

ПРОБЛЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ И КРИПТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ КЛАДЫ *CHLORELLA* (*CHLOROPHYTA*)¹

© 2020 г. Е. С. Кривина^а *, А. Д. Темралеева^а

^аИнститут физико-химических и биологических проблем почвоведения
Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, 142290 Россия

*e-mail: pepelisa@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.02.2020 г.

После доработки 25.05.2020 г.

Принята к публикации 03.06.2020 г.

В статье рассматривается система зеленых микроводорослей клады *Chlorella*, построенная на основании морфологических, физиологических, экологических и молекулярно-генетических данных. Обсуждаются диагностические признаки выделенных родов и видов, а также систематическое положение некоторых таксонов. Молекулярно-филогенетический анализ членов клады *Chlorella* показал, что использование одного гена 18S рРНК, который считается главным филогенетическим маркером для зеленых микроводорослей, не позволяет надежно разграничить виды и роды внутри клады. Применение переменных спейсеров ITS1 и ITS2 разрешило топологию дерева и усилило филогенетический сигнал. Подтверждена полифилетичность рода *Chlorella*. Часть видов рода образовали истинную кладу *Chlorella* – типовой вид *C. vulgaris*, *C. heliozoae*, *C. pituita*, *C. chlorelloides*, *C. variabilis* и *Lobosphaeropsis lobophora*. Остальные виды (*C. pulchelloides*, *C. colonials*, *C. rotunda*, *C. singularis*, *C. elongata*, *C. sorokiniana*, *C. lewinii*, *C. volutis*, *C. thermophila*) являются членами других клад, и их таксономическая принадлежность нуждается в уточнении. СВС-подход и поиск компенсаторных замен в консервативных регионах ITS2, как инструмент для разграничения видов, не был эффективен. Была подтверждена результативность использования интрона в качестве критерия разделения близкородственных видов. Анализ генетических дистанций позволил однозначно разделить штаммы на виды внутри родов *Didymogenes*, *Hindakia*, *Heynigia*. Для членов клады *Chlorella* характерно высокое криптическое разнообразие: ни одна из рассмотренных фенотипических характеристик по отдельности не позволяет однозначно определить таксономическую принадлежность водорослей клады. Некоторые морфологические признаки переменны, часто изменяются или утрачиваются после инструментальных манипуляций при пробоподготовке для мониторинга водоемов. Благодаря использованию комбинаций морфологических, биохимических, ультраструктурных, физиологических, экологических и молекулярно-генетических признаков (полифазный подход), нам удалось охарактеризовать восемь групп внутри клады *Chlorella* и выдвинуть предположения о разделении родов и видов внутри выделенных групп.

Ключевые слова: микроводоросли, морфология, экология, филогения, фрагмент 18S–ITS1–5.8S–ITS2, полифазный подход

DOI: 10.31857/S0026365620060105

Род *Chlorella sensu lato* является архетипом одноклеточных зеленых микроводорослей (*Chlorophyta*). Изначально в него включали микроводоросли с коккоидной организацией таллома, шаровидной или эллипсоидной формой клеток, а также размножающиеся исключительно автоспорами. К роду было отнесено около 100 видов свободноживущих, эндосимбиотических и паразитических зеленых микроводорослей из пресноводных, морских и наземных экосистем (Guiry, Guiry, 2020). Более по-

дробное изучение биохимических, ультраструктурных и генетических характеристик рода выявило его гетерогенность, в связи с этим было предпринято несколько попыток ревизии. Так, на основании различий в нуклеотидных последовательностях гена 18S рРНК и спейсера ITS2 Krienitz et al. (2004) выделили *Chlorella kessleri* в отдельный род *Parachlorella*. Впоследствии разделение *Chlorella*-клады и *Parachlorella*-клады на 2 сестринские группы было подтверждено Yamamoto et al. (2005) на основании ультраструктурных исследований синтеза клеточных стенок автоспор. Далее Luo et al. (2010) обобщили молекулярно-генетические, морфологические и онтогенетические результаты иссле-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365620060105 для авторизованных пользователей.

дований (Wolf et al., 2002; Krienitz et al., 2004; Fawley et al., 2005; Pröschold et al., 2010) и предложили новую концепцию клады *Chlorella*, в настоящее время соответствующей семейству *Chlorellaceae* (Guiry, Guiry, 2020), в которую, помимо архетипа, были отнесены несколько родов с различной морфологией: *Actinastrum* (ранее семейство *Coelastraceae*), *Didymogenes* (ранее *Scenedesmaceae*), *Hegewaldia*, *Meyerella* и *Micractinium* (ранее *Micractiniaceae*).

Последняя масштабная ревизия пресноводных и наземных штаммов клады *Chlorella* проводилась Pröschold et al. (2010) и Bock et al. (2011). Однако с этого времени был описан целый ряд новых таксонов внутри клады: *C. thermophila* (Ma et al., 2015), род *Carolibrandtia* (Hoshina et al., 2017; Hoshina, Nakada, 2018), *Micractinium singularis*, *M. variabile*, *M. simplicissimum* (Chae et al., 2019). Недавнее исследование Darienko et al. (2019) касалось ограниченного ряда водорослей клады *Chlorella*, обитающих исключительно в морских экосистемах. В настоящее время правильная идентификация хлорелл по-прежнему затруднительна вследствие скудности и высокой фенотипической пластичности морфологических свойств и отсутствия надежных диакритических признаков для разграничения близкородственных таксонов. Особую сложность вызывает их идентификация при проведении мониторинга состояния водоемов. Общепринятой практикой при качественном и количественном анализе фитопланктона является обработка отфильтрованных, фиксированных 40%-ным формалином альгологических проб на световом микроскопе при увеличении $\times 600$ в счетной камере Учинской или Нажотта (Методика изучения..., 1975). Точное определение микроводорослей *Chlorella*-клады в подобных пробах будет дополнительно затруднено изменением или утратой некоторых морфологических признаков, таких как слизь, соединительные тяжи, формирование колоний, щетинкообразование, вследствие методических инструментальных манипуляций (фильтрация, фиксация). Это приводит к снижению фактического биоразнообразия микроводорослей в экосистемах водоемов. Так, в составе альгофлоры планктона системы водохранилищ бассейна реки Волга по результатам многолетних наблюдений с 1953 г. по 2014 г. было обнаружено более 2000 видов, разновидностей и форм микроводорослей и цианобактерий. Из них к роду *Chlorella* относился всего 1 вид, к роду *Actinastrum* 4 вида, к роду *Didymogenes* 2 вида, к роду *Micractinium* 5 видов (Корнева, 2015). Столь же невелико видовое разнообразие *Chlorella*-подобных микроводорослей и в малых водоемах урбанизированных ландшафтов. В составе альгофлоры планктона данной группы водоемов в период изучения с 1991 г. по 2017 г. было зарегистрировано 451 вид микроводорослей и цианобактерий. При

этом род *Chlorella* был представлен всего 2 видами, род *Actinastrum* — 1 видом, род *Micractinium* — 1 видом (Кривина, 2018). Таким образом, валидная идентификация этой сложной в морфологическом плане группы микроводорослей крайне важна не только в фундаментальном аспекте для разработки таксономической классификации, но и в прикладном — для задач биомониторинга, биотестирования, биотехнологических приложений.

Цель данной работы заключалась в исследовании морфологии, экологии и филогении представителей клады *Chlorella*, в том числе нового штамма ACSSI 198, для разграничения близкородственных таксонов на уровне вида и рода. В статье впервые были обобщены и проанализированы характеристики представителей группы, в первую очередь таксоны, открытые после последней ревизии клады в 2011 году.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектами данного исследования стали описанные штаммы, принадлежащие кладе *Chlorella*, и их нуклеотидные последовательности, депонированные в GenBank, а также новый штамм зеленой микроводоросли из пробы воды с поверхностного горизонта прибрежной зоны оз. Прудовиков, расположенного на северо-восточной границе г. Тольятти Самарской области ($53^{\circ}52'95''$ с.ш., $49^{\circ}51'70''$ в.д.).

Изоляция и культивирование нового штамма. Каплю озерной воды без предварительной фильтрации наносили на твердую среду BG-11 с азотом (2% агар; pH 7.2) и далее многократно пересекали отдельные колонии. Полученные изоляты культивировали в климатостате в стандартных условиях (температура 23–25°C; свет 60–75 $\mu\text{моль фотонов м}^{-2} \text{с}^{-1}$; фотопериод 12 ч).

Микроскопия. Морфологию и жизненный цикл нового штамма изучали методами световой микроскопии (светлое поле и интерференционный контраст) с помощью микроскопов Leica DM750 и Carl Zeiss Axio Scope A1 (Германия) в ЦКП ИФХиБПП РАН. Результаты наблюдений документированы рабочими рисунками и фотографиями, снятыми с помощью цветных цифровых камер “Видеозавр” (Россия) и Carl Zeiss MRc 5 (Германия). Сроки наблюдения составили от 2 нед. до 12 мес. По данным микроскопии штамм был предварительно идентифицирован как *Chlorella* sp. и депонирован в Альгологическую коллекцию ACSSI (<http://acssi.org/>) под номером 198.

