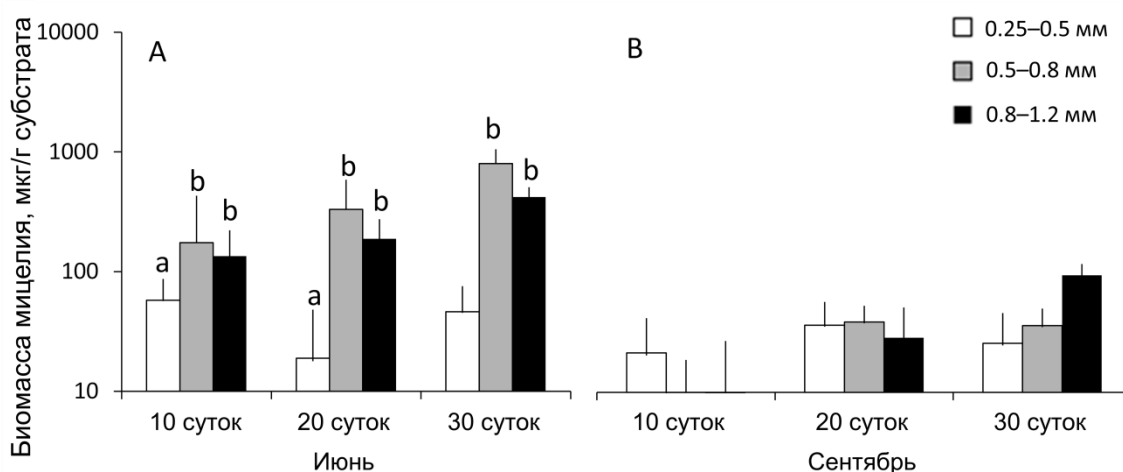
Данные о биомассе и скорости прироста мицелия необходимы для оценки потоков вещества и энергии в почвенных пищевых сетях, темпов деструкции и релокации органического и минерального вещества почвы. Мицелий эктомикоризных и сапротрофных грибов в почве невозможно различить по биохимическим маркерам (таким как спектр жирных кислот), а молекулярно-генетические методы не дают надежной количественной информации. Поэтому

наиболее популярным методом оценки биомассы мицелия микоризных грибов в полевых условиях является метод вегетационных мешочков (Chen et al., 2016; Ven et al., 2019; Wallander et al., 2001). Несмотря на свою популярность, этот метод остается плохо стандартизованным. В частности, в оригинальной методике (Wallander et al., 2001) предложен широкий диапазон фракций кварцевого песка (0.36–2.00 мм), хотя размер порового пространства субстрата может влиять на рост грибного мицелия (Otten et al., 1999; Ritz, Young, 2004).

Эксперимент по оценке влияния гранулометрического состава субстрата на продукцию мицелия микоризных грибов проведен на биостанции Малинки. Биомасса мицелия, полученная из вегетационных мешочков, была оценена с использованием флотации-фильтрации. Повторность для каждого варианта (сезон × срок экспозиции × фракция песка) составила 10 мешков, общее количество повторностей – 180.

Мицелий, полученный из вегетационных мешочков, был в подавляющем большинстве представлен микоризными грибами. Наиболее обильно были представлены микоризные грибы родов *Tomentella*, *Cortinarius*, *Thelephora* и *Amphinema* (суммарно – более 80% идентифицированных последовательностей).

Биомасса мицелия микоризных грибов зависела от всех трех исследованных факторов (сезона, срока экспозиции и размерной фракции песка; PERMANOVA,  $p < 0.05$ ). Прирост биомассы был максимален в песке фракции 0.5-0.8 мм (Рис. 3.1). Биомасса мицелия микоризных грибов в начале лета (июнь) была более чем в два раза выше, чем в начала осени (сентябрь). Прирост биомассы мицелия микоризных грибов достигал  $420 \pm 115$  (SE) мкг/г субстрата (30 суток, июнь).



**Рисунок 3.1.** Биомасса мицелия микоризных грибов (сухой вес), полученная после 10, 20 и 30 суток в июне (A) и сентябре (B). Различными цветами обозначены данные для песка фракций 0.25–0.5, 0.5–0.8 и 0.8–1.2 мм. Разными буквами обозначены статистически значимые различия (в пределах сезона, Nemenyi test,  $P < 0.05$ ). Усы показывают стандартную ошибку средней. Для каждого варианта  $n = 10$ .

Различия прироста мицелия в песке разных размерных фракций могут быть обусловлены количеством доступных почвенных пор (Elliott et al., 1980). С другой стороны, увеличение количества тонких пор и капилляров в тонкой фракции может снижать доступность субстрата за счет формирования запертых пор и Жаменовских цепочек (Arya et al., 1999; Shein, Arkhangel'skaya, 2006).

