

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.54.1>

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ КОММЕРЧЕСКОГО МИЦЕЛИЯ ТРЮФЕЛЕВЫХ ГРИБОВ

Научная статья

Шелковникова В.Н.¹, Дмитриева М.Е.², Малыгина Е.В.³, Иמידоева Н.А.⁴, Моргунова М.М.⁵, Шашкина С.С.⁶,
Бельшенко А.Ю.⁷, Власова А.А.⁸, Тельнова Т.Ю.⁹, Баталова А.А.¹⁰, Вавилина Т.Н.¹¹, Коновалов А.С.¹², Аксёнов-
Грибанов Д.В.^{13,*}¹ ORCID : 0000-0002-4411-7521;² ORCID : 0000-0002-9229-1954;³ ORCID : 0000-0002-2673-0226;⁴ ORCID : 0000-0002-6327-5517;⁵ ORCID : 0000-0002-7939-1432;⁶ ORCID : 0000-0002-3378-5671;⁹ ORCID : 0000-0003-2606-3766;¹³ ORCID : 0000-0003-2020-6084;^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13} Иркутский государственный университет, Иркутск, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (denis.axengri[at]gmail.com)

Аннотация

Целью работы являлся метагеномный анализ коммерческого мицелия трюфельных грибов, производимого и распространяемого в России. Материалом исследования послужил коммерческий мицелий шести видов: *Tuber aestivum*, *T. melanosporum*, *T. brumale*, *T. uncinatum*, *Choiromyces meandriiformis* и *T. magnatum*, полученный от пяти российских производителей. Мицелий приобретен на маркетплейсах. В качестве контрольной группы было использовано плодовое тело *T. macrosporum*. Анализ разнообразия эукариот был проведен с помощью метагеномного профилирования по гену 18S рРНК. В ходе анализа образцов не выявлено нуклеотидных последовательностей, которые было бы возможно идентифицировать как трюфельные грибы родов *Tuber* sp., либо *Choiromyces* sp. В то же время, в контрольной группе, представленной плодовым телом гриба *T. macrosporum*, выявлены 7 видов грибов, среди которых обнаружены нуклеотидные последовательности *T. macrosporum*, *T. glabrum* и *T. multimaclatum*. Выявленное отсутствие трюфелей в составе посевного материала, поставляемого и производимого в России под видом трюфельных грибов, указывает на наличие коммерческого спроса и отсутствие качественного предложения. Это может быть связано как с первоначальным отсутствием грибов в составе посевного материала, так и высокой степенью гибели мицелия трюфеля при классических схемах распространения, транспортировки и культивирования. Это свидетельствует о необходимости создания новых способов воспроизводства грибов данного рода в условиях законодательных ограничений, особенно ввиду включения трюфелей в Красную книгу России.

Ключевые слова: биоразнообразие, трюфели, черный трюфель, Ascomycota, *Tuber*.

METAGENOMIC ANALYSIS OF COMMERCIAL MYCELIUM OF TRUFFLE MUSHROOMS

Research article

Shelkovnikova V.N.¹, Dmitrieva M.E.², Malygina E.V.³, Imidoeva N.A.⁴, Morgunova M.M.⁵, Shashkina S.S.⁶, Belyshenko
A.Y.⁷, Vlasova A.A.⁸, Telnova T.Y.⁹, Batalova A.A.¹⁰, Vavilina T.N.¹¹, Kononov A.S.¹², Axenov-Gribanov D.V.^{13,*}¹ ORCID : 0000-0002-4411-7521;² ORCID : 0000-0002-9229-1954;³ ORCID : 0000-0002-2673-0226;⁴ ORCID : 0000-0002-6327-5517;⁵ ORCID : 0000-0002-7939-1432;⁶ ORCID : 0000-0002-3378-5671;⁹ ORCID : 0000-0003-2606-3766;¹³ ORCID : 0000-0003-2020-6084;^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13} Irkutsk state university, Irkutsk, Russian Federation

