

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук

На правах рукописи

**Научный доклад
об основных результатах подготовленной
научно-квалификационной работы (диссертации)**

**«СКРЫТОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ТЕМНОСПОРОВЫХ МИКСОМИЦЕТОВ
(МУХОМУСЕТЕС): ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТЫ»**

по направлению подготовки

06.06.01 Биологические науки

03.02.12 Микология

Аспирант

Щепин Олег Николаевич

Научный руководитель д.б.н., г.н.с., проф. Новожилов Юрий Капитонович

Санкт-Петербург

2020

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Знания о видовом и экологическом разнообразии и распространении почвенных микроскопических эукариот (протист) крайне фрагментарны. Во многом это связано с тем, что, в отличие от водных протист, почвенные протисты недоступны прямому наблюдению в субстратных пробах и требуют применения культуральных методов исследования, которые, в свою очередь, не позволяют выявить значительную часть таксономического разнообразия населяющих почву протист.

Миксомицеты (*Mucromycetes* = *Mucogastria*) – одна из таких групп, насчитывающая более 1000 видов из 5 порядков, принадлежащих двум эволюционным ветвям – темнеспоровым и светлоспоровым миксомицетам. Они оказывают существенное влияние на состав и численность дрожжей и бактерий, поддерживая баланс между бактериальным и грибным процессом разложения органического вещества. В их жизненном цикле сочетаются микроскопические трофические стадии амёб и зооспор, многоядерные плазмодии, а также часто хорошо заметные в природе плодовые тела (спорокарпы), сохраняющиеся в виде гербарных образцов. Трофические стадии (плазмодии, миксамебы и зооспоры) по морфологическим признакам невозможно идентифицировать до вида, за редкими исключениями.

Практически все виды описаны на основании морфологических признаков спорокарпов. Исследования экологии и биогеографии миксомицетов также до сих пор проводятся практически исключительно на основании регистрации спорокарпов и видового определения их на уровне морфологических видов, без применения молекулярно-генетических методов исследований. Эксперименты по скрещиванию изолятов в культуре (например, Novozhilov et al., 2013) и начавшие появляться в последнее десятилетие молекулярно-генетические исследования свидетельствуют о том, что морфологические признаки зачастую не позволяют надёжно определить границы вида (Walker, Stephenson, 2016), а реальное видовое разнообразие, вероятно, на порядок больше описанного. Это во многом связано с наличием комплексов репродуктивно изолированных криптических видов (Aguilar et al., 2013; Novozhilov et al., 2013; Feng and Schnittler, 2015; Dagamac et al., 2017). Кроме того, результаты ряда метагеномных исследований показывают, что экологические ниши и географическое распространение некоторых видов миксомицетов могут быть значительно шире, чем считалось на основании данных о находках плодовых тел (Kamono et al., 2013; Fiore-Donno et al., 2016; Voss et al., 2019).

Цели и задачи исследования

Цель исследования – выявить скрытое разнообразие темноспоровых миксомицетов некоторых горных и равнинных районов Европы.

Задачи:

1. На примере нескольких морфовидов (*Lepidoderma chailletii*, *Lamproderma ovoideum*, *Physarum albescens*, *Didymium dubium*, нивальные виды рода *Diderma*) получить данные о внутривидовом генетическом разнообразии темноспоровых миксомицетов.

2. Расширить базу референсных последовательностей гена 18S рРНК темноспоровых миксомицетов.

3. При помощи ДНК-метабаркодинга оценить различия генетического разнообразия и таксономического состава группировок темноспоровых миксомицетов в почвах некоторых горных и равнинных районов Евразии (Нижне-Свирский заповедник, Центрально-Лесной заповедник, Хибины, немецкие Альпы, природный парк Вулканы Камчатки, заповедник Баотианман).

4. Сравнить оценки разнообразия, выявленного ДНК-метабаркодингом, с оценками разнообразия, полученными для этих территорий классическими методами (сбор плодовых тел).

Научная новизна результатов

Впервые в России были проведены исследования генетического разнообразия и таксономического состава почвенных группировок миксомицетов нескольких горных и равнинных территорий Европы и Азии с применением методов метагеномики и секвенирования нового поколения (NGS). Получены первые данные о распространении трофических стадий почвенных миксомицетов на малом и большом географических масштабах. Впервые показана широкая распространенность и обилие видов миксомицетов нивальной экологической группы в нетипичных для этой группы местообитаниях. Впервые исследована генетическая структура популяций видов *Physarum albescens*, *Lamproderma ovoideum*, *Lepidoderma chailletii*, *Didymium dubium* и нивальных видов рода *Diderma* на основании анализа одного или нескольких генетических маркеров. Было произведено уточнение классификации Мухомycetes на основе генетических признаков. Была создана первая курируемая электронная информационная система референсных нуклеотидных последовательностей (ДНК-штрихкодов) миксомицетов, онлайн-ресурс размещен в сети Интернет (<http://dna.myxomycetes.org>) и продолжает пополняться.

Теоретическая и практическая значимость проведенных исследований

Полученные результаты можно будет использовать для дальнейшей разработки концепции вида, при изучении вопросов о влиянии географических и экологических барьеров на течение процессов генетической дивергенции у протистов, грибов и других свободноживущих микроорганизмов в контексте постулата "все есть везде, но среда отбирает". Созданные в ходе работы биоинформатические пайплайны анализа метагеномных данных, компьютерные программы и курируемая информационная система ДНК-штрихкодов облегчат дальнейшие исследования в области молекулярной экологии миксомицетов.

Методология и методы исследования

В работе использованы методы молекулярной экологии (ДНК-меташтрихкодирование, или ампликонная метагеномика), молекулярно-филогенетический подход (секвенирование и анализ одного или нескольких генетических маркеров) и генотипирование (Genotyping by Sequencing, GBS). Также были использованы методы световой (СМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Положения, выносимые на защиту

1. Виды миксомицетов *Physarum albescens*, *Lamproderma ovoideum*, *Lepidoderma chailletii* и *Didymium dubium* представляют собой комплексы криптических видов, некоторые из которых приурочены к ограниченным участкам общего ареала распространения видового комплекса и, возможно, являются эндемиками.
2. В природных популяциях *Ph. albescens* распространено как половое размножение, так и апомиксис.
3. Нивальные виды рода *Diderma* включают семь видов, в том числе один новый для науки вид *Diderma kamchaticum*.
4. Темноспоровые миксомицеты в почве формируют группировки, высоко гетерогенные и на большом, и на малом географических масштабах, с небольшим числом убиквитарных MOTU и значительным числом редких MOTU.

Апробация результатов исследования

Результаты работы были изложены на IX и X Международном конгрессе по систематике и экологии миксомицетов (Танабе, Япония, 2017; Турриальба, Коста Рика, 2020), VIII Всероссийской микологической школе-конференции с международным участием «Концепции вида у грибов: новый взгляд на старые проблемы» (Москва, 2017),

IV (XII) Международной ботанической конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2018), международном симпозиуме Биоразнообразие: геномика и эволюция BioGenEvo-2018 (Новосибирск, 2018), международном симпозиуме Современные достижения в популяционной, эволюционной и экологической генетике: МАРЕЕГ-2019 (Владивосток, 2019), международном симпозиуме 4-th Thünen Symposium on Soil Metagenomics (Брауншвейг, Германия, 2019), а также на заседаниях лаборатории систематики и географии грибов БИН РАН (Санкт-Петербург, 2016, 2017, 2018, 2019).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Приведены сведения о жизненном цикле, систематике, видовом разнообразии и основных экологических группах миксомицетов (Gray, Alexopoulos, 1968; Stephenson et al., 2008, 2011; и др.). Представлен краткий обзор работ, посвященных молекулярно-филогенетической системе миксомицетов (Fiore-Donno et al., 2008; Fiore-Donno et al., 2010; Fiore-Donno et al., 2012; Fiore-Donno et al., 2013; Nandipati et al., 2012; и др.).