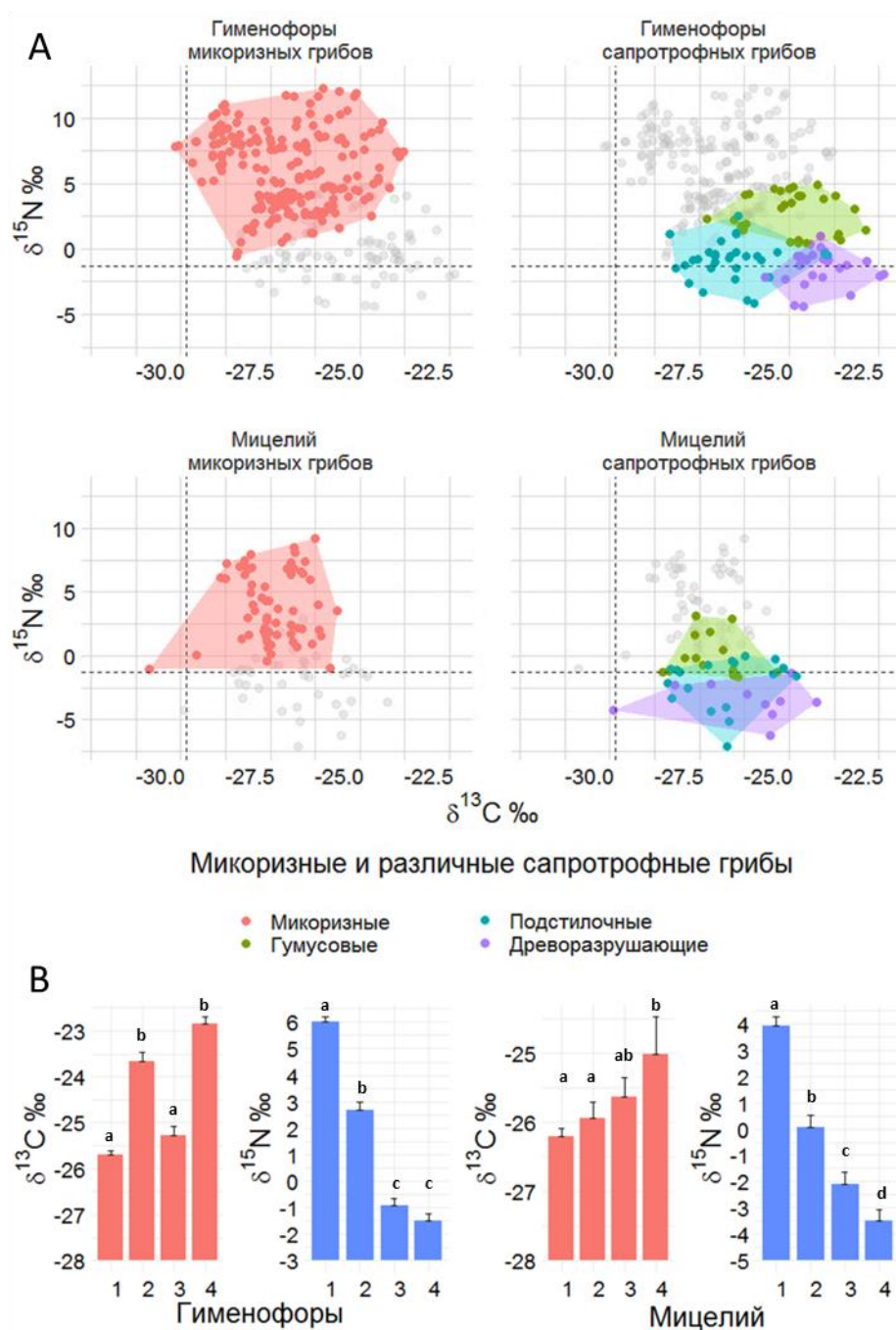
Полученная оценка биомассы мицелия микоризных грибов сопоставима с опубликованными данными. Активный рост мицелия, отмеченный в июне, соотносится с максимальными темпами развития корней и корневых волосков в весенне-летний период (Stober и др., 2000); замедление прироста мицелия в сентябре может быть обусловлено снижением количества углеводов, поступающих в корни в осенний период (Högberg et al., 2010). Изотопный и элементный состав мицелия микоризных грибов, полученного из мешочков не различался между вариантами. Средние величины  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  мицелия составили  $-27.6 \pm 0.2$  и  $3.9 \pm 0.3$  ‰, соответственно, и схожи с известными данными для микоризных грибов (см. ниже).

### **3.2 Изотопный состав углерода и азота мицелия и различных частей плодовых тел микоризных и сапротрофных грибов**

Известные данные об изотопном составе грибов получены почти исключительно при исследовании плодовых тел, хотя основную подземную биомассу составляет мицелий. Во второй части главы представлены результаты изотопного анализа мицелия, а также разных частей плодовых тел микоризных и сапротрофных макромицетов.

Материал был собран в 2010-2022 г главным образом на территории ЦЛГЗ, заповедника Кивач и хвойных лесов близ биостанции Малинки. Оценен изотопный состав углерода и азота 16 видов эктомикоризных и 8 видов сапротрофных грибов различных типов питания (подстилочные, древоразрушающие и гумусовые сапротрофы). В том числе исследован мицелий 11 видов микоризных и 5 видов сапротрофных грибов. Всего проанализированы 644 пробы.

В среднем, ткани микоризных грибов были обеднены  $^{13}\text{C}$  (LSMeans test,  $p = 0.013$ ) и обогащены  $^{15}\text{N}$  ( $p < 0.001$ ), по сравнению с тканями сапротрофных грибов. Наибольшая разница в изотопном составе микоризных и сапротрофных грибов наблюдалась в гименофорах для величины  $\delta^{15}\text{N}$ , для средних значений она достигала 7.3 ‰ (Рис. 3.2). Гименофоры микоризных грибов были в среднем на 1.5 ‰ обеднены  $^{13}\text{C}$  по сравнению с гименофорами сапротрофных грибов; различия были значимы для древоразрушающих и гумусовых, но не для подстилочных сапротрофных грибов.



**Рисунок 3.2.** Изотопный состав углерода ( $\delta^{13}\text{C}$ ) и азота ( $\delta^{15}\text{N}$ ) мицелия и гименофоров микоризных и разных трофических групп сапротрофных грибов. (А) Контурами показаны отдельные трофические группы грибов. Серые точки показывают всю выборку. Пунктирными линиями обозначен средний изотопный состав опада. (В) Сравнение средних величин  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  эктомикоризных грибов (1) и гумусовых (2), подстилочных (3) и древоразрушающих (4) сапротрофов. Буквами обозначены статистически значимые различия (LSMeans test).

Мицелий микоризных грибов был более чем на 3 ‰ обеднен  $^{13}\text{C}$  по сравнению с мицелием древоразрушающих сапротрофных грибов (LSMeans test,  $p = 0.007$ ), однако не отличался по изотопному составу углерода от мицелия

гумусовых или подстилочных сапротрофов. Средние величины  $\delta^{15}\text{N}$  мицелия сапротрофных грибов были на 5.5 - 9.5 ‰ ниже, чем у микоризного мицелия ( $p < 0.001$ ). Мицелий гумусовых сапротрофов был значимо обогащен  $^{15}\text{N}$  по сравнению с древоразрушающими и подстилочными сапротрофами ( $p < 0.003$ ).

Несмотря на достоверные различия средних величин и выраженное накопление  $^{15}\text{N}$ , микоризный мицелий не всегда можно надежно отличить по изотопному составу от мицелия сапротрофных грибов, особенно гумусовых сапротрофов (рис. 3.2). Схожесть изотопного состава некоторых микоризных грибов с гумусовыми сапротрофами может быть обусловлена освоением обогащенного  $^{15}\text{N}$  пула азота в относительно глубоких (до нескольких десятков см) горизонтах почвы (Шубин, 2000; Agerer, 2001). Следовательно, доказательство трофических связей микофагов с микоризным мицелием с помощью изотопного анализа требует дополнительных экспериментальных манипуляций (см. следующие главы).

### **3.3 Определение величин трофического фракционирования стабильных изотопов углерода и азота у грибоядных беспозвоночных**

Изотопный состав углерода и азота тканей беспозвоночных широко используется для реконструкции почвенных пищевых сетей, а также для выявления в них конкретных пар пища – потребитель (Тиунов, 2007; Potapov et al., 2019). Изотопный состав консументов отражает изотопный состав их диеты, однако в трофических цепях происходит небольшое накопление тяжелых изотопов, так называемое «трофическое фракционирование» (обычно обозначается как  $\Delta^{13}\text{C}$  и  $\Delta^{15}\text{N}$ ). Величина  $\Delta^{15}\text{N}$  в пастбищных пищевых сетях составляет в среднем 2–4‰, величина  $\Delta^{13}\text{C}$  0.5–1.0‰ (Martínez Del Rio et al., 2009). От верного определения величины трофического фракционирования зависят успех реконструкции трофических связей, а также точность оценки ключевых количественных параметров всей пищевой сети. Плодовые тела макромицетов и потребляющие их беспозвоночные могут быть удобной моделью для оценки степени трофического фракционирования стабильных изотопов углерода и азота в системе грибы–микофаги.

