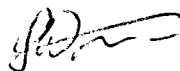


На правах рукописи



**Окунь Михаил Владимович**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ И ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ  
СТАТУС ВИДОВ МИКСОМИЦЕТОВ КОМПЛЕКСА  
*PHYSARUM NOTABILE***

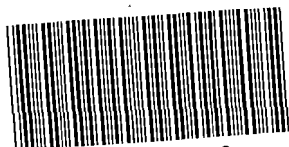
**03.02.12 - Микология**

**28 НОЯ 2013**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
профессор Новожилов Ю.К.



**005540956**

Санкт-Петербург – 2013

Работа выполнена в Лаборатории систематики и географии грибов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Российской академии наук Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург.

**Научный руководитель**

доктор биологических наук, профессор  
**Новожилов Юрий Капитонович**

**Официальные оппоненты:**

**Родионов Александр Викентьевич** доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, заведующий лабораторией.

**Ганнибал Филипп Борисович** кандидат биологических наук, Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений Российской академии сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник

**Ведущая организация**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

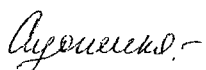
Защита состоится **18 декабря 2013 г. в 16 часов** на заседании совета Д 002.211.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 2. Тел./Факс: (812) 372-54-43.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук.

Автореферат разослан 15 ноября 2013 г.

e-mail автора: m.okun@hotmail.com

Ученый секретарь совета,  
кандидат биологических наук

 Сизоненко О. Ю.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** В отличие от животных и растений, закономерности распространения микроскопических грибов и протистов изучены значительно хуже. Малые размеры протистов, микроскопических грибов и других микроорганизмов, а также высокая экологическая толерантность способствуют их глобальному распространению. Модель космополитизма в отношении микроорганизмов (Fenchel, 2005; Fenchel, Finlay, 2004; Finlay, Fenchel, 2004), также как и модель умеренного эндемизма (Foissner, 2006) в последнее время широко обсуждается (Fontaneto, 2011; Martiny et al., 2006) в контексте постулата "все есть везде, но среда отбирает" (EiE гипотеза).

В этой связи в качестве модельных групп особенно привлекательны микроорганизмы, относительно хорошо поддающиеся учету в природе и/или в лабораторных условиях. Одной из них являются миксомицеты, или плазмодиальные слизевики (Мухомycetes = Eumycetozoa). К ним относится около 1000 видов, объединенных в 5 порядков (Martin, Alexopoulos, 1969; Olive, 1975). Будучи активными бактериофагами, миксомицеты являются регуляторами численности бактериальной биоты в почве (Feest, Madelin, 1985). Изучение миксомицетов является неотъемлемой частью исследований филогении и эволюционной истории протист в целом (Кусакин, Дроздов, 1998; Карпов, 2000; Новожилов, Гудков, 2000; Adl et al., 2012).

До последнего времени вся традиционная систематика миксомицетов базировалась на морфологических признаках плодовых тел (спорокарпов) и спор (Martin, Alexopoulos, 1969; Schnittler et al., 2012; Новожилов, 1993), и в таксономии данной группы преобладала морфологическая концепция вида. Однако эта концепция все чаще подвергается критике. Лишь за последнее десятилетие были опубликованы первые молекулярные исследования данной группы организмов. (Fiore-Donno et al., 2008 и последующие работы). Тем не менее, таксономическая система миксомицетов все еще очень нестабильна (Schnittler et al., 2012).

Морфовиды миксомицетов рода *Physarum* с серыми спорокарпами относятся к группе видов с весьма размытыми границами (Hagelstein, 1944). Ранее, в различных аридных районах Евразии, на различных субстратах был выявлен морфовид из рода *Physarum* (Novozhilov et al., 2006; Novozhilov, Schnittler, 2008). Этот вид доминировал во всех пустынных и степных безлесных сообществах, причем во всех субстратных комплексах. Он был предварительно отнесен к одной из экологических форм *Ph. notabile* T.

Масгр. на основании сходства их спорокарпов. Данный морфовид был выбран нами в качестве модельного для филогеографических исследований, поскольку ранее была собрана и определена уникальная коллекция (более 400 образцов) на трансекте, протянувшейся более чем на 3500 км с запада на восток по территории Центральной Азии.

Данная работа представляет собой результаты исследования комплекса видов *Physarum notabile* с применением как морфологических, так и молекулярных методов. Использование двух независимых генетических маркеров – 18S рибосомальная ядерная ДНК малой субъединицы рибосомы (также именуемая SSU rRNA– Small Subunit Ribosomal RNA) и ядерного гена фактора элонгации трансляции *tefl1* повышает научную значимость геносистематического анализа. В ходе данной работы на этапе анализа полученных последовательностей ДНК нами были использованы новейшие методы компьютерного анализа, многие из которых дополнительно развивались их авторами во время проведения наших экспериментов благодаря тесному взаимодействию с последними.

**Цели и задачи исследования.** Цель исследования – изучение генетического разнообразия и филогенетической структуры комплекса морфовидов *Physarum notabile*. Для этого были поставлены следующие задачи работы:

1. Определить таксономический статус аридной формы вида *Ph. notabile*.
2. Выявить филогенетические связи морфовидов комплекса *Ph. notabile*, учитывая молекулярные данные.
3. Выявить корреляцию между филогенетическим статусом изолятов аридной формы *Ph. notabile* и их географическим положением.
4. Провести подбор и тестирование наиболее эффективных методов филогенетического анализа для исследуемых образцов.

**Научная новизна.** Впервые изучена филогенетическая структура видов комплекса *Ph. notabile*, приведены данные о степени родства и эволюционной истории видов видового комплекса. Впервые в базу данных NCBI внесены последовательности ДНК нескольких видов (*Ph. notabile*, *Ph. compressum*, *Ph. confertum* и др.). Впервые в отношении миксомицетов были опробованы различные методы биоинформатики для реконструкции филогенетических деревьев. Впервые разработана таксономическая система морфологического комплекса *Ph. notabile*. Отработан новый метод выделения ДНК из плодовых тел миксомицетов с использованием лизирующих ферментов. Разработаны новые праймеры для амплификации участка гена фактора элонгации *tefl1*.

**Практическое значение.** В ходе исследования была проведена оценка эффективности использования генетических маркеров SSU и *tef1* в изучении филогении и филогеографии миксомицетов. Разработаны эффективные протоколы по выделению ДНК из плодовых тел миксомицетов, а также протоколы амплификации участков SSU и *tef1*. В ходе экспериментов по секвенированию из образцов различных представителей порядка Physarales получена 191 последовательность указанных генов. 17 последовательностей задепонированы в онлайн банк данных NCBI GenBank. Полученные данные могут быть использованы в дальнейших исследованиях по филогеографии и геносистематике комплекса видов *Physarum*, а также в изучении таксономической системы порядка Physarales. Кроме того, полученные результаты могут быть использованы для проверки гипотез космополитизма и умеренного эндемизма в отношении микроорганизмов.

