
**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ**

**ДЕЛИМИТАЦИЯ ВИДОВ И АНАЛИЗ КРИПТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ КЛАДЫ *PARACHLORELLA* (*CHLOROPHYTA*)¹**

 © 2021 г. Е. С. Кривина^{а, *}, А. Д. Темралеева^а, Ю. С. Букин^б
^аФИЦ “Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушино, 142290 Россия

^бЛимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664003 Россия

*e-mail: pepelisa@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.01.2021 г.

После доработки 17.03.2021 г.

Принята к публикации 22.03.2021 г.

В статье рассматривается система зеленых микроводорослей клады *Parachlorella*, построенная на основании морфологических, экологических и молекулярно-генетических данных. Обсуждаются диагностические признаки выделенных родов и видов, а также систематическое положение некоторых таксонов. Молекулярно-филогенетический анализ клады *Parachlorella* показал, что, несмотря на относительную простоту морфологии, для нее характерно высокое криптическое разнообразие. Показана полифилетичность рода *Dictyosphaerium*, а также ряда видов: *D. libertatis*, *D. ehrenbergianum*, *Compactochlorella kochii*, *Mucidosphaerium pulchellum*, *M. palustre*, *Closteriopsis acicularis*. Использование интрона в качестве критерия разделения близкородственных видов эффективно для представителей групп II, IV, VII, VIII, а также для штаммов видов *Compactochlorella kochii* и *D. libertatis*. Применение классического СВС-подхода, основанного на поиске СВС в консервативных регионах ITS2, было успешным только для группы II. Результаты анализа генетических дистанций и алгоритмов делимитации видов GMYC, PTP, ABGD не являются универсальными инструментами для обнаружения видовых границ и нуждаются в подтверждении другими признаками, такими как форма клеток, способность формировать колонии, способ крепления клеток к гиалиновым тяжам, тип хлоропласта, количество пиреноидов, присутствие слизи, наличие интронов, уровень генетических различий, наличие СВС в ITS1 и ITS2, среда обитания. Благодаря совместному использованию морфологических, экологических и генетических характеристик, удалось охарактеризовать II групп и 2 филогенетические линии в рамках клады *Parachlorella* и выдвинуть предположения о разделении родов и видов внутри выделенных групп.

Ключевые слова: микроводоросли, морфология, экология, филогения, фрагмент 18S–ITS1–5.8S–ITS2, разграничение видов

DOI: 10.31857/S002636562104011X

Клада *Parachlorella*, сестринская кладе *Chlorella*, была выделена Krienitz и соавт. в 2004 г., когда, исходя из различий в нуклеотидных последовательностях гена 18S рРНК и внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2, *C. kessleri* была перенесена в отдельный род *Parachlorella*. Впоследствии это разделение было подтверждено Yamamoto и соавт. (2005) на основании биохимических и ультраструктурных исследований синтеза клеточных стенок автоспор. Кроме микроводорослей с одиночными шаровидными и овальными клетками к *Parachlorella*-кладе также принадлежат организмы с удлинёнными или игловидными клетками — *Diclostera* и *Closteriopsis*, а также колониальные роды, традиционно определяемые как *Dictyosphaerium*

Nägeli (Krienitz et al., 2004; Luo et al., 2010; Bock et al., 2010; Krienitz et al., 2010; Škaloud et al., 2014; Song et al., 2018b). В настоящее время в составе клады *Parachlorella* описано 12 родов: *Closteriopsis* (Lemmertmann, 1899), *Compactochlorella* (Krienitz et al., 2012), *Coronacoccus* (Song et al., 2018b), *Diclostera* (Jao, 1975), *Dictyosphaerium* (Nägeli, 1849), *Kalenjinia* (Krienitz et al., 2012), *Marasphaerium* (Krienitz et al., 2012), *Marinichlorella* (Aslam et al., 2007), *Masaia* (Krienitz et al., 2012), *Mucidosphaerium* (Bock et al., 2011b), *Parachlorella* (Krienitz et al., 2004), *Planktochlorella* (Škaloud et al., 2014). Представители клады являются свободноживущими организмами, большинство из которых входят в состав планктона пресных и морских вод, и лишь некоторые встречаются в почвах.

Цель данной работы заключалась в комплексном исследовании морфологии, экологии и фило-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S002636562104011X для авторизованных пользователей.

гении представителей клады *Parachlorella*, включая штаммы Альгологической коллекции ACSSI, для разграничения близкородственных таксонов на уровне вида и рода. Впервые для всех описанных представителей клады (за исключением *Marinichlorella*, для которой внутренние транскрибируемые спейсеры не секвенированы) были обобщены морфологические и экологические характеристики, проанализированы результаты филогенетического анализа фрагмента 18S–ITS1–5.8S–ITS2, включая наличие интронов и их характеристики, значения генетических дистанций, оценены различия во вторичных структурах ITS1 и ITS2, в том числе присутствие компенсаторных замен (СВС), и определены видовые границы с помощью методов GMYC, PTP и ABGD. На основании проведенного анализа были выдвинуты предположения о критериях разделения родов и видов внутри данной клады.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектами данного исследования стали штаммы зеленых микроводорослей коллекции ACSSI, являющиеся субкультурами Коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS: *Parachlorella kessleri* ACSSI 334 (=IPPAS C-9), *P. kessleri* ACSSI 336 (=IPPAS C-62) и *P. kessleri* ACSSI 337 (=IPPAS C-100) (рис. ESM_1).

Культивирование штаммов ACSSI 334, ACSSI 336, ACSSI 337 проводили на твердой среде BG-11 (Гайсина и соавт., 2008).

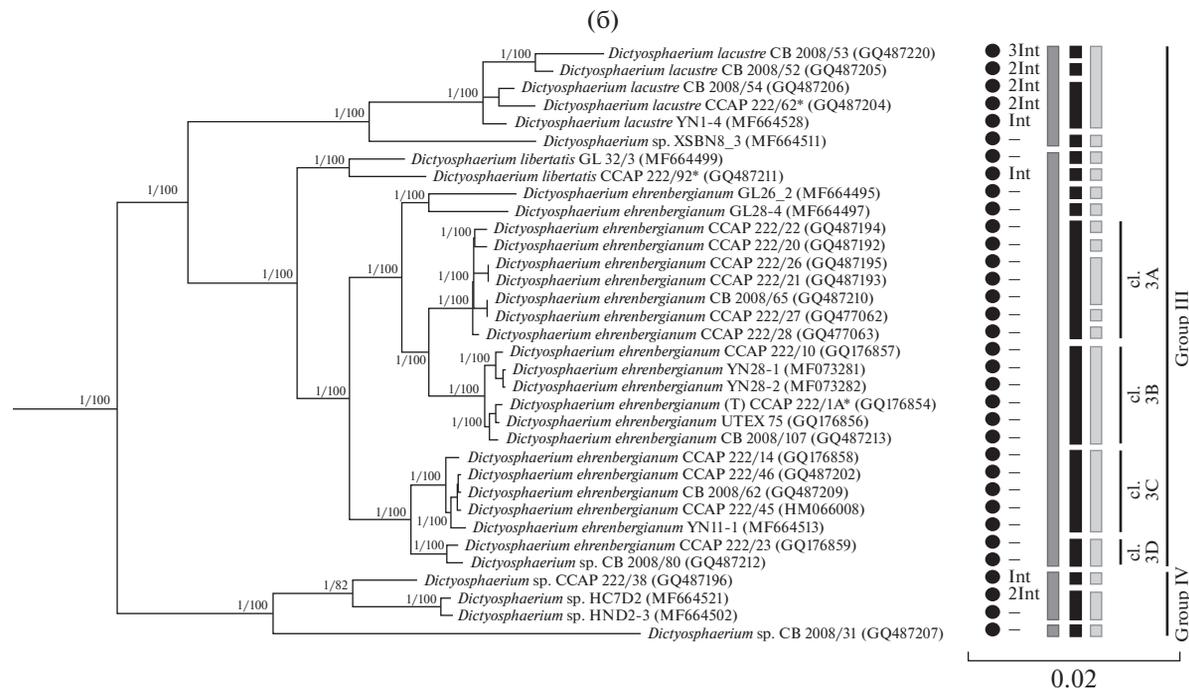
Микроскопия, выделение, амплификация, очистка и секвенирование ДНК проводились по стандартным протоколам, описанным ранее (Кривина, Темралева, 2020). Праймеры для ПЦП генов 18S, 5.8S рРНК, спейсеров ITS1, ITS2 и условия амплификации приведены в табл. ESM_2.

Молекулярно-филогенетический анализ. Для анализа филогении и уточнения таксономического положения штаммов ACSSI 334, ACSSI 336, ACSSI 337 был осуществлен поиск гомологии нуклеотидных последовательностей 18S–ITS1–5.8S–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, длины прочтения (не менее 2300 п.н.) и принадлежности к типовым видам и аутентичным штаммам. В состав выборки для филогенетического анализа вошли 117 штаммов (табл. ESM_3). Названия таксонов приведены согласно Международной электронной базе данных AlgaeBase (Guiry, Guiry, 2021). При наличии интронов в гене 18S рРНК они удалялись до выравнивания, информация о них указана на рис. 1. Филогенетический анализ клады *Parachlorella* производили по стандартным протоколам (Temraleeva et al., 2018). В

качестве внешней группы при филогенетических реконструкциях выбрали представителей сестринской клады *Chlorella* (класс *Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) – *Chlorella vulgaris* и *Hindakia tetrachotoma*. Генетические различия между нуклеотидными последовательностями охарактеризовали с помощью генетических дистанций, вычисление которых проводили в программе MEGA 6.0. Боксплот генетических дистанций построен в среде статистического программирования R 3.4.4 (<https://www.R-project.org/>). Для сравнения топологии деревьев использовали данные статей Bock и соавт. (2011a, 2011b), Krienitz и соавт. (2004, 2010, 2012), Škaloud и соавт. (2014), Song и соавт. (2018a, 2018b).

