

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2016, 26(4): 347–371

doi.org/10.15407/alg26.04.347

УДК 582.26:581.5/.9(477)

МИХАЙЛЮК Т.И.¹, ВИНОГРАДОВА О.Н.¹, ГЛАЗЕР К.², КАРСТЕН У.²¹Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
ул. Терещенковская, 2, Киев, 01004, Украина²Университет г. Росток, Ин-т биол. наук, отдел приклад. экологии и фикографии,
ул. Альберта Эйнштейна, 3, Росток D-18057, Германия

t-mikhailyuk@ukr.net

НОВЫЕ ТАКСОНЫ ДЛЯ ФЛОРЫ УКРАИНЫ В КОНТЕКСТЕ СОВРЕМЕННЫХ ПОДХОДОВ К СИСТЕМАТИКЕ *CYANOPROKARYOTA/CYANOBACTERIA*

В биологических почвенных корочках из приморских экотопов Украины выявлены интересные морфотипы цианобактерий. По результатам молекулярно-филогенетического анализа они оказались представителями недавно описанных родов из порядков *Synechococcales* (*Oculatella* Zammit, Bille et Albertano и *Nodosilinea* Perkerson et Casamatta) и *Nostocales* (*Roholtiella* Bohunická, Pietrasiak et Johansen). В филогенетическом анализе по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК все оригинальные штаммы включались в клады соответствующих родов с высокой степенью поддержки в Байесовском анализе и анализе максимального правдоподобия. Установление видовой принадлежности выделенных штаммов по морфологическим и генетическим признакам было успешным лишь в отношении одного штамма из рода *Roholtiella*. Филогенетический анализ по участку 16S рРНК, связанному с регионом 16S-23S ITS, оригинального штамма и 12 опубликованных штаммов *Roholtiella* показал, что украинский штамм входит в кладу, соответствующую виду *R. edaphica* Bohunická et Lukešová. Его вторичная структура хеликсов рРНК участка 16S-23S ITS, используемых в таксономии цианопрокариот, а также прилегающих к ним последовательностей в целом соответствует *R. edaphica*. Оригинальные штаммы родов *Oculatella* и *Nodosilinea* Perkerson et Casamatta оказались достаточно близкими между собой по нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК, в то же время на филограммах, построенных с использованием данных по региону 16S-23S ITS оригинальных и опубликованных штаммов этих родов, они образуют обособленные от других видов и высоко поддержанные клады, вероятно, являющиеся еще не описанными видами. Обнаружение с использованием полифазного подхода трех новых родов для флоры Украины свидетельствует о важности применения современных методов для оценки реального разнообразия цианобактерий в природе.

Ключевые слова: *Oculatella*, *Nodosilinea*, *Roholtiella*, цианобактерии, новые находки, Украина, молекулярная филогения, 16S рРНК, 16S-23S ITS, вторичная структура 16S-23S ITS.

© Михайлюк Т.И., Виноградова О.Н., Глазер К., Карстен У., 2016

Введение

Изучение альгофлоры Украины, охватывающее представителей всех отделов водорослей, продолжается уже больше столетия, благодаря чему накоплено огромное количество сведений об их видовом и систематическом составе, экотопическом и географическом распределении (Algae of Ukraine, 2006–2014). Синезеленым водорослям были посвящены многочисленные флористико-таксономические и эколого-гидробиологические исследования во всех природно-ботанических зонах страны и в широком диапазоне местообитаний (континентальные водоемы и почвы разных типов, гипергалинные экосистемы, украинские сектора Азовского и Черного морей). С территории Украины описано 64 новых для науки таксона (33 вида и 31 разновидность и форма). Благодаря трудам выдающегося украинского цианофикола Н.В. Кондратьевой и ее учеников были подготовлены выпуски определителя пресноводных водорослей Украины, посвященные *Cyanophyta* (Кондратьева, 1968; Кондратьева та ін., 1984), которые послужили катализатором дальнейшего разностороннего исследования синезеленых водорослей в Украине. К 2005 г. было выявлено достаточно высокое видовое разнообразие представителей прокариотических оксифототрофов: 626 видов, представленных 781 формой (включая номенклатурный тип вида) из 77 родов. Имеющиеся сведения, несомненно, имеют важное научное значение и могут рассматриваться как достойный итог «ботанического» этапа в изучении синезеленых водорослей Украины. Однако для дальнейшего познания их разнообразия необходимо применение новых подходов, возникших на современном этапе развития цианологии, и с учетом требований, которые ставит перед фикологами новая эра молекулярной систематики.

После признания бактериальной природы синезеленых водорослей для их изучения ученые стали применять многие приемы из арсенала бактериологов. Главные из них – необходимость работы с чистыми культурами и использование полифазного или комплексного подхода. Последний, в дополнение к изучению морфологии штамма, подразумевает также обязательное изучение многих аспектов его биологии и экологии (в т.ч. состав нуклеотидных оснований ДНК, ДНК-ДНК гибридизация, подвижность, лимитирующее влияние факторов окружающей среды и др.). Использование молекулярных методов способствовало пониманию важной роли горизонтального переноса генов и гомологичной рекомбинации ДНК в циано-бактериальном видообразовании (Polz et al., 2013; Sogge et al., 2013; Dvořák et al., 2015), а также осознанию того, что морфологических признаков недостаточно для точного разграничения видов. Изучение нуклеотидной последовательности гена 16S *r*PHK и района 16S-23S ITS позволило выявлять более тонкие отличия между таксонами со сходной морфологией, а также обосновать идею криптического видообразования

у цианобактерий (Bover et al., 2002; Casamatta et al., 2003). Оказалось, что в рамках классической фенетической концепции вида, опирающейся на морфологические и экологические признаки, невозможно описать реальное разнообразие цианобактерий, к тому же эта концепция допускает существование полифилетических таксонов, что противоречит принципам филогенетической систематики.

Во флоре пресных вод Европы (Komárek, Anagnostidis, 2005) вид у цианопрокариот был охарактеризован как группа природных популяций (или культуральных штаммов), принадлежащих к одному генотипу, имеющая стабильные четко очерченные фенотипические признаки и одинаковые экологические требования. В то же время исследования цианобактерий с применением полифазного подхода и молекулярно-филогенетического анализа убедительно свидетельствовали, что генетическое разнообразие внутри многих клад превышает морфологическое (Nubel et al., 2000; Abed et al., 2002; Taton et al., 2003; Gugger et al., 2005; и др.), поэтому следует искать новые критерии для описания видов. Дж. Йохансен и Д. Казаматта (Johansen, Casamatta (2005), исходя из достижений молекулярной систематики и признавая объективную необходимость выявления реального цианобактериального разнообразия, предложили для этой группы новую парадигму: вид – это наименьшая монофилетическая группа, имеющая аутапоморфию (т. е. новый эволюционный признак, который является уникальным для конкретного вида). Эта концепция основана на понятии эволюционного вида по Дж. Симпсону (вид – это группа популяций, имеющая собственную эволюционную судьбу), которая позднее была развита сторонниками кладистической систематики в филогенетическую концепцию вида, рассматривающую вид как наименьшую ветвь (кладу), которую диагностически можно отличить от других клад в ряду отношений «предок-потомок» по любому генетическому или фенотипическому признаку (Donoghue, 1985; Wheeler, Meier, 2000). Монофилетическая концепция вида по Дж. Йохансену и Д. Казаматте дает четкое определение (дефиницию) вида у цианобактерий и при этом позволяет описывать новые таксоны по правилам Ботанического кодекса (Кодекса номенклатуры водорослей, грибов и бактерий), что уже оценили многие таксономисты, использующие эту концепцию в своих ревизиях (Dvořák et al., 2015). Сочетание полифазного подхода, новых молекулярных маркеров и монофилетической концепции вида способствовало прорыву в систематике цианобактерий, было описано значительное число новых таксонов. Благодаря этому активно обновляется систематическая структура отдела и создаются предпосылки для разработки новой классификационной системы (Komárek et al., 2014).

К настоящему времени на основе полифазного подхода описано около полусотни новых родов цианобактерий (www.algaebase.org). Многие из них включают виды, поменявшие родовую принадлежность в результате таксономических комбинаций, т.е. фактически эти роды уже

были известны для флоры Украины. Например, род *Coleofasciculus* M. Siegesmund, Johansen et Friedl был описан в результате молекулярно-филогенетической ревизии рода *Microcoleus*, его типовый вид – *Coleofasciculus chthonoplastes* (Gomont) M. Siegesmund Johansen et Friedl (Siegesmund et al., 2008). Как известно, эугалобный вид *Microcoleus chthonoplastes* – космополит, который часто встречается в гипергалинных местообитаниях нашей страны (Виноградова, 2012). Однако есть целый ряд родов и видов, которые ранее не были известны науке. К ним, среди прочих, относятся такие роды, как *Oculatella* Zammit, Billi et Albertano, *Nodosilinea* Perkinson et Casamatta и *Roholtiella* Bohunická, Pietrasiak et Johansen, представители которых были выявлены нами в ходе изучения биологических корочек, развивающихся в приморских экотопах Украины и Германии. Наша статья посвящена описанию этих интересных находок.

Материалы и методы

Места исследования, отбор проб. Объектом для исследования послужили штаммы цианопрокариот, выделенные из биологических почвенных корочек, отобранных на побережье Азовского моря в районе Казантипского природного заповедника (Ленинский р-н, Крым) и Черного моря вблизи Дунайского биосферного заповедника (Кикийский р-н, Одесская обл.). Для сравнения использовали также оригинальные штаммы, полученные из корочек, собранных на побережье Балтийского моря в Германии (земля Мекленбург и Передняя Померания) (табл. 1).