Приведен подробный анализ литературных данных о криптических видах в пределах морфологически очерченных видов миксомицетов (Aguilar et al., 2013; Novozhilov et al., 2013; Feng and Schnittler, 2015; Dagamac et al., 2017). Также были подробно проанализированы работы, посвященные изучению скрытого разнообразия миксомицетов в природных субстратах при помощи различных вариантов метагеномного подхода (Kamono et al., 2009a,b; Ko et al., 2009; Kamono et al., 2013; Clissmann et al., 2015; Fiore-Donno et al., 2016; Voss et al., 2019).

В результате обобщения проанализированных данных отмечена слабая изученность скрытого разнообразия миксомицетов, в том числе темнеспоровых видов, отмечена неполнота и ненадежность существующих коллекций ДНК-штрихкодов и сформулирован ряд актуальных вопросов, связанных с видовым разнообразием, экологией и биогеографией миксомицетов.

Глава 2. Материалы и методы

Приведена краткая характеристика объектов исследования: темнеспоровых миксомицетов как группы, а также ряда видов, выбранных в качестве моделей исследования (*Physarum albescens*, *Lamproderma ovoideum*, *Lepidoderma chailletii*, *Didymium dubium* и нивальных видов рода *Diderma*). В частности, описаны их географическое распространение, особенности экологии, определительные признаки плодовых тел. Приведено подробное описание использовавшихся материалов и методов их исследования: места сбора материала (плодовых тел и образцов природных субстратов); источники гербарных образцов; методы выделения ДНК из образцов плодовых тел и субстратов; методы амплификации целевых геномных участков и использованные праймеры; методы секвенирования ДНК-библиотек для метагеномного анализа и для анализа внутривидовой генетической структуры; биоинформатическая обработка данных ДНК-меташтрихкодирования и GBS с использованием программных сред VSEARCH и IPYRAD; построение молекулярных филогений с использованием метода максимального правдоподобия (ML) и байесовского подхода (BI); программное обеспечение, написанное

на языке Python3 для облегчения ряда задач, решавшихся в ходе работы; статистический анализ с использованием кластерного анализа, неметрического многомерного шкалирования, перестановочного многомерного дисперсионного анализа; микроскопические исследования морфологических признаков плодовых тел и спор гербарных образцов миксомицетов при помощи световой микроскопии и сканирующей электронной микроскопии. Молекулярно-генетические и микроскопические исследования проводились с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием БИН РАН «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов». Отмечена помощь ряда сотрудников различных учреждений в получении материалов исследования: М. Шниттлера, Н.Х.А. Дагамака, И.С. Приходько, В.И. Гмошинского, Д.А. Ерастовой, Ю. Ядзимы, Р. Каинелли, Г. Морено, П. Яник, А. Лопес-Вийальбы, Е.Н. Щепиной, Д. Азарова, П. Ламковски. Также отмечена помощь сотрудников Нижне-Свирского государственного природного заповедника, Лапландского государственного природного биосферного заповедника и Тебердинского государственного природного биосферного заповедника в проведении полевых работ.

Глава 3. Результаты

Генетическая структура популяций *Physarum albescens*

В ходе работы были получены последовательности SSU (ген малой рибосомной субъединицы, 18S рРНК) для 368 гербарных образцов *Ph. albescens*, собранных в различных горных системах северного полушария в 2010–2018 гг. Была обнаружена высокая внутривидовая изменчивость изученного фрагмента SSU: он был представлен 44 уникальными вариантами последовательности. Филогенетические деревья (ML и BI) показали разделение образцов на 18 филогрупп. Для части образцов из каждой филогруппы были получены последовательности генов субъединицы 1- α фактора элонгации трансляции (EF1A) и субъединицы 1 цитохром с-оксидазы (COI). Полученные 194 последовательности EF1A были представлены 58 уникальными вариантами, а 204 последовательности COI – 46 вариантами.

Молекулярные филогении, построенные на основании последовательностей SSU и EF1A 298 образцов 47 видов, относящихся к семейству Physarales, и трех видов рода *Lamproderma* в качестве внешней группы, показали, что *Ph. albescens* представляет собой генетически высоко изменчивую, но монофилетическую группу в пределах Physaraceae. Топология полученных филогений подтверждает парафилетическую природу рода *Physarum*. Нивальные виды рода *Physarum* (*Ph. albescens*, *Ph. alpinum*, *Ph. alpestre*, *Ph.*

nivale, *Ph. vernum*) не объединяются в одну кладу, а формируют три отдельные клады в пределах Physaraceae.

Трехгенная филогения (SSU, EF1A, COI) с высокой статистической поддержкой большинства ветвей разделила образцы *Ph. albescens* на те же 18 филогрупп, что и филогения SSU. Результаты анализа сочетаний вариантов трех независимо наследуемых генов предполагают отсутствие обмена аллельными вариантами и полового процесса между представителями 18 выявленных филогрупп, то есть, репродуктивную изоляцию между представителями разных филогрупп.

В результате генотипирования (GBS) 98 образцов *Ph. albescens*, выбранных из 7 филогрупп, было получено 25589 локусов, содержащих однонуклеотидные полиморфизмы. В ML филогении, построенной на основе этих данных, все основные ветви получили максимальную поддержку бутстрепа. Топология подтвердила разделение образцов на те же 7 филогрупп. Кроме того, в пределах двух филогрупп были обнаружены группы образцов, в пределах которых генетическое расстояние между образцами не превышало генетическое расстояние между парами технических реплик, служащих для оценки ошибки методики, что может служить свидетельством апомиксиса. Во всех случаях члены группы предположительно апомиктических клонов были собраны в пределах одной горной системы, но в разных точках, разделенных расстоянием до 60 км.

Представители некоторых из выявленных филогрупп были обнаружены в пределах только одного региона. Например, филогруппа Nd обильно представлена в горах Камчатки, а Hc в горах юго-запада Кольского п-ова (Хибины, Лапландский заповедник и Лувеньгские Тундры), однако они отсутствуют в сборах из других регионов.

Распределение числа филогрупп *Ph. albescens* различается между изученными горными массивами. Скалистые горы в США представлены 7 филогруппами, Сьерра Невада (Испания) – шестью, Каматка – пятью, Альпы (Германия, Франция, Италия, Словения) – четырьмя, Хибины, Лапландский заповедник и Лувеньгские Тундры – только тремя, несмотря на сопоставимое число изученных образцов. Кривые насыщения для разнообразия филогрупп и для вариантов SSU показали схожую картину. Наибольшее генетическое разнообразие *Ph. albescens* наблюдается в Скалистых горах, наименьшее – в горных массивах юго-запада Кольского п-ова.

Образцы, собранные одного снежника, в большинстве случаев относились к одной филогруппе, однако в некоторых случаях они могли относиться к разным филогруппам, вплоть до четырех филогрупп в одном локалитете.