**Апробация работы.** Результаты исследований докладывались на заседаниях лаборатории систематики и географии грибов БИН РАН, а также на международных конференциях: 16-й международный конгресс европейских микологов (Халкидики, Греция, 2011); международные конференции молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2011, 2012); международная конференция по молекулярной филогенетике «MolPhy-3» (Москва, 2012), международная конференция по биосистематике «BIOSyst.2013» (Вена, Австрия, 2013). Кроме того, результаты исследований регулярно докладывались на семинарах центра интегративной биоинформатики (CIBIV – Center for Integrative Bioinformatics in Vienna) при университете г. Вена, Австрия.

**Публикация результатов исследования.** По теме диссертации опубликовано 10 работ, включая 3 статьи в международных микологических журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также материалы и тезисы докладов научных конференций.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация состоит из введения, 7 глав, выводов, списка литературы, включающего 146 наименований, в том числе 138 на иностранных языках, и приложения. Работа изложена на 105 страницах (93 страниц - текст, 12 - приложение), проиллюстрирована 22 рисунками, содержит 10 таблиц.

## СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

### ГЛАВА 1. ТЕОРИИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Модель космополитизма микроорганизмов широко распространена в научном сообществе и поддерживается постулатом «все есть всюду, но среда отбирает» (Beijerinck, 1913; Becking, 1934). Суть данной концепции состоит в предположении, что микроорганизмы распространены повсюду на Земле в местах с подходящими условиями существования. В современной науке данная точка зрения нашла отражение в работе Т. Фенхеля (Fenchel, Finlay, 2004). Также, одним из основных апологетов теории космополитизма является Финлей (Finlay, 1996; Finlay, Fenchel, 2004). Основным доводом в пользу космополитизма микроорганизмов в этих работах является тот факт, что, вследствие огромной численности, они должны очень эффективно распространяться и присутствовать повсеместно (Finlay, 2002). В то же время, существуют убедительные доказательства случаев умеренного эндемизма микроорганизмов, особенно для видов из слабо изученных регионов, но реже из местообитаний с подходящими условиями в хорошо изученных регионах. Доказательства такого типа распространения получены на раковинных амебах (Mitchell, Meisterfeld, 2005; Smith, Wilkinson, 2007), одноклеточных зеленых водорослях (Coesel, Krienitz, 2009), диатомовых (Vanormelingen et al., 2008) и других группах протистов. Имеется множество аспектов гипотезы космополитизма, которые до сих пор не получили объяснения. Например, мы не можем достаточно ясно описать разнообразие микроорганизмов, охарактеризовать количественно их экологическую нишу и географический ареал многих видов, а также определить показатели способности к расселению. Более того, крайне мало известно о путях и способах глобального распространения микроорганизмов. Необходимо определить четкие единицы оценки разнообразия микроорганизмов для того, чтобы картировать их распространение. Многие виды, которые рассматриваются как космополитные, на самом деле представлены комплексами видов с ограниченным распространением. Для решения таких вопросов необходимы комплексные исследования с применением как традиционных морфологических методов, так и методов молекулярной систематики, которая все чаще используется как высокоэффективный инструмент для изучения как ранее описанных морфовидов, так и для выявления новых для науки видов (Hillis, Dixon, 1991; Nei, 1996). Результаты исследований такого рода убедительно показывают, что генетическое разнообразие протистов значительно выше, чем у растений и животных

(Berney et al., 2004; Cavalier-Smith, 2004) и больше, чем следует из их морфологического разнообразия, даже с учетом глобальных статистических исследований разнообразия морфовидов (Chao et al., 2006).

## **ГЛАВА 2. СИСТЕМАТИКА И ГЕОГРАФИЯ МИКСОМИЕТОВ**

### **2.1. Систематическое положение миксомицетов**

К миксомицетам Mухомycetes относится около морфологических 950 видов из пяти порядков: Echinosteliales, Liceales, Physarales, Stemonitales и Trichiales. По последним данным миксомицеты являются наиболее многочисленной группой почвенных амeboидных протистов (Stephenson et al., 2011; Urich et al., 2008) и оказывают существенное влияние на состав и численность почвенных микроорганизмов (Feest, 1985; Olive, 1975), поддерживая баланс между бактериальным и грибным процессом разложения органического вещества (Madelin, 1984). Класс Mухомycetes (=Eumycetozoa) входит в состав филы Amoebozoa, которая вместе с группой Opisthokonta (заднежутиковые) формирует монофилетический надцарственный таксон Unikonta (равножутиковые) (Cavalier-Smith, 2010; Adl et al., 2012). Определение более 950 видов (Lado, 2001, 2013) основано практически полностью на морфологических особенностях их плодовых тел. Лишь за последнее десятилетие были опубликованы первые молекулярные исследования систематики данной группы организмов. (Fiore-Donno et al., 2008 и последующие работы).

### **2.2. Миксомицеты: размножение и концепции вида**

В рамках биологической концепции вида, его основной особенностью считается репродуктивная изоляция особей, обеспечивающая «защиту генофонда» (Maug, 1982). Естественно, что при изучении бесполоых, партеногенетических или самооплодотворяющихся организмов возникают затруднения с определением границ вида. Известно, что многие обычные и широко распространенные виды миксомицетов на самом деле представляют комплексы географически ограниченных апомиктических клонов (Clark, 2000; Clark, Stephenson, 2000; ElHage et al., 2000; Irawan et al., 2000). В течение более чем 200 лет, со времен первого систематического описания миксомицетов Пирсоном (Persoon, 1801) диагнозы их видов были основаны на морфологических признаках плодовых тел (спорокарпов). Более того, репродуктивные системы миксомицетов чрезвычайно пластичны (Collins, 1981; Clark et al., 2004). Несколько исследований уже показали наличие мультиаллельной системы генов спаривания с одним (реже двумя) локусами.

Другие штаммы образуют плазмодии из одной споры, не демонстрируя гетероталлизм (Collins 1981). Таким образом, многие вопросы таксономии и систематики миксомицетов остаются нераскрытыми и дают широкий простор для дальнейших исследований с применением новых подходов геносистематики и молекулярной таксономии.

