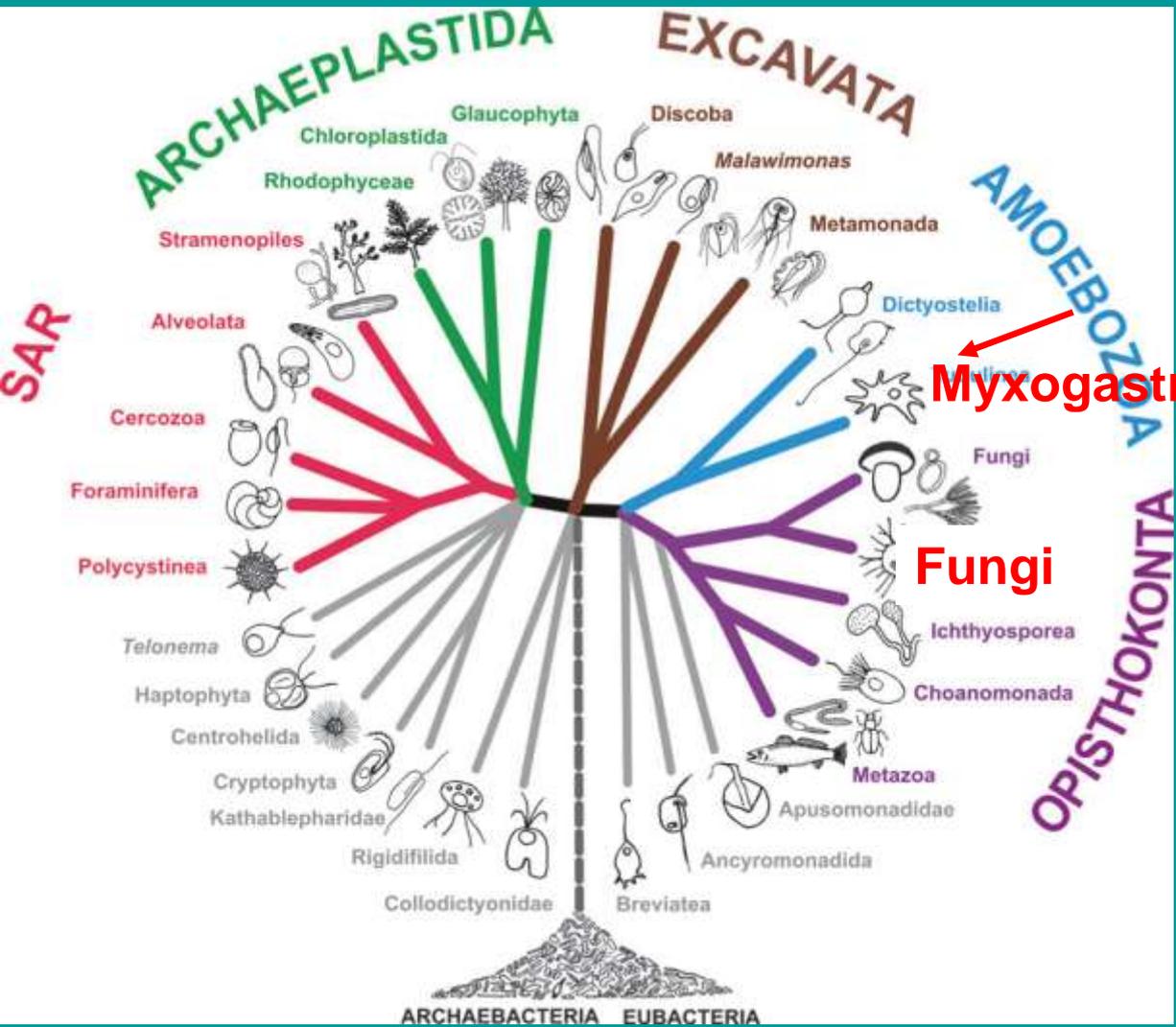


ПРОБЛЕМА СКРЫТОГО РАЗНООБРАЗИЯ МИКСОМИЦЕТОВ (МУХОМУСЕТЕС = МУХОГАСТРЕА)

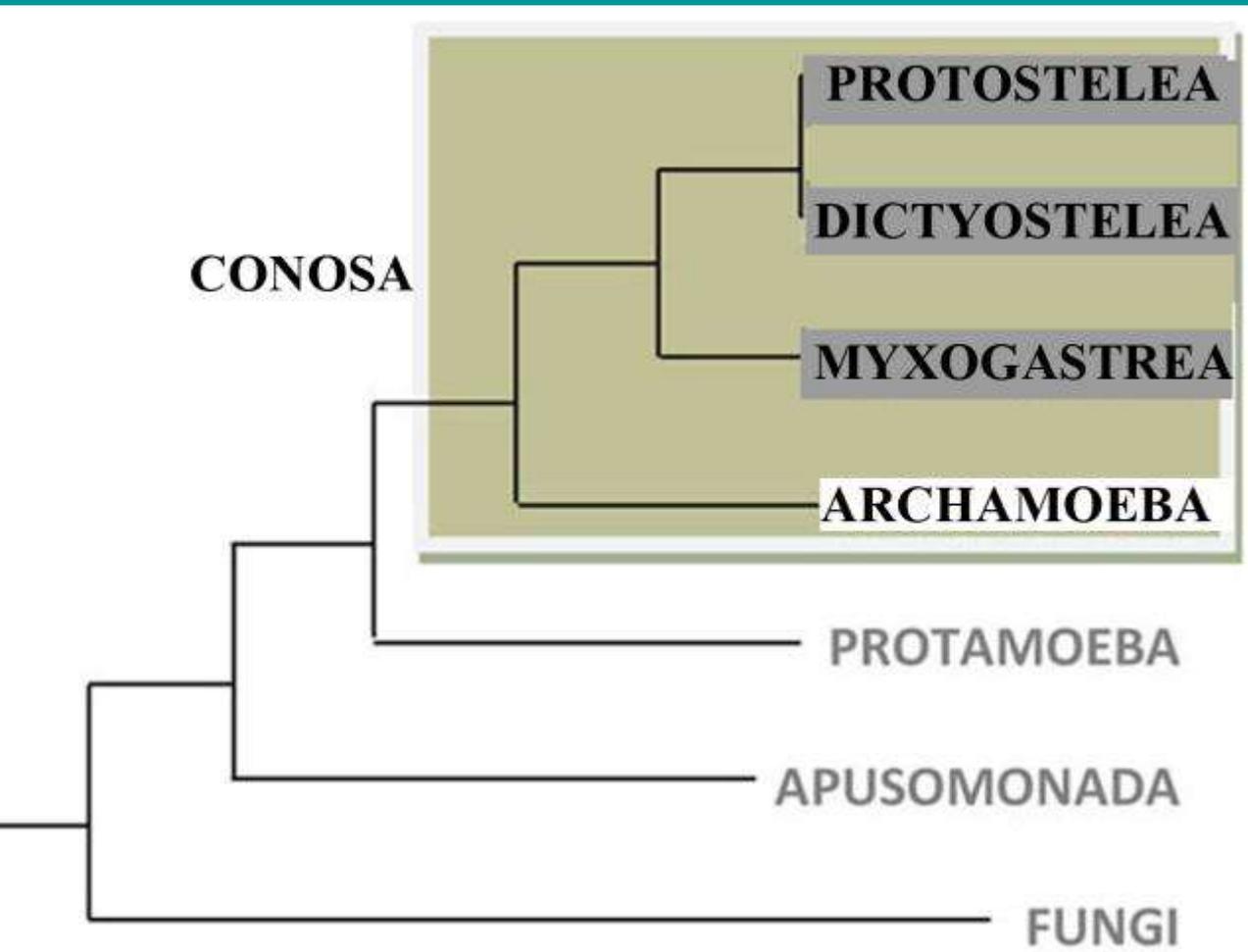


Место миксомицетов на филогенетическом дереве



Миксомицеты или миксогастриды в настоящее время рассматривают как отдельную филогенетическую кладу в пределах подтипа **Conosa**, входящего с состав **Amoebozoa** (Adl et al., 2012; Ruggiero et al., 2015).

CONOSA



Представителей *Conosa* отличает особый тип корешкового аппарата жгутика, который состоит из конусообразного набора микротрубочек, связанных с ядром.

Центры организации микротрубочек, участвующих в формировании кариомастигонтов, у архамеб связаны непосредственно с единственной кинетосомой, а у слизевиков ЦОМТы микротрубочек конуса и кинетосомы пространственно обособлены. Имеются отклонения от этой схемы.

Группы макротаксонов выделяемые на филограммах

Традиционная классификация

Myxogastria

Класс *Myxomycetes*
(= *Myxogastria*)

Клада темно-споровых/*Collumellidia*

Суперклада эхиностелид (*Echinostelium*)

Пор. *Echinosteliales*

Суперклада фусциспорид

Клада меридерматид (*Meriderma*)

Пор. *Stemonitales* p.p.

Клада стемонитовых (*Stemonitis*,
Comatricha)

Пор. *Stemonitales* p.p.

Клада лампродерматид (*Badhamia*,
Physarum, *Didymium*, *Lamproderma*)

Пор. *Physarales*,
Stemonitales p.p.

Клада светло-споровых/*Lucisporidia*

Суперклада крибрариевых (*Cribraria*)

Пор. *Liceales* p.p.

Суперклада трихиевых

Клада ретикуляриевых (*Lycogala*,
Reticularia, *Tubifera*)

Пор. *Liceales* p.p.

Клада лицеевых (*Licea*)

Пор. *Liceales* p.p.

