

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Разграничение видов и анализ криптического разнообразия микроводорослей рода *Micractinium* (*Chlorophyta*)

Е.С. Кривина<sup>1</sup>✉, А.Д. Темралеева<sup>1</sup>, Ю.С. Букин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное исследовательское учреждение «Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушино, Московская область, Россия

<sup>2</sup> Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

✉ pepelisa@yandex.ru

**Аннотация.** В статье рассматривается система зеленых микроводорослей рода *Micractinium*, построенная на основании морфологических, физиологических, экологических и молекулярно-генетических данных. Обсуждаются главные диагностические признаки видов, а также систематическое положение некоторых таксонов. Филогенетический анализ показал, что род *Micractinium* характеризуется достаточно высоким криптическим разнообразием. Используемые алгоритмы разграничения видов имели различные результаты по количеству выделенных кластеров потенциально видового уровня. Метод ABGD, основанный на дистанциях, является менее «чувствительным». Алгоритмы GMYC и PTP, анализирующие топологию филогенетического дерева, более реалистично отражают систематику рода *Micractinium* и служат эффективными вспомогательными инструментами для разграничения видов. Кластеризация, полученная двумя последними методами, хорошо согласуется с морфологическими (размеры и форма клеток, способность формировать колонии, продуцирование щетинок, тип хлоропласта), физиологическими (потребность в витаминах, реакция на воздействие высоких и низких температур), молекулярно-генетическими (наличие интронов и их длина, уровень генетических различий, наличие компенсаторных замен (СВС) или характерных особенностей вторичной структуры в ITS1 и ITS2) и экологическими признаками (среда обитания). Показана полифилетичность типового вида рода *M. pusillum*, а также *M. belenophorum*. Интрон был эффективен как вспомогательный инструмент для разграничения видов, однако результаты анализа интронов необходимо учитывать в совокупности с другими признаками. Применение СВС-подхода, базирующегося на поиске компенсаторных замен в консервативных регионах ITS2, было успешным только для отграничения криптических видов от «истинных» представителей *M. pusillum*. При разграничении видов эффективнее учитывать все СВС в ITS1 и ITS2 и анализировать характерные структурные различия (молекулярные подписи) во вторичной структуре внутренних транскрибируемых спейсеров. Анализ генетических дистанций нуклеотидных последовательностей 18S–ITS1–5.8S–ITS2 показал, что внутривидовые различия у представителей рода колебались в пределах 0–0.5 %, межвидовые – 0.6–4.7 %. Благодаря полифазному подходу удалось охарактеризовать 29 кластеров и филогенетических линий видового уровня в рамках рода *Micractinium* и выдвинуть предположения о видах внутри выделенных групп. Ключевые слова: зеленые микроводоросли; ABGD; GMYC; PTP; морфология; экология; филогения; фрагмент 18S–ITS1–5.8S–ITS2.

**Для цитирования:** Кривина Е.С., Темралеева А.Д., Букин Ю.С. Разграничение видов и анализ криптического разнообразия микроводорослей рода *Micractinium* (*Chlorophyta*). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(1):74-85. DOI 10.18699/VJGB-22-11

## Species delimitation and microalgal cryptic diversity analysis of the genus *Micractinium* (*Chlorophyta*)

E.S. Krivina<sup>1</sup>✉, A.D. Temraleeva<sup>1</sup>, Yu.S. Bukin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Pushchino, Moscow region, Russia

<sup>2</sup> Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

✉ pepelisa@yandex.ru

**Abstract.** In this article, the system of the green microalgal genus *Micractinium*, based on morphological, physiological, ecological and molecular data, is considered. The main diagnostic species characteristics and the taxonomic placement of some taxa are also discussed. Phylogenetic analysis showed that the genus *Micractinium* is characterized by high cryptic diversity. The algorithms used for species delimitation had different results on the number of potentially species-level clusters allocated. The ABGD method was less “sensitive”. The tree-based approaches GMYC and PTP showed a more feasible taxonomy of the genus *Micractinium*, being an effective additional tool for distinguishing species. The clustering obtained by the latter two methods is in good congruence with morphological (cell size and shape, ability to form colonies, production of bristles, chloroplast type), physiological (vitamin requirements, reaction to high and low temperatures), molecular (presence of introns, level of genetic differences, presence of CBCs

