

Методы и проблемы видовой идентификации при изучении экологии и закономерностей распространения споровых организмов

А. В. ВЛАСЕНКО¹, В. А. ВЛАСЕНКО¹, Ю. К. НОВОЖИЛОВ², С. В. АСБАГАНОВ¹, Т. ДЭЖИДМАА³

¹Центральный сибирский ботанический сад СО РАН
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101
E-mail: vlasenkomyces@mail.ru

²Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН
197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 2

³Научно-исследовательский институт защиты растений Монголии
17024, Улан-Батор, ул. Хороо, 11

Статья поступила 27.01.2020

После доработки 03.02.2020

Принята к печати 15.02.2020

АННОТАЦИЯ

Применение молекулярно-генетических методов для видовой идентификации грибов и миксомицетов (ДНК-баркодинг) показало, что необходимо пересмотреть взгляды на экологию и ареалы многих видов споровых организмов. Споры базидиальных грибов и миксомицетов могут распространяться на значительные расстояния при помощи воды, ветра, насекомых, что способствует заселению различных удаленных друг от друга местообитаний, где лимитирующими факторами выступают только микроусловия среды обитания и наличие подходящего субстрата. Возможность заселения различных “островных” местообитаний, например, таких как крупные древесные остатки в степных районах или особые микроклиматические условия на днищах оврагов и балок в лесостепи, где влажность значительно выше, чем на плакорных участках, позволяет споровым организмам расширять свои ареалы и расселяться в не характерных для них природных зонах. Собственные исследования, анализ литературы и данных в GenBank показали, что для споровых организмов при изучении экологии и закономерностей распространения остро встает вопрос их правильной видовой идентификации. Рассмотрены примеры влияния гипотезы “Все есть всюду, но окружающая среда отбирает” (гипотеза EиE) на понимание экологии и ареалов некоторых видов миксомицетов и базидиальных грибов. Впервые приводятся данные о распространении и экологии нивального миксомицета *Lamproderma pseudomaculatum* на равнинной территории Западной Сибири. На примере миксомицетов *Arcyria imperialis* и *A. stipata*, а также грибов *Disciseda hyalothrix* и *Pleurotus pulmonarius* обоснована возможность использования ДНК-баркодинга для изучения видового разнообразия споровых организмов, дифференциации морфологически схожих видов и правильной трактовки их ареалов и экологии. Для всех указанных видов изучены последовательности рДНК, для миксомицетов выполнены фотографии на сканирующем электронном микроскопе.

Ключевые слова: ареал, биоразнообразие, гипотеза «Все есть всюду, но среда отбирает» (EиE), гипотеза умеренного эндемизма (МЕН), грибы, закономерности распространения, миксомицеты, молекулярно-генетические методы, рДНК, сканирующая электронная микроскопия, экология, *Arcyria imperialis*, *Arcyria stipata*, *Disciseda hyalothrix*, *Lamproderma pseudomaculatum*, *Pleurotus pulmonarius*.

© Власенко А. В., Власенко В. А., Новожилов Ю. К., Асбаганов С. В., Дэжидмаа Т., 2020

Грибы и грибообразные протисты (миксомицеты) играют важную роль в природной среде, особенно виды, развивающиеся в почве и на разлагающейся древесине [Vlasenko et al., 2018], выступая главным образом в качестве регуляторов численности бактерий, стимулируя темпы разложения органического вещества и формирования бактериальных сообществ, а также играя роль в процессах гумусообразования и распада древесины [Novozhilov et al., 2017].

Классификация и видовая идентификация грибов и миксомицетов, как правило, проводится на основе анализа морфологических признаков их плодовых тел и отдельных структур спорофоров [Martin, Alexopoulos, 1969; Новожилов, 2005; и др.]. Традиционный метод выявления видового разнообразия грибов и миксомицетов основан на сборе их плодовых тел на различных субстратах в природе. Кроме того, отдельные виды миксомицетов выявляют методом “влажных камер” в лаборатории [Власенко и др., 2017].

Регистрация вида в стадии плодовых тел свидетельствует о том, что он способен проходить жизненный цикл в конкретном местообитании, в котором были собраны плодовые тела, а значит, вид является неотъемлемым элементом существующего в данном местообитании микробиоценоза. Однако многие виды, чьи плодовые тела регистрируются на растительном опаде, присутствуют также в виде трофических стадий в верхнем гумусовом горизонте, как это показывает анализ метабенома почв [Shchepin et al., 2019].

Данные о распространении и частоте встречаемости видов имеют решающее значение во многих отраслях биологии и экологии. При этом истинные ареалы большинства видов грибов и миксомицетов до сих пор не известны. Традиционно изучение распределения видов грибов основано на обширных сборах в течение многих сезонов [Redhead, 1989].

При изучении экологии и ареалов как отдельных видов, так и надвидовых таксонов одной из первостепенных задач встает правильная видовая идентификация и дифференциация от морфологически близких видов. У грибов и грибообразных протистов внутривидовой полиморфизм достаточно часто обусловлен временными фенотипическими трендами, возникающими под влиянием уз-

конаправленных факторов окружающей среды, что создает дополнительные сложности при таксономической идентификации, основанной на анализе морфологических признаков [Vlasenko et al., 2017, 2019].

Идентификацию грибов и миксомицетов также можно проводить с использованием современных молекулярно-генетических методов исследования. Из собранных плодовых тел извлекается ДНК для определения нуклеотидных последовательностей избранных локусов с помощью секвенирования методом Сэнгера или секвенирования следующего поколения (NGS, next generation sequencing), где в качестве баркодов конкретных видов используются референсные последовательности из GenBank (ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/).

Широкое применение молекулярно-генетических методов (ДНК-баркодинг) для видовой идентификации грибов-макромицетов и миксомицетов показало, что ошибочная таксономическая идентификация, основанная только на анализе диагностически значимых морфологических признаков, вносит существенные ошибки в понимание ареала таксонов. Поэтому в настоящее время необходимо пересмотреть взгляды на макроэкологические закономерности распространения споровых организмов и методы их идентификации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве модельных организмов выбраны миксомицеты *Arcyria stipitata*, *A. imperialis*, нивальный вид – *Lamproderma pseudomaculatum*, а также базидиальные грибы *Disciseda hyalothrix* и *Pleurotus pulmonarius*. Плодовые тела грибов и спорофоры миксомицетов были собраны в процессе экспедиционных исследований. Высушенные образцы сохранены в гербарии NSK. Для подтверждения точной видовой идентификации образцов миксомицетов и грибов применены классические методы, основанные на анализе морфологических признаков, в том числе сканирующая электронная микроскопия, а также современные молекулярно-генетические методы.

Для выделения тотальной ДНК использовали набор реагентов ФитоСорб (Синтол, г. Москва). Фрагмент спорофоры миксомицетов (0,002 г) и плодовых тел грибов (0,02 г) гомогенизировали в 100 и 300 мкл экстрагирующе-

го буфера соответственно. Лизис, осаждение, промывка и элюция ДНК проведены согласно протоколу производителя.

Регион 18 рДНК (SSU) амплифицирован с парами праймеров (5'-3') S1 (AACCTGGTTGATCCTGCC) – SU 19R (GACTTGTCTCTAATTGTTACTCG) для темноспоровых [Fiore-Donno et al., 2012] и (5'-3') SFATri (AATCTGCGAACGGCTCCGTA) – SR4Bright (TGCTGGCACCAGACTTGT) для светлоспоровых миксомицетов [Fiore-Donno et al., 2013]. Область рДНК ITS 1–5.8S-ITS 2 грибов амплифицирована с праймерами (5'-3') ITS 1F (CTTG-GTCATTTAGAGGAAGTAA) и ITS4B (CAG-GAGACTTGACACGGTCCAG) [Gardes, Bruns, 1993].

Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали ДНК-полимеразу HS Taq (“Евроген”, Москва). ПЦР проводили в термоциклере С 1000 (Bio-Rad, США). Результаты электрофореза визуализировали в системе Gel Doc XR + Imager (Bio-Rad, США). Секвенирование ампликонов ДНК проведено в ЦКП Генетики СО РАН (Новосибирск).

В результате нами получено по одной новой последовательности для региона SSU для темноспоровых и светлоспоровых миксомицетов, для вида *Arcyria imperialis* она получена впервые в мире. Также получены две новые последовательности для региона ITS 1–5.8S-ITS 2 для изученных нами образцов плодовых тел грибов рода *Pleurotus* и одну – для *Disciseda hyalothrix*. Дополнительные ITS последовательности из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) отобраны на основе результатов BLAST-анализа, а также взяты для таксонов, близких к идентифицированным нами видам.