Клада трихеивых (*Arcyria*, *Hemitrichia*,
Trichia)

Пор. *Trichiales*

Современная система макротаконов

миксогастриевых (Leontiev et al., 2017, in press)

Класс *Mухомycetes* (= *Мухогастрия*)

Подкласс *Columellomycetidae* (= *Columellidia*)

Пор. *Echinosteliales* (= *Echinosteliida*)

Пор. *Meridermatales* (= *Meridermatida*)

Пор. *Stemonitidales* (= *Stemonitida*)

Пор. *Physarales* (= *Physarida*)

Insertae sedis (6 родов, нет данных по филогении)

Подкласс *Lucisporomycetidae* (= *Lucisporidia*)

Пор. *Cribrariales* (= *Cribrariida*)

Пор. *Reticulariales* (= *Reticulariida*)

Пор. *Liceales* (= *Liceida*)

Пор. *Trichiales* (= *Trichiida*)

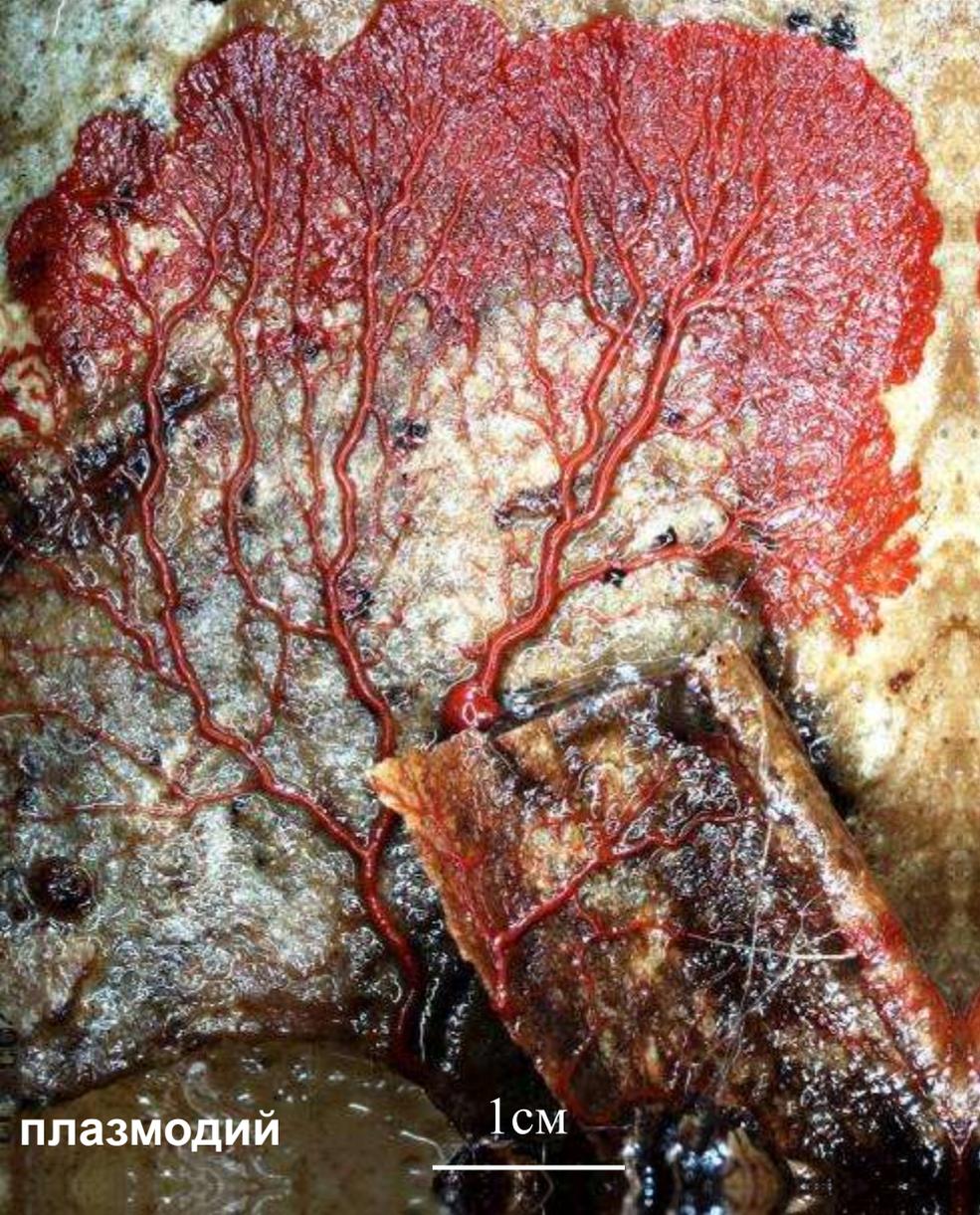
Insertae sedis (3 рода, нет данных по филогении)

Ceratiomyxa

Последние филогенетические построения показывают, что *Ceratiomyxa* формирует отдельную кладу, сестринскую по отношению к миксогастриевым и диктиостелиевым.



Краткая характеристика плазмодимальных миксомицетов (*Myxomycetes* = *Myxogastria*)



плазмодий

1 см

Известно около 1000 видов из 5 порядков.

Эукариоты, размеры плодовых тел варьируют от 50 μm – 50 см в диам. Фаготрофы, питаются микроорганизмами, детритом.



Physarum roseum

Плодовое тело или спорокарп

Echinosteliales

маленькие спорангии на ножках от 20 до 500 μm в длину, капиллиций может быть или отсутствует, светлая споровая масса, перидий обычно быстро исчезает



17KU X860

1448

10.00

JSM35



17KU X860

1449

10.00

JSM35



Echinostelium arboreum



100 mkm

Echinostelium minutum

Stemonitales

- **капиллиций состоит из нитей, обычно темных и гладких**
- **споры темные или черные**
- **у большинства родов спорокарпы – спорангии**
- **преобладающий тип плазмодия - афаноплазмодий**



Lamproderma columbinum

1000 μm

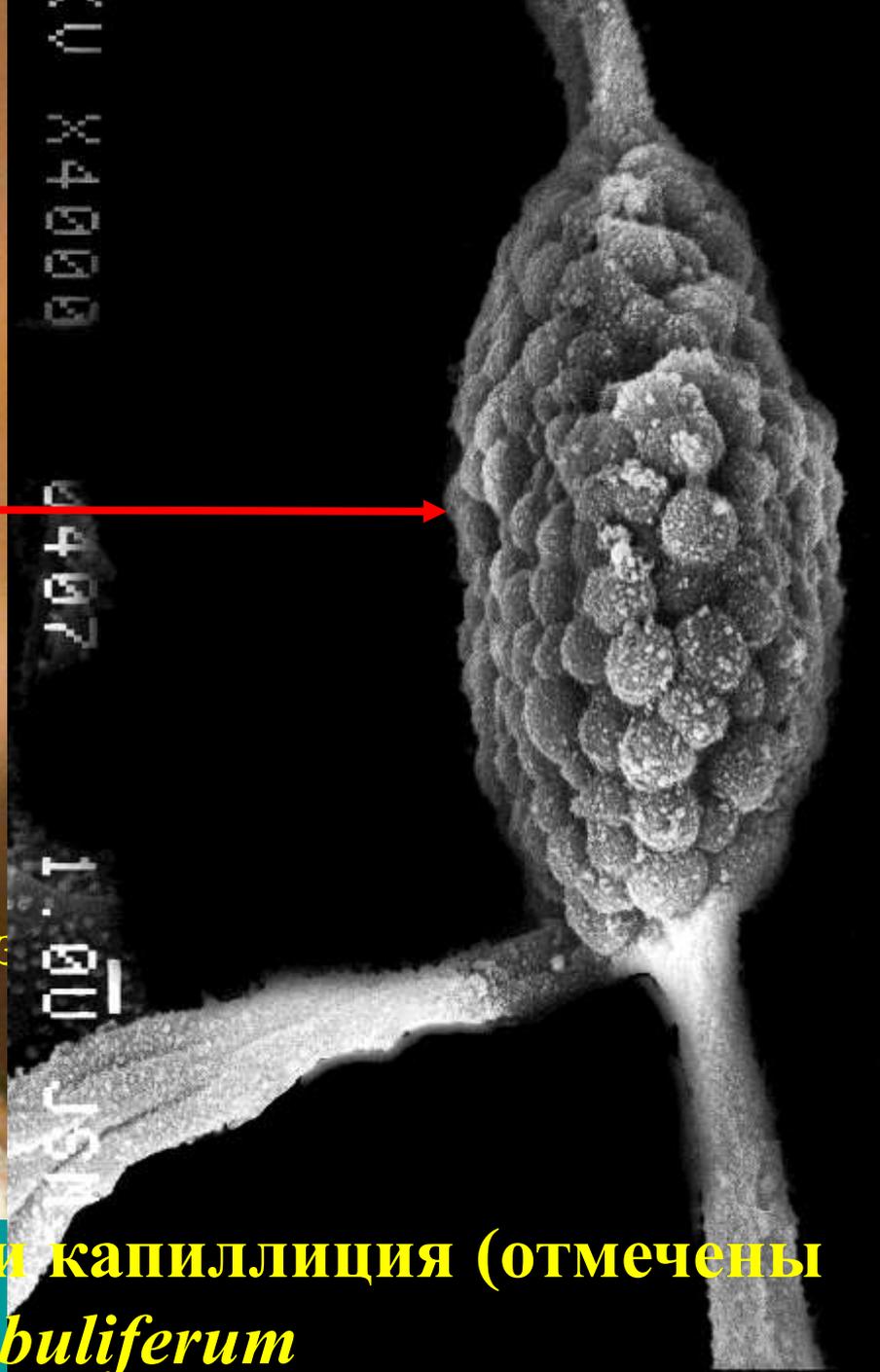
Stemonitopsis typhoides



500 μm

Physarales

- в плодовых телах или/и на их поверхности имеются известковые отложения в виде гранул, кристаллов или пластинок
- споровая масса всегда темная (черная или коричневая)
- плазмодий - фанероплазмодий



Обызвествленные узелки капиллиция (отмечены стрелками) *Physarum globuliferum*

Lepidoderma tigrinum



Liceales

(полифелитичный таксон)

- нет настоящего капиллиция
- псевдокапиллиций иногда имеется
- споры обычно светлой окраски
- у многих видов маленькие протоплазмодии