Морфологические различия между образцами из разных филогрупп в большинстве случаев не прослеживаются. Были обнаружены достоверные различия в диаметре спор

между представителями филогрупп А, В и Е. Кроме того, образцы филогруппы В отличаются от остальных ржаво-красным цветом капиллиция в проходящем свете.

Молекулярно-филогенетический анализ *Lepidoderma chailletii*

Было изучено 37 образцов *L. chailletii*: 6 из Баварских и Французских Альп, 6 с Северного Кавказа, 6 из Хибин, 10 из Лапландского заповедника, 6 с о. Валаам (Карелия) и 3 из Ленинградской области. Выборка также включала 5 образцов *L. carestianum*. Для всех образцов были получены последовательности SSU, для части – COI и EF1A. Вместе с нуклеотидными последовательностями различных представителей рода *Lepidoderma*, загруженными из базы GenBank NCBI, выравнивания включали 42 последовательности SSU, 23 EF1A и 19 COI. Филогении (ML и BI), построенные на основании как отдельных генов, так и на комбинации SSU и EF1A, показали, что *L. chailletii* представляет собой полифилетический комплекс в пределах рода *Lepidoderma*, состоящий из трех филогрупп (Shcherpin et al., 2016). *Lepidoderma carestianum* выделяется в отдельную кладу с высокой статистической поддержкой. *Diderma fallax* занимает позицию, сестринскую *L. peyerimhoffii* в пределах рода *Lepidoderma*.

Выявленные филогруппы *L. chailletii* дополнительно различаются сайтами инсерционного редактирования в митохондриальном гене COI, которые проявляются как инсерции/делеции в рамке считывания белок-кодирующего гена.

Средний диаметр спор образцов *L. chailletii* из филогруппы 2 достоверно отличается от диаметра спор групп 1 и 2. Кроме того, образцы группы два отличаются более уплощенной формой плазмодиокарпов и отсутствием спорангиальных форм.

Молекулярно-филогенетический анализ нивальных видов рода *Diderma*

Было изучено 716 гербарных образцов представителей семейства Didymiaceae, в основном относящихся роду *Diderma* (25 видов), в первую очередь – к представителям шести нивальных видов этого рода, выделяемых Poulain et al. (2011). Образцы были собраны в ходе полевых работ в различных горных системах северного полушария в 2011–2018 гг. и определены по морфологическим признакам. Для них были получены последовательности SSU, для части образцов также получены последовательности EF1A.

Филогении (ML и BI), построенные на основании полученных последовательностей SSU, а также последовательностей, загруженных из базы GenBank NCBI, показали, что пять из шести нивальных видов рода *Diderma* (*D. alpinum*, *D. europaeum*, *D. fallax*, *D. meyeriae*, *D. niveum*) образуют отдельные монофилетические клады. Шестой вид, *D. microcarpum*, образует парафилетическую кладу, не имеющую значимой статистической поддержки. Кроме того, отдельная кладу сформирована образцами *Diderma*, близкими по морфологическим признакам к *D. meyeriae* и найденными в горах Камчатки и во

французских Альпах в нивальных условиях. *D. fallax* вновь заняла положение в пределах рода *Lepidoderma* в качестве ветви, сестринской по отношению к *L. peyerimhoffii*.

Двухгенные филогении (ML и BI), построенные по объединенным выравниваниям SSU и EF1A, показали, что все шесть выделяемых Poulain et al. (2011) нивальных видов рода *Diderma* формируют монофилетические клады с высокой статистической поддержкой. Положение *D. fallax* в пределах рода *Lepidoderma* также было воспроизведено. Отдельная монофилетическая клада вновь сформирована образцами, близкими по морфологическим признакам к *D. meyeræ* и найденными в горах Камчатки и во французских Альпах в нивальных условиях. На основании филогенетического положения и морфологических отличий от описанных видов рода *Diderma* был описан новый вид *Diderma kamchaticum* sp. nov. (Schnittler et al., в печати). Результаты анализа сочетаний вариантов двух независимо наследуемых генов предполагают отсутствие обмена аллельными вариантами и полового процесса между представителями семи нивальных видов рода *Diderma*, то есть, их репродуктивную изоляцию.

Наибольшая внутривидовая генетическая изменчивость была обнаружена у *D. microcarpum* (14 уникальных вариантов SSU) и у *D. europaeum* (110). У *D. niveum* было обнаружено 9 вариантов последовательности SSU, у *D. alpinum* и *D. meyeræ* по 4 варианта последовательности, а у *D. fallax* и *D. kamchaticum* по 3. Варианты последовательности SSU *D. microcarpum* демонстрируют неравномерное географическое распространение: последовательности группы 3 обнаружены только в образцах из европейских Альп, а группы 5 – только в образцах с Камчатки, в то время как последовательности группы 4 были встречены в сборах из всех изученных регионов северного полушария. Образцы, отнесенные по морфологическим и молекулярным признакам к виду *D. europaeum*, были обнаружены только в горных системах Европы. Из 10 образцов нового вида *Diderma kamchaticum* 9 были обнаружены в горах Камчатки и лишь один во французских Альпах, несмотря на многолетние исследования разнообразия нивальных миксомицетов, проводившиеся в Альпах.

Молекулярно-филогенетический анализ видов рода *Lamproderma*

Для проведения филогенетического анализа было создано нуклеотидное выравнивание, содержащее 443 последовательности SSU, которые представляют собой все доступные последовательности для видов рода *Lamproderma*. В качестве внешней группы были выбраны последовательности шести видов рода *Meriderma*. ML филогения показала полифилетическую природу трех видов рода *Lamproderma*: *L. puncticulatum*, *L. columbinum*, *L. ovoideum*. Некоторые крупные внутривидовые клады *L. ovoideum* представлены последовательностями образцов, собранных только в одной горной системе.

Молекулярно-филогенетический анализ образцов *Didymium dubium*

Были получены последовательности SSU всех образцов *Didymium dubium*, собранных во время полевых работ в горах Камчатки (2017 г), в национальном парке Сьерра Невада (Испания, 2017 г) и в баварских Альпах (2013–2018 гг). Молекулярная филогения, построенная на основании 73 последовательностей SSU, относящихся к *Didymium dubium*, *D. difforme*, *D. nivicola* и *Lepidoderma chailletii*, показала наличие по меньшей мере пяти крупных филогрупп в пределах *D. dubium*. Представители одной из филогрупп были найдены сразу в нескольких удаленных регионах Евразии (Камчатка, Сьерра Невада, баварские Альпы), в то время как образцы из четырех других филогрупп были обнаружены в пределах лишь одного из этих трех исследованных регионов.

Данные ДНК-меташтрихкодирования природных субстратов

Был произведен биоинформатический анализ четырех ранее опубликованных наборов данных ДНК-меташтрихкодирования (Borg Dahl et al., 2018a,b; Shchepin et al., 2019a; Gao et al., 2019) и восьми неопубликованных. Данные включали в себя 374 образца. Эти образцы представляли собой пробы почвы из различных регионов (хвойные леса Центрально-Лесного заповедника, Нижне-Свирского заповедника, Большого Березового о-ва и окрестностей п. Васкелово в Ленинградской области, высотные трансекты в Хибинах, на Камчатке, на северном Кавказе, в баварских Альпах и в горных субтропических лесах центрального Китая), пробы воды из различных водоемов в Красноярском крае, пробы торфа и образцы живых сфагновых мхов северо-востока Германии, а также образцы подушек мхов из Антарктиды (о-в Кинг-Джордж и оазис Ширмахера). Все проанализированные данные были получены с использованием одинаковой пары праймеров, специфичных к фрагменту SSU большинства темнеспоровых миксомицетов.