Итоговый набор данных включал по 7 последовательностей в каждом блоке данных (SSU для темноспоровых и светлоспоровых миксомицетов, ITS для грибов) для построения филогенетических деревьев. Обзор всех последовательностей миксомицетов и грибов, используемых для реконструкции деревьев, включая названия видов, номера гербарных образцов/штаммов и номера доступа GenBank, приведены в таблице.

Нуклеотидные последовательности выравнивали с использованием метода ClustalW [Higgins et al., 1994] в MEGA-7 [Kumar et al., 2016]. Реконструкция филогении была сдела-

на с использованием метода UPGMA [Sneath, Sokal, 1973]. Показаны оптимальные деревья с суммой длины ветвей, равной 0,1122 для *Lamproderma pseudomaculatum*, 0,7854 – для *Arcyria imperialis*, 0,2791 – для *Disciseda hyalothrix*, 0,2331 и 0,1786 – для *Pleurotus pulmonarius*. На дендрограммах рядом с ветвями приведены значения в бутстреп-тесте (1000 повторов) [Felsenstein, 1985] более 75 %. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием MCL-метода (maximum composite likelihood method) [Tamura et al., 2004]. Все позиции, содержащие пробелы и неоднозначные данные, исключались. Число позиций в блоке данных анализа филогении: 535 – для *Lamproderma pseudomaculatum*, 491 – для *Arcyria imperialis*, 676 – для *Disciseda hyalothrix*, 615 и 599 – для *Pleurotus pulmonarius*. Эволюционный анализ проведен в MEGA-7.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Lamproderma pseudomaculatum Mar. Mey. et Poulain. (рис. 1, 2, а–д, 3, и, 8, з).

Многие представители рода *Lamproderma* имеют уникальную для миксомицетов особенность – образуют спорофоры на границе с тающим снегом в альпийском и субальпийском поясах [Meylan, 1931; Stephenson et al., 2000; Ronikier, Ronikier, 2009] и проявляют довольно высокую избирательность к условиям среды обитания [Erastova et al., 2017].

На территории естественного лесного массива ЦСБС СО РАН (г. Новосибирск) в кустарниковых сообществах посреди березовых и сосново-березовых лесов (рис. 4) нами обнаружено несколько колоний *Lamproderma* sp., которую мы регулярно наблюдали в период с 2009 по 2019 г. Наблюдения за столь долгий период доказывают неслучайный характер ее присутствия в данных специфических местобитаниях, находящихся в микропонижениях рельефа, где снег весной сохраняется в течение длительного времени, в то время как на окружающих, прогретых солнечными лучами плакорных участках снег уже растаял. Спорофоры *Lamproderma* формировались на границе таящего снега, на сухих прошлогодних стволиках и опаде папоротника-страусника.

При помощи молекулярно-генетических методов исследований в ЦСБС СО РАН уста-

Последовательности, использованные при выравнивании

| Вид | Гербарный образец/штамм | Номер GenBank |
|------------------------------------|-------------------------|---------------|
| <i>Lamproderma pseudomaculatum</i> | NSK 1030001 | MN913624 |
| <i>Lamproderma pseudomaculatum</i> | MM37354 | JQ031985 |
| <i>Lamproderma pseudomaculatum</i> | AMFD 180 | JQ031986 |
| <i>Lamproderma pseudomaculatum</i> | LE 285191 | JQ812674 |
| <i>Lamproderma maculatum</i> | MM37059 | JQ031982 |
| <i>Lamproderma maculatum</i> | LE 285787 | JQ812673 |
| <i>Lamproderma cristatum</i> | LE 285764 | JQ812644 |
| <i>Arcyria imperialis</i> | NSK 1030007 | MN966428 |
| <i>Arcyria stipitata</i> | AMFD 257 | EF513170 |
| <i>Hemitrichia imperialis</i> | sc22616 | KT358649 |
| <i>Hemitrichia imperialis</i> | sc27015 | KT358650 |
| <i>Arcyria denudata</i> | AMFD | AY643825 |
| <i>Arcyria denudata</i> | sc22610 | KT358640 |
| <i>Trichia varia</i> | sc25116 | KM495056 |
| <i>Pleurotus cf. pulmonarius</i> | NSK 1014216 | MN179415 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | NSK 1014214 | MN179418 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | ATCC 62887 | JX535494 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | 4203 | AY450349 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | ECS-0191 | GU722287 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | UNIP30 | KT273376 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | MHHNU 8215 | KU518325 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | F1636 | KY939738 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | FUM-077 | KY951484 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | FUM-103 | KY951485 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | FUM-096 | KY951486 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | FUM-091 | KY951487 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | P52 | KY962468 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | P53 | KY962469 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | BORHF0429 | MH178087 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | extr02 | MH444817 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | BCRC 36906 | MH453616 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | MHHNU 8215 | MK214409 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | P1 | MK956819 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | P2 | MK956820 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | P4 | MK956822 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | ICMP 18163 | MH395973 |
| <i>Pleurotus cf. eryngii</i> | C1 | FJ514549 |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | AFTOL-ID 564 | AY854077 |
| <i>Pleurotus populinus</i> | 9936 | AY450346 |
| <i>Pleurotus calyptratus</i> | P67 | KY962483 |
| <i>Disciseda hyalothrix</i> | NSK 1014099 | MN151399 |
| <i>Disciseda candida</i> | STB 304 | EU833654 |
| <i>Disciseda bovista</i> | MJ5078 | DQ112627 |
| <i>Bovista aestivalis</i> | MJ1122 | DQ112620 |
| <i>Lycoperdon perlatum</i> | MJ4684 | DQ112630 |
| <i>Vascellum pratense</i> | MJ4864 | DQ112554 |
| <i>Mycenastrum corium</i> | KM162954 | GQ981488 |

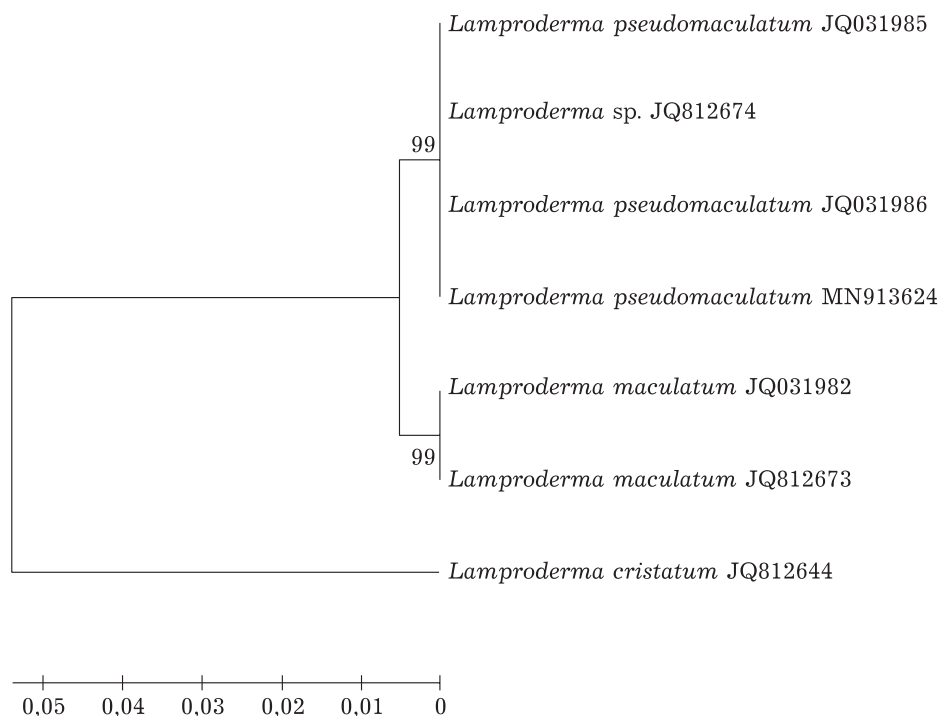


Рис. 1. Дерево UPGMA на основе SSU-последовательностей, показывающее филогенетические связи *Lamproderma pseudomaculatum* (NSK 1030001/ MN 913624) из Новосибирской области с другими родственными таксонами. Генетическое расстояние 0,010 с 99 % бутстреп-поддержкой ветки *L. pseudomaculatum*

новлена видовая принадлежность изученного образца на основе определения нуклеотидной последовательности SSU rDNA (GenBank № MN 913624). Сравнение с данными GenBank на основе BLAST анализа показало, что на равнинной территории обитает редкий нивальный вид миксомицетов – *Lamproderma pseudomaculatum*, который ранее был известен лишь из горных регионов.

