

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н. Гульяевой Елены Ивановны на диссертационную работу **Щепина Олега Николаевича «Скрытое разнообразие темноспоровых миксомицетов (Mucromycetes): таксономический и экологический аспекты»**, представленную в диссертационный совет Д 002.211.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.12 – «Микология».

Диссертационная работа О.Н. Щепина посвящена изучению разнообразия темноспоровых миксомицетов (*Mucromycetes*) на обширной территории Европы и Азии. Миксомицеты являются чрезвычайно широко распространенной в природе группой. Систематика миксомицетов до сих пор базируется главным образом на особенностях строения и развития спорокарпов, следуя морфологической концепции вида. Однако наличие в пределах морфовидов криптических видов и апомиктических клонов и значительная морфологическая изменчивость, свойственная спорокарпам многих видов, является серьезной проблемой для таксономии, основанной на морфологии. В современный период для таксономии грибов и протистов широко используется полифазный подход, включающий фенотипические, генотипические, филогенетические и экологические признаки. Молекулярно-генетические исследования последнего десятилетия подтвердили что реальное видовое разнообразие миксомицетов, на порядок выше, определенного на основании морфологических признаков.

В связи с этим представляло актуальность расширить исследования генетического разнообразия и таксономического состава почвенных группировок миксомицетов на территории Европы и Азии с применением методов метагеномики и секвенирования нового поколения. В результате получены новые данные о распространении трофических стадий почвенных миксомицетов как на отдельной территории, так и в географическом масштабе. Впервые показана широкая распространенность и обилие видов миксомицетов нивальной экологической группы за пределами типичных для этой группы местообитаний. Генетическая структура популяций видов *Physarum albescens*, *Lepidoderma chailletii*, *Didymium dubium* и нивальных видов рода *Diderma* впервые исследована с использованием отдельных или комплекса генетических маркеров. Результаты этих исследований можно применить для дальнейшей разработки концепции вида, таксономии, филогении и биогеографии протистов, грибов и других свободноживущих эукариотических микроорганизмов, а также для изучения вопросов влияния географических и экологических барьеров на течение процессов генетической дивергенции у свободноживущих эукариотических микроорганизмов в контексте постулата "все есть везде, но среда отбирает".

Наряду с этим создана первая электронная информационная система референсных нуклеотидных последовательностей (ДНК-штрихкодов)

миксомицетов MuxoSeq, что значительно облегчит дальнейшие исследования в области молекулярной экологии миксомицетов.

Общее количество научных публикаций по теме работы в журналах, входящих в перечень международных реферативных баз данных и список ВАК, и апробация результатов на международных и всероссийских конференциях свидетельствуют об актуальности и значимости исследований.

Выносимые на защиту научные положения основаны на большом фактическом материале, полученных автором. Не вызывает сомнений достоверность полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации. Для характеристики внутривидового разнообразия изучаемых групп миксомицетов использовался тщательный статистический анализ.

Диссертационная работа состоит из 161 страницы, включая приложения, и построена по стандартной схеме (введение, 4 экспериментальные главы, заключение, выводы, список литературы, 5 приложений). Работа проиллюстрирована 35 рисунками и 2 таблицами. Список литературы содержит 259 источников, из них 247 на иностранных языках. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

При прочтении главы «**Введение**» создается хорошее понимание актуальности темы исследования, автор выделяет в отдельные разделы степень разработанности темы, цель работы, научную новизну исследований, теоретическую и практическую значимость работы, методологию и методы исследований, выносимые на защиту положения, апробацию результатов, а также описание вклада автора.

Обзор литературы включает пять подразделов. Подробно обсуждены существующие концепции вида. Проанализированы их достоинства и недостатки. Приводятся общие сведения по систематике, экологии, распространению, жизненном цикле и вариациях репродуктивной системы миксомицетов и методах их исследований. В заключительном подразделе этой главы обсуждаются методические подходы для изучения филогеографии и генетической структуры популяций миксомицетов.

Автор хорошо владеет литературой по теме исследования. Глава написана доступно и понятно и составляет треть от общего объема диссертации. Резюмируя сведения, представленные в обзоре литературы, автор обосновывает актуальность проведения диссертационных исследований.

Глава «**Материалы и методы**» написана довольно подробно. Она включает описание изучаемого материала; методов отбора образцов субстратов; получения и обработки данных ДНК-меташтрихкодирования; секвенирования маркерных генов гербарных образцов; филогенетического анализа; комбинации вариантов последовательностей с помощью новой программы LineChart и генотипирования гербарных образцов *Physarum albescens*. Детально представлен процесс подсчета компьютерной симуляции для выявления изоляции между членами разных филогрупп в пределах *Physarum albescens*. В заключительной части раздела представлены пакеты программ, используемые для статистической обработки экспериментальных данных.