В результате анализа было выявлено 951 MOTU (молекулярных операциональных таксономических единиц), кластеризованных с 98% порогом сходства нуклеотидных последовательностей и отнесенных к темнеспоровым миксомицетам (Columellomycetidae) на основании генетического сходства и филогенетического положения. Из них 244 MOTU (24% от общего числа) нашли совпадение видового уровня (98% сходства) с референсными ДНК-штрихкодами.

Почвенные группировки темнеспоровых миксомицетов восьми районов исследования

Среди проб почвы наибольшее богатство MOTU темнеспоровых миксомицетов и по наблюдаемому, и по экстраполированным оценкам обнаружено в пробах с Камчатки (склоны Авачинского вулкана), наименьшее – в пробах из Нижне-Свирского заповедника и из горных субтропических лесов центрального Китая (заповедник Баотианман). Богатство

MOTU для почвенных проб из остальных районов исследования было сопоставимым. Индекс разнообразия Шеннона был наибольшим для проб с Камчатки, из Хибин и из Центрально-Лесного заповедника, а наименьшим – для проб из Нижне-Свирского заповедника и из центрального Китая.

График частоты встречаемости MOTU в пробах представляет собой классическую кривую, характерную и для данных о разнообразии миксомицетов, основанных на регистрации плодовых тел. 75% MOTU были обнаружены в не более чем 10 изученных пробах (3% от общего числа проб почвы). Почти половина MOTU была обнаружена в не более чем двух пробах. 80% MOTU встретились лишь в одном или двух из районов исследования. При этом два MOTU, отнесенные к нивальному виду *Meriderma cribrarioides*, присутствовали в пробах почвы из всех восьми районов исследования, включая субтропический лес в Китае. Лишь 25 MOTU (2,6% от общего числа) были обнаружены в пробах хотя бы из шести районов исследования. Из этих 25 MOTU 16 относились к видам нивальной группы, причем 12 из них – к роду *Meriderma*. Одна MOTU, найденная в семи районах исследования, показала 100% генетическое сходство с последовательностью SSU, полученной из изолятов миксамеб, выделенных с коры живых деревьев в Германии (Walochnik et al., 2004).

Результаты неметрического многомерного шкалирования (NMDS) показали, что почвенные группировки темноспоровых миксомицетов в субтропических лесах заповедника Баотианман в центральном Китае в наибольшей степени отличаются по составу от группировок остальных районов исследования. Проанализированные пробы из равнинных таежных лесов трех районов Ленинградской области (Нижне-Свирского заповедника, Большого Березового о-ва и окрестностей п. Васкелово) группируются вместе. Пробы из Центрально-Лесного заповедника наименее однородны по составу MOTU темноспоровых миксомицетов и не формируют компактной группы на графике NMDS.

Почвенные группировки темноспоровых миксомицетов таежных лесов Нижне-Свирского заповедника

Была проанализирована 51 проба почвы и растительного опада с четырех пробных площадок, представляющих собой четыре стадии восстановления леса после пожара (7 лет, 15, 30 и контрольная площадка) (Shchepin et al., 2019a). С помощью ДНК-метагеномного кодирования было выявлено 101 MOTU, относящиеся к темноспоровым миксомицетам. Из них 28 MOTU было определено до уровня вида. Они были отнесены к 15 видам из 9 родов порядков Stemonitales и Physarales в традиционном понимании, среди них четыре вида не регистрировались на территории Ленинградской области в виде плодовых тел: *D. europaeum*, *Lamproderma carpatiensis* ad int., *Meriderma cribrarioides* и *Ph.*

albescens. Десять выявленных видов относятся к нивальной экологической группе. Всего к MOTU нивальных видов было отнесено 14,2% от общего числа нуклеотидных прочтений и они были обнаружены в 47 из 51 пробы. Согласно индексу Chao1, проанализированных проб было достаточно для того, чтобы выявить 98% разнообразия MOTU темнеспоровых миксомицетов изучаемой территории. Наибольшее богатство MOTU было выявлено на площадке через 15 лет после пожара, наименьшее – на площадке 30 лет.

Ни одна MOTU не была обнаружена во всех пробах. Самой распространенной оказалась MOTU, встретившаяся в 33 пробах и занимающая в филогении положение в пределах Stemonitidales, близко к *Stemonitis* spp. Лишь 32% MOTU были выявлены в пробах со всех четырех пробных площадок, хотя расстояние между площадками не превышает 3,6 км. В пределах пробных площадок 20×20 м даже самые часто встречающиеся MOTU не были распространены равномерно во всех пробах.

В графиках NMDS пробы, собранные с одной пробной площадки, группировались вместе, отдельно от проб с других площадок. Очевидный градиент, соответствующий стадиям восстановления растительного сообщества после пожара, на графиках не выявлялся. Напротив, пробы с контрольной площадки и пробы с площадки, представляющей 7 лет после пожара, располагались ближе друг к другу, чем остальные пробы. Градиент не наблюдался также и в показателях разнообразия (индексы Симпсона и Шеннона). Результаты перестановочного многомерного дисперсионного анализа (PerMANOVA) показали, что 20,7% изменчивости состава группировок темнеспоровых миксомицетов объясняется влиянием пробной площадки ($P=0.001$). Кроме того, дополнительно 13,9% изменчивости объясняется месяцем пробоотбора (июнь или сентябрь, $P=0.001$). Ряд MOTU, например, *D. alpinum* OTU53, *M. cribrarioides* OTU67, Physarales OTU18, Physarales OTU45 и Stemonitidales OTU79, были выявлены в большом числе проб, собранных в один из двух месяцев, и почти или полностью отсутствовали в пробах, собранных во второй месяц.

Почвенные группировки темнеспоровых миксомицетов на высотном градиенте в баварских Альпах

Было проведено сравнение разнообразия нивальных миксомицетов, выявленного на высотной трансекте в баварских Альпах в виде образцов плодовых тел за четыре сезона полевых работ, и скрытого разнообразия трофических стадий в пробах почвы, выявленного при помощи ДНК-меташтрихкодирования (Borg Dahl et al., 2018b). Всего было собрано и определено до уровня вида по морфологическим признакам 711 колоний плодовых тел темнеспоровых миксомицетов, что составило список из 28 видов. Для 537 образцов (75%) удалось получить последовательность SSU для прямого сравнения с MOTU. Большинство

видов было представлено более чем одним вариантом последовательности SSU; всего было выявлено 70 уникальных последовательностей.

Из проб почвы было получено 201 MOTU, из них лишь 59 (29%) нашли совпадение с референсными последовательностями со сходством видового уровня. Из 70 уникальных последовательностей SSU, полученных из плодовых тел в районе исследования, лишь 53 имели сходство с выявленными MOTU не менее 99.1%. Остальные 17 последовательностей, полученных из плодовых тел, не имели прямого совпадения среди MOTU. В целом на всех участках трансекты разнообразие последовательностей SSU, выявленное ДНК-метабаркодингом, было выше разнообразия последовательностей, полученных путем секвенирования ДНК, выделенной из плодовых тел.

