

**Морфологическая и молекулярная характеристика
представителя *Brasilonema* (*Scytonemataceae*, *Cyanoprokaryota*) из
тропической оранжерии в Киеве**

**Романенко П.А.¹, Виноградова О.Н.², Романенко Е.А.²,
Михайлюк Т.И.², Бабенко Л.М.², Иванников Р.В.³, Щербак Н.Н.⁴**

¹ ООО Научно-производственное предприятие «5 Element»,

ул. Михайловская, Херсон 3773025, Украина

² Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,

ул. Терещенковская, 2, Киев 01004, Украина

³ Национальный ботанический сад имени Н.Н. Гришко НАН Украины,

ул. Тимирязевская, 1, Киев 01014, Украина

⁴ School for Science and Technology, Örebro University,

Fakultetagan 1, Örebro, Sweden

petrorom@ukr.net

Поступила в редакцию 16.03.2020. После доработки 30.03.2020

Подписана в печать 13.04.2020. Опубликована 24.06.2020

Реферат

Приведены данные о первой находке представителя пантропического рода *Brasilonema* Fiore et al. в оранжерее Старого Света. Род, описанный в 2007 г. с применением комплексного подхода, морфологически близок к роду *Scytonema*, отличаясь характером роста нитей, образующих восходящие пучки, цветом трихомов, а также тем, что ложные ветвления наблюдаются лишь спорадически. К настоящему времени описано 12 видов *Brasilonema*; все они ведут субаэрофитный образ жизни в тропических и субтропических регионах. В течение последних ряда лет в оранжерее Национального ботанического сада имени Н.Н. Гришко НАН Украины (НБС) наблюдали обильные разрастания в виде черноватых матов с ворсистой поверхностью, образованные ложно ветвящимися гетероцитными цианобактериями, окрашенными в лиловый, бледно-фиолетовый или серый цвет. Цианобактериальные маты покрывали вегетативные органы различных тропических растений-эпифитов из семейств *Orchidaceae* Juss. и *Bromeliaceae* Juss., иногда встречались на других

© Романенко П.А., Виноградова О.Н., Романенко Е.А., Михайлюк Т.И., Бабенко Л.М., Иванников Р.В., Щербак Н.Н., 2020

субстратах. Представлены результаты изучения морфологических особенностей выявленной цианобактерии из «природы» (оранжереи) и культивированной на жидкой и агаризованной среде. Сравнительный анализ оригинальных данных с описаниями видов *Brasilonema* показал, что киевская популяция морфологически и экологически совпадает сразу с несколькими видами, из которых наиболее близка к *B. octagenarum*. Филогенетический анализ по участку нуклеотидной последовательности гена, кодирующего 16S рРНК, подтвердил родовую принадлежность оригинальных штаммов. Анализ нуклеотидной последовательности участка 16S-23S ITS, а также вторичной структуры наиболее информативных его спиралей подтвердил близость киевского материала к *B. octagenarum*, которая в свою очередь, вероятно, представляет собой комплекс видов, таксономическое разделение которых возможно в будущем. Предположительно цианобактерия могла попасть в киевскую оранжерею с тропическими растениями, привезенными украинскими ботаниками из экспедиции в Бразилию в 1986 г.

Ключевые слова: аэрофитные цианобактерии, *Brasilonema octagenarum*, морфологическая изменчивость, 16S рРНК, участок 16S-23S ITS, вторичная структура

Введение

Оранжерейный комплекс тропических и субтропических растений входит в состав одноименного отдела Национального ботанического сада имени Н.Н. Гришко НАН Украины и состоит из экспозиционного и закрытого отделений, которое используется в научных целях. В течение ряда лет в закрытой оранжерее ботсада, где ведутся исследования биологии представителей тропической флоры, наблюдали обильные разрастания в виде черноватых матов с ворсистой поверхностью, которые покрывали вегетативные органы различных тропических растений-эпифитов из семейств *Orchidaceae* Juss. и *Bromeliaceae* Juss.; иногда их развитие начинало мешать нормальной вегетации растений и тогда приходилось удалять наиболее пострадавшие участки. Подобные разрастания встречались также на каменных ограждениях и металлических конструкциях оранжереи. Их более детальное изучение показало, что они образованы ложноветвящимися нитями гетероцитных цианобактерий, окрашенными в лиловый, бледно-фиолетовый или серый цвет. По внешнему облику талломов и нитей, а также местообитанию обнаруженные цианобактерии соответствовали описанию редкого рода *Brasilonema* Fiore et al. (семейство *Scytonemataceae*), распространенного в тропических и субтропических областях Нового Света.

Этот род объединяет представителей гетероцитных цианобактерий, морфологически близких к роду *Scytonema*, но отличающихся характером роста нитей, образующих восходящие пучки над поверхностью таллома, цветом трихомов и вегетативных клеток (темно-зеленый, сероватый, красноватый или фиолетовый), а также тем, что ложные ветвления нитей наблюдаются лишь спорадически (Komárek, 2013). Родовой статус

Brasilonema был подтвержден результатами секвенирования гена, кодирующего 16S рРНК (Fiore et al., 2007). Материалы, послужившие основой для описания рода и его типового вида *B. bromeliae* Fiore et al. (всего 12 популяций), были найдены в ряде субаэрофитных местообитаний в тропических и субтропических районах Бразилии. Первоначально черноватые маты с бархатистой структурой, образованные сцитонемобразными нитями неоднократно отмечали в оранжереях ботанического сада в Сан-Паулу, где они развивались внутри розеток листьев разнообразных бромелиевых (типовое местообитание *B. bromeliae*), а также на влажных деревянных досках тепличных поддонов. Позднее разрастания этого вида были обнаружены в природе: на стволах деревьев во влажном тропическом лесу, а также на железной трубе и камнях источника в горах Паранапьякаба (Fiore et al., 2007). Вскоре последовали новые находки представителей этого рода в регионе; к настоящему времени известно уже 12 видов, все они обитают в различных аэрофитных и субаэрофитных местообитаниях влажных тропических и субтропических регионов Нового света (Guiry, Guiry, 2019). По мнению Sant'Anna et al., 2011, при описании внутривидового разнообразия *Brasilonema*, наряду с молекулярными данными, которые показывают очень высокую степень сходства между видами (до 99%), важно учитывать морфологические, биохимические и экологические особенности; последние достаточно четко выражены у представителей этого рода. Так, четыре вида (*B. bromeliae*, *B. epidendron* Sant'Anna et Komárek, *B. octagenarum* R.Anguiar et al. и *B. ornatum* Sant'Anna et al.) ведут преимущественно эпифитный образ жизни, *Brasilonema lichenoides* Villanueva, P.Hasler et Casamatta – фотобионт эндолитного лишайника (Villanueva et al., 2018). Остальные виды *Brasilonema* обитают субаэрофитно на различных субстратах неорганической природы (Aguiar et al., 2008; Sant'Anna et al., 2011; Vaccarino, Johansen, 2012; Becerra-Absalón et al., 2013; Rodarte et al., 2014; Miscoe et al., 2016; Villanueva et al., 2019).

Что касается сведений о распространении этого рода, то все его виды описаны из неотропиков: Бразилии, Мексики, Флориды, а также Антильских и Гавайских островов. Данные об их находках пока немногочисленны. Из 12 описанных на сегодня видов, десять известны только из их *loci classici*, два вида имеют более широкую географию в пределах неотропического царства. Так, *B. octagenarum*, кроме Бразилии, была выявлена на гавайском острове Оаху (Vaccarino, Johansen, 2012) и в Перу (Mendoza Carbajal, 2018); описанная с Антильских островов (Bourrelly, Manguin, 1952) *B. roberti-lamii* (Bourrelly) Sant'Anna et J.Komárek, недавно была обнаружена в Мексике (Rodarte et al., 2014). Известны находки *Brasilonema* sp. в морской литорали у побережья Мексики (González-Resendiz et al., 2015), Северной, Центральной и Южной Америке, Центральной Африке, Южной и Восточной Азии (Bohunická et al., 2016). Есть данные о находках этого рода в Южной Европе: штамм *Brasilonema* sp. был выделен из аэрофитона римских катакомб и, по результатам секвенирования гена, кодирующего 16S рРНК, вошел в

молекулярную кладу *Brasilonema* (Bruno et al., 2008; цит. по: Komárek, 2013, с. 107). Аналогичная информация существует в отношении двух штаммов из биологических пленок со стен церковных подземелий на Мальте (Zammit et al., 2011). В обоих случаях цианобактерии развивались в условиях высокой влажности. Киевская находка интересна тем, что выявлена в тропической оранжерее, большинство растений в которой происходят из коллекций ботанических садов или получены методом культуры клеток.