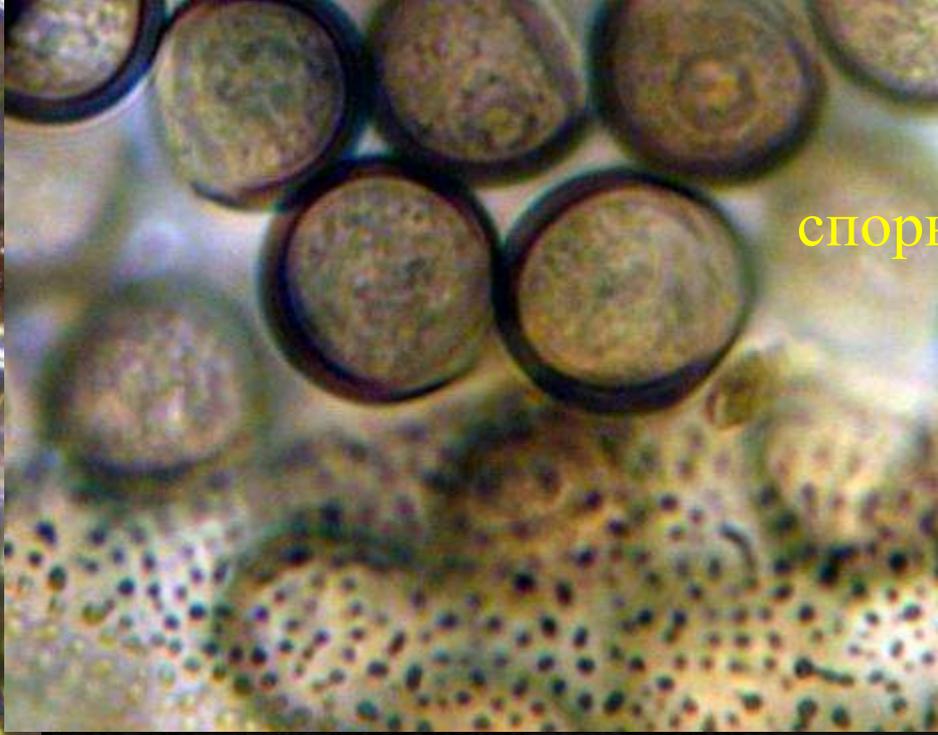
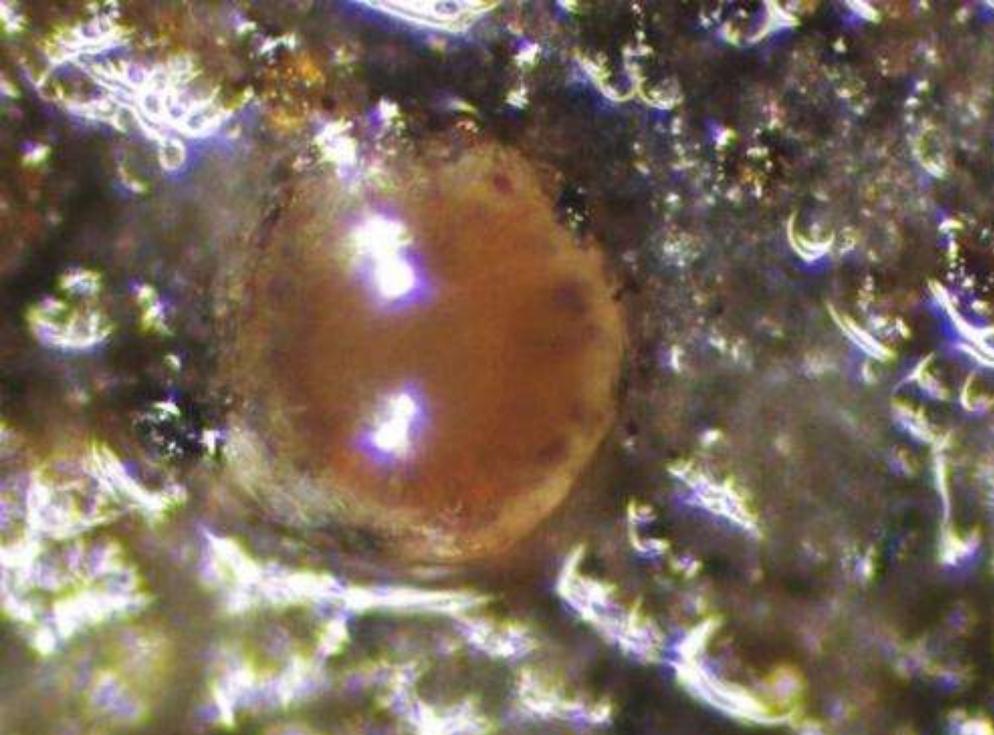




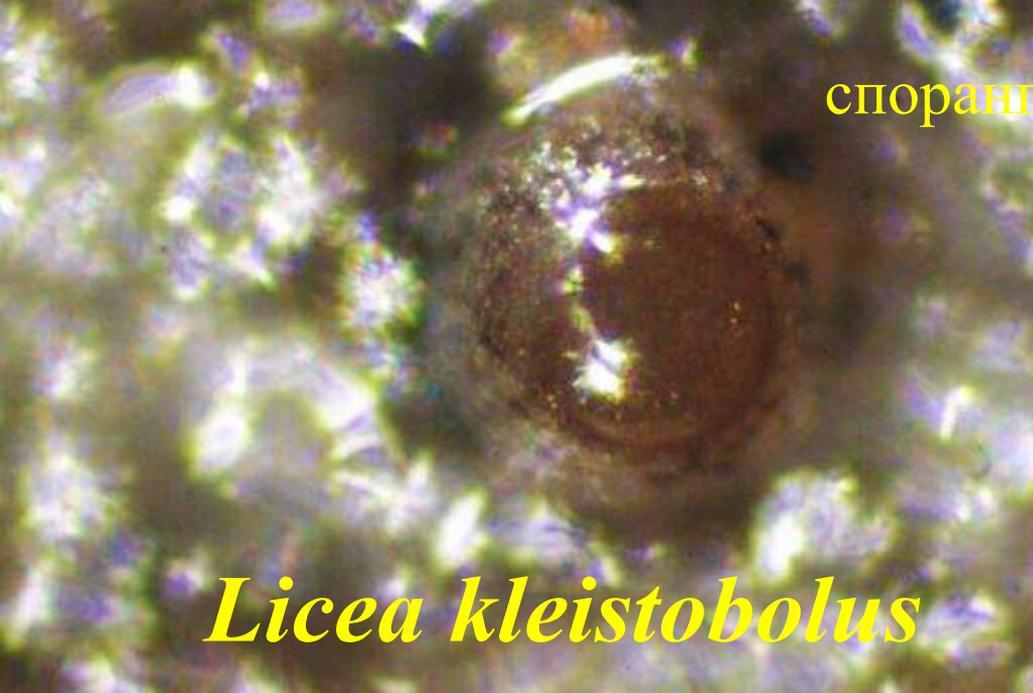
Reticularia lycoperdon

Lycogala epidendrum
«волчье вымя»





спори



спорангии



Licea kleistobolus

7KV X860 1302 10 0U USM35

Trichiales

- колонка всегда отсутствует
- споры обычно светлые (желтые, коричневые, оливково-желтые)
- нити капилиция часто скульптурированы спиральями, шипиками, различными выростами

Arcyria helvetica



Arcyria denudata



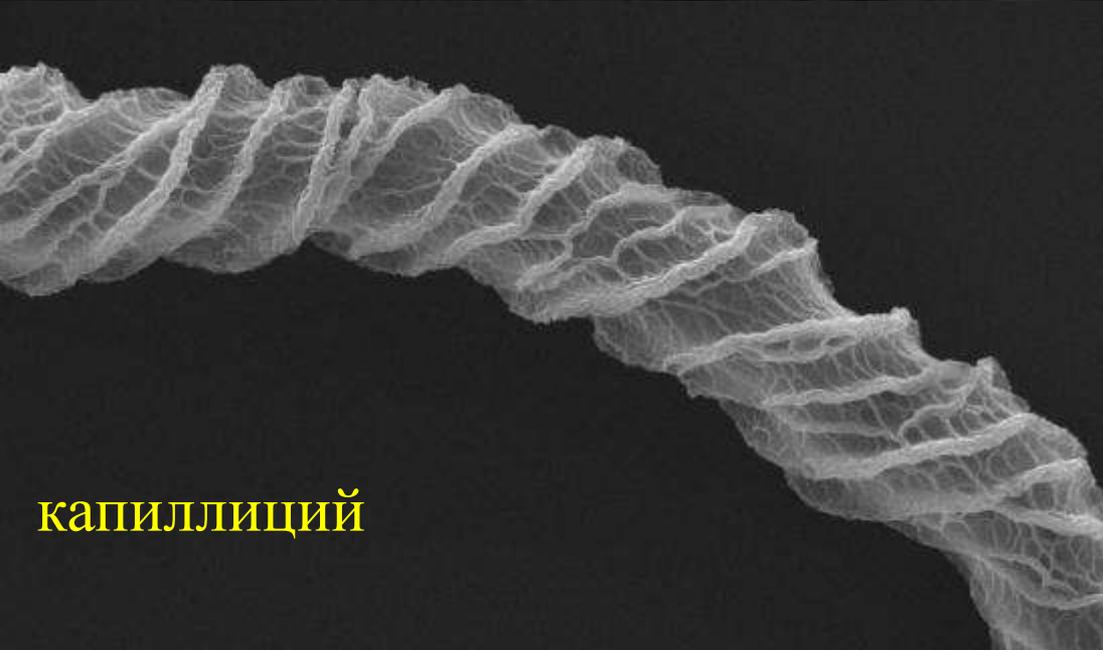
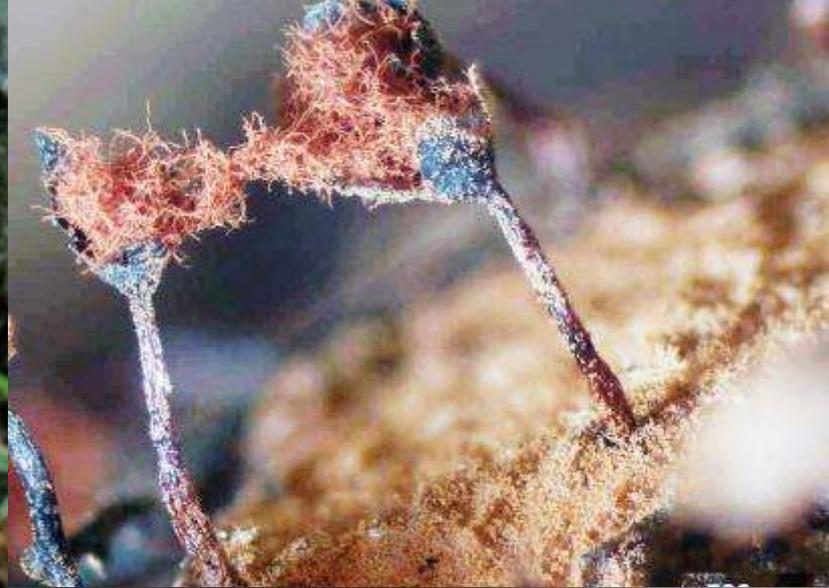
Arcyria incarnata