Представители родов *Lamproderma* и *Diderma* составляли 80% находок плодовых тел. Среди MOTU, определенных до уровня рода или вида, представители этих двух родов также преобладали (64% всех нуклеотидных прочтений). Доля представителей родов *Meriderma*, *Physarum* и *Didymium* среди MOTU была выше, чем среди находок плодовых тел (13.2/5.7%, 8.9/4.8% и 7.4/4.5%, соответственно). Наибольшим числом видов был представлен род *Lamproderma* – 7 и 11 видов среди MOTU и плодовых тел, соответственно.

Пик числа найденных плодовых тел для большинства видов (ежкром *Meriderma carestiae* и *Lamproderma sauteri*) приходился на верхне-среднюю часть трансекты (1500–1700 м над уровнем моря), в то время как для MOTU четкого пика в распределении по трансекте не наблюдалось. Тем не менее, средняя высота обнаружения для большинства видов на уровне MOTU было значимо сдвинуто к нижней части трансекты.

Почвенные группировки темнеспоровых миксомицетов на высотном градиенте в заповеднике Баотианман (Китай)

Из 75 проб почвы из разных типов субтропического леса на высотном градиенте в заповеднике Баотианман в центральном Китае было получено 195 MOTU, отнесенных к темнеспоровым миксомицетам (Gao et al., 2019). Полнота выявления богатства MOTU исследованной территории была оценена в 98.95%. Среднее количество MOTU в пробе составляло $34,51 \pm 9,84$. Более половины MOTU (105) были отнесены к порядку Physarales в традиционном понимании, остальные (90) – к Stemonitidales. Всего 16 MOTU нашли совпадение видового уровня с референсными последовательностями SSU, что дало список из восьми видов. Из них только *Craterium minutum* ранее регистрировался в заповеднике по находкам плодовых тел. Четыре выявленных среди MOTU нивальных вида (*Lamproderma arcyrioides*, *L. cristatum*, *L. piriforme*, *M. cribrarioides*) являются новыми для заповедника, три из них также являются новыми для Китая. Только 29 MOTU темнеспоровых

миксомицетов из 195, выявленных в заповеднике, встречались в других регионах, исследованных с помощью ДНК-меташтрихкодирования.

Показатели альфа-разнообразия значительно различались между шестью исследованными типами леса в заповеднике Баотуанман (богатство MOTU: $F=4,53$, $P < 0,01$; индекс Шеннона: $F=6,07$, $P < 0,01$). Значимых различий для показателей альфа-разнообразия между тремя разными сезонами пробоотбора (апрель, июль, октябрь) выявлено не было. Результаты регрессионного анализа показали, что для богатства MOTU наиболее сильными предикторами были тип леса, отношение C:N, содержание K, Na и высота над уровнем моря. Совместное действие этих факторов объясняло 35% изменчивости богатства MOTU ($AIC=190,51$, $R^2_{adj}=0,35$). Для показателей разнообразия наиболее сильными предикторами были тип леса, сомкнутость крон, отношение C:N, содержание воды, Ca, K и Mg. Совместное действие этих факторов объясняло 34% изменчивости значений индекса Шеннона ($AIC=191,81$, $R^2_{adj}=0,34$). На графиках NMDS пробы группировались в соответствии с типами леса, в которых проводился пробоотбор. Результаты PERMANOVA подтвердили наличие значимых различий в составе группировок миксомицетов в различных типах леса ($F=2,830$, $R^2=0,217$, $P=0,001$). Значимых отличий для проб, собранных в разные сезоны, обнаружено не было. Было выявлено одиннадцать переменных, значимо влияющих на состав группировок миксомицетов в пробах почвы. Три группы факторов – переменные, связанные со структурой растительных сообществ, эдафические и пространственные факторы – объясняли 10,99%, 5,17% и 9,02% изменчивости состава сообществ, соответственно. Наиболее сильное влияние на состав почвенных группировок миксомицетов оказывал тип леса: этот фактор в одиночку объяснял 9,44% изменчивости.

Темноспоровые миксомицеты в пробах воды

В пяти пробах планктона, отфильтрованного из озер в окрестностях Красноярска на глубине 1 м, было выявлено 28 MOTU, отнесенных к темноспоровым миксомицетам. Более половины MOTU (18) не встречалось в наборах данных из других субстратов и регионов. Сходство с референсными последовательностями позволило определить 12 MOTU до уровня вида, что составило список из 8 видов: *Diderma fallax*, *D. montanum*, *Lamproderma ovoideum*, *Lepidoderma chailletii*, *M. echinulatum*, *M. spinulosporum*, *Physarum albescens*, *Ph. album*, *Ph. melleum*. Шесть из этих видов относятся к нивальной группе (32% от числа MOTU). Большинство MOTU было встречено только в одной пробе, лишь две MOTU были обнаружены в двух разных пробах. Среднее число MOTU в пробе составляло $6 \pm 4,12$.

Темноспоровые миксомицеты в пробах торфа и сфагнома

В трех кернах торфа и 13 пробах живых побегов мха *Sphagnum* sp., собранных в ветровых болотах на северо-востоке Германии, было выявлено 22 MOTU, отнесенных к темнospоровым миксомицетам. Пять MOTU было определено до уровня вида на основании сходства последовательностей с референсными ДНК-штрихкодами (*Diderma sauteri*, *Didymium anellus*, *D. iridis*, *Lamproderma ovoideum*, *Stemonitis flavogenita*). *L. ovoideum* принадлежит к нивальной экологической группе (21%). Половина выявленных MOTU не встречалась в наборах данных из других субстратов и районов исследования. Почти треть MOTU (7) относилась к роду *Didymium*. К порядку Stemonitidales было отнесено к 8 MOTU, остальные 14 – к Physarales.

Лишь три MOTU были общими и для торфяных кернов, и для проб живых побегов *Sphagnum* sp: *D. sauteri*, *D. anellus* и одна MOTU, отнесенная к Physarales. В пробах живого *Sphagnum* sp. наиболее часто встречающиеся MOTU, обнаруженные в 7 пробах из 13, были отнесены к *Leocarpus* sp. и Didymiaceae. В торфяных кернах наиболее часто встречающиеся MOTU были отнесены к *D. iridis*, *S. flavogenita* и Physarales (в двух из трех проб и наибольшее число нуклеотидных прочтений).

Темнospоровые миксомицеты в пробах мха из Антарктиды

В образцах подушек мхов из Антарктиды (о-в Кинг-Джордж и оазис Ширмахера) было выявлено 19 MOTU, отнесенных к темнospоровым миксомицетам. Десять MOTU нашла совпадения с референсными нуклеотидными последовательностями с уровнем сходства, достаточным для видового определения. Эти MOTU были отнесены к следующим видам: *Diderma alpinum*, *D. sauteri*, *Lamproderma arcyrioides*, *L. zonatum*, *Leocarpus fragilis*, *Lepidoderma chailletii*. Четыре из этих видов относятся к нивальной группе. Все шесть видов являются новыми для Антарктиды (Horak, 1966; Arambarri and Spinedi, 1989). Большая часть MOTU (16 из 19) была обнаружена и в наборах данных из других исследованных регионов. Так, 14 из этих MOTU были зарегистрированы также в таежных лесах в Ленинградской области, 13 в Хибинах, 6 в Центрально-Лесном заповеднике, а также по одной MOTU в баварских Альпах и субтропических лесах заповедника Баотианман.