Глава «**Результаты**» состоит из 7 подразделов, в каждом из которых описываются исследования конкретных видов. Все результаты работы хорошо иллюстрированы (рисунками, диаграммами и т.д.); цифровые данные представлены в таблицах в тексте диссертации и в приложениях.

В первом подразделе (3.1) представлены результаты изучения генетической структуры популяций *Physarum albescens*, представленных 368 гербарными образцами из различных горных систем северного полушария, собранных в 2010–2018 гг. На основании секвенирования маркерных генов у показана монофилетичность комплекса *Physarum albescens*. По результатам комплексного анализа (филогения SSU и трехгенная (SSU, EF1A, COI)), образцы *Physarum albescens* разделены на 18 филогрупп, и доказана их репродуктивная изоляция. Для 98 образцов, отобранных из семи групп, это подтверждено с использованием генотипирования путем секвенирования (GBS).

Наличие репродуктивной изоляции между представителями разных филогрупп *Physarum albescens* было протестировано на примере части данных из Хибин и Сьерра Невады с помощью компьютерной симуляции.

В подразделе 3.2 описаны результаты молекулярно-филогенетического анализа *Lepidoderma chailletii* на примере 37 образцов *Lepidoderma chailletii* и 5 образцов *Lepidoderma carestianum*, собранных в разных регионах Европы. Показано, что *L. chailletii* представляет собой полифилетический комплекс в пределах рода *Lepidoderma*, состоящий из трех филогрупп. *Lepidoderma carestianum* выделяется в отдельную кладу с высокой статистической поддержкой. *Diderma fallax* занимает позицию, сестринскую *Lepidoderma peyerimhoffii* в пределах рода *Lepidoderma*. Выявленные филогруппы *L. chailletii* дополнительно различаются сайтами инсерционного редактирования в митохондриальном гене COI. Определенные морфологические различия (средний диаметр спор, форма плазмодиокарпов и др.) также выявлены между некоторыми из этих форм.

В подразделе 3.3 представлены результаты молекулярно-филогенетического анализа нивальных видов рода *Diderma* у 716 гербарных образцов. Показано, что шесть нивальных видов рода *Diderma* (*D. alpinum*, *D. europaeum*, *D. fallax*, *D. meyeræ*, *D. nuveum*) образуют отдельные монофилетические клады. Отдельная кладка сформирована образцами *Diderma*, близкими по морфологическим признакам к *Diderma meyeræ* и найденными в горах Камчатки и во французских Альпах в нивальных условиях. На основании филогенетического положения и морфологических отличий от описанных видов был описан новый вид *Diderma kamchaticum* sp. nov.. Результаты анализа сочетаний вариантов двух несцепленных генов предполагают репродуктивную изоляцию между представителями семи нивальных видов рода *Diderma*. Для вида *Diderma microcarpum* показано неравномерное географическое распространение.

В подразделе 3.4 представлены результаты молекулярно-филогенетического анализа образцов *Didymium dubium* широкого географического происхождения (Камчатка (2017 г), национальный парк Сьерра Невада (Испания, 2017 г), баварские

Альпы (2013–2018 гг)). Показано наличие по меньшей мере пяти крупных филогрупп в пределах *Diderma 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 регионов.

В подразделе 3.5 представлены результаты ДНК-меташифрования природных субстратов. Это самая объемная глава в экспериментальном разделе. Объем изученного материала проб колоссален. Он представлен пробами почвы (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), воды (водоемы Красноярского края), торфа и образцов живых сфагновых мхов с северо-запада Германии и подушек мхов из Антарктиды. Всего изучено 374 образца проб. В результате анализа было выявлено 951 OTU (операционных таксономических единиц, operational taxonomic units), кластеризованных с 98% порогом сходства нуклеотидных последовательностей и отнесенных к темнospоровым миксомицетам (*Columellomycetidae*) на основании генетического сходства и филогенетического положения.

Далее автор представляет подробные результаты исследований для каждой из группировок темнospоровых миксомицетов.

Определена различная степень разнообразия OTU темнospоровых миксомицетов в пробах почвы из разных регионов. Показано, что почвенные группировки темнospоровых миксомицетов в субтропических лесах заповедника Баотяньмань в центральном Китае в наибольшей степени отличаются по составу от группировок остальных районов исследования. Проанализированные пробы из равнинных таежных лесов трех районов Ленинградской области группировались вместе. Пробы из Центрально-Лесного заповедника наименее однородны.