* Corresponding author (denis.axengri[at]gmail.com)

Abstract

The aim of the work was to conduct a metagenomic analysis of commercial mycelium of truffle mushrooms produced and distributed in Russia. The study material was commercial mycelium of six species: *Tuber aestivum*, *T. melanosporum*, *T. brumale*, *T. uncinatum*, *Choiromyces meandriiformis* and *T. magnatum*, obtained from five Russian producers. Mycelium was purchased from marketplaces. The fruiting body of *T. macrosporum* was used as a control group. Eukaryotic diversity was analysed by metagenomic profiling on the 18S rRNA gene. The samples analysed did not show any nucleotide sequences that could be identified as truffle mushrooms of the genera *Tuber* sp. or *Choiromyces* sp. At the same time, in the control group, represented by the fruiting body of the fungus *T. macrosporum*, 7 fungal species were identified, among which the nucleotide sequences of *T. macrosporum*, *T. glabrum*, *T. gliomyces* sp. *macrosporum*, *T. glabrum* and *T. multimaclatum*. The detected absence of truffles in the composition of inoculum supplied and produced in Russia under the guise of truffle mushrooms

indicates the presence of commercial demand and lack of quality supply. This may be due to both the initial absence of mushrooms in the seed composition and the high degree of truffle mycelium mortality under classical schemes of propagation, transport and cultivation. This indicates the necessity to create new ways of reproduction of mushrooms of this genus under the conditions of legislative restrictions, especially in view of the inclusion of truffles in the Red Book of Russia.

Keywords: biodiversity, truffles, black truffle, Ascomycota, Tuber.

Введение

Истинные трюфели, грибы рода *Tuber* sp., представляют собой гипогенные грибы-аскомицеты. Данные грибы играют важную экологическую роль в качестве эктомикоризного партнера для нескольких семейств растений, например, буковых (*Fagaceae*) и сосновых (*Pinaceae*) [10]. Трюфели известны и уникальны не только своим вкусом и ароматом, но и являются потенциальным и перспективным источником для новых лекарственных препаратов. Ранее показано, что экстракты трюфелей обладают разнообразными биологическими активностями, в т.ч. противоопухолевой, антибактериальной, антиоксидантной и др. [6].

Выращивание трюфелей является сложным и многостадийным процессом, поскольку их жизненный цикл включает симбиотические отношения с деревьями-хозяевами. Коммерческое выращивание трюфелей зачастую основано на высадке в теплицы колонизированных трюфелями растений, полученных путем инокуляции суспензией аскоспор. Однако существует проблема с методами инокуляции спор, заключающаяся в заражении растений патогенами, вредителями и другими микоризными грибами. Вследствие этого возникают сложности в получении растения с чистой культурой трюфеля. Инокуляция саженцев растений чистым мицелием имеет больше преимуществ, чем инокуляция спорами за счет того, что обеспечивается непрерывное производство эктомикоризных проростков хорошего качества. Также инокуляция чистым мицелием гарантирует более высокую скорость колонизации проростков, чем инокуляция аскоспорами [5].

В России осуществляется продажа мицелия нескольких видов трюфеля для посева. Товарными формами выступают грунт или компост, инокулированный спорами и мицелием, а также мицелий на зерновом субстрате. Ввиду отсутствия доступной технической информации о производстве посевного материала, необязательной сертификации данной продукции и отсутствии признанных государственных методик по оценке содержания трюфеля в коммерческом мицелии, целью работы являлся метагеномный анализ коммерческого мицелия трюфельных грибов, производимого и распространяемого в России, для выявления в составе мицелия трюфельных грибов.

