

На правах рукописи



Жуйкова Елена Викторовна

СОСТАВ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ
ЛИНИЙ *FOMES FOMENTARIUS* (L.) FR. В СЕВЕРНОЙ АЗИИ

1.5.15 Экология (биологические науки)

1.5.18 Микология (биологические науки)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Екатеринбург – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук

Научный руководитель

Мухин Виктор Андреевич

доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Переведенцева Лидия Григорьевна

доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры ботаники и генетики растений Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

Красуцкий Борис Викторович

доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник лаборатории лесовосстановления, защиты леса и лесопользования Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук

Ведущее учреждение:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»

Защита состоится 20 февраля 2024 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета Д 004.005.01 при Институте экологии растений и животных УрО РАН, 620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202.

Факс: (343) 260-82-56, e-mail: dissovet@ipae.uran.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института экологии растений и животных УрО РАН, <http://ipae.uran.ru>.

Автореферат разослан 20 ноября 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук



Золотарева Наталья Валерьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Ксилотрофные базидиомицеты (Fungi, Dikarya, Basidiomycota) – это вероятно единственная известная группа организмов, способных к твердофазной ферментации лигноцеллюлозного комплекса древесины [Рипачек, 1967; Рабинович и др., 2001; Heilmann-Clausen and Boddy, 2008]. В силу этого они играют исключительно важную роль в углеродном цикле лесов, в том числе в эмиссии парниковых газов. Эти факты определяют современную экологическую парадигму относительно их места и роли в лесных экосистемах. Они уникальная, биосферно значимая группа организмов, жизнедеятельность которых, наряду с таковой древесных растений, лежит в основе углеродного цикла и сопряженных с ним циклов других биогенных элементов [Мухин, 2015].

Наиболее известной частью группы дереворазрушающих базидиомицетов являются трутовые грибы – филогенетически разнородная группа преимущественно с трубчатым гименофором [Ryvarden and Gilbertson, 1993]. Это широко распространенные организмы, ареалы которых в большинстве случаев охватывают все северное полушарие, реже – какой-либо один из континентов [Gilbertson and Ryvarden, 1986; Ryvarden and Gilbertson, 1993].

Широко известным представителем данной группы является настоящий трутовик *Fomes fomentarius* (L.) Fr. – один из наиболее обычных и массовых видов ксилотрофных грибов в лесах Евразии и Северной Америки [Бондарцев, 1953; Gilbertson and Ryvarden, 1986; Бондарцева, 1989; Мухин, 1993; Ryvarden and Gilbertson, 1993].

В последнее время он привлекает внимание и как перспективный источник биологически активных и лекарственных соединений [Peintner et al., 1998; Peintner and Pöder, 2000; European medicinal polypores..., 2014; Medicinal value and..., 2016]. Однако его биотехнологическое использование ограничивает отсутствие данных о генетической и эколого-географической изменчивости [European medicinal polypores..., 2014; Fungal strain matters..., 2015; Medicinal value and..., 2016]. Широкое распространение, высокая численность и экологическая

пластичность этого вида дают основание предполагать наличие у него высокого уровня генетической изменчивости. Кроме того, в его жизненном цикле присутствуют конидиальные стадии, способствующие формированию клональной внутривидовой структуры [Mukhin and Votintseva, 2002]. Все это диктует необходимость изучения изменчивости настоящего трутовика, в том числе на молекулярно-генетическом уровне.

Благодаря широкому использованию молекулярно-генетических методов, было показано, что многие монотипические морфовиды грибов на самом деле являются гетерогенными, состоящими из филогенетических линий, сопоставимых по характеристикам с филогенетическими видами [A reinterpretation of..., 1999; Ainsworth & Bisby's..., 2008; Relationships among North..., 2010; Phylogenetic and phenotypic..., 2013; Genetic variability in..., 2013; Fungal strain matters..., 2015; How to resolve..., 2019]. В частности, в Европе настоящий трутовик состоит из нескольких симпатрических криптических генотипов или филогенетических линий [The occurrence and..., 2012; Genetic variability in..., 2013; How to resolve..., 2019]. С другой стороны, изучение генетической гетерогенности данного вида требует проведения исследований в пределах всего его ареала [Medicinal value and..., 2016], значительная часть которого находится в Северной Азии.

Цель работы: изучение генетического разнообразия на популяционно-видовом уровне и экологических особенностей *Fomes fomentarius* (L.) Fr. в Северной Азии.

Задачи:

1. изучить генетическое разнообразие популяций настоящего трутовика на Урале, в Сибири и на Дальнем Востоке;
2. изучить биогеографические закономерности молекулярно-генетического разнообразия настоящего трутовика в Северной Азии;
3. изучить экологические (трофические) особенности генетических линий и сублиний, определить их филогенетический статус.

Научная новизна. Впервые с использованием молекулярно-генетических методов на примере настоящего трутовика проведено изучение генетической

изменчивости и структуры широко ареальных видов ксилотрофных грибов. Установлено, что в Северной Азии данный мономорфный вид является генетически гетерогенным и состоит из нескольких криптических филогенетических линий и сублиний, обладающих выраженной географической и экологической индивидуальностью. Впервые установлено, что филогенетические линии соответствуют описываемым в Европе симпатрическим криптическим видам *Fomes fomentarius* sensu stricto и *F. inzengae* (Ces. & De Not.) Cooke. Показано, что наибольшее распространение в Северной Азии имеет *F. fomentarius* s. str. – бореальный вид, представленный двумя группами географических популяций, а *F. inzengae* – новый для Северной Азии редкий неморальный вид, для которого Урал является восточной границей распространения.

Теоретическая и практическая значимость. Установлены географические закономерности генетической изменчивости настоящего трутовика – одного и наиболее экологически важных деструкторов древесного дебриса, ответственных за эмиссию CO₂ в лесных экосистемах Урала, Сибири, Дальнего Востока. Эти данные впервые дают достаточно полное представление об особенностях экологической, генетической и географической структуры и объеме мономорфных широко ареальных видов ксилотрофных грибов.

Данные по генетической изменчивости настоящего трутовика, составу и экологии его филогенетических групп необходимы для использования этого вида в биотехнологии, а также для разработки методов диагностики фитосанитарного состояния лесов с использованием молекулярно-генетических методов. Результаты работы используются в курсах «Альгология и микология», «Экологическая физиология грибов», читаемых студентам Института естественных наук и математики Уральского федерального университета им. первого Президента России Б. Н. Ельцина.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В Северной Азии *Fomes fomentarius* (L.) Fr. представлен двумя криптическими филогенетическими линиями (А и В) и тремя сублиниями (А1,

A2, B2), обладающими выраженной географической индивидуальностью: A1 встречается преимущественно на Дальнем Востоке, B2 – только на Урале, а A2 – на Урале и в Сибири.