Фрагменты корочек (размером около 6 × 6 см) отбирали скальпелем, по возможности, в неповрежденном виде и переносили в бумажные коробочки или чашки Петри. В лаборатории пробы высушивали и хранили в темноте. Камеральная обработка проб, включающая культуральные, морфологические и молекулярно-филогенетические исследования, проведена в лаборатории прикладной экологии и фикологии университета г. Росток (Германия).

Выделение штаммов, условия культивирования, световая микроскопия. Небольшое количество проб высевали на поверхность агаризованной среды Болда (1N BBM) (Bischoff, Bold, 1963), культуры выращивали в стандартных лабораторных условиях, с 12-часовым чередованием световой и темновой фаз и освещением 25 мкмоль фотонов · м⁻² · с⁻¹ при температуре +20±5 °С. Альгологически чистые культуры цианобактерий выделяли, используя стереомикроскоп Olympus ZS40 (Токуо, Япон) с последующей очисткой путем многократных пересевов. Очищенные штаммы содержали в тех же условиях, на средах 1N BBM и BG-11 (Stanier et al., 1971). Морфологические признаки молодых (2–4 недели) и старых (2–6 месяцев) культур цианобактерий исследовали с помощью световых микроскопов Olympus IX70 и BX51 с дифференциальной интер-ференционной оптикой Номарского (DIC).

Микрофотографии были сделаны с помощью камер ColorView II и Olympus UC30, присоединенных к микроскопам, и обработаны с использованием программного обеспечения analySIS и cellSens Entry.

Таблица 1

**Краткая характеристика мест отбора образцов, из которых были выделены
исследованные штаммы цианобактерий**

Штамм	Место сбора	Дата
<i>Nodosilinea</i>		
Prim-5-5	Побережье Черного моря, песчаные дюны выше зоны пляжа, разреженная травянистая растительность, на открытых местах нежная зеленоватая корочка, образованная цианобактериями с небольшой примесью эвкариотических водорослей	01.09.2013
Ru-6-11	Побережье Балтийского моря, о. Рюген, песчаные дюны, разреженная травянистая растительность, плотные корки с доминированием <i>Microcoleus vaginatus</i> Gomont ex Gomont и <i>Klebsormidium flaccidum</i> (Kütz.) Silva, Mattox et Blackwell.	08.10.2013
WD-4-2	Побережье Балтийского моря, Варнемюнде, песчаные дюны выше зоны пляжа, разреженная травянистая растительность, биологическая корочка с доминированием мхов	05.03.2013
Us-2-1	Побережье Балтийского моря, о. Усдом, песчаные дюны, разреженная травянистая растительность, плотные темно-сине-зеленые корки с доминированием цианобактерий	08.10.2013
<i>Oculatella</i>		
KZ-5-4-1	Побережье Азовского моря, окрестности Казантипского природного заповедника, пересыпь Акташского озера, ракушечниковый пляж, в 10 м от кромки воды, цианобактериально-водорослевые корочки с доминированием <i>Nostoc edaphicum</i> Kondrat.	08.08.2012
KZ-7-1-4	Побережье Азовского моря, окрестности Казантипского природного заповедника, пересыпь Акташского озера, ракушечниковый пляж, в 10 м от кромки воды, цианобактериально-водорослевые корочки с доминированием <i>Nostoc edaphicum</i> и <i>Hassalia</i> sp.	08.08.2012
<i>Roholtiella</i>		
KZ-5-4-5	Побережье Азовского моря, окрестности Казантипского природного заповедника, пересыпь Акташского озера, ракушечниковый пляж, в 10 м от кромки воды, плотные корки с доминированием <i>Nostoc edaphicum</i>	08.08.2012

Экстракция ДНК, ПЦР и секвенирование. Геномная ДНК штаммов цианобактерий была экстрагирована с помощью специального набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), следуя инструкциям его изготовителя. Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК вместе с 16S-23S ITS регионом (от 1700 до 2300 оснований) были амплифицированы с помощью набора Taq PCR Mastermix Kit (Qiagen GmbH) и праймеров SSU-4-forw и ptLSU C-D-rev (Marin et al., 2005) в термоциклере T gradient Thermoblock (Biometra, Germany). ПЦР содержала 30 циклов: начальная денатурация – 3 мин при 96 °С, циклическая повторяющаяся денатурация – 1 мин при 96 °С, отжиг – 2 мин при 55 °С, и удлинение фрагмента – 3 мин при 68 °С. Затем следовало финальное удлинение фрагмента – 7 мин при 68 °С. Продукты ПЦР были очищены с использованием набора Qiagen PCR purification kit (Qiagen GmbH), следуя инструкциям его изготовителя. Очищенные продукты ПЦР секвенированы на коммерческой основе компанией Qiagen, с использованием праймеров SSU-4-forw, Wil 6, Wil 12, Wil 14, Wil 5, Wil 9, Wil 16 и ptLSU C-D-rev (Wilmotte et al., 1993; Marin et al., 2005). Нуклеотидные последовательности использованных праймеров и ссылки на соответствующие литературные источники даны в табл. 2. Полученные последовательности собраны и отредактированы с помощью программного обеспечения Geneious (версия 8.1.8; Biomatters). Они депонированы в GenBank под инвентарными номерами KY098843-KY098849.

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности использованных праймеров

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Источник
SSU-4-forw	GATCCTKGCTCAGGATKKACGCTGGC	Marin et al., 2005
ptLSU C-D-rev	GCCGGCT CATCTTCAAC	Marin et al., 2005
Wil 6	GCCAGCAGCCGCGGTAA	Wilmotte et al., 1993
Wil 12	GYAACGAGCGCAACCC	Wilmotte et al., 1993
Wil 14	TGTACACACCGCCCGTC	Wilmotte et al., 1993
Wil 5	CTGCTGCCTYCCGTA	Wilmotte et al., 1993
Wil 9	GGGGTATCTAATCCC	Wilmotte et al., 1993
Wil 16	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	Wilmotte et al., 1993

Филогенетические анализы. Для сравнения с 7 оригинальными штаммами было использовано 58 нуклеотидных последовательностей представителей порядка *Synechococcales* и 67 *Nostocales* из базы данных GenBank (NCBI). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей для филогении по гену 16S *r*РНК осуществляли с использованием веб сервера Mafft (версия 7, Katoh, Standley, 2013) и последующим редактированием вручную в программе BioEdit (версия 7.2). Выравнивание для филогении по участку 16S-23S ITS выполнено вручную в BioEdit, с учетом вторичной структуры РНК данного региона. Эволюционная модель, которая наилучшим образом подходит к используемым базам данных, была выбрана на основе наименьшего индекса АИС (Akaike, 1974), вычисленного в программе MEGA (версия 6, Tamura et al., 2013).

Филогенетические деревья построены в программе MrBayes 3.2.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003), с использованием эволюционной модели GTR+G+I, с 5,000,000 генераций. Два прогона из четырех марковских цепей по методу Монте-Карло были выполнены одновременно, с деревьями, отбираемыми каждые 500 генераций. Разделение частот между прогонами в конце вычисления было ниже 0.01. Деревья, отобранные до того, как показатель правдоподобия достиг насыщения, были впоследствии отбракованы. Надежность топологии деревьев подтверждена анализом максимального правдоподобия (ML), выполненным в программе GARLI 2.1 (March, 2011).

Вторичная структура РНК. Модель вторичной структуры РНК участка 16S-23S ITS оригинального штамма *Roholtiella* была построена по предварительно опубликованным данным (Bohunická et al., 2015). Хеликсы были свернуты в режиме онлайн с помощью программы mfold (Zuker, 2003), а их визуализация осуществлена в программе Pseudoviewer (Byun, Han, 2009).

Результаты и обсуждение

Морфологическое изучение выделенных штаммов позволило предположить, что они относятся к трем недавно описанным родам из порядков *Synechococcales* (*Oculatella* и *Nodosilinea*) и *Nostocales* (*Roholtiella*), изученным с применением полифазного подхода. Каждый из этих родов обладает четко выраженными апоморфиями, позволяющими с уверенностью отнести к ним наши образцы (рис. 1). Последующее молекулярно-биологическое исследование украинских штаммов подтвердило их родовую принадлежность. Рассмотрим подробнее каждый из обнаруженных родов.