Плодовые тела микоризных и сапротрофных грибов и населяющие их беспозвоночные были отобраны в 2016-2022 г. на территории ЦЛГЗ, заповедника Кивач, хвойных лесов близ биостанции Малинки и ЗБС. Специализация представленных в работе таксонов беспозвоночных животных на питании грибами известна преимущественно из литературных данных. В отдельных случаях, непосредственное потребление беспозвоночными тканей грибов было отмечено визуально при сборе плодовых тел.

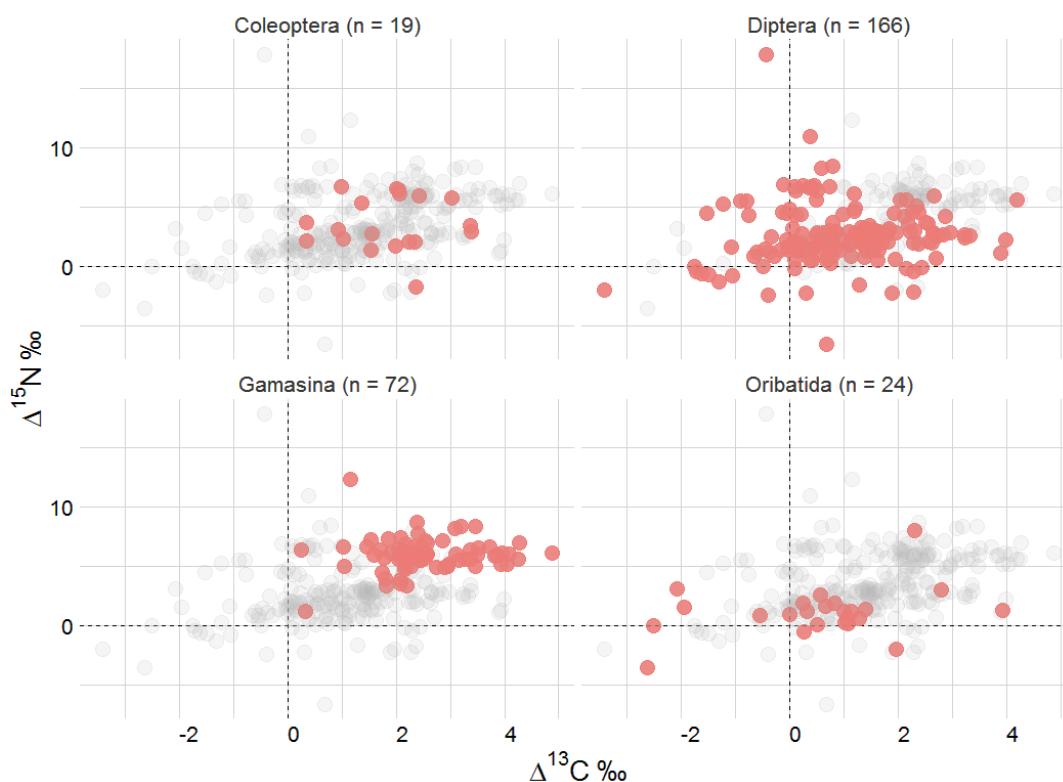
Трофическое фракционирование стабильных изотопов углерода и азота оценено для 17 семейств беспозвоночных, принадлежащих к шести отрядам (Coleoptera, Collembola, Diptera, Gamasina, Isopoda и Oribatida). Наиболее обильны в



плодовых телах грибов были двукрылые (10 семейств), личинки которых являются специализированными микофагами. Всего проанализировано 284 пары образцов гриб-микофаг.

В среднем, ткани исследованных беспозвоночных-микофагов были обогащены  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  по сравнению с тканями плодовых тел макромицетов на  $1.4 \pm 1.4$  и  $3.5 \pm 2.8$  ‰, соответственно (Рис. 3.3). Наибольшие средние величины  $\Delta^{13}\text{C}$  и  $\Delta^{15}\text{N}$  отмечены у гмазовых клещей *Hoploseius oblongus* ( $2.5 \pm 0.9$  ‰ и  $6.0 \pm 1.4$  ‰, соответственно). Рассчитанная площадь изотопной ниши беспозвоночных-микофагов составила  $32.52$  ‰<sup>2</sup>, ширина ниши по величине  $\Delta^{13}\text{C}$  и  $\Delta^{15}\text{N}$  составила 4.5 и 9.1 ‰ соответственно.

Полученные оценки средних величин  $\Delta^{13}\text{C}$  и  $\Delta^{15}\text{N}$  соответствуют величинам, наблюдаемым в пастбищных и детритных пищевых цепях (Тиунов, 2007) и были использованы в других частях нашего исследования.



**Рисунок 3.3.** Трофическое фракционирование стабильных изотопов углерода ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) и азота ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) у наиболее обильных микофагов - представителей различных отрядов беспозвоночных. Серым цветом обозначена вся выборка. В скобках приведено количество проб отдельных таксонов. Пунктирными линиями показан изотопный состав тканей грибов.

#### ГЛАВА 4. ВЫЯВЛЕНИЕ ПОЧВЕННЫХ КОЛЛЕМБОЛ, ТРОФИЧЕСКИ СВЯЗАННЫХ С МИЦЕЛИЕМ МИКОРИЗНЫХ ГРИБОВ, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ С ПОДРЕЗКОЙ КОРНЕЙ

В главе представлены результаты полевого эксперимента, который предусматривал изоляцию экспериментальных площадок от корней деревьев и последующую оценку изменений структуры сообщества и изотопного состава коллембол. Исследование проведено на территории заповедника Кивач в 70-летнем и 180-летнем брусничных сосняках. Биомасса мицелия микоризных грибов оценена с использованием вегетационных мешочков и флотации-фильтрации. Коллемболы с экспериментальных и контрольных площадок были отобраны (4 пробы внутри и 4 снаружи каждой площадки) спустя 1, 2 и 3 года после изоляции площадок (всего 120 проб). Для 13 наиболее обильных видов проведен изотопный анализ. В зависимости от размера коллембол, одна проба для изотопного анализа включала от 1 до 225 особей одного вида. Всего проанализировано 206 проб коллембол и 48 проб мицелия грибов.