Фолдинг вторичной структуры ITS1 проводили с помощью веб-сервера RNAfold web server (<http://ma.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) в соответствии с принципом минимальной энергии. При оценке правильности фолдинга ITS1 ориентировались на работу A. Coleman (2015). Для анализа вторичной структуры ITS2 была выполнена аннотация спейсера в ITS2-DataBase (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>) и фолдинг также с помощью веб-сервера RNAfold web server по принципу минимальной энергии. Правильность фолдинга ITS2 оценивали, ориентируясь на работу Caisová и соавт. (2013). Сравнение вторичной структуры ITS1 и ITS2 между штаммами, поиск консервативных мотивов и компенсаторных замен (СВС) осуществляли в программе 4SALE. При анализе вторичных структур ITS2 для разделения видов особое внимание уделено подходу A. Coleman (2000, 2009), согласно которому наличие даже одной СВС в консервативных регионах ITS2 (5 п.н. I шпильки, 10 п.н. II шпильки, вся III шпилька) у двух микроводорослей коррелирует с их половой несовместимостью. Вторичные структуры спейсеров визуализированы в программе PseudoViewer3.

Делимитация видов. Реконструированное методом максимального правдоподобия (ML) филогенетическое дерево было использовано для делимитации видов с помощью алгоритма “Poisson tree processes” (PTP) на онлайн-сервере <https://species.h-its.org/>. Для делимитации видов в массиве данных применяли метод автоматического поиска межвидового пробела/разрыва (gap) в генетических дистанциях (automatic barcode gap discovery – ABGD) (Puillandre et al., 2012) на онлайн сервере <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>. Для анализа ABGD использовалась матрица генетических дистанций, рассчитанная в программе IQ-TREE. Третьим методом была обобщенная смешанная модель Юла с учетом целостности видов (general mixed Yule coalescent model, GMYC) (Fujisawa, Barraclough, 2013), реализованная в пакете “splits” для языка программирования R. Для GMYC анализа использовалось ультраметриче-



па: *Chlorella*-подобный (группа I), *Dictyosphaerium*-подобный (группы II–IX), *Scenedesmus*-подобный (группа X, р. *Coronacoccus*), *Actinastrum*-подобный (группа XI). Хлоропласт пристенный. Пиреноид с фрагментированной крахмальной оберткой, как правило, один, кроме представителей рода *Diclostera*, у которых количество пиреноидов может варьировать до 5 или отсутствует (табл. 1). Размножение бесполое – автоспорами. Рассмотренные представители являются свободноживущими организмами; большинство из них – обитатели пресноводных водоемов, и лишь некоторые встречаются в почвах (Krienitz et al., 2004, 2012; Bock et al., 2010, 2011a, 2011b; Škaloud et al., 2014; Song et al., 2018a, 2018b). Длина ITS1 у членов *Parachlorella*-клады варьировала от 230 до 335 н., длина ITS2 – от 241 до 273 н. Вторичные структуры ITS1 и ITS2 в целом соответствовали моделям, предложенным Coleman (2003, 2009, 2015) для эукариотических организмов.

Метод делимитации видов ABGD в составе клады *Parachlorella* выделил 24 кластера видового уровня, не считая внешнюю группу. Дистанция разделения видов составила 0.0164. С помощью метода GMYC выделено 57 кластеров видового уровня (дистанция разделения видов 0.00343). Статистическая поддержка результатов делимитации $P = 6.979972e-13 < 0.05$, следовательно, в массиве достаточно данных для получения достоверных результатов делимитации. С помощью метода РТР выделено 55 видов, что близко к результатам делимитации GMYC. Результаты дели-

митации видов методами ABGD, GMYC и РТР приведены на филогенетическом дереве (рис. 1а, 1б). Все кластеры видового уровня, выделенные методами делимитации, имеют высокие статистические поддержки (PP – 0.95–1.00, BP – 90–100%). По сравнению с другими методами ABGD выделил в кладе *Parachlorella* наименьшее количество видов при наибольшей дистанции их разделения. Количество выделенных кластеров разными методами делимитации видов ABGD, GMYC и РТР согласуется с работами Zou и соавт. (2016a, 2016b) и Zhu и соавт. (2017), в которых ABGD также разделял массив данных на меньшее количество предполагаемых видов, чем GMYC и РТР. Это связано с тем, что в качестве исходных данных метод ABGD использует матрицу генетических дистанций и поэтому является менее чувствительным (“грубым”) методом для разделения видов. Алгоритмы GMYC и РТР в качестве исходных данных используют филогенетические деревья, которые обычно строятся совершенными дискретными методами филогенетического анализа (ML или BI). Поэтому методы GMYC и РТР могут идентифицировать более “тонкие” генетические различия между штаммами в исследуемом наборе данных и выделяют большее количество предполагаемых видов.

Далее мы приводим отличительные морфологические, молекулярно-генетические и экологические характеристики каждой из групп. Отметим, что, исходя из работ Škaloud и соавт. (2014) и Song и соавт. (2018b), изначально пороги внутриви-

Таблица 1. Основные морфологические характеристики представителей клалды *Parachlorella*

Группа	Кластер/линия	A*	B	C	D	Ey	Ead	F	G
I	<i>Parachlorella kessleri</i>	2	1	–	1	2, 3	1, 2	3, 6	1
	<i>P. beijerinckii</i>	2	1	–	2	2, 3	1, 2	2, 4	1
	<i>P. hussii</i>	2	1	–	1	2, 3	1, 2	1	1
II	<i>Dictyosphaerium</i> sp. кластеры 2A, 2B	1	6	1	1	2, 3	1, 2	1	1
III	<i>D. lacustre</i>	1	6	2	1	3, 6	1, 3	1, 2	1
	<i>Dictyosphaerium</i> sp. XSBN8_3	1	6	2	1	2, 3	2, 3	1, 2	1
	<i>D. libertatis</i>	1	6	2	1	3, 4	3	1, 2	1
	<i>D. ehrenbergianum</i>	1	6	2	1	3	3	1, 2	1
IV	<i>Dictyosphaerium</i> sp. ССАР 222/38, НС7D2, HND2-3, СВ 2008/31	1	6	2	1	3	3	1, 2	1
V	<i>Dictyosphaerium</i> sp. XY16-6, YN24_2	1	6	2	1	3	3	1, 2	1
	<i>Dictyosphaerium</i> sp. G129	1	6	1	1	3	3	1, 2	1
VI	<i>Kalenjinia gelatinosa</i>	1	2	2	1	1, 3, 4, 5	1, 3, 4, 5	1	1
	<i>Compactochlorella kochii</i>	1	2	1	1	1, 3, 4	1, 3, 4	1	1
	<i>Dictyosphaerium</i> sp. WfA1	1	2	1	1	1, 3, 4	1, 3, 4	1	1
	<i>C. dohrmannii</i>	1	2	1	1	1, 3, 4	1, 3, 4	1	1
	<i>Marasphaerium gattermannii</i>	1	2	1	1	1, 2	1, 2	1	1
	<i>Planktochlorella nurekis</i>	2	1	–	2	1, 2	1	1	1
	<i>Masaia oloidia</i>	1	3	2	1	1, 3, 4	1, 3, 4	1	1
VII	<i>Mucidosphaerium pulchellum</i>	1	6	1	1	3, 4	1, 3	1, 2	1
	<i>M. planctonicum</i>	1	6	1	1	2, 3	1	1, 7	1
	<i>M. spagnale</i>	1	5	1	1	3, 7	1, 2	1, 7	1
	<i>M. palustre</i>	1	6	1	1	3	1	1, 7	1
VIII	<i>Dictyosphaerium</i> sp. кластеры 8A–8D, штаммы HND3-9, ССАЛА 335, ССАР 222/41	1	5	2	1	2, 3	2, 3	1	1
IX	<i>Dictyosphaerium</i> sp. YN12-3, I68, JI8-2, ССАР 222/4, DQ1_1, YN12-4, qingdao10, NIES 453, YN29-3, JI6-1, YN12-1	1	6	2	1	1, 3	1, 3	1	1
X	<i>Dicloster acutus</i>	3	2	–	2	7	7	8	0, 1, 2, 3
XI	<i>Closteriopsis acicularis</i>	1, 2	4	–	1	8	8	5	0, 1, 2
	<i>Dictyosphaerium</i> sp. ССАР 222/43	1	–	1	1	1, 3	1, 3	1	1
	<i>Coronacoccus hengyangensis</i>	1	3	–	1	1, 2, 3, 4, 9	1, 2, 3, 4, 9	1	1

* А – Форма: 1 – колонии; 2 – одиночные клетки; 3 – ценобий. В – количество клеток: 1 – 1; 2 – до 4; 3 – до 8; 4 – до 16; 5 – до 32; 6 – до 64. С – крепление клеток к гиалиновым тязам: 0 – нет тязей; 1 – узкой стороной; 2 – широкой стороной. D – слизь: 1 – есть; 2 – нет. E – форма клеток: Ey – форма молодых клеток, Ead – форма взрослых клеток: 1 – шаровидная; 2 – широкоовальная; 3 – овальная; 4 – яйцевидная; 5 – каплевидная; 6 – почковидная; 7 – изогнутая с заостренными концами; 8 – веретеновидная; 9 – четырехгранная. F – тип хлоропласта: 1 – чашевидный; 2 – блюдцевидный; 3 – мантиевидный; 4 – корытовидный; 5 – желобовидный; 6 – шаровидный; 7 – поясковидный; 8 – пристенный. G – количество пиреноидов: 0 – нет пиреноида; 1 – 1; 2 – 2; 3 – от 3 до 5. Прочерк означает отсутствие информации.