2. Филогенетические линии/сублинии обладают экологической индивидуальностью: в трофическом спектре грибов сублиний A1 и A2 отсутствует древесина *Populus*, и они преимущественно развиваются на древесных остатках *Betula*, тогда как грибы сублинии B2 не встречаются на остатках *Betula* и развиваются преимущественно на *Populus*.

3. В Северной Азии, как и в Европе, настоящий трутовик – это комплекс криптических видов: *Fomes fomentarius sensu stricto* и *Fomes inzengae* (Ces. & De Not.) Cooke. *F. fomentarius sensu stricto* – широко распространенный бореальный вид, представленный двумя географическими группами популяций: евроазиатской (сублиния A2) и дальневосточной (сублиния A1), *F. inzengae* встречается только на Урале и представлен одной европейской группой популяций (сублиния B2).

Степень достоверности и апробация результатов. Обоснованность выводов и защищаемых положений, представленных в диссертационной работе, обеспечивается большим объемом данных, полученных с использованием современных молекулярно-генетических методов, а также современных методов обработки и анализа данных. В ходе выполнения работы сформирована коллекция из 254 плодовых тел и 18 чистых дикариотических культур настоящего трутовика, получены и проанализированы 94 оригинальных последовательности ITS рДНК. Результаты исследования прошли рецензирование и опубликованы в отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в базы данных Web of Science и Scopus.

Основные теоретические положения и практические результаты исследований были представлены и обсуждались на: Четвертом Съезде Микологов России (г. Москва, 12–14 апреля 2017 г.), Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной памяти Н. В. Глотова «Экология: факты, гипотезы, модели» (г. Екатеринбург, 9–13 апреля 2018 г.), Всероссийской

конференции с международным участием «Микология и альгология России. XX–XXI век: смена парадигм» (г. Москва, 19–20 ноября 2018 г.), III Национальной научной конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения академика РАН П. Л. Горчаковского «Информационные технологии в исследовании биоразнообразия» (г. Екатеринбург, 5–10 октября 2020 г.), Всероссийской конференции молодых ученых «Экология: факты, гипотезы, модели», посвященной Международному году фундаментальных наук (г. Екатеринбург, 18–22 апреля 2022 г.), V (XIII) Международной ботанической конференции молодых ученых (г. Санкт-Петербург, 25–29 апреля 2022 г.), LVII Всероссийской конференции молодых ученых «Экология: факты, гипотезы, модели», посвященной 90-летию со дня рождения профессора С. Г. Шиятова (г. Екатеринбург, 17–21 апреля 2023 г.).

Работа выполнена при поддержке РФФИ в рамках проекта № 20-34-90054, РФФИ и Свердловской области в ходе проекта № 20-44-660012, Государственных заданий (темы № АААА-А19-119031890084-6 и № 122021000092-9).

Личный вклад автора. Личный вклад автора заключается в сборе полевых материалов, проведении работ по изучению генетического разнообразия, обработке и обобщению результатов, формулировании целей, задач, выводов, защищаемых положений и написании диссертационной работы.

Публикации. Всего опубликовано 25 научных работ, из них 11 по теме диссертации, в том числе 3 работы в изданиях рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и индексируемых базами WoS, Scopus.

Структура работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов, списка литературы и 6 приложений. Работа изложена на 153 страницах, основной текст диссертации содержит 17 таблиц и 23 рисунка. Список литературы включает в себя 183 источника, из них 126 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д.б.н., профессору В. А. Мухину. Благодарю д.б.н. Д. В. Веселкина, д.б.н. В. Л. Семерикова, к.б.н. С. А. Семерикову, к.б.н. О. С. Ширяеву, к.б.н. Д. К. Диярову, Д. И. Дубровина, Д. П. Дубровину, О. С. Рафикову (ИЭРиЖ УрО РАН),

д.б.н. А. С. Третьякову, В. Д. Владыкину (УрФУ), к.б.н. С. В. Волобуева (БИН РАН) за ценные консультации и помощь в процессе выполнения работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1 Объект исследования

Объект исследования – настоящий трутовик, *Fomes fomentarius* L. (Fr.) или *Fomes fomentarius sensu lato* (Basidiomycota, Agaricomycetes) – массовый космополитный вид дереворазрушающих грибов в Северном полушарии [McDonald, 1938; Бондарцев, 1953; Gilbertson and L. Ryvarden, 1986; Breitenbach and Kranzlin, 1986; Farr et al., 1989; Kotlaba, 1997; Schmidt, 2006; Vernicchia, 1990]. В умеренных широтах Евразии он является одним из основных деструкторов древесного дебриса в лиственных лесах [Мухин, 1993].

1.2 Биоматериалы для молекулярно-генетического анализа

В качестве биоматериалов выступали базидиокарпы настоящего трутовика, собранные в 1994–2017 гг. научным руководителем д.б.н., профессором В. А. Мухиным (120 шт.) и диссертантом в 2019–2021 гг. (134 шт.) на территориях Урала, Сибири, Дальнего Востока. При проведении полевых работ использовали традиционные микологические методы сбора и гербаризации базидиокарпов трутовых грибов [Бондарцев, 1953; Бондарцева, 1989; Ryvarden and Gilbertson, 1993]. Объединенная коллекция из 254 базидиокарпов хранится в Институте экологии растений и животных УрО РАН. Информация о находках на Урале и в Зауралье (записи о 184 плодовых телах) совместно с таковыми данными из Музея ИЭРиЖ УрО РАН (SVER, данные о 64 плодовых телах) опубликованы на портале GBIF [GBIF: The Global...] в виде датасета [Zhuikova and Mukhin, 2021].

Для молекулярно-генетического анализа были отобраны 94 базидиокарпа, из них 50 с территории Урала (Пермский край – 3, Свердловская – 32, Челябинская – 7, Оренбургская обл. – 4, Республика Башкортостан – 4), 17 – из Сибири и с Дальнего Востока (Республика Алтай – 4, Красноярский край – 2, Иркутская область – 2, Республика Бурятия – 1, Республика Саха – 1, Приморский край – 5, Сахалинская область – 2). Кроме того, были использованы базидиокарпы

из Крыма (5), Республики Коми (6), Костанайской области Республики Казахстан (9) и Японии (7).

