МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РОДА *VISCHERIA* (EUSTIGMATACEAE, OCHROPHYTA) В АЛЬГОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ ACSSI

© 2022 г. А. Д. Темралеева^{1,*}, Е. А. Портная¹

¹ Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук"

ул. Институтская, 2, Пущино, 142290, Россия *e-mail: temraleeva.anna@gmail.com Поступила в редакцию 23.04.2021 г. После доработки 24.10.2021 г. Принята к публикации 16.11.2021 г.

Выполнен морфологический и молекулярно-генетический анализ четырех штаммов почвенных эустигматофитовых водорослей, выделенных из серых лесных почв Московской и Тульской областей России. По данным 18S pPHK и ITS2 филогении, изученные штаммы Альгологической коллекции ACSSI (Algal Collection of Soil Science Institute) являются представителями рода *Vischeria*. Морфологически они близки к *V. magna*, однако только один штамм ACSSI 026 с высокой статистической поддержкой кластеризовался с аутентичным штаммом SAG 2554. Остальные штаммы образовали отдельную независимую группу.

Систематика рода представляется проблемной из-за неразрешенности филогенетического дерева 18S pPHK и ITS2, неинформативности вариабельных регионов V4—V5 и V8—V9 гена 18S pPHK и безуспешности CBC-подхода, основанного на разделении близкородственных видов при наличии хотя бы одной CBC в консервативных регионах вторичной структуры ITS2. Предполагается, что увеличение количества штаммов эустигматофитовых водорослей, выделенных из различных биотопов, использование пластидных генов или глубокого секвенирования всего пластидного генома, изучение ультраструктурных, физиологических, биохимических характеристик позволит разработать концепцию вида у эустигматофитовых водорослей в целом и рода *Vischeria* в частности.

Ключевые слова: эустигматофитовые водоросли, световая микроскопия, филогения, 18S pPHK, ITS2, CBC-подход

DOI: 10.31857/S0006813622020119

Пятьдесят лет назад Hibberd и Leedale (1971), исследовав 12 родов коккоидных желто-зеленых водорослей, обнаружили у них уникальные ультраструктурные и биохимические особенности, позволившие выделить их в новый класс водорослей – Eustigmatophyceae. В настоящее время эустигматофитовые водоросли представляют собой самостоятельную линию отдела Ochrophyta, coстоящую из 102 таксономически признанных видов, принадлежащих 18 родам, восемь из которых являются монотипными (Guiry, Guiry, 2021). Это свидетельствует о недостаточной изученности таксономического разнообразия группы, большинство новых членов которой только предстоит описать. Полагают, что в настоящее время обнаружено только от 0.2 до 2% видов эустигматофитовых водорослей (Norton et al., 1996). Группа представлена, как правило, мелкими неподвижными одноклеточными, реже колониальными

коккоидными водорослями различной формы (шаровидной, эллипсоидной, цилиндрической, яйцевидной, полиэдрической, звездчатой, веретеновидной или дисковидной), некоторые из них имеют ножку или разветвленные выступы. В клетке имеется обычно один желто-зеленый хлоропласт с одним или несколькими пиреноилами (реже без пиреноида). Типичными характеристиками является отсутствие хлорофилла с и присутствие виолаксантина. Воспроизведение происходит путем образования автоспор и зооспор с 1-2 передними различными по строению жгутиками (иногда присутствует задний голый жгутик). Прямых наблюдений полового процесса не описано, однако данные полногеномного секвенирования предполагают его присутствие у некоторых видов (Elias et al., 2017). Большинство эустигматофитовых живут в пресной воде, два рода морские (Nannochloropsis Hibberd, Microchloropsis Fawley,

Jameson et Fawley), а некоторые представители встречаются в наземных экосистемах, в которых редко доминируют. Часть таксонов предпочитают обитать в условиях среды с рН менее 7. Большой интерес к эустигматофитовым водорослям со стороны биотехнологии обусловлен их способностью к синтезу липидов, в том числе полиненасыщенных жирных кислот (Pal et al., 2013; Gao et al., 2016, 2018; Wang et al., 2018), а также пигментов, стеролов, витаминов (Patterson et al., 1994; Durmaz, 2007; Li et al., 2012; Stoykova et al., 2019; Stoyneva-Gärtner et al., 2019; Martins et al., 2021). Оптимизируя лабораторные условия их культивирования, можно многократно увеличить продукцию нужных метаболитов (Сера́k et al., 2014; Remias et al., 2020). Кроме того, описано эффективное применение штаммов эустигматофитовых водорослей для биоремедиации загрязненных сред (Fukuda et al., 2014; Upadhyay et al., 2016). Подобная востребованность группы говорит о необходимости поиска и открытия новых таксонов, инвентаризации и ревизии коллекционных штаммов, что требует их правильной идентификации.

Традиционно роды Eustigmatos Hibberd и Vischeria Pascher различались наличием выростов на клеточной оболочке у последнего (Hibberd, 1981: Ettl, Gärtner, 1995). Хотя было отмечено, что старые культуры (свыше 6 месяцев культивирования) E. magnus (Petersen) Hibberd характеризовались присутствием клеток с выростами (Safiullina et al., 2014). Внутри рода Eustigmatos было описано четыре вида, различающиеся размерами вегетативных клеток и зооспор. Для E. vischeri Hibberd диаметр клеток составлял 7-9 мкм (максимально до 20-30 мкм), для E. polyphem (Pitschmann) Hibberd 14-25 мкм в диаметре и зооспоры до 24 мкм длиной, у *E. magnus* клетки 14–34 мкм в диаметре и зооспоры 12 мкм длиной, у *E. calaminaris* Trzcinska et Pawlik-Skowronska клетки 7–12 мкм в диаметре (редко до 18-30 мкм) и зооспоры 7-12 мкм длиной. Последняя ревизия на основе данных морфологии, 18S pPHK и ITS2-филогении объединила роды Eustigmatos и Vischeria в один (Krivenda et al., 2018). В настоящее время род Vischeria насчитывает 16 таксономически принятых видов, при этом для девяти из них (V. aculeata Pascher, V. aster Pascher, V. gemma Pascher, V. gibbosa Pascher, V. regularis Pascher, V. rimosa Pascher, V. tetraedroides Pascher, V. torta Pascher, V. undulata Pascher) отсутствуют депонированные нуклеотидные последовательности в GenBank, а длина последовательности 18S pPHK аутентичного штамма V. magna (Petersen) Kryvenda, Rybalka, Wolf et Friedl SAG 2554 не превышает 300 п.н. Таким образом, филогения данного рода остается все еще слабо изученной.

Целью настоящей работы является морфологический и молекулярно-генетический анализ

БОТАНИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ том 107 № 2 2022

четырех штаммов эустигматофитовых водорослей из Альгологической коллекции ACSSI.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изоляция штаммов и условия культивирования. Штаммы ACSSI 012 и 081 были выделены из верхнего гумусового горизонта серой лесной почвы Московской области (54°50'03"N 37°34'24"E), штаммы ACSSI 013 и 026 — из второго гумусового горизонта в виде кротовин, серой лесной почвы Тульской области (54°23'30.1""N 38°10'53.5"E). Из образцов стерильно отобранных почв готовили водно-почвенную суспензию и наносили ее на поверхность твердой питательной среды ВG11 (1%-ный агар, pH = 7.0) на чашке Петри, одновременно образцы почвы добавляли к жидкой среде BG11 в 96-луночном культуральном планшете. Далее культуры были доведены до альгологически чистых с помощью многократного пересева. Культивирование штаммов проводили в климатостате КС-200, (Смоленское СКТБ СПУ, Россия) при стандартных условиях (температура $+23-25^{\circ}$ С, свет 60-75 имоль фотонов м⁻² с⁻¹, фотопериод 12 ч.).