Целью нашего исследования было изучение морфологических признаков выявленной цианобактериальной популяции по материалам из оранжереи и культуры методами световой и сканирующей электронной микроскопии, а также ее идентификация по результатам молекулярно-филогенетического и морфологического анализа.

Материалы и методы

Материалом для исследований послужили образцы обростаний цианобактерии с воздушных корней эпифитных и аэрофитных орхидей родов *Vanda*, *Cattleya*, *Trichocentrum*, *Brassoleliocotlea* (*Orchidaceae*), а также стеблей и листьев аэрофитных бромелиад *Tillandsia usneoides* (L.) L. и *T. funckiana* Baker, собранные в феврале 2017 и декабре 2018 гг. в тропической оранжерее Национального ботанического сада имени Н.Н. Гришко. Растения, на которых развивались цианобактериальные налеты, в подавляющем большинстве попали в киевский ботсад из коллекций других ботанических учреждений Европы; только экземпляр *Cattleya aclandiae* Lindl. в 1986 г. был привезен из Бразилии украинскими ботаниками, принимавшими участие в кругосветном рейсе научно-исследовательского судна «Академик Вернадский».

Выделение штаммов, условия культивирования, световая микроскопия, идентификация. Небольшое количество материала высевали на поверхность агаризованной среды Болда (1N BBM) (Bischoff, Bold, 1963). Монокультуры *Brasilonema* выделяли путем многократных пересевов на чашки Петри с агаризованными средами 1N BBM и BG-11 без источника азота (BG₀11) (Stanier et al., 1971), используя стереомикроскоп МБС-9 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия). Культуры выращивали в стандартных лабораторных условиях, с 12-часовым чередованием световой и темновой фаз и освещением 30 мкмоль фотонов • м⁻² • с⁻¹ при температуре 20 ± 5 °С. Альгологически чистые культуры *Brasilonema* выращивали также на жидкой питательной среде BG₀11 при тех же условиях. Для молекулярно-филогенетических исследований были отобраны два штамма, у которых в одинаковых условиях культивирования цвет разрастаний был в одном случае лилово-пурпурным (Вг-Київ-1), а в другом – зеленовато-бурым (Вг-Київ-2). Морфологическую изменчивость изучали на живом материале: свежееотобранном в оранжерее и культурах разного возраста – молодых (2–4 недели) и старых (2–6 месяцев). В работе использовали световые микроскопы МБС-9 и Olympus ВХ 53 (Токио, Япония) с дифференциальной интерференционной оптикой Номарского (DIC). Микро-

фотографии под световым микроскопом были сделаны с помощью камеры Olympus UC30, присоединенной к микроскопу, и обработаны с применением программного обеспечения cellSens Entry.

В процессе идентификации природного и культурального материала использовали выпуск флоры пресных вод Европы, посвященный ностокальным (Komárek, 2013) и отдельные публикации по роду *Brasilonema* (Fiore et al., 2007; Aguiar et al., 2008; Sant'Anna et al., 2011; Vaccarino, Johansen 2012; Becerra-Absalón et al., 2013; Rodarte et al., 2014; Villanueva et al., 2018, 2019).

Изучение ультраструктуры поверхности разрастаний и нитей цианобактерий на воздушных корнях орхидей проводили методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ, JOEL JSM-6060LA). При подготовке препаратов для СЭМ воздушные корни орхидеи "*Vanda hybrid*" с корковидными обрастаниями цианобактерии обезвоживали поэтапно в растворах этилового спирта с возрастающей концентрацией (30, 50, 70, 80, 96, 100%), смеси этилового спирта и ацетона (2 : 1; 1 : 1) и абсолютном ацетоне с целью предотвращения деформации клеток и микрорельефа клеточной поверхности цианобактерии. Материал высушивали в установке сушки в критической точке (HSP-2, Hitachi) в атмосфере CO₂. Образцы фиксировали на латунных предметных столиках и напыляли слоем золота в ионном напылителе (JEOL JFC-1100).

Экстракция ДНК, ПЦР и секвенирование. Геномная ДНК цианобактерии была экстрагирована с помощью специального набора *Quick-DNA Miniprep Kit* (Zymo Research, CA, USA). Очищенную ДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации гена, кодирующего 16S рРНК вместе с областью 16S-23S ITS, разграниченной парой праймеров SSU-4-forw и ptSSU C-D-rev (Marin et al., 2005).

ПЦР-амплификацию проводили с использованием высококачественной ДНК-полимеразы Phusion™ (Thermo Scientific) в следующих условиях: начальная денатурация при 98 °С с последующей циклической стадией, содержащей денатурацию при 98 °С, отжиг при 55 °С и 2-минутное удлинение фрагмента при 72 °С (40 циклов) и окончательное удлинение фрагмента при 72° С в течение 5 минут. ДНК-гель-электрофорез реакции ПЦР показал наличие трех продуктов ПЦР с размерами приблизительно 2,7; 1,6 и 1 т.п.н. Полоса, соответствующая 2,7 т.п.н., была вырезана из геля и очищена с использованием набора для быстрой экстракции геля PureLink (Invitrogen). Очищенный фрагмент был секвенирован коммерческой службой Eurofins Genomics (Эберсберг, Германия) с использованием праймеров SSU-4-forw, ptSSU C-D-rev, Wil9 и Wil 12 (Wilmotte et al., 1993; Marin et al., 2005).

Полученные последовательности были собраны и отредактированы с помощью программного обеспечения Geneious (версия 8.1.8; Biomatters). Они депонированы в GenBank под инвентарными номерами MT152271 – MT152272.

Филогенетический анализ. Для сравнения с оригинальными штаммами было использовано 49 нуклеотидных последовательностей представителей

порядка *Nostocales* из базы данных GenBank (NCBI). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей для филогении по гену 16S рРНК произведено с использованием веб-сервера Mafft (версия 7, Katoh, Standley, 2013) с 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 (см. ниже). Эволюционная модель, которая наилучшим образом подходит к используемым базам данных, была выбрана на основе наименьшего индекса AIC (Akaike, 1974), вычисленного в программе MEGA (версия 6, Tamura et al., 2013). Филогенетические деревья построены в программе MEGA методами максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) и присоединения соседей (Neighbor Joining, NJ). При этом использована эволюционная модель GTR+G+I, поддержки бутстрепа были вычислены с 1000 повторностей.

Вторичная структура РНК. Модели вторичной структуры РНК участка 16S-23S ITS оригинальных штаммов *Brasilonema* были построены, следуя предварительно опубликованным данным (Villanueva et al., 2018). Спиральи были свернуты в режиме онлайн с помощью программы Mfold (Zuker, 2003), а их визуализация осуществлена в программе PseudoViewer (Byun, Han, 2009).