Выделение, амплификация, очистка и секвенирование ДНК. Суммарную ДНК из штамма ACSSI 198 выделяли с помощью колоночного набора DNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, США), следуя протоколу производителя. Для амплификации использовали готовую смесь Screen Mix-HS (“Ев-

Таблица 1. Праймеры и условия амплификации генов 18S и 5.8S рРНК, спейсеров ITS1 и ITS2

Локус	Праймер	Последовательность (5'–3')	Условия амплификации
18S рРНК	18SF	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	95°C – 5 мин;
	18SR	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTACG	95°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 2 мин, 35 циклов; 72°C – 5 мин
	402–23F*	GCTACCACATCCAAGGAAGGCA	
	1323–44F*	CGAACGAGACCTCAGCCTGCTA	
	898–919R*	TAAATCCAAGAATTTACCTCT	
ITS1, 5.8S	ITS-AF	CGTTTCCGTAGGTGAACCTGC	95°C – 3 мин;
	ITS-BR	CATATGCTTAAGTTCAGCGGG	95°C – 30 с, 57.6°C – 30 с, 72°C – 1 мин, 35 циклов; 72°C – 10 мин
ITS2	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	95°C – 3 мин;
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	95°C – 30 с, 57.6°C – 30 с, 72°C – 1 мин, 35 циклов; 72°C – 10 мин

* Внутренние секвенирующие праймеры.

роген”, Россия). Праймеры для ПЦР генов 18S, 5.8S рРНК и спейсеров ITS1, ITS2 были использованы из статей Katana et al. (2001) и White et al. (1990) (табл. 1). Детекцию целевых ПЦР-продуктов проводили электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Для дальнейшей очистки ампликонов из геля применяли набор Cleanup Standard (“Евроген”, Россия). Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли с праймерами, приведенными в табл. 1, на базе ЗАО “Синтол” (Россия).

Молекулярно-филогенетический анализ. Для уточнения филогенетического положения штамма ACSS1 198 и установления его связей внутри клады *Chlorella* был осуществлен поиск гомологии нуклеотидных последовательностей генов 18S, 5.8S рРНК и спейсеров ITS1, ITS2 по алгоритму BLASTn в GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Отбор последовательностей осуществляли исходя из критериев максимального родства (сходство $\geq 95\%$), качества прочтения (без вырожденных и неизвестных нуклеотидов), длины прочтения (фрагмент 18S–ITS1–5.8S–ITS2 не менее 2300 п.н. длиной) и принадлежности к типовым видам и коллекционным аутентичным штаммам. В состав выборки для филогенетического анализа вошли 96 штаммов, характеристика которых представлена в дополнительных материалах (табл. S1). Названия таксонов приведены согласно Международной электронной базе данных AlgaeBase (Guiry, Guiry, 2020). При наличии интронов в гене 18S рРНК они удалялись из выравнивания, информация об обнаруженных интронах указана на рис. 1, 2. Множественное выравнивание

было выполнено в программе BioEdit по алгоритму ClustalW. При выборе модели нуклеотидных замен использовали программу jModelTest и минимальное значение критерия AIC. Реконструкцию филогенетических взаимосвязей осуществляли с помощью метода максимального правдоподобия (ML) в программе PhyML. В качестве внешней группы выбрали представителей класса *Trebouxiophyceae* (*Chlorophyta*) – *Dictyosphaerium ehrenbergianum*, *Parachlorella beijerinckii*, *P. kessleri*.

Статистическая поддержка топологии дерева была оценена с помощью бутстреп-анализа (1000 повторностей) и указана в узлах ветвей в виде процентов. Филогенетические деревья были визуализированы в программе FigTree v. 1.3.1. 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 MEGA 6.0. Для сравнения топологии деревьев использовали данные статей (Krienitz et al., 2004; Hoshina et al., 2010; Luo et al., 2010; Bock et al., 2011a, 2011b; Pröschold et al., 2011; Ma et al., 2015; Hoshina et al., 2017; Hoshina, Nakada, 2018; Darienko et al., 2019).

Для анализа вторичной структуры ITS2 была выполнена аннотация спейсера в ITS2-DataBase (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>) и его фолдинг с помощью веб-сервера Mfold (<http://unafold.rna.albany.edu>) в соответствии с

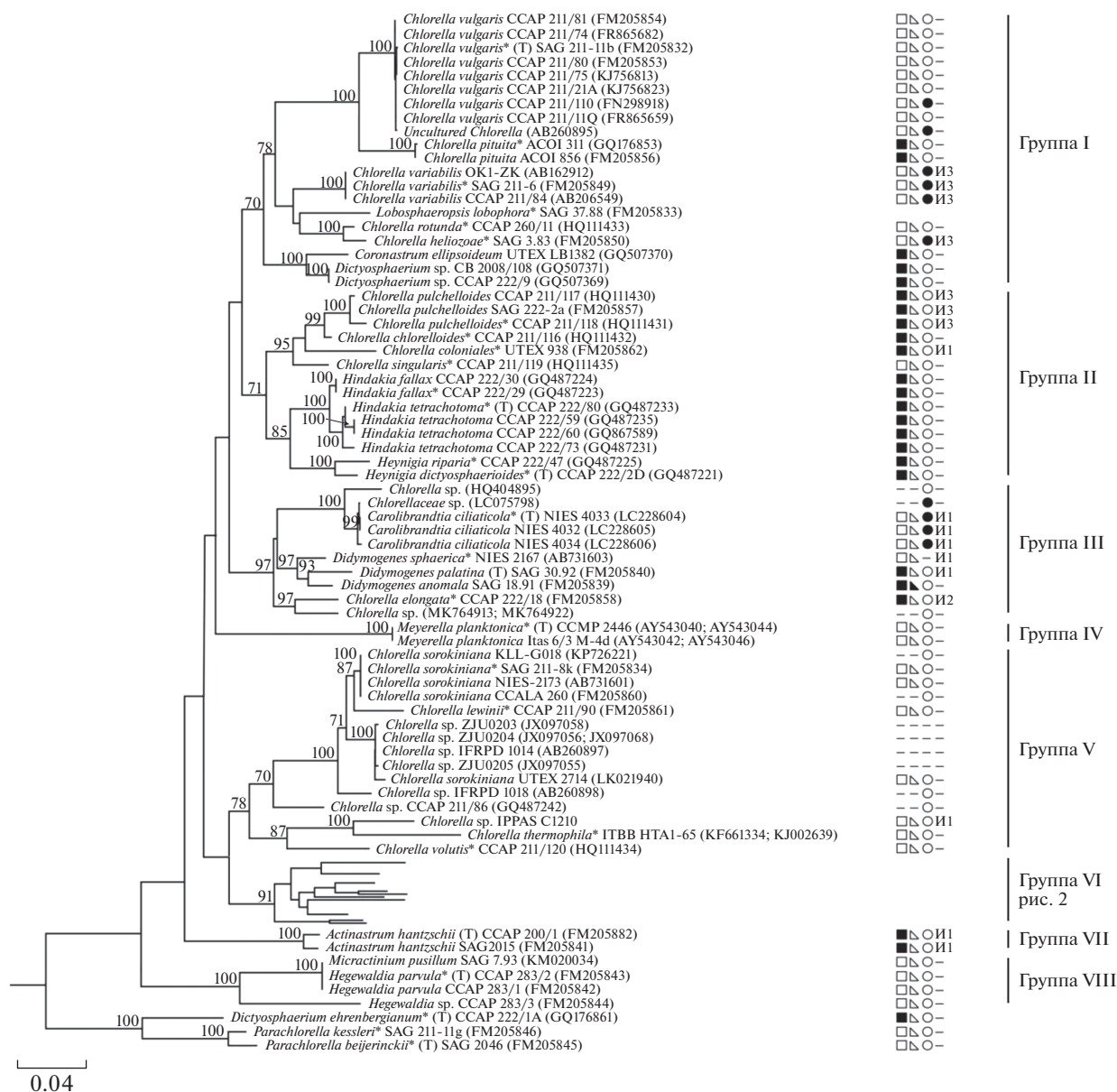


Рис. 1. Укорененное филогенетическое дерево зеленых водорослей клады *Chlorococcales*, построенное методом максимального правдоподобия (ML), на основе последовательностей генов 18S и 5.8S рРНК и спейсеров ITS1 и ITS2 (2611 п.н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны бутстреп-значения ML; значения <70% не показаны. Модель нуклеотидных замен: GTR + I + G. Обозначения: * – аутентичные штаммы; (T) – типовой вид. ■ – образует колонии; □ – одиночные клетки; ▽ – не продуцирует шетинки; ▲ – продуцирует шетинки; ○ – свободноживущий организм; ● – эндосимбиотический организм; “–” – нет информации; И – наличие интронов, рядом указано количество интронов; “–” – нет интрона.