Методы и принципы исследования

Коммерческий мицелий трюфеля был приобретен на крупных российских маркетплейсах в 2021-2022 году. В работе использовали шесть доступных видов трюфельных грибов, в т.ч. *T. aestivum*, *T. melanosporum*, *T. brumale*, *T. uncinatum*, *T. magnatum* и *Choiromyces meandriformis*. Посевной материал получен от пяти российских производителей. Образцы для секвенирования готовили посредством вскрытия коммерческого мицелия всех производителей, интенсивного перемешивания и разделения образца методом квартования. В качестве контрольной группы было использовано плодовое тело *T. macrosporum*. Анализ разнообразия эукариот был проведен с помощью метагеномного профилирования по гену 18S рРНК в ООО «БиоСпарк».

Для выделения геномной ДНК из образцов использовали набор FastDNA SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, США). Для метагеномного профилирования проводили амплификацию гипервариабельного ITS2 участка гена 18S рРНК с применением следующих праймеров: прямой NR_5.8S (F) (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATCTCGATGAAGAACGCAGCG-3'), обратный NR ITS4 (R) (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCATCCTCCGTTATTGATATGC-3') в концентрации 5мкМ. Амплификацию проводили в объеме 25 мкл в смеси, содержащей 5 мкл 5x KTN-mix (Евроген, Россия), 2 мкл смесь праймеров, 0,5 мкл 50x SYBR. Реакцию проводили в амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США) в режиме реального времени при следующих условиях: первичная денатурация 3мин при 95°C; 35 циклов: денатурация 30с при 95°C, отжиг 30с при 57°C, элонгация 30с при 72°C; заключительная элонгация 5мин при 72°C. Амплификацию ПЦР продукта, полученного на первом этапе, с целью баркодирования библиотек, проводили в объеме 25 мкл в смеси, содержащей те же компоненты, что и в первом этапе. Амплификацию проводили при следующих условиях: первичная денатурация 3мин при 95°C; 7 циклов: денатурация 30с при 95°C, отжиг 30с при 55°C, элонгация 30с при 72°C; заключительная элонгация 5мин при 72°C. Для амплификации использовали индексы, рекомендованные производителем Nextera Index Kit (Illumina, США).

После второго этапа ампликоны очищали с использованием магнитных частиц AMPureXP (KAPA Biosystems, США) в соотношении 1:0.7. Очищенные ампликоны, являющиеся готовыми библиотеками, смешивали между собой и доводили до общей концентрации 2 нМ. К отобраным 5 мкл смеси добавляли 5 мкл 0.2M NaOH и инкубировали в течении 5мин. К денатурированной ДНК добавляли 990 мкл HTI и 1 мкл 12,5 mM заранее денатурированного Phyx. Анализ библиотек проводили на секвенаторе нового поколения Illumina MiSeq методом парно-концевого чтения генерацией не менее 10 000 парных прочтений. На каждый образец были использованы реактивы MiSeqReagentKitv2 nano и MiSeqv2 ReagentKit (500 CyclesPE). Полученные данные обрабатывали в программе, написанной с использованием алгоритма QIIME1.9.1. Распределение последовательностей по таксономическим единицам выполняли с использованием базы данных Silva версии 132 и Unite v8, порог классификации 97%. Эксперимент (контрольные закупки и секвенирование) проведен трехкратно.

Основные результаты

Эукариотическое сообщество коммерческих образцов состояло из грибов (OTU 90,29±8,33 %) и неописанных таксонов (OTU 9,71±0,1 %). Грибное сообщество представлено 4 филами, в т.ч. *Ascomycota* (OTU 88,54±9,41 %), *Basidiomycota* (OTU 1,54±0,29 %), *Mortierellomycota* (OTU 0,02±0,001 %) и *Mucoromycota* (0,19±0,01).

Таксономический анализ показал, что в посевном материале содержится 31 род грибов (табл. 1). Несмотря на выраженное грибное разнообразие, выявлено, что в коммерческих образцах мицелия, заявленных как трюфель, представителей семейства *Tuberaceae* не обнаружено.