В качестве материала для получения ДНК изолятов также были использованы чистые дикариотические культуры (18 шт.), выделенные из базидиокарпов с территории Свердловской области с использованием традиционных методов [Промышленное культивирование съедобных..., 1978; Благовещенская, 2017].

1.3 Молекулярно-генетический анализ

В качестве ДНК-маркера использовали последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров (internal transcribed spacer, ITS) 1 и 2 рибосомальной ДНК, и гена 5.8S рРНК. В работе последовательность ITS1-5.8S-ITS2 анализировали с использованием специфичных для базидиомицетов праймеров ITS1-F (5'-СТТGGTCAТТТАGAGGAAGTAA-3') и ITS4-B (5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3') [Gardes and Bruns, 1993]. Основную часть работ выполняли в лаборатории молекулярной генетики растений и грибов Института естественных наук и математики Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина (г. Екатеринбург).

Высечки из плодовых тел или дикариотический мицелий объемом до 0.5 см³ измельчали в стерильных фарфоровых ступках с добавлением жидкого азота. Из полученного порошка ДНК экстрагировали с использованием коммерческих наборов, в основном *diaGene* для выделения ДНК из растительной ткани (ООО "Диаэм", РФ) по прилагаемому к набору стандартному протоколу. Высушенную ДНК растворяли в 50–100 мкл Трис-ЭДТА буфера или деионизированной воды. В каждую партию образцов входили отрицательный и положительный контрольные образцы.

Большинство ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси из буферного раствора с 2.5 мМ MgCl₂, 0.2 мМ dNTP, 0.1 мкМ каждого праймера, 0.08 ед./мкл HS-Taq ДНК полимеразы и 2, 5 или 10 мкл раствора ДНК. В каждую постановку ПЦР также включались пробирки с внутренними (положительным и отрицательным) контролями ПЦР. Программа ПЦР включала начальную

денатурацию 95 °С в течение 5 мин, 35 циклов денатурации при 95 °С – 30 с, отжига праймеров при 55 °С – 45 с, элонгации при 72 °С – 45 с, и финальную элонгацию при 72 °С – 10 мин. Результаты ПЦР визуализировали с помощью горизонтального электрофореза. Все вышеуказанные процедуры выполняли с соблюдением требований по предотвращению контаминаций. Большинство процедур очистки продуктов ПЦР ферментами или электрофорезом в агарозном геле, а также секвенирование по Сэнгеру в двух направлениях выполняла компания ООО “Синтол” (г. Москва, РФ). Обработку первичных данных секвенирования проводили с использованием программ Sequencing Analysis Software v.5.3.1 от Applied Biosystems, FinchTV v.1.5.0 и MEGA v.7.

В работе использованы как оригинальные (94 сиквенса), так и привлеченные из открытых баз данных (GenBank NCBI и UNITE) ITS1-5.8S-ITS2 последовательности (216 сиквенсов). Пул из 28 референсных сиквенсов сформирован из описанных как типичные сиквенсы в работах The occurrence and... [2012], Phylogenetic and phenotypic... [2013], Genetic variability in... [2013], Medicinal value and... [2016], How to resolve... [2019].

Выравнивание последовательностей проводили с помощью алгоритма Muscle с ручной проверкой результатов. Филогенетические деревья построены методом присоединения соседей (Neighbor Joining, NJ) согласно двухпараметрической модели Кимуры [Kimura, 1980] с дискретным гамма-распределением (+G) с 5 категориями скорости. Статистическая оценка деревьев проведена с помощью бутстрэп метода (1000 повторений). Деревья построены в масштабе с длинами ветвей, измеряющимися количеством нуклеотидных замен на сайт. В качестве внешней группы выбраны референсные последовательности *Fomes fasciatus* (Sw.) Cooke. Выравнивание последовательностей, подбор модели [Nei and Kumar, 2000], филогенетический анализ и построения проведены в программе MEGA v.7 [Kumar et al., 2016].

Показатели генетического полиморфизма рассчитывали на основе выравнивания без полиморфных позиций (R, M, Y и другие удалены у всех последовательностей). Матрицу сходства считали в веб-сервисе Multiple Sequence

Alignment EMBL-EBI [Multiple Sequence Alignment], нуклеотидные разнообразие (π) и дивергенцию (D_{xy}) – при помощи программы DnaSP v.6.12 [DnaSP 6: DNA sequence..., 2017].

Оценка географического распространения была проведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа с использованием фактора «сублиния», а значения широт находок в качестве зависимой переменной. Статистический анализ субстратной приуроченности проведен с использованием критерия χ^2 с поправкой Йейтса. Расчеты выполнены в статистическом пакете Statistica 8.0.

Глава 2. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ СОСТАВ НАСТОЯЩЕГО ТРУТОВИКА НА УРАЛЕ

Дана характеристика Уральской физико-географической стране и зонального подразделения растительного покрова.

2.1 Генетический полиморфизм

Филогенетический анализ 59 последовательностей, выделенных из базидиокарпов с Приуралья, Северного, Среднего и Южного Урала, а также Зауралья показывает генетическую неоднородность вида: сиквенсы разделяются на два монофилетических кластера. При этом в кластере 1 преобладают изоляты с Среднего Урала (27 из 37 шт.), а в кластере 2 – с Южного Урала и Зауралья (9 и 8 из 22 шт.), последовательности из плодовых тел с Северного Урала принадлежат кластеру 1. Вариабельность внутри клад крайне ограничена: уровень сходства в среднем 99,75% и 99,91% соответственно. Нуклеотидное разнообразие в пределах обоих кластеров равно нулю, для всей выборки составляет 0,581% при среднем уровне нуклеотидных различий 3,33 п. о.

2.2 Филогенетические линии

Приведены литературные данные о текущем состоянии вопроса.

На Урале настоящий трутовик представлен сублинией A2 и линией В (Рисунок 1), последовательности которых отличаются двумя инделами и полиморфизмом 7 сайтов. Уральские последовательности также группируются вместе и с последовательностями линии *F. fomentarius* s. str., и линии *F. inzengae*.