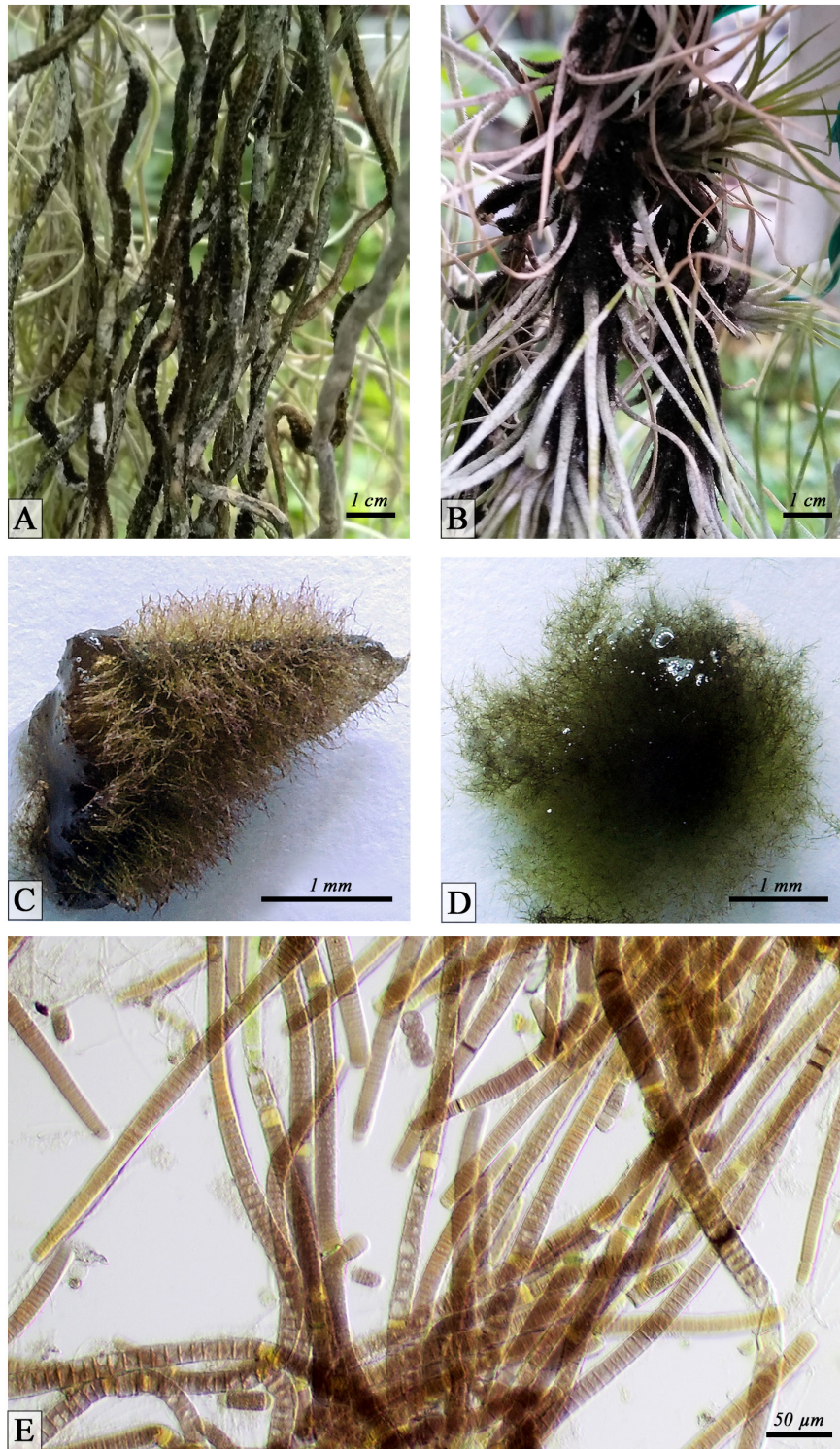
Результаты и обсуждение

Детали морфологии. Киевская находка морфологически полностью отвечает описанию рода *Brasilonema* (Komárek, 2013): в оранжерее разрастания имели вид зеленовато-бурых до черноватых дернинок с бархатистой поверхностью (рис. 1, A, B), которая под биноклем (рис. 1, C) и СЕМ (рис. 2, A, B) выглядит шерстистой благодаря восходящим нитям, а также пучкам нитей, поднимающимся перпендикулярно распростертой части таллома и субстрату (рис. 2, C, D). В культурах на агаре цианобактерия образовывала макроскопические разрастания, очень сходные с оранжерейными: распростертые маты черновато-лилового, зеленовато-бурого, в старых частях желтовато-бурого цвета. В жидкой культуре нити не образовывали пучков, а тесно переплетаясь, агрегировали в войлокообразные клубочки светло-лилового или оливково-зеленого цвета (рис. 1, D). Нити длинные, прямые или разнообразно изогнутые (рис. 1, E), 11,4–16,8 (19,5) мкм шир.; в культурах этот диапазон был несколько шире (см. табл. 1). Влагалища тонкие, крепкие, бесцветные, в старых нитях расширенные, слоистые, толщиной 1,5–2,0 мкм, иногда желтоватые (рис. 1, F, G). По данным СЭМ (рис. 2, E–H), поверхность влагалищ гладкая по всей длине нити, иногда на концах нитей влагалища выглядят поперечно ребристыми (см. рис. 2, G, H). Ложные ветвления двойные и одинарные, в образцах из оранжереи встречались редко, в культурах были частыми и обильными (рис. 1, H–J). Ветви длинные, такой же ширины, как и основная нить. Трихомы цилиндрические, не перетянутые или слегка перетянутые у клеточных перегородок, к концу не сужены, иногда слабо сужены (рис. 1, J, K), (7,3) 9,0–19,2 (23,1) мкм шир., причем в свежих образцах диапазон

значений был уже по сравнению с культуральным материалом (см. табл. 1). Вегетативные клетки темно-лилового, серовато-фиолетового, сине-зеленого, светло-изумрудно-зеленого до зеленовато-желтого цвета, часто с вакуолизированным содержимым. Длина клеток колеблется в широких пределах, от очень коротких, дисковидных в апикальных частях трихомов и меристематических зонах до почти равных ширине трихома в старых частях. Гетероцисты в основном одиночные, интеркалярные, иногда терминальные, желтоватые, разнообразной формы: от линзовидных до округлых и удлинено-цилиндрических, 9,3–20,0 мкм шир., 5,0–12,5 мкм дл. Размножение при помощи гормогониев и гормоцитов. Гормогонии короткоцилиндрические или удлинено-цилиндрические, иногда изогнутые, с короткими гранулированными клетками, 9–13 мкм шир., 23–66 мкм дл. Гормоциты ± шаровидные, 8,4–12,5 мкм в диам. (рис. 1, L).

Сравнение наших данных с описаниями уже известных видов *Brasilonema* позволило установить, что наибольшее сходство киевская популяция имеет с видами *B. bromeliae* и *B. octagenarum*, а также довольно близка к *B. tolantongense* Becerra-Absalón et Montejano (см. табл. 1). Все три вида имеют размерные диапазоны, совпадающие с полученными нами данными. Экологическая характеристика и местообитания *B. bromeliae* и *B. octagenarum* полностью совпадают с нашей находкой. Следует отметить, что в нашем материале кроме бесцветных влагалищ, указанных в протоколах всех упомянутых видов, в старых частях разрастаний мы наблюдали также желтоватые чехлы. Однако в статье с описанием *B. octagenarum* авторы вида приводят сравнительную таблицу морфологических признаков видов *Brasilonema*, где в графе «Цвет влагалища» указывают для *B. octagenarum* «влагалище бесцветное до желто-коричневого» (Aguiar et al., 2008, p. 1329, Tab. 2). Таким образом, предварительно киевский материал был идентифицирован как *B. octagenarum*.

Молекулярно-филогенетический анализ. Киевские штаммы *Brasilonema* очень близки по нуклеотидному составу исследованного региона, отличаются 2 разными нуклеотидами в составе 16S рРНК и имеют идентичный участок 16S-23S-ITS. Филогенетический анализ по нуклеотидной последовательности гена, кодирующего 16S рРНК, подтвердил принадлежность киевских штаммов к роду *Brasilonema* (рис. 3). На филогенетическом дереве, построенном методом максимального правдоподобия (ML) и включающем представителей *Brasilonema* и родственные штаммы других ностокальных, киевские штаммы присоединились к высоко поддерживанной (100%) кладе, образованной штаммами бразилонемы. Как видно на рис. 3, наиболее близкородственными для них оказались три штамма *B. octagenarum* (включая типовый штамм UFV-E1), а также несколько штаммов, идентифицированных как *Brasilonema* sp.