довых, межвидовых и межродовых дистанций были установлены на основании представителей родов *Parachlorella*, *Kalenjinia*, *Planktochlorella*, *Masaia*, монофилетичность которых не вызывала сомне-

ний. Минимальная внутривидовая генетическая дистанция (на базе штаммов вида *P. hussii*) – 0%, минимальная межвидовая дистанция (на основе различий между *P. hussii* и *P. beijerinckii*) – 0.4%,

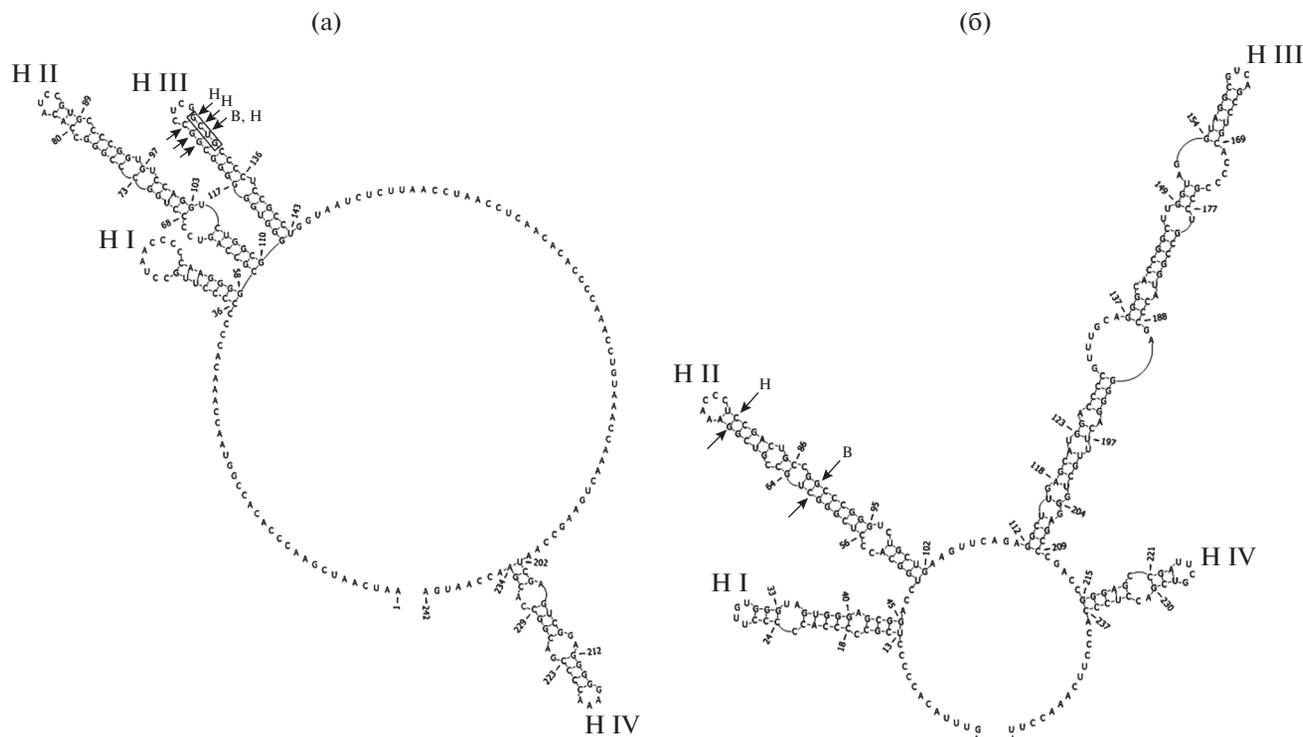


Рис. 2. Вторичная структура ITS1 (а) и ITS2 (б) штаммов *Parachlorella kessleri* ACSSI 334, ACSSI 336, ACSSI 337. Стрелками показаны СВС, В – *P. beijerinckii*, Н – *P. hussii*. Черный прямоугольник – молекулярная подпись.

межродовая (между родами *Kalenjinia* и *Masaia*) – 1.2%. Далее нами был проведен комплексный анализ остальных видов и родов, который позволил уточнить границы генетических различий (см. ниже).

Группа I объединяет представителей рода *Parachlorella*, которые имеют *Chlorella*-подобный морфотип (табл. 1). Они широко распространены в водной, почвенной и наземно-воздушной средах (Krienitz et al., 2004; Bock et al., 2011a; Song et al., 2018b). В состав группы входят три самостоятельных вида: типовой вид рода *P. beijerinckii*, *P. kessleri*, *P. hussii*. Отличительными морфологическими признаками являются тип хлоропласта и слизистой оболочки. Уровень генетических различий между видами варьирует от 0.4 до 0.8% (ESM_4). Последовательности ITS1 и ITS2 для трех штаммов *P. kessleri* ACSSI 334, 336 и 337 были идентичны, различия с аутентичным штаммом SAG 211-11g также отсутствовали. Анализ вторичной структуры ITS1 представителей данных видов выявил мотив, расположенный сразу после вершины III шпильки с 3'-стороны, который можно рассматривать как молекулярную подпись: для *P. kessleri* – мотив GCUG, для *P. beijerinckii* – AGCC, для *P. hussii* – GAAA (рис. 2а). Между видами *P. beijerinckii* и *P. hussii* СВС не обнаружено. *P. kessleri* отличается от других видов на 1 СВС в III шпильке ITS2 от двух других видов и на 2 дополнительных

СВС в этой же шпильке от *P. hussii* (табл. ESM_5). СВС между видами в консервативных регионах ITS2 отсутствовали (рис. 2б). В неконсервативных регионах каждый из видов *P. beijerinckii* и *P. hussii* по сравнению с другими видами группы имели по 1 СВС (табл. ESM_6). Анализы GMYC и РТР, в отличие от метода ABGD, подтвердили видовой статус всех 3 видов. Таким образом, разделение видов внутри рода *Parachlorella* подтверждается морфологическими отличиями (тип хлоропласта, слизь), величиной генетических дистанций (0.4–0.8%), наличием молекулярных подписей и СВС во вторичной структуре ITS1 и ITS2, результатами делимитации видов методом GMYC и РТР.

Группа II является близкородственной группе I; в нее вошли штаммы микроводорослей с *Dictyosphaerium*-подобным морфотипом. Колонии состоят из 16–64 клеток, которые крепятся к гиалиновым тяжам узкой стороной (табл. 1). Все представители – обитатели пресноводных водоемов (Song et al., 2018b). Группа включает 2 кластера (рис. 1а). Члены кластера 2А, в отличие от кластера 2В, в составе гена 18S рРНК имеют интрон длиной 457 н. Генетические дистанции внутри вышеописанных кластеров были менее 0.1%, между ними – 0.4% (межвидовой уровень), с представителями сестринской группы I – 3.4%–3.7% (межродовой уровень) (табл. ESM_7). У штаммов кла-

стеров 2А и 2В была обнаружена 1 СВС в ITS1 и 1 СВС в консервативном регионе ITS2 (табл. ESM_8, ESM_9). Метод ABGD объединяет оба кластера в один вид, метод GMYC, напротив, разделяет их на 2 самостоятельных вида. Метод РТР подтверждает самостоятельный видовой статус кластера 2В и дополнительно разделяет кластер 2А на 3 вида, но последнее не подтверждается другими признаками.

Обобщая все изученные характеристики, мы предполагаем, что кластеры 2А и 2В являются крипточескими видами со сходной морфологией, но отличающиеся присутствием интрона в составе гена 18S рРНК у штаммов кластера 2А; наличием 1 СВС в ITS1 и 1 СВС в консервативном регионе ITS2. Генетические дистанции между кластерами соответствовали межвидовому уровню (0.4%), разделение кластеров также было подтверждено двумя методами делимитации видов – GMYC и РТР. Оба вида не вошли в группу “истинных” *Dictyosphaerium*, включающую аутентичный штамм типового вида *D. ehrenbergianum* ССАР 222/1А (группа III), т.е. являются членами нового неопищенного рода с *Dictyosphaerium*-подобной морфологией.

Группа III объединяет штаммы, кластеризующиеся с *D. ehrenbergianum* – типовым видом рода *Dictyosphaerium* – и являющиеся, вероятно, его “истинными” представителями (рис. 16). В колониях обычно от 4 до 32 клеток, реже – до 64, которые, в отличие от группы II, крепятся к гиалиновым тяжам широкой стороной (табл. 1). Форма молодых клеток варьирует в зависимости от видовой принадлежности. Взрослые клетки преимущественно овальные. Все представители – обитатели пресноводных водоемов (Bock et al., 2011b). В состав группы входят 30 штаммов, которые образуют несколько кластеров:

1) отличительной чертой *D. lacustre* является почковидная форма молодых и шаровидная форма зрелых клеток (Bock et al., 2011b). Штаммы имели разное количество интронов в составе гена 18S рРНК: у штамма СВ 2008/53 – 3 интрона (356 н., 465 н., 503 н.), у СВ 2008/52, СВ 2008/54 и аутентичного штамма ССАР 222/62 – 2 интрона (467 н., 503 н.), у штамма YN 1-4 – 1 интрон (501 н.). Генетические различия между ССАР 222/62, СВ 2008/54 и YN 1-4 соответствовали внутривидовому уровню ($\leq 0.3\%$), в остальных случаях – межвидовому ($\geq 0.4\%$) (табл. ESM_10). СВС между указанными штаммами в ITS1 и в ITS2 не были обнаружены (табл. ESM_11, ESM_12). Алгоритмы ABGD и РТР объединили штаммы *D. lacustre* в один вид. Согласно результатам GMYC они относятся к 3 разным видам: 1) штамм СВ 2008/53; 2) штамм СВ 2008/52; 3) аутентичный штамм ССАР 222/62, штаммы СВ 2008/54, YN1-4. Это согласуются со значением генетических дистанций (0.4–0.9%),