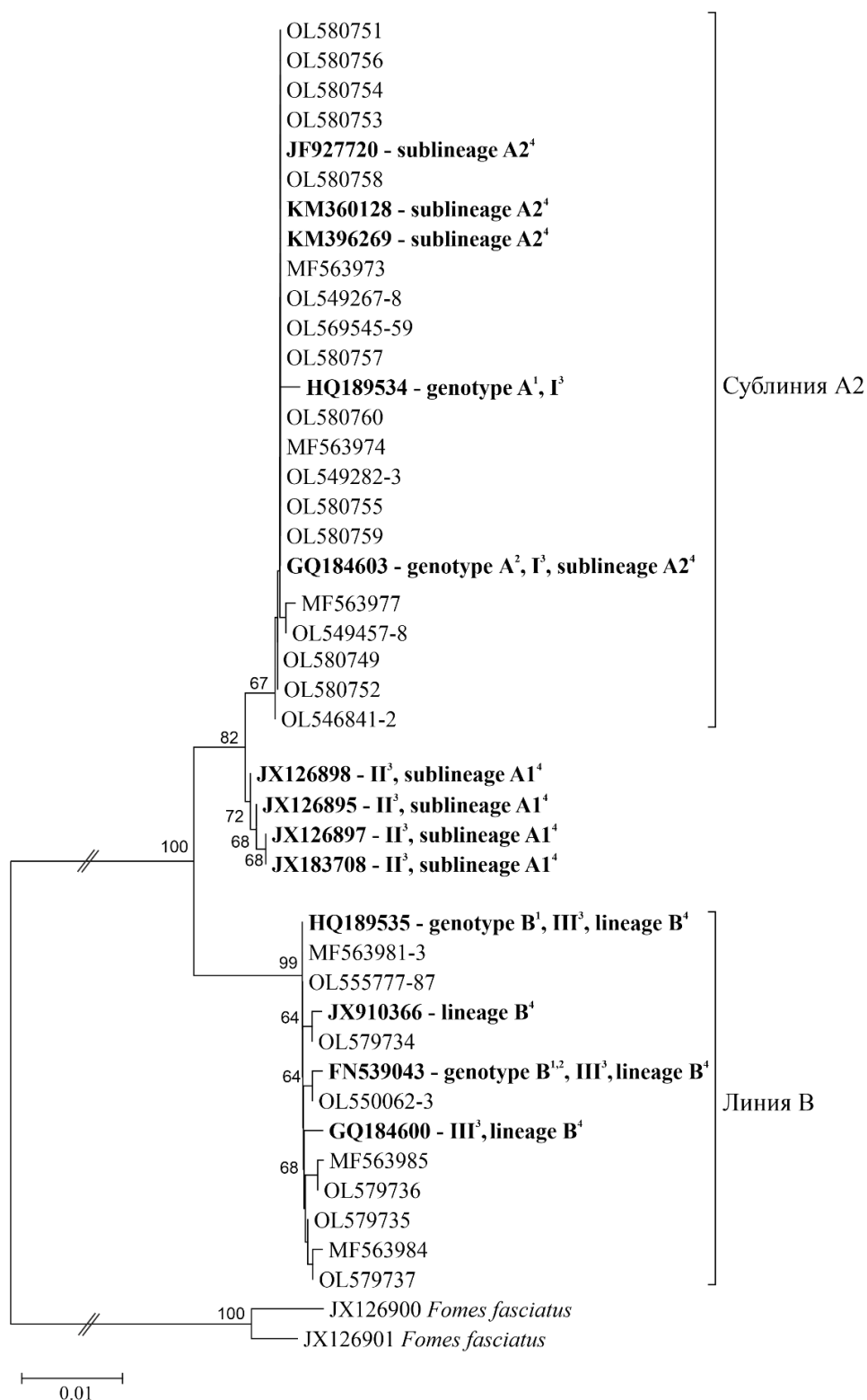


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево изолятов последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 *Fomes fomentarius* s. lat. с Урала и референсных последовательностей Judova et al. [The occurrence and..., 2012]⁽¹⁾, Pristas et al. [Genetic variability in..., 2013]⁽²⁾, McCormick et al. [Phylogenetic and phenotypic..., 2013]⁽³⁾ и Gáper et al. [Medicinal value and..., 2016]⁽⁴⁾

Это говорит, что а) на Урале представлены данные две филогенетические линии и что б) они идентичны сублинии А2 и линии В соответственно. Последовательности ITS1-5.8S-ITS2 *F. fomentarius* s. str. и *F. inzengeae*, а соответственно и последовательности А2 и В очень близки к таковым из Европы [How to resolve..., 2019]: нуклеотидная дивергенция между ними в кладе *F. fomentarius* s. str. (сублинии А2) составляет 0,24% или 1,05 п. о., а в кладе *F. inzengeae* (линия В) еще ниже – 0,021% или 0,095 п. о. Преобладающей является линия А2, или *F. fomentarius* s. str. (65% всех сиквенсов).

2.3 Криптический характер филогенетических линий

Макроморфологически базидиокарпы грибов *F. fomentarius* s. str. и *F. inzengeae*, а соответственно и филогенетических линий А2 и В практически не отличаются. Некоторые различия, однако, регистрируются по морфологическим, анатомическим и физиологическим признакам [How to resolve..., 2019; *Fomes inzengeae* (Ces. & De Not.)..., 2020; *Fomes fomentarius* and..., 2023].

Глава 3. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ СОСТАВ НАСТОЯЩЕГО ТРУТОВИКА В АЗИАТСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

Дан обзор работ о находках настоящего трутовика в азиатской части России, результаты анализа показывают его распространение во всех физико-географических регионах.

3.1 Генетический полиморфизм в Сибири и на Дальнем Востоке

Филогенетический анализ 17 последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров рДНК и 5.8S рРНК показывает их генетическую неоднородность: они с высокой степенью поддержки разделяются на два монофилетических кластера. Первый кластер (10 сиквенсов) по географическому составу можно назвать преимущественно сибирским, второй (7) – преимущественно дальневосточным. Внутри кластеров нулевой уровень нуклеотидного разнообразия (π), уровень сходства последовательностей превышает 99% (для кластера 1 – в среднем 99,95%, кластера 2 – в среднем 99,87%). Между кластерами нуклеотидная дивергенция составляет 0,49% или 2,14

п. о., а среднее нуклеотидное сходство между кластерами – 99,51%, а нуклеотидная дивергенция – 0,49% или 2,14 п. о. в среднем.

3.2 Филогенетические линии

В Азиатской части России настоящий трутовик представлен двумя сублиниями одной филогенетической линии: А1 и А2 (Рисунок 2). Их последовательности отличаются одним инделом и полиморфизмом трех сайтов.