### 2.3. Род *Physarum*: систематика и морфология

Одной из групп миксомицетов; легко обнаруживаемых в природе и культивируемых в лаборатории, являются представители рода *Physarum* Pers., 1794. Данный род входит в порядок Physarales T. Macbr., являющийся самым крупным среди класса Мухомycetes, и разделенным на два семейства: *Physaraceae* Chevall. и *Didymiaceae* Rostaf. ex Cooke. Характерными признаками порядка являются наличие темноокрашенных спор, присутствие извести во всех структурах спорофора и возможность образования всех типов плодовых тел. Ассимилятивная стадия представлена фанероплазмодием. Род *Physarum* был выделен Персоном (Persoon, 1794) на основе *Physarum aureum* Pers. и относится к семейству *Physaraceae* Chevall. Большинство видов рода *Physarum* имеет хорошо развитый капиллиций, разделенный на обызвествленные узлы и гиалиновые трубки. На данный момент род насчитывает более 130 видов (<http://www.nomen.eumycetozoa.com>). Род *Physarum* не является монофилетичным (Nandipati et al., 2012), а разделение между родами *Physarum* и *Badhamia*, видимо, большей частью искусственное. Род *Physarum* характеризуется наличием нескольких морфовидов, таких, как *Ph. leucophaeum* Fr., *Ph. album* (Bull.) Chevall. и *Ph. notabile* T. Macbr., которые создают своеобразный «таксономический континуум» (Hagelstein, 1944), так как имеют сходные морфологические и экологические характеристики. В связи с этим выделение таксономических границ и определение четкого систематического положения вышеперечисленных морфовидов представляет определенные трудности. Так, в ходе исследований миксомицетов в пустынных регионах Казахстана методом влажных камер были выделены образцы рода *Physarum* с небольшими ссырыми спорокарпами (Schnittler, Novozhilov, 2000b; Schnittler, 2001). Образцы данного морфовида были отнесены к известному виду *Physarum notabile* T. Macbr. как к самому близкому в морфологическом отношении.

### 2.4. Комплекс видов *Physarum notabile*



Согласно литературе (Hagelstein, 1944; Martin, Alexopoulos, 1969), *Ph. notabile* относится к группе видов рода *Physarum* с серыми обызвествленными спорокарпами и состоит из множества морфологических форм. Этот комплекс включает в себя несколько видов, таких как *Ph. album* (Bull.) Chevall., *Ph. leucophaeum* Fr. Все эти виды демонстрируют значительную вариабельность количества и распределения извести в капиллиции и перидии, формы, цвета и орнаментации спор, а также формы и размера плодовых тел. Относительный вес многих морфологических признаков при определении видовой принадлежности до сих пор не совсем ясен; молекулярно-генетический анализ позволяет нам переоценить значимость указанных признаков в таксономических исследованиях.

## ГЛАВА 3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНЕТИКА

### 3.1. Методы молекулярной филогенетики

В основе молекулярной филогенетики лежит сравнение нуклеотидной последовательности семантид (ДНК, РНК или белков) исследуемых таксонов. Результатом такого анализа является построение филогенетического дерева, или дендрограммы, которая отражает гипотетический ход эволюции исследуемых организмов (Suárez-Díaz, Алауа-Миноз, 2008). Применение таких дополнительных статистических методов, как бутстрэп, позволяет оценить степень достоверности структуры полученной дендрограммы. Различают две основных группы методов филогенетического анализа: методы расстояний, работающие с матрицей генетических расстояний между исследуемыми таксонами, и методы, анализирующие непосредственно символы (нуклеотиды или аминокислоты) в анализируемой последовательности. К этой группе относятся алгоритмы ML (Maximum Likelihood – метод максимального правдоподобия), метод MP (Maximum Parsimony – максимальная экономия) и Байесовский поиск (BA – Bayesian Inference).

### 3.2. Теоретические подходы в геносистематике

Теоретические предпосылки молекулярной систематики были заложены в 1960х гг. Э. Цукеркандлем, Э. Марголиаш, Л. Паулингом и В. Фичем. Они положены в основу двух течений в рамках современной теории молекулярной эволюции – кладизма или эволюционной систематики. К преимуществам молекулярных методов в филогении можно отнести в первую очередь то, что именно в анализируемых последовательностях ДНК или РНК напрямую отражается ход эволюции.

Важным условием для осуществления молекулярно-филогенетических работ является наличие дополнительных ресурсов по нуклеотидным последовательностям видов, родственных к изучаемому таксону. На данный момент в базе данных нуклеотидных последовательностей Nucleotide (NCBI GenBank - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) задепонировано свыше 1170 последовательностей рибосомальной ДНК миксомицетов порядка 700 различных видов (октябрь 2013).

### **3.3. Генетические маркеры в филогенетике**

Важным аспектом адекватного молекулярно-филогенетического анализа является выбор исследуемого участка ДНК/РНК или белка. Проводимые в настоящее время микологические исследования в области геносистематики в основном опираются на последовательности рибосомальной ДНК (рДНК). Филогенетические отношения в рамках миксомицетов в основном исследуются с использованием в качестве маркерной последовательности участка гена SSU рДНК, кодирующего малую субъединицу рибосомы (Fiore-Donno et al., 2005, 2008, 2011, 2012; Aguilar et al., 2013). Данный участок подходит для изучения систематики и филогении миксомицетов на уровне от изолятов одного вида до анализа родства отдельных семейств (Fiore-Donno et al., 2008; Erastova et al., 2013). Кроме того, в нашей работе мы использовали маркерный ядерный ген *tef1* для верификации дендрограмм, полученных на основе гена SSU. Последовательность данного гена в анализах филогении миксомицетов применяется на уровне рода и порядка (Baldauf and Doolittle, 1997; Fiore-Donno et al., 2005, 2009, 2011).

## **ГЛАВА 4. ФИЛОГЕОГРАФИЯ: ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ,**

### **СОДЕРЖАНИЕ**

С термином «Филогеография» связано возникновение нового течения, находящегося на пересечении интересов классической популяционной биологии, современной геномики и таких традиционных дисциплин, как систематика и биогеография. Филогеография в основном изучает исторические аспекты современного распространения таксонов в пространстве (Avice, 2000). Автор термина – Джон С. Авайс, профессор генетики университета штата Джорджия в Атланте, США. Рабочим инструментом филогеографии является анализ генных родословных различных локусов митохондриальной или ядерной ДНК. Данные по внутривидовой изменчивости ДНК подвергаются анализу с двух позиций: а)

генеалогических взаимоотношений между молекулами ДНК и б) географического распределения филогенетических групп. Эти два элемента составляют внутривидовую филогеографию.

Особый интерес в свете филогеографии представляют паттерны распределения миксомицетов (Aguilar et al., 2013). На данный момент нами накоплено множество изолятов модельных морфовидов, собранных в различных частях ареала не только в пустынях России, Казахстана, Монголии, Китая, но также США и Омана. Анализ филогеографических деревьев и ареалов модельных видов проводился нами с учетом возможности трансконтинентального переноса пропагул (спор, микроцист) миксомицетов, например, с частицами пыли.