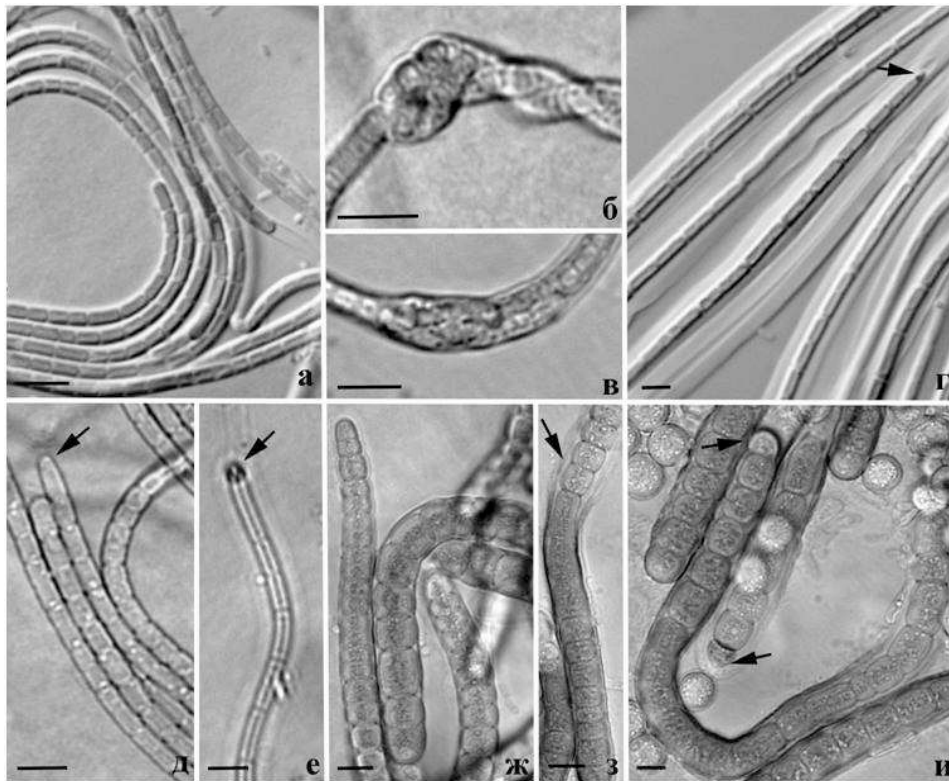


Рис. 1. Морфология исследованных штаммов, представляющих новые таксоны для флоры Украины. *Nodosilinea* sp.: а – общий вид нитей, б, в – узелкообразные структуры, обусловленные делением клеток в нескольких плоскостях; *Oculatella* sp.: г, е – вид нитей в старой культуре, видны четкие влагалища (г), д – нити в молодой культуре, видны грануляции возле клеточных перегородок, стрелка указывает на красное светочувствительное включение; *Roholtiella edaphica*: ж – общий вид нитей, з – образование артроспор (стрелка) на конце нити, и – гетерополярные трихомы с гетероцистами (стрелки). Шкала 5 мкм

Род *Nodosilinea* Perkinson et Casamatta 2011 (рис. 1, а–в)

Установлен по результатам филогенетического анализа представителей порядка *Synechococcales*, в ходе которого была обнаружена хорошо поддержанная клада, куда вошли морфотипы, соответствующие описанию рода *Leptolyngbya*, но отличающиеся от него генетически и филогенетически (Perkinson et al., 2011). У штаммов этой клады была выявлена общая морфологическая синапоморфия: способность трихомов образовывать узелки по длине нити. Ранее данный признак в качестве таксономического был известен лишь для вида *Leptolyngbya nodulosa* Z. Li et J. Brand, который стал типовым видом рода *Nodosilinea*. Пока описано четыре вида этого рода, из которых два ранее были известны как виды *Leptolyngbya* (*N. nodulosa* (Z. Li et J. Brand) Perkinson et Casamatta и *N. bijugata* (Kong.) Perkinson et Kováčik), а два – новые для науки виды. Мы обнаружили морфотипы с узелками в био-

логических корочках с побережья Черного и Балтийского морей. Ниже приводим их описание:

Таллом сине-зеленого цвета в виде тонкого мата, диффузно распространяющегося от центра чашки и проникающего в глубь агара. Нити извилистые, как правило неразветвленные, изредка с ложными ветвлениями, в условиях низкой освещенности образуют узелки. Влагалища присутствуют всегда. Влагалище обычно тонкое, бесцветное, плотно прилегающие к трихому. Трихомы сине-зеленые, неподвижные, (1,1)1,3-1,7(2,1) мкм шир., слабо перетянуты у клеточных перегородок, без некридий, без меристематических зон, деление клеток происходит по всему трихому, на узелковых участках клетки, очевидно, делятся больше чем в одной плоскости. Часто наблюдалось образование гормогониев. Клетки округло-цилиндрические, с периферическими тилакоидами, без грануляций, длина их 1,7–2,6 мкм, обычно равна или больше ширины. Конечные клетки округлые.

В культурах украинского и немецких штаммов мы наблюдали морфологические признаки, характерные для рода *Nodosilinea* – деление клеток в нескольких плоскостях и формирование узелкообразных структур. Их родовой статус был подтвержден также филогенетическим анализом с использованием последовательностей гена 16S рРНК (рис. 2). В целом, полученное дерево порядка *Synechococcales* соответствует результатам, других ученых, изучавших филогенетические взаимоотношения внутри порядка (Perkerson et al., 2011; Mühlsteinová et al., 2014; Osorio-Santos et al., 2014; Patzelt et al., 2014; и др.). Наши штаммы, отнесенные по морфологическим признакам к роду *Nodosilinea*, на филогенетическом дереве присоединились к уже известным штаммам и видам данного рода, образовав обособленную кладу (см. рис. 2). Как видно из рисунка, оригинальные штаммы *Nodosilinea*, как украинский, так и немецкие, оказались достаточно близкими между собой по нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК.

Видовая идентификация обнаруженного украинского штамма пока не завершена. Его морфологические признаки имеют отличия от уже известных видов *Nodosilinea*, а решить этот вопрос путем филогенетического анализа по участку 16S-23S ITS не удалось, т. к. полученная нуклеотидная последовательность украинского штамма была слишком короткой и не содержала большей части анализируемого участка.

Род *Oculatella* Zammit, Billi et Albertano 2012 (рис. 1, *z-e*).

Описан в результате комплексного изучения субаэрофитных штаммов из подземелий Италии и Мальты и первоначально позиционировался как представитель гипогейной биоты Средиземноморья. Молекулярный и филогенетический анализы, основанные на нуклеотидных последовательностях 16S рРНК, выявили кластер, обособленный на родовом уровне, причем все исследованные штаммы имели высокий уровень генетического сходства (99% и выше).

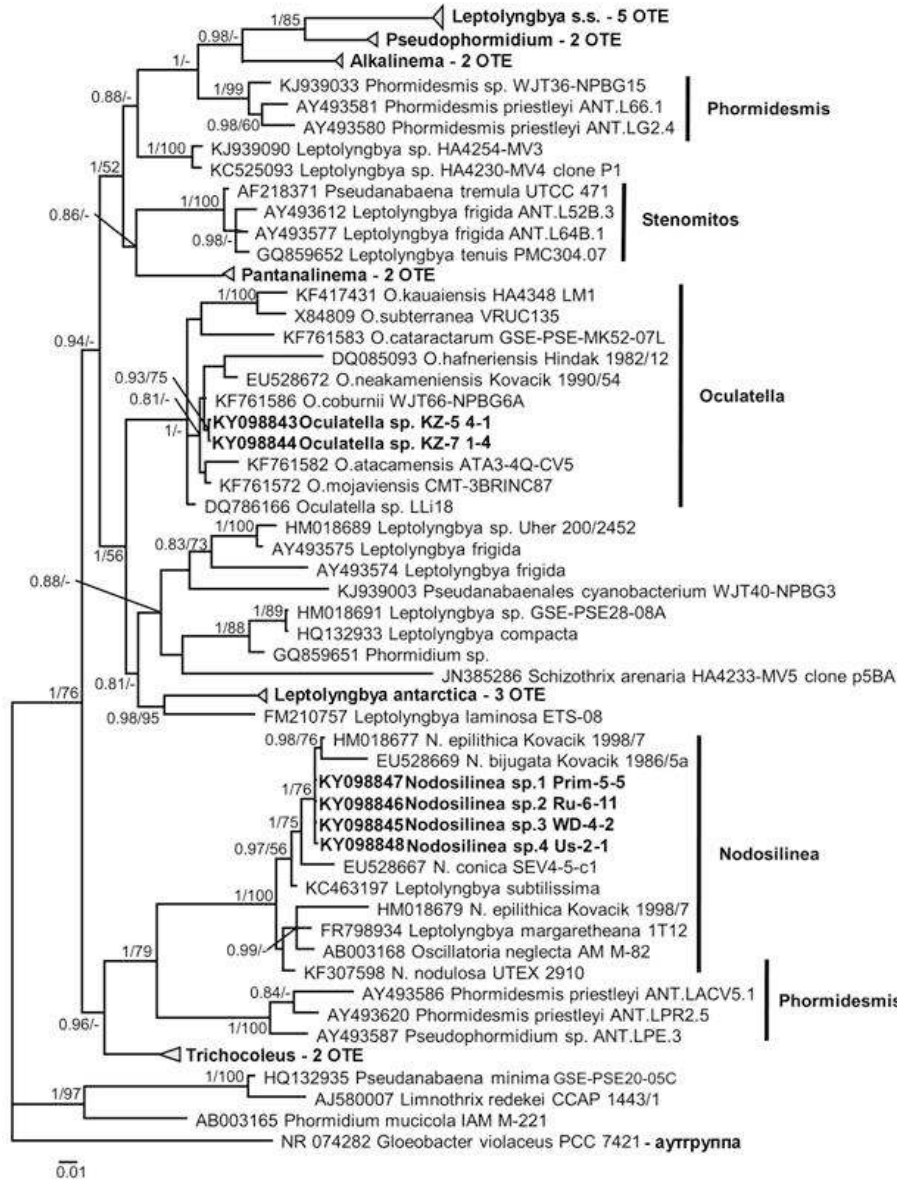


Рис. 2. Молекулярная филогения *Synechococcales* на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Филогенетическое дерево построено Байесовским методом с указанием значений Байесовской вероятности (Bayesian Posterior Probabilities (PP), слева) и поддержки бутстрепа при анализе максимального правдоподобия (Maximum Likelihood bootstrap support (BP), справа). Показаны только значения PP выше 0,8 и BP выше 50%. Оригинальные последовательности штаммов цианобактерий отмечены жирным шрифтом. Определение клад дано согласно работам Osorio-Santos et al., 2014; Miscoe et al., 2016. OTE – операционная таксономическая единица

Ввиду этого, а также наличия четких морфологических отличий, был описан род *Oculatella*, для которого авторы указали три аутопоморфы, отличающие его от всех других родов: пурпурно-красная окраска клеток и трихомов, обязательное наличие оранжевой светочувствительной структуры на кончике зрелых конечных клеток трихома и субаэрофитное существование в подземных местообитаниях с ограниченной освещенностью (Zammit et al., 2011). Голотипом рода стал вид *Oculatella subterranea* Zammit, Billi et Albertano, ранее известный как *Leptolyngbya* «Albertano/Kovacik красная» 1997 (под этим названием был включен во «Флору пресных вод Европы»; Komárek, 2005). Однако вскоре монотипность и узкая экологическая специализация *Oculatella* были опровергнуты. В результате изучения штаммов, генетически относящихся к этой кладе, но лишенных красно-пурпурной окраски и обитающих в разнообразных негипогейных местообитаниях, расположенных на трех континентах и острове в Тихом океане, было продемонстрировано их значительное морфологическое, генетическое и экологическое разнообразие (Osorio-Santos et al., 2014). Основываясь на монотипической концепции вида, было описано 7 новых видов *Oculatella*, из которых четыре – обитатели почв пустыни, а остальные – из более влажных местообитаний, включая пресное озеро. Таким образом, в современном понимании уникальным признаком рода *Oculatella* является красноватое светочувствительное включение на конце трихома.