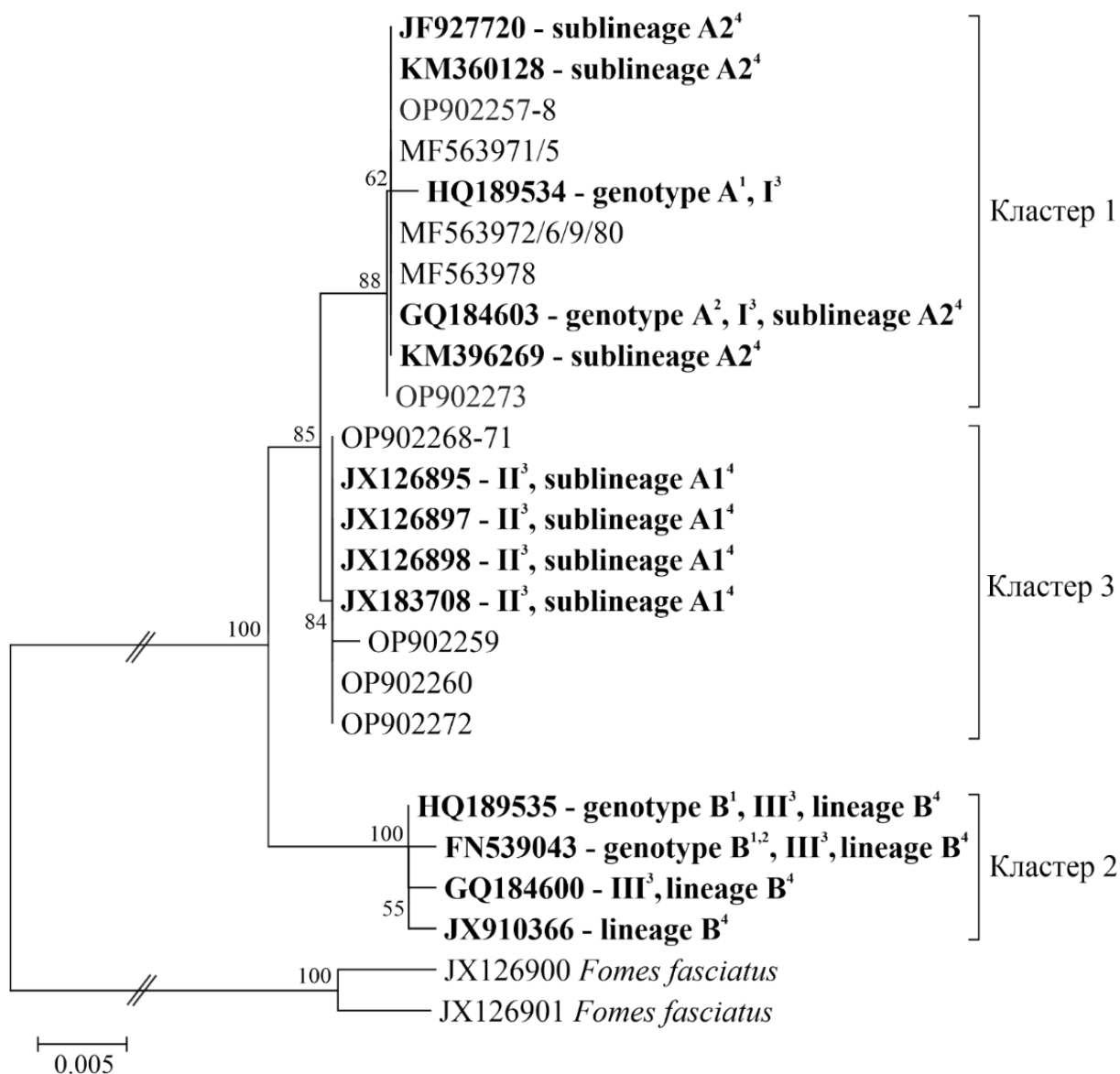


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево последовательностей ITS настоящего трутовика из Сибири и Дальнего Востока и референсных Judova et al. [The occurrence and..., 2012]⁽¹⁾, Pristas et al. [Genetic variability in..., 2013]⁽²⁾, McCormick et al. [Phylogenetic and phenotypic..., 2013]⁽³⁾ и Gáper et al. [Medicinal value and..., 2016]⁽⁴⁾

Сравнение последовательностей сублинии А1 из азиатской части России и отмеченных в работе Phylogenetic and phenotypic... [2013] из Северной Америки, показывает, что они крайне близки: нуклеотидная дивергенция (D_{xy}) составляет 0,033% или в среднем 0,015 п. о.

Сравнительный анализ последовательностей сублинии А2, полученных из грибов с Урала и из Сибири, показывает их полную идентичность: они образуют единый кластер и D_{xy} равен нулю. При этом сибирские сиквенсы сублинии А2 более дистанцированы от таковых из Европы, чем уральские (0,28% или в среднем 1,23 п. о. против 0,24% или в среднем 1,05 п. о. соответственно).

Глава 4. ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ

Отмечается разрозненность и недостаточность литературных данных о субстратной приуроченности и распространении линий, сублиний и локальный характер их описаний.

4.1 Филогенетическая линия А

Впервые описана в Восточной Словакии [The occurrence and..., 2012], затем разделена на североамериканскую А1 и европейскую А2 сублинии [Medicinal value and..., 2016].

Сублиния А1 – единственная филогенетическая линия настоящего трутовика в Северной Америке [Phylogenetic and phenotypic..., 2013], в субстратном спектре которой доминируют представители рода *Betula*. Впервые обнаружена нами на Дальнем Востоке, самый западный представитель зарегистрирован в Республике Саха (Якутия). В субстратном спектре сублинии представлены *Alnus* (2), *Betula* (4), *Chosenia* (1), *Quercus* (1). Ареал сублинии А1 включает и Японский архипелаг, где она отмечена нами на *Fagus* (2).

Сублиния А2 описана на территории Европы [The occurrence and..., 2012; Medicinal value and..., 2016; How to resolve..., 2019] преимущественно с *Fagus* и *Betula*. Обнаружена нами в Армении на *Fagus* [Badalyan et al., 2022] и в европейской части России в Республике Коми на *Betula* (6). На Урале является преобладающей (62.7% от всех находок). Ее представители преимущественно

встречаются на Северном и Среднем Урале (30 из 35 изолятов), значительно реже на Южном Урале и в Северном Казахстане (7 из 24 изолятов). Грибы этой сублинии развиваются на древесных остатках *Alnus*, *Prunus*, *Salix*, *Sorbus*, но чаще всего на *Betula* (31 из 37 изолятов). Ее представители также обнаружены в Сибири: на Алтае, Западном Саяне, в Забайкалье и Прибайкалье, где также чаще всего встречаются на древесных остатках *Betula* (6 из 10 изолятов). Самое восточное местонахождение сублинии A2 находится на Дальнем Востоке – в Уссурийском заповеднике на *Ulmus*.