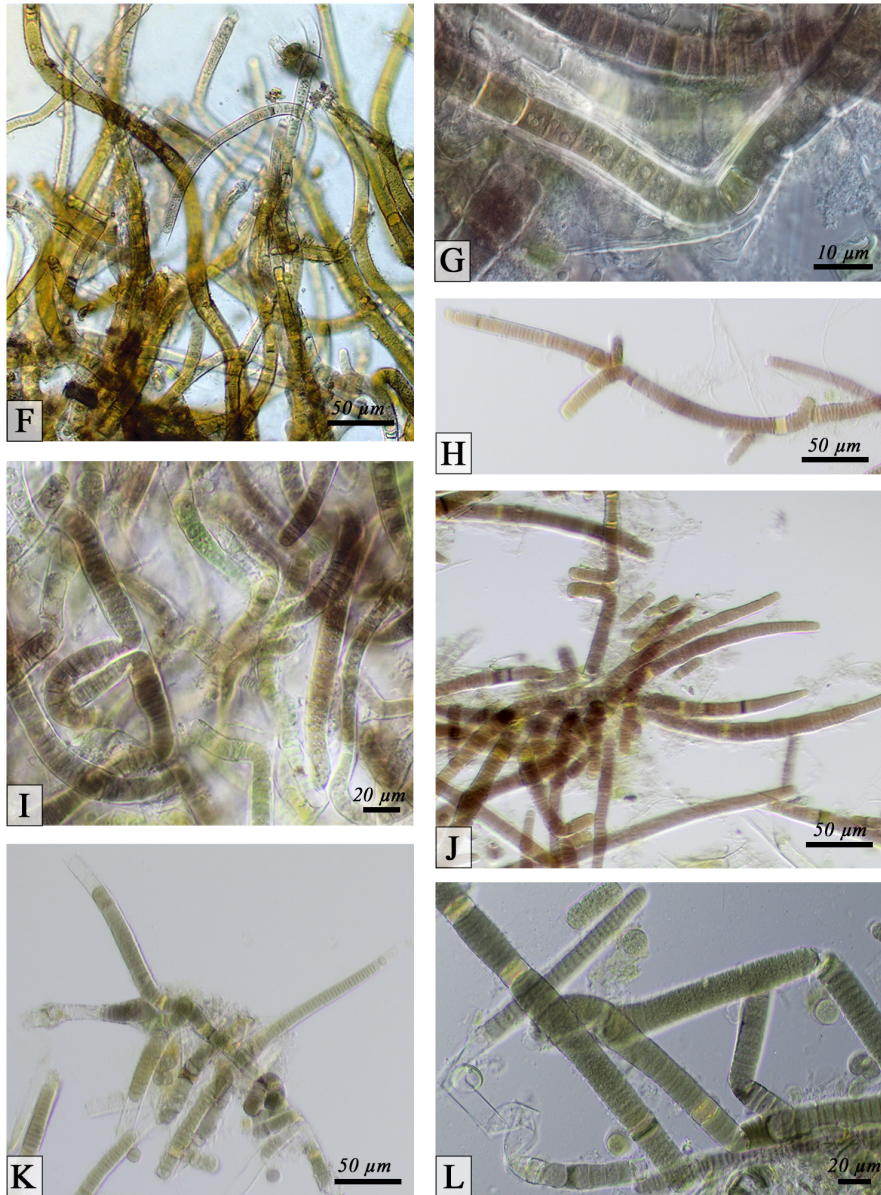


Рис. 1. *Brasilonema octagenarum*: корки цианобактерии на воздушных корнях орхидей (A) и на *Tillandsia funkiana* (B); внешний вид разрастания под бинокляром (C – в оранжеее; D – в жидкой культуре); E – скопления нитей на агаре, видны ряды вакуолизированных клеток, некридии, желтые гетероцисты; влагалища (F – в оранжеее; G – на агаре); ложное ветвление (H – на агаре, I – в жидкой культуре); полиморфизм окончаний трихомов (J – на агаре, K – в жидкой культуре); L – фрагментация трихомов

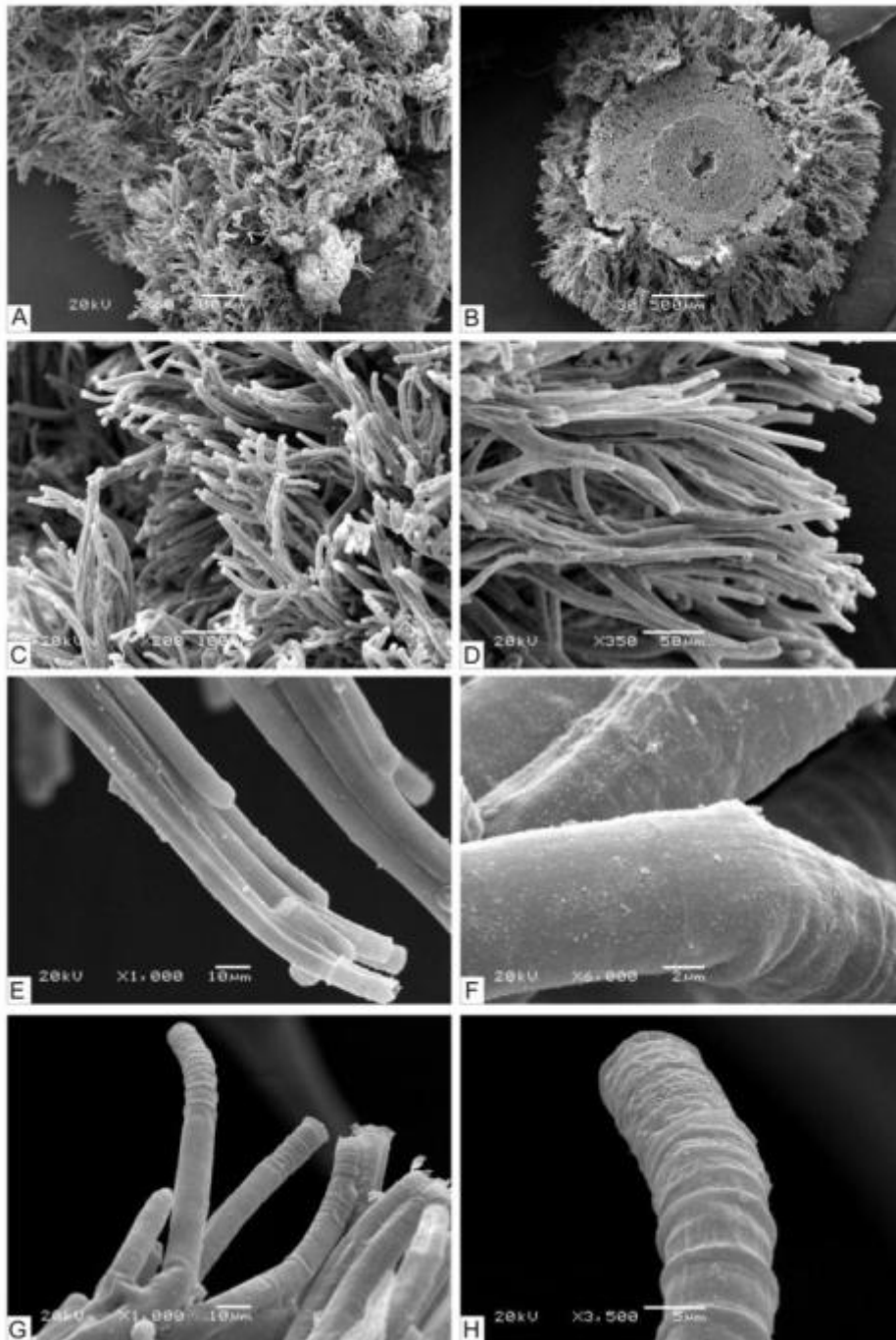


Рис. 2. СЭМ микрофотографии *Brasionema octagenarum* на поверхности воздушных корней орхидеи “*Vanda hybrid*”: *A* – фрагмент дернинки; *B* – поперечный срез корня; *C*, *D* – восходящие нити и пучки нитей; *E* – пучок нитей, влагалища с гладкой поверхностью; *F* – участок нити с частично гладкой, частично складчатой поверхностью; *G*, *H* – концы нитей; влагалища имеют кольцевидно-ребристую структуру