Морфологический анализ. Морфологию и жизненные циклы штаммов эустигматофитовых изучали методами световой микроскопии (светлое поле и интерференционный контраст) с помощью микроскопов Leica DM750 и Carl Zeiss Axio Scope A1 (Германия). Результаты наблюдений документированы рабочими рисунками и фотографиями, снятыми с помощью цветной цифровой камеры Carl Zeiss MRc 5 (Германия), морфологические характеристики приведены в табл. 1. Сроки наблюдения составляли от 2 недель до 6 месяцев. При морфологической идентификашии штаммов учитывали тип организации таллома; форму и размеры клеток; наличие и толщину слизистых оболочек; количество и тип хлоропластов; наличие пиреноида и структуру крахмальной обкладки; способы размножения, присутствие гигантских клеток и шиповидных выростов. Для оценки размеров вегетативных клеток проводили 100 измерений для каждого штамма, для автоспор – 20. Расчеты минимального, максимального, среднего значения и стандартного отклонения выполняли в ПО Видеозавр (Россия). Каждый штамм был предварительно идентифицирован на основе данных морфологии.

Экстракция ДНК, амплификация, секвенирование. Далее идентификация морфовидов подтверждалась с помощью молекулярно-генетических методов. Суммарную ДНК выделяли с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США), следуя протоколу производителя. Для амплификации использовали готовую смесь для ПЦР Screen Mix-HS (Евроген, Россия). Праймеры и условия для амплификации выбранных маркеров указаны

Штамм Strain	Диаметр вегетатив- ных клеток, мкм Diameter of vegeta- tive cells, µm	Наличие гиган- тских клеток Presence of giant cells	Наличие шипо- видных выростов Presence of cell wall projections	Размеры автоспор, мкм Autospore size, µm	Количество автоспор Number of autospores
V. magna ACSSI 012 V. magna ACSSI 013	8.4–11.9 (10.0 ± 0.87) 7.1–13.7 (10.1 ± 1.42)	До 32 мкм Up to 32 μm Не наблюдали Not observed	He наблюдали Not observed	$\begin{array}{c} 8.1 - 11.6 \times 5.6 - 8.2 \\ (9.8 \pm 0.87 \times 6.9 \pm 0.75) \\ \hline 5.7 - 11.1 \times 3.9 - 8.2 \\ (9.1 \pm 1.23 \times 6.4 \pm 1.08) \end{array}$	2-4
<i>V. magna</i> ACSSI 026	7.9–15.1 (10.7 ± 1.51)			$6.0-11.5 \times 5.1-10.1$ (9.0 ± 1.60 × 7.3 ± 1.40)	2
<i>V. magna</i> ACSSI 081	6.9–13.4 (9.6 ± 1.21)	До 24 мкм Up to 24 µm		$\frac{4.9 - 8.1 \times 3.8 - 5.8}{(6.4 \pm 0.68 \times 5.0 \pm 0.54)}$	2-6

Таблица 1. Морфологическая характеристика штаммов ACSSI Table 1. Morphological features of ACSSI strains

Примечание. Для зрелых клеток указаны минимальные и максимальные значения диаметра, в скобках – среднее значение ± стандартное отклонение, для автоспор указаны минимальные и максимальные значения длины и ширины, в скобках – среднее значение ± стандартное отклонение.

Note. For mature cells, the minimum and maximum diameters are specified, with the mean \pm standard deviation in parentheses. For autospores, the minimum and maximum values of length and width are specified, with the mean \pm standard deviation in parentheses.

Локус Locus	Праймер Primer	Последовательность (5'-3') Sequence	Условия амплификации Amplification conditions	Ссылка Reference
18S pPHK 18S rRNA	18S F Eustig R1	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT GTTATAAACTCGTTGAACGCA	95°C – 5 min; 95°C – 1 min, 55°C – 1 min, 72°C – 2 min, 25 cycles; 72°C – 5 min	Katana et al., 2001 Fawley et al., 2014
ITS2	ITS-F-Visch ITS4-Eustig	GCGCCGTTGGCTTCTAGCC TCCTCCGCTTAGTTATATGC	94°C – 3 min; 94°C – 1 min, 53°C – 1 min, 72°C – 2 min, 35 cycles; 72°C – 10 min	Procházková, 2012

Таблица 2. Праймеры и условия амплификации эустигматофитовых водорослей Table 2. Primers and amplification conditions for eustigmatophyte algae

в табл. 2. Детекцию целевых ПЦР-продуктов проводили электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Для дальнейшей очистки ампликонов из геля применяли набор Cleanup Mini (Евроген, Россия). Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли на базе ЗАО "Синтол" (Россия).

Молекулярно-генетический анализ. Для филогенетического анализа штаммов был выполнен поиск гомологии нуклеотидных последовательностей по алгоритму BLAST в GenBank, составлены наборы из собственных и депонированных в GenBank последовательностей (табл. 3). Названия штаммов, нуклеотидные последовательности которых были использованы в этом исследовании, приведены в соответствии с их названиями в генетической базе данных. Всего в анализ вошло 86 последовательностей гена 18S pPHK длиной 1781 п.н. и 18 последовательностей спейсера ITS2 длиной 397 п.н. В программе BioEdit по алгоритму ClustalW было выполнено множественное выравнивание. Для выбора модели нуклеотидных замен использовали программу iModelTest. Реконструкцию филогенетических взаимосвязей осуществляли методом максимального правдоподобия (ML) в программе PhyML. Статистическая поддержка топологии дерева была оценена с помощью бутстрэп-анализа (1000 повторностей) и указана в узлах ветвей в виде процентов (рис. 2). Генетические различия между нуклеотидными последовательностями гомологичных генов охарактеризовали с помощью генетических дистанций. Мерой генетических различий являлся процент несовпадений нуклеотидов при попарном сравнении выровненных последовательностей, вычисление которого проводили в программе МЕGA 5.0. Филогенетические деревья визуализировали с помощью программы FigTree v1.3.1. Границы вариабельных участков V4-V5 и V8-V9 гена 18S рРНК были обнаружены автоматическим поиском при выравнивании последовательностей и праймеров v4 Reuk454FWDI (CCAGCASCYGCGGTAATTCC) и v4-v5 1132r (CCGTCAATTHCTTYAART), V8 V8f (ATAACAGGTCTGTGATGCCCT) и V9 1510r (CCTTCYGCAGGTTCACCTAC), соответственно (Bradley et al., 2016).