Именно этот признак был выявлен нами у штаммов, выделенных из биологических корочек, развивавшихся на побережье Азовского моря. Ниже мы приводим морфологическое описание изученных образцов.

Таллом в виде тонкого налета сине-зеленого цвета на поверхности агара. Нити извилистые, неразветвленные, (3,0)4,3–6,5 мкм шир. Влагалища наблюдаются часто, особенно в старых культурах, достаточно широкие, иногда содержат более одного трихома. Трихомы сине-зеленые, длинные, не суживаются к концам, 1,1–1,8(2,5) мкм шир., у клеточных перегородок слабо перетянуты (в молодых культурах) или не перетянуты, иногда с грануляциями. Некридии отсутствуют. Длина клеток больше ширины (в молодых культурах – лишь немного больше), (2,5)3,0–6,5 мкм, цитоплазма не гранулирована, тилакоиды четкие, пристенные, заметны в световом микроскопе. В молодых культурах наблюдалась некоторая подвижность трихомов. Зрелые конечные клетки четко конические, более длинные, чем вегетативные, 3,2–7,1 мкм дл., с красновато-оранжевым пятном на верхушке клетки.

Морфологически и филогенетически (по гену 16S рРНК, см. рис. 2) наши штаммы полностью соответствуют описанию рода *Oculatella* (Zammit et al., 2011). Украинские штаммы *Oculatella* оказались идентичными по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК; они присоединились к уже известным видам этого рода, образовав отдельную обособленную кладу с высокой поддержкой. Морфологически и по последовательности участка 16S-23S ITS (не приводится)

украинские штаммы отличаются от всех известных видов этого рода, вероятно, представляя собой новый для науки вид *Oculatella*. Более детально вопросы таксономического статуса украинских штаммов *Oculatella* мы обсудим в следующей статье.

Род *Roholtiella* M. Bohunická, N. Pietrasiak et J.R. Johansen 2015 (см. рис. 1, ж–и)

Описан по результатам разностороннего исследования 16 штаммов морфологически четко обособленных гетероцитных цианобактерий из различных местообитаний Чехии, России и США. Очень интересный род, в котором сочетаются признаки, всегда служившие диагностическими при разграничении семейств порядка *Nostocales*: для *Nostocaceae* – это наличие обильной слизи вокруг колоний, сильно перетянутые трихомы и образование цепочек артростор без закономерной связи с гетероцистами; для *Scytonemataceae* – трихомы с цилиндрическими клетками и ложное ветвление, а для *Rivulariaceae* – гетерополярные трихомы, суживающиеся к одному из концов. После внедрения молекулярных методов в систематику цианобактерий, исследуя филогенетические взаимоотношения гетероцитных форм, иногда получали деревья, в которых штаммы, наделенные вышеперечисленными признаками, оказывались в одной кладе (Rajaniemi et al., 2005; Johansen et al., 2014). Эти факты часто воспринимали как результат неверного определения некоторых штаммов, последовательности которых помещены в Генбанк. Это признавали проблемой, но только после обнаружения в Коста-Рике гетерополярных нитей с ложным ветвлением, которые по молекулярным маркерам оказались близки не к *Calothrix* C. Agard, а к роду *Tolypothrix* Kütz., и описания рода *Calochaete* Nauer, Bohunická et Mühlsteinová (2013), возникло понимание того, что в природе могут существовать генотипы с морфологией, неожиданной для традиционной цианосистематики (Bohunická et al., 2015). Мы обнаружили гетерополярную ложноветвящуюся цианобактерию в образцах биологических корочек, которые развивались на поверхности ракушечника на побережье Азовского моря. Ниже приводим морфологическое описание украинского штамма *Roholtiella*.

В культуре таллом оливково-зеленый до коричнево-зеленого и красновато-коричневого, плоский, распростертый, иногда с видимыми на поверхности пучками нитей, в старых культурах неровной пористой поверхностью напоминает разрастания ностока, врастает в агар, иногда окрашивает его в коричневый или коричнево-красный цвет. Нити короткие до умеренно длинных, как правило, с одиночными ложными ветвлениями, изополярные или гетерополярные. Влагалища тонкие, иногда расширенные, закрытые на концах или расплывающиеся, открытые, когда выходят артросторы, от бесцветных до красноватых или красно-коричневых. Трихомы перетянуты у клеточных перегородок, отчетливо и постепенно сужаются к концу, слегка расширены у основания, в самом широком месте 5,3–7,1(8,9) мкм шир.

Клетки бочонковидные до почти шаровидных или сжато-шаровидных, с однородным или нежно гранулированным содержимым, оливково-зеленые до красноватых, обычно короткие, иногда изодиаметрические или несколько удлиненные, 2,9–6,4(7,9) мкм дл. Конечные клетки округло-конические или округлые, 2,9–6,4 мкм шир., 3,6–7,5 мкм дл. Гетероцисты наблюдали только терминальные, полушаровидные, с бледно-желтым содержимым, 4,3–5,3 мкм шир., 3,6–4,3 мкм дл. Гормогонии короткие, их клетки 5,3–6,4 мкм шир., 3,6–5,7 мкм дл. Артроспоры образуются цепочками, обычно 5,3–6,8 мкм шир., 4,3–5,3 мкм дл., высвобождаются на концах нити путем диссоциации.

Сравнение нашего штамма с уже описанными видами *Roholtiella* (табл. 3) показало, что по внешнему виду нитей, строению и окраске влагалища, размерным признакам он наиболее близок с типовым видом рода *Roholtiella* – *R. edaphica* Bohunická et Lukešová. Штаммы этого вида были выделены из разнообразных почв (включая почву угольных отвалов в стадии рекультивации, а также степные и лесные почвы) Европы (Чехия), Азии (Россия: Башкирия) и Северной Америки (США). Как указано в протологе, от других видов рода *R. edaphica* отличается заметным утолщением трихома под базальной гетероцистой, что мы изредка наблюдали в наших культурах. О калотриксобразном виде с базальной гетероцистой и расширением у основания также упоминается в описании *R. mojaviensis*, однако для этого вида характерны ярко-сине-зеленая окраска таллома, короткие нити и более последовательно сужающиеся трихомы, что отличает его от всех остальных видов и нашего штамма. Экологически наш штамм отличается от всех известных штаммов *Roholtiella* (см. табл. 2): все они, как аквальные, так и террестриальные, обитали в условиях нормальной солености, а наш штамм был выделен из биологической корочки, обнаруженной на ракушечном пляже у Азовского моря. Поэтому для окончательного решения вопроса видовой принадлежности украинского штамма был необходим молекулярно-филогенетический анализ.

Филогенетический анализ гетероцитных цианопрокариот порядка *Nostocales* по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (рис. 3), включающий наши оригинальные данные, в целом соответствует филогении этого порядка (Casamatta et al., 2006; Hauer et al., 2013, 2014; Bohunická et al., 2015; Berrendero et al., 2016; и др.). Наш штамм, отнесенный по морфологическим признакам к роду *Roholtiella*, вошел в кладу, соответствующую этому роду. Данная клада является частью более крупной клады, объединяющей наземные виды *Nostocaceae*, что также было показано в работе М. Богуницкой с соавт. (Bohunická et al., 2015). Таким образом, филогенетический анализ подтвердил родовую принадлежность украинского штамма *Roholtiella*.

Для видовой идентификации этого штамма мы использовали

данные о последовательностях участка 16S рРНК, сцепленного с регионом 16S-23S ITS. Этот фрагмент считается более информативным, чем просто последовательности гена 16S рРНК, поскольку позволяет разграничивать клады, отличающиеся морфологически и биотопически, но имеющие уровень сходства по 16S рРНК выше 97,5% (Osorio-Santos et al., 2014).