or special features of the secondary structure in ITS1 and ITS2) and ecological characteristics (habitat). The polyphyly of the holotype of the genus *M. pusillum* as well as *M. belenophorum* is shown. The intron was effective as an additional tool for distinguishing species, and the results of the intron analysis should be taken into account together with other characteristics. The CBC approach, based on the search for compensatory base changes in conservative ITS2 regions, was successful only for distinguishing cryptic species from "true" members of *M. pusillum*. Therefore, to distinguish species, it is more effective to take into account all the CBC in ITS1 and ITS2 and analyze characteristic structural differences (molecular signatures) in the secondary structure of internal transcribed spacers. The genetic distances analysis of 18S–ITS1–5.8S–ITS2 nucleotide sequences showed that intraspecific differences in the genus ranged from 0 to 0.5 % and interspecific differences, from 0.6 to 4.7 %. Due to the polyphasic approach, it was possible to characterize 29 clusters and phylogenetic lines at the species level within the genus *Micractinium* and to make assumptions about the species.

Key words: green microalgae; ABGD; GMYC; PTP; species delimitation; morphology; ecology; phylogeny; 18S–ITS1–5.8S–ITS2 fragment.

**For citation:** Krivina E.S., Temraleeva A.D., Bukin Yu.S. Species delimitation and microalgal cryptic diversity analysis of the genus *Micractinium* (Chlorophyta). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):74-85. DOI 10.18699/VJGB-22-11

## Введение

Род *Micractinium* был описан G. Fresenius в 1858 г. и отнесен к семейству Micractiniaceae. Долгое время считалось, что данный род включает только микроводоросли, которые, в отличие от рода *Chlorella* и прочих «маленьких зеленых шариков», формируют колонии и имеют щетинки, состоящие из белка, лишённые целлюлозных волокон и развивающиеся после образования клеточной стенки (Schnepf et al., 1980). Видовые различия основывались на незначительных изменениях в формировании колоний, а также длины и количества щетинок.

В результате филогенетического анализа последовательностей гена 18S рРНК М. Wolf с коллегами (Wolf et al., 2003) показали, что штаммы рода *Micractinium* входят в класс *Trebouxiophyceae* и тесно связаны с родом *Chlorella* Beijerinck. Позже было установлено (Luo et al., 2005, 2006), что формирование колоний и продуцирование щетинок нередко являются реакцией на так называемую пастбищную нагрузку со стороны альгофагов (в первую очередь коловраток и инфузорий); в этой работе высказано также предположение о полифилетичности типового вида рода – *M. pusillum*. Т. Pröschold с соавторами (Pröschold et al., 2010) по данным молекулярно-генетических исследований доказали, что род *Diacanthos* с его типовым видом *D. belenophorus* является частью рода *Micractinium*. Обобщив результаты молекулярно-генетического, морфологического и онтогенетического анализов, исследователи предложили новую концепцию клады *Chlorella*, в соответствии с которой род *Micractinium* был перенесен в семейство Chlorellaceae (Wolf et al., 2003; Krienitz et al., 2004; Fawley et al., 2005; Luo et al., 2010; Pröschold et al., 2010).

В настоящее время в составе рода *Micractinium* насчитывается 20 видов микроводорослей. Однако фрагмент 18S–ITS1–5.8S–ITS2 секвенирован только для 9 видов, среди которых встречаются как микроводоросли с классическим *Micractinium*-подобным морфотипом, т. е. формирующие колонии и продуцирующие щетинки, так и организмы, имеющую типичную *Chlorella*-подобную морфологию (например, *M. singularis*, *M. variable*, *M. simplicissimum*, *M. inermum*, *M. tetrahymenae*), у которых у стандартных условиях клетки одиночные, а щетинки отсутствуют (Hoshina, Fujiwara, 2013; Chae et al., 2019; Pröschold et al., 2020).

Представители рода *Micractinium* широко распространены в различных биотопах, в том числе в пресноводных и солоноватоводных водоемах, горячих источниках и в холодных водах Антарктиды, при температурах от нуля и выше 70 °C (Hoshina, Fujiwara, 2013; Onay et al., 2014; Adar et al., 2016; Chae et al., 2019). Они играют важную роль в жизни экосистем, активно участвуя в процессах фотосинтеза органических веществ и фотосинтетической аэрации, а также естественного самоочищения водоема путем аккумуляции, трансформации и минерализации поллютантов (Вайшля, Кулятов, 2011; Mehrabadi et al., 2017). Данные микроводоросли активно используются для производства кормов для животных, пищевых добавок и для очистки сточных вод (Lipstein, Hurwitz, 1983; Onay et al., 2014; Mehrabadi et al., 2017). Кроме того, некоторые виды рода *Micractinium* признаны подходящим сырьем для биотоплива из-за высокой скорости роста в сочетании с высоким содержанием липидов (Onay et al., 2014; Adar et al., 2016). В настоящее время значительный интерес для биотехнологии представляют термофильные и криотолерантные микроводоросли рода *Micractinium*, которые способны накапливать липиды или другие ценные вещества (Onay et al., 2014; Adar et al., 2016; Chae et al., 2021). Точная видовая идентификация в этом случае становится первоочередной задачей, поскольку экологическая пластичность видов к абиотическим факторам среды может существенно варьировать не только в рамках всего рода, но и между близкородственными видами (Onay et al., 2014; Chae et al., 2021).