однако не подтверждается результатами анализа интронов, поиска СВС и методами ABGD и РТР. Поэтому для уточнения таксономического статуса и точного разграничения крипточеских видов, штаммы *D. lacustre* нуждаются в дополнительном изучении;

2) отдельную филогенетическую линию образует штамм *Dictyosphaerium* sp. XSBN8_3, имеющий типичную для представителей группы III морфологию (Song et al., 2018b). Генетические дистанции между штаммом XSBN8_3 и сестринским кластером *D. lacustre* колебались от 1 до 1.6% (межвидовой уровень) (табл. ESM_10). Также у штамма XSBN8_3 по сравнению с *D. lacustre* обнаружено 2 СВС в ITS1 (табл. ESM_11, ESM_12). Методы делимитации видов GMYC и РТР подтвердили его самостоятельный видовой статус. Таким образом, штамм *Dictyosphaerium* sp. XSBN8_3 является представителем нового вида в рамках группы “истинных” *Dictyosphaerium*;

3) отличительной чертой штаммов *D. libertatis* от других представителей группы является наличие молодых клеток яйцевидной формы (Bock et al., 2011b). В составе гена 18S рРНК у ССАР 222/92 в отличие от GL 32/3 присутствует интрон длиной 403 н. Уровень генетических различий между ними – 0.5% (межвидовой уровень) (табл. ESM_10). Между указанными штаммами найдена 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2. От остальных представителей группы оба штамма отличались на 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2 (табл. ESM_11, ESM_12). Методы GMYC и РТР подтвердили принадлежность этих штаммов к разным видам. Метод ABGD, напротив, объединил представителей *D. libertatis* и *D. ehrenbergianum* в один кластер. Таким образом, о том, что *D. libertatis* может быть разделен на 2 вида свидетельствуют наличие/отсутствие интрона (403 н.), уровень генетических различий (0.5%), 1 СВС в ITS2, результаты делимитации видов методами GMYC и РТР;

4) голотип рода *Dictyosphaerium* – *D. ehrenbergianum*. В отличие от *D. libertatis* и *D. lacustre*, диаметр колоний его представителей может достигать 80 мкм; кроме чашевидного, в клетках встречается поясковидный хлоропласт (табл. 1) (Nägeli, 1849; Bock et al., 2011b). *D. ehrenbergianum* является полифилетичным видом, представители которого формируют 2 филогенетические линии и 4 кластера видового уровня согласно алгоритмам делимитации GMYC (рис. 16). Морфологические различия между ними не были обнаружены. Уровень генетических различий каждого из штаммов GL 26_2 и GL 28_4 по сравнению с остальными от 0.5% и выше (межвидовой уровень) (табл. ESM_10). Штамм GL 26_2 отличается от родственного штамма GL 28_4 на 1 СВС в ITS1 и 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2. Метод РТР также

подтверждает их видовую специфичность. Генетические дистанции внутри кластеров 3А, 3В, 3С, 3D составляла 0–0.2% (внутривидовой), между кластерами 3С и 3D – 0.3% (внутривидовой уровень), в остальных случаях – 0.5–1.1% (межвидовой). В неконсервативном регионе ITS2 у штаммов кластера 3В была найдена 1 специфическая СВС по сравнению с остальными, у штаммов кластеров 3С и 3D – 2 СВС (табл. ESM_11, ESM_12). Анализ РТР разделяет кластер 3А на 5 видов, однако это дробление ничем более не подтверждается. В остальном результаты соответствуют GMYC. Кластеры 3С и 3D, выделенные методом GMYC и РТР, следует рассматривать как представителей одного вида, поскольку уровень генетических различий между кластерами соответствует внутривидовому уровню (0.3%), СВС или иных существенных различий в строении ITS1 и ITS2 между ними не найдено. Таким образом, самостоятельный видовой статус каждого из штаммов GL 26_2, GL 28_4, а также кластеров 3А, 3В и объединенной подгруппы 3С и 3D, подтверждены генетическими дистанциями ($\geq 0.5\%$), наличием СВС в ITS1 и/или ITS2 по сравнению с сестринскими филогенетическими линиями, методами делимитации видов РТР и/или GMYC.

Группа IV выделена на основании уникального филогенетического положения и объединяет 4 штамма с *Dictyosphaerium*-подобной морфологией, у которых гиалиновые тяжи в колониях крепятся к широкой стороне клеток (табл. 1) (Song et al., 2018b). Штамм ССАР 222/38 в составе гена 18S рРНК имеет интрон длиной 542 н., штамм НС7D2 – 2 интрона длиной 349 н. и 402 н. Генетические дистанции между НС7D2 и ННD2-3 соответствовали внутривидовому уровню (0.2%), между ними и штаммом ССАР 222/38 – межвидовому (0.6–0.7%), между штаммом СВ 2008/31 и остальными представителями группы – межродовому (2.5%) (табл. ESM_13). Уровень генетических различий с сестринской группой III – 3.1–3.6% (межродовой). Штаммы НС7D2 и ННD2-3 отличались от ССАР 222/38 на 1 СВС в ITS1. Штамм СВ2008/31 отличался от других представителей на 2 СВС в неконсервативных регионах ITS2 (табл. ESM_14, ESM_15). Самостоятельный видовой статус штамма СВ2008/31 подтвержден всеми методами делимитации видов. Остальные штаммы согласно анализу АВGD относятся к одному кластеру, тогда как РТР и GMYC выделяет еще 2. Таким образом, вероятно, группа IV объединяет 2 криптических рода. Первый род состоит из двух видов (1-й вид – штамм ССАР 222/38; 2-й вид – штаммы НС7D2 и ННD2-3). Второй род представлен только штаммом СВ 2008/31.

Группа V содержит 3 штамма с *Dictyosphaerium*-подобным морфотипом, которые различаются способом прикрепления клеток к гиалиновым тяжам (Song et al., 2018b). У штаммов ХУ16-6,

YN24_2 клетки крепятся к ним широкой стороной, у штамма G129 – узкой (табл. 1). Генетические дистанции между штаммами группы соответствовали межвидовому уровню (0.5–0.8%) (ESM_16). При анализе ITS1 у штаммов были выявлены различия в длине шпильки III. У штамма ХУ16-6 она составляла 40 н., у штамма YN24_2 – 33 н., у штамма G129 – 27 н. СВС не были обнаружены ни в ITS1, ни в ITS2. Согласно анализам GMYC и РТР все исследуемые штаммы являются представителями неописанных видов, тогда как метод АВGD объединял их в один кластер. Видовой статус штамма G129 подтверждают особенности морфологии (крепление клеток штамма к гиалиновым стеблям узкой стороной), уровень генетических дистанций ($\geq 0.5\%$), результаты анализа GMYC и РТР. Разделение штаммов ХУ16-6, YN24_2 на 2 самостоятельных вида, помимо алгоритмов делимитации, подтверждено только уровнем генетических различий. Однако для понимания таксономического статуса данные штаммы нуждаются в дополнительном исследовании.

Группа VI микроводоросли с *Dictyosphaerium*-подобным морфотипом, у которых колонии состоят, как правило, из 2–4 клеток, соединяющихся с гиалиновыми стеблями узкой стороной (табл. 1). Все представители группы обитатели пресноводных водоемов (Krienitz et al., 2012; Škaloud et al., 2014; Song et al., 2018b). В ее состав входят (рис. 1a):

1) монотипный род *Kalenjinia*. Он представлен типовым видом *K. gelatinosa*. Генетические дистанции между штаммами 0.1%, с другими родами – 1.2–2.5% (межродовой уровень) (табл. ESM_17). Между штаммами СВС нет (табл. ESM_18, ESM_19). Видовой статус *K. gelatinosa* подтвержден всеми методами делимитации;

2) отдельный кластер формируют представители рода *Compactochlorella* и штамм *Dictyosphaerium* sp. WfA1. Типовой вид рода *C. kochii* образует подгруппу с *Dictyosphaerium* sp. WfA1. Она характеризуется генетической неоднородностью. Так, только у штаммов ССАР 222/61, СВ 2008/47 в составе гена 18S рРНК имеется интрон длиной 708 н. Генетическая дистанция между этими штаммами – $< 0.1\%$ (внутривидовой уровень), между ними и *Dictyosphaerium* sp. WfA1, штаммом СВ 2008/14 – 0.4% (межвидовой), штаммом ССАР 222/7 – 1.2% (табл. ESM_17). Штаммы ССАР 222/61, СВ 2008/47 отличаются от остальных членов подгруппы на 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2 (табл. ESM_18, ESM_19). Согласно методу GMYC, штаммы данной подгруппы относятся к 4 видам, РТР – к 2 видам. Полифилетичность вида *C. kochii* подтверждают наличие/отсутствие интронов, уровень генетических дистанций (0.4–1.2%), СВС в ITS2, результаты анализа GMYC и РТР. Истинными представителями вида *C. kochii* являются, вероятно, аутентичный штамм

ССАР 222/61 и близкородственный ему СВ 2008/47. Таксономический статус остальных штаммов подгруппы нуждается в уточнении. Сестринской филогенетической линией к *C. kochii* является аутентичный штамм *C. dohrmannii* ССАР 222/5. Уровень генетических различий между *C. dohrmannii* ССАР 222/5 и подгруппой, объединяющей штаммы *C. kochii* и *Dictyosphaerium* sp. WfA1, колебался в пределах от 1.2 до 1.8% (табл. ESM_17). От всех представителей сестринской подгруппы *C. dohrmannii* ССАР 222/5 отличается 1 СВС в ITS1 и на 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2. Кроме того, по сравнению с ССАР 222/61 и СВ 2008/47 он имеет еще по 1 СВС в ITS1 и неконсервативном регионе ITS2, с ССАР 222/7 – 1 СВС в ITS1, с *Dictyosphaerium* sp. WfA11 – 1 дополнительную СВС в неконсервативной части ITS2 (табл. ESM_18, ESM_19). Таким образом, видовой статус *C. dohrmannii* подтвержден генетическими дистанциями ($\geq 1.2\%$), СВС в ITS2, результатами анализов ГМУС и РТР;