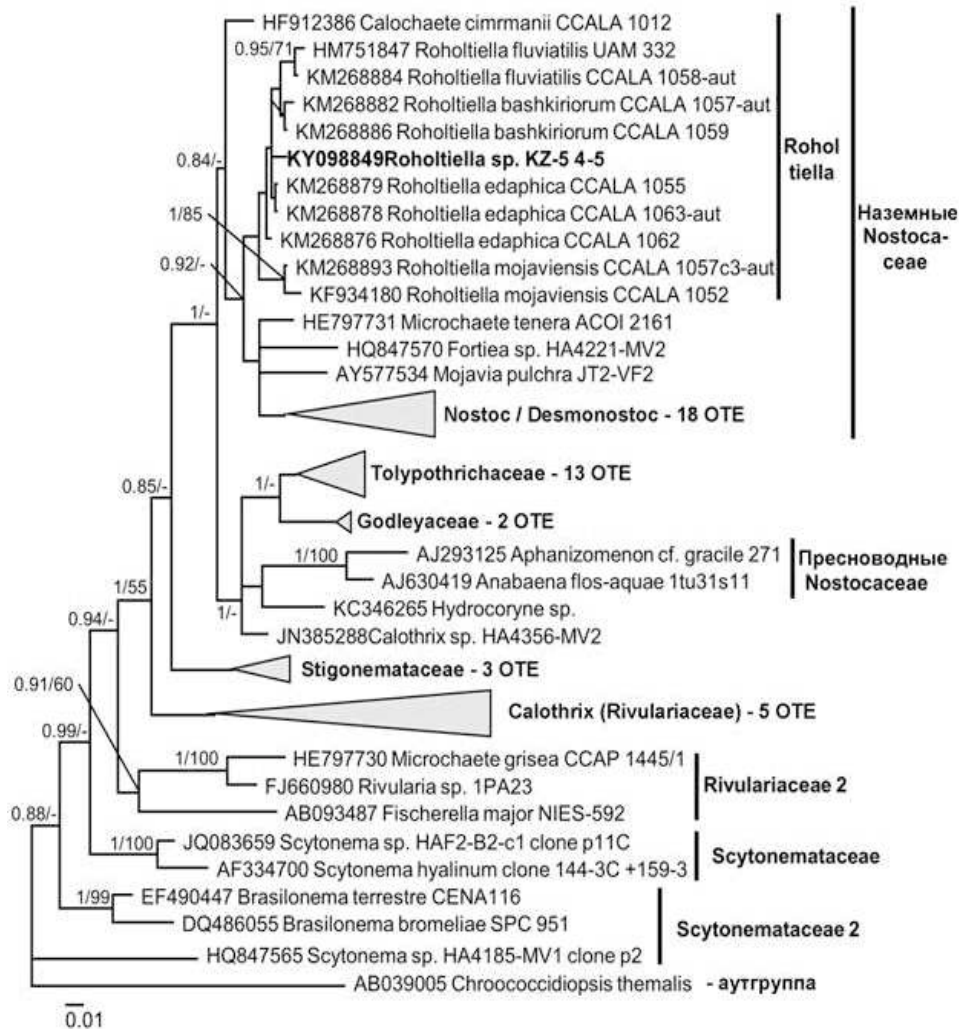


Рис. 3. Молекулярная филогения *Nostocales* на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Филогенетическое дерево построено Байесовским методом с указанием значений Байесовской вероятности (Bayesian Posterior Probabilities (PP), слева) и поддержки бутстрепа при анализе максимального правдоподобия (Maximum Likelihood bootstrap support (BP), справа). Показаны только значения PP выше 0,8 и BP выше 50%. Оригинальная последовательность штамма цианобактерий отмечена жирным шрифтом. Определение клад дано согласно работам Hauer et al., 2013; 2014. OTE – операционная таксономическая единица

Таблица 3

Морфология и экология украинского штамма (KZ-5-4-5) и описанных ранее (Bohnická et al., 2015) видов рода *Roholtiella*

Вид	Морфология и размерные признаки (ширина/ длина, мкм)					Экология
	Влагалище	Вегетативные клетки	Конечные клетки	Гетероцисты	Артро-споры	
<i>Roholtiella</i> KZ-5-4-5	От бесцветного до красноватого или красно-коричневого	Бочонковидные до сжато-шаровидных, 5,3-7,1 (8,9) / 2,9-6,4 (7,9)	Округло-конические или округлые, 2,9-6,4 / 3,6-7,5	Терминальные полушаро-видные 4,3-5,3 / 3,6-4,5	Сжато-шаровидные, 5,3-6,8 / 4,3-5,3	Ракушечный пляж на морском берегу
<i>R. edaphica</i> Bohnická et Lukešová	Бесцветное, слегка розоватое, оранжевое красное или красно-коричневое	Бочонковидные до сжато-шаровидных, 6,2-12,3 / 1,6-8,2 (9,0)	Конические, округло-конические или округлые, 4,1-4,9 / 3,2-5,5	Терминальные шаровидные, полушаровидные до округло-удлиненных, интеркалярные коротко-бочонковидные, 4,8-8,0 (10) / 2,8-7,5	6,1-11,1 / 4,6-9,3 мкм	Почвы в умеренном климате, в т.ч. разнотравной степи, березового леса и отвалов после угольных разработок
<i>R. mojavensis</i> Pietrasiak et Johansen	Бесцветные до слегка розоватых	Цилиндрические, бочонковидные или сжато-шаровидные 5,7-9,6 / 1,6-7,3	Округло-конические или конические, 2,8-5,2 / 3,2-6,4	Терминальные полушаровидные или слабо-конические, интеркалярные коротко-бочонковидные,	Почти шаровидные, 5,6-7,9 / 4,1-9,0	Песчано-гравийная почва пустыни
<i>R. bashkiriolum</i> Gaisina et Bohnická	Бесцветные	Бочонковидные до округлых, 6,6-9,8 / 2,1-8,5	Округло-конические, 3,3-6,9 / 3,6-7,2	Терминальные полукруглые, интеркалярные цилиндрические, 4,1-8,2 / 2,5-7,4	Сжато округлые до почти шаровидных, 6,2-10,5 / 4,9-9,0	Почва на берегу реки
<i>R. fluvialis</i> Johansen et Gaisina	Бесцветные, оранжевые до красноватых	Бочонковидные, 7,9-9,8 / 2,8-10,8	Округлые или конические, 3,9-6,9 / 4,1-6,4	Терминальные полукруглые, интеркалярные округло-цилиндрические, 4,7-7,4 / 3,2-6,8	Сжато-округлые до почти шаровидных	В небольших реках или на берегу у кромки воды

Как известно, в бактериологии уровень сходства при сопоставлении последовательностей 16S рРНК ниже 97,5% означает другой вид, а все, что выше этого порога, считается неинформативным (Johansen, Casamatta, 2005). Однако, как было показано при изучении внутривидовых филогенетических взаимоотношений у различных групп цианобактерий, уровень сходства по 16S рРНК может быть выше этого порога, но при этом между кладами существуют четкие отличия, позволяющие считать их отдельными видами (Řeháková et al., 2007; Osorio-Santos et al., 2014; Bohunická et al., 2015). Так, для видов рода *Roholtiella* это сходство было выше 97,9%, что не помешало описать четыре новых для науки вида, аутопоморфиями у которых выступали отличия в структуре некоторых консервативных областей региона 16S-23S ITS (Bohunická et al., 2015).

Полученная нами нуклеотидная последовательность участка 16S-23S ITS украинского штамма *Roholtiella* содержала оперон без генов *m*РНК. Известно, что в пределах данного рода у одного и того же штамма можно получить нуклеотидную последовательность этого участка как с опероном с двумя генами *m*РНК, так и без них (Bohunická et al., 2015). Поэтому при анализе участка 16S-23S ITS мы использовали только те последовательности известных видов, которые не несут гены *m*РНК. Филогенетический анализ по участку 16S рРНК, связанному с регионом 16S-23S ITS, нашего оригинального и 12 опубликованных штаммов *Roholtiella* (рис. 4), показал, что украинский штамм входит в кладу, соответствующую виду *R. edaphica*, и является сестринским по отношению к референтному штамму CCALA 1063.

Мы также провели анализ вторичной структуры РНК информативных хеликсов участка 16S-23S ITS (оперон без генов *m*РНК) нашего оригинального штамма KZ-5-4-5 и трех штаммов *R. edaphica* – CCALA 1063 (США, референтный штамм), CCALA 1060 (Россия) и CCALA 1062 (Чехия). Из рис. 5 видно, что конфигурация спирали Вох В украинского штамма очень близка со всеми представленными штаммами; отличия выявлены лишь у двух нуклеотидах во внутренней и терминальной петлях. Штамм CCALA 1062 также отличается от всех существенно большим размером внутренней петли участка спирали Вох-В. Вторичная структура хеликса V3 в пределах вида *R. edaphica* довольно изменчива. Как видно из рисунка, этот хеликс украинского штамма идентичен с таковым референтного штамма *R. edaphica* (CCALA 1063). При этом структура V3 референтного штамма сходна с другими только в нижней части и кардинально отличается в верхней части как по количеству нуклеотидов, так и по их качественному составу.

К сожалению, в статье М. Богуницкой (Bohunická et al., 2015) не приводится вторичная структура РНК участка 16S-23S ITS референтного штамма CCALA 1063 и эта особенность не обсуждается. Поэтому можно лишь констатировать факт достаточно высокой вариабельности участка 16S-23S ITS в пределах вида *R. edaphica*.