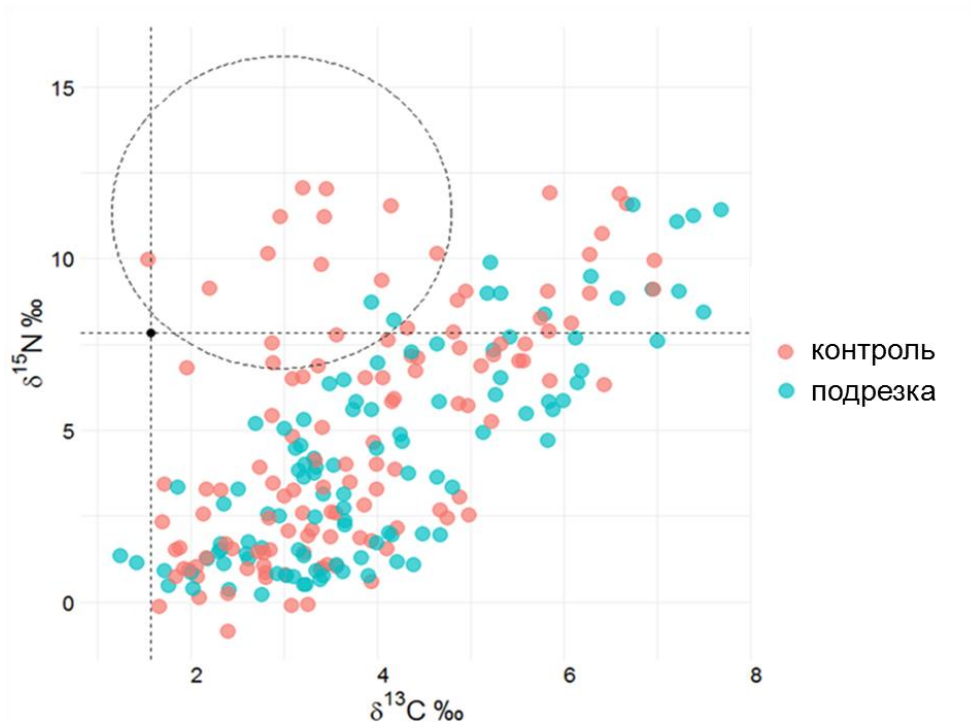
Биомасса мицелия микоризных грибов спустя 1 год с момента подрезки корней была примерно в три раза ниже на экспериментальных площадках, по сравнению с контролем (0.7-0.8 против 1.4-1.9 мкг С на / г субстрата; LSMean test  $p < 0.005$ ). Биомасса мицелия микоризных грибов в молодом и перестойном сосняках не различалась.

Сообщества коллембол было представлено 25 видами, из которых 22 были общими для молодого и перестойного сосняков. Доминантные виды в двух лесах совпадали и были представлены *Isotomiella minor*, *Friesea mirabilis*, *Micraptorura absoloni*, *Parisotoma notabilis* и *Willemia anophthalma*. Подрезка корней деревьев не привела к статистически значимому снижению общей численности коллембол, однако численность отдельных видов снижалась в 70-летнем сосняке. В частности, численность *W. anophthalma* после подрезки корней сократилась  $19395 \pm 8928$  до  $658 \pm 222$  инд./м<sup>2</sup> (LSMeans test,  $p < 0.001$ ), *Mesaptorura yosiii* – с  $8608 \pm 3000$  до  $89 \pm 38$  инд./м<sup>2</sup> ( $p = 0.058$ ).

Результаты PERMANOVA показали значимое влияние возраста леса ( $F = 4.25$ ,  $p = 0.001$ ), но не подрезки корней на структуру сообщества коллембол, однако влияние взаимодействия факторов было достоверным ( $F = 1.78$ ,  $p = 0.048$ ). Анализ сообществ методом главных компонент показал, что основной вклад (около 83% описанной дисперсии) в различия между сообществами экспериментальных и контрольных площадок внесли изменения обилия *I. minor* и *W. anophthalma*.

Изотопный состав мицелия микоризных грибов, собранного с использованием вегетационных мешочков, не изменился после подрезки корней. Средние величины  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  мицелия составили около  $-27.2$  и  $3.6$  ‰, соответственно. Напротив, величины  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  значимо (MANOVA,  $F_{2,223} = 7.792$ ;  $p < 0.001$ ) различались у

коллембол с экспериментальных и контрольных площадок (Рис. 4.1). Возраст леса не влиял на изотопный состав мицелия или коллембол.



**Рисунок 4.1.** Изотопный состав (нормированные на опад величины  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$ ) коллембол в эксперименте. Объединенные данные из лесов разного возраста. Черной точкой и прямыми пунктирными линиями обозначены средние величины изотопного состава мицелия микоризных грибов. Пунктирный эллипс описывает ожидаемую изотопную нишу беспозвоночных-микофагов (Глава 3.3) при питании микоризным мицелием.

Изотопный состав азота и углерода, соответствующий изотопному составу предполагаемых потребителей мицелия эктомикоризных грибов (см. главу 3, показан на Рис. 4.1 пунктирным эллипсом) был обнаружен почти исключительно в пробах коллембол из контрольных площадок и только в двух пробах коллембол с экспериментальных площадок. Коллемболы, изотопный состав которых указывал на питание мицелием микоризных грибов, были представлены *F. mirabilis* (5 проб), *I. minor* (2), *M. absoloni* (4), *Neanura muscorum* (3) и *W. anophthalma* (7 проб). *F. mirabilis* и *M. absoloni* имели изотопный состав, присущий потребителям микоризного мицелия, как на контрольных, так и, единично, – на экспериментальных площадках, остальные три вида коллембол – только на контрольных площадках. Значимые различия величин  $\delta^{15}\text{N}$  при подрезке корней показаны только для двух эуэдафических видов – *I. minor* (LSMeans test,  $p = 0.003$ ) и *W. anophthalma* ( $p < 0.001$ ).

Сокращение численности и изменение изотопных ниш отдельных эуэдафических видов коллембол при подрезке корней указывает на их

трофическую связь с мицелием микоризных грибов. Однако лишь небольшая часть почвенных и подстилочных коллембол отреагировала на подрезку корней, сопровождавшуюся угнетением мицелия микоризных грибов. Это говорит об ограниченной значимости мицелия микоризных грибов в питании почвенных коллембол. Наши результаты согласуются с данными более ранних экспериментов. Как правило, подрезка корней приводит к уменьшению обилия лишь немногих видов коллембол, включая *Mesaphorura macrochaeta*, *Anurida granaria* и *P. notabilis* (Malmström, Persson, 2011), а также *W. anophthalma* и *M. yosiii* (Siira-Pietikäinen et al., 2001, 2003). В нашем эксперименте численность *M. yosiii* и *W. anophthalma* сократилась после подрезки корней только в молодом (70-летнем) сосняке. Это может быть связано с изменениями обилия и состава сообщества микоризных грибов с увеличением возраста насаждений (Hagenbo et al., 2018) и указывать на относительно большую роль мицелия микоризных грибов в питании почвенных коллембол в молодых лесах.