Arcyria cinerea



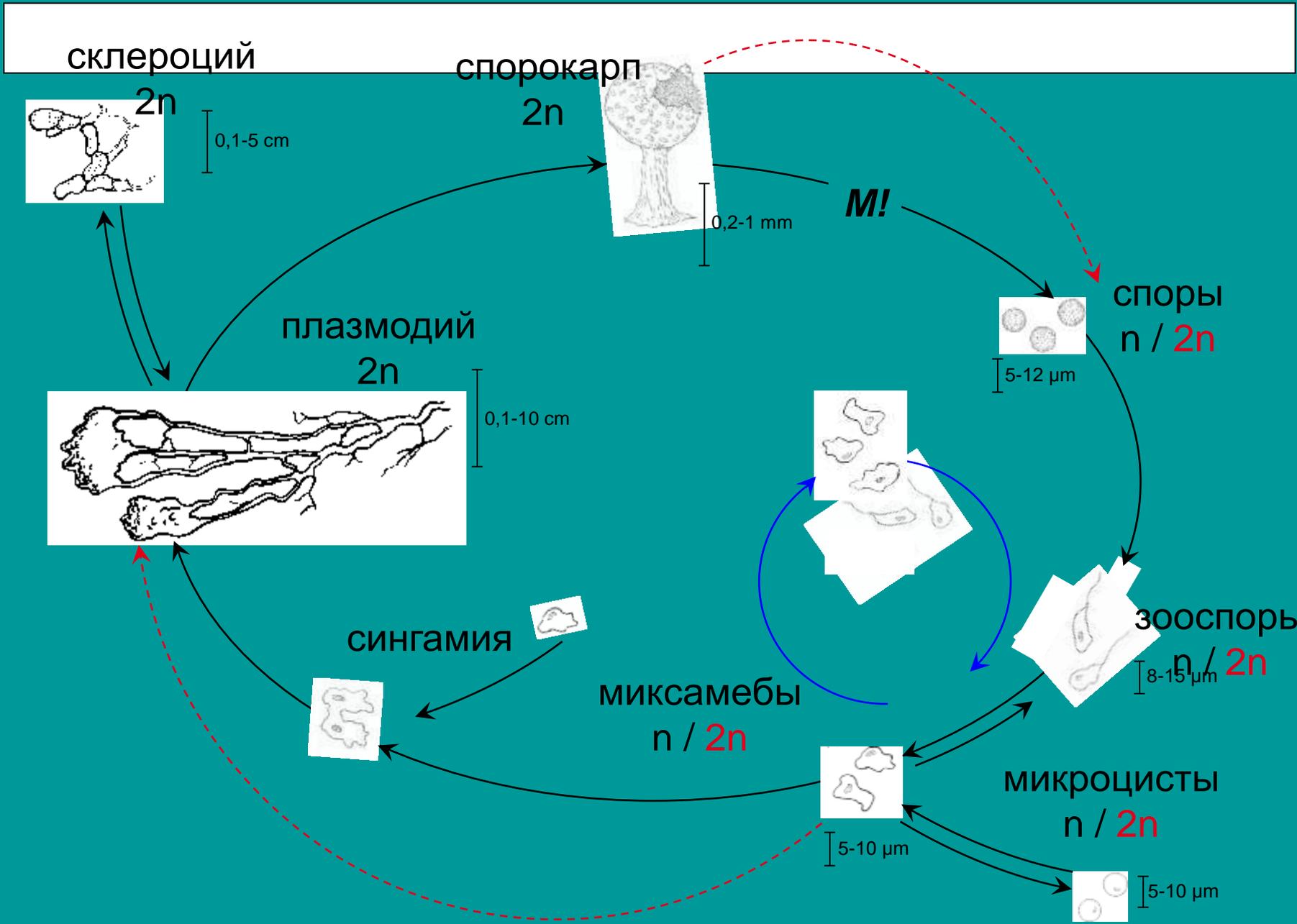
Arcyria versicolor



капиллиций



Trichia erecta



Репродуктивные системы МИКСОМИЦЕТОВ

- Большинство из изученных морфовидов миксомицетов включают как асексуальные, так и сексуальные линии.
- Преобладают гетероталлические однолокусные мультиаллельные системы скрещивания, как, например, у *Didymium iridis*.
- Более сложные системы включают два локуса с множественными аллелями как у *Physarum polycephalum*.
- Однако многие виды миксомицетов фенотипически являются гомоталлическими. Эти изоляты могут формировать плазмодий и затем плодовые тела из одной споры. Среди негетероталлических линий встречаются формы как с гапloidным, так и диплоидным жизненным циклом, которые не скрещиваются между собой.
- Переход от половой (гетероталлической) к бесполой (негетероталлической, возможно апомиктической) и наоборот системами наблюдался неоднократно в пределах одного морфовида.
- Предполагают, что формы с диплоидным жизненным циклом являются бесполоыми, хотя теоретически возможно и обратное.

Инструменты для работы с образцами



Методы сбора образцов



Гербарий



Влажные камеры



Полевые образцы

Морфологическая концепция вида до сих широко используется и основана на признаках спорокарпов

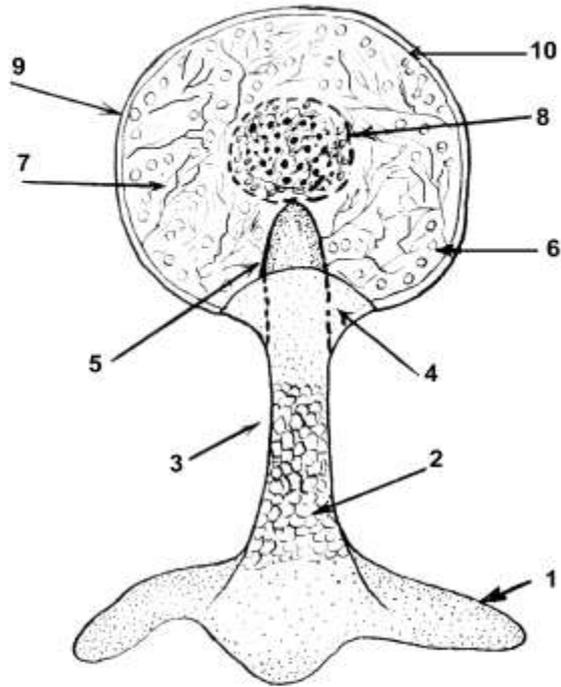
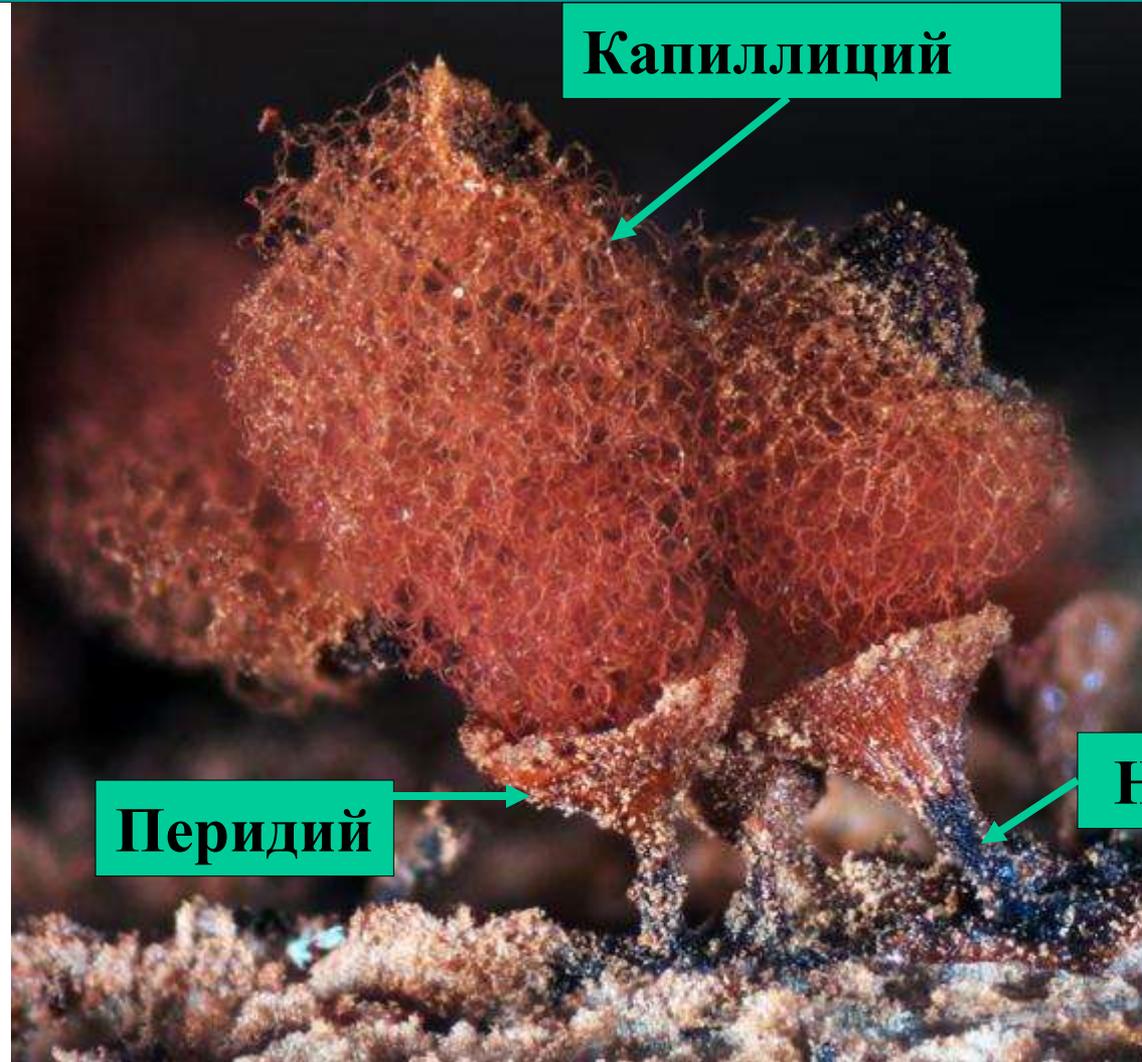


Рис. Схема строения спорофора миксомицетов.
Обозначения: 1 - гипоталлус; 2 - "спороподобные" клетки в ножке спорофора; 3 - ножка; 4 - чашечка; 5 - колонка; 6 - спора; 7 - капиллиций; 8 - псевдокапиллиций; 9 - наружный слой перидия; 10 - внутренний слой перидия.