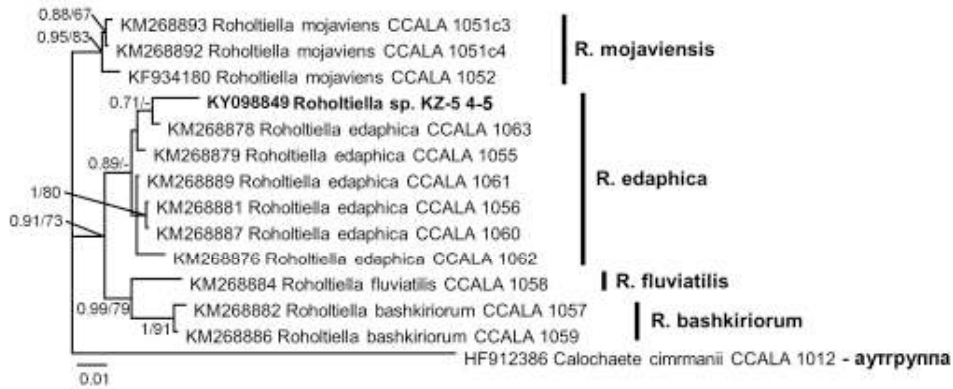


Рис. 4. Молекулярная филогения рода *Roholtiella* на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, связанного с 16S-23S ITS регионом. Филогенетическое дерево построено Байесовским методом с указанием значений Байесовской вероятности (Bayesian Posterior Probabilities (PP), слева) и поддержки бутстрепа при анализе максимального правдоподобия (Maximum Likelihood bootstrap support (BP), справа). Показаны только значения PP выше 0,8 и BP выше 50%. Оригинальная последовательность штамма цианобактерий отмечена жирным шрифтом. Определение клад дано согласно Bohunická et al., 2015. ОТЕ – операционная таксономическая единица

Как было отмечено (Bohunická et al., 2015), все четыре вида *Roholtiella* легко определяются по нуклеотидным последовательностям участков, прилегающих к хеликсам Вох-В и V3 региона 16S-23S ITS: у каждого из видов их состав уникален и выполняет роль генетической аутопоморфии. При этом, исходя из опубликованных ими последовательностей, этот показатель у *R. bashkiriorum* и *R. mojaviensis*, представленных двумя штаммами каждый, был константным, а у *R. edaphica* – вариативным. Приведенные варианты последовательностей для штаммов CCALA 1055-1060 и CCALA 1062 отличаются по двум нуклеотидам в позициях 133 и 345 (табл. 4). Сравнение переменных последовательностей участков, прилегающих к спиральям Вох-В и V3 региона 16S-23S ITS украинского штамма с опубликованными данными, показало, что оригинальный штамм наиболее близок к штаммам *R. edaphica*: из 11 переменных последовательностей шесть оказались идентичными, в пяти позициях (129, 144, 186, 228 и 345) выявлены отличия в семи нуклеотидах. Некоторое сходство есть также с *R. mojaviensis*: пять полных совпадений, отличия в восьми нуклеотидах шести позиций. Интересно, что виды из более влажных местообитаний, *R. fluviatilis* и *R. bashkiriorum*, не совпадали с украинским штаммом в 10 из 11 изученных фрагментов (см. табл. 4).

Короткие переменные последовательности или отдельные нуклеотиды в пределах участков, прилегающих к хеликсам Вох-В и V3, украинского штамма (KZ-5-4-5) и известных видов *Roholtiella*

Вид, штамм	Номер позиции элаймента переменных последовательностей*										
	129	133	136	141	144	148	155	186	228	339	345
<i>R. fluvialis</i> , CCALA 1058	T	C	TAC	G	TT	A	AA	TTAT-	-AA	-	TTGTTTAA
<i>R. bashkiriolum</i> , CCALA 1057, 1059	G	C	CAA	G	CA	G	AC	AGAA-	AAA	-	--TGAATT
<i>R. mojaviensis</i> , CCALA 1055, 1056	C	C	ARA	C	CT	G	G-	TAATR	-AA	-	T-TGTTTA
<i>R. edaphica</i> , CCALA 1055- 1060	A	C	AAA	C	CT	G	G-	TATTG	TTT	C	A-TGTATW
<i>R. edaphica</i> , CCALA 1062	A	G	AAA	C	CT	G	G-	TATTG	TTT	C	A-TGTATT
<i>R. edaphica</i> , KZ-5-4-5	<u>C</u>	C	AAA	C	<u>TT</u>	G	G-	<u>TATTT</u>	<u>AAA</u>	C	A-TGTATA

*Согласно статье М. Богуницкой с соавт. (Bohunická et al. 2015, рис. 5, с. 94). Отличия оригинального штамма от опубликованных штаммов *R. edaphica* отмечены жирным шрифтом и подчеркиванием.

Таким образом, по морфологическим признакам и результатам филогенетического анализа по участку 16S рРНК, связанному с регионом 16S-23S ITS, украинский штамм *Roholtiella* может быть идентифицирован как *R. edaphica*. Сравнение переменных последовательностей участков, прилегающих к хеликсам Вох-В и V3 региона 16S-23S ITS оригинального и опубликованных штаммов этого вида, выявило некоторые расхождения. Вариабельность украинского штамма, вероятно, лежит в пределах изменчивости вида *R. edaphica* (согласно его существующей концепции), однако при этом является «пограничным» вариантом и в будущем, при дальнейшем изучении данного рода, он может быть отнесен к другим таксонам видового или внутривидового ранга.

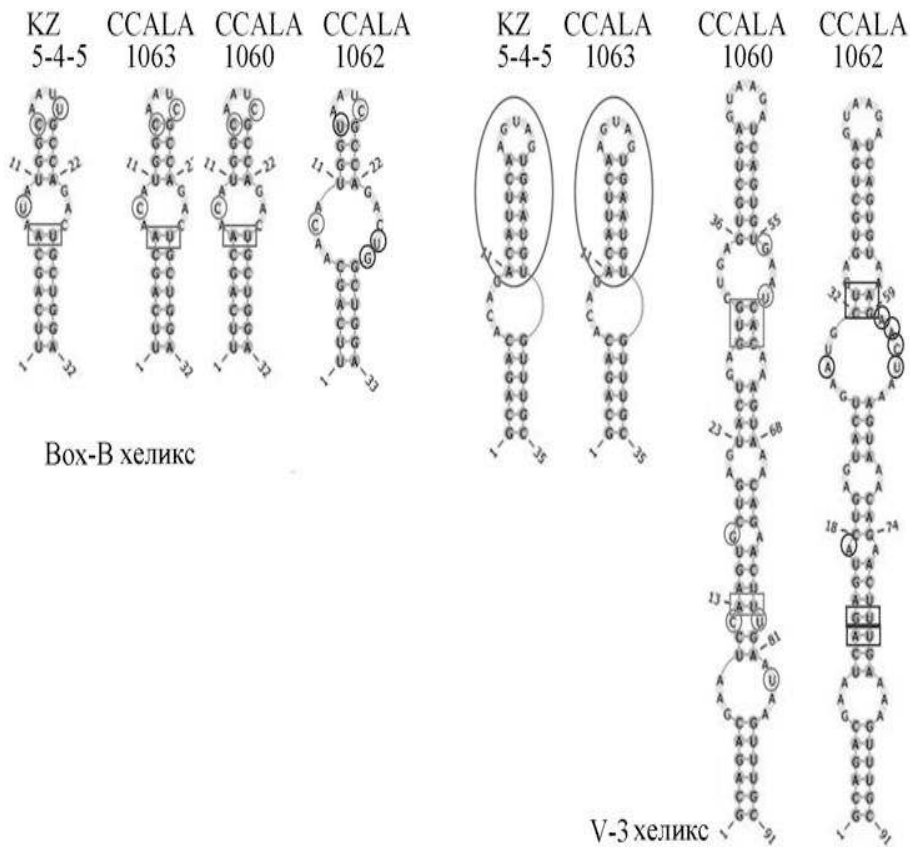


Рис. 5. Вторичная структура РНК основных информативных хеликсов региона 16S-23S ITS украинского штамма *Roholtiella* (KZ-5-4-5) в сравнении со штаммами наиболее близкого вида *R. edaphica*. Отмеченные отдельными (кружками), спаренными (прямоугольниками) нуклеотидные основания или крупные регионы хеликса (эллипсами) являются переменными в пределах рода

Заклучение

Изучение штаммов, выделенных из биологических почвенных корочек, отобранных на побережьях Азовского и Черного морей, молекулярно-филогенетическими методами, позволило обнаружить новые для флоры Украины роды из порядков *Synechococcales* (*Oculatella* Zammit, Billi et Albertano и *Nodosilinea* Perkerson et Casamatta) и *Nostocales* (*Roholtiella* Bohunická, Pietrasiak et Johansen). Филогенетический анализ по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК показал, что все оригинальные штаммы включались в клады соответствующих родов с высокой степенью поддержки. Однако провести видовую идентификацию выделенных штаммов по морфологическим и генетическим

признакам удалось лишь в отношении штамма из рода *Roholtiella*: филогенетический анализ по участку 16S рРНК, связанному с регионом 16S-23S ITS, показал, что украинский штамм входит в кладу, соответствующую виду *R. edaphica* Bohunická et Lukešová. Сравнение вариabельных последовательностей участков, прилегающих к хеликсам Вох-В и V3 региона 16S-23S ITS, оригинального штамма с опубликованными штаммами этого вида выявило некоторые расхождения, что, возможно, связано с особенностями внутривидовой изменчивости *R. edaphica*.

Оригинальные штаммы родов *Oculatella* и *Nodosilinea* оказались достаточно близкими между собой по нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК, в то же время на филограммах, построенных с использованием данных по региону 16S-23S ITS оригинальных и опубликованных штаммов этих родов, они образуют обособленные от других видов и высоко поддержанные клады, вероятно, являющиеся еще не описанными видами.

Обнаружение с использованием полифазного подхода трех новых родов для флоры Украины свидетельствует о важности применения современных методов для оценки реального разнообразия цианобактерий в природе. Кроме того, нахождение новых генетических линий указывает на существование неисчерпанного и неопisanного их разнообразия.