В качестве инструмента разделения видов был использован подход, предложенный A. Coleman (2000, 2009), которая показала, что наличие хотя бы одной компенсаторной замены (compensatory base change, CBC) в консервативных регионах ITS2 (10 пар нуклеотидов для II шпильки и 18 пар для III шпильки) у двух водорослей коррелирует с их полной половой несовместимостью. Напротив, замены в менее консервативных регионах (І и IV шпильки), а также полукомпенсаторные замены (hCBC) в консервативных регионах не были связаны со способностью скрещиваться. На основе мета-анализа большого числа данных Müller с соавт. (2007) установили, что наличие даже одной СВС в 93% исследованных случаев указывает на принадлежность организмов к разным видам. Для анализа вторичной структуры ITS2 была выполнена аннотация спейсера в ITS2-DataBase (http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de), его фолдинг с помощью RNAfold web server (http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWeb-Suite/RNAfold.cgi), визуализация посредством программы PseudoViewer3 (Byun, Han, 2009), выравнивание ITS2 с учетом вторичной структуры и поиск CBC осуществляли в программе 4SALE.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологический анализ. Наблюдения 38 штаммами ACSSI 012, 013, 026 и 081 показали их морфологическое сходство с V. magna ($\equiv E.$ magnus): шаровидные одиночные клетки в среднем 9.6-10.7 мкм в диаметре, для штаммов ACSSI 012 и 081 отмечено присутствие "гигантских" клеток с максимальным диаметром – 32 и 24 мкм, соответственно. Клеточная оболочка гладкая, нескульптурированная, шиповидных выростов не наблюдали. Хлоропласт пристенный, лопастной с 1 полиэдрическим пиреноидом и большой красной глобулой (рис. 1). Размножение преимущественно 2-4 (ACSSI 012, ACSSI 013), 2 (ACSSI 013) или 2-6 (ACSSI 081) автоспорами. Автоспоры эллипсоидной и широкоовальной формы, самые крупные – у штаммов ACSSI 012 и 026, самые мелкие — у штамма ACSSI 081 (табл. 1). Половой процесс и зооспоры не наблюдали.

Молекулярно-генетический анализ. Проведенный 18S pPHK-анализ подтвердил принадлежность штаммов ACSSI к роду Vischeria со 100%ной статистической поддержкой (рис. 2). Сестринскими являются род Chlorobotrys и Characiopsis-подобный род, представители которого принадлежат эустигматофитовым, а не желто-зеленым водорослям. На филогенетическом дереве некультивируемые клоны эустигматофитовых водорослей образуют несколько независимых филогенетических линий, которые, возможно, в будущем будут описаны как новые самостоятельные роды. Основным местообитанием проанализированных штаммов являются пресноводные пруды и озера. Изоляты двух родов (*Nannochloropsis* и *Microchloropsis*) были выделены в основном из лагун и открытого моря. Все штаммы рода *Vischeria* были изолированы из почв, исключение составляют некультивируемые клоны WS072.033 и WS071.070 из Южно-Китайского моря (табл. 3).

Кластеризация внутри рода Vischeria характеризовалась низкими бутстрэп-значениями, что свидетельствует о недостаточном филогенетическом сигнале гена, кодирующего 18S рРНК, на видовом уровне. Анализ вариабельных регионов V4-V5 и V8-V9, которые широко используются в качестве ДНК-баркодов при идентификации сообществ эукариотических организмов, показал наличие только двух замен у *V. stellata* (Chodat) Pascher SAG 887-2 и штаммов ACSSI, соответственно. Таким образом, данная работа подтвердила и дополнила вывод о том, что для эустигматофитовых водорослей ген 18S рРНК можно использовать для выделения высоких таксономических рангов (Fawley et al., 2014), например, порядков. Однако, ни целый ген, ни его вариабельные области V4-V5 и V8-V9 не подходят для разграничения видов. в том числе в метагеномных исследованиях. Поэтому для уточнения филогенетического статуса штаммов ACSSI был проанализирован более изменчивый молекулярно-генетический маркер – ITS2 (рис. 3). По данным ITS2-филогении все четыре изученных штамма ACSSI вошли в одну группу с аутентичным штаммом Eustigmatos magna SAG 2554 со статистической поддержкой 64%. Внутри данной группы штаммы ACSSI 012, 013 и 081 образовали первую подгруппу, штамм ACSSI 026 и SAG 2554 вторую (рис. 3). Высокими поддержками характеризовались клада "V. punctata + V. helvetica" и "V. stellata" - 93 и 100% соответственно. Следует отметить, что часть штаммов, по морфологии идентифицированные как V. magna ($\equiv E.$ magnus), на дереве ITS2 образовывали самостоятельные филогенетические линии, не группируясь с аутентичным штаммом SAG 2554, и, следовательно, могут быть отдельными криптическими таксонами. Аналогично штамм ССАР 860/76, идентифицированный как V. vischeri ($\equiv E.$ vischeri), не объединился с аутентичным штаммом SAG 860-1. Применение более вариабельного маркера ITS2 привело к снижению доли консервативных участков с 78% до 35% по сравнению с маркером 18S pPHK.

Тем не менее использование первичной структуры ITS2 не позволило разрешить филогению рода *Vischeria*. Поэтому далее мы изучили вторичную структуру ITS2 штаммов ACSSI и сравнили ее со всеми доступными аутентичными штаммами видов рода *Vischeria*. Длина спейсера состави-



Рис. 1. Строение клеток штаммов Vischeria magna.

a — вегетативные клетки ACSSI 012, b — гигантские зрелые клетки ACSSI 012, c — вегетативные клетки ACSSI 013, d — вегетативные клетки ACSSI 026, e — вегетативные клетки ACSSI 081, f — гигантские зрелые клетки ACSSI 081. Шкала: 10 мкм.

Fig. 1. Cell structure of Vischeria magna strains.

a - vegetative cells ACSSI 012, b - giant mature cells ACSSI 012, c - vegetative cells ACSSI 013, d - vegetative cells ACSSI 026, e - vegetative cells ACSSI 081, f - giant mature cells ACSSI 081. Scale: 10 μ m.

Ta6л Tablé	ица 3. Список штаммов, использованны: e 3. List of strains used in the phylogenetic at	к в филогенетическо ialysis of the eustigma	м анализе эустигматофитовых tophyte algae	водорослей		
Z	Виды Species	Номер штамма при изоляции Strain number at isolation	Коллекционный штамм Collection strain	18S pPHK 18S rRNA	ITS2	Местообитание, страна Habitat, country
	Eustigmatos vischeri	T8	CCAP 860/7	KJ713283	KJ713283	Почва, Австрия Soil Austria
2	Eustigmatos magnus	Ι	SAG 2554* (= CCAP 860/4,	I	MG596348	Почва, Новая Зеландия
ς	Eustigmatos cf. polyphem	I	UTEX 2351, CCMP 387) CAUP H4302	JX865375	I	Soil, New Zealand Чехия
4	Vischeria nunctata	266	SAG 887-1*	KV771664	K <i>Y</i> 771673	Czech Republic Почва Швейнария
-						Soil, Switzerland
Ś	Vischeria punctata	316	UTEX 86	FJ858971	I	Почва Soil
9	Eustigmatos magnus	Ι	SAG 36.89	KY271662	JX202557	Почва, Непал
7	Uncultured enkarvote clone WS072.033	I	I	K P404737	I	зоц, пераі Южно-Китайское море
						South China Sea
8	Uncultured eukaryote clone WS071.070	Ι	I	KP404701	Ι	Южно-Китайское море
6	Eustigmatos calaminaris	E120	CCALA 1014*	JX188078	JX202554	South China Sea Почва, Польша
)					Soil, Poland
10	Eustigmatos magnus Eustigmatos vischeri	241	SAG 2506 SAG 860–1* (= CCAP 860/1A;	KY271665 JX274590	KY271678 JX202556	– Почва, Швейцария
)		UTEX 310)			Soil, Switzerland
12	Eustigmatos polyphem	ASIB 207	SAG 38.84* (CCAP 860/8)	JX188077	JX202558	Почва, Кения с.:1 Усто
13	Vischeria stellata (T)	185	SAG 887–2* (CCAP 887/2B;	KY271666	KY271675	зоп, кепуа Почва, Швейцария
			UTEX 312)			Soil, Switzerland
14	Vischeria helvetica	255	UTEX 49* (SAG 876–1; ATCC 30425; CCAP 861/1)	AF045051	JX202559	Почва Soil
15	Eustigmatos magnus	I	SAG 2370	KY271663	KY271677	Ι
16	Chloridella neglecta	I	SAG 48.84	KF848924	KY271697	Почва, Германия
ţ						Soil, Germany
18	Vischeria helvetica Fustiematos magnus		CCALA 514 SAG 7766	KF848920 KY771669	– KY771676	
19	Vischeria stellata	Ι	SAG 33.83	KF848919	KY271674	Почва, бывшая Югославия
						Soil, former Yugoslavia