Изученные образцы: Новосибирская область, Новосибирск, ЦСБС СО РАН, 54°48'50" с. ш., 83°06'29" в. д., кустарниковые сообщества из *Padus avium* Mill. в западине посреди сосново-березового леса, на сухих прошлогодних стволиках и опаде *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod., 28 IV 2019, А. В. Власенко (A. V. Vlasenko), NSK 1030001.

L. pseudomaculatum впервые выявлена А. В. Власенко в азиатской части России. В России ранее была известна из европейской части [Erastova et al., 2017]. Распространена в горных районах Европы (Германия, Франция, Австрия) и Азии (Япония). Редкий вид.

Arcyria imperialis (G. Lister) Q. Wang et Yu Li (рис. 5, см. рис. 3, б–д, ж–з).

Первоначально на основе специфических морфологических признаков строения нитей

капиллиция описана Г. Листером (G. Lister) в 1929 г. в роде *Hemitrichia*, сем. *Trichiaceae*, как *H. imperialis*. В 2006 г. переведена в род *Arcyria* К. Вангом и Ю. Ли (Q. Wang, Yu Li).

Спорофоры *A. imperialis* несколько напоминают таковые у морфологически близкого вида *A. stipata* (см. рис. 2, е–з, 3, а–е). Спорофоры *A. stipata* скученные, деформированные от взаимного сжатия, тогда как у *A. imperialis* они не только скученные и деформированные от взаимного сжатия, но и очень часто формируют псевдоэталлии с потерей индивидуальности. Окраска свежих спорофоров *A. imperialis* от розового до грязно-розового цвета, у *A. stipata* – красные с фиолетоватым оттенком. При длительном хранении в гербарии спорофоры как *A. imperialis*, так и *A. stipata* приобретают красновато-коричневый оттенок. Значимым диагностическим признаком является строение нитей капиллиция. Капиллиций *A. imperialis* состоит из очень длинных нитей, редко ветвящихся, орнаментированных спиральными утолщениями, без свободных окончаний. Похожее строение спорофоров и схожесть в окраске старых плодовых тел может вводить в заблуждение при видовой

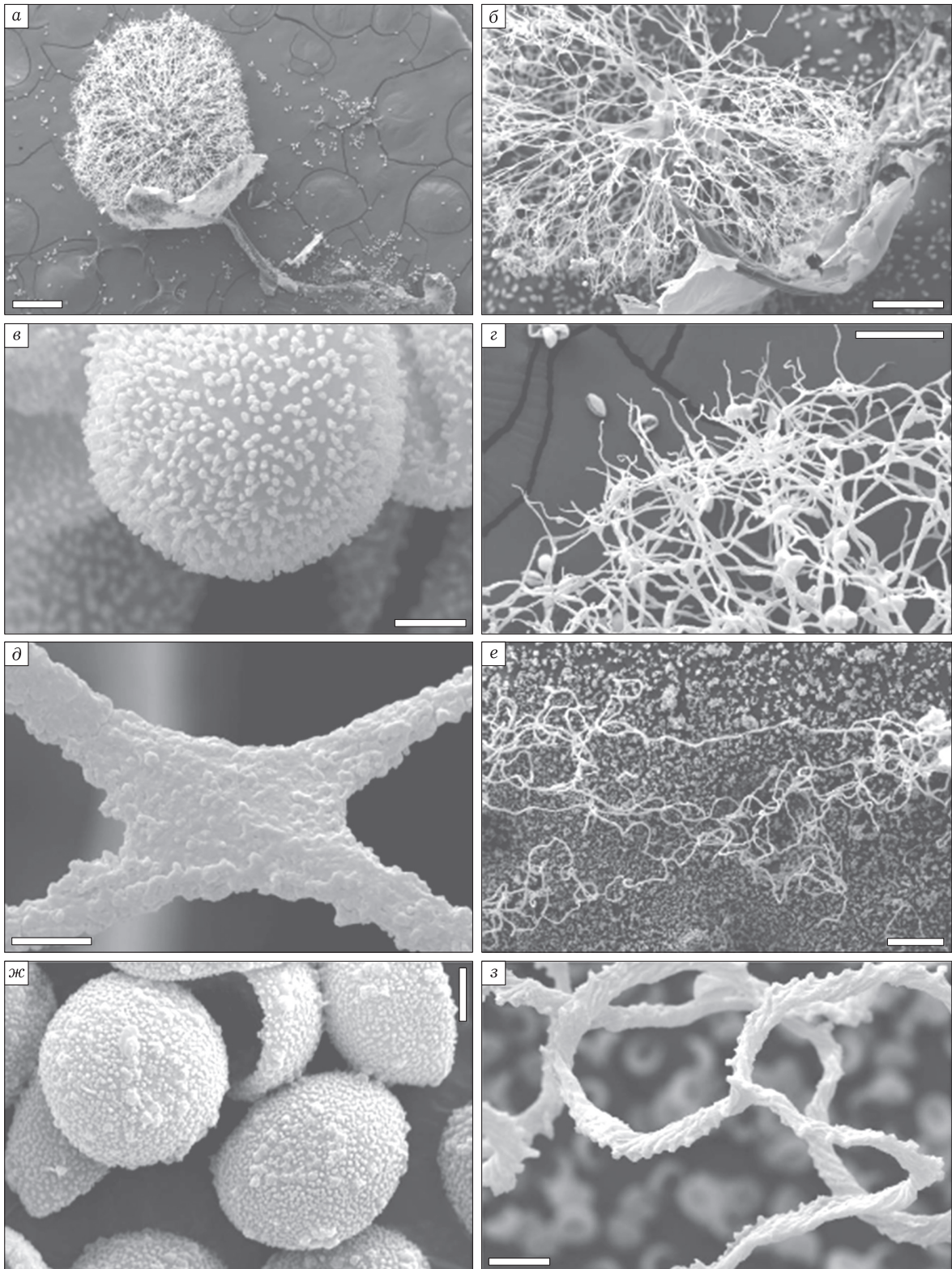


Рис. 2. *Lamproderma pseudomaculatum* (NSK 1030001): а – спорангии (СЭМ), 200 мкм; б – нити капиллиция и колонка (СЭМ), 100 мкм; в – спора (СЭМ), 2 мкм; г – окончание нитей капиллиция (СЭМ), 40 мкм; д – орнаментация нитей капиллиция (СЭМ), 2 мкм; *Arcyria stipata*: е – нити капиллиция (СЭМ), 100 мкм; ж – спора (СЭМ), 2 мкм; з – нити капиллиция (СЭМ), 10 мкм