## ГЛАВА 5. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 5.1 Отбор образцов для исследования

Для данного исследования было отобрано 199 образцов спорокарпов представителей рода *Physarum* из коллекции микологического гербария Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (LE), а также образцы из личных коллекции проф. Мартина Шнитлера (M. Schnittler, Greifswald University, Germany, указаны кодом sc в тексте), проф. Стива Стефенсона (S.L. Stephenson, Arkansas University, USA), частной коллекции Евы Гарсия Карвахаль (E-G. Carvajal, Madrid, Spain), коллекции миксомицетов института ботаники Литвы (BILAS, Vilnius, Lithuania) (таб. 1). Наиболее эффективным подходом для отбора образцов спорокарпов миксомицетов в аридных условиях оказалось сочетание традиционных полевых сборов плодовых тел в поле и метода влажной камеры.

**Таблица 1.** Количество образцов, изученных в различных анализах в ходе исследования

Анализ частичной последовательности гена SSU	173
Анализ полной последовательности гена SSU	9
Анализ частичной последовательности гена <i>tef1</i>	18
Морфологический анализ	83
Всего изучено образцов	199

### 5.2. Влажные камеры

Образцы субстратов стандартного размера собирались в бумажные конверты и помещались в лаборатории в чашки Петри (63.6 см<sup>2</sup>) на фильтровальную бумагу, смоченную водой. Образцы инкубировались в

течение 2 месяцев (помет растительноядных животных — до 3 месяцев) при комнатной температуре и рассеянном свете. Чашки регулярно просматривались под бинокулярной лупой (на 2-4, 6-8, 11-14, 20-22 и 40-44 день соответственно).

### 5.3. Микроскопия

Высушенные спорокарпы изучались методом световой микроскопии с помощью бинокулярного микроскопа Stemi 2000, микроскопа Zeiss Axio Imager A1 с дифференциальным контрастом. Исследование орнаментации спор проводилось под сканирующим электронным микроскопом JSM-6390 LA. Для микроскопии, спорокарпы фиксировались в качестве постоянных препаратов в поливинил-лактофеноле; необходимые измерения диаметра спор и размеров плодовых тел проводились в программе AxioVision 4.8 (<http://www.zeiss.com>). Диаметр спор оценивался путем замера 25 спор из одного гербарного образца спорокарпов. Для проведения сканирующей электронной микроскопии образцы фиксировались на медных подставках двухсторонней клейкой лентой и покрывались золотым напылением.

### 5.4. Морфологический анализ

Для выявления паттернов морфологической вариабельности образцов комплекса *Physarum notabile* был использован метод NMS (Non-metric Multidimensional Scaling). Анализ проводился в программе PC-ORD 5 (McCune, Mefford, 1999; Holland, 2008) с настройками по умолчанию. В анализ были включены 17 морфологических признаков.

### 5.5. Выделение ДНК из спор миксомицетов

При работе с образцами миксомицетов ДНК экстрагировалась непосредственно из спор, полученных из образцов спорокарпов. Спорокарпы подвергались глубокому замораживанию в жидком азоте, и затем споровая масса растиралась различными методами непосредственно в 1,5 мл пробирке. Лизис протопластов происходил в течение двух часов в СТАВ-буфере (2% СТАВ, 2% PVP, 5% SDS, 100 mM TrisHCl pH 8, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0.2% β-меркаптоэтанол) при 65°C. ДНК изолировалась путем хлороформной экстракции и далее высаливалась с использованием изопропилового спирта и 5M ацетата аммония. Промывка осуществлялась 70% этанолом, затем ДНК растворяли в 15 мкл EB-буфера из Qiagen QIAquick PCR Purification Kit. Кроме этого после разрушения оболочек спор с помощью жидкого азота ДНК выделялась с помощью набора реагентов

Аxygen Genomic DNA Multisource Miniprep Kit согласно протоколу производителя.

## 5.6. Дизайн праймеров

Для амплификации участка гена фактора элонгации (*tefl*) в рамках данной работы была разработана новая пара олигонуклеотидов. Дизайн праймеров проводился с помощью онлайн-сервиса primer-BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi)) портала NCBI. В качестве матрицы для отжига при дизайне использовалась нуклеотидная последовательность гена SSU миксомицета *Ph. polycephalum* (GenBank AF016243). Поиск подходящей последовательности праймеров проводился при следующих условиях: длина результирующего ампликона – 600-900 п.о., различия в температуре плавления < 3°C, количество олигонуклеотидов – два, не более двух несоответствий праймеров амплифицируемой последовательности.

## 5.7. ПЦР

Для амплификации участка 18S SSU рДНК проб миксомицетов использовалась пара праймеров S1-SU19R (Fiore-Donno et al., 2008). Для тех образцов, где проводилось секвенирование всего гена SSU, данный участок был амплифицирован в нескольких ПЦР с использованием пар праймеров S1-SU19R, S3Dark-SR14, S3Dark-753Rn, 718FL-SR13, S12'-SRBE, S12'-SR15, S14,5a-SRBE и S12'-SRBE (Fiore-Donno et al., 2008).

## 5.8. Секвенирование

Очищенные продукты ПЦР использовались в секвенирующей ПЦР с набором реагентов Big Dye XTerminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Секвенирование осуществлялось на секвенаторе ABI 3130 Genetic Analyzer. Выходные данные секвенатора обрабатывались в программе ABI Sequencing Analysis 5.3.1 или Sequencher 4.7.

## 5.9. Компьютерный анализ

Выравнивание последовательностей. Первичная обработка полученных электрофореграмм проводилась в программе Chromas Lite 2.1.1. Далее прямая и обратная последовательности выравнивались в программном пакете MEGA 5.2. Полученные таким образом последовательности выравнивались с помощью различных алгоритмов: ClustalW, Muscle, MAFFT, Toffee.

Реконструкция дендрограмм. Построение дендрограмм проводилось методами максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) и Байесовского поиска (Bayesian Inference, BI). При реконструкции деревьев методом ML использовались программы RAxML 7.0.3 (<http://www.exelixis-lab.org/>) и IQ-Tree 0.9.5 (<http://www.cibiv.at/software/iqtree/>). Байесовский анализ проводился в программе MrBayes (<http://mrbayes.sourceforge.net/>).

Филогеографический анализ. Разделение набора данных на кластеры (OTU – Operational Taxonomic Units) для проведения филогеографического анализа происходило методом, описанном в статьях Zarrei et al. 2012 и Novozhilov et al., 2013. Соответствующие вычисления проводились в программе Microsoft Excel при помощи плагина PopTools (<http://www.poptools.org/>).