137

Z	Виды Species	Номер штамма при изоляции Strain number at isolation	Коллекционный штамм Collection strain	18S pPHK 18S rRNA	ITS2	Местообитание, страна Habitat, country
20	Vischeria helvetica	KGU-Y001	1	AB731568	I	Япония Ianan
21	Eustigmatos vischeri	JNU4		KT191017	Ι	
22	Characiopsis saccata	Ι	SAG 15.97 (= ACOI 481)	KF848925	Ι	Рисовое поле, Португалия
						Rice field, Portugal
23	Characiopsis acuta	Ι	ACOI 456 (SAG 14.97)	KY271644	I	Пресные воды, Португалия
č				077120221		Freshwater, Portugal
7 7	Eusigmatophyceae sp.	I		NY2/1008	I	
C7	Characiopsis acuta	I	ACUI 183/	KY 2/1040	I	Планктон, Поргугалия Diankton Domined
96				KV71650		
01						Portugal
77	Chlorohotrys gloeathere	I	ACOI 1114	KY271649	I	Пруд. Поптугалия
i						Pond, Portugal
28	Uncultured stramenopile	clone OL10	I	KX465211	Ι	Озеро, Кения
						Lake, Kenya
29	Chlorobotrys regularis	l	ACOI 307	KY271643	I	Стоячая вода, Португалия
						Stagnant water, Portugal
30	Chlorobotrys regularis	I	ACOI 1089	KY271648	I	Пруд, Португалия
						Pond, Portugal
31	Vischeria punctata	I	IPPAS H -242	MH979476	I	Ι
32	Uncultured eukaryote clone WS072.034	Ι	-	KP404738	Ι	Южно-Китайское море
:						South China Sea
33	Uncultured eukaryote clone WS071.072	I	I	KP404703	I	Южно-Китайское море
č						South China Sea
3 4	Nannochloropsis sp.	JL2/4-1	Ι	12111600	I	U3epo, CIIIA
						Lake, USA
35	Characiopsis longipes	Ι	ACOI 1838	KY271647	Ι	Бассейн, Португалия
						Reservoir, Portugal
36	Nannochloropsis limnetica	AS3-9		DQ977726	I	O3epo, CIIIA
						Lake, USA
37	Nannochloropsis granulata	CCMP529	-	U41092	Ι	1
38	Nannochloropsis limnetica	CCMP505	-	U41050	Ι	Ι
39	Nannochloropsis oculata	CCMP225	-	KU900229		-

138

Таблица 3. Продолжение

ТЕМРАЛЕЕВА, ПОРТНАЯ

Z	Виды Species	Номер штамма при изоляции Strain number at isolation	Коллекционный штамм Collection strain	18S pPHK 18S rRNA	ITS2	Местообитание, страна Habitat, country
40	Nannochloropsis sp.	Tow 2/24 P-1w	I	DQ977728	I	Пруд, США Ронd 115A
41	Nannochloropsis sp.	NANNO-IOLR	Ι	AB025533	I	-
42	Nannochloropsis oculata	CCMP525	1	AF045044	I	Ι
43	Nannochloropsis sp.	CCMP531	1	U41094	I	Ι
44	Nannochloropsis limnetica	Ι	SAG 18.99*	AF251496	EU165325	Пруд, Германия
45	I [neulthred enkarvote clone WS074 005		I	K P404875	I	Pond, Germany Южно. Китайское моне
H ر						South China Sea
46	Nannochloropsis sp.	IOLR		AF067956	I	Ι
47	Monodopsis unipapilla	Ι	SAG 8.83*	AM490827	KY271699	Почва, Австрия
						Soll, Austria
48	Monodopsis subterranea		SAG 848–1 (= CCAP 848/1; UTEX 151; ATCC 30593)	U41054	KY271698	Kaмни в реке, CIIIA Wet rock in a river, USA
49	Uncultured eukaryote clone WS071.073	I	I	KP404704	Ι	Южно-Китайское море
						South China Sea
50	Pseudotetraedriella kamillae	Ι	SAG 2056*	EF044311	KY271700	Озеро, Германия
i	:					Lake, Germany
51	Microchloropsis salina	Ι	CCMP369	U41093	I	I
52	Monodopsis cf. guttula	Ι	CCALA 825	KF848929	I	Ι
53	Monodopsis sp.	1 ME-2013	CAUP 901	KF848926	I	Камни, Чехия
						Rocks, Czech Republic
54	Monodopsis guttula		CCALA 826	KF848927	I	I
55	Microchloropsis gaditana	I	CCAP 849/5* (= CCMP1775)	AF045036		Море, Испания
						Sea, Spain
56	Microchloropsis gaditana	I	CCMP526	KF040086	I	I
57	Microchloropsis gaditana	I	CCMP527	M87328	l	CIIIA
						USA
58	Uncultured phytoplankton clone Q3–25	I		JQ420104	I	Фитопланктон, Китай
						Phytoplankton, China
59	Nannochloropsis oceanica	I	CCALA 978	KF010154	I	Солоноватые воды, Арген-
						TUHA Brackish water Argentina
						DIMONIA MUCH, I BOILDING

Таблица 3. Продолжение

		Номер штамма				
Z	Виды Species	при изоляции Strain number	Коллекционный штамм Collection strain	18S pPHK 18S rRNA	ITS2	Местообитание, страна Habitat, country
		at isolation				
60	Pseudellipsoidion edaphicum	1	CAUP Q 401*	KF848933	I	Торфяно-болотная почва, Чехия
						Peat-bog soil, Czech Republic
61	Nannochloropsis oceanica	MBIC10090	I	AB052273	DQ069777	I
62	Nannochloropsis granulata	MBIC10054	I	AB052272	EU165324	I
63	Nannochloropsis sp.	KMMCC EUS-16	I	GQ122351	Ι	Южная Корея
						South Korea
64	Eustigmatophyceae sp.	Tow 9/21 P-2w	Ι	KF757253	I	Пруд, США
Ĭ						Pond, USA
65	Eustigmatophyceae sp.	Mary 6/3 T–1w	I	KF757240	I	O3epo, CIIIA
						Lake, USA
99	Eustigmatophyceae sp.	Mary 8/18 T-4d	I	KF757239	I	O3epo, CIIIA
						Lake, USA
67	Nannochloropsis oceanica	Ι	CCAP 849/10	KJ756836	KJ713291	Ι
68	Nannochloropsis gaditana	IVP	Ι	EF473733	I	Италия
						Italy
69	Nannochloropsis gaditana	I	Ι	AF133819		Лагуна, Италия
l						Lagoon, Italy
70	Nannochloropsis salina	MBIC10063	Ι	AB052278	EU165326	1
71	Nannochloropsis oceanica	I	CCAP 849/9	KJ756835	I	Море, Япония
						Sea, Japan
72	Nannochloropsis oceanica	I	CCAP 849/8	KJ756834	KJ713290	Море, Китай
f						Sea, China
5/	Nannochloropsis gaattana	MBIC10118	I	ABU22204A	I	1
74	Nannochloropsis oculata	I	$CCAP 849/1^* (= SAG 38.85,$	KJ756827	KY271701	Скалистая зона заплеска,
			UTEX 2164)			Шотландия
						Supralitoral rock pool, Scot-
						land
75	Nannochloropsis oculata	I	CCAP 849/7	KJ756833	KJ713289	Озеро, Тунис
						Lake, Tunis
76	Pseudocharaciopsis ovalis	I	CAUP Q 302	KF848932	I	Почва, Чехия
						Soil, Czech Republic
77	Nannochloropsis salina	Ι	CCAP 849/2	KJ756828	KJ713285	Море, Шотландия
						Sea, Scotland