Таблица 1 - Результат метагеномного анализа коммерческих образцов мицелия трюфелей

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.54.1.1>

Фила	OTU, %	Род	Виды
Ascomycota	55,83±10,7	<i>Pseudogymnoascus</i>	-
	7,11±3,42	<i>Sporothrix</i>	<i>Sporothrix guttuliformis</i>
	4,73±2,2	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium griseofulvum</i> , <i>Penicillium commune</i> , <i>Penicillium baarnense</i>
	4,57±3,14	<i>Candida</i>	<i>Candida sophiae-reginae</i>
	4,57±2,33	<i>Oidiodendron</i>	<i>Oidiodendron echinulatum</i> , <i>Oidiodendron rhodogenum</i>
	3,19±0,01	<i>Sugiyamaella</i>	<i>Sugiyamaella paludigena</i>
	2,3±0,01	<i>Chalara</i>	<i>Chalara vaccinii</i>
	1,47±0,01	<i>Nadsonia</i>	<i>Nadsonia starkeyi-henricii</i>
	1,19±0,01	<i>Phialocephala</i>	<i>Phialocephala oblonga</i>
	0,95±0,54	<i>Talaromyces</i>	<i>Talaromyces derxii</i> , <i>Talaromyces infraolivaceus</i>
	0,64±0,01	<i>Hawksworthiomyces</i>	<i>Hawksworthiomyces lignivorus</i>
	0,4±0,05	<i>Neofusicoccum</i>	<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i>
	0,29±0,01	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	0,19±0,02	<i>Pseudeurotium</i>	<i>Pseudeurotium hygrophilum</i>
	0,19±0,04	<i>Coniochaeta</i>	<i>Coniochaeta luteoviridis</i>
	0,19±0,02	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
	0,18±0,1	<i>Scytalidium</i>	<i>Scytalidium lignicola</i>
	0,16±0,01	<i>Priceomyces</i>	<i>Priceomyces fermenticarens</i>
	0,15±0,01	<i>Phialemonium</i>	<i>Phialemonium inflatum</i>
	0,1±0,01	<i>Conioscypha</i>	<i>Conioscypha pleiomorpha</i>
	0,07±0,01	<i>Hyaloscypha</i>	<i>Hyaloscypha daedaleae</i>
	0,04±0,01	<i>Jattaea</i>	-
	0,03±0,01	<i>Humicola</i>	<i>Humicola grisea</i>
Basidiomycota	0,89±0,01	<i>Apiotrichum</i>	<i>Apiotrichum xylopinii</i>
	0,39±0,04	<i>Clitopilus</i>	<i>Clitopilus pinsitus</i> , <i>Clitopilus hobsonii</i>
	0,09±0,03	<i>Tomentella</i>	-
	0,08±0,04	<i>Gymnopilus</i>	<i>Gymnopilus decipiens</i>
	0,07±0,01	<i>Sistotrema</i>	-

Фила	OTU, %	Род	Виды
	0,02±0,01	<i>Ruinenia</i>	-
<i>Mortierellomycota</i>	0,02±0,001	<i>Mortierella</i>	<i>Mortierella basiparvispora</i>
<i>Mucoromycota</i>	0,19±0,01	<i>Umbelopsis</i>	-

В плодовом теле *T. macrosporum* эукариотическое сообщество состояло только из грибов-аскомицетов (табл. 2). В образцах *T. macrosporum* обнаружены представители 4 родов грибов, в т.ч. *Tuber* sp. (OTU 99,5± 0,1%), *Saccharomyces* sp. (OTU 0,32±0,1%), *Aspergillus* sp. (OTU 0,07±0,05%) и *Penicillium* sp. (OTU 0,07±0,05%).