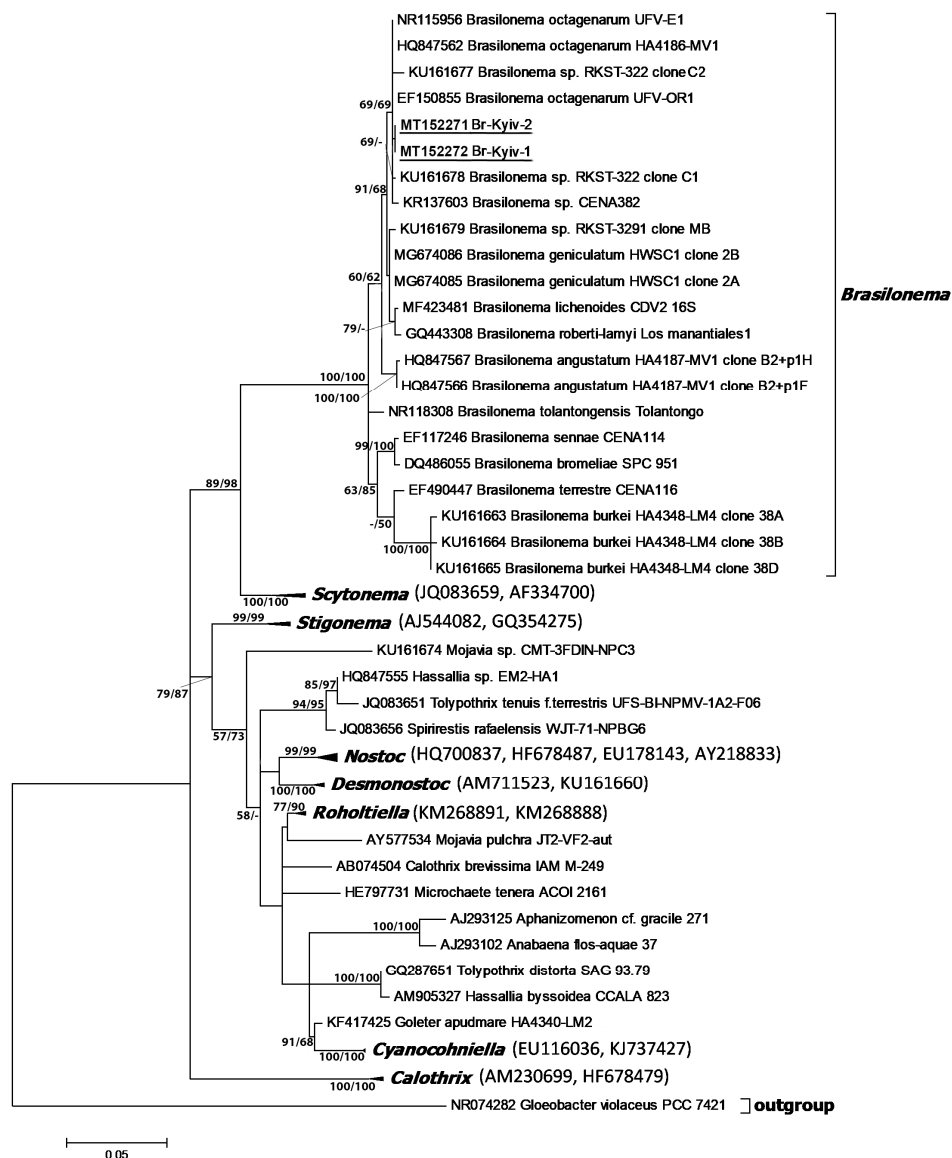


Рис. 3. Молекулярная филогения *Nostocales* (*Cyanoprokaryota*) на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S *p*РНК. Филогенетическое дерево построено методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с указанием значений поддержки бутстрепа при данном анализе (bootstrap support (BP), слева) и при анализе методом присоединения соседей (Neighbor Joining, справа). Показаны только значения BP выше 50%. Оригинальные последовательности штаммов отмечены подчеркиванием

Изучение сходства между генами 16S *p*РНК двух рибосомных оперонов наших штаммов и других штаммов *Brasilonema* (табл. 2), выявило 99,9% идентичности киевских материалов и трех штаммов

Таблица 1. Морфологические признаки видов рода *Brasilonema* Figue et al. по оригинальным и литературным данным

Признак	Оригинальные данные для <i>B. ostagensis</i> Вг-Куш-1 и Вг-Куш-2		Литературные данные видов рода <i>Brasilonema</i>	Литература	
	Маты из оранжевой Водная культура	Агар			
Разрастания	Распростертые, с бархатистой поверхностью, от зеленовато-бурого до черноватого цвета, образованы тесно переплетенными нитями, образующими восходящие пучки	В виде клубочков светло-лилового или оливоково-зеленого цвета, образованных разнообразно изогнутыми нитями	Шерстистый налет буро-зеленого, по краям желтовато-бурого цвета из тесно переплетенных нитей, образующих восходящие пучки	Плотные черно-фиолетовые корочки, образованные прямыми пучками тесно переплетенных нитей	<i>E. vromeliae</i> (Figue et al., 2007) <i>E. ostagensis</i> (Aguilar et al., 2008) <i>E. tolaionense</i> (Vessera-Abalón et al., 2013)
Ширина нитей, мкм	11.4–16.8 (19.5) (x _{cp} = 13.6)	(11.1) 13.3–19.0 (23.5) (x _{cp} = 16.5)	(13.9) 15.2–20.0 (23.1) (x _{cp} = 17.4)	15–17	17.5–24.5 (x _{cp} = 21.0)
Влагалища	Тонкие, крепкие, бесцветные, иногда желтоватые	Тонкие, крепкие, бесцветные, в старых нитях широкие, слоистые,	Тонкие, крепкие, слабо слоистые, бесцветные	Тонкие, крепкие, иногда слабослоистые, бесцветные	Тонкие, крепкие, в старых нитях слоистые, бесцветные
Ложное ветвление	Очень редко, одинарное и двойное	Часто, одинарное и двойное	Редко, одинарное и двойное	Очень редко, одинарное и двойное	Редко, преимущественно двойное
Трихом	Не перетянут или слегка перетянут, к концу сужен	Не перетянут или слегка перетянут, к концу не сужен, иногда слабо	Не перетянут или слегка перетянут, без заметного сужения к концу	Не перетянут или слегка перетянут, к концу не сужен	Не перетянут или слегка перетянут, к концу не сужен (кроме молодых трикомов)
Ширина трикомов, мкм	(8.1) 8.4–12.9 (13.3) (x _{cp} = 10.4)	(7.3) 9.0–19.2 (21.1) (x _{cp} = 12.0)	(9.2) 10.1–17.6 (23.1) (x _{cp} = 15.1)	14.5–16.8	12.5–20.0 (x _{cp} = 17.0)
Длина клеток	2.5–8.4	3.5–6.7	2.8–6.6	9.5–18.4	5.25–18.7

Цвет клеток	Серовато-фиолетовый, сине-зеленый, светло-изумрудно-зеленый, светло-желтый	Темно-лиловый, зеленовато-бурый, оливковый	Оливково-зеленый до коричневого-фиолетового	Фиолетовый до коричневого
Гетероцисты, ширина/длина, мкм	В основном одиночные, интеркалярные, желтоватые, разнообразной формы: от линзовидных до округлых и удлиненно-цилиндрических, 9,3–13,3/6,2–10,0	В основном одиночные, интеркалярные, изредка терминальные, золотисто-желтые, разнообразной формы, 10,1–16,8/8,4–12,5	Одиночные, интеркалярные, дисковидные или цилиндрические, такой же ширины, как вегетативные клетки. Их длина изредка до 1,5 раз превышает ширину	Одиночные, интеркалярные, дисковидные до прямоугольных, 12,5–16,4/7,4–15,6
Местообитание	На воздушных корнях орхидей, стеблях и листьях тилландсий, а также каменных ограждениях и металлических конструкциях	На внутренней стороне листьев бромелий и деревянных поддонах в оранжерее	На стволах и листьях молодых эвкалиптов, а также на наземных листьях орхидей, мхе и отмершей древесине	Субаэрофитно на влажном известняке у водопада

Таблица 2. Процент сходства последовательности гена 16S рРНК киевских штаммов *Brasilonema octagenarium* Вт-Київ-1 и Вт-Київ-2 и других известных представителей этого рода