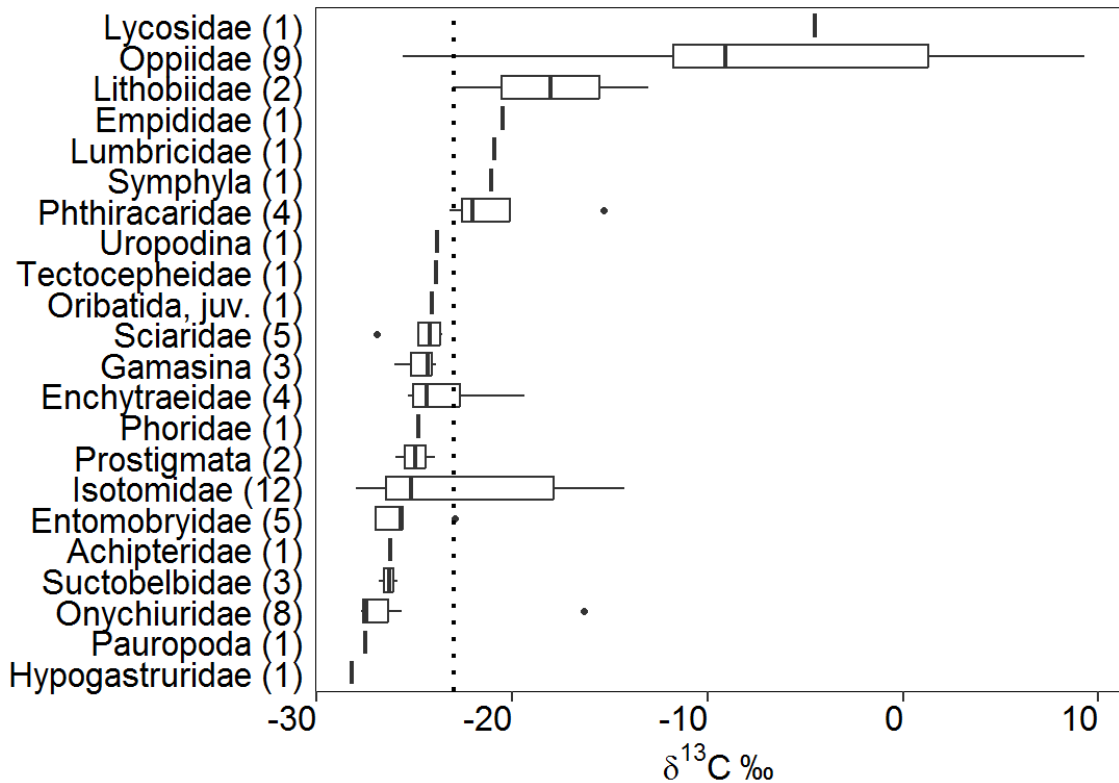
## ГЛАВА 5. ВЫЯВЛЕНИЕ ТРОФИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ ПОЧВЕННЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ С МИЦЕЛИЕМ МИКОРИЗНЫХ ГРИБОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УГЛЕРОДНОЙ МЕТКИ ( $^{13}\text{C}$ )

В главе представлены объединенные результаты двух полевых экспериментов, в которых поступление углерода от корней и микоризных окончаний к почвенным животным было прослежено с помощью искусственной изотопной метки. Полевые эксперименты были проведены в еловых лесах ЦЛГЗ и близ биостанции Малинки. Мечение мицелия микоризных грибов было произведено путем ассимиляции  $^{13}\text{CO}_2$  растениями-хозяевами (*Picea abies*). Почвенные беспозвоночные были изолированы от корней растений мелкоячеистой сеткой (46 мкм), что делало возможным получение ими  $^{13}\text{C}$  метки преимущественно через мицелий микоризных грибов.

Мицелий, полученный из вегетационных мешочков, был более чем на 93% (по количеству аффилированных в NCBI прочтений) представлен микоризными грибами. Наиболее обильно были представлены микоризные грибы родов *Tylospora* (34.1% всех прочтений), *Amphinema* (27.3%), *Tomentella* (7.9%), *Lactarius* (4.1%), *Wilcoxina* (3.4%), и *Russula* (0.7%). Величины  $\delta^{13}\text{C}$  мицелия микоризных грибов были значимо (LSMeans test,  $p < 0.001$ ) выше на экспериментальных площадках, по сравнению с контролем. Трансфер обогащенных  $^{13}\text{C}$  углеводов от растений-хозяев к мицелию микоризных грибов произошел в относительно короткие сроки (две недели); однако мицелий микоризных грибов был полностью помечен только через 45 дней после внесения метки. Самые высокие величины  $\delta^{13}\text{C}$  ( $-3.3 \pm 14.6$  ‰, максимум 10.5 ‰) в мицелии были показаны на 15-й день после мечения, а затем немного снизились. Это хорошо соответствует модели однократного поступления углеводов из корней растения-хозяина к мицелию

микоризных грибов и их дальнейшего распределения по сети мицелия (Le Tacon et al., 2013).

Почвенные беспозвоночные, получившие  $^{13}\text{C}$  метку через мицелий микоризных грибов, принадлежали к 11 таксономическим группам, включая три семейства коллембол (*Isotomidae*, *Entomobryidae*, *Onychiuridae*) и два семейства панцирных клещей (*Opriidae*, *Phthiracaridae*). В целом,  $^{13}\text{C}$  метка была обнаружена в 35.2% проб почвенных беспозвоночных. Изотопная метка была отмечена и у хищных беспозвоночных – пауков, литобиид, а также хищных личинок двукрылых семейства *Empididae* (Рис. 5.1). Это свидетельствует о поступлении «микоризного» углерода от микофагов на более высокие уровни почвенных пищевых сетей.

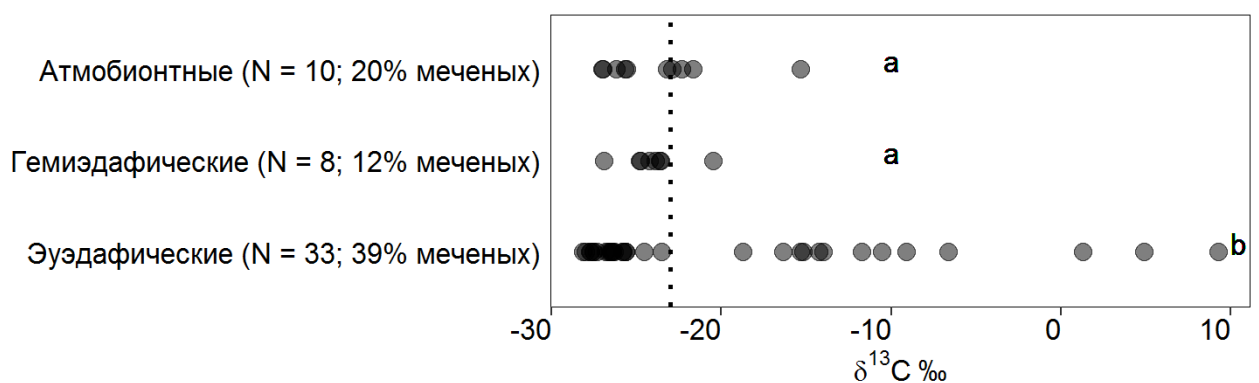


**Рисунок 5.1** Изотопный состав углерода ( $\delta^{13}\text{C}$ , ‰) тканей почвенных беспозвоночных. Показаны медианы (вертикальные линии), межквартильный размах (коробочки) и 95% доверительные интервалы (усы). Вертикальная пунктирная линия показывает пороговую природную величину  $\delta^{13}\text{C}$  (-23.0 ‰, Goncharov et al., 2016). В скобках приведены размеры выборок.