Таким образом, филогенетическая линия A имеет циркумбореальное распространение и представлена двумя аллопатрическими сублиниями. Их ареалы перекрываются, как можно полагать, на востоке Сибири и граничащих с ней районах Дальнего Востока. Трофические спектры грибов сублиний не являются полностью идентичными, но общей чертой их является преимущественное развитие на древесных остатках *Betula*.

4.2 Филогенетическая линия B

Впервые описана в Восточной Словакии [The occurrence and..., 2012]. Как и линия A имеет две сублинии, но в Северной Азии представлена лишь одна из них – B2 [Mukhin et al., 2018].

Существование сублинии B1 показывает результат филогенетического анализа сиквенсов линии B из Европы, с Урала и из Азии. Кластер сублинии B2 образуют сиквенсы из Европы и с Урала, а другой – B1 – из Ирана, Узбекистана, Китая, Непала и Южной Кореи. Уровень D_{xy} между сублиниями B1 и B2 составляет 0,46% (в среднем 2,26 п. о.). Представители сублинии B1 обнаружены нами в Японии на *Fagus* (2 изолята). По данным GenBank грибы сублинии B1 развиваются на *Fagus*, *Quercus* и *Pistacia*. Нуклеотидное разнообразие внутри сублинии B1 (0,45%, в среднем 2,26 п. о.) в десятки раз выше по сравнению с B2 (0,011%, в среднем 0,005 п. о.), что указывает на гетерогенность сублинии B1, однако ее анализ ограничивает недостаток данных.

Сублиния B2 соответствует генотипу B, линии B и *F. inzengae*, и распространена в Центральной и Южной Европе, также в Иране и Китае.

Отмечена нами в Крыму на *Juglans* (5 изолятов) и в Армении на *Carpinus*, *Juglans*, *Fagus*, *Populus*, *Salix* [Badalyan et al., 2022]. Широко представлена на Урале: Среднем и Южном Урале, а также в Северном Казахстане, – и имеет более южное распространение по сравнению с сублинии A2 ($p = 0,00003$). Основным субстратом для грибов этой сублинии на Урале являются древесные остатки *Populus* (12 из 22 находок), единично они отмечены на *Acer* (4), *Alnus* (1), *Prunus* (1), *Salix* (2), *Tilia* (2). На Урале, как и в Центральной и Южной Европе [The occurrence and..., 2012; How to resolve..., 2019; Genetic and plant..., 2020, *Fomes inzengae* (Ces. & De Not.)..., 2020] среди субстратов грибов сублинии B2 нет древесных остатков *Betula*. И если в Европе как ведущий, так и специфический для сублинии B2 субстрат выделить не представляется возможным [The occurrence and..., 2012], то наши данные позволяют говорить, что на Урале и в Зауралье в таком качестве выступают древесные остатки *Populus* ($p < 0,001$). Это также подтверждается данными из GenBank: нет ни одной последовательности сублинии B2, которая была бы получена из грибов, растущих на *Betula*.

Глава 5. ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СТАТУС ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ

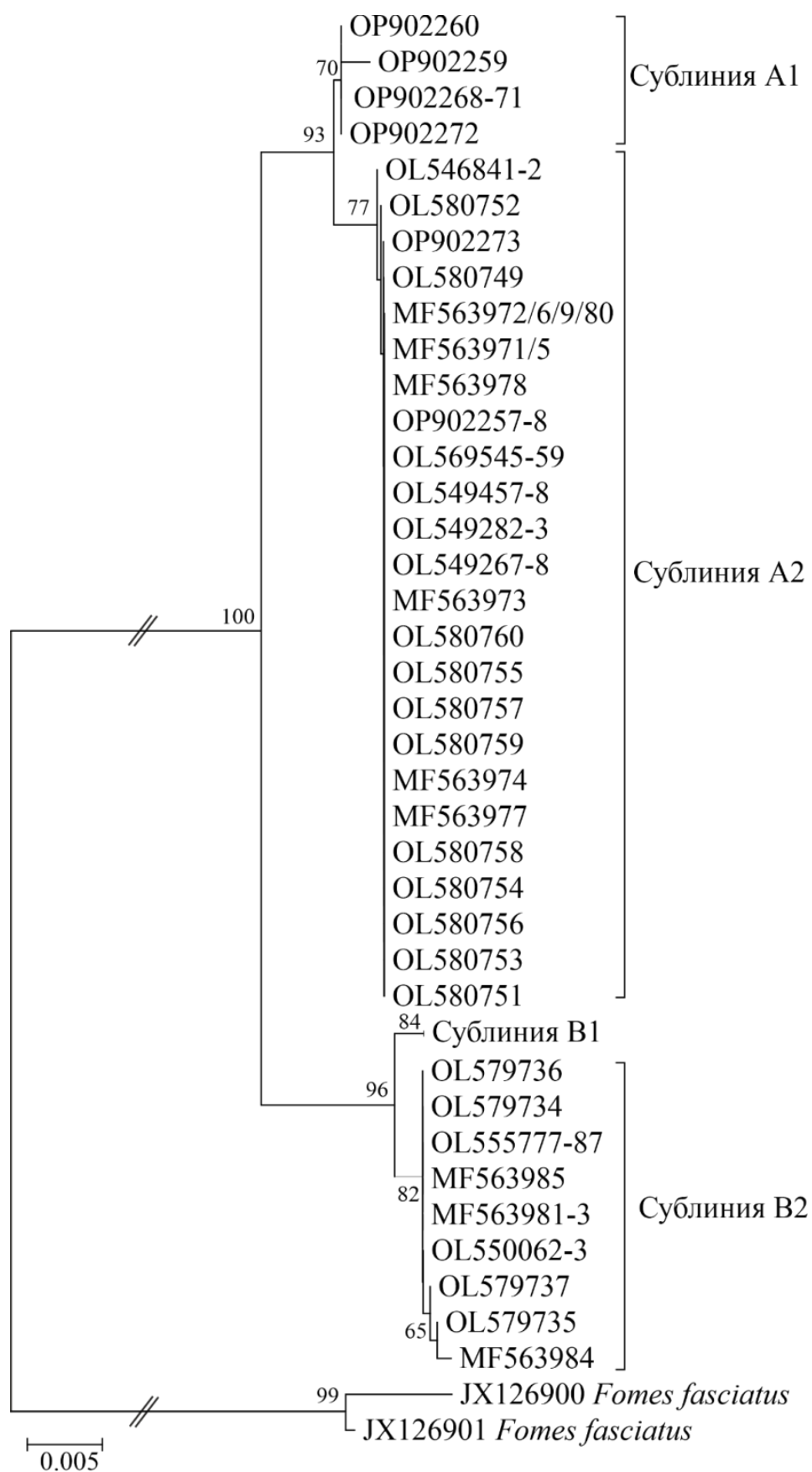
Приведен обзор современных представлений о генетической структуре *F. fomentarius* s. lat. по результатам молекулярно-генетических исследований [The occurrence and..., 2012; Genetic variability in..., 2013; Phylogenetic and phenotypic..., 2013; How to resolve..., 2019].