Проблема морфовида

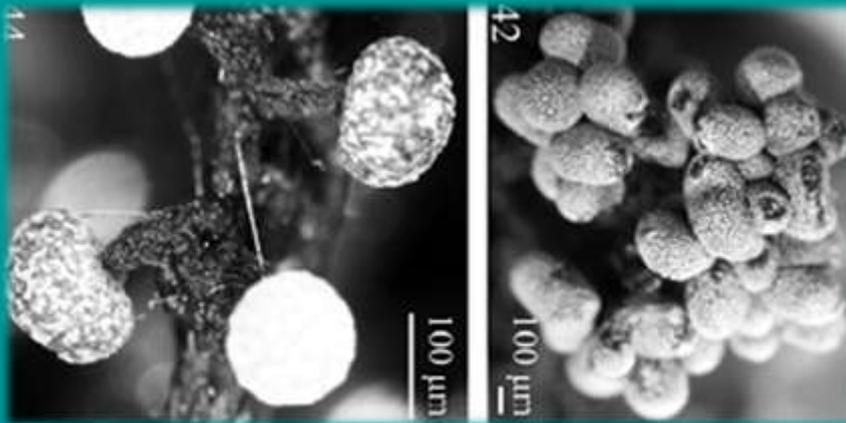
Пример 1

Комплекс морфовидов “*Physarum notabile*”

- Около 50 % всех видов миксомицетов известно только из типовых местообитаний или менее, чем из 5 мест. Весьма вероятно, что многие из таких «видов» представляют только морфологически отличные формы одного вида, приуроченные к особым местообитаниям. Примером является, *Physarum notabile*, один из хорошо известных обитателей крупных древесных остатков в умеренных и таежных лесах. Спорокарпы этого вида из пустынь Евразии, прохладных пустынь Великого Бассейна в США и теплых пустынь Омана имеют значительное разнообразие форм ножки и споротеки, а также их пропорции, распределения известны в структурах спорокарпа и т.д. Эти признаки плохо согласуются с характеристиками спорокарпов *Ph. notabile* из лесных районов с умеренным и холодным климатом. Комплексный морфологический и молекулярный анализ изолятов *Ph. notabile* из аридных районов позволил отделить их в качестве нового для науки вида – *Ph. pseudonotabile*. Филогенетический анализ на основе генов 18s SSU и *tef1* показал генетическую гетерогенность и полифилетичность видового комплекса *Ph. notabile* в рамках порядка *Physarales* (Novozhilov et al., 2013).

Physarum notabile T. Macbr.

- «Лесная» форма – *Ph. notabile* s.str. Характерна для хвойных и широколиственных лесов.
- **Аридная форма:** обнаружена в различных аридных регионах мира: Россия, Казахстан, Монголия, Китай, Оман, США и др. (Novozhilov et al., 2003, 2006, 2009, 2010; Schnittler et al., 2000, 2001, 2013). Отнесена к *Ph. notabile* как к наиболее близкому по морфологии виду.



• *Ph. notabile* (аридн.)



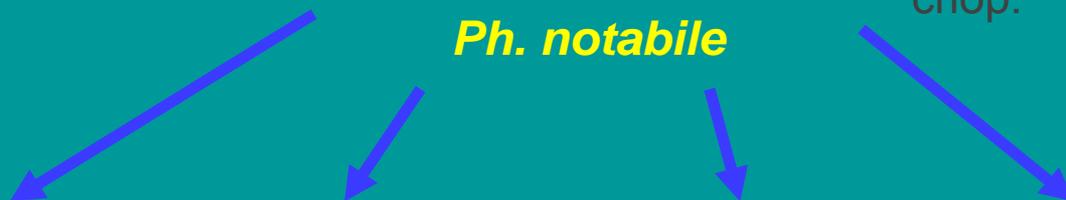
• *Ph. notabile* s.str



Ph. notabile – центр, вокруг которого собраны бесчисленные формы, отличающиеся по размеру, форме, узелкам извести, и даже по цвету, размеру и характеру поверхности спор.

(Hagelstein, 1944)

Ph. notabile



Ph. pusillum



Ph. leucophaeum



Badhamia panicea



Ph. album

«Таксономический континуум»

Соответствие между морфовидами и кладами на филогенетическом дереве

- Для некоторых морфовидов с размытой границей и множеством переходных форм (например комплекс *Physarum notabile*) конфликт между определением по морфологическим признакам и кластеризацией риботипов на филогенетическом дереве может отражать реальные трудности в подборе подходящих морфологических признаков для определения.

• Аридный морфотип *Ph. notabile*

Сравнение с *Ph. notabile* s.str.



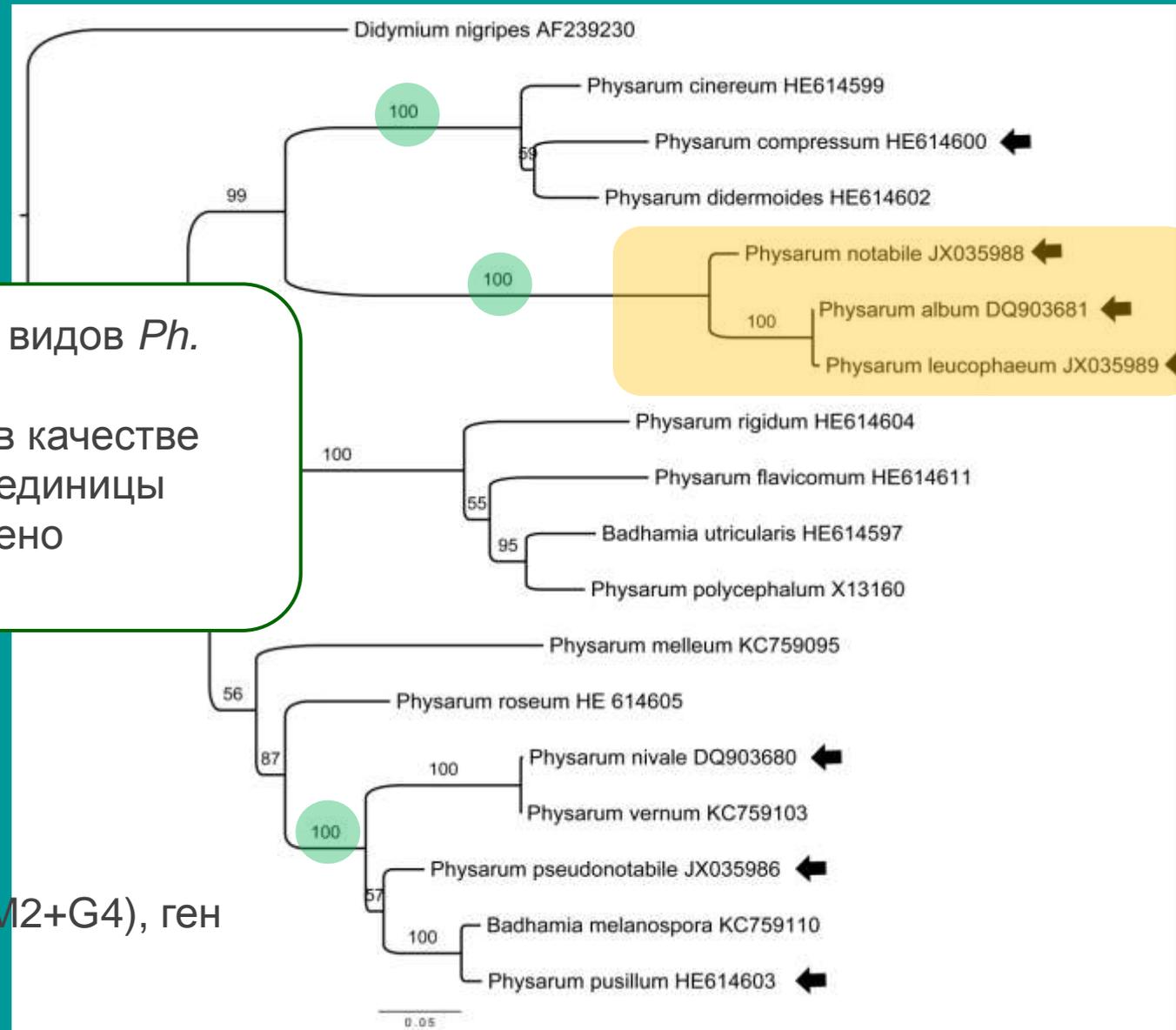
• «Лесной» морфотип

• Аридный морфотип

Дерево: ML,
модель TNe+G4, ген
SSU, 646 п.о.

• Комплекс видов *Ph. notabile*

Вывод: комплекс видов *Ph. notabile* **не может** рассматриваться в качестве таксономической единицы (также подтверждено маркером *tef1*)



Дерево – ML (TIM2+G4), ген SSU, 2270 п.о.

Биологические виды (Clark 1995, Collins 1979).

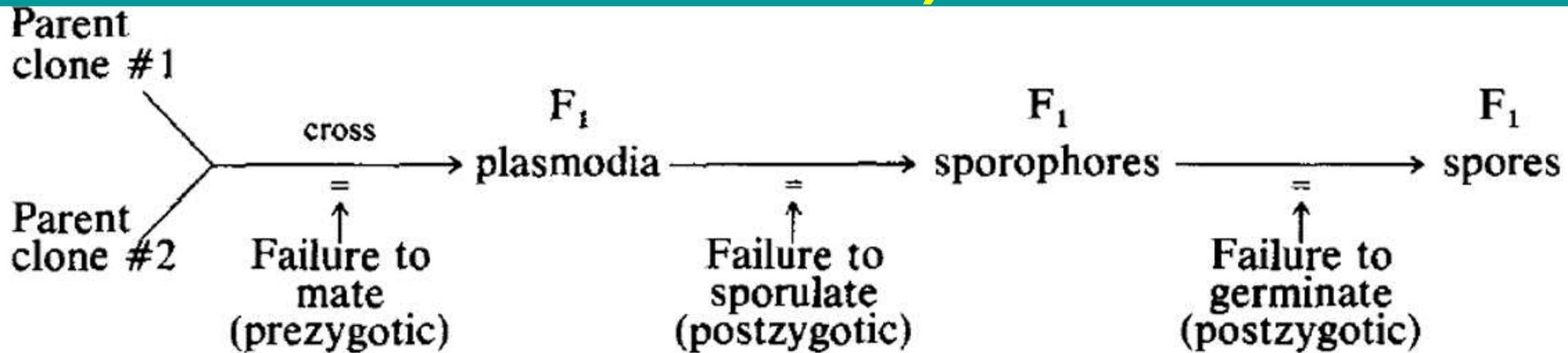


Схема возможных барьеров при скрещивании двух изолятов морфовида миксомицета (по Collins: “Myxomycete biosystematics: some recent developments and future research opportunities”, 1979)

- Ранние исследования скрещиванию изолятов (клонов), были основаны на альтернативной биологической концепции вида и проводились главным образом на представителях Physarales.
- Было показано, что отдельные изоляты одного морфовида часто разделяются на группы (предположительно биовиды), которые несовместимы друг с другом. Кроме того, в условиях культивирования были обнаружены бесполое клоны, что привело к критике морфологическую концепции вида у миксомицетов.

Ограничения теста по скрещиванию

- Моноспоровые культуры – только 5-10% морфовидов относительно легко культивируются,
- Труднореализуемый на практике и трудоемкий метод, так как необходимо, чтобы культуры могли проходить полный жизненный цикл от споры до споры (спорокарпов).