Скрытое разнообразие представителей родов *Echinostelium* и *Echinosteliopsis*

Во всех доступных наборах данных ДНК-меташтрихкодирования миксомицетов был произведен поиск последовательностей, близких к последовательностям SSU микроскопических видов миксомицетов – *Echinosteliopsis oligospora* и видов порядка Echinosteliales в традиционном составе. В результате было обнаружено 15 уникальных последовательностей, близких к *Echinostelium bisporum* (73.1–95% сходства), и 4 последовательности, близкие к *Echinosteliopsis oligospora* (81.6–95.2% сходства), который является единственным описанным видом в своем роде. Филогения, полученная на основе

полных последовательностей SSU всех основных крупных эволюционных ветвей миксомицетов, подтвердила, что выявленные последовательности образуют две монофилетические ветви, включающие *Echinostelium bisporum* и *Echinosteliopsis oligospora* с высокой статистической поддержкой (Shcherin et al., 2019b).

На основании выявленного скрытого разнообразия миксомицетов, относящихся к роду *Echinosteliopsis*, положения данного комплекса в полученной филогении и морфологических отличий от представителей Echinosteliales было предложено выделение нового порядка Echinosteliopsidales в пределах Columellomycetidae (Wijayawardene et al., 2020).

Электронная информационная система МухоSeq

Совместными усилиями сотрудников трех научных учреждений была разработана и реализована первая курируемая электронная информационная система ДНК-штрихкодов миксомицетов МухоSeq. Система размещена на интернет-сервере (dna.muchomycetes.org). МухоSeq предназначена для хранения ДНК-штрихкодов миксомицетов (SSU, COI, EF1A), а также связанных с ними метаданных: праймеры, с которыми были амплифицированы последовательности, хроматограммы в формате ABI, фотографии связанных с ними гербарных образцов, информация о месте и дате сбора, таксономическая аннотация и история ее изменений. Реализована встроенная система визуализации хроматограмм, отображение карты обозначением точек сбора выделенных пользователем образцов, система поиска и фильтрации последовательностей с использованием регулярных выражений и системы Glob, отображение фотографий, привязанных к выделенным образцам, а также экспорт выбранных последовательностей и связанных с ними метаданных в табличной форме. Для наполнения МухоSeq производится секвенирование и фотографирование гербарных образцов широкого спектра видов миксомицетов из микологического гербария БИН РАН, гербария миксомицетов кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ, микологического гербария университета Алькала-де-Энарес (Испания), а также частных коллекций М. Шниттлера (Германия), М. Майер (Франция), А.В. Власенко (ЦСБС РАН) и И.В. Землянской (ВГМУ). Кроме того, проводится отбор нуклеотидных последовательностей миксомицетов, содержащихся в базе GenBank NCBI, на соответствие следующим критериям: 1) последовательность покрывает целевые фрагменты SSU, COI или EF1A; 2) присутствует ссылка на гербарный образец, из которого получена последовательность; 3) присутствует таксономическая аннотация до уровня вида; 4) филогенетическое положение последовательности в референсной филогении подтверждает таксономическую аннотацию. На данный момент в МухоSeq загружено около 10% накопленных данных по нуклеотидным последовательностям миксомицетов.

Глава 4. Обсуждение

Скрытое биологическое разнообразие миксомицетов можно разделить на две компоненты: 1) наличие репродуктивно изолированных видов-двойников (криптических видов) в пределах видов, описанных по морфологическим признакам, и 2) наличие видов, которые ускользают от детекции во время полевых исследований разнообразия при помощи стандартных методик, например, из-за того, что эти виды редко или никогда не формируют плодовых тел в районе исследования, хотя присутствуют в виде трофических стадий. В данном исследовании первый аспект изучался при помощи анализа структуры популяций отдельных видов темнеспоровых миксомицетов по трем независимо наследуемым генам, а также при помощи генотипирования путем секвенирования (GBS). Второй аспект скрытого разнообразия выявлялся при помощи анализа группировок темнеспоровых миксомицетов в образцах природных субстратов с использованием метагеномного подхода (ДНК-меташтрихкодирования).

Проведенное исследование подтвердило, что для миксомицетов характерно образование криптических видов в пределах морфологически очерченных видов (морфовидов). Это явление было впервые отмечено для миксомицетов еще во время экспериментов по скрещиванию изолятов модельных видов в 1960-х гг (Henney, 1967; Henney, Henney, 1968; Collins, 1976) и затем продемонстрировано на ряде примеров в нескольких молекулярно-филогенетических исследованиях последнего десятилетия (Aguilar et al., 2013; Novozhilov et al., 2013; Feng and Schnittler, 2015; Dagamac et al., 2017). Наше исследование значительно расширило выборку исследованных видов миксомицетов, показав наличие криптических видов в пределах *Didymium dubium*, *Lepidoderma chailletii*, *Lamproderma puncticulatum*, *L. columbinum*, *L. ovoideum*, *Physarum albescens*.

Другим важным результатом стало подтверждение существования криптических видов миксомицетов с ограниченным географическим распространением, то есть, эндемичных видов. Ранее это было показано для *Badhamia melanospora* (Aguilar et al., 2013) и *Hemitrichia serpula* (Dagamac et al., 2017). Нами наличие эндемичных криптических видов было показано для *Ph. albescens*, *D. dubium* и *L. ovoideum*. Кроме того, было показано, что *Diderma eurpaicum* не распространена за пределами горных систем Европы. Результаты применения метагеномного подхода свидетельствует о том же: большая часть MOTU темнеспоровых миксомицетов встречалась в почвенных пробах лишь одного из шести исследованных географических регионов. Это свидетельствует в пользу гипотезы умеренного эндемизма, сформулированной для протист Фойсснером (Foissner, 1999). В то же время, ряд криптических видов и MOTU показали чрезвычайно широкое географическое распространение, что свидетельствует о наличии механизмов дальнего переноса. Тем не

менее, само существование эндемичных видов свидетельствует о том, что дальний перенос должен быть достаточно редким событием, чтобы подобные виды сохранили ограниченное распространение.

В результате проведенного исследования *Ph. albescens* стал видом миксомицетов с наибольшим числом образцов, изученных молекулярно-генетическими методами на данный момент. Результаты анализа трех генов предполагают наличие в пределах этого морфовида как минимум 18 репродуктивно изолированных криптических видов. Метод GBS, впервые примененный для исследования миксомицетов, подтвердил гипотезу репродуктивной изоляции для представителей семи изученных филогрупп *Ph. albescens*. При помощи GBS впервые было подтверждено наличие апомиксиса в природных популяциях миксомицетов. ДНК-штрихкод SSU показал высокую разрешающую способность, позволяющую различить 17 из 18 криптических видов в пределах *Ph. albescens*.

ДНК-меташтрихкодирование ранее практически не применялось для исследования миксомицетов. Проведенный нами анализ последовательностей SSU, полученных из различных природных субстратов, позволил обнаружить неописанное разнообразие, близкое к видам *Leocarpus fragilis*, *Echinostelium bisporum* и *Echinosteliopsis oligospora* (Shchepin et al., 2019b).

Результаты исследования показывают, что структура почвенных группировок темнеспоровых миксомицетов чрезвычайно гетерогенна не только на большом географическом масштабе, но и в пределах небольших пробных площадок. Большая часть разнообразия представлена редкими MOTU, встречающимися всего в одной или двух пробах.