№	Штамм	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	Вт-Київ-1	–																				
2	Вт-Київ-2	100.0	–																			
3	<i>B. octagenarium</i> UFV-OR1	99.9	99.9	–																		
4	<i>B. octagenarium</i> UFV-E1	99.9	99.9	100.0	–																	
5	<i>B. octagenarium</i> HA4186-MV1	99.9	99.9	100.0	100.0	–																
6	<i>Brasilonema</i> sp. RKST-322 clone C1	99.8	99.8	99.9	99.9	99.9	–															
7	<i>Brasilonema</i> sp. RKST-322 clone C2	99.5	99.5	99.6	99.6	99.6	99.5	–														
8	<i>Brasilonema</i> sp. CEN.A382	99.7	99.7	99.8	99.8	99.8	99.7	99.4	–													
9	<i>Brasilonema</i> sp. RKST-3291 clone MB	99.6	99.6	99.7	99.7	99.7	99.6	99.3	99.5	–												
10	<i>B. gemiculatum</i> HWSC1 clone 2B	99.3	99.3	99.4	99.4	99.4	99.3	99.0	99.2	99.5	–											
11	<i>B. gemiculatum</i> HWSC1 clone 2A.	99.4	99.4	99.5	99.5	99.5	99.4	99.1	99.3	99.6	99.7	–										

B. octagenarum. Результат сравнения этих генов у Br-Kyiv и *B. bromeliae* (97,5%) свидетельствует о том, что это разные виды, поскольку достоверным порогом разграничения видов у прокариот считается процент сходства генов 16S *p*PHK ниже 98,7% (Stackebrandt, Ebers, 2006; Kim et al., 2014). Именно таким оказалось сходство между Br-Kyiv и *B. tolantongensis* (см. табл. 2).

Как видно из таблицы, подавляющее число штаммов *Brasilonema* имели сходство с киевскими штаммами выше упомянутого порога. Последовательность гена 16S *p*PHK не дает однозначного разграничения между видами *Brasilonema*, что видно и на филогенетическом дереве (см. рис. 3). Поэтому, для уточнения видовой идентификации киевского материала мы использовали данные о последовательностях участка 16S *p*PHK, сцепленного с регионом 16S-23S ITS. В настоящее время этот фрагмент признан более информативным, чем просто последовательности гена 16S *p*PHK, он хорошо себя зарекомендовал при разграничении морфологически и биотопически близких видов цианобактерий, в т.ч. представителей рода *Brasilonema* (Vaccarino et al., 2012; Miscoe et al., 2016; Villanueva et al., 2018, 2019).

Филогенетический анализ по гену 16S *p*PHK, сцепленного с регионом 16S-23S ITS (рис. 4), показал, что киевские штаммы входят в кладу, образованную одним из штаммов *B. octagenarum* HA4186-MV-1 и несколькими другими, идентифицированными как *Brasilonema* sp. Сравнение количества нуклеотидов ряда информативных участков консервативного домена ITS киевских штаммов *Brasilonema* с другими штаммами рода (табл. 3) показало, что 16S-23S ITS регион характеризуется очень высокой вариабельностью. Значительные отличия в длине отдельных

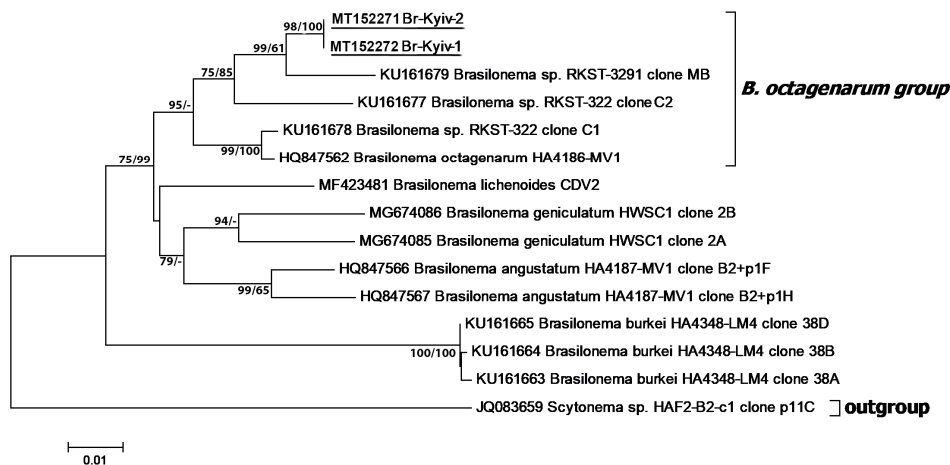


Рис. 4. Молекулярная филогения рода *Brasilonema* на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S *p*PHK, сцепленного с 16S-23S ITS регионом. Филогенетическое дерево построено методом присоединения соседей (Neighbor Joining)

геликсов (спиралей) и спейсеров, присутствии/отсутствии гена, кодирующего *t*РНК, прослеживаются не только между разными видами *Brasilonema*, но и между молекулярными клонами, происходящими из одного штамма. 16S-23S ITS участок киевских штаммов не содержал генов, кодирующих *t*РНК, и в целом, по длине нуклеотидных цепочек был наиболее близок к штаммам *Brasilonema* sp. RKST-3291 clone MB и RKST-322 clone C2, а также *B. octagenarum* HA4186-MV1 clone B7A+p4 (табл. 3).

Таблица 3. Сравнение количества нуклеотидов, входящих в консервативные домены участка 16S-23S ITS киевских штаммов *Brasilonema* с другими штаммами этого рода (по Villanueva et al., 2019)

Штамм	Leader	D1-D1' helix	spacer+ D2+ spacer	D3+ spacer	tRNAII legene	spacer+ V2+ spacer	tRNAAI legene	Spacer	Box-B+ spacer	Box A	D4+ spacer	V3+ITS end (partial)
<i>Brasilonema</i> sp. Br-Kyiv*	8	105	38	11	–	–	–	–	48	11	21	63
<i>B. geniculatum</i> clone 2A	8	91	38	11	74	78	73	136	48	11	21	228
<i>B. geniculatum</i> clone 2B	8	67	38	138	–	–	–	–	48	11	21	228
<i>B. lichenoides</i>	8	67	38	138	–	–	–	–	48	11	21	55
<i>B. sp.</i> RKST-3291 clone MB	8	105	38	11	74	91	73	134	47	11	21	61
<i>B. sp.</i> RKST-322 clone C1	8	67	38	139	–	–	–	–	47	11	21	61
<i>B. sp.</i> RKST-322 clone C2	8	102	38	11	74	84	73	133	47	11	21	73
<i>B. octagenarum</i> HA4186-MV1 clone B7A+p4	1	67	38	139	–	–	–	–	47	11	21	61
<i>B. angustatum</i> HA4187-MV1 clone B2+p1F	8	67	38	129	–	–	–	–	49	11	21	72
<i>B. angustatum</i> HA4187-MV1 clone B2+p1F	8	79	38	11	74	60	73	126	49	11	21	67

*Поскольку анализируемый участок ITS у штаммов Br-Kyiv-1 и Br-Kyiv-2 идентичен, в таблице они приведены под одним именем.

Мы также провели качественный анализ вторичных структур РНК информативных геликсов D1-D1', Box-B и V3 участка 16S-23S ITS киевских штаммов и сравнили полученные данные с уже известными. В роде *Brasilonema* вторичные структуры опубликованы для 5 видов: *B. angustatum*, *B. burkei*, *B. geniculatum*, *B. lichenoides* и *B. octagenarum*, а также ряда неидентифицированных до вида штаммов (Vaccarino, Johansen,

2012; Becerra-Absalón et al., 2013; Rodarte et al., 2014; Miscoe et al., 2016; Villanueva et al., 2018, 2019). Сравнив наши данные со всеми опубликованными реконструкциями, мы пришли к выводу, что по конфигурации вторичной структуры киевские штаммы наиболее близки к штаммам *Brasilonema* sp. RKST-3291 clone MB и RKST-322 clone C2. При этом другой клон штамма RKST-322 – clone C1 близок к *B. octagenarum* HA4186-MV-1. Сравнение основных геликсов вторичной структуры 16S-23S ITS наших изолятов и филогенетически близких штаммов *Brasilonema* (рис. 5) показало высокую вариабельность геликса D1-D1', тогда как геликсы Vох-V и V3 являются достаточно консервативными и различаются у анализируемых штаммов только несколькими нуклеотидами, сосредоточенными преимущественно в районе терминальных петель (см. рис. 5).