принципом минимальной энергии. При оценке правильности фолдинга ITS2 зеленых микроводорослей ориентировались на работу Saisová et al. (2013). Сравнение вторичной структуры между штаммами, поиск консервативных мотивов и компенсаторных замен (СВС) осуществляли между всеми штаммами выборки в программе 4SALE. В качестве инструмента разделения видов

был использован подход, предложенный Coleman (2000, 2009), которая показала, что наличие хотя бы одной СВС в консервативных регионах ITS2 (5 п.н. I шпильки, 11 п.н. II шпильки, вся III шпилька) у двух водорослей коррелирует с их полной половой несовместимостью. Напротив, СВС в менее консервативных регионах, а также полукомпенсаторные замены (hСВС) в консерва-

тивных регионах не были связаны со способностью к скрещиванию. Вторичные структуры были визуализированы в программе PseudoViewer3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Главный молекулярно-филогенетический маркер для эукариотических организмов — ядерный ген 18S рРНК — достаточно консервативен и не всегда позволяет успешно разделять близкородственные виды зеленых микроводорослей (Fawley et al., 2006). В дополнительных материалах (рис. S1) представлено филогенетическое дерево клады *Chlorella*, построенное на основе последовательностей гена 18S рРНК. Доля консервативных сайтов составляла 88%, переменных — 12%, парсимони-информативных — 6%. Для усиления филогенетического сигнала использовали более длинный фрагмент, включающий гены 18S и 5.8S рРНК, а также спейсеры ITS1 и ITS2. При увеличении длины нуклеотидной последовательности количество консервативных сайтов снизилось до 71%, доля переменных сайтов возросла более чем в 2 раза и составила 27%, доля парсимони-информативных сайтов увеличилась более чем в три раза и равнялась 22%. Было отмечено улучшение кластеризации и рост статистических поддержек узлов дерева. Поэтому в данной работе мы рассматриваем филогенетическое дерево, построенное на основании фрагмента 18S–ITS1–5.8S–ITS2. Клада *Chlorella* образовала группу с максимальным уровнем статистической поддержки (рис. 1), внутри разделяясь на 8 групп надродового и родового уровня со статистической поддержкой от 70 до 100%.

Все представители клады *Chlorella* имели коккоидную организацию таллома. Клетки одиночные или колониальные, соединенные слизистыми тяжами. Хлоропласт пристенный, преимущественно чашевидный. Пиреноид, как правило, один, кроме представителей рода *Meyerella*, у которых он отсутствует. Крахмальная обертка пиреноида либо фрагментированная, состоящая из 2–4 скорлупок, либо сплошная. Размножение преимущественно бесполое — автоспорогенез, за исключением *Micractinium pusillum* и представителей рода *Hegewaldia*, у которых известен половой процесс (оогамия). Большинство микроводорослей клады *Chlorella* являются пресноводными свободноживущими планктонными организмами. Однако встречаются также свободноживущие обитатели солоноватоводных водоемов и морских вод, почв и эндосимбионты (Krienitz et al., 2004; Fawley et al., 2005; Luo et al., 2010; Pröschold et al., 2010; Bock et al., 2011a; Darienko et al., 2019).

Для всех штаммов, представленных на филогенетическом дереве, были смоделированы вторичные структуры ITS2. Длина ITS2 членов клады *Chlorella* варьировала в диапазоне от 221 до 268 н.

Вторичная структура ITS2 обладала общими признаками, характерными для зеленых микроводорослей (*Chlorophyta*): четыре неразветвленные шпильки, пиримидин-пиримидиновый мисматч во II шпильке, консервативный мотив GGUAGG в самой длинной III шпильке. Далее мы приводим описание каждой из групп с морфологическими, молекулярно-генетическими и экологическими характеристиками.

Группа I объединяет с 70%-ной статистической поддержкой микроводоросли с шаровидными или слегка овальными клетками, которые не образуют щетинок. Хлоропласт пристенный, у большинства представителей клады чашевидный, реже поясковидный. Пиреноид один, с крахмальной оберткой из 2–4 скорлупок. Размножение автоспорами. Обитают, преимущественно, в пресных водах, реже в солоноватоводных и соленых водоемах и почве. Среди них есть как свободноживущие микроводоросли, так и симбионты пресноводных ресничных и амебоидных протистов (Luo et al., 2010; Pröschold et al., 2010; Bock et al., 2011a). В состав данной группы вошли:

- типовой вид рода *Chlorella vulgaris* (8 штаммов, в т.ч. аутентичный штамм SAG 211-11b) и некультивируемая микроводоросль *Chlorella* sp. Преимущественно пресноводные свободноживущие организмы. Однако встречаются обитатели солоноватоводных и соленых водоемов (штаммы CCAP 211/21A, CCAP 211/75) и эндосимбионты пресноводной инфузории *Paramecium bursaria* (штамм CCAP 211/110 и *Chlorella* sp.);

- *C. pituita* (2 штамма, включая аутентичный штамм ACOI 311). Отличительные черты: слизистые тяжи, формирование колоний, окруженных слизистой оболочкой, наличие, помимо чашевидного, блюдцевидного хлоропласта (Bock et al., 2011a);

- *C. variabilis* (3 штамма, в т.ч. аутентичный штамм SAG 211-6). В отличие от других представителей группы I штаммам *C. variabilis* для нормальной жизнедеятельности необходимы соединения аммония или органического азота, витамины B₁ и B₁₂ (Pröschold et al., 2011). Вероятно, это связано с симбиотическим образом жизни, поскольку все представители подгруппы являются эндосимбионтами инфузории *Paramecia bursaria*. Другой характерной чертой является наличие в составе гена 18S рРНК трех интронов длиной 326, 646 и 495 п.н. соответственно;

- аутентичный штамм *Lobosphaeropsis lobophora* SAG 37.88. К диакритическим признакам относятся лопастной хлоропласт, присутствие капель масла в цитоплазме (Ettl, Gärtner, 1995), почвенное местообитание. Отметим, что перенос *C. lobophora* к *Lobosphaeropsis* Reisinger, предложенный Ettl, Gärtner (1995) не подтверждается в нашем исследовании, равно как в других работах (Krienitz et al.,

2004; Luo et al., 2010; Bock et al., 2011a). Аутентичный штамм *L. pyrenoidosa*, типового вида рода *Lobosphaeropsis*, утерян, а единственный доступный штамм этого вида FG2/10.3 близок к роду *Watanabea*;

– аутентичный штамм *C. rotunda* ССАР 260/11, отличающийся наименьшими размерами в данной группе (3.3–4.5 мкм в диаметре) (Bock et al., 2011a);

– аутентичный штамм *C. heliozoae* SAG 3.83. Характерными признаками являются мантиевидный или блюдцевидный хлоропласт, эндосимбиотический образ жизни в теле центрохелидного солнечника *Acanthocystis turfacea* (Bock et al., 2011a), а также наличие в составе гена 18S рРНК трех интронов длиной 552, 435 и 387 п.н. соответственно;

– отдельную филогенетическую линию составляют 2 неаутентичных штамма *Dictyosphaerium* sp., отличающиеся наличием колоний, в которых клетки соединены слизистыми тяжами (Bock et al., 2011b);

– сестринской филогенетической линией к *Dictyosphaerium* sp. является неаутентичный штамм *Coronastrum ellipsoideum* UTEX LB1382, характерной чертой которого является способность формировать 4-клеточные ценобии при помощи коротких бесцветных нитей (Bock et al., 2011b). Можно предположить, что *Dictyosphaerium* sp. и *C. ellipsoideum* UTEX LB1382 являются новыми, пока не идентифицированными видами рода *Chlorella*.

В пределах группы I внутривидовые различия нуклеотидных последовательностей, включающих гены 18S и 5.8S рРНК и спейсеры ITS1 и ITS2, составляли 0–0.1%, межвидовые – 0.4–2.1%. Условно, обозначим данную группу как “истинные” хлореллы.

Применение СВС-подхода для разграничения видов внутри группы I не было полностью успешным. Так между видами *C. vulgaris* и *C. pituita*, а также между видами *C. variabilis*, *C. rotunda* и *C. heliozoae* в консервативных регионах ITS2 СВС не были обнаружены. При этом для некоторых видов удалось выявить СВС в консервативных регионах: *C. vulgaris*, *C. pituita*, *L. lobophora* отличались от остальных видов группы на 1 СВС в консервативном регионе II шпильки (A–U → G–C, 3 п.н.). *C. vulgaris* имела еще 1 СВС при сравнении с *C. heliozoae* и *C. rotunda* в III шпильке (U–A → G–G, 3 п.н.). *L. lobophora* также отличалась от всех видов группы, кроме *C. heliozoae*, на 1 СВС в консервативном регионе I шпильки (U–A → C–G, 4 п.н.). У *Coronastrum ellipsoideum* и *Dictyosphaerium* sp. была отмечена 1 общая СВС в III шпильке (A–U → G–C, 24 п.н.), присущая только этой подгруппе. Кроме того, *C. ellipsoideum* имел еще одну специфическую СВС в III шпильке (A–U → G–C, 23 п.н.), которая больше не встречалась ни у одного представителя группы.