Почвенные группировки темнospоровых миксомицетов таежных лесов Нижне-Свирского заповедника были представлены пробами, представляющими четыре стадии восстановления леса после пожара (7 лет, 15, 30 и контрольная площадка). Наибольшее богатство OTU было выявлено на площадке через 15 лет после пожара, наименьшее – на площадке 30 лет. Ни одна OTU не была обнаружена во всех пробах.

В анализе разнообразия нивальных миксомицетов на высотной трансекте в баварских Альпах представители родов *Lamproderma* и *Diderma* составляли 80% находок плодовых тел. Среди OTU, определенных до уровня рода или вида, представители этих двух родов также преобладали. Доля представителей родов *Meriderma*, *Physarum* и *Didymium* среди OTU была выше, чем среди находок плодовых тел. Наибольшим числом видов был представлен род *Lamproderma*.

В почвенных группировках заповедника Баотяньмань более половины OTU были отнесены к порядку *Physarales*, остальные – к *Stemonitidales*. Один из видов *Craterium minutum* ранее регистрировался в заповеднике по находкам плодовых тел.

Четыре выявленных среди OTU нивальных вида (*Lamproderma arcyrioides*, *L. cristatum*, *L. piriforme*, *M. cribrarioides*) являются новыми для заповедника, три из них также являются новыми для Китая. Только 29 OTU темнеспоровых миксомицетов из 195, выявленных в заповеднике, встречались в других регионах, исследованных с помощью ДНК-меташтрихкодирования.

В пяти пробах планктона, отфильтрованного из озер в окрестностях Красноярска выявлено 8 видов (*Diderma fallax*, *D. montanum*, *Lamproderma ovoideum*, *Lepidoderma chailletii*, *M. echinulatum*, *M. spinulosporum*, *Physarum albescens*, *Ph. album*, *Ph. melleum*), 6 из которых относятся к нивальной группе.

В пробах торфа и сфагнома, собранных в верховых болотах на северо-востоке Германии, выявлено 6 представителей нивальной экологической группы *Diderma sauteri*, *Didymium anellus*, *D. iridis*, *Lamproderma ovoideum*, *Stemonitis flavogenita*, *L. ovoideum*. Половина OTU была оригинальных и не выявлены в других наборах данных. Выявлены три OTU общие и для торфяных кернов, и для проб живых побегов *Sphagnum* sp: *D. sauteri*, *D. anellus* и одна OTU, отнесенная к *Physarales*. пробах живого *Sphagnum* sp. наиболее часто встречающиеся OTU, обнаруженные в 7 пробах из 13, были отнесены к *Leocarpus* sp. и *Didymiaceae*. В торфяных кернах наиболее часто встречающиеся OTU были отнесены к *D. iridis*, *S. flavogenita* и *Physarales*.

В образцах подушек мхов из Антарктиды выявлены *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. Большая часть OTU (16 из 19) была обнаружена и в наборах данных из других исследованных регионов.

В подразделе 3.6 представлены результаты изучения скрытого разнообразия представителей родов *Echinostelium* и *Echinosteliopsis*. Филогения подтвердила, что *Echinostelium bisporum* и *Echinosteliopsis oligospora* разделяются на монофилетические ветви. 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*.

В подразделе 3.7 описано создание Электронная информационная система MuxoSeq и информация в нее включенная. На данный момент в MuxoSeq загружено около 10% накопленных данных по нуклеотидным последовательностям миксомицетов.

В главе 4 представлено обсуждение полученных результатов, в сравнении с опубликованными в литературе.

Проведенное исследование подтвердило, что для миксомицетов характерно образование криптических видов в пределах морфовидов. Показано наличие криптических видов в пределах морфовидов *Didymium dubium*, *Lepidoderma chailletii*, *Physarum albescens*. Подтверждение существования криптических видов

миксомицетов с ограниченным географическим распространением. Впервые наличие таких криптических видов с ограниченным распространением было показано для *Physarum albescens* и *Didymium dubium*. Установлено, что *Diderma europaeum* не распространена за пределами горных систем Европы. В пределах морфовида *Physarum albescens* определено как минимум 18 репродуктивно изолированных криптических видов. Метод GBS, впервые примененный для исследования природных популяций протистов вообще и миксомицетов подтвердил наличие репродуктивной изоляции между представителями разных филогрупп, населяющих одну территорию. ДНК-меташтрихкодирование позволило обнаружить ранее неизвестное разнообразие миксомицетов, близких к видам *Echinostelium bisporum* и *Echinosteliopsis oligospora*. Результаты исследования показывают, что структура почвенных группировок темнеспоровых миксомицетов чрезвычайно гетерогенна не только на большом географическом масштабе, но и в пределах небольших пробных площадок. Среди выявленных при помощи ДНК-меташтрихкодирования видов некоторые являются нетипичными для почвы и растительного опада. Интересным является обнаружение OTU, 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. OTU 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. Полученные результаты изучения метагенома почв свидетельствуют о том, что экологические ниши многих видов миксомицетов значительно шире, чем считается на основании регистрации плодовых тел этих видов.