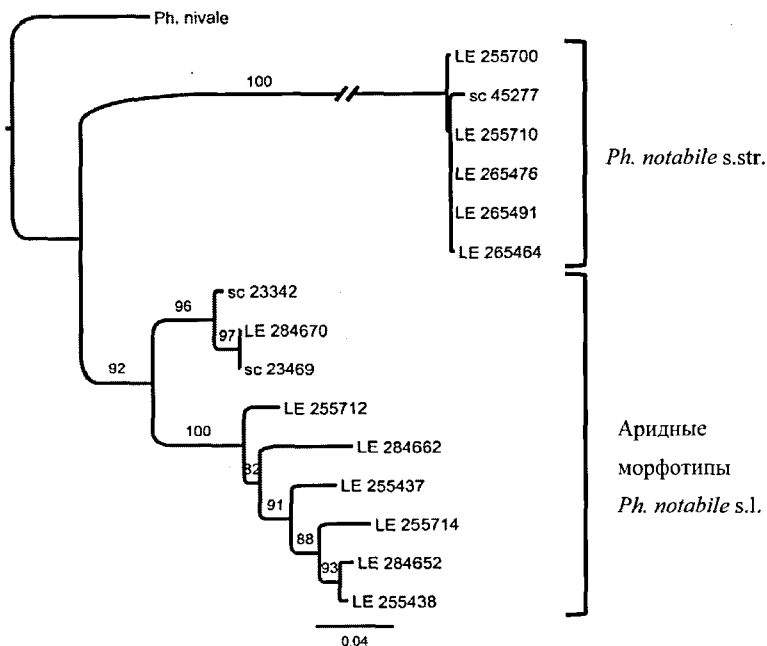
## **ГЛАВА 6. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС ВИДОВ КОМПЛЕКСА *Ph. NOTABILE***

### **6.1. Оптимизация протоколов выделения ДНК и ПЦР**

Молекулярно-генетические исследования в области миксомицетов все еще находятся на стадии развития. Стандартные, проверенные временем протоколы выделения ДНК и ПЦР, столь характерные для многих бактериальных и эукариотических организмов, для миксомицетов к началу нашей работы отсутствовали. В связи с этим этапы выделения ДНК, ПЦР и компьютерного анализа были оптимизированы в соответствии с изучаемыми объектами.

### **6.2. Анализ генетических различий «лесного» и аридного морфотипов *Physarum notabile***

На первом этапе работы предстояло выяснить, имеются ли существенные морфологические и генетические различия между представителями «лесного» морфотипа вида *Ph. notabile* и аридного морфотипа этого видового комплекса, часто встречающегося в пустынных и степных районах Евразии. С помощью маркерного участка 18S рДНК был проведен сравнительный молекулярно-генетический анализ образцов, принадлежащих к двум указанным морфотипам. Полученная дендрограмма (рис. 1) убедительно показывает, что вышеупомянутые образцы с высокой статистической поддержкой формируют два кластера, соответствующие разделению по двум морфотипам. Таким образом, речь может идти о двух различных видах, условно сведенных в один морфовид *Ph. notabile*.

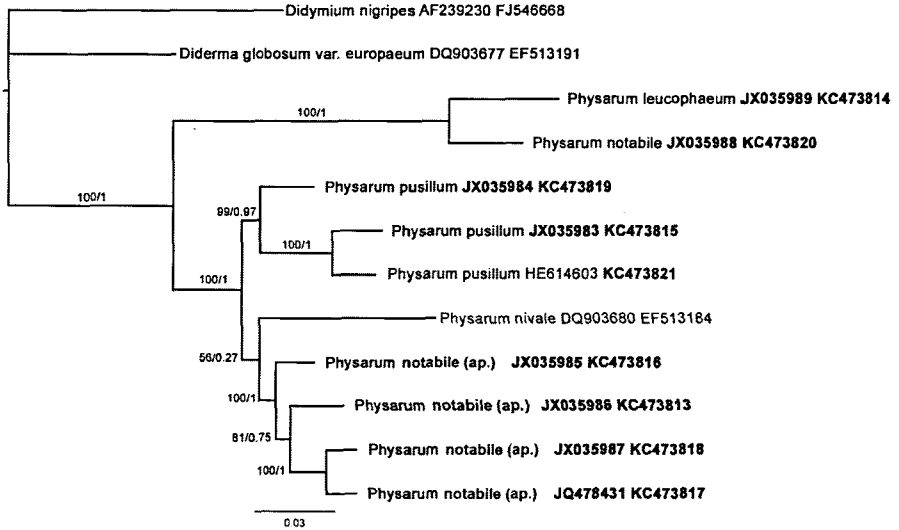


**Рисунок 1.** Филогенетическое дерево, построенное на основании частичной последовательности гена SSU (646 п.о.) 16 образцов. Анализ ML: программа IQ-Tree, модель эволюции TNe + G4, 10000 ультра-быстрых бутстрэпов. Значения поддержки бутстрэпа выше 80 указаны у соответствующих ветвей. Вид *Ph. nivale* использован в качестве внешней группы. Указаны гербарные номера использованных образцов. Образцы с номерами sc взяты из личной коллекции М. Шниттлера (Университет Грайфсальда, Германия). Масштабная линейка соответствует 0,04 нуклеотидных замен на одну позицию. Длина ветви, ведущей к образцам *Ph. nobile* s.str, визуально уменьшена. Реальная длина – 0,309.

### 6.3. Филогенетический анализ изолятов *Ph. nobile* из аридных районов

Для увеличения информативности и достоверности проводимого филогенетического анализа нами были получены полные последовательности гена SSU, а также второго маркерного гена, *tef1*, избранных образцов – изолятов аридного морфотипа *Ph. nobile*, для их сравнения с соответствующими последовательностями изолятов «лесных» форм, а также с видами *Ph. album*, *Ph. leucophaeum* и *Ph. nivale*. На рис. 2

показан результат филогенетического анализа, проведенного на основании объединенных последовательностей полного гена SSU и частичной последовательности гена *tef1* четырех изолятов аридной формы *Ph. notabile* и ближайших к нему видов. Образцы аридного морфотипа *Ph. notabile* образуют монофилетическую группу с максимальной степенью поддержки.