3) род *Marasphaerium*, включающий типовой вид *M. gattermannii*, в отличие от остальных имеет преимущественно шаровидную форму взрослых клеток (Krienitz et al., 2012). Генетические дистанции между штаммами ССАР 222/24 и Heg 1983/17 – 0.1% (внутривидовой уровень) (табл. ESM_17). Аутентичный штамм ССАР 222/24 по сравнению со штаммом Heg 1983/17 имел 3 СВС в неконсервативных регионах ITS2 (табл. ESM_18, ESM_19). АВГД и РТР относят их к одному виду, ГМУС – к разным. Поэтому мы считаем, что штаммы ССАР 222/24 и Heg 1983/17 принадлежат одному виду – *M. gattermannii*;

4) сестринский кластер к роду *Marasphaerium* образует монотипный род *Planktochlorella*. Голотип рода *P. nurekis* представлен аутентичным штаммом САУР Н8701 и штаммом ССАР 222/25. Диакритические признаки: клетки одиночные, имеют двуслойную клеточную стенку, не формируют колоний. Однако сами авторы отмечают, что, возможно, способность формировать колонии может проявиться у данного вида при определенных условиях, например, при интенсивной “пастбищной” нагрузке (Škaloud et al., 2014). Генетические дистанции внутри вида составляли 0.2%, межродовые варьировали от 1.8 до 2.9% (табл. ESM_17). СВС между штаммами не обнаружено (табл. ESM_18, ESM_19). Анализ ГМУС отнес штаммы к разным видам, АВГД и РТР к одному виду. Самостоятельный видовой статус подтверждают все методы делимитации. Исходя из уровня генетических различий, отсутствия СВС, результатов АВГД и РТР, можно сказать, что штаммы САУР Н8701 и ССАР 222/25 относятся к одному виду *P. nurekis*;

5) род *Masaia*, представленный типовым видом *M. oloidia* (3 штамма, в т.ч. аутентичный штамм

ССАР 222/32), в отличие от других членов группы способен формировать 8-клеточные колонии (Krienitz et al., 2012). Уровень генетических дистанций между штаммами был равен $\leq 0.2\%$, с представителями других родов – 1.2–2.2% (табл. ESM_17). СВС между штаммами не обнаружены ни в ITS1, ни в ITS2 (табл. ESM_18, ESM_19). На основании вышесказанного, а также результатов АВГД, ГМУС и РТР, все три штамма принадлежат к виду *M. oloidia*.

В группу VII входят представители рода *Mucidosphaerium*. Они морфологически идентичны группе III и встречаются в сходных экологических условиях (табл. 1) (Bock et al., 2011b). Морфологически виды внутри рода различаются формой молодых клеток (рис. 1):

1) *M. pulchellum* от других представителей рода отличается яйцевидной или овальной формой молодых клеток (табл. 1) (Bock et al., 2011b). Между штаммами имеются расхождения в составе гена 18S рРНК. Так штамм АСОИ 755 имеет 3 интрона (355 н., 518 н., 497 н.), штамм ССАР 222/2А – 4 интрона (355 н., 732 н., 513 н., 497 н.). Генетические дистанции между штаммами ССАР 222/2А и АСОИ 755, а также между UTEX 731 и ССАР 222/2В – 0.2–0.3% (внутривидовой уровень), между этими подгруппами – 0.8% (межвидовой), с другими видами – 2.0–3.9% (табл. ESM_20). Штаммы ССАР 222/2А и АСОИ 755 по сравнению с остальными имели 1 СВС в ITS1 и 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2 (табл. ESM_21, ESM_22). Анализ АВГД отнес все штаммы к одному виду, ГМУС выделил 2 вида, а РТР – 3. Результаты ГМУС подтверждаются генетическими дистанциями, отсутствием интронов у UTEX 731, ССАР 222/2В, 1 СВС в ITS1 и 1 СВС в ITS2. Таким образом, вид *M. pulchellum*, вероятно, является полифилетичным и включает в себя 2 вида (1-й вид – ССАР 222/2А, АСОИ 755, 2-й вид – UTEX 731, ССАР 222/2В);

2) аутентичный штамм *M. planctonicum* АСОИ 1719, характерной особенностью которого являются исключительно овальная форма молодых клеток (Bock et al., 2011b). В составе нуклеотидной последовательности гена 18S рРНК присутствует 4 интрона длиной 368 н., 428 н., 440 н., 498 н. Уровень генетических различий от других видов группы VII – 2.2–4.5% (табл. ESM_20). Между *M. planctonicum* и штаммами *M. pulchellum* ССАР 222/2А, АСОИ 755 была найдена 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2 (табл. ESM_21, ESM_22). Видовой статус был подтвержден всеми методами делимитации;

3) типовой вид рода *Mucidosphaerium* – *M. palustre*, у которого форма молодых клеток варьирует от овальной до почковидной (Bock et al., 2011b). Аутентичный штамм ССАЛА 332 отличается от штамма СВ2008/6 строением и длиной интронов

в гене 18S рРНК (штамм ССАЛА 332 – 4 интрона длиной 422 н., 440 н., 462 н., 429 н., штамм СВ2008/6 – 4 интрона длиной 422 н., 356 н., 447 н., 429 н.). Уровень генетических дистанций между ними – 2.2%, с другими видами – 2.2–3.9% (табл. ESM_20). СВС между штаммами *M. palustre* не были обнаружены ни в ITS1, ни в ITS2 (табл. ESM_21, ESM_22). От родственного *M. sphagnale* они отличаются на 2 СВС в неконсервативных участках ITS2. Анализы GMYC и РТР, в отличие от АВГД, относят штаммы к разным видам, что подтверждается расхождением в составе и длине интронов и высокими значениями генетических дистанций (2.2%);

4) *M. sphagnale*, характерной чертой которого является узкоовальная или полулунная форма молодых клеток (Vock et al., 2011b). Все представители вида в составе гена 18S рРНК имеют два интрона, длина которых составляет 356 н. и 447 н. Генетическая дистанция между штаммами *M. sphagnale* – 0–0.2%, с другими членами группы – 1.9–3.1% (табл. ESM_20). СВС в ITS1 и ITS2 между данными штаммами не обнаружено (табл. ESM_21, ESM_22). Объединение всех трех штаммов в один кластер видового уровня подтверждено методами делимитации GMYC и РТР, метод АВГД объединяет данный вид с представителями *M. palustre*. Однако расхождения в форме молодых клеток, количестве и составе интронов, наличие 2 СВС в ITS2 по сравнению с *M. palustre*, результаты GMYC и РТР позволяют утверждать, что *M. sphagnale* – самостоятельный вид. Таким образом, таксономически признанный род *Mucidosphaerium* характеризуется высоким генетическим полиморфизмом.

Группа VIII объединяет штаммы с *Dictyosphaerium*-подобным морфотипом, у которых гиалиновые стебли крепятся к широкой стороне клеток (табл. 1) (Krienitz et al., 2012; Song et al., 2018b). Несмотря на морфологию, данная группа с “истинными” представителями рода *Dictyosphaerium* (группа III) не группируется. В состав входят 7 кластеров предположительно видового уровня, выделенных на основании анализов GMYC и РТР (рис. 1а):

1) кластер 8А объединяет штаммы, имеющие в составе гена 18S рРНК интрон длиной 660 п.н. Генетические дистанции между штаммами – 0.2% (внутривидовой), с другими кластерами – 1.3–1.6% (межвидовой) (табл. ESM_23). Между кластером 8А и сестринским штаммом HND 3-9 обнаружена 1 СВС в неконсервативном регионе ITS2 (табл. ESM_24, ESM_25). Все методы делимитации подтвердили видовой статус кластера. Таким образом, доказательствами валидности видового статуса кластера 8А являются наличие интрона, уровень генетических дистанций ($\geq 0.6\%$), результаты алгоритмов АВГД, GMYC и РТР;

2) штамм *Dictyosphaerium* sp. HND 3-9, имеющий в гене 18S рРНК интрон длиной 506 п.н. Уровень генетических различий с другими членами группы – 1.4–1.6% (межвидовой уровень) (табл. ESM_23). Между HND 3-9 и штаммом ССАЛА 335 имел 3 СВС в неконсервативных регионах ITS2, с кластером 8В – 3 СВС в ITS1 и 5 СВС в неконсервативных регионах ITS2, с кластером 8D – 4 СВС в неконсервативных регионах ITS2, со штаммом ССАП 222/41 – 4 СВС в неконсервативных регионах ITS2 (табл. ESM_24, ESM_25). Наличие интрона, генетические дистанции $\geq 0.7\%$, СВС в ITS2, анализы АВГД, GMYC и РТР подтверждают то, что штамм HND 3-9 относится к новому виду неопisanного *Dictyosphaerium*-подобного рода;

3) уровень генетических дистанций штамма ССАЛА 335 от других представителей группы VIII варьировал от 1.4–1.8% (межвидовой уровень) (табл. ESM_23). У данного штамма была найдена 1 специфическая СВС в ITS1, отличающая его от остальных членов группы. Штамм ССАЛА 335 отличается от кластера 8А и штамма HND 3-9 на 1 СВС в консервативном регионе ITS2. В неконсервативной части ITS2 штамм ССАЛА 335 по сравнению с кластером 8В и 8С имеет по 1 СВС, кластером 8D – 5 СВС, от штамма ССАП 222/41 – 2 (табл. ESM_24, ESM_25). Таким образом, самостоятельный видовой статус штамма ССАЛА 335 подтверждают генетические дистанции $\geq 1.4\%$, наличие СВС в ITS1 и ITS2, результаты GMYC и РТР;