Результаты филогенетических реконструкций и качественного анализа вторичной структуры основных информативных геликсов участка 16S-23S ITS хотя и показали близость цианобактерии из киевской оранжереи к *B. octagenarum*, однако не дали однозначного ответа относительно видовой принадлежности. Причиной этому является отсутствие данных о регионе 16S-23S ITS аутентичного штамма *B. octagenarum* (UFV-OR-1), а также очень высокая вариабельность этого региона у представителей рода *Brasilonema* в целом. Качественный состав региона 16S-23S ITS и его вторичная структура являются признанными маркерами для разграничения видов в пределах разных родов цианобактерий. Однако, похоже, они не решают этой проблемы в пределах рода *Brasilonema*, для этого необходима апробация других маркеров (Villanueva et al., 2019). Присутствие нескольких неидентифицированных штаммов в пределах клады, относящейся к *B. octagenarum* (см. рис. 3, 4) указывает на, вероятно, широкую современную трактовку данного вида, который возможно в будущем будет разделен на несколько отдельных таксонов. В связи с этим, на основании проведенных анализов, мы относим киевский материал к *B. octagenarum*, но предполагаем, что этот вид, вероятно, в будущем станет предметом очередной таксономической ревизии.

Экология и географическое распространение. *B. octagenarum* известна как эпифит: разрастания этого вида находили на стволах и листьях молодых эвкалиптов, наземных листьях орхидей, мхах и отмершей древесине (Aguíar et al., 2008; Sant'Anna et al., 2011; Vaccarino, Johansen, 2012; Mendoza Carbajal, 2018). В оранжерее киевского ботсада эта цианобактерия обильно вегетировала не только на разнообразных орхидеях и бромелиевых, но и на каменных ограждениях и металлических конструкциях оранжереи, что также характерно для *B. bromeliae*. Вероятно, при наличии благоприятных условий температуры и влажности, характер субстрата не играет для бразилонем большой роли.

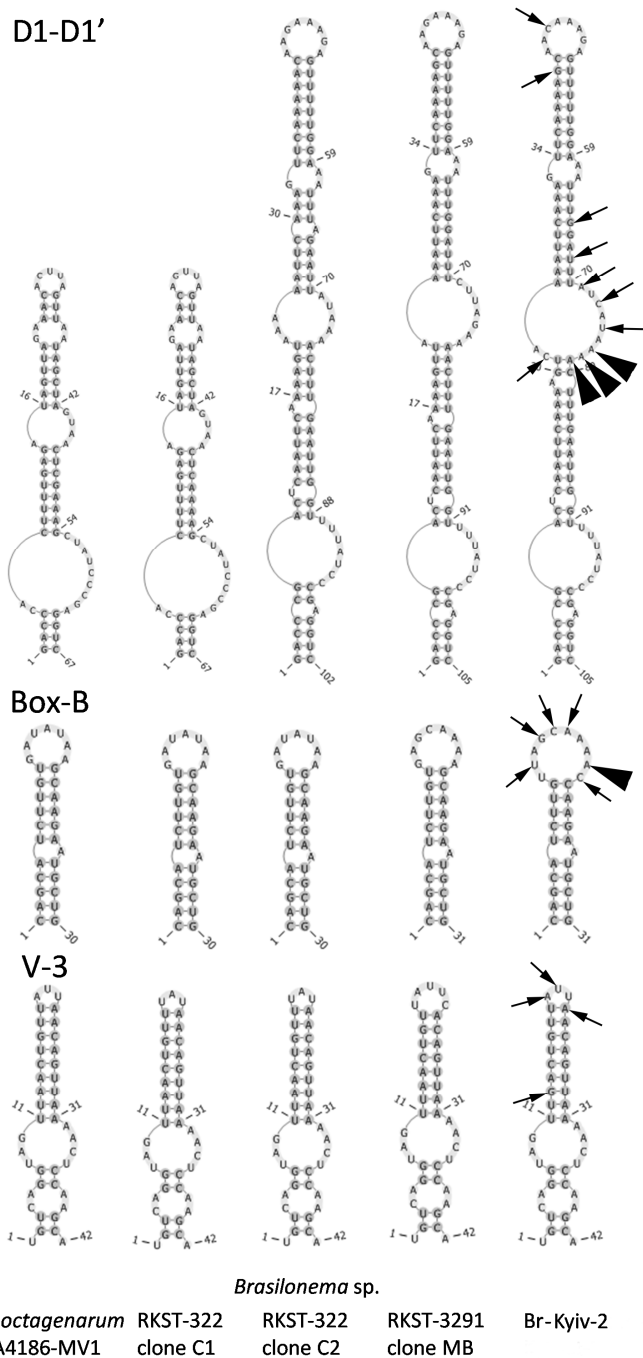


Рис. 5. Вторичная структура РНК основных информативных геликсов региона 16S-23S ITS одного из киевских штаммов *Brailonema* в сравнении с наиболее близкими штаммами *B. octagenarum* и *Brailonema* sp. Варибельные участки РНК киевского штамма отмечены стрелками, места вставок нуклеотидов – головками стрелок. Сравнение по высоко-варибельному геликсу D1-D1' проведено только с наиболее похожими спиралями штаммов RKST-322 clone C2 и RKST-3291 clone MB

Относительно происхождения киевской популяции *B. octagenarum*, признаки присутствия которой отмечали несколько десятилетий, мы полагаем, что она могла попасть в Киев с тропическими растениями, привезенными украинскими учеными из Бразилии, которую они посещали во время кругосветного путешествия на научно-исследовательском судне «Академик Вернадский» в 1986 году.

Наша находка подтверждает мнение, высказанное М. Богуницкой с соавторами (Bohunická et al., 2016) о том, что бразилонема является широко распространенным пантропическим родом, который также может быть обнаружен в других климатических регионах при наличии подходящих условий обитания. Такие условия созданы в тропических оранжереях и других помещениях со стабильной температурой и влажностью. Основным лимитирующим фактором для распространения *Brasilonema* в природе выступает непереносимость зимнего вымерзания; аномально теплые зимы последнего десятилетия позволяют предположить возможность расширения ее природного ареала.

Заключение

В исследовательском отделении оранжерейного комплекса тропических и субтропических растений Национального ботанического сада имени Н.Н. Гришко НАН Украины в Киеве обнаружена тропическая цианобактерия, которая по результатам комплексного изучения методами световой и сканирующей микроскопии, а также молекулярно-филогенетического анализа была определена как *B. octagenarum* R.Anguiar et al. Это первая находка представителя пантропического рода *Brasilonema* Fiore et al. в оранжерее Старого Света. В то же время, результаты филогенетических реконструкций и качественного анализа вторичной структуры информативных спиралей D1-D1', Vох-B и V3 участка 16S-23S ITS еще раз засвидетельствовали очень высокую вариабельность этого региона у представителей *Brasilonema*, что ставит вопрос о необходимости дальнейших поисков молекулярных маркеров для достоверного разграничения видов этого рода.