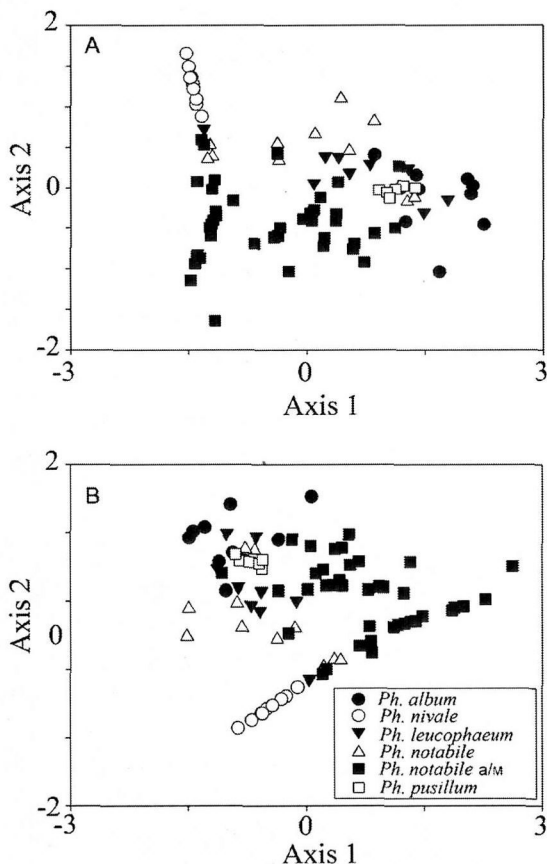
**Рисунок 2.** Филогенетическое дерево, построенное на основании полного гена SSU и частичной последовательности гена *tef1* (2008 п.о. + 718 п.о.) 12 образцов 7 различных видов. Анализ ML: программа IQ-Tree, модель эволюции TNe + G4 для SSU, TN + G4 для *tef1*, 1000 бутстрепов. Анализ BI: программа MrBayes, модель эволюции GTR + G4, 2 мио. поколений. Значения бутстрэпа (0-100) и байесовской апостериорной вероятности (0-1) указаны для каждого узла. *Physarum notabile* (ap.) – аридный морфотип *Ph. notabile*. Виды *Didymium nigripes* и *Diderma globosum* var. *europaeum* использованы в качестве внешней группы. Масштабная линейка соответствует 0,03 нуклеотидных замен на одну позицию. Номера последовательностей генов SSU и *tef1* в базе данных GenBank указаны после названия вида. Номера последовательностей, полученных в ходе данной работы, выделены жирным шрифтом. Группы образцов, относящиеся к *Ph. pusillum* и к аридной форме *Ph. notabile*, выделены серым.

#### 6.4. Морфологический анализ видов комплекса *Ph. notabile*

В ходе проведенного NMS-анализа были анализированы 17 признаков у 83 образцов спорокарпов *Ph. album*, *Ph. notabile* («классический» и



аридный морфотипы), *Ph. leucophaeum*, *Ph. nivale* и *Ph. pusillum*. Выделяются три основных кластера: первый образован образцами аридного морфотипа *Ph. notabile*, второй – *Ph. nivale*, третий – *Ph. album*. Остальные три вида плохо отделены от аридного морфотипа *Ph. notabile* (рис. 3 В). Однако, при анализе всех 17 изученных признаков данные три вида выделяются по цвету и форме споротеки и ножки (рис. 3 А). Таким образом, данные NMS-анализа подтверждают, что большинство образцов аридного морфотипа *Ph. notabile* отличается от похожих представителей вида *Physarum*.



**Рисунок 3.** Ординация, полученная методом многомерного шкалирования (NMS) для аридного морфотипа *Ph. notabile* (39 образцов), *Ph. album* (10), *Ph. leucophaeum* (10), *Ph. notabile* (11), *Ph. nivale* (9), *Ph. pusillum* (6). А. График распределения количественных и качественных морфологических признаков. В. График распределения только количественных признаков.

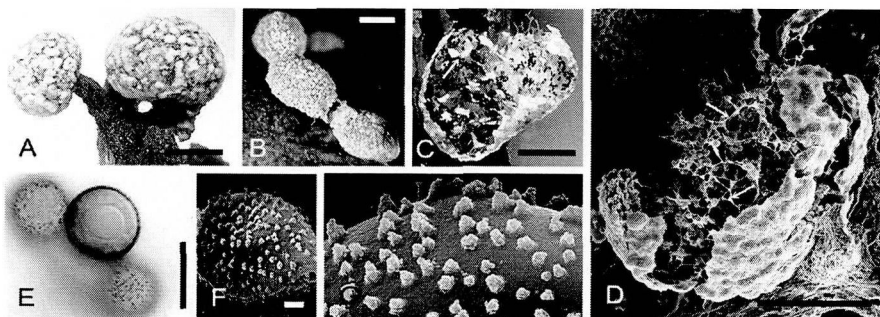
### 6.5. Экологический анализ видов комплекса *Ph. notable*

В ходе работы нами были исследованы образцы миксомицетов из аридных регионов Евразии, Южной и Северной Америки, кроме того были изучены морфовиды комплекса из широколиственных и таежных лесов Северной Америки, Германии, и России (Новосибирская обл.). Нами были проанализированы результаты 9 региональных исследований миксомицетов, из них 5 в аридных регионах. Сравнительный анализ данных по встречаемости видов комплекса *Ph. notable* в различных растительных сообществах показал, что виды *Ph. album*, *Ph. leucophaeum* и *Ph. notable* s.str. предпочитают крупные древесные остатки в лесах умеренного пояса и тайге. Напротив, аридный морфотип *Ph. notable* не был обнаружен в лесах умеренного пояса и таежной зоне; ареал обитания представителей этой группы ограничен безлесными сообществами степных и пустынных регионов.

### 6.6. Описание нового вида *Ph. pseudonotabile*

В совокупности отличительные особенности экологии, данные филогенетического анализа и морфологические различия позволяют нам описать исследованные образцы *Ph. notable* из аридных регионов как новый вид.

*Physarum pseudonotabile* Novozh., Schnittler et Okun, MycoBank MB800893, (Novozhilov et al., 2013) (рис. 4).