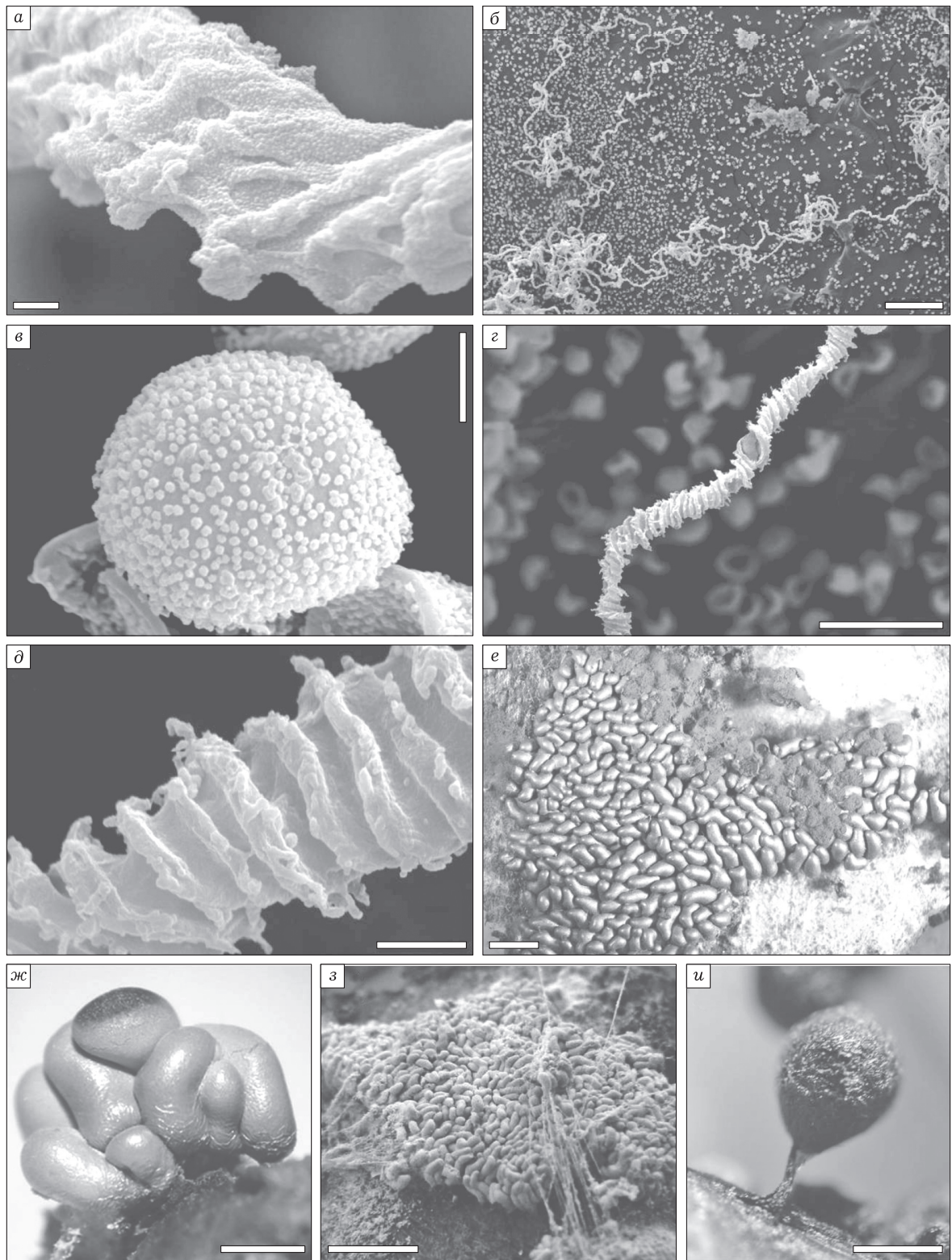


Рис. 3. *Arcyria stipata*: а – орнаментация нитей капиллиция (СЭМ), 1 мкм; б – *Arcyria imperialis* (NSK 1030007): нити капиллиция (СЭМ), 100 мкм; в – спора (СЭМ), 2 мкм; г – нить капиллиция (СЭМ), 20 мкм; д – орнаментация нити капиллиция (СЭМ), 2 мкм; *Arcyria stipata*: е – колония (RL), 2 мм; *Arcyria imperialis* (NSK 1030007); ж – псевдоэталлии (RL), 1 мм; з – колония (RL), 1 мм; *Lamproderma pseudomaculatum* (NSK 1030001); и – спорангии (RL), 1,5 мм



Рис. 4. Местообитание *Lamproderma pseudomaculatum* (NSK 1030001) в Новосибирской области: кустарниковые сообщества с папоротником-страусником в западинах посреди сосново-березового леса

идентификации. Наши образцы морфологически идентичны типу. В Сибири данный вид образует плодоношения осенью (сентябрь – ноябрь), часто после первых заморозков на

валеже и сухостое лиственных деревьев в лиственных и смешанных лесах (рис. 6).

Изученные образцы: Новосибирская область, Новосибирск, ЦСБС СО РАН,

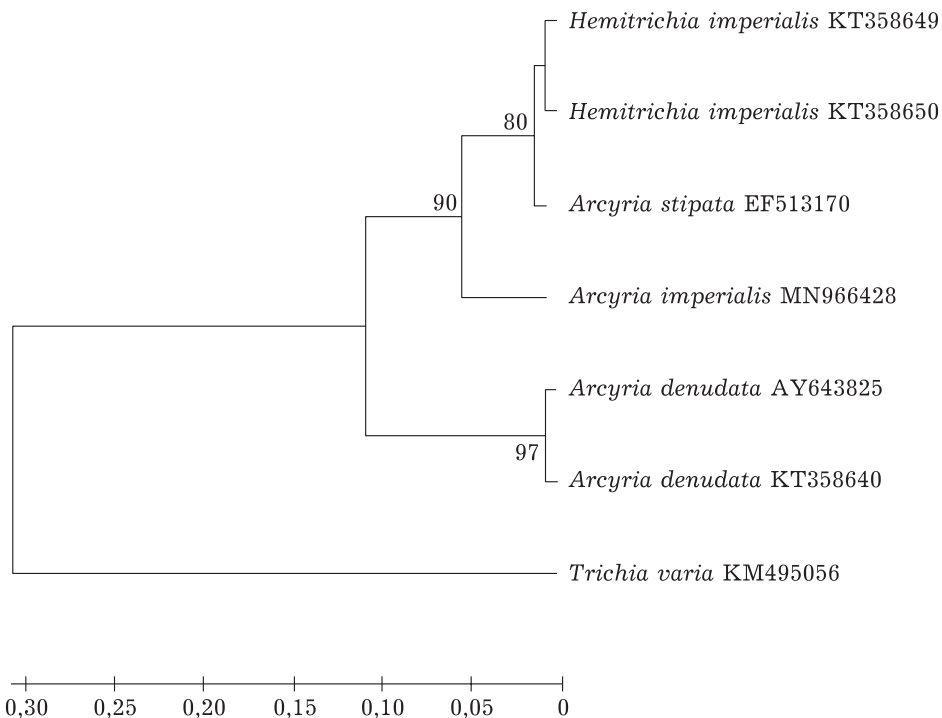


Рис. 5. Дерево UPGMA на основе SSU-последовательностей, показывающее филогенетические связи *Arcyria imperialis* (NSK 1030007/MN 966428) из Новосибирской области с другими родственными таксонами. Генетическое расстояние 0,104 с 80 % бутстреп-поддержкой ветки *Arcyria imperialis*

54°49'36" с. ш.; 83°06'18" в. д., сосново-березово-осиновый лес, на валеже осины, 02 X 2008, А. В. Власенко (A. V. Vlasenko), NSK 1030007.

Arcyria imperialis ранее впервые выявлена А. В. Власенко в России [Власенко, Новожилов, 2010, 2011; Novozhilov et al., 2010]. Видовая принадлежность изученного образца дополнительно подтверждена с помощью СЭМ, а также молекулярно-генетических методов исследований в ЦСБС СО РАН. Для данного вида впервые определена нуклеотидная последовательность SSU rDNA (GenBank № MN966428), которую можно использовать в качестве уникального баркода для молекулярно-генетической идентификации вида. Вид распространен в Азии (Япония), другие находки на территории Европы требуют подтверждения, так как в GenBank размещены две последовательности – КТ 358649 и КТ 358650, полностью идентичные последовательности EF 513170, полученной из образца *A. stipata*.

Disciseda hyalothrix (Cooke et Masee) Hollós (рис. 7, 8, а; Vlasenko et al., 2020: 38).

Видовая принадлежность изученных образцов подтверждена с помощью молекулярно-генетических методов исследований в ЦСБС СО РАН. Для данного вида впер-

вые определена нуклеотидная последовательность ITS1-5.8S-ITS2 рДНК (GenBank № NSK 1014099), которую можно использовать в качестве уникального баркода для молекулярно-генетической идентификации вида.

Изученные образцы: Алтайский край, Краснощековский район, ГПЗ Тигирекский, в 3 км к западу от с. Тигирек, на восточной окраине ущелья “Драгунский ключ”, пещера “Драгунская”, 51°09'11" с. ш., 82°58'47" в. д., на грунте в пещере, 05 VII 2018, В. А. Власенко (V. A. Vlasenko), NSK 1014099.

Disciseda hyalothrix впервые выявлена В. А. Власенко в Алтайском крае [Vlasenko et al., 2020]. Распространена в Европе, Азии, Северной и Южной Америке, Австралии. Редко встречающийся вид. Развивается как сапротроф на почве, в горных каменистых степях (рис. 9).

Pleurotus pulmonarius (Fr.) Qué. (рис. 10, 11, см. рис. 8, б, в).

Изученные образцы: Новосибирская область, Новосибирск, Академгородок, посадки березы, на корнях березы, 14 VIII 2018, В. А. Власенко (V. A. Vlasenko), NSK 1014216. – там же, посадки рябины, на усыхающем стволе живой рябины, 15 VII 2018, В. А. Власенко (V. A. Vlasenko), NSK 1014214.