Несмотря на то, что изотопная метка была обнаружена в пробах 3 из 4 семейств коллембол, доля меченых проб была, в целом, невысока. Чаще всего (25 % меченых проб) были помечены коллемболы семейства *Isotomidae*. Такой характер распределения метки подтверждает отмечавшийся ранее (Fujii et al. 2021) оппортунистический характер питания микофагов мицелием микоризных грибов. Среди панцирных клещей метка была отмечена у семейств *Opriidae* (100% проб) и

Phthiracaridae (25% проб), однако более близкие к естественным медианные значения  $\delta^{13}\text{C}$  предполагают меньшую роль микоризных грибов в питании Phthiracaridae.

Почвенные беспозвоночные, имеющие разные жизненные формы имели разную интенсивность  $^{13}\text{C}$  метки (Mood's median test;  $\chi^2 = 22.7$ ,  $p < 0.001$ ). Гемиедафические беспозвоночные были помечены реже (12%), чем эуэдафические (~ 40%) и атмобионтные (20% меченых проб) беспозвоночные. Средние величины  $\delta^{13}\text{C}$  эуэдафических беспозвоночных были более чем на 4 ‰ выше, чем у представителей других жизненных форм (Рисунок 5.2), что также свидетельствует о более интенсивном питании эуэдафических беспозвоночных мицелием микоризных грибов.



**Рисунок 5.2.** Величины  $\delta^{13}\text{C}$  почвенных беспозвоночных разных жизненных форм в эксперименте с изотопной меткой. Вертикальная пунктирная линия отображает принятое пороговое значение природной величины  $\delta^{13}\text{C}$ . Разными буквами отмечены статистически достоверные различия между группами (Mood's median test,  $p < 0.05$ ).

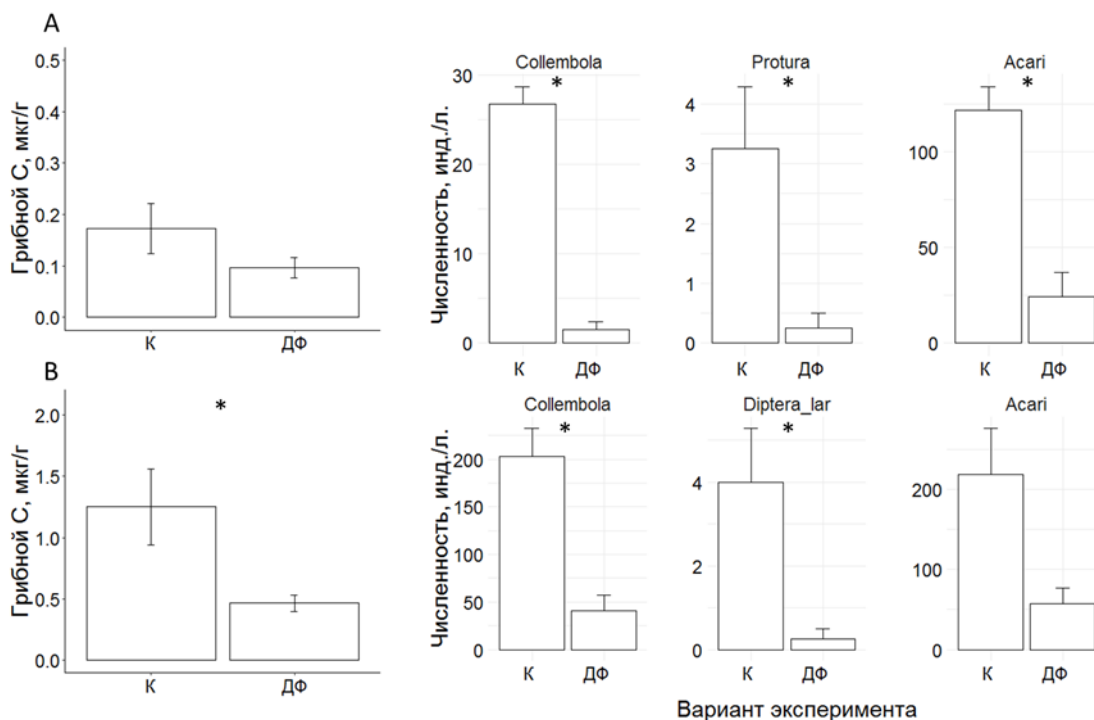
Наличие более интенсивной  $^{13}\text{C}$  метки в тканях эуэдафических беспозвоночных демонстрирует большую важность мицелия микоризных грибов как пищевого ресурса в минеральной почве, по сравнению с гумусовым горизонтом и подстилкой. Состав грибного сообщества существенно меняется в почвенном профиле; сапротрофные микромицеты населяют преимущественно верхние слои почвы и подстилку, в то время как микоризные грибы присутствуют как в гумусовых, так и в минеральных горизонтах (Clemmensen et al. 2013). Как следствие, питание мицелием микоризных грибов более характерно для почвенных беспозвоночных, обитающих преимущественно в минеральной почве. Этот вывод хорошо согласуется с результатами эксперимента, представленного в Главе 4.

## ГЛАВА 6. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПОЧВЕННЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ НА ПРИРОСТ МИЦЕЛИЯ МИКОРИЗНЫХ ГРИБОВ

В главе описаны изменения в приросте биомассы мицелия микоризных грибов в хвойных лесах при экспериментальном снижении обилия почвенных беспозвоночных. Полевые эксперименты проведены в ельнике-кисличнике, расположенном в ЦЛГЗ и сосняке беломошном на территории заповедника Кивач. В каждом лесу были заложены четыре экспериментальные площадки. На каждой площадке три почвенных монолита объемом 1 л (10×10×10 см) были обработаны 2% раствором циперметрина (пиретроид II поколения, согласно опубликованным данным не оказывает существенного влияния на активность грибов). Три контрольных монолита были обработаны водой. Почвенные монолиты были изолированы от окружающей почвы сеткой из нержавеющей стали; размер ячеек (50 мкм) препятствует прорастанию корней деревьев и проникновению большинства почвенных беспозвоночных, но мицелий грибов мог свободно проникать внутрь монолитов. Биомасса мицелия микоризных грибов была оценена с использованием вегетационных мешочков (были заложены как внутри изолированных монолитов, так и в окружающую почву) и модифицированного метода эпифлуорисцентной микроскопии. Срок экспозиции монолитов составил 30 суток для заповедника Кивач и 90 суток – для Центрально-Лесного Заповедника. По три контрольные почвенные пробы были извлечены с каждой площадки одновременно с изъятием изолированных сеткой монолитов.