Группа II. Отличительной особенностью всех представителей группы II является формирование колоний (за исключением одиночной *Chlorella singularis*), в которых шаровидные, овальные или широко эллипсоидные клетки соединены слизистыми тяжами. Количество клеток в колонии в целом варьирует от 4 до 64. Колонии окружены слизистой оболочкой. Клетки не продуцируют щетинки. Кроме чашевидного, широко распространен блюдцевидный хлоропласт. Пиреноид окружен, как правило, 2 крахмальными скорлупками. Размножение осуществляется автоспорами, которые после разрыва материнской оболочки в большинстве случаев прикрепляются к ее концам. Представители – преимущественно свободноживущие пресноводные организмы (Bock et al., 2010, 2011a). На филогенетическом дереве группа имеет статистическую поддержку 71% и включает в себя:

– *C. pulchelloides* (3 штамма, в т.ч. аутентичный штамм ССАР 211/117). Отличается часто встречающейся яйцевидной формой клеток, в особенности молодых; прикреплением клеток к слизистым тяжам широкой стороной; горизонтальным расхождением (либо под небольшим наклоном) автоспор после разрушения материнской оболочки (Bock et al., 2011a); наличием в гене 18S рРНК трех интронов длиной 420, 436 и 431 п.н. соответственно;

– аутентичный штамм *C. chlorelloides* ССАР 211/116. К характерным признакам относятся 4-клеточные колонии, расхождение автоспор после разрушения материнской оболочки под углом 180° (Bock et al., 2011a);

– аутентичный штамм *C. colonialis* UTEX 938. Данный вид отличает следующая совокупность признаков: клетки овальные или широкоэллипсоидные, которые соединяются слизистыми тяжами; автоспоры после разрушения материнской оболочки расходятся под наклоном или горизонтально (Bock et al., 2011a); в составе гена 18S рРНК присутствует один интрон длиной 318 п.н. Типичное местообитание неизвестно;

– аутентичный штамм *C. singularis* ССАР 211/119. Диаκριтические признаки: клетки одиночные, шаровидные, в слизистой оболочке; размер взрослых клеток наибольший в группе II – 6.7–9 мкм в диаметре; после разрыва материнской оболочки автоспоры расходятся в разные стороны (Bock et al., 2011a);

– род *Hindakia*, выделенный на основании результатов молекулярно-генетического анализа, со 100%-й статистической поддержкой объединяет штаммы двух видов: *H. fallax* (2 штамма, включая аутентичный штамм ССАР 222/29) и типовой вид рода *H. tetrachotoma* (4 штамма, в т.ч. аутентичный штамм ССАР 222/80). Виды различаются формой молодых клеток: у *H. fallax* – ассиметрично копьевидная, у *H. tetrachotoma* – узкоовальная форма (Bock et al., 2010);

– сестринской подгруппой к роду *Hindakia* является род *Heynigia* (статистическая поддержка 85%). Этот род также был выделен на основании данных молекулярно-генетического анализа и включает аутентичные штаммы *H. riparia* ССАР 222/4 и *H. dictyosphaerioides* ССАР 222/2D (типовой вид рода). Отличительным признаком видов внутри рода являются размеры клеток: у *H. riparia* размер клеток составляет 5–7.5 мкм в диаметре, у *H. dictyosphaerioides* – 4.5–6 мкм (Bock et al., 2010).

Внутривидовые различия нуклеотидных последовательностей 18S–ITS1–5.8S–ITS2 в группе II составляли 0–0.3%, межвидовые – 0.4–1.5%, межродовые – 1–1.6%. Обобщая результаты изучения морфологических, экологических и молекулярно-генетических признаков, можно предположить, что виды *C. pulchelloides*, *C. chlorelloides*, *C. colonialis* и *C. singularis* не являются “истинными” хлореллами. Вероятно, это представители нового рода. Однако, исходя из величины генетических дистанций (0.9–1.5%) в сравнении с величинами внутривидовых и межродовых различий нуклеотидных последовательностей для всей клады *Chlorella* и неспособности *C. singularis* формировать колонии, мы предполагаем, что это может быть и группа близкородственных родов. Поэтому таксономическая принадлежность этих видов нуждается, на наш взгляд, в дальнейшем изучении и уточнении.

СВС-подход для разграничения видов, как и в случае с группой I, оказался неэффективен. При анализе вторичной структуры ITS2 в консервативных регионах только у штаммов *C. pulchelloides* и *C. colonialis* была обнаружена 1 СВС (U–A → C–G, 19 п.н.) в III шпильке, отличающая их от всех остальных штаммов группы. Молекулярной подписью микроводорослей рода *Hindakia* может быть более длинный пиримидин-пиримидиновый мисматч (UUU–UUU – у *H. tetrachotoma*, UUU–UCU – у *H. fallax*) во II шпильке ITS2.

Группа III морфологически весьма разнородна (статистическая поддержка – 97%) и объединяет виды как с одиночными клетками, так и колонизальные. Преимущественно не продуцируют шетинки. Хлоропласт один, пристенный, чаше- или блюдцевидный. Пиреноид один с фрагментированной крахмальной оберткой. Размножение осуществляется автоспорами. Среди представителей клады встречаются как свободноживущие, так и симбиотические организмы (Hindák, 1974; Hoshina, Fujiwara, 2013; Hoshina et al., 2017; Hoshina, Nakada, 2018):

– род *Carolibrandtia*, представленный типовым видом *C. ciliaticola* (3 штамма, в т. ч. аутентичный штамм NIES 4033), который образует с *Chlorella-ceae* sp. одну подгруппу со 100%-ной статистической поддержкой. Отличительными чертами являются субглобулярный пиреноид, потребность в

казаминовых кислотах для роста и жизнедеятельности, эндосимбиотический образ жизни в инфузориях пресноводных водоемов (Hoshina et al., 2017; Hoshina, Nakada, 2018) и наличие интрона длиной 339 п.н. в гене 18S рРНК;

– штамм *Chlorella* sp. СССryo 297-06, который является сестринской филогенетической линией рода *Carolibrandtia*, отличается свободноживущим образом жизни и отсутствием интрона в гене 18S рРНК;

– род *Didymogenes* с 97%-ной статистической поддержкой объединяет штаммы 3 видов: аутентичный штамм *D. sphaerica* NIES 2167, штамм *D. palatina* SAG 30.92 (типовой вид рода) и *D. anomala* SAG 18.91. Характерными чертами рода являются, как правило, сигмовидные клетки, соединенные в 2–16-клеточные ценобии; при бесполом размножении образуется спорангий с автоспорами, собранными в 2-х или 4-клеточные ценобии (Hindák, 1974; Hoshina, Fujiwara, 2013). *D. sphaerica* отличается от других видов рода одиночными шаровидными клетками и наличием интрона длиной 448 п.н. в гене 18S рРНК. Характерной чертой *D. palatina* является наличие интрона длиной 317 п.н. в гене 18S рРНК, *D. anomala* – отсутствие интрона в гене 18S рРНК и способность продуцировать шетинки. Представители рода *Didymogenes* являются пресноводными свободноживущими организмами, за исключением *D. sphaerica*, для которого типичное местообитание не установлено;

– аутентичный штамм *Chlorella elongata* ССАР 222/18. Отличительными являются следующие признаки: клетки овальные, образуют колонии, соединяясь слизистыми тяжами, наличие двух интронов длиной 490 и 326 п.н. в гене 18S рРНК (Bock et al., 2011). Является пресноводным свободноживущим организмом;

– некультивируемая микроводоросль *Chlorella* sp., близкородственная к *C. elongata* (статистическая поддержка 97%), отличается обитанием в соленой воде и отсутствием интронов в гене 18S рРНК;

Внутривидовые генетические различия в группе III не превышали 0.1%, межвидовые варьировали в диапазоне от 0.5 до 0.8%, межродовые – в пределах 0.9–1.4%. При этом, исходя из результатов филогенетического анализа и величины внутривидовых и межродовых генетических дистанций для всей клады *Chlorella*, штамм *Chlorella* sp. СССryo 297-06 может рассматриваться как потенциально новый самостоятельный вид р. *Carolibrandtia*, а *Chlorella elongata* и *Chlorella* sp. (МК764913; МК764922) – как виды, относящиеся к одному роду.

СВС-подход для разграничения видов и родов в данном случае оказался неприменим, поскольку при анализе вторичной структуры ITS2 СВС в консервативных регионах обнаружено не было.

Группа IV состоит из монотипного рода *Meyerella* и включает в себя 2 штамма типового вида *Meyerella planktonica*, в т.ч. аутентичный штамм ССМР 2446. Отличительными признаками рода являются цилиндрическая или шаровидная форма зрелых клеток; пластинчатый хлоропласт в молодых клетках, корытообразный в зрелых; отсутствие пиреноида; угловато-эллипсоидальные автоспоры, которые затем превращаются в короткий цилиндр с закругленными концами (Fawley et al., 2005).

Внутривидовые различия в нуклеотидных последовательностях отсутствовали, межродовые различия с остальными группами клады *Chlorella* составляли 1.5–2.6%.

Анализ вторичной структуры ITS2 не выявил каких-либо различий в консервативных регионах в пределах группы IV.