Рис. 6. Местообитание *Arcyria imperialis* (NSK 1030007) в Новосибирской области: растительные сообщества в нижних частях склонов и днищ балок

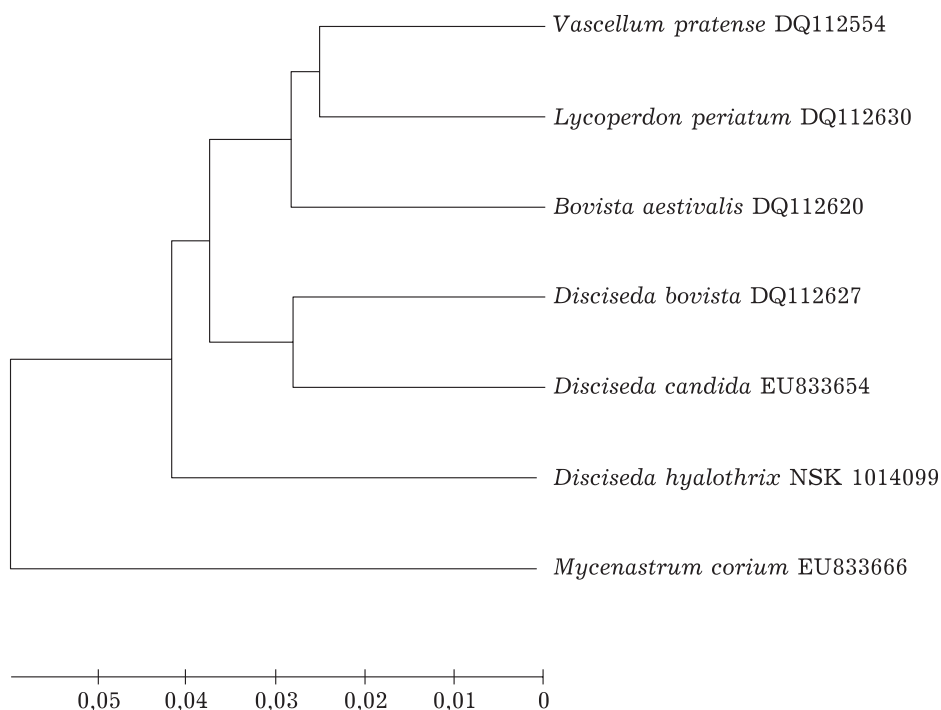


Рис. 7. Дерево UPGMA на основе ITS-последовательностей, показывающее филогенетические связи *Disciseda hyalothrix* (NSK 1014099/MN 151399) из Алтайского края с другими родственными таксонами. Генетическое расстояние 0,071 с 60 % бутстреп-поддержкой ветки *D. hyalothrix*

Видовая принадлежность изученных образцов подтверждена с помощью молекулярно-генетических методов исследований в ЦСБС СО РАН. Определена нуклеотидная последовательность ITS1-5.8S-ITS2 рДНК для изученных образцов грибов (GenBank № MN 179415 и MN 179418). Вид *P. pulmonarius* распространен повсеместно, кроме Гренландии и Антарктиды. Часто встречающийся вид. Развивается как сапротроф или паразит древесных растений как в естественных растительных сообществах, так и в городских насаждениях [Власенко, Власенко, 2018; Власенко и др., 2019]. *P. pulmonarius* морфологически и экологически близок к *P. ostreatus*, применение метода ДНК-баркодинга позволяет дифференцировать эти виды. *P. pulmonarius* уже на стадии выравнивания нуклеотидных последовательностей можно отличить от *P. ostreatus* по характерной делеции части нуклеотидов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Немногим менее ста лет назад выдвинута гипотеза “Все есть всюду, но среда отбирает” (сокращенно гипотеза “EiE”). Согласно

данной гипотезе микроорганизмы являются космополитами, и отсутствие какого-либо вида в определенном местообитании определяется лимитирующими действиями среды [Beijerinck, 1913]. Затем данное предположение было успешно применено к протистам, а далее экстраполировано на все организмы размером менее 2 мм [Finlay, Clarke, 1999; Fenchel, Finlay, 2004; Foissner, 2006], что связано с достаточно легким распространением их микроскопических пропагул по всему миру.

Известно, что споры миксомицетов распространяются ветром [Alexopoulos, 1963; Stephenson et al., 2008; Tran et al., 2008], насекомыми [Keller, Smith, 1978; Blackwell et al., 1982; Newton, Stephenson, 1990; Stephenson et al., 1994] и водой [Власенко и др., 2016].

Анализ маркерных нуклеотидных последовательностей рДНК нивального миксомицета *Lamproderma pseudomaculatum*, развивающегося на территории Новосибирской области ранней весной, показал, что виды миксомицетов, ранее считавшиеся строго нивальными, могут быть выявлены на равнинной террито-

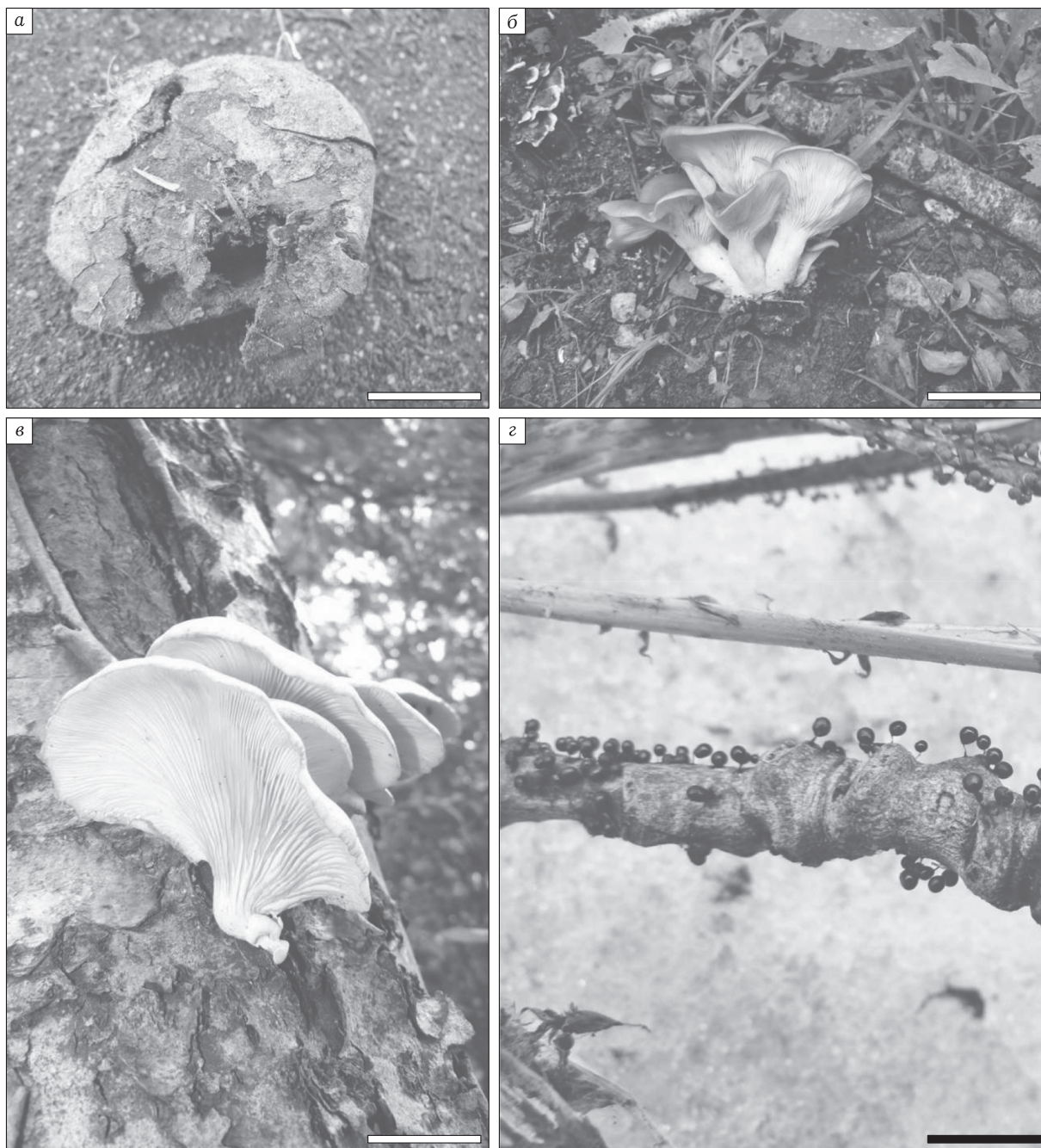


Рис. 8. *Disciseda hyalothrix* (NSK 1014099): а – плодовое тело в природе; *Pleurotus pulmonarius* (NSK 1014216); б – плодовое тело в природе; *Pleurotus pulmonarius* (NSK 1014214); в – плодовое тело в природе; *Lamproderma pseudomaculatum* (NSK 1030001); г – спорангии в природе