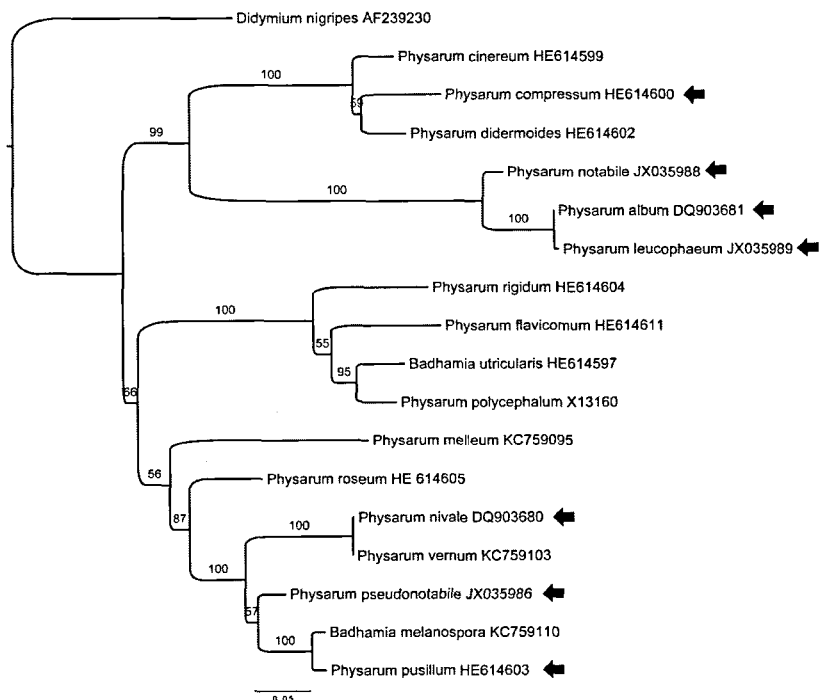


**Рисунок 4.** Морфологические признаки аридного морфотипа *Ph. notable* (A-G, LE 255438), *Ph. album* (H, I, LE 259241), *Ph. leucophaeum* (J, K, LE 45842), *Ph. nivale* (L-N, LE 285902), *Ph. notable* s.str. (O-S, LE 255700) и *Ph. pusillum* (T-X). **А.** Два закрытых спорокарпа аридного морфотипа *Ph. notable* под бинокулярной лупой (БЛ); шкала = 100 мкм. **В.** Плазмодиокарпное

плодоношение; шкала = 100 мкм. **С.** Открытый спорокарп с белыми узелками извести в капиллиции (стрелка, БЛ); шкала = 100 мкм. **Д.** Сканирующая электронограмма (СЭМ) открытого спорокарпа с нитями капиллиция (стрелки) и узелками извести; шкала = 100 мкм. **Е.** Споры в сложном микроскопе (СМ, иммерсионное масло, 100х объектив, вид сверху и сбоку); шкала = 10 мкм. **Ф.** Сканирующая электронограмма споры. **Г.** Детали орнаментации споры (СЭМ).

### 6.7. Филогенетический анализ комплекса видов *Ph. notabile*

Основной целью данного анализа было показать таксономическое положение морфокомплекса *Ph. notabile* в системе семейства *Physaraceae*. Для этого, наряду с последовательностями полного гена SSU видов комплекса нами были взяты также последовательности этого гена представителей родов *Physarum* и *Badhamia*, не относящихся к морфокомплексу *Ph. notabile*. Результат анализа – филогенетическое дерево – представлено на рис. 5.



**Рисунок 5.** Филогенетическое дерево, построенное на основании полной последовательности гена SSU (2270 п.о.) 18 образцов. Анализ ML: программа IQ-Tree, модель эволюции TIM2 + G4, 10000 ультра-быстрых бутстрэпов. Значения поддержки бутстрэпа указаны у соответствующих ветвей. Вид *Didymium nigripes* использован в качестве внешней группы. Стрелками отмечены представители комплекса видов *Ph. notabile*. Масштабная линейка соответствует 0,05 нуклеотидных замен на одну позицию.

Из рисунка видно, что отмеченные стрелками представители морфокомплекса *Ph. notabile* не образуют единой моно- или парафилиетической группы в рамках семейства *Physarales*, таким образом не удовлетворяя филогенетическому критерию таксономического ранга ни в рамках классического кладизма, ни в рамках эволюционной систематики. Таким образом, отсутствует филогенетическое обоснование для группировки вышеуказанных видов комплекса *Ph. notabile* в систематическую группу; сходная морфология этих видов является следствием конвергентной эволюции и не может быть использована при построении таксономической системы. Схожие результаты получены при использовании в качестве генетического маркера частичной последовательности гена *tef1*.

Отдельного упоминания заслуживают близкородственные виды *Ph. album* (syn. *Ph. nutans*), *Ph. notabile* и *Ph. leucophaeum*. Листер (Lister, 1894) и Хагельштайн (Hagelstein 1944) описывают первые два вида как центры, окруженные бесчисленным разнообразием морфологических переходных форм, образующих «таксономический континуум», в пределах которого затруднено определение видов. В проведенных нами филогенетических анализах данные три вида всегда образуют монофилиетичную группу с максимальной степенью поддержки; при более детальном исследовании виды *Ph. leucophaeum* и *Ph. notabile* могут оказаться одним видом, описанным на разных континентах – в Европе и Северной Америке, соответственно.

## ГЛАВА 7. ФИЛОГЕОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИДА *PH.*

### *PSEUDONOTABILE*

Накопление большого массива данных по последовательностям вида *Ph. pseudonotabile* из разных регионов мира позволило нам провести филогеографический анализ, оценивающий степень взаимосвязи между географическим положением и филогенетическим статусом изолятов этого вида.

## 7.1. Разделение на генотипы

Для филогеографического анализа было отобрано 89 частичных последовательностей гена SSU. На начальном этапе филогеографического анализа необходимо было разбить имеющийся набор данных на группы (генотипы) для дальнейшего анализа. 69 образцов из 89 относятся к трансекте, проходящей по территории Центральной Азии. Нами был использован метод, описанный в работе по филогеографии рода *Gagea* (сем. лилейные) (Zarrei et al., 2012). В результате такого подхода массив данных разделяется на 8 генотипов (А-Н). Оценочная функция Chao2, будучи приложенной к кривой накопления генотипов, выдает финальное значение  $6,00 \pm 0,00$  для шести основных генотипов из 69 образцов, относящихся к Центрально-азиатской трансекте (рис. 19 В). Для восьми генотипов, к которым относятся 91 образец, значение Chao2 равно  $8,0 \pm 0,25$  генотипов. Согласно этим значениям, исследование должно быть завершено на 100% как для данных с трансекты, так и для полного набора данных, т.е. нахождение новых генотипов не является вероятным.

Наиболее распространен генотип А, наиболее часто встречающийся среди образцов Центральной Азии и США. Генотип В в основном распространен на территории Таримского бассейна; за двумя исключениями, генотип D ограничен другим большим среднеазиатским бассейном – впадиной Великих озер (Монголия). Генотипы С, G и Н встречаются повсеместно в Центральной Азии, однако, последний имеет более широкое распространение, так как он был самым часто встречающимся среди образцов из Патагонии (Аргентина) и Омана. Генотип Е представлен одним образцом из Техаса (США), и, наконец, генотип F был найден один раз в Южной Дакоте (США) и один раз в Северном Омане.