Группа V с 78%-ной статистической поддержкой объединяет микроводоросли с одиночными, преимущественно шаровидными клетками без слизи и щетинок. Кроме чашевидного, широко распространен блюдцевидный или поясковидный хлоропласт. Крахмальная обертка в большинстве случаев фрагментирована на 2–4 скорлупки. Размножение осуществляется автоспорами. Все представители клады являются свободноживущими организмами, обитающими, преимущественно, в пресноводных водоемах, реже почве или наземно-воздушной среде (Shihira, Krauss, 1965; Bock et al., 2011):

– *C. sorokiniana* (аутентичный штамм SAG 211-8k и неаутентичные штаммы NIES 2173, CCALA 260, KLL-G018). Отличительной чертой является преимущественно эллипсоидальная форма клеток, которая при повышенном содержании глюкозы в среде становится шаровидной (Shihira, Krauss, 1965);

– аутентичный штамм *C. lewinii* ССАР 211/90. Характерные признаки – наличие клеток яйцевидной формы и почвенная среда обитания (Bock et al., 2011);

– отдельную подгруппу со статистической поддержкой 100% образуют неаутентичный штамм *C. sorokiniana* UTEX 2714, который на сайте коллекции обозначен как *C. vulgaris*, и штаммы *Chlorella* sp. ZJ0203, ZJ0204, IFRD 1014, ZJ0205. Данная подгруппа не имеет характерных морфологических признаков и отличается от остальных видов независимым филогенетическим положением;

– самостоятельную филогенетическую линию образует штамм *Chlorella* sp. IFRPD 1018, который со статистической поддержкой 100% кластеризуется с группой, включающей штаммы *C. sorokiniana* и *C. lewinii*. Штамм *Chlorella* sp. ССАР 211/86 примыкает к их кластеру (статистическая поддержка 70%). Штаммы нуждаются в дополнительном изучении и валидации;

– аутентичный штамм *C. thermophila* HTA1-65, диакритическими признаками которого являются двуслойная гладкая клеточная стенка, наимень-

ший в группе IV размер клеток (1.5–2.5 мкм в диаметре), наличие в цитоплазме клеток липидных капель, термотолерантность (выдерживает температуру до 45°C), наземно-воздушное распространение и свободноживущий образ жизни (изолирован с обрастаний крыш) (Ma et al., 2015);

– сестринскую филогенетическую линию с *C. thermophila* образует *Chlorella* sp. IPPAS C1210 (статистическая поддержка 100%). Отличительные признаки: наличие интрона длиной 440 п.н. в составе гена 18S рРНК и свободноживущий образ жизни в пресной воде;

– аутентичный штамм ССАР 211/120 *C. volutis*, характеризующийся исключительно шаровидной формой клеток и их размером (5–6.5 мкм в диаметре), который является наибольшим в группе IV (Bock et al., 2011).

Различия внутри кластеров, которые можно рассматривать как потенциальные виды, нуждающиеся в дополнительном изучении и валидации (1-ый вид – *C. sorokiniana* KLL-G018, CCALA 260, NIES-2173 и аутентичный штамм SAG 211-8K; 2-ой вид – *C. sorokiniana* ZJU0203, ZJU0204, IFRPD 1014, ZJU0205, UTEX 2714), составляли 0–0.3%. Межвидовые различия, с учетом выделения вышеуказанных потенциально новых видов, варьировали в пределах от 0.5–2.4%. Обобщая итоги изучения морфологических, физиологических, экологических и молекулярно-генетических характеристик представителей группы V, можно сказать, что, во-первых, согласно филогенетическому анализу все представители данной группы “истинными” хлореллами не являются. Во-вторых, вероятно, данная группа содержит несколько новых родов. Можно предположить, что в один род входят *C. sorokiniana* KLL-G018, CCALA 260, NIES-2173 и аутентичный штамм SAG 211-8K; 2-ой вид – *C. sorokiniana* (ZJU0203, ZJU0204, IFRPD 1014, ZJU0205, UTEX 2714); *C. lewinii* (генетические дистанции в данной подгруппе $\leq 0.7\%$). *C. thermophila*, *Chlorella* sp. IPPAS C1210, *C. volutis* могут быть как видами одного рода, так и представителями близких родов, т.к. генетическая дистанция между ними составляет 1.9–2.0%. Для выдвижения более или менее обоснованных предположений о таксономическом статусе штаммов *Chlorella* sp. IFRPD 1018 и *Chlorella* sp. ССАР 211/86 информации пока не достаточно.

СВС-подход, как и в предыдущих группах, оказался неэффективен. При анализе вторичной структуры ITS2 СВС были обнаружены лишь у *C. thermophila*: 1 СВС (U–A → C–G, 3 п.н.) в консервативном регионе I шпильки и 2 СВС (A–U → G–C, 7 п.н.; G–C → A–U, 2 п.н.) в III шпильке, а также у *Chlorella* sp. IPPAS C-1210: 2 СВС (A–U → G–C, 7 п.н.; G–C → A–U, 2 п.н.) в III шпильке.

Группа VI объединяет представителей рода *Microactinium* со статистической поддержкой 91%

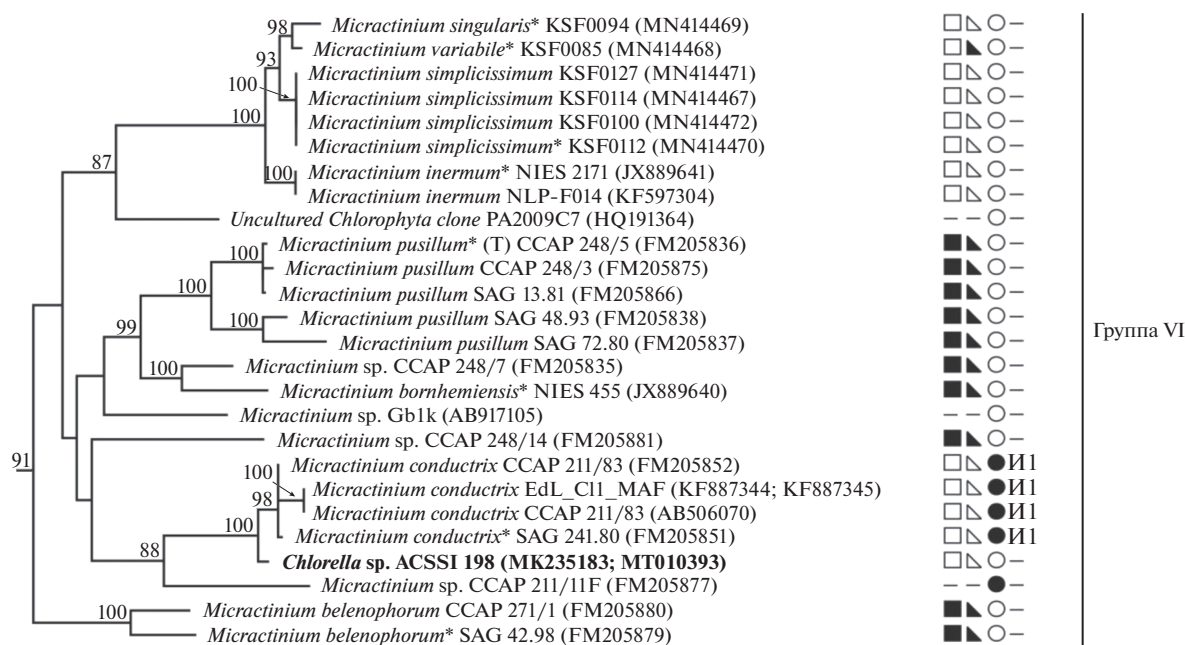


Рис. 2. Фрагмент укорененного филогенетического дерева зеленых водорослей клады *Chlorella* (группа VI), построенного методом максимального правдоподобия (ML), на основе последовательностей генов 18S и 5.8S рРНК и спейсеров ITS1 и ITS2 (2611 п.н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны бутстреп-значения ML; значения <70% не показаны. Модель нуклеотидных замен: GTR + I + G. Обозначения: жирным шрифтом выделен штамм ACSSI 198; * – аутентичные штаммы; (Т) – типовой вид. ■ – образует колонии; □ – одиночные клетки; ▽ – не продуцирует щетинки; ▲ – продуцирует щетинки; ○ – свободноживущий организм; ● – эндосимбиотический организм; I – наличие интронов, рядом указано количество интронов; “–” – нет интрона.