рии. При этом образцы *L. pseudomaculatum*, собранные в горах и на равнине, не имеют внутривидового генетического полиморфизма. Что касается другого вида миксомицета, изученного нами и развивающего спороношения поздней осенью – *Arcyria imperialis*, возможно, он более редок, чем предполагалось ранее, в отличие от вида *A. stipata*, ко-

торый встречается чаще и широко распространен в Евразии. Это подтверждает анализ сиквенсов из GenBank, полученных из двух образцов *A. imperialis* (КТ 358649, КТ 358650), которые образуют общую филогенетическую кладу с сиквенсом референсного образца *Arcyria stipata* (EF 5131). Таким образом, ошибочная идентификация, основанная на беглом



Рис. 9. Местообитание *Disciseda hyalothrix* (NSK 1014099) в Алтайском крае: петрофитные степные сообщества южных экспозиций склонов гор, горно-лесостепной пояс

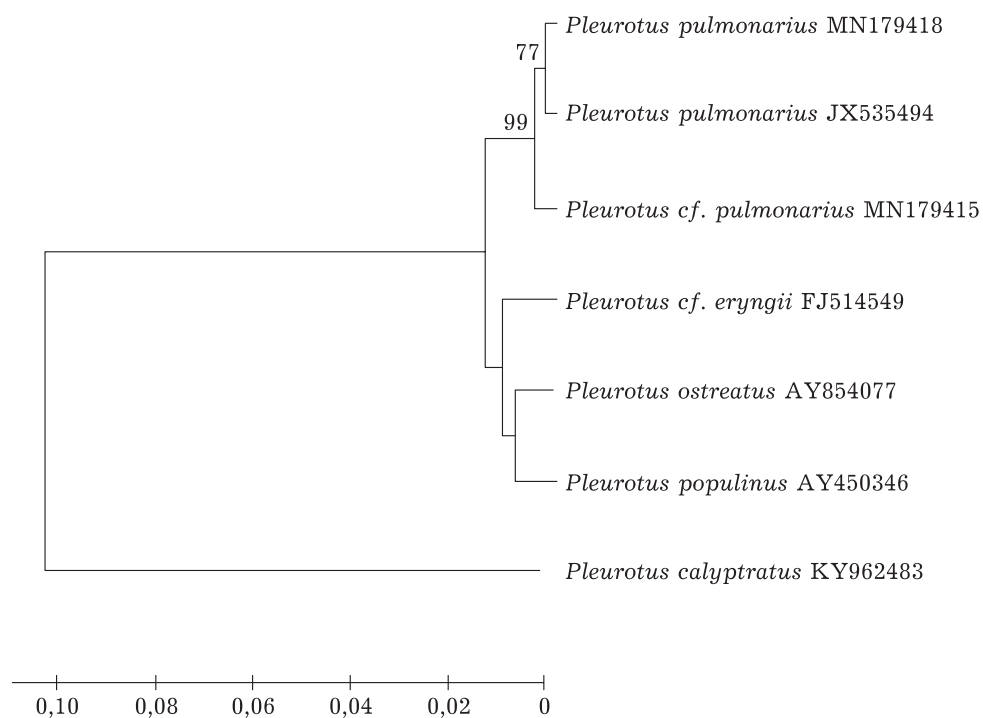


Рис. 10. Дерево UPGMA на основе ITS-последовательностей, показывающее филогенетические связи *P. pulmonarius* (NSK 1014216/MN 179415 и NSK 1014214/MN 179418) из Новосибирской области с другими родственными таксонами. Генетическое расстояние 0,002 с 99 % бутстреп-поддержкой ветки *P. pulmonarius*

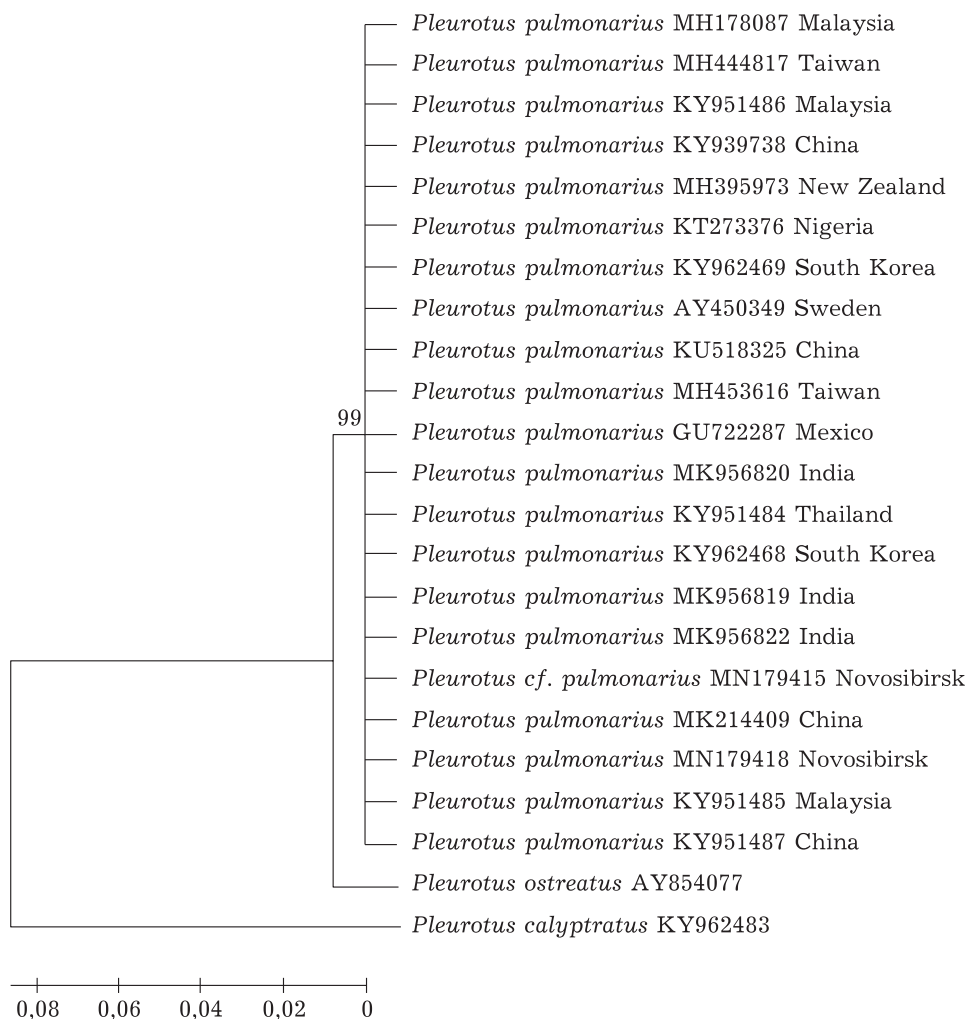


Рис. 11. Дерево UPGMA на основе ITS-последовательностей, показывающее филогенетические связи *P. pulmonarius* из различных регионов мира. Генетическое расстояние 0,013 с 99 % бутстреп-поддержкой ветки *P. pulmonarius*

анализе морфологических признаков, может повлечь за собой ошибку не только в присвоении видового эпитета при депонировании в генбанк, но и ошибочную трактовку ареала вида и рода. Это в полной мере характерно и для гастеромицета *Disciseda hyalothrix*, который был выявлен в Республике Алтай [Горбунова, Ребриев, 2016], но без использования СЭМ он ошибочно указан как *Disciseda ochrochalcona*. Сравнение неполных маркерных нуклеотидных ITS1-5.8S-ITS2 последовательностей гастеромицетов из родов *Disciseda* и *Bovista* показывает, что названия таксонов, описанных из Алтае-Саянского региона, по всей видимости, являются синонимами: *Bovista altaica* Rebriev et Gorbunova – *Bovista tomentosa* (Vittad.) De Toni, а *Bovista discise-*

da Rebriev et Gorbunova и *Bovista subcatastoma* Rebriev et Gorbunova – *Bovista hollosii* Jeppson, Finy et E. Larss.