ТЕМРАЛЕЕВА, ПОРТНАЯ

140

Таблица 3. Продолжение

		Номер штамма				
7	Виды	при изоляции	Коллекционный штамм	18S pPHK	COLI	Местообитание, страна
2	Species	Strain number at isolation	Collection strain	18S rRNA	7611	Habitat, country
78	Microchloropsis gaditana	I	CCAP 849/6	KJ756832	KJ713288	Mope, CIIIA
						Sea, USA
79	Microchloropsis salina	Ι	CCAP 849/4	KJ756830	KJ713287	Море, Шотландия
						Sea, Scotland
80	Pseudocharaciopsis ovalis	I	CAUP Q 301	KF848931	I	Торфяно-болотная почва,
						Чехия Peat-hog soil. Czech Republic
81	Eustigmatophyceae sp.	Mary 8/18 T-3d		KF757238	Ι	Osepo, CIIIA
_						Lake, USA
82	Nannochloropsis australis	CS-416	Ι	KT031997	Ι	Море, Австралия
						Sea, Australia
83	Nannochloropsis australis	CS-759*	I	KT031998	ļ	Море, Австралия
						Sea, Australia
84	Vischeria magna	I	ACSSI 012	MK228871	MK228867	Серая лесная почва, Россия
						Grey forest soil, Russia
85	Vischeria magna	I	ACSSI 013	MK228872	MK228868	Кротовина, серая лесная
						почва, Россия
						Mole drain, grey forest soil,
						Russia
86	Vischeria magna	I	ACSSI 026	I	MK228869	Кротовина, серая лесная
						почва, Россия
						Mole drain, grey forest soil,
						Russia
87	Vischeria magna	Ι	ACSSI 081	MK228873	MK228870	Серая лесная почва, Россия
						Grey forest soil, Russia
-		Mediophyceae	, Bacillariophyta (внешняя груп	па)	_	_
		Mediophy	ceae, Bacillariophyta (outgroup)			
88	Thalassiosira pseudonana	Ι	CCMP 1007	HF565127	HF565127	Mope, CIIIA Sea, USA
Прим	ечание. Прочерк означает отсутствие данны	с, * − аутентичный шт	амм, (Т) — типовой вид.			

Таблица 3. Окончание

БОТАНИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

том 107

Nº 2

2022

Note. Dash – data missing, * – authentic strain, (T) – type species.

Аббревиатуры коллекций культур / Abbreviations of culture collection: ACOI – Coimbra Collection of Algae, Португалия / Portugal; ACSSI – Algal Collection of Soil Science In-stitute, Poccua / Russia; ATCC – American Type Culture Collection, CШA / USA; CAUP – the Culture Collection of Algae of Charles University, Чехия / Czech Republic; CCALA – the Culture Collection of Autotrophic Organisms, Чехия / Czech Republic; CCAP – the Culture Centre Algae and Protozoa, Bеликобритания / United Kingdom; CCMP – Na-tional Center for Culture of Marine Phytoplankton, CШA / USA; IPPAS – Culture Collection of Microalgae IPPAS, Poccua / Russia; SAG – the Culture Collection of Algae at the University of Göttingen, Германия / Germany; UTEX – the Culture Collection of Algae at The University of Texas at Austin, CШA / USA.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РОДА



Рис. 2. Укорененное филогенетическое дерево эустигматофитовых водорослей, построенное методом максимального правдоподобия (ML), на основе последовательностей гена 18S рРНК.

В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны бутстреп-значения ML; значения <70% не показаны. Модель нуклеотидных замен: GTR + I + G. Жирным шрифтом выделены штаммы ACSSI, * отмечены аутентичные штаммы. Fig. 2. Rooted phylogenetic tree of eustigmatophyte algae constructed by the maximum likelihood (ML) method, based on the 18S rRNA gene (1781 bp).

ML bootstrap values are specified as statistical support for tree nodes; values < 70% are not shown. Nucleotide Substitution Model: GTR + I + G. ACSSI strains are highlighted in bold, authentic strains are marked with asterisk (*).



Рис. 3. Укорененное филогенетическое дерево эустигматофитовых водорослей рода *Vischeria*, построенное методом максимального правдоподобия (ML), на основе анализа первичной структуры ITS2.

В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны бутстреп-значения ML; значения <70% не показаны. Модель нуклеотидных замен: SYM. Жирным шрифтом выделены штаммы ACSSI, * отмечены аутентичные штаммы. Fig. 3. Rooted phylogenetic tree of the genus *Vischeria* constructed by the maximum likelihood (ML) method, based on the analysis of the primary structure of ITS2 (397 bp).

ML bootstrap values are specified as statistical support for tree nodes; values <70% are not shown. Nucleotide Substitution Model: SYM. ACSSI strains are highlighted in bold, authentic strains are marked with asterisk (*).



Рис. 4. Сравнение вторичной структуры шпилек I, II, IV ITS2 штаммов ACSSI и аутентичных штаммов рода *Vischeria*. **Fig. 4.** Comparison of the ITS2 secondary structure of helices I, II, IV for ACSSI strains and authentic strains of the

genus Vischeria.

a - ACSSI 013, b - ACSSI 026, c - ACSSI 081, d - Vischeria calaminaris, e - V. helvetica, f - V. magna, g - V. polyphem, h - V. punctata, i - V. stellata, j - V. vischeri.

ла 255 п.н., третья шпилька была самая длинная и разветвленная (рис. 5), что было показано для всех штаммов рода *Vischeria*. Во второй шпильке

присутствовал U-U мисматч, на верхушке третьей шпильки – консервативный мотив GGUC-GG (рис. 4, 5). При сравнении вторичных струк-



Рис. 5. Сравнение вторичной структуры шпилек III ITS2 штаммов ACSSI и аутентичных штаммов рода Vischeria. **Fig. 5.** Comparison of the ITS2 secondary structure of helix III for ACSSI strains and authentic strains of the genus Vischeria. a - ACSSI 013, b - ACSSI 026, c - ACSSI 081, d - Vischeria calaminaris, e - V. helvetica, f - V. magna, g - V. polyphem, h - V. punctata, i - V. stellata, j - V. vischeri.