4) генетические дистанции между штаммами кластера 8В – 0.2% (внутривидовой уровень), с другими членами группы VIII – 0.6–1.6% (межвидовой) (табл. ESM_23). Кластер 8В имеет уникальную для группы VIII СВС в I шпильке и 2 СВС в IV шпильке ITS1, по сравнению со всеми штаммами, кроме HND 3-9. Кроме того, между кластером 8В и штаммом ССАП 222/41 найдено 2 СВС в неконсервативных регионах ITS2 (табл. ESM_24, ESM_25). Итак, уровень генетических различий ($\geq 0.6\%$), наличие СВС в ITS1 и ITS2, результаты GMYC и РТР указывают, что штаммы кластера 8В относятся к самостоятельному виду;

5) внутри кластера 8С генетические дистанции соответствовали внутривидовому уровню ($\leq 0.2\%$), с остальными представителями группы межвидовому – 1.2–1.7% (табл. ESM_23). Кроме СВС, приведенных ранее, представители кластера 8С отличались на 1 СВС в консервативной III шпильке ITS2 от остальных членов группы, за исключением *Dictyosphaerium* sp. ССАЛА 335 и штаммов кластера 8В (табл. ESM_24, ESM_25). Таким образом, видовой статус штаммов кластера 8С подтверждают генетические дистанции ($\geq 1.2\%$), СВС в ITS2, анализы АВГД, GMYC и РТР;

6) штаммы кластера 8D в отличие от сестринской филогенетической линии *Dictyosphaerium* sp. ССАР 222/41 в составе гена 18S рРНК не имеют интрона. Генетические дистанции внутри кластера 8D – 0–0.1% (внутривидовой уровень), между кластером 8D и штаммом ССАР 222/41 – 0.3% (внутривидовой), между ними и остальными кластерами – 1.0–1.7% (межвидовой) (табл. ESM_23). СВС между кластером 8D и штаммом ССАР 222/41 ни в ITS1, ни в ITS2 не обнаружено (табл. ESM_24, ESM_25). Вероятно, кластер 8D и штамм ССАР 222/41 относятся к одному и тому же криптическому виду, принадлежащему *Dictyosphaerium*-подобному роду, о чем свидетельствуют единая морфология, уровень генетических различий, отсутствие СВС в ITS1 и ITS2.

Группа IX объединяет микроводоросли с *Dictyosphaerium*-подобным морфотипом, у которых гиалиновые стебли крепятся к широкой стороне клеток (табл. 1) (Krienitz et al., 2012; Song et al., 2018b). Члены группы XI также к “истинным” *Dictyosphaerium* не относятся. В состав группы входят (рис. 1a):

1) штамм *Dictyosphaerium* sp. YN12-3;

2) кластер, включающий 10 штаммов. Данный кластер характеризуется гетерогенностью в строении гена 18S рРНК: штаммы YN29-3, J16-1, YN12-1 имеют интрон длиной 403 н. Уровень генетических различий внутри кластера – 0.1 до 0.2% (внутривидовой уровень), между кластером и штаммом *Dictyosphaerium* sp. YN12-3 – 0.4–0.5% (межвидовой уровень) (табл. ESM_26). Штамм *Dictyosphaerium* sp. YN12-3 отличался от других представителей группы на 2 СВС в ITS1, от штаммов I68, J18-2, ССАР 222/4 – на еще 1 дополнительную СВС в ITS1 (табл. ESM_27). СВС в ITS2 отсутствовали. Согласно методу АВGD все штаммы группы относятся к одному виду, согласно РТР – к 2 видам, GMYC – к 4. Видовой статус штамма *Dictyosphaerium* sp. YN12-3 подтверждают уровень генетических различий (≥ 0.4), 2 СВС в ITS1, результаты GMYC, РТР. Все остальные представители группы относятся к другому виду. Генетические дистанции между ними невелики и соответствуют внутривидовому уровню ($\leq 0.2\%$), СВС в ITS1 и ITS2 не найдены. Наличие интрона у некоторых из них может указывать на начавшиеся процессы видообразования, но пока происходящие на популяционном уровне (Gaonkar et al., 2018).

Группа X состоит из монотипного рода *Dicloster* и включает в себя 3 штамма типового вида *Dicloster acutus* (рис. 1a). Нуклеотидные последовательности аутентичного штамма в GenBank отсутствуют. Отличительными признаками являются *Scenedesmus*-подобный морфотип, клетки изогнутые, с длинными сужающимися, заостренными концами, хлоропласт чаще всего с 1–2 пиреноидами

(реже отсутствует или от 3 до 5) (табл. 1). Кроме того, может активно развиваться в кислых водах, в т.ч. в болотах (Jao et al., 1975). Генетические дистанции между штаммами были не более 0.1% (внутривидовой уровень). Межродовые различия с сестринской группой XI, включающей род *Closteriopsis*, составляли 2.1–2.2%. СВС внутри группы отсутствовали. Методы делимитации видов GMYC и АВGD в отличие от РТР подтвердили принадлежность всех штаммов группы к одному виду.

Группа XI представлена видом *Closteriopsis acicularis* (рис. 1a). К сожалению, информация о нуклеотидных последовательностях типового вида рода *C. longissima* и аутентичного штамма *C. acicularis* отсутствует в GenBank. Характерные черты: *Actinastrum*-подобный морфотип, клетки веретеновидные, прямые или изогнутые, одиночные или в небольших скоплениях, хлоропласт желобовидный с 1, 2 или без пиреноида, размножение автоспорами (табл. 1). Представители данной группы – обитатели пресноводных водоемов (Belcher, Swale, 1962). Генетические дистанции между штаммами SAG 11.86 и EN 2003/36 были менее чем 0.1% (внутривидовой уровень), между подгруппой штаммов SAG 11.86, EN 2003/36 и штаммом FACHB-2133 – $\geq 0.5\%$ (межвидовой уровень). Между штаммами SAG 11.86, EN 2003/36, FACHB-2133 выявлена 1 СВС в ITS1 (H III: G→U→C→G, 11 п.н.). Анализы GMYC и РТР, в отличие от метода АВGD, подтвердили разделение группы на 2 вида. Таким образом, учитывая генетические дистанции ($\geq 0.5\%$), наличие СВС в ITS1, результаты GMYC и РТР, можно предположить, что вид *Closteriopsis acicularis* состоит из двух независимых видов: 1-й вид – штаммы SAG 11.86, EN 2003/36; 2-й вид – штамм FACHB-2133.

Сестринскую к группе XI филогенетическую линию образует штамм *Dictyosphaerium* sp. ССАР 222/43. Имеет типичный *Dictyosphaerium*-подобный морфотип (табл. 1) (Song et al., 2018b). Генетические дистанции с представителями группы X составляли 2.7%, группы XI – 2.3–2.5%. Методы делимитации видов GMYC, РТР и АВGD подтвердили, что *Dictyosphaerium* sp. ССАР 222/43 является представителем нового, пока не описанного вида, принадлежащего *Dictyosphaerium*-подобному роду.

Самостоятельную филогенетическую линию образует род *Coronacoccus*, представленный типовым видом рода *C. hengyangensis* (рис. 1a). Характеризуется способностью формировать 4- реже 8-клеточные колонии, *Scenedesmus*-подобные, покрытые аморфной слизью (табл. 1). Форма молодых и взрослых клеток внутри колоний варьирует. Иногда встречаются четырехгранные клетки или слегка асимметричные (Song et al., 2018a). Уровень генетических различий данного вида с груп-

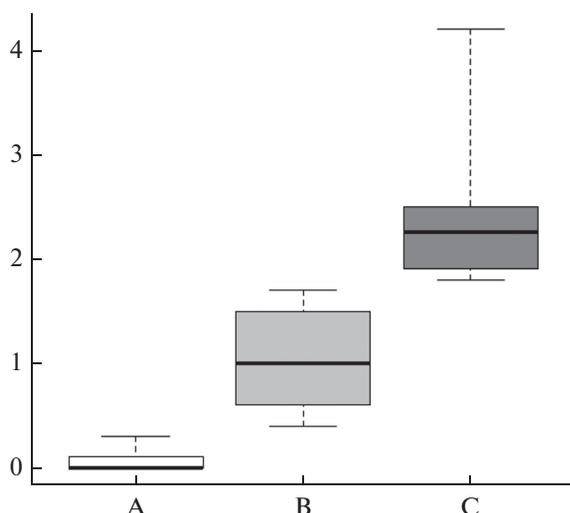


Рис. 3. Генетические дистанции (%) внутри видов (А), между видами (В) и между родами (С). Границы бокса показывают первый и третий квартили, жирная горизонтальная линия — медианное значение, “усы” — размах. Таксоны с неясным систематическим положением, требующие дополнительных исследований, не учтены.

пами X, XI и *Dictyosphaerium* sp. ССАР 222/43 составляли 3–4.1%, а методы делимитации видов GMYC, РТР и ABGD подтвердили его самостоятельный таксономический статус.