Среди выявленных при помощи ДНК-меташтрихкодирования видов некоторые являются нетипичными для почвы и растительного опада. Так, *Colloderma oculatum* и *Lepidoderma tigrinum* считаются классическими бриофильными видами, обитающими на мхах, покрывающих упавшие хвойные деревья, однако MOTU этих видов были обнаружены в значительном числе проб почвы или растительного опада из Хибин и таежных лесов Ленинградской области. *Echinosteliopsis oligospora* известен только по находкам на мертвых растительных остатках, но последовательности найдены в пробах почвы из трех разных регионов.

Интересным является обнаружение MOTU, относящихся к видам нивальной экологической группы, в значительном числе проб почвы из всех исследованных регионов, в том числе из субтропических горных лесов. Нивальные миксомицеты считаются узко специализированными видами, образующими плодовые тела на краю тающих снежников

весной в альпийском и субальпийском поясе гор (Ronikier and Ronikier, 2009). Ряд недавних сообщений показал, что нивальные миксомицеты могут формировать плодовые тела не только в горах, но и в равнинных лесах (Erastova and Novozhilov, 2015; Buchtoyarova et al., 2018; Yatsiuk and Leontyev, 2020; M. Pennanen, личное сообщение). Тем не менее, столь широкое присутствие этих видов в почве различных регионов является неожиданным, особенно в субтропических лесах заповедника Баотианман в центральном Китае, где зимой не образуется стабильный снежный покров, а нивальные виды в виде плодовых тел ранее не регистрировались (Gao et al., 2019; Shchepin et al., 2019a). MOTU нивальных миксомицетов также были обнаружены в планктонных пробах из водоемов в окрестностях Красноярска и в пробах живых побегов сфагновых мхов и торфа из верховых болот. Эти находки согласуются с потребностью трофических стадий нивальных миксомицетов в наличии слоя воды при культивировании, а также с их способностью существовать при комнатной температуре *in vitro* (Shchepin et al., 2014). Также MOTU нивальных видов миксомицетов составили почти половину MOTU, обнаруженных в образцах мхов из Антарктиды.

В группировках миксомицетов, выявленных в образцов мхов из Антарктиды, необычно небольшую долю в сравнении с данными по другим регионам составляют редкие MOTU, уникальные для этого района исследования. Действительно, лишь 3 MOTU из 19 не были найдены в других регионах, а 13 MOTU были найдены, помимо проб из Антарктиды, в трех и более районах исследования: в основном в таежных лесах Ленинградской области и в Хибинах, но также на Камчатке, в баварских Альпах и даже в субтропических лесах заповедника Баотианман. Это свидетельствует о существовании дальнего переноса пропагул миксомицетов в глобальном масштабе.

В пробах почвы из заповедника Баотианман наименьший процент MOTU нашел совпадение видового уровня с референсными последовательностями. Это объясняется тем, что подавляющее большинство референсных ДНК-штрихкодов миксомицетов было получено из образцов, собранных в горных системах Европы. Это также свидетельствует о наличии ярко выраженных широтных биогеографических паттернов в распространении миксомицетов, подтверждая закономерности, выявленные с помощью традиционных подходов (Stephenson and Stempen, 1994).

Также для почвенных группировок темноспоровых миксомицетов из заповедника Баотианман показано наименьшее разнообразие MOTU в сравнении с другими изученными регионами. Это может служить свидетельством в пользу того, что известный по находкам плодовых тел паттерн уменьшения разнообразия миксомицетов от бореальных лесов к топическим справедлив и для трофических стадий миксомицетов (Novozhilov et al., 2017),

однако для окончательного вывода требуется проведение расширенного пробоотбора на широтной трансекте.

Заключение

Примененные нами подходы (анализ трех несцепленных генов, генотипирование и ДНК-штрихкодирование) ранее практически не использовались при изучении миксомицетов, что позволило впервые получить данные о репродуктивной структуре популяций темноспоровых миксомицетов в высоком разрешении и на большом географическом масштабе на примере *Physarum albescens*, а также получить новые данные о структуре группировок темноспоровых миксомицетов в природных субстратах на разных географических масштабах. Впервые показано наличие комплексов криптических видов в пределах мофровидов *Didymium dubium*, *Lepidoderma chailletii*, *Lamproderma puncticulatum*, *L. columbinum*, *L. ovoideum* и *Physarum albescens*.

Совокупность полученных данных подтверждает широкую распространенность скрытого видообразования и эндемизма среди темноспоровых миксомицетов, что свидетельствует о том, что число описанных на данный момент видов миксомицетов существенно меньше их реального разнообразия, и подтверждает гипотезу умеренного эндемизма в отношении миксомицетов. Также подтверждено, что не только на уровне плодовых тел, но и на уровне трофических стадий большая часть разнообразия миксомицетов представлена редкими видами и наблюдаются ярко выраженные биогеографические паттерны в распространении MOTU.

Применение ДНК-меташихкодирования с праймерами, специфичными к темноспоровым миксомицетам, показало себя эффективным для изучения структуры группировок темноспоровых миксомицетов в различных субстратах, включая почву, растительный опад, пробы пресноводного планктона и живых мхов (Borg Dahl et al., 2018b; Gao et al., 2019; Shcherin et al., 2019a,b). Этот инструмент может быть особенно эффективен для изучения разнообразия видов, образующих микроскопические плодовые тела, такие как *Echinosteliopsis oligospora* и *Echinostelium bisporum*, которые не выявляются при полевых исследованиях и даже во влажных камерах (Shcherin et al., 2019b). Полученные результаты свидетельствуют о том, что географическое распространение и экологические предпочтения многих видов, особенно нивальной экологической группы, на уровне трофических стадий значительно шире, чем известно по данным традиционных исследований, основанных на регистрации плодовых тел. Вероятно, многие виды способны формировать устойчивые популяции трофических стадий в местообитаниях, условия которых недостаточно благоприятны для формирования плодовых тел, или в которых

отсутствуют триггеры, запускающие переход к формированию плазмодиев и/или плодовых тел.

Список литературы

Aguilar M., Fiore-Donno A.M., Lado C., Cavalier-Smith T. 2013. Using environmental niche models to test the ‘everything is everywhere’ hypothesis for *Badhamia*. *The ISME Journal* 8, 737–745.

Arambarri A.M., Spinedi H.A. 1989. Antarctic Myxomycetes [Mixomicetes antárticos]. Antarctic Inst. Argentina, Buenos Aires. Contribución 365, pp. 12.

Borg Dahl, M., Brejnrod, A.D., Unterseher, M., Hoppe, T., Feng, Y., Novozhilov, Y.K., Sørensen, S.J., Schnittler, M. 2018a. Genetic barcoding of dark-spored myxomycetes (Amoebozoa) – identification, evaluation and application of a sequence similarity threshold for species differentiation in NGS studies. *Mol. Ecol. Resources* 18, 2, 306–318.

Borg Dahl M., Shchepin O.N., Schunk C., Menzel A., Novozhilov Y.K., Schnittler M. 2018b. A four year survey reveals a coherent pattern between distribution of fruit bodies and soil amoebae populations for nivicolous myxomycetes. *Scientific Reports* 8, 11662.

Buchtayarova N.Yu., Gmoshinskiy V.I., Matveev A.V. 2018. The results of the long-term monitoring of the species diversity of myxomycetes in the Central Forest National Biosphere Reserve, in: Proceedings of IV (XII) International Botanical Conference of Young Scientists in Saint-Petersburg. April 22nd–28th, 2018. St. Petersburg, BIN RAS.