Проблема

Таким образом, морфологическая концепция вида миксомицетов относительно хорошо применима для практической таксономии, однако имеет ограниченные возможности для разграничения биологических видов и плохо подходит для выявления «скрытого разнообразия» в пределах морфовидов.

Биологическая концепция, лучше учитывает особенности биологии миксомицетов, но с трудом применима на практике.

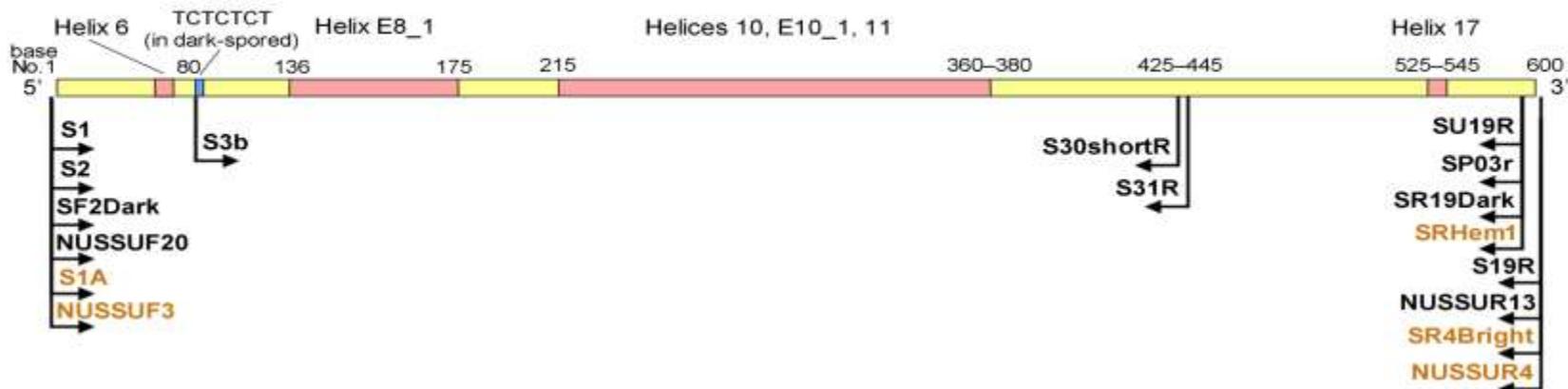
Генетическое разнообразие морфовидов

Использование молекулярных маркеров может помочь взаимодействию этих двух концепций.

Недавние молекулярные исследования с использованием в качестве маркера начальной последовательности (около 600 bp) гена малой субъединицы рибосомальной РНК (18s SSU), выявили высокое разнообразие в пределах одного морфовида (Novozhilov et al., 2013; Feng, Schnittler, 2017).

Для темноспоровых миксомицетов данный ген относительно легко идентифицируется по уникальной подписи в его начале **TCTCTCT**. Эта часть последовательности свободна от интронов и включает четыре очень

вариабильных участка (Helix 6, Helix E8_1, Helices 10, E10_1, 11, Helix 17). Данный участок рассматривается как перспективный маркера для баркодинга темно-споровых миксомицетов (Schnittler et al., 2017).



Другие маркеры перспективные для баркодинга

Маркер	Плюсы	Минусы	Публикации
SSU: 18S rRNA	Высокая вариабельность. Мультикопийный внеядерный ген. Имеются универсальные праймеры для темно-споровых миксомицетов.	Множество риботипов в пределах одного морфовида.	Novozhilov et al., 2013; Feng & Schnittler 2016; Dagamac et al., 2017).
ITS	Высокая вариабельность. Не подходит для реконструкции глубокой филогении, но может подойти для баркодинга.	Универсальные праймеры для ITS отсутствуют.	(Baba et al., 2015).
EF1A	Одни и те же праймеры подходят для темно-споровых и светлоспоровых видов. Имеются вариабельные интроны. Возможно их использование для изучения внутривидовой изменчивости.	Подчиняется Менделевским законам наследования, поэтому возможна гетерозиготность.	Feng et al., 2016
COI	Умеренно консервативен, позволяет использовать универсальные праймеры для темно- и светло-споровых видов. Нет интронов. Достаточная вариабельность для выявления биовидов.	Иногда может наследоваться от обоих родителей.	Kawano et al. 1991, 1993; Feng & Schnittler 2015, Shchepin et al. 2016

Криптические виды

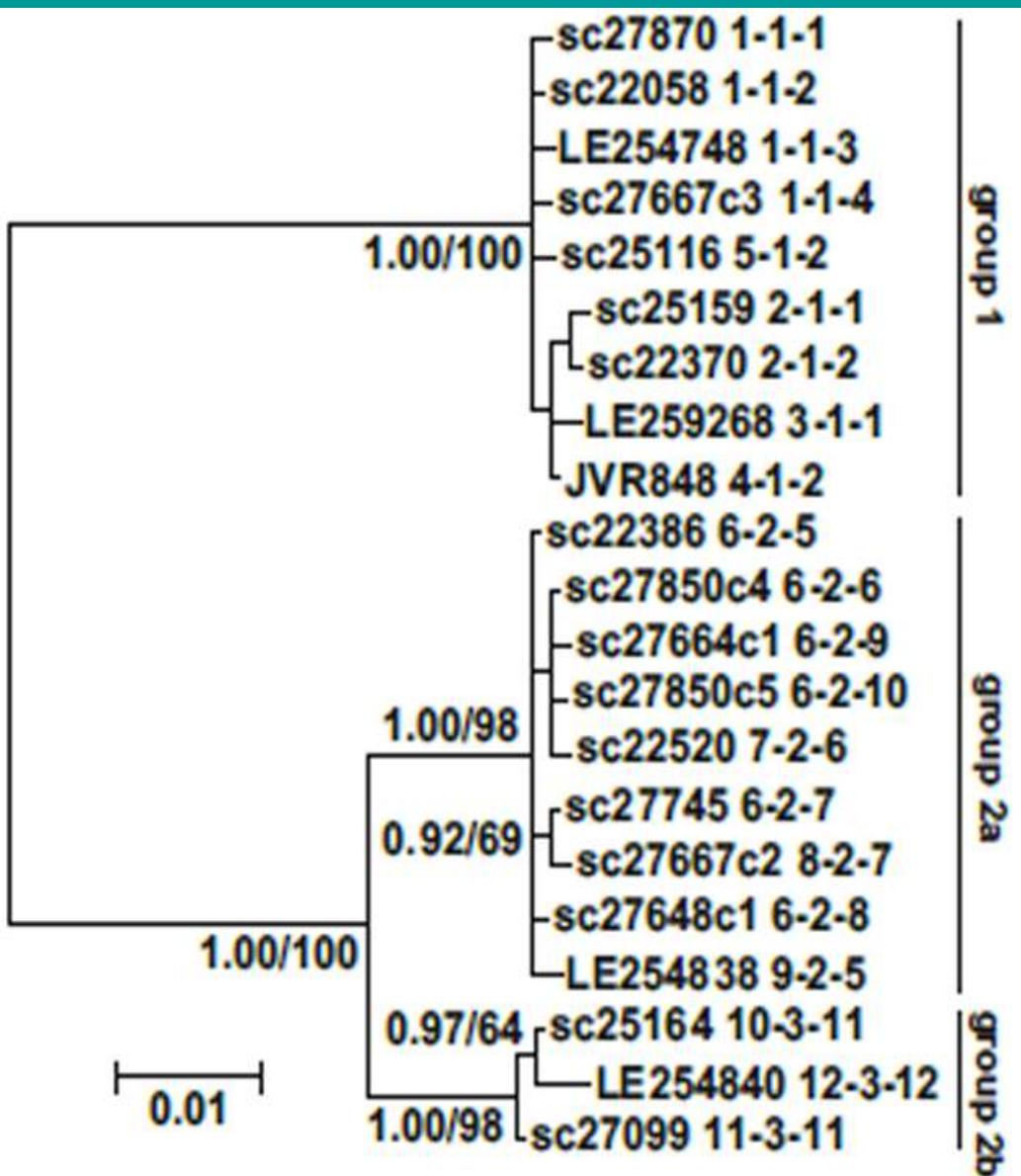
- Как и у других групп протистов, среди миксомицетов можно ожидать выявление большого числа криптических видов. Практически для всех морфовидов, изученных с использованием данного маркера, пропорция генотипов, выявляемых в пределах одного морфовида варьировала между 1:5 и 1:25 (Schnittler et al., 2017).
- Это было также показано в работах с использованием других маркеров (*tef1-α* и COI), для *Trichia varia* (Feng and Schnittler, 2015), *Meriderma* spp. (Feng et al., 2016) и *Hemitrichia serpula* (Dagamac et al., 2017).



Среднее число риботипов среди морфовидов МИКСОМИЦЕТОВ

Морфовиды	Среднее число риботипов	Публикация
Нивальные темно-споровые виды	1.7 (ср.число)	Novozhilov et al., 2013
Ксилофильные светло-споровые виды	2.6 (ср.число)	Feng, Schnittler, 2017
<i>Lamproderma puncticulatum</i>	3	Fiore-Donno et al., 2010
<i>Lamproderma columbinum</i>	7	Fiore-Donno et al., 2010
<i>Tubifera ferruginosa</i>	24	Leontiev et al., 2014
<i>Trichia varia</i>	18	Feng, Schnittler, 2017
<i>Hemitrichia serpula</i>	40	Dagamac et al., 2017
<i>Badhamia melanospora</i>	37	Aguilar et al. 2014

Пример 2 *Trichia varia* (Feng, Schnittler, 2015)



Наболее правдоподобное Байесовское филогенетическое дерево морфовида *Trichia varia*, на основе генов **18S rRNA**, **COI**, **EF1A**).

Выявлены генотипы (21), формирующие три клады. Генотипические комбинации трех маркеров, признаки генетической рекомбинации, характер распределения интронов указывают на наличие трех криптических видов, которые размножаются преимущественно половым путем и репродуктивно изолированы. Однако значимых морфологических различий между ними не выявлено.