(рис. 2). Морфологически клада разнородна. Ранее главным фенотипическим признаком рода считалась способность формировать щетинки (Komárek, Fott, 1983). Однако на сегодняшний день известны виды, которые щетинки не продуцируют даже в условиях “пастбищной нагрузки” со стороны альгофагов (Luo et al., 2006). Клетки шаровидные или овальные, одиночные или собранные в колонии. Хлоропласт, как правило, пристенный, чаше- или блюдцевидный. Пиреноид один с крахмальной оберткой из 2–4 скорлупок. Размножение у большинства видов происходит 2–8 автоспорами. Среди представителей данной группы преобладают свободноживущие пресноводные организмы, однако встречаются и эндосимбионты. В состав группы входят:

– со 100%-статистической поддержкой отдельную подгруппу образуют аутентичный штамм *M. singularis* KSF0094, аутентичный штамм *M. variable* KSF0085, 4 штамма *Micractinium simplicissimum*, в т.ч. аутентичный штамм KSF0112, 2 штамма *M. inermum* (аутентичный штамм NIES 2171). Данная подгруппа объединяет виды с одиночными клетками, шаровидными или овальными, преимущественно без слизи. Из всех представителей подгруппы только *M. variable* способен продуцировать щетинки в условиях “пастбищной” нагрузки. Наряду с чашевидным, распространен

поясковидный хлоропласт. Виды выделены на основании данных молекулярно-генетического анализа (Hoshina, Fujiwara, 2013; Chae et al., 2019);

– сестринскую филогенетическую линию к вышеописанной подгруппе образует некультивируемая зеленая микроводоросль *Chlorophyta clone* PA2009C7 (статистическая поддержка 85%). Пресноводный свободноживущий организм;

– *M. pusillum* (5 штаммов, в т.ч. аутентичный штамм CCAP 248/5) – типовой вид рода *Micractinium*. Диаκριтические признаки: формирование полиэдрических и тетраэдрических колоний; способность клеток под давлением альгофагов продуцировать щетинки, половое размножение (оогамия) (Komárek, Fott, 1983; Luo et al., 2006);

– аутентичный штамм *M. bornhemiensis* NIES 455 и неаутентичный штамм *M. pusillum* CCAP 248/3 формируют общую подгруппу со статистической поддержкой 100%. Отличительными чертами являются способность клеток формировать правильные пирамидальные ценобии и продуцировать щетинки, автоспоры по 4 (Komárek, Fott, 1983);

– отдельную филогенетическую линию образует штамм *Micractinium sp.* GB1k, который близкородственен *M. pusillum*, *M. bornhemiensis*, *Micractinium sp.* CCAP 248/7 (статистическая поддержка 71%). Пресноводный свободноживущий организм;

– *M. belenophorum* (2 штамма, в т.ч. аутентичный штамм SAG 42.98). Морфологические особенности данного вида: одиночные, овальные клетки с длинными щетинками на концах, которые размещены по одной прямой линии, и пластинчатый хлоропласт (Pröschold et al., 2010);

– *Micractinium* sp. ССАР 248/14 образует отдельную филогенетическую линию в кладе VI. Свободноживущий пресноводный организм;

– *M. conductrix* (4 штамма, включая аутентичный штамм SAG 241.80). Характерные черты: одиночные шаровидные клетки, которые не продуцируют щетинки даже при “пастбищной” нагрузке; размер 4–12 мкм в диаметре, хлоропласт может быть блюдцевидным и мантиевидным, пиреноид с крахмальной оберткой из 2–4 скорлупок; для роста и нормального обеспечения процессов жизнедеятельности необходимы витамины В₁ и В₁₂ (Pröschold et al., 2011). Единственный в группе облигатный эндосимбионт с интроном в гене 18S рРНК длиной 323 п.н.;

– выделенный нами штамм *Chlorella* sp. АСССИ 198 со 100%-ной статистической поддержкой образует группу с *M. conductrix*, морфологически с ним близок формой клеток и отсутствием щетинок. Отличительными признаками являются меньшие размеры клеток (2.9–4.7 мкм в диаметре), форма хлоропласта только чашевидная, пиреноид со сплошной крахмальной оберткой, при культивировании не испытывает потребности в витаминах группы В, а также является свободноживущим пресноводным организмом. Кроме того, в составе гена 18S рРНК отсутствует интрон;

– штамм *Micractinium* sp. ССАР 211/11F является сестринской филогенетической линией вида *M. conductrix* и отличается от последнего образом жизни (симбионт в лишайнике) и отсутствием интрона в гене 18S рРНК;

Внутривидовые различия нуклеотидных последовательностей 18S–ITS1–5.8S–ITS2 у представителей группы VI варьировали в пределах от 0 до 0.9%, межвидовые – 0.4–1.9%. Отметим, что уровень генетических различий внутри вида *M. pusillum* (1 группа – штаммы ССАР 248/3, SAG 13.81 и аутентичный штамм ССАР 248/5; 2 группа – штаммы SAG 48.93 и 72.98) составлял 0.9%, что в других группах (II, III) соответствовало различиям межвидового уровня. Это позволяет предположить, что, возможно, *M. pusillum* включает в себя 2 вида.

При сравнении вторичной структуры ITS2 между видами группы VI было выявлено, что виды *M. singularis*, *M. variabile*, *M. simplicissimum*, *M. inermum* отличаются от всех других представителей группы I СВС в III шпильке (A–U → C–G, 23 п.н.). Еще 1 характерная СВС для *Micractinium simplicissimum*, отличающая данный вид от всех, кроме *M. singularis*, *M. variabile*, *Micractinium* sp.

ССАР 248/14, находится в консервативном регионе II шпильки (A–U → G–C, 3 п.н.). *M. simplicissimum* и *M. inermum* различаются на 1 СВС в III шпильке (G–C → A–U, 18 п.н.). Штаммы *M. pusillum* ССАР 248/5, ССАР 248/3, SAG 13.81 по сравнению с остальными представителями рода имеют 1 СВС в консервативном регионе I шпильки (A–U → G–C, 3 п.н.), штаммы *M. pusillum* SAG 48.93 и 72.98 – 1 СВС в консервативном регионе II шпильки (U–A → C–G, 9 п.н.). 2 СВС были обнаружены у штамма *Micractinium* sp. ССАР 246/14 в консервативных регионах II (U–A → C–G, 5 п.н.) и III шпилек (A–U → G–C, 3 п.н.). При этом между целым рядом видов СВС не были обнаружены. Например, между *M. singularis*, *M. variabile*, *M. simplicissimum* не было обнаружено СВС в консервативных регионах вторичной структуры ITS2. Также не было СВС между *M. inermum*, *M. singularis* и *M. variabile*; между *M. conductrix*, *M. belenophorum*, *M. bornhemiensis*, *Chlorella* sp. АСССИ 198 (вторичная структура ITS2 представлена на рис. S2), *Micractinium* sp. ССАР 211/11F.

Таким образом, в группе VI СВС-подход оказался частично пригоден для разделения некоторых видов рода *Micractinium*. Наряду с этим были обнаружены СВС в консервативных регионах между штаммами одного вида (*M. pusillum*), что подтверждает наше предположение о необходимости его разделения на 2 вида.

Клада VII объединяет представителей рода *Actinastrum* и состоит из 2 штаммов вида *Actinastrum hantzschii* (ССАР 200/1, SAG 2015), который является типом рода. Представители данной группы характеризуются вытянутой формой клеток, способны формировать трехмерные, звездообразные колонии. Клетки имеют радиально симметричное расположение и связаны друг с другом на проксимальных полюсах. В культурах колонии распадаются, и клетки становятся короче. Хлоропласт пристенный, с одним, не всегда отчетливым пиреноидом. Размножение автоспорами. Представители – преимущественно обитатели пресноводных водоемов (Luo et al., 2010). Штаммы в группе различаются длиной интрона в гене 18S рРНК: у штамма ССАР 200/1 – 599 п.н., у штамма SAG 2015 – 353 п.н.

Внутривидовая генетическая дистанция между штаммами составила 0.2%. Межродовая дистанция с другими членами клады *Chlorella* варьировала в диапазоне от 0.9 до 2.8%. СВС в консервативных регионах вторичной структуры ITS2 найдено не было.

Клада VIII объединяет представителей рода *Hegewaldia* и включает в себя 2 штамма типового вида *Hegewaldia parvula*, в т.ч. аутентичный штамм ССАР 283/2, *Hegewaldia* sp. ССАР 283/3 и *M. pusillum* SAG 7.93. Однако в последнем случае, вероятно, имело место неверное таксономическое определе-

ние штамма. Данный род характеризуется сочетанием следующих признаков: клетки одиночные, шаровидные, со щетинками или без них; размножение осуществляется как бесполом путем (автоспорами), так и половым — оогамией (Pröschold et al., 2011).

Внутригрупповые различия в нуклеотидных последовательностях варьировали в диапазоне 0–2.2%, межродовые различия с другими представителями клады *Chlorella* — 1.5–4.1%.

При сравнительном анализе вторичной структуры ITS2 было выявлено наличие одной СВС (U–A → C–G, 3 п.н.) в III шпильке штамма *Hegewaldia* sp. ССАР 283/3, по сравнению со штаммами *H. parvula*.