Таблица 2 - Результаты метагеномного анализа плодового тела *T. macrosporum*

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.54.1.2>

Фила	OTU, %	Род	Вид
<i>Ascomycota</i>	99,11±0,01	<i>Tuber</i>	<i>Tuber macrosporum</i>
<i>Ascomycota</i>	0,25±0,1	<i>Tuber</i>	<i>Tuber glabrum</i>
<i>Ascomycota</i>	0,32±0,1	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Ascomycota</i>	0,14±0,05	<i>Tuber</i>	<i>Tuber multimaclatum</i>
<i>Ascomycota</i>	0,07±0,05	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus ruber</i>
<i>Ascomycota</i>	0,07±0,05	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium astrolabium</i>
<i>Ascomycota</i>	0,04±0,01	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>

Обсуждение

Фила *Ascomycota* представлена 23 родами, в т.ч. *Pseudogymnoascus* (OTU 55,83±10,7%), *Sporothrix* sp. (OTU 7,11±3,42 %), *Penicillium* sp. (OTU 4,73±2,2 %), *Candida* sp. (OTU 4,57±3,14%), *Neofusicoccum* sp. (OTU 0,4±0,05%) и др. Грибы *Sporothrix* sp. известны видами, вызывающими споротрихоз у млекопитающих. Однако большинство видов данного рода обладают низким патогенным потенциалом и имеют важное экологическое значение. Например, в образцах коммерческого мицелия найден *Sporothrix guttuliformis*, обитающий в почве и участвующий в процессе гниения древесины, растительных остатков и т.п. [3]. Грибы рода *Candida* относятся к дрожжам, вызывающим инфекции слизистых оболочек у человека и животных [7]. Также обнаруженный в мицелии *Neofusicoccum vitifusiforme* может являться возбудителем язв и некроза у виноградной лозы и дуба [4].

Фила *Basidiomycota* представлена 6 родами, такими как *Apiotrichum* sp. (OTU 0,89±0,01%), *Clitopilus* sp. (OTU 0,39±0,04%), *Toментella* sp. (OTU 0,09±0,03%), *Gymnopilus* sp. (OTU 0,08±0,04%), *Sistotrema* sp. (OTU 0,07±0,01%) и *Ruinenia* sp. (OTU 0,02±0,01%). *Clitopilus* sp. считается распространенным сапротрофным родом. Обнаруженный в посевном материале *Clitopilus hobsonii* может действовать как корневой эндофит, способствующий росту деревьев [9]. *Toментella* sp. участвует в формировании эктомикоризы с деревьями. В 2023 году F. Ori с коллегами показали, что в трюфельной плантации в эктомикоризе с листовыми породами и сосной доминируют рода *Toментella*, *Scleroderma*, *Inocybe* и *Tuber* [8]. Также известно, что род *Toментella* доминирует в таежных лесах после пожара, что может свидетельствовать о защитной и стимулирующей ролях в росте и развитии растений в экстремальных условиях [2]. Фила *Mortierellomycota* представлена родом *Mortierella* (OTU 0,02±0,001%). Многие виды *Mortierella* sp. распространены в сельскохозяйственных почвах, способствуют росту растений и разложению подстилки [11]. Фила *Mucoromycota* представлена *Umbelopsis* sp. (OTU 0,19±0,01%). Грибы рода *Umbelopsis* являются сапрофитами и хорошо известны как продуценты липазы и липидов [1].

Заключение

В коммерческих образцах мицелия идентифицирован 31 род грибов, не относящихся к представителям истинных (*Tuber* sp.), либо ложных (*Choioomyces* sp.) видов трюфелей, тогда как в плодовом теле гриба идентифицировано 7 видов грибов, среди которых обнаружены нуклеотидные последовательности трюфелей видов *T. macrosporum*, *T. glabrum* и *T. multimaclatum*. Таким образом, показано, что в партиях грибов, поступивших на анализ, генетический материал трюфельных грибов отсутствует, а большинство симбионтных грибов в коммерческих образцах представлены сапрофитными видами.