5.1 Молекулярно-генетические критерии разграничения видов грибов

Составлен анализ литературных данных об уровне внутривидовой и межвидовой генетической изменчивости, их соотношении и используемых для их оценки показателей.

5.2 Статус филогенетических линий настоящего трутовика в Северной Азии

В Северной Азии представлены три из четырех известных филогенетических сублиний настоящего трутовика, которые обособляются в виде трех монофилетических клад на филогенетическом дереве (Рисунок 3). Значения нуклеотидного разнообразия (π) в пределах каждой из трех сублинии в Северной



Через дефис или косую черту приведены номера идентичных последовательностей

Рисунок 3 – Филогенетическое дерево оригинальных ITS1-5.8S-ITS2 последовательностей изолятов настоящего трутовика из Северной Азии

Азии крайне низкие: 0–0,045% (Таблица 1). Уровень нуклеотидной дивергенции между сублиниями A1 и A2 (0,37%) значительно ниже, чем между каждой из них и сублинией B2 (1,46–1,47%). Максимальная нуклеотидная дивергенция регистрируется между сублиниями и *F. fasciatus* – другого вида рода *Fomes* (7,22–9,23%).

Таблица 5.1 – Нуклеотидное разнообразие (*) или нуклеотидная дивергенция (**) и среднее число нуклеотидных различий внутри и между филогенетическими сублиниями *Fomes fomentarius* s. lat. в Северной Азии и *F. fasciatus*

Сублиния/вид (сиквенсов, шт.)	A1	A2	B2	<i>F. fasciatus</i>
A1 (7)	0,06%* 0,29 п. о.	0,45%**	1,46%**	7,51%**
A2 (47)	2,14 п. о.	0*	1,46%**	7,22%**
B2 (22)	7,14 п. о.	7,00 п. о.	0*	9,23%**
<i>F. fasciatus</i> (11)	36,60 п. о.	34,46 п. о.	45,46 п. о.	0,35%* 1,71 п. о.

Данные о нуклеотидном разнообразии и дивергенции показывают, во-первых, генетическую близость сублиний A1 и A2 и их принадлежности к одной филогенетической линии А, во-вторых, наличие у них выраженных генетических различий с линией В в лице ее сублинии B2. Наблюдаемая дивергенция между линиями А и В (1,46%) ниже среднего уровня ITS изменчивости у базидиальных грибов: 3,33% [Intraspecific ITS variability..., 2008]. Она также существенно ниже их дивергенции с *F. fasciatus* (7,22–9,23%), которая, как можно полагать, может быть показателем нуклеотидных различий видового уровня. Это позволяет рассматривать линии А и В, представленные в Северной Азии сублиниями A1, A2 и B2, как инфравидовые образования, возможно, подвидового уровня [Жуйкова и Мухин, 2022; Badalyan et al., 2022].

Внутри всех трех сублиний в Северной Азии уровень нуклеотидного сходства составляет более 99%. Близкий уровень нуклеотидного сходства можно видеть и между сиквенсами сублиний A1 и A2 (99.2%), а между ними и сублинией B2 сходство ниже: 96,38 и 95,82% соответственно (Таблица 2).

Таблица 2 – Среднее нуклеотидное сходство (в верхней части) и его разброс (в нижней части таблицы) в процентах внутри и между филогенетическими сублиния *Fomes fomentarius* s. lat. в Северной Азии и *F. fasciatus*

Сублиния/вид (сиквенсов, шт.)	A1	A2	B2	<i>F. fasciatus</i>
A1 (7)	99,77 99,40–100	99,20	96,38	79,37
A2 (47)	98,59–99,60	99,74 98,99–100	95,82	79,13
B2 (22)	95,77–96,57	95,15–95,16	99,86 99,4–100	79,49
<i>F. fasciatus</i> (11)	78,99–80,04	78,54–79,80	78,93–80,16	97,71 94,33–100

Согласно принятой в молекулярной генетике практике разграничения таксонов грибов на основе анализа ITS региона (ITS-base taxon delimitation) нуклеотидное сходство 97% и ниже указывает на видовой уровень филогенетических линий A и B. В этом случае, учитывая, что сублиния B2 соответствует *F. inzengeae*, а A2 и A1 – *F. fomentarius* s. str., и мы можем говорить, что в Северной Азии *F. fomentarius* s. lat. это комплекс двух криптических видов – *F. fomentarius* s. str. и *F. inzengeae*. Первый из них представлен в Северной Азии двумя слабо отличающимися в генетическом отношении криптическими сублиниями с обширными, преимущественно не перекрывающимися ареалами – A1 (Дальний Восток) и A2 (Урал, Сибирь), – а второй – одной сублинией B2, для которой Урал является восточной границей распространения.

Диапазон нуклеотидной дивергенции 0,5–2,0% относится к так называемой «серой зоне», когда имеет место начальное видообразование, таксономическая

интерпретация которого не имеет однозначного решения [Shedding light on..., 2016]. Нуклеотидная дивергенция между сублиниями A1 и A2 (0,45%), B1 и B2 (0,46%) соответствует нижней границе указанного диапазона. Поэтому, мы находим возможным не обсуждать филогенетический (таксономический) статус сублиний и рассматриваем их как географические группы популяций: дальневосточная (сублиния A1), евроазиатская (сублиния A2), южноазиатская (сублиния B1) и европейская (сублиния B2).