Влияние изоляции почвы металлической сеткой на почвенные сообщества было оценено по сравнению с окружающей почвой (внешний контроль, ВК). Численность наиболее обильных групп почвенной мезофауны (коллемболы, клещи, личинки двукрылых), а также большинства других групп беспозвоночных не различалась между контрольными монолитами и окружающей почвой. В 30-суточном эксперименте показано значимое (ANOVA,  $p = 0.033$ ) снижение обилия протур, а в 90-суточном эксперименте значимое снижение численности было отмечено только у перепончатокрылых. Биомасса мицелия микоризных грибов также не различалась между контрольными монолитами и окружающей почвой, хотя прирост биомассы мицелия за 90 суток был почти на порядок выше, чем в 30-суточном эксперименте (ANOVA,  $p < 0.001$ ). Таким образом, изоляция почвенных монолитов стальной сеткой почти не повлияла на почвенные сообщества.

Обработка почвенных монолитов циперметрином привела к сильному сокращению обилия животных, особенно выраженному в 30-суточном эксперименте (заповедник Кивач). Численность клещей, коллембол и протур снизилась в 19, 6 и 10 раз, соответственно, по сравнению с контрольными монолитами (LSMeans test,  $p < 0.05$ ). В 90-суточном эксперименте численность коллембол сократилась в 3 раза ( $p < 0.05$ ), личинок двукрылых – более чем в 20 раз ( $p < 0.05$ ), клещей – в 4 раза ( $p = 0.08$ , Рис. 6.1).



**Рисунок 6.1.** Биомасса мицелия микоризных грибов (мкг С на г песка) и численность почвенных беспозвоночных в экспериментах с дефаунированием почвы. Представлены данные краткосрочного (А - 30 сут., Кивач) и долгосрочного (В - 90 сут., ЦЛГЗ) экспериментов. Приведены средние величины (столбики) и 1 SE (усы). Варианты эксперимента: К – контрольные монолиты, ДФ – дефаунированные монолиты. Звездочки (\*) указывают на значимые различия между экспериментом и контролем (LSMeans test,  $p < 0.05$ ).

Биомасса мицелия микоризных грибов составляла от 0.14 (в экспериментальных мезокосмах) до 4.98 мг С / г субстрата (в контроле) и была в основном представлена септированным мицелием, характерным для эктомикоризных грибов. Биомасса мицелия микоризных грибов значимо не различалась между дефаунированными и контрольными монолитами в 30-суточном эксперименте. В 90-суточном эксперименте биомасса мицелия в дефаунированных монолитах была ниже, чем в контрольных (LSMeans test;  $p = 0.011$ ).

Таким образом, вопреки нашим ожиданиям, снижение численности почвенных беспозвоночных не привело к увеличению биомассы (или скорости прироста) микоризного мицелия. Напротив, биомасса мицелия снизилась в дефаунированных монолитах. Прямое влияние относительно нестойкого инсектицида-пиретроида на почвенные грибы маловероятно, тем более на протяжении 90-суточного эксперимента. Возможно, снижение обилия мицелия связано с явлением компенсаторного роста, т.е стимуляции роста и ветвление



мицелия в ответ на поедание микофагами (Crowther, A'Beare, 2012). Хищные беспозвоночные, поедающие микофагов, также могут косвенно стимулировать рост грибного мицелия (Crowther et al., 2012), однако в нашем эксперименте хищники были более подвержены действию циперметрина, чем потенциальные микофаги. В целом, отсутствие выраженной стимуляции роста мицелия при снижении обилия беспозвоночных подтверждает предположение о низкой трофической активности почвенной мезофауны в отношении микоризных грибов (Bluhm et al., 2019; Potapov, Tiunov, 2016).

## ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований усовершенствованы методы получения биомассы микоризных грибов. Молекулярно-генетическими методами подтверждено, что в собранном с использованием методики вегетационных мешочков мицелии доминируют микоризные грибы. Уточнены различия в изотопном составе между различными тканями (гименофоры, ножки и мицелий) микоризных и сапротрофных грибов. Величины трофического фракционирования стабильных изотопов углерода и азота, определенные для большой выборки беспозвоночных животных, позволили определить параметры изотопной ниши микофагов. В серии полевых манипуляционных экспериментов в комбинации с широким использованием изотопного анализа углерода и азота, а также изотопной метки, достоверно показано, что мицелий эктомикоризных грибов потребляется различными группами почвенных беспозвоночных. Питание микоризными грибами впервые показано для эуэдафических коллембол семейства Nurogastruridae (род *Willemia*) и панцирных клещей семейства Phthiracaridae, а также некоторых представителей макрофауны. Таким образом, существенно расширен список таксонов, для которых установлено питание микоризными грибами. Подтверждено отмеченное ранее питание микоризными грибами некоторых коллембол (Collembola: Isotomidae) и панцирных клещей (Oribatida: Oribiidae). Более того, установлено, что получаемая от микоризных грибов энергия передается на более высокие трофические уровни детритной пищевой сети. Тем не менее, прямой эксперимент, проведенный в двух типах леса, не подтвердил существенного влияния снижения численности почвенных беспозвоночных на обилие микоризного мицелия. Это еще один аргумент, подтверждающий в общем относительно низкую интенсивность трофических связей почвенных микофагов с эктомикоризными грибами. Таким образом, несмотря на своё обилие, мицелий микоризных грибов представляют собой специфический пищевой ресурс, осваиваемый только отдельными группами почвенных беспозвоночных. Причины и механизмы низкой доступности, малой пищевой привлекательности или высокой эффективности защиты мицелия эктомикоризных грибов пока остаются неясными.

## ВЫВОДЫ

1. Использование кварцевого песка с гранулометрическим составом 0.5 – 1.2 мм наиболее эффективно для получения мицелия микоризных грибов в природных условиях. Прирост мицелия наиболее активен в начале вегетационного сезона. Мицелий, проникающий в вегетационные мешочки, представлен таксонами, образующими эктомикоризу, что подтверждено молекулярно-генетическими методами.

2. Различия в изотопном составе (прежде всего повышенное содержание  $^{15}\text{N}$  в тканях микоризных грибов) позволяют дифференцировать потоки вещества, поступающего в почвенные пищевые сети через мицелий микоризных и сапротрофных грибов.

3. Впервые определены параметры изотопной ниши для грибоядных беспозвоночных животных, населяющих плодовые тела микоризных и сапротрофных грибов. В среднем, грибоядные беспозвоночные обогащены  $^{13}\text{C}$  на 1.4 ‰ и  $^{15}\text{N}$  – на 3.5 ‰ по сравнению с грибами, что близко к обычно наблюдаемым величинам трофического обогащения консументов в пищевых сетях.

4. Впервые установлены систематические трофические связи эуэдафических коллембол семейства Hurogastruridae (род *Willemia*) и панцирных клещей семейства Phthiracaridae с мицелием микоризных грибов. Подтверждено питание мицелием микоризных грибов некоторых коллембол семейств Isotomidae и Onychiuridae, панцирных клещей семейства Oppiidae, а также включение микоризного мицелия в рацион почвенных олигохет. Обнаружение «микоризного» углерода в тканях почвенных хищников (пауки, литобииды) подтверждает поступление углерода, полученного микофагами с мицелием микоризных грибов, на более высокие трофические уровни почвенных пищевых сетей.