Так как анализ влияния естественных экологических и географических барьеров на распространение макроскопических базидиальных грибов в свете ЕіЕ гипотезы ранее не проводился, в качестве модельного объекта взят дереворазрушающий базидиальный гриб – *Pleurotus pulmonarius* (вешенка легочная), зарегистрированный на пяти континентах. Анализ нуклеотидных последовательностей, полученных нами, а также размещенных в GenBank, показал низкий генетический полиморфизм избранных локусов рДНК у образцов *Pleurotus pulmonarius* с различных континентов, что противоречит ранее активно

обсуждавшейся в научном сообществе теории МЕН (гипотеза умеренного эндемизма).

Среди грибов есть узкие эндемики, но многие грибы имеют космополитное распространение. В работе “Global diversity and geography of soil fungi” показано, что сильные биогеографические связи между далекими континентами отражают относительно эффективное рассеяние пропагул микроскопических почвенных грибов на большие расстояния по сравнению с макроорганизмами [Tedersoo et al., 2014]. Несмотря на то что *Pleurotus pulmonarius* имеет относительно крупные плодовые тела (до 20 см в диаметре), он проявляет идентичные микроскопическим почвенным грибам свойства, способствующие расселению на значительные расстояния.

Активное распространение спор грибов происходит воздушными потоками на расстояния в тысячи километров [Norden, Larsson, 2000; Hallenberg et al., 2001], что доказано с помощью метода монокариотических (гаплоидных) колоний – приманок, который является одним из простых и немногих способов, применяемых для обнаружения спор грибов, переносимых воздушными потоками. Он впервые описан в 1984 г. [Adams et al., 1984; Williams et al., 1984]. Этот видоспецифичный метод улавливания спор целенаправленно был использован для обнаружения грибов рода *Pleurotus* из различных географически удаленных регионов мира, находящихся на разных континентах [Vilgalys, Sun, 1994]. В эксперименте монокариотические тестовые штаммы, представляющие пять интерстерильных групп в морфокомплексе *Pleurotus ostreatus*, использованы в качестве приманки для улавливания спор. Результаты распределения интерстерильных групп *Pleurotus* на разных континентах свидетельствуют о том, что данные о распределении видов, полученные в ходе экспериментов по улавливанию спор, не всегда соответствуют имеющимся данным о распределении видов, основанным на традиционных методах сбора и учета плодовых тел. Оказалось, что виды грибов рода *Pleurotus* имеют гораздо более широкое распространение, чем считалось ранее. Например, обнаружены дикарионы *Pleurotus djamor*, полученные из Гавайев, Швейцарии, Канады и Китая, хотя ранее считалось, что этот вид имеет пан-

тропическое распространение [Pegler, 1977, 1986; Corner, 1981].

Модель “умеренного эндемизма” подходит, видимо, лишь для отдельных, специализированных в отношении биотопов и субстратов видов, споры которых, разносясь на огромные расстояния, не находят подходящих условий для колонизации новых местообитаний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Недостаточность проработки диагностически значимых морфологических признаков и редкое использование сканирующей электронной микроскопии при изучении миксомицетов не позволяют проводить границу между морфологически схожими видами, что влечет за собой неправильное понимание их экологии и географии. Золотым стандартом таксономической идентификации должен стать комплекс традиционных и современных методов: морфологический анализ с применением высокоточных возможностей сканирующей электронной и световой микроскопии, а также сравнение с ваучерными последовательностями избранных локусов рДНК грибов и миксомицетов, размещенных в общедоступных референсных базах данных. В настоящее время появляются международные базы данных, где кроме баркодов и морфологического описания видов приводятся микро- и макрофотографии грибов и их местообитаний.

Работа А. В. Власенко по миксомицетам выполнена в соответствии с государственным заданием ЦСБС СО РАН АААА-А17-117012610055-3. Работа Ю. К. Новожилова по миксомицетам выполнена в рамках гранта РФФИ 18-04-01232-А. Работа В. А. Власенко по грибам *Pleurotus pulmonarius* выполнена в рамках гранта РФФИ и Правительства Новосибирской области № 18-44-543018 р_мол_а. Работа А. С. Асбаганова и Т. Дэжидмаа по грибам *Disciseda hyalothrix* выполнена в рамках проекта РФФИ и МКОНСМ № 19-54-44002 Монг_Т. Использованы материалы гербария им. М. Г. Попова (NSK), г. Новосибирск.

ЛИТЕРАТУРА

- Власенко В. А., Власенко А. В. Дереворазрушающие грибы на древесных растениях в зеленых насаждениях города Новосибирска // Вестн. Алт. гос. аграр. ун-та. 2018. № 1(159). С. 93–97.
- Власенко А. В., Новожилов Ю. К. Редкие и новые для России виды миксомицетов (Mucoromycetes) России

- из основных лесов правобережья Верхнего Приобья // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44, вып. 2. С. 99–108.
- Власенко А. В., Новожилов Ю. К. Миксомицеты сосновых лесов правобережной части Верхнего Приобья // Микология и фитопатология. 2011. Т. 45, вып. 6. С. 465–477.
- Власенко В. А., Асбаганов С. А., Власенко А. В. Экологическое разнообразие некоторых ресурсных лекарственных грибов рода *Pleurotus* Новосибирской области // Самар. науч. вестн. 2019. Т. 8, № 4 (29). С. 34–38.
- Власенко А. В., Новожилов Ю. К., Власенко В. А., Королюк А. Ю., Дулепова Н. А. Новые данные об облигатных копробионтных миксомицетах Сибири // Изв. Иркут. гос. ун-та. Сер. Биология. Экология. 2017. Т. 21. С. 50–60.
- Власенко А. В., Новожилов Ю. К., Щепин О. Н., Власенко В. А. Гидрохория как один из способов расселения миксомицетов в пойменных биотопах юга Западной Сибири // Микология и фитопатология. 2016. Т. 50, вып. 1. С. 14–23.
- Горбунова И. А., Ребриев Ю. А. Новые сведения о биоте гастеромицетов Алтае-Саянской горной области // Раст. мир Азиатской России. 2016. Т. 2. С. 3–7.
- Новожилов Ю. К. Миксомицеты (класс Мухомовые) России: таксономический состав, экология и география: дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2005. 377 с.
- Adams T. J. H., Williams E. N. D., Todd N. K., Rayner A. D. M. A species-specific method of analyzing populations of basidiospores // Trans. Br. Mycol. Soc. 1984. Vol. 82. P. 359–361.
- Alexopoulos C. J. The myxomycetes II // Bot. Rev. 1963. Vol. 29. P. 1–78.
- Beijerinck M. W. Oxydation des Mangancarbonates durch Bakterien und Schimmelpilze // Folia Microbiol. 1913. Vol. 2. P. 1–12.
- Blackwell M. R., Laman T. G., Gilbertson R. Spore dispersal in *Fuligo septica* (Myxomycetes) by lathridiid beetles // Mycotaxon. 1982. Vol. 14. P. 58–60.
- Corner E. The agaric genera *Lentinus*, *Panus*, and *Pleurotus* with particular reference to Malaysian species // Beih. Nova Hedwigia. 1981. Vol. 69. P. 1–169.
- Erastova D. A., Novozhilov Yu. K., Schnittler M. N. Nivicolous myxomycetes of the Khibiny Mountains, Kola Peninsula, Russia // Nova Hedwigia. 2017. Vol. 104, N 1–3. P. 85–110.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. Vol. 39. P. 783–791.
- Finlay B. J., Clarke K. J. Ubiquitous dispersal of microbial species // Nature. 1999. Vol. 400. P. 828.
- Fenchel T., Finlay B. J. The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity // Bioscience. 2004. Vol. 54. P. 777–784.
- Fiore-Donno A. M., Clissmann F., Meyer M., Schnittler M., Cavalier-Smith T. Two-gene phylogeny of bright-spored Myxomycetes (Slime Moulds, Superorder Lulcisporidia) // PLoS One. 2013. Vol. 8. P. e62586.
- Fiore-Donno A. M., Kamono A., Meyer M., Schnittler M., Fukui M., Cavalier-Smith T. 18S rDNA phylogeny of *Lamproderma* and allied genera (Stemonitales, Myxomycetes, Amoebozoa) // PLoS One. 2012. Vol. 7. P. e35359.
- Foissner W. Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing Protists // Acta Protozoologica. 2006. Vol. 45. P. 111–136.
- Gardes M., Bruns T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts // Molec. Ecol. 1993. Vol. 2. P. 113–118.
- Hallenberg N., Kuffer N. Long-distance spore dispersal in wood-inhabiting Basidiomycetes // Nord. J. Bot. 2001. Vol. 21. P. 431–436.
- Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Res. 1994. Vol. 22. P. 4673–4680.
- Keller H. W., Smith D. M. Dissemination of myxomycete spores through the feeding activities (ingestion – defecation) of an acarid mite // Mycologia. 1978. Vol. 70. P. 1239–1241.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. Vol. 33. P. 1870–1874.
- Martin G. W., Alexopoulos C. J. The Myxomycetes. Iowa City: The University of Iowa Press, 1969. P. 1–561.
- Meylan C. Les espèces nivales du genre *Lamproderma* // Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 1931. Vol. 57. P. 359–373.
- Newton A. F. S., Stephenson S. L. A beetle/slime mold assemblage from Northern India (Coleoptera; Myxomycetes) // Oriental Insects. 1990. Vol. 24. P. 197–218.
- Norden B., Larsson K.-H. Basidiospore dispersal in the old-growth forest fungus *Plebia centrifuga* (Basidiomycetes) // Nord. J. Bot. 2000. Vol. 20. P. 215–219.
- Novozhilov Y. K., Rollins A., Schnittler M. Ecology and distribution of Myxomycetes // Myxomycetes: biology, systematics, biogeography and ecology / Eds S. L. Stephenson, C. A. Rojas. London: Academic Press, 2017. P. 253–297.
- Novozhilov Y. K., Schnittler M., Vlasenko A. V., Fefelov K. A. Myxomycete diversity of the Altay Mts. (southwestern Siberia, Russia) // Mycotaxon. 2010. Vol. 111. P. 91–94.
- Pegler D. N. *Pleurotus* (Agaricales) in India, Nepal and Pakistan // Kew Bull. 1977. Vol. 31. P. 501–510.
- Pegler D. N. Agaric flora of Sri Lanka // Kew Bull., Addit. Ser. 1986. Vol. 12. P. 1–519.
- Redhead S. A. A biogeographical overview of the Canadian mushroom flora // Canad. J. Bot. 1989. Vol. 67. P. 3003–3062.
- Ronikier A., Ronikier M. How 'alpine' are nivicolous myxomycetes? A worldwide assessment of altitudinal distribution // Mycologia. 2009. Vol. 101. P. 1–16.
- Shchepin O. N., Schnittler M., Erastova D. A., Prikhodko I. S., Borg Dahl M., Azarov D. V., Chernyayeva E. N., Novozhilov Y. K. Community of dark-spored myxomycetes in ground litter and soil of taiga forest (Nizhne-Svirskiy Reserve, Russia) revealed by DNA metabarcoding // Fungal Ecol. 2019. Vol. 39. P. 80–93.
- Sneath P. H., Sokal R. R. Numerical Taxonomy. San Francisco: Freeman, 1973. 573 p.
- Stephenson S. L., Novozhilov Y. K., Schnittler M. Distribution and ecology of Myxomycetes in high-latitude regions of the Northern Hemisphere // J. Biogeogr. 2000. Vol. 27. P. 741–754.