Выражаем искреннюю благодарность нашим спонсорам за помощь и поддержку в получении оборудования, на котором выполнена данная работа (фонд Александра фон Гумбольдта, Германия (Alexander von Humboldt Stiftung, Deutschland) и ООО «Светмед» (Украина)). Выражаем благодарность д-ру Карин Глазер (университет г. Росток, Германия) за ценные советы и рекомендации при анализе молекулярных данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Anguiar M., Fiore F.M., Franco M.W., Ventrella M.C., Lorenzi A.S., Vanetti C.A., Alfenas A.C. 2008. A novel epiphytic cyanobacterial species from the genus *Brasilonema* causing damage to *Eucalyptus* leaves. *J. Phycol.* 44: 1322–1334. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00584.x>

- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *Automatic Control, IEEE Transactions on Automatic Control*. 19: 716–723.
- Bischoff H.W., Bold H.C. 1963. Phycological studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *University of Texas Publ.* 6318: 1–95.
- Becerra-Absalón I., Rodarte B., Osorio K., Alba-Lois L., Segal-Kischinevzky C., Montejano G. 2013. A new species of *Brasilonema* (Scytonemataceae, Cyanoprokaryota) from Tolantongo, Hidalgo, Central Mexico. *Fottea*, Olomouc. 13(1): 25–38. <http://dx.doi.org/10.5507/fot.2013.003>
- Bohunická M., Mareš J., Hauer T., Komárek J., Štenclová L., Zima J., Becerra-Absalón I., Johansen J.R. 2016. Biogeography of the recently described pantropical genus *Brasilonema* Fiore et al. (*Nostocales*, *Cyanobacteria*). In: Rott E. (ed.): 20th *Cyanophyte / Cyanobacteria* Research Symposium. Program & Abstracts. Institute of Botany, University of Innsbruck. Austria. 20 p.
- Bourrelly P., Manguin E. 1952. *Algues d'eau douce de la Guadeloupe et dépendances*. Centre National de la Recherche Scientifique, Société d'Édition d'Enseignement Supérieur. Paris. 281 p.
- Byun Y., Han K. 2009. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. *Bioinformatics*. 25(11): 1435–1437.
- Fiore M.F., Sant'Anna C.L., Azevedo M.T.P., Komárek J., Kaštovský J., Sulek J., Lorenzi A.S. 2007. The cyanobacterial genus *Brasilonema*, gen. nov., a molecular and phenotype evaluation. *J. Phycol.* 43:789–798. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00376.x>
- González-Resendiz L., León-Tejera H.P., Gold-Morgan M. 2015. Morphological diversity of benthic *Nostocales* (*Cyanoprokaryota/Cyanobacteria*) from the tropical rocky shores of Huatulco region, Oaxaca, México. *Phytotaxa*. 219(3): 221–232. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.219.3.2>
- Guiry M.D., Guiry G.M. 2019. *AlgaeBase. World-wide electronic publication*. National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>
- Katoh K., Toh H. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*. 9: 286–298.
- Kim M., Oh H.S., Park S.Ch., Chun J. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S *r*RNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. and Evol. Microbiol.* 64: 346–351.
- Komárek J. 2013. Cyanoprokaryota. 3rd part: Heterocytous Genera. In: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Bd 19/3. Berlin, Heidelberg: Springer Spectrum. Pp. 1–1130.
- Marin B., Nowack E.C.M., Melkonian M. 2005. A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist*. 156: 425–432.
- Mendoza Carbajal L.H. 2018. *New insights in the morphology and phylogeny of heterocytous cyanobacteria from Peru, including the description of new taxa*. Master's Thesis. České Budějovice. 108 p. <https://theses.cz/ivekg7> > MasterThesis_Final
- Miscoe L.H., Johansen J.R., Vaccarino M.A., Pietrasiak N., Sherwood A.R. 2016. The diatom flora and cyanobacteria from caves on Kauai, Hawaii. II. Novel cyanobacteria from caves on Kauai, Hawaii. *Bibliotheca Phycologica*. 123: 75–152.
- Rodarte B., Becerra-Absalón I., Montejano G.A., Osorio-Santos K., Alba-Lois L., León-Tejera H., Segal-Kischinevzky C. 2014. Morphological and molecular characterization of *Brasilonema roberti-lamii* (*Cyanophyceae*, *Nostocales*, *Scytonemataceae*), from Central Mexico. *Phytotaxa*. 164(4): 255–264. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.164.4.4>

- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19: 1572–1574.
- Sant'Anna C.L., Azevedo, M.T.P., Fiore M.F., Lorenzi A.S., Kaštovský J., Komárek J. 2011. Subgeneric diversity of *Brasilonema* (Cyanobacteria, Scytonemataceae). *Rev. Brasil. Bot.* 34(1): 51–62. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042011000100006>
- Stackebrandt E., Ebers J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today*. 8: 6–9.
- Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Revs.* 35: 171–205.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725–2729.
- Vaccarino M.A., Johansen J.R. 2012. *Brasilonema angustatum* sp. nov. (Nostocales), a new filamentous cyanobacterial species from the Hawaiian Islands. *J. Phycol.* 48: 1178–1186. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01203.x>
- Villaneuva C.D., Hašler P., Dvořák P., Pouličková A., Casamatta D.A. 2018. *Brasilonema lichenoides* sp. nov. and *Chroococciopsis lichenoides* sp. nov. (Cyanobacteria): two novel cyanobacterial constituents isolated from a tripartite lichen of headstones. *J. Phycol.* 54: 224–233. <https://doi.org/10.1111/jpy.12621>
- Villaneuva C.D., Garvey A.D., Hašler P., Dvořák P., Pouličková A., Norwich A.R., Casamatta D.A. 2019. Descriptions of *Brasilonema geniculatum* and *Calothrix dumus* (Nostocales, Cyanobacteria): two new taxa isolated from cemetery tombstones. *Phytotaxa*. 387(1): 1–20. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.387.1.1>
- Wilmutte A., Van der Auwera G., De Wachter R. 1993. Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC75 18, and phylogenetic analysis. *FEBS Letters*. 317: 96–100. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81499-p](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81499-p)
- Zammit G., Billi D., Shubert E., Kaštovský J., Albertano P. 2011. The biodiversity of subaerophytic phototrophic biofilms from Maltese hypogea. *Fottea* 11(1): 187–201. <https://fottea.czechphycology.cz/pdfs/fot/2011/01/18.pdf>

Подписал в печать С.П. Вассер

Romanenko P.A.¹, Vinogradova O.N.², Romanenko E.A.², Mikhailiyuk T.I.², Babenko L.M.², Ivannikov R.³, Scherbak N.N.⁴

¹ LLC SPE “The Fifth Element”, Mikhailivska Str., Kherson 3773025, Ukraine

² N.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine, 2 Tereshchenkivska Str., Kyiv 01004, Ukraine

³ N.N. Grishko National Botanical Garden, 1 Timiriazivska Str., Kyiv 01014, Ukraine

⁴ School for Science and Technology, Örebro University, Fakultetagatan 1, Örebro, Sweden

Morphological and molecular characterisation of the representative of *Brasilonema* (*Scytonemataceae*, *Cyanoprokaryota*) from the tropical greenhouse in Kiev (Ukraine)

The paper presents morphological and molecular characterization of the representative of the pantropic genus *Brasilonema* Fiore et al., first found in the greenhouse in Europe. The genus described in 2007 using an integrated approach is morphologically close to *Scytonema* Agardh,

differing in the filaments forming ascending bundles, rarely occurring false branching and the color of cells. To date, 12 species of *Brasilonema* have been described; all of them occur subaerophytically in tropical and subtropical regions with a humid climate. For several years in the greenhouse of the N.N. Grishko National Botanical Garden of the NAS of Ukraine, we observed abundant blackish mats with a fleecy surface, formed by falsely branching filaments of heterocytous cyanobacteria, lilac, pale purple or gray in color. Cyanobacteria densely covered the vegetative organs of various tropical epiphytic plants from the *Orchidaceae* and *Bromeliaceae* families; sometimes they inhabited concrete and wooden substrates in the greenhouse. The morphological features of the found cyanobacteria were studied both in natural material (samples from the greenhouse) and culture. For cultivation, liquid and agarized N-free BG11 medium was used. The specimens from the mats and the cultures had some differences in thalli habitus, coloration and arrangement of filaments, frequency of false branching, trichome appearance, dimensional limits, etc. A comparative analysis of the original data with descriptions of the known *Brasilonema* species showed that the Kiev population morphologically and ecologically coincides with several species, of which it is closest to *B. octagenarum* Aguiar et al. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequence of the gene encoding 16S rRNA confirmed affiliation of the original strains to *Brasilonema*. Analysis of the nucleotide sequence of the 16S-23S ITS region, as well as the secondary structure of its most informative helices, showed the closest proximity of the Kiev material to *B. octagenarum*, which in turn is probably a complex of species whose taxonomic separation is possible in the future. Presumably, cyanobacteria could get into the Kiev greenhouse with tropical plants brought by Ukrainian botanists from an expedition to Brazil in 1986.

Key words: subaerophytic cyanobacteria, *Brasilonema octagenarum*, morphological variability, SEM, molecular phylogeny, 16S rRNA, 16S-23S ITS secondary structure