тур ITS2 четырех штаммов ACSSI с аутентичными штаммами видов *V. calaminaris* (Trzcinska et Pawlik-Skowronska) Kryvenda, Rybalka, Wolf et Friedl CCALA 1014, *V. helvetica* (Vischer et Pascher) Hibberd UTEX 49, *V. magna* SAG 2554, *V. polyphem* (Pitschmann) Kryvenda, Rybalka, Wolf et Friedl SAG 38.84, *V. punctata* Vischer SAG 887-1, *V. stellata* SAG 887-2, *V. vischeri* (Hibberd) Kryvenda, Rybalka, Wolf et Friedl SAG 860-1 не было обнаружено ни одной CBC ни между исследуемыми штаммами ACSSI, ни между штаммами из других коллекций. Тем не менее была найдена одна CBC во второй шпильке

ITS2 при сравнении штаммов ACSSI с неаутентичным штаммом E. magnus SAG 2506 и одна CBC в четвертой шпильке ITS2 при сравнении с *E. magnus* SAG 36.89. Данные замены не учитываются при разделении видов. Таким образом, СВС-подход не позволяет разделить описанные виды рода Vischeria: V. magna, V. calaminaris, V. stellata, V. helvetica, V. punctata, V. vischeri и V. polvphem. Несмотря на отсутствие СВС, необходимо отметить другие различия, которые были обнаружены во всех четырех шпильках ITS2 (рис. 4, 5). Штамм ACSSI 026 и аутентичный штамм V. magna SAG 2554 отличались от других штаммов одной заменой $C \rightarrow U$ на вершине I шпильки ITS2 (рис. 4b, f). Штамм V. stellata SAG 887-2 отличался от остальных видов рода одной заменой $C \rightarrow U$ на неспаренной вершине I шпильки ITS2 (рис. 4i). Во II шпильке ITS2 штаммов V. punctata SAG 887-1 и V. stellata SAG 887-2 были обнаружены по одной hCBC (рис. 4h, i), а для штамма V. vischeri SAG 860-1 был характерен распаренный участок UUGCA, а не CUGCA как у остальных штаммов (рис. 4j). Кроме трех hCBC и мутаций неспаренных участков основания и верхушки III шпильки, были обнаружены вставки в коротком стебле разветвленной III шпильки GC у V. helvetica UTEX 49 (рис. 5e) и V. punctata SAG 887-1 (рис. 5 h), а также в длинном стебле разветвленной III шпильки СС у V. calaminaris CCALA 1014 (рис. 5 d) и V. stellata (рис. 5i), а также UC у V. vischeri SAG 860-1 (рис. 5j). Шпилька IV была наиболее вариабельной и имела одинаковую hCBC у штаммов ACSSI и V. magna SAG 2554 A-U (рис. 4a, b, c, f), U-U мисматч у V. helvetica UTEX 49 (рис. 4e) и V. punctata SAG 887-1 (рис. 4h), а также мутации на верхушке шпильки. Однако наличие нескольких паралогичных последовательностей ITS2 в пределах одного штамма (Kryvenda et al., 2018) затрудняет использование этого маркера для надежного разграничения видов рода Vischeria.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный молекулярно-генетический анализ подтвердил, что все четыре изученных штамма ACSSI являются представителями рода Vischeria. Несмотря на то, что по морфотипу они были близки к V. magna, только ACSSI 026 с высокой статистической поддержкой кластеризовался с аутентичным штаммом SAG 2554. Систематика рода представляется проблемной из-за низкого разрешения ветвей на филогенетическом дереве 18S рРНК и ITS2. Используемые для других групп водорослей вариабельные регионы V4-V5 и V8-V9 гена 18S рРНК оказались неинформативны для видовой идентификации внутри рода. СВС-подход, основанный на разделении близкородственных видов при наличии хотя бы одной СВС в консервативных регионах ITS2, также не имел успеха. Другие обнаруженные различия во вторичной структуре ITS2 могут быть непоказательны вследствие внутригеномной вариации последовательностей ITS2 внутри одного штамма. Вероятно, увеличение объема выборки эустигматофитовых водорослей, использование пластидных генов, в частности *rbc*L, или глубокого секвенирования всего пластидного генома (Amaral et al., 2020), изучение ультраструктурных, физиологических, биохимических характеристик позволит надежно разделить виды рода *Vischeria*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 19-74-00030.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Amaral R., Fawley K.P., Nemcová Y., Sevcíková T., Lukesová A., Fawley M.W., Santos L.M.A., Eliás M. 2020. Toward modern classification of eumastigophytes, including the description of Neomonodaceae fam. nov. and three new genera. – J. Phycol. 56 (3): 630–648.

https://doi.org/10.1111/jpy.12980

- Byun Y., Han K. 2009. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. – Bioinformatics. 25 (11): 1435–1437. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp252
- Bradley I.M., Pinto A.J., Guest J.S. 2016. Design and evaluation of Illumina MiSeq-compatible, 18S rRNA genespecific primers for improved characterization of mixed phototrophic communities. – Appl. Environ. Microbiol. 82 (19): 5878–5891. https://doi.org/10.1128/AEM.01630-16
- Cepák V., Přibyl P., Kohoutková J., Kaštánek P. 2014. Optimization of cultivation conditions for fatty acid composition and EPA production in the eustigmatophycean microalga *Trachydiscus minutus*. – J. Appl. Phycol. 26 (1): 181–190. https://doi.org/10.1007/s10811-013-0119-z
- Coleman A.W. 2009. Is there a molecular key to the level of "biological species" in eukaryotes? A DNA guide. – Mol. Phylogenet. Evol. 50: 197–203. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.10.008
- Coleman A.W. 2000. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. – Protist. 151 (1): 1–9. https://doi.org/10.1078/1434-4610-00002
- Durmaz Y. 2007. Vitamin E (α-tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. – Aquaculture. 272: 717–722.

https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.213

Elias M., Amaral R., Fawley K.P., Fawley M.W., Nemcova Y., Neustupa J., Pribyl P., Santos L.M.A., Sevcıkova T. 2017. Eustigmatophyceae. – In: Handbook of the Protists. Archibald J.M., Simpson A.G.B., Slamovits C.H. [Eds.] Springer International Publishing. Switzerland. P. 367–406.

- Ettl H., Gärtner G. 1995. Syllabus der Boden-, Luft-, und Flechtenalgen. Stuttgart, Jena, New York, Gustav Fischer. 710 p.
- Fawley K.P., Eliáš M., Fawley M.W. 2014. The diversity and phylogeny of the commercially important algal class Eustigmatophyceae, including the new clade Goniochloridales. – J. Appl. Phycol. 26: 1773–1782. https://doi.org/10.1007/s10811-013-0216-z
- Fukuda S.Y., Iwamoto K., Atsumi M., Yokoyama A., Nakavama T., Ishida K., Inouve I., Shiraiwa Y. 2014. Global searches for microalgae and aquatic plants that can eliminate radioactive cesium, iodine and strontium from the radio-polluted aquatic environment: A bioremediation strategy. - J. Plant Res. 127 (1): 79-89. https://doi.org/10.1007/s10265-013-0596-9
- Gao B., Xia S., Lei X., Zhang Z. 2018. Combined effects of different nitrogen sources and levels and light intensities on growth and fatty acid and lipid production of oleaginous eustigmatophycean microalga Eustigmatos cf. polyphem. – J. Appl. Phycol. 30: 215–229. https://doi.org/10.1007/s10811-017-1180-9
- Gao B., Yang J., Lei X., Xia S., Li A., Zhang C. 2016. Characterization of cell structural change, growth, lipid accumulation, and pigment profile of a novel oleaginous microalga, Vischeria stellata (Eustigmatophyceae), cultured with different initial nitrate supplies. - J. Appl. Phycol. 28: 821-830. https://doi.org/10.1007/s10811-015-0626-1
- Guiry M.D., Guiry G.M. 2021. AlgaeBase. World-wide electronic publication. National University of Ireland. Galway. http://www.algaebase.org
- Hibberd D.J. 1981. Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). - Bot. J. Linn. Soc. 82 (2): 93-119.