Исследование выполнено при поддержке немецкого фонда Александра фон Гумбольдта (Alexander von Humboldt Stiftung).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Виноградова О.М. *Cyanoprokaryota* гіпергалінних екосистем України. – К.: Альтерпрес, 2012. – 200 с.
- Кондратьева Н.В. Визначник прісноводних водоростей Української РСР. Вип. 1. Синьозелені водорості – *Cyanophyta*. Ч. 2. – К.: Наук. думка, 1968. – 523 с.
- Кондратьева Н.В., Коваленко О.В., Приходькова Л.П. Визначник прісноводних водоростей Української РСР. Вип. 1. Синьозелені водорості – *Cyanophyta*. Ч. 1. – К.: Наук. думка, 1984. – 388 с.
- Abed R.M.M., Garcia-Pichel F., Hernández-Mariné M. Polyphasic characterization of benthic, moderately halophilic, moderately thermophilic cyanobacteria with very thin trichomes and the proposal of *Halomicronema excentricum* gen. nov., sp. nov. // Arch. Microbiol. – 2002. – 177. – P. 361–370.
- Akaike H. A new look at the statistical model identification // IEEE Trans. Automat. Contr. – 1974. – 19(6). – P. 716–723.
- Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography* Vol. 1, P.M. Tsarenko, S.P. Wasser, E. Nevo (Eds). – Ruggell: A.R.A. Gantner Verlag K.-G., 2006. – 714 p.; Vol. 2, 2009, 413 p.; Vol. 3, 2011, 511 p.; Vol. 4, 2014, 703 p.
- Berrendero Gómez E., Johansen J.R., Kaštovský J., Bohunická M., Čapková K. *Macrochaete* gen. nov. (*Nostocales*, *Cyanobacteria*), a taxon morphologically and molecularly distinct from *Calothrix* // J. Phycol. – 2016. – 52(4). – P. 638–655.

- Bischoff H.W., Bold H.C. Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species // Univ. Texas Publ. – 1963. – (6318). – P. 1–95.
- Bohunická M., Johansen J. R., Fučíková K. *Tapinothrix clintonii* sp. nov. (*Pseudanabaenaceae*, *Cyanobacteria*), a new species at the nexus of five genera // Fottea. – 2011. – **11**(1). – P. 127–140.
- Bohunická M., Pietrasiak N., Johansen J.R., Gómez E.B., Hauer T., Gaysina L.A., Lukešová A. *Roholtiella*, gen. nov. (*Nostocales*, *Cyanobacteria*) – a tapering and branching cyanobacteria of the family *Nostocaceae* // Phytotaxa. – 2013. – **109**(1). – P. 36–44.
- Boyer S.L., Johansen J.R., Flechtner V.R. Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (*Cyanophyceae*) species based on sequence analysis of the 16S *r*RNA gene and associated 16S-23S ITS region // J. Phycol. – 2002. – **38**. – P. 1222–1235.
- Byun Y., Han K. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots // Bioinformatics. – 2009. – **25**(11). – P. 1435–1437.
- Casamatta D.A., Gomez S.R., Johansen J.R. *Rexia erecta* gen. et sp. nov. and *Capsosira lowei* sp. nov., two newly described cyanobacterial taxa from the Great Smoky Mountains National Park (USA) // Hydrobiologia. – 2006. – **561**. – P. 13–26.
- Casamatta D.A., Vis M.L., Sheath R.G. Cryptic species in cyanobacterial systematics: a case study of *Phormidium retzii* (*Oscillatoriales*) using RAPD molecular markers and 16S *r*DNA sequence data // Aquat. Bot. – 2003. – **77**(4). – P. 295–309.
- Donoghue M.J. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative // The Bryologist. – 1985. – **88**. – P. 172–181.
- Dvořák P., Pouličková A., Hašler P., Belli M., Casamatta D.A., Papini A. Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification // Biodiver. and Conservat. – 2015. – **24**(4). – P. 739–757.
- Gugger M., Molica R., Le Berre B., Dufour P., Bernard C., Humbert J.F. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (*Cyanobacteria*) isolated from four continents // Appl. and Environ. Microbiol. – 2005. – **71**(2). – P. 1097–1100.
- Hauer T., Bohunická M., Mühlsteinová R. *Calochaete* gen.nov. (*Cyanobacteria*, *Nostocales*), a new cyanobacterial type from “paramo” zone in Costa Rica // Phytotaxa. – 2013. – **109**(1). – P. 36–44.
- Hauer T., Bohunická M., Johansen J.R., Mares J., Berrendero-Gomez E. Reassessment of the cyanobacterial family *Microchaetaceae* and establishment of new families *Tolypothrichaceae* and *Godleyaceae* // J. Phycol. – 2014. – **50**(6). – P. 1089–110.
- Johansen J.R., Casamatta D.A. Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm. // Arch. Hydrobiol. Algol. Stud. – 2005. – **117**. – P. 71–93.
- Johansen J.R., Bohunická M., Lukesová A., Hrcková K., Vaccarino M.A., Chesarino N.M. Morphological and molecular characterization within 26 strains of the genus *Cylindrospermum* (*Nostocaceae*, *Cyanobacteria*), with descriptions of three new species // J. Phycol. – 2014. – **50**(1). – P. 187–202.
- Katoh K., Stadley D.M. MAFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: improvements in performance and usability // Mol. Biol. and Evol. – 2013. – **30**(4). – P. 772–780.
- Komárek J. *Cyanoprokaryota*. 2. Teil: *Oscillatoriales* / J. Komárek, K. Anagnostidis // Süßwasserflora von Mitteleuropa. Bd 19/2. – Jena, etc.: Elsevier, 2005. – 759 p.
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen J.R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014 using a polyphasic approach // Preslia. – 2014. – **86**(4). – P. 295–235.

- Lawrence J.G., Retchless A.C. The interplay of homologous recombination and horizontal gene transfer in bacterial speciation // *Meth. Mol. Biol.* – 2009. – **532**. – P. 29–53.
- Marin B., Nowack E.C.M., Melkonian M. A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis // *Protist.* – 2005. – **156**: 425–432.
- Miscoe L.H., Johansen J.R., Vaccarino M.A., Pietrasiak N., Sherwood A.R. Novel cyanobacteria from caves on Kauai, Hawaii // *Bibl. Phycol.* – 2016. – **120**. – P. 75–152.
- Mühlsteinová R., Johansen J.R., Pietrasiak N., Martin M.P., Osorio-Santos K., Warren S.D. Polyphasic characterization of *Trichocoleus desertorum* sp. nov. (*Pseudanabaenales*, *Cyanobacteria*) from desert soils and phylogenetic placement of the genus *Trichocoleus* // *Phytotaxa.* – 2014. – **163**(5). – P. 241–261.
- Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina* Turpin) and the description of *Halospirulina tapeticola* gen. nov., sp. nov. // *Int. J. Syst. and Evol. Microbiol.* – 2000. – **50**(3). – P. 1265–1277.
- Osorio-Santos K., Pietrasiak N., Bohunická M., Miscoe L.H., Kováčik L., Martin M.P., Johansen J.R. Seven new species of *Oculatella* (*Pseudanabaenales*, *Cyanobacteria*): taxonomically recognizing cryptic diversification // *Eur. J. Phycol.* – 2014. – **49**(4). – P. 450–470.
- Patzelt D.J., Hodač L., Friedl T., Pietrasiak N., Johansen J.R. Biodiversity of soil cyanobacteria in the hyper-arid Atacama Desert, Chile // *J. Phycol.* – 2014. – **50**(4). – P. 698–710.
- Perkerson R.B. III, Johansen J.R., Kováčik L., Brand J., Kastovsky J., Casamatta D.A. An unique pseudanabaenalean (*Cyanobacteria*) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data // *J. Phycol.* – 2011. – **47**(6). – P. 1397–1412.
- Polz M.F., Alm E.J., Hanage W.P. Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure // *Trends in Genet.* – 2013. – **29**(3). – P. 170–175.
- Rajaniemi P., Hrouzek P., Kaštovská K., Willame R., Rantala A., Hoffmann L., Komárek J., Sivonen K. Phylogenetic and morphological evaluation of genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (*Nostocales*, *Cyanobacteria*) // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2005. – **55**. – P. 11–26.
- Reháková K., Johansen J.R., Casamatta D.A., Xuesong L., Vincent J. Morphological and molecular characterization of selected desert soil cyanobacteria: three species new to science including *Mojavia pulchra* gen. et sp. nov. // *Phycologia.* – 2007. – **46**. – P. 481–502.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.R. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic interference under mixed models // *Bioinformatics.* – 2003. – **19**(12). – P. 1572–1574.
- Siegismund M.A., Johansen J.R., Karsten U., Friedl T. *Coleofasciculus* gen. nov. (*Cyanobacteria*): morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont // *J. Phycol.* – 2008. – **44**. – P. 1572–1585.
- Sogge H., Rohrlack T., Rounge T.B., Sunstebui J.H., Tooming-Klunderud A., Kristensen T., Jakobsen K.S. Gene flow, recombination and selection in *Cyanobacteria*: population structure of geographically related *Planktothrix* freshwater strains // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 2013. – **79**(2). – P. 508–515.
- Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*) // *Bacteriol. Revs.* – 1971. – **35**. – P. 171–205.

- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A. MEGA6: molecular evolutionary analysis version 6.0 // *Mol. Biol. and Evol.* – 2013. – 30(12). – P. 2725–2729.
- Taton A., Grubisic S., Brambilla E., De Wit R., Wilmotte A. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 2003. – 69(9). – P. 5157–5169.
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbet D.S., Fisher M.C. Phylogenetic species recognition and species concept in fungi // *Fung. Gen. Biol.* – 2000. – 31(1). – P. 21–32.
- Wheeler Q.D., Meier R. Species concepts and phylogenetic theory: a debate. – New York: Columb. Univ. Press, 2000. – 230 p.
- Wilmotte A., Van der Auwera G., De Wachter R. Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC75 18, and phylogenetic analysis // *FEBS Lett.* – 1993. – 317(1–2). – P. 96–100.
- Zammit G., Billi D., Albertano P. The subaerophytic cyanobacterium *Oculatella subterranea* (*Oscillatoriales, Cyanophyceae*) gen. et sp. nov.: a cytomorphological and molecular description // *Eur. J. Phycol.* – 2012. – 47. – P. 341–354.
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // *Nucl. Acid Res.* – 2003. – 31(13). – P. 3406–3415.