Пример 3 *Meriderma atrosporum* (Feng et al., 2016)

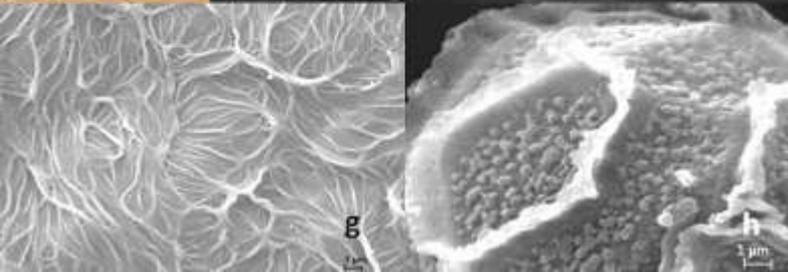
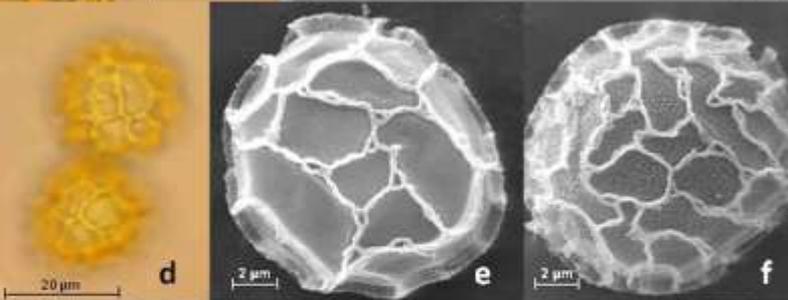
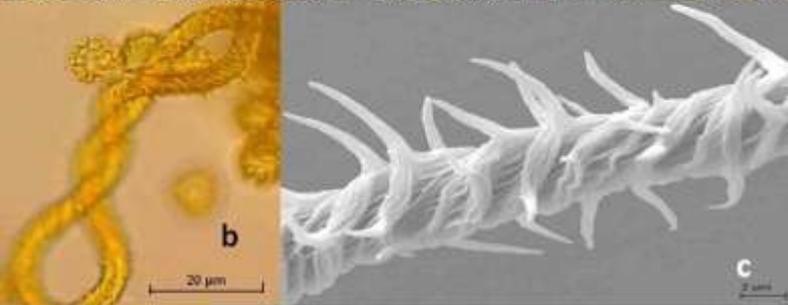


Филогения гена EF1A, включая очень вариабильный сплайсомальный интрон, представлена 7-ю филогруппами, эта топология подтверждена сиквенсами SSU. Две трети изученных образцов были гетерозиготны по EF1A. За редким исключением риботипы хорошо соотносились с филогруппами. Этот паттерн хорошо согласуется с предположением о наличии в пределах одного морфовида репродуктивно изолированных половых биовидов. Однако морфологических отличий между этими популяциями не было найдено, что делает их «невидимыми» для традиционных таксономистов.



Пример 4

Hemitrichia serpula (Dagamac et al. 2017)



Соответствуют или нет морфологические различия криптическим видам и согласуются ли они с последовательностями маркерных генов ?

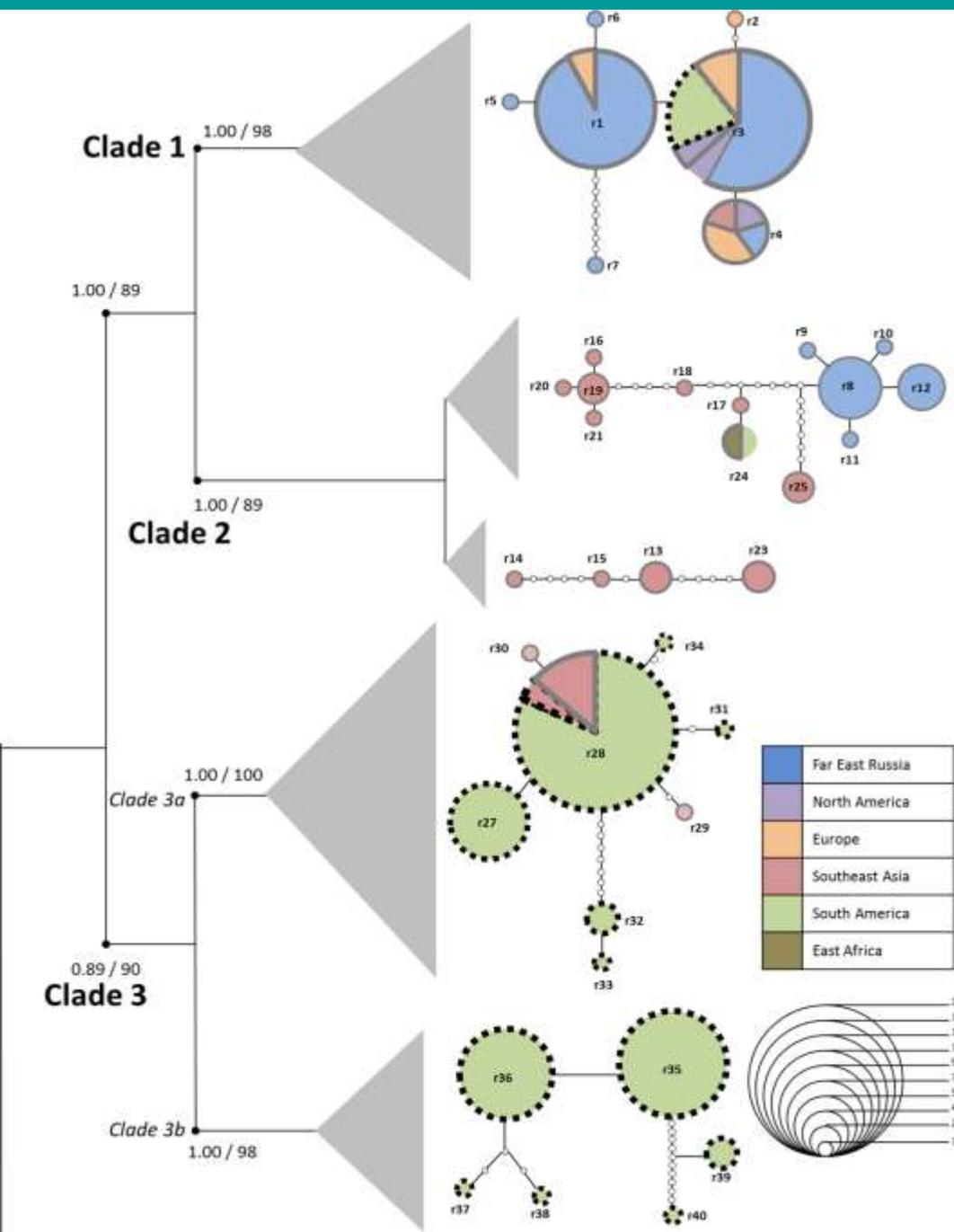
Праймеры

S1A

(CTGGTTGATCCTGCCAGAAT)

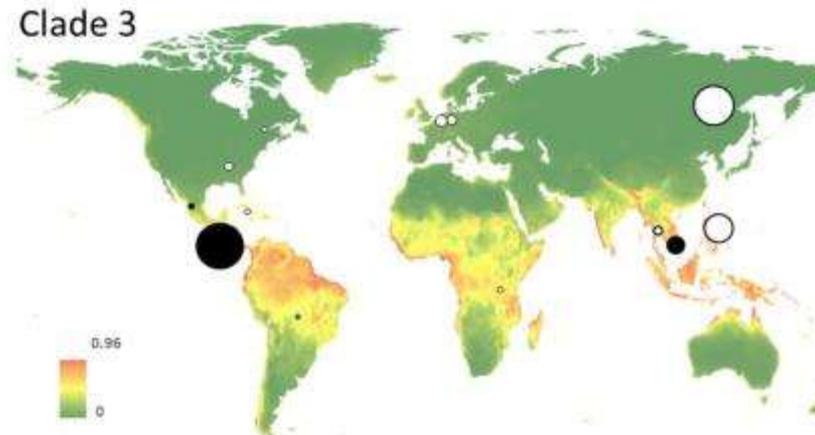
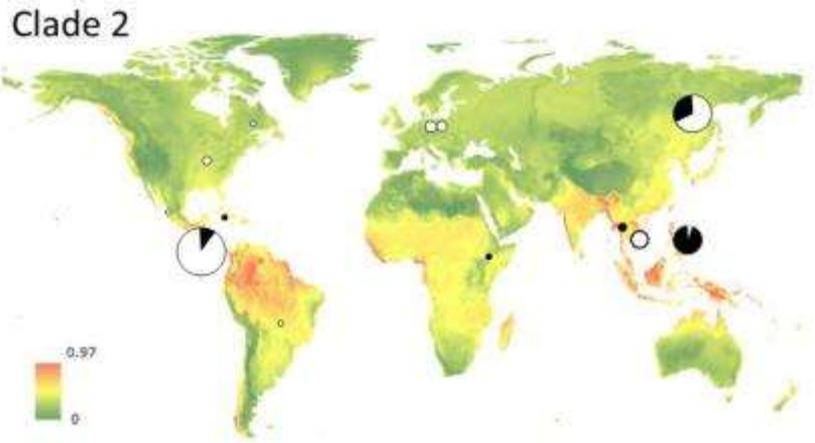
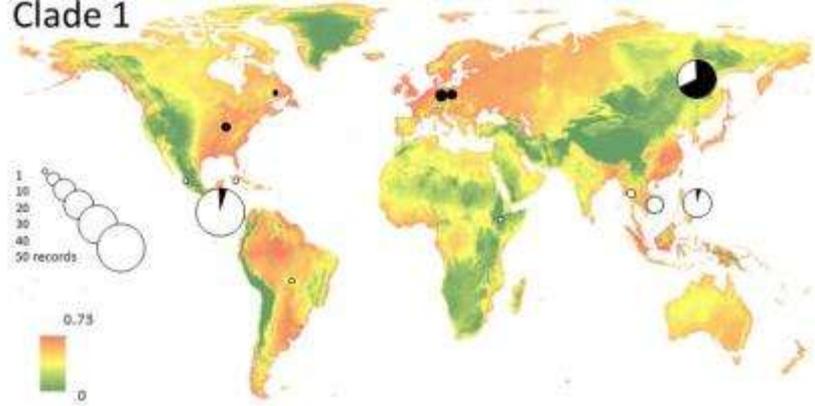
SRHem1

(CGGGGTTTAAAGGTCCCC)



Генеалогические отношения среди 40 риботипов представлены в виде сети, в результате анализа с помощью программы TCS.

Серые треугольники соответствуют числу образцов в сети. Размер окружностей пропорционален числу последовательностей, представляющих каждый риботип. Маленькие кружки между риботипами показывают гипотетические переходные риботипы. Разными цветами показаны районы происхождения образцов. Морфотипы, представляющие риботип **var. serpula** и **var. parviverrucospora** отмечены гладкой и прерывистой линией соответственно (Dagamac et al., 2017).