Clissmann F., Fiore-Donno A.M., Hoppe B., Krüger D., Kahl T., Unterseher M., Schnittler M. 2015. First insight into dead wood protistean diversity: a molecular sampling of brightspored Myxomycetes (Amoebozoa, slime moulds) in decaying beech logs. *FEMS Microbiology Ecology* 91, 6, fiv50.

Collins O.R. 1976. Heterothallism and homothallism: a study of 27 isolates of *Didymium iridis*, a true slime mold. *American Journal of Botany* 63, 138–143.

Dagamac N.H.A., Rojas C., Novozhilov Y.K., Moreno G.H., Schlueter R., Schnittler M. 2017. Speciation in progress? A phylogeographic study among populations of *Hemitrichia serpula* (Myxomycetes). *PLoS ONE* 12, 4, e0174825.

Erastova D.A., Novozhilov Y.K. 2015. Nivicolous myxomycetes of the lowland landscapes of the Northwest of Russia. *Mikologiya i Fitopatologiya* 49, 1, 9–18.

Feng Y., Schnittler M. 2015. Sex or no sex? Independent marker genes and group I introns reveal the existence of three sexual but reproductively isolated biospecies in *Trichia varia* (Myxomycetes). *Organism Diversity and Evolution* 15, 631–650.

- Fiore-Donno A.M., Clissmann F., Meyer M., Schnittler M., Cavalier-Smith T. 2013. Two-gene phylogeny of bright-spored Myxomycetes (slime moulds, superorder Lucisporidia). *PLoS ONE*. 8, e62586
- Fiore-Donno A.M., Meyer M., Baldauf S.L., Pawlowski J. 2008. Evolution of dark-spored Myxomycetes (slime molds): molecules versus morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46, 878–889.
- Fiore-Donno A.M., Nikolaev S.I., Nelson M. 2010. Deep phylogeny and evolution of slime molds (Mycetozoa). *Protist* 161, 55–70.
- Fiore-Donno A.M., Weinert J., Wubet T., Bonkowski M. 2016. Metacommunity analysis of amoeboid protists in grassland soils. *Scientific Reports* 11, 6, 19068.
- Fiore-Donno A.M., Kamono A., Meyer M., Schnittler M., Fukui M., Cavalier-Smith T. 2012. 18S rDNA phylogeny of Lamproderma and allied genera (Stemonitidales, Myxomycetes, Amoebozoa). *PLoS ONE* 7, 4, e35359.
- Foissner W. 2007. Dispersal and biogeography of protists: recent advances. *Japanese Journal of Protozoology* 40, 1–16.
- Gao Y., Zhang X., He G., Shchepin O.N., Yan S., Chen S. 2019. Influence of forest type on dark-spored myxomycete community in subtropical forest soil, China. *Soil Biology and Biochemistry* 139, 107606.
- Gray W.D., Alexopoulos C.J. 1968. *Biology of the Myxomycetes*. Ronald Press Co., New York.
- Henney M.R. 1967. The mating type system of the myxomycete *Physarum flavicomum*. *Mycologia* 59, 637–652.
- Henney M.R., Henney H.R. 1968. The mating type systems of the myxomycetes *Physarum rigidum* and *Physarum flavicomum*. *J. Gen. Microbiol.* 53, 321–332.
- Horak E. 1966. Sobre dos nuevas especies de hongos recolectadas en el Antártico. *Contrib. Antarctic Inst. Argentina* 104, 1–13.
- Kamono A., Kojima H., Matsumoto J., Kawamura K., Fukui M. 2009a. Airborne myxomycete spores: detection using molecular techniques. *Naturwissenschaften* 96, 147–151.
- Kamono A., Matsumoto J., Kojima H., Fukui M. 2009b. Characterization of myxomycete communities in soil by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)-based method. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1324–1330.
- Kamono A., Meyer M., Cavalier-Smith T., Fukui M., Fiore-Donno A.M. 2013. Exploring slime mould diversity in high-altitude forests and grasslands by environmental RNA analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94, 98–109.

Novozhilov Y.K., Okun M.V., Erastova D.A., Shchepin O.N., Zemlyanskaya I.V., García-Carvajal E., Schnittler M. 2013. Description, culture and phylogenetic position of a new xerotolerant species of *Physarum*. *Mycologia* 105, 1535–1546.

Novozhilov Y.K., Rollins A.W., Schnittler M. 2017. Ecology and Distribution of Myxomycetes, in: Stephenson, S.L., Rojas, C. (Eds.), *Myxomycetes. Biology, Systematics, Biogeography and Ecology*. Elsevier, Academic Press, pp. 83–105.

Poulain M., Meyer M., Bozonnet J. 2011. *Les Myxomycètes*. Sevrier: Fédération mycologique et botanique Dauphiné-Savoie. 1119 p.

Ronikier A., Ronikier M. 2009. How ‘alpine’ are nivicolous myxomycetes? A worldwide assessment of altitudinal distribution. *Mycologia* 101, 1, 1–16.

Shchepin O.N., Novozhilov Y.K., Schnittler M. 2016. Disentangling the taxonomic structure of the *Lepidoderma chailletii-carestianum* species complex (Myxogastria, Amoebozoa): genetic and morphological aspects. *Protistology* 10, 4, 117–129.

Shchepin O.N., Schnittler M., Erastova D.A., Prikhodko I.S., Borg Dahl M., Azarov D.V., Chernyaeva E.N., Novozhilov Y.K. 2019a. Community of dark-spored myxomycetes in ground litter and soil of taiga forest (Nizhne-Svirskiy Reserve, Russia) revealed by DNA metabarcoding. *Fungal Ecology* 39, 80–93.

Shchepin O.N., Schnittler M., Dagamac N.H.A., Leontyev D.V., Novozhilov Y.K. 2019b. Unexplored diversity of the microscopic myxomycetes: evidence from environmental DNA. *Plant Ecology and Evolution* 152, 3, 499–506.

Shchepin O.N., Novozhilov Y.K., Schnittler M. 2014. Nivicolous myxomycetes in agar culture: some results and open problems. *Protistology* 8, 2, 53–61.

Stephenson S.L., Fiore-Donno A.M., Schnittler M. 2011. Myxomycetes in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 2237–2242.

Stephenson S.L., Schnittler M., Novozhilov Y. 2008. Myxomycete diversity and distribution from the fossil record to the present. *Biodiversity & Conservation* 17, 285–301.

Stephenson S.L., Stempen H. 1994. *Myxomycetes: a handbook of slime molds*. Timber Press Portland, Oregon.

Voss C., Fiore-Donno A.M., Guerreiro M.A., Peršoh D., Bonkowski M. 2019. Metatranscriptomics reveals unsuspected protistan diversity in leaf litter across temperate beech forests, with Amoebozoa the dominating lineage. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95, 10, fiz142.

Walker L.M., Stephenson S.L. 2016. The species problem in myxomycetes revisited. *Protist* 167, 319–338.

Walochnik J., Michel R., Aspöck H. 2004. A molecular biological approach to the phylogenetic position of the genus *Hyperamoeba*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51, 4, 433–40.

Wijayawardene N. N., Hyde K. D., Al-Ani L. K. T., Tedersoo L., Haelewaters D., Rajeshkumar K. C., ... Thines, M. 2020. Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere* 11, 1, 1060–1456.

Yatsiuk I., Leontyev D. 2020. Two species of nivicolous myxomycetes that formed fruiting bodies during three spring seasons in the lowlands of the Eastern Ukraine. *Phytotaxa* 437, 147–155.