Для выявления возможной корреляции между географическим положением изученных изолятов и генетическими расстояниями нами был проведен тест Мантеля. Между матрицами расстояний для образцов с трансекты была выявлена значительная степень корреляции ( $r = 0,124$ ), что достоверно больше значений при рандомизированных тестах. Существенная корреляция также была обнаружена и для полного массива образцов:  $r = 0,110$ .

## 7.2. Филогенетический анализ.

В рамках филогеографического анализа также было необходимо провести реконструкцию филогенетических взаимоотношений изучаемых

образцов *Ph. pseudonotabile*. Клады, полученные при филогенетическом анализе, в основном совпадают с генотипами, полученными путем сравнения нуклеотидных последовательностей. Статистическая поддержка бутстрэпа большей частью высокая: генотип А – 40, В – 75, С – 100, D, Е – 82, F – 99, G – 43, H – 99. Аналогичные данные были получены при анализе с использованием маркерного гена *tef1*.

Результаты, полученные методом выявления генотипов, говорят о наличии ограниченных определенным ареалом групп генотипов, а тест Мантеля, подтверждает, что несмотря на высокую мобильность пропагул миксомицетов и высокую вероятность перенос их спор на большие расстояния, в более широком масштабе, даже это не может обеспечить абсолютно независимого от географических барьеров случайного распределения изолятов. Полученные данные, таким образом, подтверждают верность теории умеренного эндемизма в отношении миксомицетов. Не исключено, что дальнейшие исследования в данной области покажут, что выявленные генотипы вида *Ph. pseudonotabile* соответствуют отдельным биологическим видам.

Кроме того, из полученных данных можно сделать предположение о преобладании тех или иных стратегий размножения миксомицетов. В наборе данных присутствует большое количество идентичных последовательностей, что говорит о наличии среди изолятов возможных клонов. В основном эти клоны приурочены к одному местоположению. Возможно, в краткосрочной перспективе бесполое размножение дает преимущество при заселении новой территории из-за отсутствия необходимости поиска полового партнера. Эти данные соответствуют выводам, сделанным авторами в работе Schnittler, Tesmer (2008). Таким образом, чередования полового и бесполого размножений у миксомицетов могут быть связаны с процессами захвата новых ареалов и их освоения.

## ВЫВОДЫ

1. Комплексный морфологический и молекулярный анализ изолятов *Ph. notabile* из аридных районов позволил отделить их в качестве нового для науки вида – *Ph. pseudonotabile*.
2. Филогенетический анализ на основе генов 18S SSU рДНК и *tef1* показал генетическую гетерогенность и полифилетичность видового комплекса *Ph. notabile* в рамках порядка Physarales.
3. Установлено, что виды *Ph. notabile* и *Ph. leucophaeum* имеют схожее морфологическое строение и множество переходных форм, а также

образуют монофилетичные ветви с максимальной степенью поддержки на дендрограммах.

4. Показано, что *Ph. album* формирует сестринскую группу к видам *Ph. leucosphaeum* и *Ph. notabile*, однако наиболее удален на дендрограмме от остальных изученных таксонов комплекса.
5. Филогеографический анализ показал наличие слабой корреляции между филогенетической структурой вида *Ph. pseudonotabile* и географическим положением изолятов: из 8 найденных генотипов как минимум два (B, D) демонстрируют географическую приуроченность; коэффициент корреляции по тесту Мантеля составляет 0,124.
6. Показано, что филогенетический анализ на основе комбинации генетических маркеров SSU и *tef1* в сочетании с методами ML и BI является оптимальным инструментом для изучения генетической структуры таксономических групп миксомицетов на уровне от вида и выше.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### В изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Erastova D.A., Okun M.V., Fiore-Donno A.M., Novozhilov Y.K., Schnittler M. Phylogenetic position of the enigmatic myxomycete genus *Kelleromyxa* revealed by SSU rDNA sequences // *Mycological Progress*. 2013. Vol. 12 (3). P. 599-608.
2. Novozhilov Y.K., Okun M.V., Erastova D., Shchepin O., Zemlyanskaya I.V., García-Carvajal E., Schnittler M. Description, culture and phylogenetic position of a new xerotolerant species of *Physarum* // *Mycologia*. 2013a. doi: 10.3852/12-284.
3. Novozhilov Y.K., Schnittler M., Erastova D.A., Okun M.V., Schepin O.N., Heinrich E. Diversity of nivalicolous myxomycetes of the Teberda State Biosphere Reserve (Northwestern Caucasus, Russia) // *Fungal Diversity*. 2013. Vol. 59 (1). P. 109-130.

### В сборниках трудов, материалов и тезисов конференций:

4. Окунь М.В., Новожилов Ю.К., Шнитлер М. Генотипическое разнообразие вида *Physarum notabile* T. Macbr. (Мухомыцеты) в аридных районах Евразии // V Международная конференция «Изучение грибов в биогеоценозах». Пермь, 2009. С. 175-178.

5. **Окунь М.В.**, Новожилов Ю.К., Шнитлер М., Фиоре-Донно А.М. Генотипическое разнообразие вида *Physarum notabile* T. Masbr. (Myxomycetes) в аридных районах Евразии // Всероссийская конференция «Современные аспекты структурно-функциональной биологии растений и грибов». Орел, 2010. С. 223-227.
6. **Окунь М.В.** Генотипическое разнообразие вида *Physarum notabile* T. Masbr. (Myxomycetes) в аридных районах Евразии // XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2011". Москва, 2011. С. 154.
7. **Окунь М.В.** Новый вид *Physarum pseudonotabile* (Myxomycetes): молекулярная систематика и морфология // XIX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2012". Москва, 2012. С. 151-152.
8. **Okun M.V.**, Fiore-Donno A.M., Novozhilov Y.K., Schnittler M., Zemlianskaia I.V., Erastova D.A. Molecular Phylogeny and Phylogeography of *Physarum notabile* // XVI Congress of European Mycologists. Halkidiki, Porto Carras, 2011. P. 48-49.
9. **Okun M.V.** Molecular Phylogeny of Myxomycetes // III Moscow Conference «Molecular Phylogenetics» (MolPhy-3). Москва, 2012.
10. **Okun M.V.**, Novozhilov Y.K., Haeseler A. Assessing the hidden biodiversity of Myxomycetes using molecular methods // BioSyst.EU Global Systematics. Vienna, Austria, 2013. P. 155.



---

Подписано в печать 13.11.13. Формат 60×84 1/16.  
Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 1,0.  
Тираж 100 экз. Заказ 126.

---

Отпечатано с готового оригинал-макета  
Издательство СПбГЭТУ «ЛЭТИ»  
197376, С.-Петербург, ул. Проф. Попова, 5