Выявленное отсутствие трюфелей в составе посевного материала, поставляемого и производимого в России под видом трюфельных грибов, указывает на наличие коммерческого спроса и отсутствие качественного предложения. Это может быть связано как с первоначальным отсутствием грибов в составе посевного материала, так и высокой степенью гибели мицелия трюфеля при классических схемах распространения, транспортировки и культивирования. Это свидетельствует о необходимости создания новых способов воспроизводства грибов данного рода в условиях законодательных ограничений, особенно ввиду включения трюфелей в Красную книгу России.

Финансирование

Исследование проведено при поддержке Российского научного фонда (проект 22-76-10036).

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Funding

The study was conducted with the support of the Russian Science Foundation (project 22-76-10036).

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Aquino M.D. Umbelopsis (Mucoromycota) from Patagonia, Argentina: identification, phylogenetic analysis, and expression profiling of lipase activity and lipid accumulation in selected isolates / M.D. Aquino, M.C.N. Saparrat, M.B. Pildain // *Mycological Progress*. — 2023. — № 22 (3). — P. 18. — DOI: 10.1007/s11557-023-01866-9.
2. Cheng Z. Cortinarius and Tomentella fungi become dominant taxa in taiga soil after fire disturbance / Z. Cheng, S. Wu, H. Pan // *Journal of Fungi*. — 2023. — № 9 (11). — P. 1113. — DOI: 10.3390/jof9111113.
3. De Carvalho J.A. Trends in molecular diagnostics and genotyping tools applied for emerging Sporothrix species / J.A. de Carvalho, R.C. Monteiro, F. Hagen // *Journal of Fungi*. — 2022. — № 8 (8). — P. 809. — DOI: 10.3390/jof8080809.
4. Del Grosso C. First report of Diplodia quercivora and Neofusicoccum vitifusiforme associated with cankers and necrosis of holm oak (Quercus ilex) in declining stands in Southern Italy / C. Del Grosso, D. Palmieri, L. Marchese // *Journal of Fungi*. — 2024. — № 10 (1). — P. 35. — DOI: 10.3390/jof10010035.
5. Iotti M. First evidence for truffle production from plants inoculated with mycelial pure cultures / M. Iotti, F. Piattoni, P. Leonardi // *Mycorrhiza*. — 2016. — № 26. — P. 793–798. — DOI: 10.1007/s00572-016-0703-6.
6. Lee H. Potentials of truffles in nutritional and medicinal applications: A review / H. Lee, K. Nam, Z. Zahra // *Fungal Biology and Biotechnology*. — 2020. — № 7 (1). — P. 1–17. — DOI: 10.1186/s40694-020-00097-x.
7. Mba I.E. Mechanism of Candida pathogenesis: revisiting the vital drivers / I.E. Mba, E.I. Nweze // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. — 2020. — № 39. — P. 1797–1819. — DOI: 10.1007/s10096-020-03912-w.
8. Ori F. Ectomycorrhizal fungal community and ascoma production in a declining Tuber borchii plantation / F. Ori, M. Leonardi, F. Puliga // *Journal of Fungi*. — 2023. — № 9 (6). — P. 678. — DOI: 10.3390/jof9060678.
9. Peng L. Hybrid genome assembly and gene repertoire of the root endophyte Clitopilus hobsonii QYL-10 (Entolomataceae, Agaricales, Basidiomycetes) / L. Peng, X. Shan, Y. Wang // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. — 2021. — № 34 (6). — P. 711–714. — DOI: 10.1094/MPMI-11-20-0328-A.
10. Qin J. Life cycle and phylogeography of true truffle / J. Qin, B. Feng // *Genes*. — 2022. — № 13 (1). — P. 145. — DOI: 10.3390/genes13010145.
11. Telagathoti A. Mortierellaceae from subalpine and alpine habitats: new species of Entomortierella, Linnemannia, Mortierella, Podila and Tyroliella gen. nov / A. Telagathoti, M. Probst, E. Mandolini // *Studies in Mycology*. — 2022. — № 103 (1). — P. 25–58. — DOI: 10.3114/sim.2022.103.02.