Раздел «Заключение» суммирует полученные данные и обобщает результаты.

Раздел «Выводы» содержит 5 пунктов, они довольно хорошо сформулированы, соответствуют защищаемым положениям и согласуются с результатами.

Список литературы оформлен по стандартной схеме, включает 259 источников, многие из которых основополагающие публикации, охватывающие последние достижения по теме исследования.

Основные результаты диссертационной работы кратко суммированы в автореферате, там дана также общая характеристика работы, включая цели и задачи, положения выносимые на защиту, научную новизну, теоретическую и научно-практическую значимость работы. В автореферате присутствуют все выводы и список публикаций по теме исследования.

Диссертация и автореферат написаны грамотно и логично.

При чтении диссертации возникли **вопросы** и некоторые **замечания**.

Общие замечания.

1) Автором используется термин «убиквитный». Подразумевается ли его тождество с термином «убиквитарный» или соискатель степени вкладывает в это какой-то дополнительный смысл?

2) Автор делает вывод о дальнейшем переносе пропагул миксомицетов как вывод по убиквитности. Может ли это также быть обусловлено весьма древним полифилетическим формированием видов совместно с биогенным формированием почвы, как среды обитания?

3) В работе отмечено, что ДНК-метабаркодинг позволил выявить 951 OTU, 244 из них удалось определить до вида. Какая доля приходилась на OTU, которые не удалось определить до видового и родового уровня?

4) В первом выводе автор пишет, что «Морфовиды темноспоровых миксомицетов *Physarum albescens*, *Lepidoderma chailletii* и *Didymium dubium* представляют собой комплексы криптических видов...». В чем, по мнению автора, отличие криптических видов от генетически разнородных популяций, одного вида, наличие которых также может объяснить ограниченное географическое распространение в пределах общего ареала вида?

5) В работе используются термины ДНК-меташрихкодирование и ДНК-метабаркодинг. Следовало бы выбрать один единственный и использовать только его. ДНК-метабаркодинг более распространенный вариант.

6) Для того что бы понять объем данных, полученных для анализа с помощью ДНК-метабаркодинга, неплохо было представить общее количество ридов, из которых формировались OTU.

7) Не очень удачно сделаны подписи к рисункам. Шрифт и интервалы такие же, как в основном тексте. Это создает неудобство при чтении материала. Следовало либо сделать меньше интервал и шрифт, особенно в примечаниях после основного названия рисунка.

8) Стр. 63 в сочетании «программный паплайн» должно быть «программный пайплайн»; стр. 80 «Лапландский заповеднк» - «заповедник». Встречаются и другие опечатки в тексте диссертации, но в допустимых пределах.

Однако эти замечания не носят принципиальный характер и не умаляют научно-практической значимости диссертационной работы.

Заключение. Диссертационная работа **Щепина Олега Николаевича** «Скрытое разнообразие темноспоровых миксомицетов (Mycetozoa): таксономический и экологический аспекты», выполненная Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук, представляет собой цельное и законченное исследование, в котором на новом уровне рассмотрена крупная научная проблема по микологии. Работа выполнена на высоком научном и методическом уровне, соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и соответствует специальности 03.02.12 - микология. Автореферат достаточно полно отражает объем и содержание работы. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и качеству научных публикаций представленная работа отвечает требованиям «Положения о присуждении научных степеней», утверждённого постановлением Правительства

Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Щепин О.Н. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.12 - микология.

Официальной оппонент

Ведущий научный сотрудник лаборатории микологии
и фитопатологии ФГБНУ «Всероссийский
научно-исследовательский институт защиты растений»,
д.б.н.

Елена Ивановна Гультаева

02.04.2021 г.

Специальность, по которой официальным оппонентом была защищена диссертация:
03.02.12 – «Микология».

Адрес места работы:

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»,
196608 Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, д. 3

Тел +7(812)- 470-51-10

E-mail: egulyaeva@vizr.spb.ru

Подпись руки

Гультяевой Е.И.

Удостоверяю

**Секретарь
директора**



А.М. Комганова