Топология дерева, представленного в работе, соответствовала более ранним исследованиям (Bock et al., 2011b; Krienitz et al., 2012; Škaloud et al., 2014; Song et al., 2018a, 2018b). Группы II, IV, V, VIII, IX, объединяющие штаммы, идентифицированные как *Dictyosphaerium* sp., соответствовали линиям, выделенным Song и соавт. (2018b). Увеличение выборки представителей клады *Parachlorella*, используемых в анализе (Krienitz et al., 2012 — 36 штаммов, Škaloud et al., 2014 — 30 штаммов, Song et al., 2018a — 67 штаммов, Song et al., 2018b — 105 штаммов, данная работа — 115 штаммов) позволило уточнить филогенетическое положение этих групп, а также способствовало тому, что представители родов с преимущественно *Dictyosphaerium*-подобным морфотипом, колонии которых состояли не более чем из 8 клеток, вошли в состав группы VI. Сравнение рассчитанных генетических дистанций с другими диакритическими признаками (форма клеток, способность формировать колонии, способ крепления клеток к гиалиновым тяжам, тип хлоропласта, количество пиреноидов, присутствие слизи, наличие интронов, уровень генетических различий, наличие СВС в ITS1 и ITS2, среда обитания, кластеризация методами ABGD, GMYC, РТР) позволило уточнить внутривидовые, межвидовые и межродовые уровни различий (рис. 3).

На сегодняшний день в составе клады *Parachlorella* описано с применением совокупности морфологических и молекулярно-генетических методов всего 12 родов и порядка 20 видов, но по результатам проведенного анализа истинное видовое и родовое богатство данной группы оказалось существенно выше — не менее 20 родов и 46 видов. К диакритическим морфологическим признакам, обеспечивающим таксономическое разделение микроводорослей внутри клады, можно отнести размер и форму молодых и взрослых клеток, способ крепления клеток к гиалиновым тяжам, диаметр колоний, наличие и толщина слизи, тип хлоропласта, наличие и количество пиреноидов. Дополнительной экологической характеристикой также может служить специфическое местообитание, например, болота или поверхность почвы. По итогам анализа генетических дистанций нуклеотидных последовательностей 18S–ITS1–5.8S–ITS2 можно предположить, что внутривидовые различия, как правило, находятся в пределах 0–0.2%, межвидовые — в пределах 0.4–2.6%, межродовые — 1.2–4.2%. Представители группы VII (род *Mucidosphaerium*) отличались высоким генетическим полиморфизмом: генетические различия между таксономически признанными видами в этой группе соответствовали диапазону 1.9–4.5%, который являлся межродовым уровнем для других групп клады. Использование интрона в качестве критерия разделения близкородственных видов было эффективно для представителей групп II, IV, VIII, рода *Mucidosphaerium*, а также для штаммов видов *Compactochlorella kochii* и *D. libertatis*. Применение классического СВС-подхода, основанного на поиске СВС исключительно в консервативных регионах ITS2 (Coleman, 2003, 2009, 2015), было успешным только для представителей группы II. Низкую эффективность СВС-подхода для *Parachlorella*-клады отмечали также в своей работе Song и соавт. (2018a, 2018b). В связи с этим, в остальных группах в роли вспомогательного инструмента для разграничения видов были использованы СВС в ITS1 и в неконсервативных регионах ITS2. Кроме того, в качестве молекулярной подписи видов рода *Parachlorella* можно рассматривать мотив, расположенный сразу после вершины III шпильки ITS1: для *P. kessleri* — мотив GCUG, для *P. beijerinckii* — AGCC, для *P. hussii* — GAAA. Используемые алгоритмы делимитации видов имели различные результаты по количеству выделенных кластеров потенциально видового уровня: дистанционный метод ABGD является менее “чувствительным” и выделит 24 кластера, в то время как более совершенные топологические алгоритмы GMYC и РТР — 57 и 55 кластеров соответственно. Следует отметить, что выделенные кластеры по своей сути являются молекулярными оперативными таксономическими единицами (molecular operational taxonomic units, MOTUs), т.е. представ-

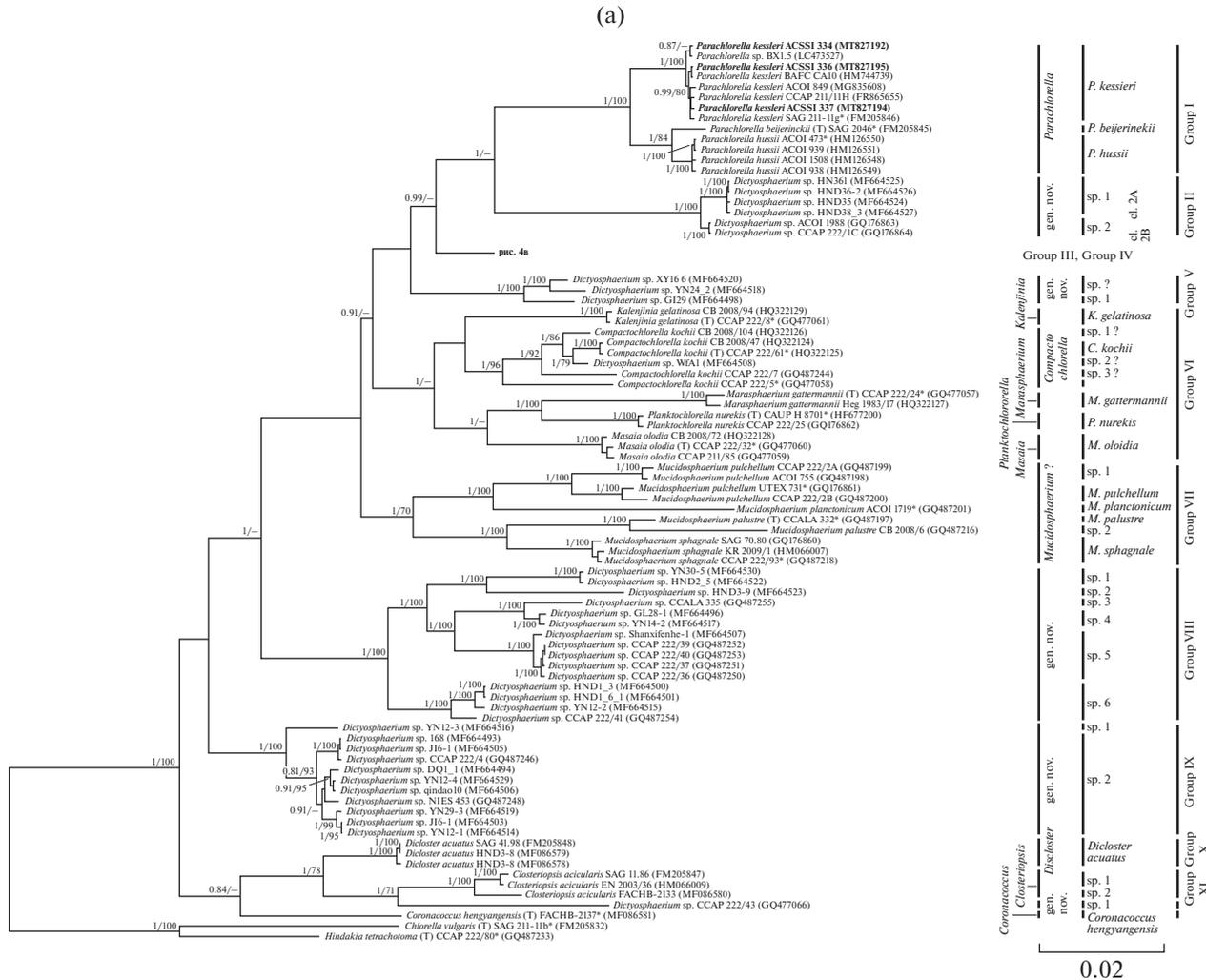


Рис. 4. Предполагаемое разделение родов и видов внутри клады *Parachlorella*. (а) – Клада *Parachlorella*; (б) – группа III и IV. Обозначения: жирным шрифтом выделены штаммы ACSSI, исследуемые в рамках данной работы, * – аутентичные штаммы; (Т) – типовой вид, ? – таксономический статус нуждается в уточнении.

ляют собой предварительные гипотезы о валидности вида, нуждающиеся в подтверждении другими характеристиками. На наш взгляд, GMYC и PTP более реалистично отражают систематику клады *Parachlorella*, являясь эффективным вспомогательным инструментом для разграничения видов, валидность которых была подтверждена также и другими дополнительными признаками.

Таким образом, по результатам кластеризации методами делимитации видов GMYC, PTP и ABGD, наличию/отсутствию интронов и их характеристикам, значению генетических дистанций, сравнению вторичных структур ITS1 и ITS2, нам удалось охарактеризовать 11 групп и 2 филогенетические линии в рамках клады *Parachlorella* и выдвинуть предположения о разделении родов и видов внутри выделенных групп. Предположена полифилетичность видов *D. libertatis*, *D. ehrenbergianum*, *Compactochlorella*

rella kochii, *Mucidosphaerium pulchellum*, *M. palustre*, *Closteriopsis acicularis*. Истинными представителями рода *Dicyosphaerium* могут считаться виды группы III, которые объединились с типовым видом рода – *D. ehrenbergianum*, что согласуется с результатами Song et al. (2018b). Остальные представители рода, определенные как *Dicyosphaerium* sp., но вошедшие в состав групп II, IV, V, VII, VIII, IX, а также штамм CCAP 222/45, формирующие отдельные филогенетические линии, по-видимому, “истинными” членами рода *Dicyosphaerium* не являются, и их таксономическая принадлежность нуждается в дальнейшем изучении и уточнении (рис. 4).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность руководителю коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS

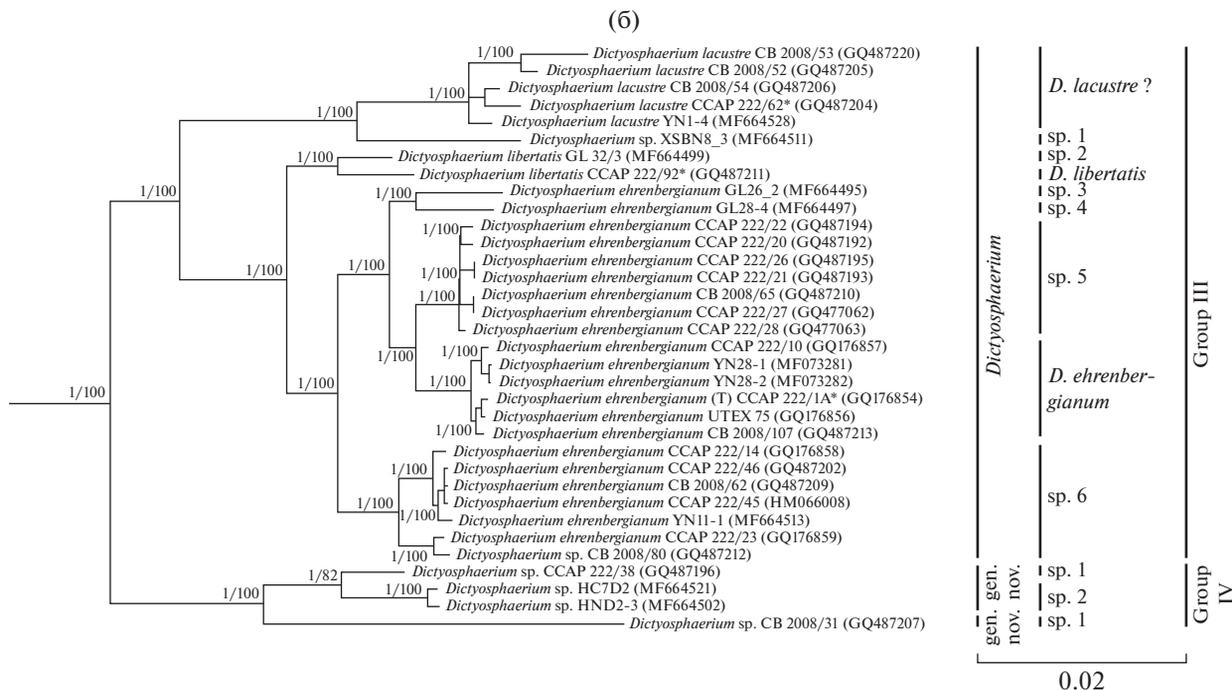


Рис. 4. Окончание

ИФР РАН к. б. н. М.А. Синетовой за предоставление штаммов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Культивирование, микроскопия штаммов АСССИ и анализ литературы выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-60002, молекулярно-филогенетические работы выполнены при поддержке РНФ в рамках проекта № 19-74-00030.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей: учеб. пособие. Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. 152 с.
Кривина Е.С., Темралева А.Д. Проблема идентификации и криптическое разнообразие микроводорослей клады *Chlorella* (*Chlorophyta*) // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 714–727.

Krivina E.S., Temraleeva A.D. Identification problems and cryptic diversity of *Chlorella*-clade microalgae (*Chlorophyta*) // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 720–732.

Aslam Z., Shin W., Kim M.K., Im W.-T., Lee S.-T. *Marinichlorella kaistiae* gen. et sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) based on polyphasic taxonomy // J. Phycol. 2007. P. 576–584.

Belcher J.H., Swale, E.M.F. Some *Chlorococcales* new to Britain // Brit. Phycol. Bull. 1962. V. 2. P. 121–125.

Bock C., Pröschold 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.

Bock C., Pažoutová M., Krienitz L. Phylogenetic position of *Coronastrum ellipsoideum* and description of *Parachlorella hussii* sp. nov. // Biologia. 2011a. V. 66/4. P. 585–594.

Bock C., Pröschold T., Krienitz L. Updating the genus *Dictyosphaerium* and description of *Mucidosphaerium* gen. nov. (*Trebouxiophyceae*) based on morphological and molecular data // J. Phycol. 2011b. V. 47. P. 638–652.

Caisová L., Marin 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. 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.

Coleman A.W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons // Trends Genet. 2003. V. 19. P. 370–375.

- Coleman A.W. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure // Trends Genet. 2015. V. 31. P. 157–163.
- Drummond A.J., Nicholls G.K., Rodrigo A.G., Solomon W. Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data // Genetics. 2002. V. 161. P. 1307–1320.
- 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.
- Fujisawa T., Barraclough T.G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets // Syst. Biol. 2013. V. 62. P. 707–724.
- Gaonkar C.C., Piredda R., Minucci C., Mann D., Montresor M., Sarno D., Kooistra W.H.C.F. Annotated 18S and 28S rDNA reference sequences of taxa in the planktonic diatom family *Chaetocerotaceae* // PLoS One. 2018. V. 13. e0208929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208929>.
- Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 2021. <http://www.algaebase.org>.
- Jao C.-C., Wei Y.X., Hu H.J. *Dicloster*, a new genus of *Chlorococcales* // Acta Hydrobiol. Sin. 1975. V. 6. P. 115–116.
- 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.
- 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.
- Krienitz L., Bock C., Kotut K., Pröschold T. Genotypic diversity of *Dictyosphaerium*-morphospecies (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*) in African inland waters, including the description of four new genera // Fottea. 2012. V. 12. P. 231–253.
- Krienitz L., Bock C., Luo W., Pröschold T. Polyphyletic origin of the *Dictyosphaerium*-morphotype within *Chlorellaceae* (*Trebouxiophyceae*) // J. Phycol. 2010. V. 46. P. 559–563.
- 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.
- Puillandre N., Lambert A., Brouillet S., Achaz G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation // Mol. Ecol. 2012. V. 21. P. 1864–1877.
- Škaloud P., Němcová Y., Pytela J., Bogdanov N.I., Bock C., Pickinpaugh S.H. *Planktochlorella nurekis* gen. et sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*), a novel coccoid green alga carrying significant biotechnological potential // Fottea. 2014. V. 14. P. 53–62.
- Song H., Liu X., Hu Y., Wang Q., Long J., Liu G., Hu Z. *Coronacoccus hengyangensis* gen. et sp. nov., a new member of *Chlorellaceae* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) with *Radiococcean* morphology // Phycologia. 2018a. V. 57. P. 363–373.
- Song H., Qinghua Wang Q., Liu X., Hu Y., Long J., Guoxiang Liu G., Hu Z. Phylogenetic diversity and taxonomic problems of the *Dictyosphaerium* morphotype within the *Parachlorella* clade (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*) // J. Eukaryot. Microbiol. 2018b. V. 65. P. 382–391.
- Temraleeva A., Moskalenko S., Mincheva E., Bukin Y., Sinetova M. *Spongiosarcinopsis terrestris* gen. et sp. nov. (*Chlorophyta*, *Chlorophyceae*): a new genus of green algae from gray forest soil, Russia // Phytotaxa. 2018. V. 376. P. 291–300.
- Ustinova I., Krienitz L., Huss V.A.R. *Closteriopsis acicularis* (G.M. Smith) Belcher et Swale is a fusiform alga closely related to *Chlorella kessleri* Fott et Nováková (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*) // Eur. J. Phyco. 2001. V. 36. P. 341–351.
- Yamamoto M., Kurihara I., Kawano S. Late type daughter cell wall synthesis in one of the *Chlorellaceae*, *Parachlorella kessleri* (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*) // Planta. 2005. V. 221. P. 766–775.
- Zhu X.C., Chen J., Chen R., Jiang L.Y., Qiao G.X. DNA barcoding and species delimitation of *Chaitophorinae* (*Hemiptera*, *Aphididae*) // ZooKeys. 2017. V. 656. P. 25–50.
- 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. 2016a. V. 11. e0153833.
- Zou S., Fei C., Wang C., Gao Z., Bao Y., He M., Wang C. How DNA barcoding can be more effective in microalgae identification: a case of cryptic diversity revelation in *Scenedesmus* (*Chlorophyceae*) // Sci. Rep. 2016b. V. 6. P. 1–13.

Species Delimitation and Cryptic Diversity Analysis of *Parachlorella*-Clade Microalgae (*Chlorophyta*)

E. S. Krivina¹*, A. D. Temraleeva¹, and Yu. S. Bukin²

¹Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Pushchino, 142290 Russia

²Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

*e-mail: pepelisa@yandex.ru

Received January 27, 2021; revised March 17, 2021; accepted March 22, 2021

Abstract—This article discusses the system of green microalgae of the clade *Parachlorella*, based on morphological, ecological, and molecular genetic data. The diagnostic characteristics of the selected genera and species and the systematic position of some taxa are discussed. Molecular phylogenetic analysis of the *Parachlo-*

rella clade has shown that, despite the relative simplicity of morphology, it is characterized by high cryptic diversity. The polyphyletic nature of the genus *Dictyosphaerium* and some species (*D. libertatis*, *D. ehrenbergianum*, *Compactochlorella kochii*, *Mucidosphaerium pulchellum*, *M. palustre*, and *Closteriopsis acicularis*) was shown. The use of the intron as a universal criterion for closely related species was effective for representatives of groups II, IV, VII, and VIII, as well as for strains of the species *Compactochlorella kochii* and *D. libertatis*. The application of the classical CBC approach, based on the search for CBC in conservative ITS2 regions, was successful only for the representatives of group II. The results of analysis of genetic distances and the GMYC, PTP, and ABGD species delimitation algorithms are not universal tools for determining species boundaries and need to be confirmed by other characteristics (cell shape, ability to form colonies, the way the cells attach to hyaline interconnecting strands, the type of chloroplast, the number of pyrenoids, the presence of mucilage, the presence/absence of introns, the level of genetic differences, the presence of CBC in ITS1 and ITS2, the habitat). Due to the combined use of morphological, ecological and genetic features, it was possible to characterize 11 groups and 2 phylogenetic lines within the clade *Parachlorella* and to make assumptions about the division of genera and species within the selected groups.

Keywords: microalgae, morphology, ecology, phylogeny, 18S–ITS1–5.8S–ITS2, differentiation of species