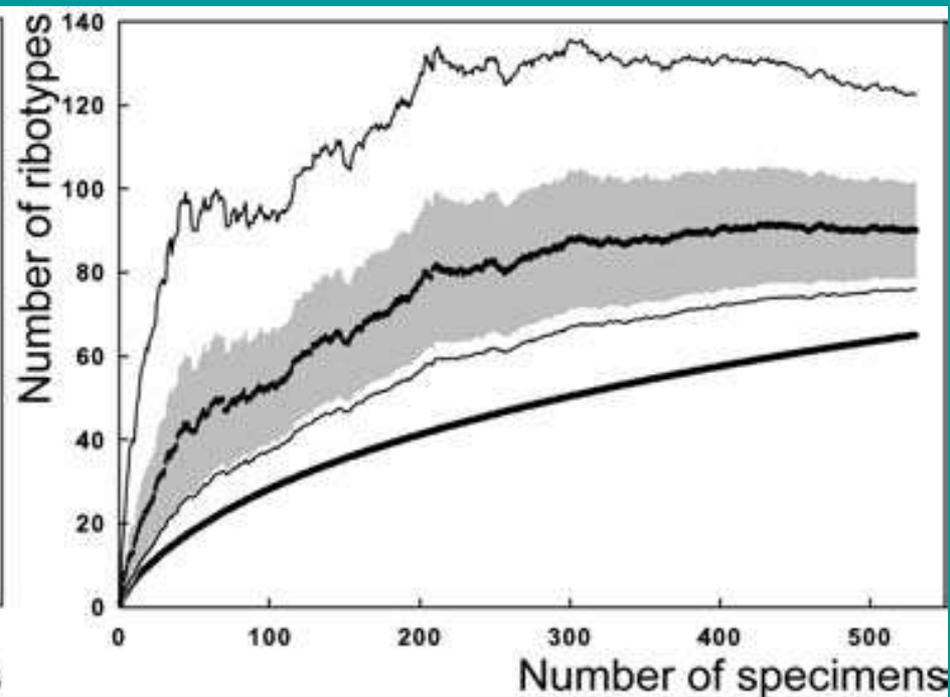
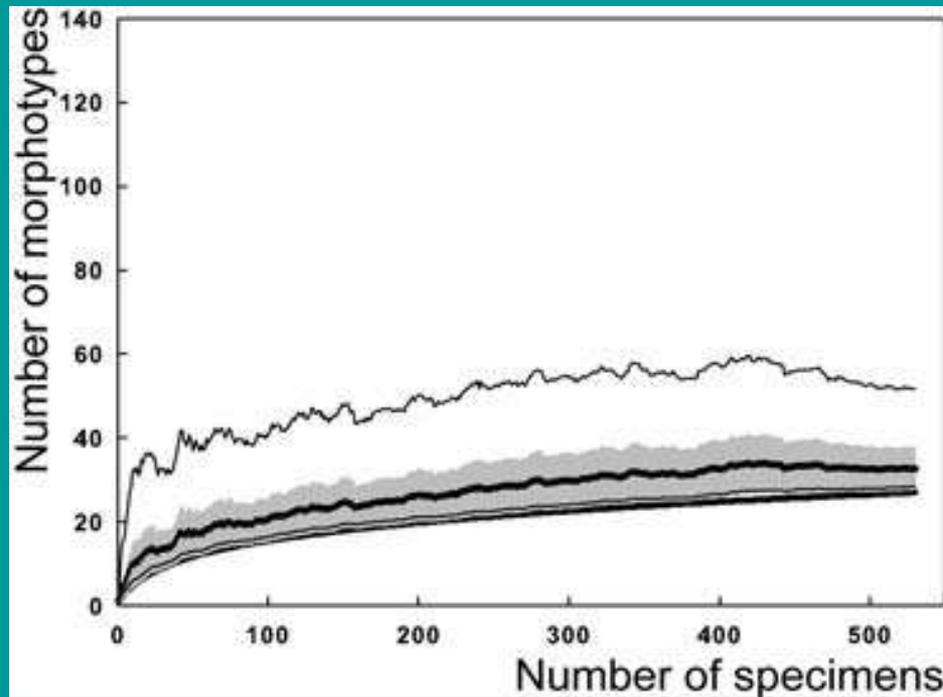


Биогеографический паттерн распределения риботипов *H. serpula* на Земле

Отличается ли экологическая дифференциация криптических видов от таковой у соответствующих им морфовидов?

- Вероятностная оценка распределения риботипов трех клад *Hemitrichia serpula* на основе модели экологической ниши, (использован алгоритм MaxEnt). Размер кружков пропорционален числу образцов. Черные сектора на диаграммах показывают число образцов, относящихся к той или иной кладе (Dagamac et al., 2017).

Бутстреп анализ разнообразия морфовидов и соответствующих риботипов.



Бутстреп анализ разнообразия морфовидов показывает распределения с «длинным хвостом», т.е. только небольшое число видов регулярно спороносит в природе и выявляется обычными методами сбора плодовых тел в природе, значительная часть остается неучтенной, также как их риботипы.

Проблемы и перспективы

1. Морфовиды или генетические виды?

Число морфологических признаков для анализа ограничено; скорее всего мы имеем дело с большим числом криптических видов.

Для их выявления необходимо развитие метода баркодлинга последовательностей, источником ДНК могут служить споры.

Получены первые обнадеживающие и пока не опубликованные результаты, в частности для темно-споровых видов.

2. Если популяции миксамеб в природе могут существовать без перехода в стадию споруляции, то мы имеем дело с огромным неучтенным разнообразием (скрытое разнообразие).

Какие предпосылки и косвенные факты есть для этого вывода:

- теоретически популяции амеб бессмертны, даже, если они теряют способность к споруляции они продолжают жить.
- опыты по культивированию отдельных видов показывают, что амебы могут более года существовать в культуре без перехода в стадию плазмодия;

3. Практически нет данных об экологической дифференциации биологических видов, их распределении по эконишам.

Метагеномный анализ образцов субстратов

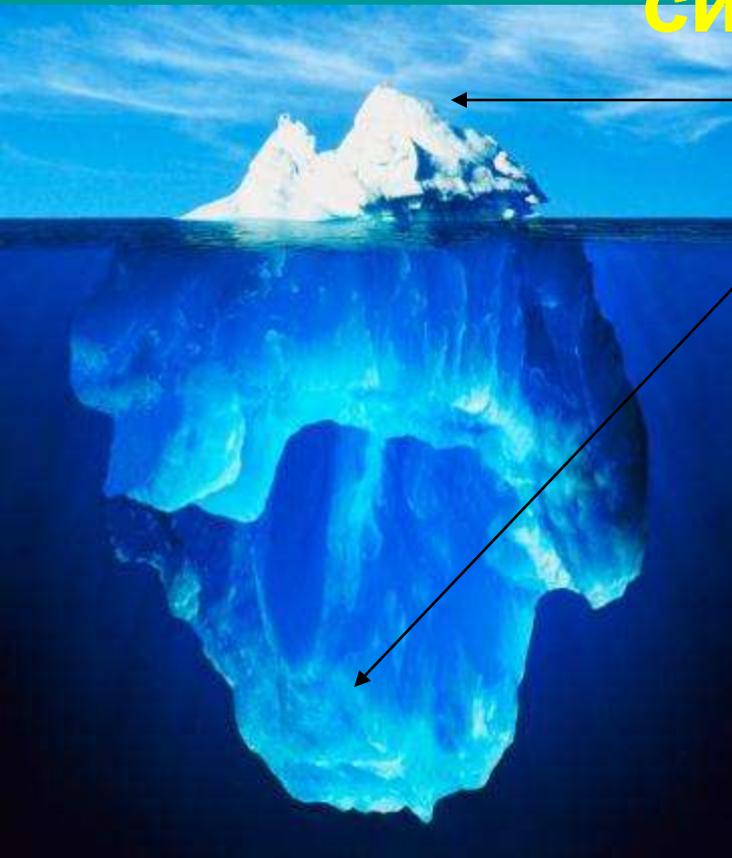


- Использование молекулярно-генетических методов – один из способов выявления «скрытых» популяций, что крайне важно для анализа видовых ареалов миксомицетов (Kamono and Fukui, 2006; Kamono et al., 2009a, b; Kamono et al., 2013).
- В частности это было показано в отношении нивальных миксомицетов, особой группы, обитающей в почве и формирующей спорокарпы на границе с тающим снегом. Эти виды спороносят весной преимущественно в субальпийском и альпийском поясе, характеризующимся длительным сохранением снежников при довольно высоких дневных температурах воздуха (Ronikier and Ronikier, 2009; Schnittler et al., 2015). Однако изредка они регистрируются и в равнинных таежных ландшафтах (Erastova et al., 2017).
- В результате метагеномных исследований почвы, проведенных в равнинных районах Германии (Fiore-Donno et al., 2016) и северо-запада России (Shchepin et al., 2016), были выявлены последовательности гена 18S рРНК темно-споровых миксомицетов. Следует подчеркнуть, что спорокарпы этих видов там ранее не обнаруживались, несмотря на интенсивные исследования.

Первые результаты выявления «скрытого разнообразия» миксомицетов в Нижне-Свирском заповеднике (Shcherin et al., pers. comm.)

- 15 OTU удалось идентифицировать до уровня вида, 70 до рода, 68 до семейства, 7 до порядка. Еще 20 OTU имеют неясное положение в пределах Columellidia.
- Таким образом, до уровня рода и ниже удалось определить 47% OTU, что демонстрирует высокую эффективность применения филогенетического подхода для анализа последовательностей гена 18S рРНК из экологических образцов.
- Низкий процент определения OTU до видового уровня (8,3%) объясняется высоким выбранным порогом сходства (98,4%), позволяющим различать биовиды в пределах классических морфовидов, а также неполнотой референсной базы и преобладанием в ее составе последовательностей нивальных видов миксомицетов – экологической группы, представители которой обычны в горных регионах.

На пути к созданию базы данных сиквенсов SSU



1000 морфовидов
10000 – 15000 видов

Морфовиды или генетические (филогенетические) виды?

Ограничения морфологической концепции:
Число морфологических признаков для анализа ограничено. Имеется большое число криптических видов.

Крайне необходима референсная база сиквенсов SSU, полученных из ДНК гербарных образцов морфовидов, выверенных экспертами.

Например, в первом специальном исследовании с применением баркодинга (Feng, Schnittler, 2016) показано, что только 73 последовательности светло- и 270 последовательностей темно-споровых миксомицетов нашли совпадение с сиквенсами из NCBI, которые сопровождалась информацией об образце, заслуживающем доверия.

Благодарю за внимание

- Работы выполнялись при поддержке гранта РФФИ
- (15-29-02622 офи-м) и DFG (SCHN 1080/2, RTG 2010).