- Stephenson S. L., Schnittler M., Novozhilov Y. K. Myxomycete diversity and distribution from the fossil record to the present // *Biodiv. Conserv.* 2008. Vol. 17, N 2. P. 285–301.
- Stephenson S. L., Wheeler Q. D., McHugh J. V. P., Fraissinet P. R. New North American associations of Coleoptera with Myxomycetes // *J. Natur. Histor.* 1994. Vol. 28, N 4. P. 921–936.
- Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*. 2004. Vol. 101. P. 11030–11035.
- Tedersoo L., Bahram M., Pylme S. et al. Global diversity and geography of soil fungi // *Science*. 2014. Vol. 346, Iss. 6213. 1256688.
- Tran H. T. M., Stephenson S. L., Hyde K. D., Mongkolporn O. Distribution and occurrence of Myxomycetes on agricultural ground litter and forest floor litter in Thailand // *Mycologia*. 2008. Vol. 100. P. 181–190.
- Vilgalys R., Sun B. L. Assessment of species distribution in *Pleurotus* based on trapping of airborne basidiospores // *Mycologia*. 1994. Vol. 86. P. 270–274.
- Vlasenko A. V., Novozhilov Yu. K., Schnittler M., Vlasenko V. A., Tomoshevich M. A. Pattern of Substrate Preferences of Free Living Protists (Myxomycetes) on Decaying Wood // *Contemp. Probl. Ecol.* 2018. Vol. 11, N 5. P. 494–502.
- Vlasenko V. A., Rebriev Yu. A., Asbaganov S. V., Dejiddmaa T., Vlasenko A. V. Morphological characteristics and molecular phylogeny of *Disciseda hyalothrix* (Gasteromycetes) from Altai Mountains, a new record to Northern Asia // *Curr. Res. Environ. & Appl. Mycol. (J. Fungal Biol.)*. 2020. Vol. 10, Iss. 1. P. 34–41.
- Vlasenko V. A., Vlasenko A. V., Zmitrovich I. V. First record of *Neolentinus lepideus* f. *ceratoides* (Gloeophyllales, Basidiomycota) in Novosibirsk Region // *Curr. Res. Environ. & Appl. Mycol.* 2017. Vol. 7, N 3. P. 187–192.
- Vlasenko V. A., Zmitrovich I. V., Vlasenko A. V. Unusual monstrose form of *Neolentinus cyathiformis* (Gloeophyllaceae, Basidiomycota) from the Novosibirsk Region (Russia) // *Botanica Pacifica. J. Plant Sci. Conservat.* 2019. Vol. 8, N 1. P. 81–84.
- Williams E. N. D., Todd N. K., Rayner A. D. M. Characterization of the spore rain of *Coriolus versicolor* and its ecological significance // *Trans. Br. Mycol. Soc.* 1984. Vol. 82. P. 323–326.

Methods and problems of species identification in the study of ecology and patterns of distribution of spore organisms

A. V. VLASENKO¹, V. A. VLASENKO¹, Yu. K. NOVOZHILOV², S. V. ASBAGANOV¹, T. DEJIDMAA³

¹Central Siberian Botanical Garden of SB RAS
630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101
E-mail: vlasenkomyces@mail.ru

²Komarov Botanical Institute of RAS
197376, St. Petersburg, Professor Popov str., 2

³Plant Protection Research Institute of Mongolia
17024, Ulaanbaatar, Khoroo str., 11

The use of molecular genetic methods for the species identification of fungi and myxomycetes (DNA barcoding) showed that it is necessary to reconsider the views on the ecology and habitats of many species of spore organisms. Spores of basidiomycetes and myxomycetes can spread over considerable distances with the help of water, wind, and insects, which contributes to the settlement of various distant habitats, where only microenvironment and substrate act as limiting factors. The possibility of settling various “island” habitats, for example, such as large tree debris in the steppe regions or special microclimatic conditions on the bottoms of ravines and gullies in the forest-steppe, where the humidity is much higher than on the plain areas, allows spore organisms to expand their habitats and settle in uncharacteristic for them natural areas. Own research, analysis of the literature and data in GenBank showed that for spore-forming organisms, when studying the ecology and patterns of distribution, the question of their correct species identification arises. The article discusses examples of the influence of the hypothesis “Everything is everywhere, but the environment takes away” (EiE hypothesis) on the understanding of the ecology and ranges of some species of myxomycetes and basidiomycetes. For the first time, data are presented on the distribution and ecology of the nivicolous species of myxomycetes *Lamproderma pseudomaculatum* on the plain territory of Western Siberia.

Using the myxomycetes *Arcyria imperialis* and *A. stipata*, as well as the fungi *Disciseda hyalothrix* and *Pleurotus pulmonarius*, the possibility of using DNA barcoding to study the species diversity of spore organisms, differentiate morphologically similar species, and correctly interpret their ranges and ecology is shown. For all of these species, rDNA sequences were studied; photographs were taken on a scanning electron microscope for myxomycetes.

Key words: *Arcyria imperialis*, *Arcyria stipata*, biodiversity, *Disciseda hyalothrix*, ecology, “everything is everywhere” (EiE hypothesis), fungi, *Lamproderma pseudomaculatum*, patterns of distribution, moderate endemism hypothesis (MEH), myxomycetes, molecular genetic methods, *Pleurotus pulmonarius*, range, rDNA, scanning electron microscopy.