https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1981.tb00954.x

- Hibberd D.J., Leedale G.F. 1971. A new algal class The Eustigmatophyceae. - Taxon. 20 (4): 523-525. https://doi.org/10.1038/225758b0
- Katana A., Kwiatowski J., Spalik K., Zakryś B., Szalacha E., Szymańska H. 2001. Phylogenetic position of Koliella (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA. - J. Phycol. 37 (3): 443-451.

https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037003443.x

- Kryvenda A., Rybalka N., Wolf M., Friedl T. 2018. Species distinctions among closely related strains of Eustigmatophyceae (Stramenopiles) emphasizing ITS2 sequence-structure data: Eustigmatos and Vischeria. -Eur. J. Phycol. 53 (4): 471-491. https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1475015
- Li Z., Sun M., Li Q., Li A., Zhang C. 2012. Profiling of carotenoids in six microalgae (Eustigmatophyceae) and assessment of their ß-carotene productions in bubble column photobioreactor. - Biotechnol. Lett. 34 (11): 2049-2053.

https://doi.org/10.1007/s10529-012-0996-2

Martins C.B., Ferreira O., Rosado T. et al. 2021. Eustigmatophyte strains with potential interest in cancer prevention and treatment: partial chemical characterization and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity. -Biotechnol Lett.

https://doi.org/10.1007/s10529-021-03122-0

- Müller T., Philippi N., Dandekar T., Schultz J., Wolf M. 2007. Distinguishing species. - RNA. 3 (9): 1469-1472. https://doi.org/10.1261/rna.617107
- Norton T.A., Melkonian M., Andersen R.A. 1996. Algal biodiversity. - Phycologia. 35: 308-326. https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-4-308.1
- Pal D., Khozin-Goldberg I., Didi-Cohen S., Solovchenko A., Batushansky A., Kaye Y., Sikron N., Samani T., Fait A., Boussiba S. 2013. Growth, lipid production and metabolic adjustments in the euryhaline eustigmatophyte Nannochloropsis oceanica CCALA 804 in response to osmotic downshift. - Appl. Microbiol. Biotechnol. 97 (18): 8291-8306. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5092-6
- Patterson G.W., Tsitsa-Tzardis E., Wikfors G.H., Smith B.C., Gladu, P. K. 1994. Sterols of Eustigmatophytes. - Lipids. 29 (9): 661-664. https://doi.org/10.1007/BF02536102
- Procházková K. 2012. Diverzita a druhový koncept u kom-Vischeria/Eustigmatos (Eustigmatophyceae): plexu Diplomova prace. Praha. Karlova univerzita. 79 p.
- Remias D., Nicoletti C., Krennhuber K. et al. 2020. Growth, fatty, and amino acid profiles of the soil alga Vischeria sp. E71.10 (Eustigmatophyceae) under different cultivation conditions. - Folia Microbiol. (Praha). 65 (6): 1017-1023. https://doi.org/10.1007/s12223-020-00810-8
- [Safiullina et al.] Сафиуллина Л.М., Муратова К.Р., Закирова М.Б. 2014. Сравнительный анализ микроскопических почвенных водорослей Eustigmatos *magnus* и Vischeria helvetica (Eustigmatophyta). – Альгология. 24 (3): 270-273.
- Stoykova P., Stoyneva-Gärtner M., Uzunov B., Gärtner G., Atanassov I., Draganova P., Borisova C. 2019. Morphological characterization and phylogenetic analvsis of aeroterrestrial Vischeria/Eustigmatos strains with industrial potential. – Biotechnol. Biotechnol. Equip. 33 (1): 231-242. https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1561212
- Stoyneva-Gärtner M., Uzunov B., Gärtner G., Borisova C., Draganova P., Radkova M., Stoykova P., Atanassov I. 2019. Current bioeconomical interest in stramenopilic Eustigmatophyceae: a review. - Biotechnol. Biotechnol. Equip. 33 (1): 302-314. https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1573154
- Upadhyay A.K., Singh N.K., Singh R., Rai U.N. 2016. Amelioration of arsenic toxicity in rice: Comparative effect of inoculation of Chlorella vulgaris and Nannochloropsis sp. on growth, biochemical changes and arsenic uptake. – Ecotoxicol. Environ. Saf. 124: 68–73. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.002
- Wang F., Gao B., Huang L., Su M., Dai C., Zhang C. 2018. Evaluation of oleaginous eustigmatophycean microalgae as potential biorefinery feedstock for the production of palmitoleic acid and biodiesel. - Bioresour. Technol. 270: 30-37. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.016

БОТАНИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ Nº 2 2022 том 107

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF GENUS VISCHERIA (EUSTIGMATACEAE, OCHROPHYTA) IN THE ACSSI ALGOLOGICAL COLLECTION

A. D. Temraleeva^{*a*,[#]} and E. A. Portnaya^{*a*}

^a Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science of the Russian Academy of Science, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences" Institutskaya Str., 2, Pushchino, 142290, Russian Federation [#]e-mail: temraleeva.anna@gmail.com</sup>

Morphological and molecular genetic analysis of four strains of soil eustigmatophyte algae isolated from grey forest soils of Moscow and Tula regions of Russia and kept in the Algal Collection of Soil Science Institute (ACSSI) was carried out. According to the 18S rRNA and ITS2 phylogeny data, the studied strains are the members of the *Vischeria* genus. They are morphologically close to *V. magna*; however, only one ACSSI 026 strain with high statistical support clustered with the authentic SAG 2554 strain. The other strains formed a separate independent group. The paper shows that the taxonomy of the genus seems to be problematic due to the unresolved phylogenetic tree of 18S rRNA and ITS2, the lack of information content of the variable regions V4-V5 and V8-V9 of the 18S rRNA gene and the failure of the CBC approach based on the separation of closely related species in the presence of at least one CBC in the conservative regions of the secondary structure of ITS2. It is assumed that an increase in the number of strains of eustigmatophyte algae isolated from various biotopes, the use of plastid genes or deep sequencing of the whole plastid genome, the study of ultrastructural, physiological, and biochemical characteristics will make it possible to develop the concept of a species in eustigmatophyte algae in general and in the genus *Vischeria* in particular.

Key words: eustigmatophyte algae, light microscopy, phylogeny, 18S rRNA, ITS2, CBC approach

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by the Russian Science Foundation, project number 19-74-00030.