В целом, отметим, что СВС-критерий работает только в одном направлении, т.е. отсутствие СВС во вторичной структуре ITS2 не свидетельствует, что 2 организма принадлежат одному виду (Coleman, 2009). На основе мета-анализа большого числа данных Müller et al. (2007) установили, что наличие даже 1 СВС в 93% исследованных случаев, по крайней мере, для растений и грибов, указывает на их принадлежность к разным видам. Этими же авторами показано, что отсутствие СВС между 2 таксонами свидетельствует, что только в 77% случаев они принадлежат одному виду. Так как наличие/отсутствие СВС во вторичной структуре ITS2 сильно коррелирует с биологическими видами, авторы предложили использовать этот критерий как молекулярный индикатор для разделения минимального количества отдельных видов в метагеномных анализах. СВС-критерий может быть успешно использован для разграничения видов зеленых водорослей, размножающихся как половым, так и бесполом путем. Так как компенсаторная замена в консервативных регионах ITS2 — редкое эволюционное событие (Coleman, 2003), то наличие СВС является скорее мерой истекшего эволюционного времени, показывающее, что прошло достаточно времени для события видообразования, а не его необходимым условием. Ожидаемое количество СВС зависит от степени дивергенции, длины последовательности и скорости замен на участок.

Анализ генетических дистанций между различными представителями клады *Chlorella* позволил выявить четкие границы для разграничения видов и родов только у части таксонов (так внутри родов *Didymogenes*, *Hindakia*, *Heynigia* генетические дистанции между видами варьировали 0.4 до 0.8%). С другой стороны, уровень различий в исследуемом фрагменте между родами *Didymogenes* и *Carolibrandtia* изменялся в диапазоне 0.9–1.4%, между родами *Hindakia* и *Heynigia* 1.0–1.3%, тогда как генетическая дистанция между видами рода *Hegewaldia* составляла 2.2%. Подобные примеры не позволяют выделить общие и однозначные

межвидовые и межродовые генетические пороги для всех представителей клады *Chlorella*.

Поиск эффективного универсального инструмента для выявления скрытого биоразнообразия микроводорослей клады *Chlorella* продолжается. Так, Zou et al. (2016) была предпринята попытка идентификации представителей родов *Chlorella*, *Chloroidium*, *Dictyosphaerium* и *Actinastrum* с помощью 4-х молекулярных маркеров (*rbcL*, ITS, *tufA* и 16S рРНК) и различных методов делиминации видов (GMYC, PTP, P ID, ABGD и символьный подход). В результате исследования был сделан вывод, что ген *tufA* может рассматриваться как потенциально пригодный “штрих-код” для микроводорослей клады *Chlorella*. При этом было отмечено, что ДНК-баркодинг не всегда позволяет проводить идентификацию неизвестных образцов на уровне видов. Авторы подчеркнули, что для ДНК-баркодинга необходима большая выборка таксонов, чтобы обеспечить наличие заметного разрыва штрих-кода между межвидовой дивергенцией и внутривидовой изменчивостью, а также для подтверждения существования диагностических молекулярных признаков. Следовательно, несмотря на перспективность применения алгоритмов делиминации видов, они требуют как собственного дальнейшего развития, так и описания большего количества таксонов исследуемой группы организмов.

В данной работе на основе филогенетического анализа была подтверждена полифилетичность рода *Chlorella*. Мы предполагаем, что истинными представителями данного рода могут считаться виды группы I, которые кластеризуются с типовым видом рода — *C. vulgaris*, а именно: *C. pituita*, *C. variabilis*, *L. lobophora*, *C. rotunda* и *C. heliozoae*. Причем далеко не все виды этой группы описаны. Так, *Dictyosphaerium* sp. и *Coronastrum ellipsoideum* UTEX LB1382, вероятно, являются новыми, пока неидентифицированными представителями рода *Chlorella*. Остальные виды рода, определенные как *Chlorella*, но вошедшие в состав групп II–V, по-видимому, “истинными” хлореллами не являются, и их таксономическая принадлежность нуждается в дальнейшем изучении и уточнении.

Определенные расхождения с топологиями филогенетических деревьев ревизий (Luo et al., 2010; Pröschold et al., 2010; Bock et al., 2011a, 2013), в т.ч. кластеризация всех видов рода *Chlorella* в одну группу с невысокими статистическими поддержками, было связано с большим количеством проанализированных последовательностей в нашей работе. Так, в изученную выборку вошли представители родов *Carolibrandtia* и *Hegewaldia*, расширен видовой состав родов *Didymogenes*, *Micractinium*, *Chlorella*, а также добавлены новые штаммы уже имеющихся видов, и штаммы, видовой принадлежности которых пока не установлена.

Расширение выборки штаммов для филогенетического анализа позволило выделить группы клады *Chlorella* с высокими статистическими поддержками. При этом кластеры видов, которые в прошлых ревизиях имели высокую статистическую поддержку ($\geq 70\%$), повторяются и в полученном дереве. Например, кластеризация *C. vulgaris* + *C. pituita*, *C. pulchelloides* + *C. chlorelloides*, *C. rotunda* + *C. heliozoae*, *C. lewinii* + *C. sorokiniana*. Отмечаются существенные расхождения в топологии дерева Heeg, Wolf (2015), как с деревом в работе Bock et al. (2011a, 2013), так с деревом в нашем исследовании. Это связано, во-первых, с тем, что в своей работе Heeg и Wolf используют только ген 18S рРНК и спейсер ITS2, а во-вторых, с составом и размером выборки. При построении филогенетического дерева 18S + ITS2 Heeg и Wolf используют 60 нуклеотидных последовательностей, 34 из которых относятся к кладе *Chlorella*. Кроме того, в анализе использованы неаутентичные штаммы *Micractinium inermum* NLP-F014 (KF597304), *C. pulchelloides* CCAP 211/17 (HQ111430), *C. pituita* ACOI 856 (FM205856), *Crucigenia lauterbornia* UTEX 1755 (JQ356710), *H. tetrachotoma* CCAP 222/54 (GQ487238), *H. tetrachotoma* CCAP 222/82 (GQ487232), *Coronastrum ellipsoideum* UTEX LB 1382 (GQ507370), тогда как аутентичные штаммы данных видов отсутствуют. В отличие от нашей работы не представлены роды *Carolibrandtia*, *Meyerella*, отсутствует ряд видов *Chlorella thermophila*, *Micractinium simplicissimum*, *M. variabile*, *M. singularis*, *M. bornhemiensis*, а также ряд идентифицированных до рода таксонов, иллюстрирующих, на наш взгляд, криптическое разнообразие клады *Chlorella*. Различия в топологии филогенетических деревьев Ma et al. (2015) (объем выборки — 32 штамма), Darienko et al. (2019) (объем выборки 69 штаммов, из них к *Chlorella*-кладе относились 9 штаммов), Chae et al. (2019) (объем выборки 45 штаммов, из них к *Chlorella*-кладе относились 39 штаммов) объясняется меньшим объемом выборки, отсутствием представителей ряда видов и родов, а также, в отдельных случаях, невключением аутентичных штаммов (*Chlorella pituita* ACOI 856, *C. pulchelloides* SAG 222-2a, *Micractinium pusillum* CCAP 248/1 в работе Ma et al.).

Таким образом, для членов клады *Chlorella* характерно высокое криптическое разнообразие: ни одна из рассмотренных фенотипических характеристик по отдельности не позволяет однозначно определить таксономическую принадлежность водорослей клады. Кроме того, многие описанные морфологические признаки (слизь, соединительные тяжи, формирование колоний, щетинкообразование) представляют собой адаптивную реакцию на воздействие окружающей среды и чрезвычайно вариабельны. Особенно важно, что для осуществления мониторинговых наблюдений в результате методических манипуляций при про-

боподготовке (фильтрация вакуумным насосом, фиксация формалином) данные признаки часто изменяются или полностью утрачиваются.

Молекулярно-филогенетический анализ членов клады *Chlorella* показал, что использование одного гена 18S рРНК, который считается главным филогенетическим маркером для зеленых микроводорослей, не позволяет надежно разграничить виды и роды внутри клады. Использование дополнительных, более изменчивых спейсеров ITS1 и ITS2, разрешило топологию дерева и усилило филогенетический сигнал. СВС-подход и поиск компенсаторных замен в консервативных регионах ITS2 как инструмент для разграничения видов не был эффективен. Была подтверждена результативность использования интрона в качестве критерия разделения близкородственных видов. Анализ генетических дистанций позволил однозначно разделить штаммы на виды только внутри родов *Didymogenes*, *Hindakia*, *Heyningia*. Таким образом, поиск эффективного универсального инструмента для выявления скрытого биоразнообразия микроводорослей клады *Chlorella* продолжается. Благодаря использованию комбинаций морфологических, биохимических, ультраструктурных, физиологических, экологических и молекулярно-гетеротических признаков (полифазный подход), нам удалось охарактеризовать восемь групп внутри клады *Chlorella* и выдвинуть предположения о разделении родов и видов внутри выделенных групп.