5. Несмотря на наличие таксонов почвенных беспозвоночных, регулярно потребляющих мицелий микоризных грибов, интенсивность трофических связей почвенных микофагов с эктомикоризными грибами невелика. В условиях полевых экспериментов снижение обилия мицелия микоризных грибов не приводит к существенным перестройкам структуры сообщества почвенных беспозвоночных, а снижение численности почвенных беспозвоночных не приводит к повышению обилия микоризного мицелия.

**Публикации по теме диссертации****Статьи в журналах, рекомендованных ВАК**

1. **Zuev A.G.**, Khmeleva M.V., Tiunov A.V. Collecting fungal mycelium using in-growth mesh bags: Effects of the sand particle size and seasonality // *Pedobiologia*. 2019. V. 77. Art. 150591.
2. **Зуев А.Г.**, Розанова О.Л., Цуриков С.М., Панченко П.Л., Ершова М.А., Смолярова Д.Д., Кривошеина М.Г., Александрова А.В., Ивницкий С.Б., Малеева Ю.В., Тиунов А.В. Трофическое фракционирование изотопов углерода и азота ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) грибоядными личинками двукрылых // *Известия Российской академии наук. Серия биологическая*. 2019. Т. 5. №. 5. С. 485–494.
3. **Зуев А.Г.** Микромицеты гифосферы макромицетов: фракционирование стабильных изотопов ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) и структура сообщества // *Микология и фитопатология*. 2020. Т. 54. №. 2. С. 79–85.
4. Kudrin A.A., **Zuev A.G.**, Taskaeva A.A., Konakova T.N., Kolesnikova A.A., Gruzdev I.V., Gabov D.N., Yakovleva E.V., Tiunov A.V. Spruce girdling decreases abundance of fungivorous soil nematodes in a boreal forest // *Soil Biology and Biochemistry*. 2021. V. 155. Art. 108184.
5. Potapov A.M., Rozanova O.L., Semenina E.E., Leonov V.D., Belyakova O.I., Bogatyreva V.Yu., Degtyarev M., Esaulov A.S., Korotkevich A.Yu., Kudrin A.A., Malysheva E.A., Mazei Yu.A., Tsurikov S.M., **Zuev A.G.**, Tiunov A.V. Size compartmentalization of energy channeling in terrestrial belowground food webs // *Ecology*. 2021. V. 102. Art. e03421.
6. **Зуев А.Г.**, Акулова А.Ю., Зуева А.И. Дефаунирование почвы циперметрином в полевых экспериментах и его влияние на продукцию мицелия микоризных грибов // *Экология*. 2022. №. 5. С. 362–369.
7. **Зуев А.Г.**, Зуева А.И. Фракционирование изотопов углерода и азота ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) макромицетами верхового олиготрофного болота «Старосельский мох» // *Вестник Московского Университета, сер. 17. Почвоведение*. 2022. №. 4. С. 69–75.
8. **Zuev A.G.**, Krivosheina M.G., Leonov V.D., Öpik M., Vasar M., Saraeva A.K., Tiunov A.V., Goncharov A.A. Mycorrhiza-feeding soil invertebrates in two coniferous forests traced with  $^{13}\text{C}$  labelling // *Mycorrhiza*. 2023. V. 33. P. 59–68.
9. **Zuev A.G.**, Kudrin A.A., Leonov V.D., Saraeva A.K., Tsurikov S.M., Tiunov A.V. Good shelter, bad food: invertebrates inhabiting fruiting bodies of spring ascomycetes in a mixed forest // *Russian Journal of Ecology*. 2023. V. 54. №. 4. P. 307–310.
10. **Zuev A.G.**, Potapov M.B., Tiunov A.V., Saraeva A.K. Root trenching and stable isotope analysis uncover trophic links of euedaphic Collembola species to mycorrhizal mycelium in pine forests // *European Journal of Soil Biology*. 2023. V. 118. Art. 103519.

**Тезисы и материалы конференций**

1. **Зуев А.Г.** Возрастная динамика изотопного состава ( $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ ) эктомикоризных грибов / Почвоведение – мост между науками. Материалы международной научной конференции «XXI Докучаевские молодежные чтения». Санкт-Петербург. Издательство СПбГУ. 2018. С. 322–323.
2. **Зуев А.Г.**, Кудрин А.А. Влияние эксперимента с подрезкой флоэмы (girdling) и подрезки эрикоидов на почвенное дыхание / Здоровые почвы – гарант устойчивого развития. Материалы научно-практической конференции. Курск. Курский государственный университет. 2018. С. 63–65.
3. Кудрин А.А., Таскаева А.А., Колесникова А.А., Конакова Т.Н., **Зуев А.Г.** Корневые выделения как фактор регуляции обилия и структуры почвенной фауны в бореальном лесу / Материалы XVIII Всероссийского совещания по почвенной зоологии. Москва. КМК. 2018. С. 115–116.
4. Сараева А.К., **Зуев А.Г.** Влияние угнетения корней и микоризы на сообщества коллембол в почве / Материалы XVIII Всероссийского совещания по почвенной зоологии. Москва. КМК. 2018. С. 177–178.
5. **Зуев А.Г.**, Морозова А.И., Белов А.А. Проверка микробиологической стерильности внутренних полостей плодовых тел некоторых макромицетов / Актуальные проблемы биоразнообразия и природопользования. Материалы II Национальной научно-практической конференции, посвященной 20-летию кафедры экологии моря ФГБОУ ВО «КГМУ». Керчь. ИТ «АРИАЛ». 2019. С. 53–56.
6. **Зуев А.Г.** Встречаемость личинок грибоядных двукрылых на плодовых телах грибов в хвойных лесах / Окружающая среда: комфортность и экологическая безопасность. Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции. Курск. Курский государственный университет. 2021. С. 141–146.
7. **Зуев А.Г.**, Макарова О.Л. Структура трофических сетей беспозвоночных, населяющих трутовые грибы *Fomitopsis pinicola* / Актуальные проблемы биологии и экологии. Материалы XXVIII Всероссийской молодежной научной конференции. Сыктывкар. Коми научный центр УрО РАН. 2021. С. 39–41.
8. **Zuev A.** Fungal mycelium growth: effects of the sand particle size / Abstract book of the European Geosciences Union General Assembly. Vienna, Austria. 2022. Art. EGU-1418.
9. **Зуев А.Г.**, Акулова А.Ю., Зуева А.И. Влияние дефаунирования почвы циперметрином на продукцию мицелия микоризных грибов / Биота, генезис и продуктивность почв. Материалы XIX Всероссийского совещания по почвенной зоологии. Улан-Удэ. Бурятский научный центр СО РАН. 2022. С. 88–89.