Поступила 26 сентября 2016 г.
Подписал в печать В.Я. Дворник

REFERENCES

- Abed R.M.M., Garcia-Pichel F., and Hernández-Mariné M., *Arch. Microbiol.*, 2002, 177: 361–370.
- Akaike H., *IEEE Trans. Automat. Contr.*, 1974, 19(6): 716–723.
- Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography* Vol. 1, P.M. Tsarenko, S.P. Wasser, E. Nevo (Eds), A.R.A. Gantner Verlag K.-G., Ruggell, 2006, 714 p.; Vol. 2, 2009, 413 p.; Vol. 3, 2011, 511 p.; Vol. 4, 2014, 703 p.
- Berrendero Gómez E., Johansen J.R., Kaštovský J., Bohunická M., and Čapková K., *J. Phycol.*, 2016, 52(4): 638–655.
- Bischoff H.W. and Bold H.C., *Univ. Texas Publ.*, 1963, 6318: 1–95.
- Bohunická M., Johansen J.R., and Fučíková K., *Fottea*, 2011, 11(1): 127–140.
- Bohunická M., Pietrasiak N., Johansen J.R., Gómez E.B., Hauer T., Gaysina L.A., and Lukešová A., *Phytotaxa*, 2013, 109(1): 36–44.
- Boyer S.L., Johansen J.R., and Flechtner V.R., *J. Phycol.*, 2002, 38: 1222–1235.
- Byun Y. and Han K., *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1435–1437.
- Casamatta D.A., Gomez S.R., and Johansen J.R., *Hydrobiologia*, 2006, 561: 13–26.
- Casamatta D.A., Vis M.L., and Sheath R.G., *Aquat. Bot.*, 2003, 77(4): 295–309.
- Donoghue M.J., *The Bryologist.*, 1985, 88: 172–181.
- Dvořák P., Pouličková A., Hašler P., Belli M., Casamatta D.A., and Papini A., *Biodiver. and Conservat.*, 2015, 24(4): 739–757.
- Gugger M., Molica R., Le Berre B., Dufour P., Bernard C., and Humbert J.F., *Appl. and Environ. Microbiol.*, 2005, 71(2): 1097–1100.

- Hauer T., Bohunická M., Johansen J.R., Mares J., and Berrendero-Gomez E., *J. Phycol.*, 2014, 50(6): 1089–110.
- Hauer T., Bohunická M., and Mühlsteinová R., *Phytotaxa*, 2013, 109(1): 36–44.
- Johansen J.R. and Casamatta D.A., *Arch. Hydrobiol. Algol. Stud.*, 2005, 117: 71–93.
- Johansen J.R., Bohunická M., Lukesová A., Hrcková K., Vaccarino M.A., and Chesarino N.M., *J. Phycol.*, 2014, 50(1): 187–202.
- Katoh K. and Stadley D.M., *Mol. Biol. and Evol.*, 2013, 30(4): 772–780.
- Komárek J., *Cyanoprokaryota. 2. Teil: Oscillatoriales*. In: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Bd 19/2, Elsevier, Jena, etc., 2005, 759 p.
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., and Johansen J.R., *Preslia*, 2014, 86(4): 295–235.
- Kondratyeva N.V., *Viznachnik prsnovodnikh vodorostey Ukrainskoi RSR. Vyp. I. Sinozeleni vodorosti – Cyanophyta. Ch. 2 [Identification manual to freshwater algae Ukrainian SSR. Issue 1. Blue Green Algae – Cyanophyta. Pt 2]*, Nauk. Dumka Press, Kiev, 1968, 523 p. (Ukr.)
- Kondratyeva N.V., Kovalenko O.V., and Prikhodkova L.P., *Viznachnik prsnovodnikh vodorostey Ukrainskoi RSR. Vyp. I. Sinozeleni vodorosti – Cyanophyta. Ch. 1 [Identification manual to freshwater algae Ukrainian SSR. Issue 1. Blue Green Algae – Cyanophyta. Pt 1]*, Nauk. Dumka Press, Kiev, 1984, 388 p. (Ukr.)
- Lawrence J.G. and Retchless A.C., *Meth. Mol. Biol.*, 2009, 532: 29–53.
- Mühlsteinová R., Johansen J.R., Pietrasiak N., Martin M.P., Osorio-Santos K., and Warren S.D., *Phytotaxa*, 2014, 163(5): 241–261.
- Nübel U., Garcia-Pichel F., and Muyzer G., *Int. J. Syst. and Evol. Microbiol.*, 2000, 50(3): 1265–1277.
- Osorio-Santos K., Pietrasiak N., Bohunická M., Miscoe L.H., Kováčik L., Martin M.P., and Johansen J.R., *Eur. J. Phycol.*, 2014, 49(4): 450–470.
- Patzelt D.J., Hodač L., Friedl T., Pietrasiak N., and Johansen J.R., *J. Phycol.*, 2014, 50(4): 698–710.
- Perkerson R.B. III, Johansen J.R., Kováčik L., Brand J., Kastovsky J., and Casamatta D.A., *J. Phycol.*, 2011, 47(6): 1397–1412.
- Polz M.F., Alm E.J., and Hanage W.P., *Trends in Genet.*, 2013, 29(3): 170–175.
- Rajaniemi P., Hrouzek P., Kaštovská K., Willame R., Rantala A., Hoffmann L., Komárek J., and Sivonen K., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2005, 55: 11–26.
- Reháková K., Johansen J.R., Casamatta D.A., Xuesong L., and Vincent J., *Phycologia*, 2007, 46: 481–502.
- Ronquist F. and Huelsenbeck J.R., *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572–1574.
- Siegesmund M.A., Johansen J.R., Karsten U., and Friedl T., *J. Phycol.*, 2008, 44: 1572–1585.
- Sogge H., Rohrlack T., Rounge T.B., Sønstebø J.H., Tooming-Klunderud A., Kristensen T., and Jakobsen K.S., *Appl. and Environ. Microbiol.*, 2013, 79(2): 508–515.
- Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., and Cohen-Bazire G., *Bacteriol. Revs.*, 1971, 35: 171–205.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., and Filipowski A., *Mol. Biol. and Evol.*, 2013, 30(12): 2725–2729.
- Taton A., Grubisic S., Brambilla E., De Wit R., and Wilmotte A., *Appl. and Environ. Microbiol.*, 2003, 69(9): 5157–5169.
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbet D.S., and Fisher M.C., *Fung. Gen. Biol.*, 2000, 31(1): 21–32.

- Vinogradova O.M., *Cyanoprokaryota gipergalimnykh ekosistem Ukrainy* [Cyanoprokaryota hiperhaline ecosystems of Ukraine], Alterpres, Kiev, 2012, 200 p. (Ukr.)
- Wilmotte A., Van der Auwera G., De Wachter R., *FEBS Lett.*, 1993, 317(1–2): 96–100.
- Wheeler Q.D. and Meier R., *Species concepts and phylogenetic theory: a debate*, Columb. Univ. Press, New York, 2000, 230 p.
- Zammit G., Billi D., and Albertano P., *Eur. J. Phycol.*, 2012, 47: 341–354.
- Zuker M., *Nucl. Acid Res.*, 2003, 31(13): 3406–3415.

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2016, 26(4): 347–371

doi.org/10.15407/alg26.04.347

Mikhailyuk T.I.¹, Vinogradova O.N.¹, Glaser K.², Karsten U.²

¹N.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine,
2, Tereshchenkivska St., Kiev 01004, Ukraine

²University of Rostock, Institute of Biological Sciences, Dept. of Applied Ecology and Phycology,
3, Albert-Einstein-St., Rostock D-18057, Germany

NEW TAXA FOR THE FLORA OF UKRAINE, IN THE CONTEXT OF MODERN APPROACHES TO TAXONOMY OF *CYANOPROKARYOTA/CYANOBACTERIA*

In biological soil crusts from coastal sites of Ukraine a number of interesting cyanobacterial morphotypes were recorded. Characterization of seven original strains using molecular, morphological, and ecological information revealed that they belong to newly described genera of the orders *Synechococcales* (*Oculatella* Zammit, Billi et Albertano and *Nodosilinea* Perkerson et Casamatta) and *Nostocales* (*Roholtiella* M. Bohunická, Pietrasiak et Johansen). In phylogenetic analyses using sequences of the 16S *r*RNA gene, all Ukrainian strains could be assigned to clades of the corresponding genera with a high degree of support in the Bayesian and Maximum Likelihood analyses. However, their species-level identification has been successful only for one strain of the genus *Roholtiella*. The phylogeny based on the 16S *r*RNA gene concatenated with the 16S-23S ITS region of the original strain and 12 published strains of *Roholtiella* showed that the Ukrainian strain is closely related to *R. edaphica* Bohunická et Lukešová. Its *r*RNA secondary structure of the Box B and V3 helices of the 16S-23S ITS region, and of nucleotide sequences flanking them, in main features correspond to *R. edaphica*. Original strains of genera *Oculatella* and *Nodosilinea* were quite similar to each other by the nucleotide sequences of the 16S *r*RNA gene. But, phylogenetic trees based on the 16S-23S ITS region of both original and published strains of these genera indicated that our isolates might represent new species as they form highly supported distinct clades. The findings of three new genera for the flora of Ukraine demonstrate the importance of using modern approaches for the assessment of real diversity of cyanobacteria in nature.

Key words: *Oculatella*, *Nodosilinea*, *Roholtiella*, cyanobacteria, new records, Ukraine, molecular phylogeny 16S *r*RNA, 16S-23S ITS, secondary structure of 16S-23S ITS.