БЛАГОДАРНОСТИ

Особую благодарность авторы выражают руководителю коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS ИФР РАН к. б. н. М.А. Синетовой за предоставление штамма *Chlorella* sp. IPPAS C1210.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-60002 и частично в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № АААА-А18-118013190177-9).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Корнева Л.Г. Фитопланктон водохранилищ бассейна Волги / Под ред. Копылова А.И. Кострома: Костромской печатный дом, 2015. 284 с.
- Кривина Е.С. Трансформация фитопланктона малых водоемов урбанизированных территорий в условиях изменения антропогенной нагрузки. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 16.11.2018. Тольятти: ИЭВБ РАН, 2018. 19 с.
- Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов / Под ред. Мордухай-Болтовского Ф.Д. М.: Наука, 1975. 240 с.
- Bock C., Krienitz L., Pröschold T. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species // *Fottea*. 2011a. V. 11. P. 293–312.
- Bock C., Pažoutová M., Krienitz L. Phylogenetic position of *Coronastrum ellipsoideum* and description of *Parachlorella hussii* sp. nov. // *Biologia*. 2011b. V. 66. P. 585–594.
- Bock C., Proschold T., Krienitz L. Two new *Dictyosphaerium*-morphotype lineages of the *Chlorellaceae* (Trebouxiophyceae): *Heynigia* gen. nov. and *Hindakia* gen. nov. // *Eur. J. Phycol.* 2010. V. 45. P. 267–277.
- Caisová L., Marín B., Melkonian M. A consensus secondary structure of ITS2 in the *Chlorophyta* identified by phylogenetic reconstruction // *Protist*. 2013. V. 164. P. 482–496.
- Coleman A.W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons // *Trends Genet.* 2003. V. 19. Iss. 7. P. 370–375.
- Coleman A.W. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2009. V. 50. P. 197–203.
- Coleman A.W. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence // *Protist*. 2000. V. 151. P. 1–9.
- Chae H., Lim S., Kim H., Choi H.-G., Kim J.H. Morphology and phylogenetic relationships of *Micractinium* (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*) taxa, including three new species from Antarctica // *Algae*. 2019. V. 34. P. 267–275.
- Darienko T., Rad-Menéndez C., Campbell C., Pröschold T. Are there any true marine *Chlorella* species? Molecular phylogenetic assessment and ecology of marine *Chlorella*-like organisms, including a description of *Droopiella* gen. nov. // *Syst. Biodivers.* 2019. V. 17. P. 811–829.
- Ettl H., Gärtner G. Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtalgen. Stuttgart: Gustav Fischer, 1995. 721 p.
- Fawley M.W., Dean M.L., Dimmer S.K., Fawley K.P. Evaluating the morphospecies concept in the *Selenastraceae* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) // *J. Phycol.* 2006. V. 42. P. 142–154.
- Guiry M.D., Guiry G.M. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 2020. <http://www.algaebase.org>.
- Hindák F. The chlorococcal algal genus *Didymogenes* Schmidle 1905 // *Biologia*. 1974. V. 29. P. 559–570.
- Hoshina R., Fujiwara Y. Molecular characterization of *Chlorella* cultures of the National Institute for Environment Studies culture collection with description of *Micractinium inermum* sp. nov., *Didymogenes sphaerica* sp. nov. and *Didymogenes soliella* sp. nov. (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*) // *Phycol. Res.* 2013. V. 61. P. 124–132.
- Hoshina R., Iwataki M., Imamura N. *Chlorella variabilis* and *Micractinium reisseri* sp. nov. (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*): Redescription of the endosymbiotic green algae of *Paramecium bursaria* (*Peniculia*, *Oligohymenophorea*) in the 120th year // *Phycol. Res.* 2010. V. 58. P. 188–210.
- Hoshina R., Kobayashi M., Suzuki T., Kusuoka Y. *Brandtia ciliaticola* gen. et sp. nov. (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*) a common symbiotic green coccoid of various ciliate species // *Phycol. Res.* 2017. V. 66. P. 76–81.
- Hoshina R., Nakada T. *Carolibrandtia* nom. nov. as a replacement name for *Brandtia* Hoshina (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*) // *Phycol. Res.* 2018. V. 66. P. 82–83.
- Katana A., Kwiatowski J., Spalik K., Zakryś B., Szalacha E., Szymańska H. Phylogenetic position of *Koliella* (*Chlorophyta*) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA // *J. Phycol.* 2001. V. 37. P. 443–451.
- Komárek J., Fott B. *Chlorophyceae* (Grünalgen). Ordnung *Chlorococcales* // *Die Binnengewässer*. Bd 16, Tl 7. H. 1. Stuttgart, 1983. 1044 p.
- Krienitz L., Hegewald E.H., Hepperle D., Huss V.A.R., Rohr T., Wolf M. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*) // *Phycologia*. 2004. V. 43. P. 529–542.
- Luo W., Pflugmacher S., Pröschold T., Walz N., Krienitz L. Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*) // *Protist*. 2006. V. 157. P. 315–333.
- Luo W., Pröschold T., Bock C., Krienitz L. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*) // *Plant Biol.* 2010. V. 12. P. 545–553.
- Ma S., Han B., Huss V.A.R., Hu X., Sun X., Zhang J. *Chlorella thermophyla* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*), a novel thermo-tolerant *Chlorella* species isolated from an occupied rooftop incubator // *Hydrobiologia*. 2015. V. 760. P. 81–89.
- Müller T., Philippi N., Dandekar T., Schultz J., Wolf M. Distinguishing species // *RNA*. 2007. V. 13. P. 1469–1472.
- Pröschold T., Bock C., Luo W., Krienitz L. Polyphyletic distribution of bristle formation in *Chlorellaceae*: *Micractinium*, *Diacanthos*, *Didymogenes* and *Hegewaldia* gen. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) // *Phycol. Res.* 2010. V. 58. P. 1–8.
- Pröschold T., Darienko T., Silva P. C., Reisser W., Krienitz L. The systematics of “*Zoochlorella*” revisited employing an integrative approach // *Environ. Microbiol.* 2011. V. 13. P. 350–364.
- Shihira I., Krauss R.W. *Chlorella*. Physiology and Taxonomy of Forty-One Isolates. Maryland: University of Maryland, College Park, 1965. P. 97.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* / Eds. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. San Diego: Acad. Press, 1990. V. 3. P. 315–322.
- Wolf M., Krienitz L., Hepperle D. Phylogenetic position of *Actinastrum hantzschii* Lagerheim (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*) // *Algol. Stud.* 2002. V. 104. P. 59–67.
- Yamamoto M., Kurihara I., Kawano S. Late type of daughter cell wall synthesis in one of the *Chlorellaceae*, *Parachlorella kessleri* (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*) // *Planta*. 2005. V. 221. P. 766–775.
- Zou S., Fei C., Song J., Bao Y., He M., Wang C. Combining and comparing coalescent, distance and character-based approaches for barcoding microalgae: a test with *Chlorella*-like species (*Chlorophyta*) // *PLoS One*. 2016. V. 11. P. 1–24. e0153833.

Identification Problems and Cryptic Diversity of *Chlorella*-Clade Microalgae (*Chlorophyta*)

E. S. Krivina¹, * and A. D. Temraleeva¹

¹*Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences—Separate Subdivision PSCBR RAS, Pushchino, 142290 Russia*

**e-mail: pepelisa@yandex.ru*

Received February 20, 2020; revised May 25, 2020; accepted June 3, 2020

The article considers the system of the *Chlorella*-clade basing on morphological, ecological and molecular genetic data. Diagnostic characteristics of some genera and species are discussed, as well as the systematic position of some taxa. Molecular phylogenetic analysis of members of the *Chlorella*-clade showed that the use of only the 18S rRNA gene, which is considered the main phylogenetic marker for green microalgae, does not reliably distinguish species and genera within the clade. Application of more variable spacers ITS1 and ITS2 resolved the tree topology and strengthened the phylogenetic signal. The polyphyletic nature of the genus *Chlorella* was confirmed. Some of the species of the genus *Chlorella* formed a true clade of *Chlorella* species, including the type species *C. vulgaris*, *C. heliozoae*, *C. chlorelloides*, *C. rotunda*, *C. variabilis*, and *Lobosphaeropsis lobophora*. Other species (*C. pulchelloides*, *C. colonials*, *C. rotunda*, *C. singularis*, *C. elongata*, *C. sorokiniana*, *C. lewinii*, *C. volutis*, and *C. thermophila*) were found to belong to other groups, and their taxonomic affiliation requires clarification. The CBC approach and the search for compensatory replacements in conservative ITS2 regions as a tool for distinguishing species was not effective for most *Chlorella*-clade representatives. Efficiency of using the intron as a criterion for separating closely related species was confirmed. Analysis of genetic distances made it possible to clearly identify the strains as species of the genera *Didymogenes*, *Hindakia*, and *Heynigia*. Members of the *Chlorella*-clade are characterized by a high cryptic diversity: none of the phenotypic characteristics considered separately was sufficient for unequivocal determination of the taxonomic position of members of the clade. Some morphological features were variable, often changed or became lost after instrumental manipulations during sample preparation for the water bodies monitoring. Using a combination of morphological, biochemical, ultrastructural, physiological, ecological, and molecular genetic features (a polyphase approach), we were able to characterize eight groups within the *Chlorella*-clade and to make assumptions about the division of the genera and species within these groups.

Keywords: microalgae, morphology, ecology, phylogeny, 18S–ITS1–5.8S–ITS2 fragments, polyphase approach