REFERENCES

- Amaral R., Fawley K.P., Nemcová Y., Sevcíková T., Lukesová A., Fawley M.W., Santos L.M.A., Eliás M. 2020. Toward modern classification of eumastigophytes, including the description of Neomonodaceae fam. nov. and three new genera. – J. Phycol. 56 (3): 630–648. https://doi.org/10.1111/jpy.12980
- Byun Y., Han K. 2009. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. – Bioinformatics. 25 (11): 1435–1437. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp252
- Bradley I.M., Pinto A.J., Guest J.S. 2016. Design and evaluation of Illumina MiSeq-compatible, 18S rRNA genespecific primers for improved characterization of mixed phototrophic communities. – Appl. Environ. Microbiol. 82 (19): 5878–5891. https://doi.org/10.1128/AEM.01630-16
- Cepák V., Přibyl P., Kohoutková J., Kaštánek P. 2014. Optimization of cultivation conditions for fatty acid composition and EPA production in the eustigmatophycean microalga *Trachydiscus minutus*. – J. Appl. Phycol. 26 (1): 181–190. https://doi.org/10.1007/s10811-013-0119-z
- Coleman A.W. 2009. Is there a molecular key to the level of "biological species" in eukaryotes? A DNA guide. – Mol. Phylogenet. Evol. 50: 197–203. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.10.008

- Coleman A.W. 2000. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. – Protist. 151 (1): 1–9. https://doi.org/10.1078/1434-4610-00002
- Durmaz Y. 2007. Vitamin E (α-tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. – Aquaculture. 272: 717–722.
- https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.213
- Elias M., Amaral R., Fawley K.P., Fawley M.W., Nemcova Y., Neustupa J., Pribyl P., Santos L.M.A., Sevcıkova T. 2017. Eustigmatophyceae. – In: Handbook of the Protists. Archibald J.M., Simpson A.G.B., Slamovits C.H. [Eds.] Springer International Publishing. Switzerland. P. 367–406.
- Ettl H., Gärtner G. 1995. Syllabus der Boden-, Luft-, und Flechtenalgen. Stuttgart, Jena, New York, Gustav Fischer. 710 p.
- Fawley K.P., Eliáš M., Fawley M.W. 2014. The diversity and phylogeny of the commercially important algal class Eustigmatophyceae, including the new clade Goniochloridales. – J. Appl. Phycol. 26: 1773–1782. https://doi.org/10.1007/s10811-013-0216-z
- Fukuda S.Y., Iwamoto K., Atsumi M., Yokoyama A., Nakayama T., Ishida K., Inouye I., Shiraiwa Y. 2014. Global searches for microalgae and aquatic plants that can eliminate radioactive cesium, iodine and strontium from the radio-polluted aquatic environment: A bioremediation strategy. – J. Plant Res. 127 (1): 79–89. https://doi.org/10.1007/s10265-013-0596-9
- Gao B., Xia S., Lei X., Zhang Z. 2018. Combined effects of different nitrogen sources and levels and light intensities on growth and fatty acid and lipid production of oleaginous eustigmatophycean microalga *Eustigmatos*

cf. *polyphem*. – J. Appl. Phycol. 30: 215–229. https://doi.org/10.1007/s10811-017-1180-9

- Gao B., Yang J., Lei X., Xia S., Li A., Zhang C. 2016. Characterization of cell structural change, growth, lipid accumulation, and pigment profile of a novel oleaginous microalga, *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae), cultured with different initial nitrate supplies. J. Appl. Phycol. 28: 821–830. https://doi.org/10.1007/s10811-015-0626-1
- Guiry M.D., Guiry G.M. 2021. AlgaeBase. World-wide electronic publication. National University of Ireland. Galway. http://www.algaebase.org
- Hibberd D.J. 1981. Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). Bot. J. Linn. Soc. 82 (2): 93–119.
 - https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1981.tb00954.x
- Hibberd D.J., Leedale G.F. 1971. A new algal class The Eustigmatophyceae. – Taxon. 20 (4): 523–525. https://doi.org/10.1038/225758b0
- Katana A., Kwiatowski J., Spalik K., Zakryś B., Szalacha E., Szymańska H. 2001. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA. – J. Phycol. 37 (3): 443–451.

https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037003443.x

Kryvenda A., Rybalka N., Wolf M., Friedl T. 2018. Species distinctions among closely related strains of Eustigmatophyceae (Stramenopiles) emphasizing ITS2 sequence-structure data: *Eustigmatos* and *Vischeria*. – Eur. J. Phycol. 53 (4): 471–491.
https://doi.org/10.1080/00670262.2018.1475015

https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1475015

Li Z., Sun M., Li Q., Li A., Zhang C. 2012. Profiling of carotenoids in six microalgae (Eustigmatophyceae) and assessment of their β-carotene productions in bubble column photobioreactor. – Biotechnol. Lett. 34 (11): 2049–2053.

https://doi.org/180.1007/s10529-012-0996-2

- Martins C.B., Ferreira O., Rosado T. et al. 2021. *Eustigmatophyte* strains with potential interest in cancer prevention and treatment: partial chemical characterization and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity. – Biotechnol . Lett.
 - https://doi.org/10.1007/s10529-021-03122-0
- Müller T., Philippi N., Dandekar T., Schultz J., Wolf M. 2007. Distinguishing species. – RNA. 3 (9): 1469– 1472.

https://doi.org/10.1261/rna.617107

Norton T.A., Melkonian M., Andersen R.A. 1996. Algal biodiversity. – Phycologia. 35: 308–326. https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-4-308.1

- Pal D., Khozin-Goldberg I., Didi-Cohen S., Solovchenko A., Batushansky A., Kaye Y., Sikron N., Samani T., Fait A., Boussiba S. 2013. Growth, lipid production and metabolic adjustments in the euryhaline eustigmatophyte *Nannochloropsis oceanica* CCALA 804 in response to osmotic downshift. – Appl. Microbiol. Biotechnol. 97 (18): 8291–8306. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5092-6
- Patterson G.W., Tsitsa-Tzardis E., Wikfors G.H., Smith B.C., Gladu P.K. 1994. Sterols of Eustigmatophytes. – Lipids. 29 (9): 661–664. https://doi.org/10.1007/BF02536102
- Procházková K. 2012. Diversity and species concept of the *Vischeria/Eustigmatos* complex (Eustigmatophyceae): Graduation thesis. Praha. Karlova univerzita. 79 p. (In Czech.)
- Remias D., Nicoletti C., Krennhuber K. et al. 2020. Growth, fatty, and amino acid profiles of the soil alga *Vischeria* sp. E71.10 (Eustigmatophyceae) under different cultivation conditions. – Folia Microbiol. (Praha). 65 (6): 1017–1023. https://doi.org/10.1007/s12223-020-00810-8
- Safiullina L.M., Muratova K.R., Zakirova M.B. 2014. Comparative analysis of microscopic soil algae *Eustigmatos magnus* and *Vischeria helvetica* (Eustigmatophyta). – Algologia. 24 (3): 270–273 (In Russ.).
- Stoykova P., Stoyneva-Gärtner M., Uzunov B., Gärtner G., Atanassov I., Draganova P., Borisova C. 2019. Morphological characterization and phylogenetic analysis of aeroterrestrial *Vischeria/Eustigmatos* strains with industrial potential. – Biotechnol. Biotechnol. Equip. 33 (1): 231–242.

https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1561212

- Stoyneva-Gärtner M., Uzunov B., Gärtner G., Borisova C., Draganova P., Radkova M., Stoykova P., Atanassov I. 2019. Current bioeconomical interest in stramenopilic Eustigmatophyceae: a review. – Biotechnol. Biotechnol. Equip. 33 (1): 302–314. https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1573154
- Upadhyay A.K., Singh N.K., Singh R., Rai U.N. 2016. Amelioration of arsenic toxicity in rice: Comparative effect of inoculation of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis* sp. on growth, biochemical changes and arsenic uptake. – Ecotoxicol. Environ. Saf. 124: 68–73. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.002
- Wang F., Gao B., Huang L., Su M., Dai C., Zhang C. 2018. Evaluation of oleaginous eustigmatophycean microalgae as potential biorefinery feedstock for the production of palmitoleic acid and biodiesel. – Bioresour. Technol. 270: 30–37. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.016