ВЫВОДЫ

1. В Северной Азии (на Урале, в Сибири и Дальнем Востоке) настоящий трутовик – *Fomes fomentarius* (L.) Fr. – широко распространенный вид ксилотрофных базидиомицетов, состоящий из нескольких морфологически не дифференцированных (криптических) филогенетических линий и сублиний, обладающих выраженной эколого-географической индивидуальностью.

2. Филогенетическая линия А представлена двумя генетически слабо отличающимися (нуклеотидное сходство более 99%, нуклеотидная дивергенция менее 0,5%) сублиниями A1 и A2. Сублиния A1 характерна для дальневосточной группы популяций, а сублиния A2 для евроазиатской группы популяций, ареал которой охватывает Урал, Сибирь и частично Дальний Восток.

3. Филогенетическая линия В также имеет две сублинии (B1 и B2), но в Северной Азии представлена только одной из них (сублиния B2), характерной для европейской географической группы популяций, встречающейся в Северной Азии лишь на Урале. Генетически близкая ей сублиния B1 встречается у грибов из Ирана, Узбекистана, Китая, Южной Кореи и Японии.

4. Грибы филогенетических линий А и В существенно различаются в трофическом отношении. Грибы линии А преимущественно развиваются на древесных остатках *Betula*, древесные остатки *Populus* в их трофическом спектре отсутствует. Для грибов линии В, наоборот, древесные остатки *Populus* являются основным субстратом, а *Betula* в их трофическом спектре нет. Это обеспечивает симпатрическое развитие грибов разных линий в районах, где их ареалы перекрываются – на Урале.

5. Филогенетические линии А и В соответствуют филогенетическим линиям *Fomes fomentarius* sensu stricto и *F. inzengae* (Ces. & De Not.) Cooke, описываемых в Европе как два криптических симпатрических вида. Уровень нуклеотидного сходства линий А и В в Северной Азии (менее 97%) также позволяет рассматривать их как два криптических вида: *Fomes fomentarius* s. str. и *Fomes inzengae* (Ces. & De Not.) Cooke.

6. *F. fomentarius* s. str. – бореальный, широко распространенный в Северной Азии вид, преимущественно ассоциированный с *Betula* и представленный двумя географическими группами популяций: евроазиатской и дальневосточной. *F. inzengae* – редкий неморальный вид, представленный в Северной Азии одной географической группой популяций (европейской) и встречающийся на Урале преимущественно на древесных остатках *Populus*.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из Перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК РФ:

1. Mukhin, V. A. Genetic variability of the medicinal tinder bracket polypore, *Fomes fomentarius* (Agaricomycetes), from the Asian Part of Russia / V. A. Mukhin, E. V. Zhuykova, S. M. Badalyan // Int. J. Med. Mushrooms. — 2018. — Vol. 20, №. 6. — P. 561–568.

2. Badalyan, S. M. The phylogenetic analysis of Armenian collections of medicinal tinder polypore *Fomes fomentarius* (Agaricomycetes, Polyporaceae) / S. M. Badalyan, E. V. Zhuykova, V. A. Mukhin // Ital. J. of Mycology. — 2022. — Vol. 51, №. 1. — P. 23–33.

3. **Жуйкова, Е. В.** Разнообразие и экологические особенности филогенетических линий настоящего трутовика на Урале / **Е. В. Жуйкова**, В. А. Мухин // Экология. — 2022. — №. 5. — С. 355–361.

В других научных изданиях:

4. **Жуйкова, Е. В.** Генетическая изменчивость *Fomes fomentarius* (L.) J.J. Kicks. / **Е. В. Жуйкова**, В. А. Мухин // Современная микология в России:

материалы 4-го Съезда микологов России. — М.: Нац. акад. микологии, 2017. — Т. 6. — С. 41.

5. **Жуйкова, Е. В.** Генетическое разнообразие *Fomes fomentarius* (L.) J.J. Kickx в Азиатской части Евразии / **Е. В. Жуйкова** // Экология : факты, гипотезы, модели: материалы конф. молодых ученых, 10–13 апр. 2018 г. — Екатеринбург : Реэкшен, 2018. — С. 43–46.

6. **Жуйкова, Е. В.** Эколого-географические особенности генотипов *Fomes fomentarius* (L.) Fr. / **Е. В. Жуйкова** // Микология и альгология России. XX – XXI век: смена парадигм: материалы всером. конф. ..., 17–19 нояб. 2018 г. — М.: Перо, 2018. — С. 157-158.

7. **Жуйкова, Е. В.** О формировании базы данных *Fomes fomentarius* на Урале / **Е. В. Жуйкова**, В. А. Мухин, С. М. Бадалян // Информационные технологии в исследовании биоразнообразия: III нац. науч. конф., 5–10 окт. 2020 г. — Екатеринбург: Гуманитар. ун-т, 2020. — С. 210.

8. **Жуйкова, Е. В.** Мобилизация и первичный анализ коллекций *Fomes fomentarius* на Среднем и Южном Урале / **Е. В. Жуйкова** // Современная микология в России. — Том 8. — М.: Нац. акад. микологии, 2020. — Т. 8 — С. 57.

9. **Zhuykova, E.** *Fomes fomentarius* in the Urals and adjacent territories from the Institute of Plant and Animal Ecology herbaria / **E. Zhuykova**, V. Mukhin [Electronic resource]. — Ekaterinburg, 2021. — Режим доступа : <https://doi.org/10.15468/xnqzar>.

10. **Жуйкова, Е. В.** Новые территории – новые знания: на примере филогенетических линий настоящего трутовика на Дальнем Востоке / **Е. В. Жуйкова** // Экология: факты, гипотезы, модели: материалы конф. молодых ученых, 18-22 апр. 2022 г. — Екатеринбург: Альфа Принт, 2022. — С. 64–69.

11. **Жуйкова, Е. В.** Разнообразие филогенетических групп *Fomes fomentarius* L. Fr. на Урале / **Е. В. Жуйкова** // Материалы V (XIII) Международной ботанической конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге, 25–29 апр. 2022 г. — СПб.: БИН РАН, 2022. — С. 133.

Подписано в печать 25.10.2023 г.

Бумага офсетная. Гарнитура «Таймс».

Формат 60x84/16. Объем 1 авт. л.

Тираж 120 экз. Заказ

Отпечатано в копировальном центре «Университетский»

620063, г. Екатеринбург, пер. Университетский, д. 3. Тел: (343) 257-90-50