Цель нашей работы заключалась в комплексном исследовании представителей рода *Micractinium*, включая новые штаммы Альгологической коллекции Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН (ИФХиБПП РАН) – Algal Collection of Soil Science Institute (ACSSI), для надежного разграничения близкородственных таксонов на уровне вида. Впервые для всех описанных видов *Micractinium* были обобщены морфологические, физиологические и экологические характеристики, рассмотрены результаты филогенетического анализа фрагмента 18S–ITS1–5.8S–ITS2, включая наличие интронов и их характеристики, значения генетических дистанций, оценены различия во вторичных структурах спейсеров ITS1 и ITS2, в том числе присутствие

компенсаторных замен (СВС) и структурные отличия, а также определены видовые границы с помощью методов GMYC, PTP и ABGD. На основании полифазного подхода выдвинуты предположения о критериях разделения видов внутри рода.

## Материалы и методы

**Объектами исследования** стали описанные и депонированные в GenBank генетические последовательности штаммов, принадлежащих роду *Micractinium*, а также шесть новых штаммов микроводорослей коллекции ACSSI. Штаммы ACSSI 198, ACSSI 287 и ACSSI 345 были изолированы из воды с поверхностного горизонта пелагической зоны оз. Прудовиков (53°31'44.4" с. ш., 49°30'58.0" в. д., г. Тольятти, Самарская область, Россия), ACSSI 343 и ACSSI 344 – из воды с поверхностного горизонта пелагической зоны и зарослей макрофитов оз. Большое Васильевское соответственно (53°32'45.2" с. ш., 49°32'02.0" в. д., Тольятти, Самарская область, Россия). Штамм ACSSI 332 (= IPPAS C-16) является субкультурой Коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS и изолирован из горячих источников на Чукотском полуострове.

**Изоляция и культивирование новых штаммов.** Каплю озерной воды без предварительной фильтрации наносили на твердую среду BG-11 с азотом (1 % агар, pH = 7.2) и далее многократно пересекали отдельные колонии. Полученные изоляты культивировали в климатостате при стандартных условиях (температура +23...+25 °C, свет 60–75 мкмоль фотонов/(м<sup>2</sup>·с), фотопериод 12 ч).

**Микроскопия.** Морфологию и жизненный цикл указанных штаммов изучали методами световой микроскопии (светлое поле и интерференционный контраст) с помощью микроскопов Leica DM750 и Carl Zeiss Axio Scope A1 (Германия) в ЦКП ИФХиБПП РАН. Результаты наблюдений документированы рабочими рисунками и фотографиями, снятыми с помощью цветных цифровых камер «Видеозавр» (Россия) и Carl Zeiss MRc 5 (Германия). Сроки наблюдения составили от 2 недель до 12 месяцев. Для определения границ варьирования морфологических признаков были проанализированы характеристики 200 вегетативных клеток каждого штамма.

**Выделение, амплификация, очистка и секвенирование ДНК.** Суммарную ДНК из штаммов выделяли с помощью колоночного набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США), следуя протоколу производителя. Для амплификации использовали готовую смесь Screen Mix-HS («Евроген», Россия). Праймеры для ПЦР генов 18S и 5.8S рРНК и спейсеров ITS1, ITS2 и условия амплификации приведены в работе (Krivina, Temraleeva, 2020). Детекцию целевых ПЦР-продуктов проводили электрофоретически в 1 % агарозном геле. Для дальнейшей очистки ампликонов из геля применяли набор Cleanup Standard («Евроген»). Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли на базе ЗАО «Синтол» (Россия).

**Молекулярно-филогенетический анализ.** Для анализа филогении и уточнения таксономического положения исследуемых штаммов был выполнен поиск гомологии нуклеотидных последовательностей 18S–ITS1–5.8S–ITS2 по алгоритму BLASTn в GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Отбор последовательностей осуществляли исходя из критериев максимального родства (сходство  $\geq 95\%$ ), качества прочтения, длины прочтения (не менее 2300 п. н.) и принадлежности к типовым видам и ауθενичным штаммам. В состав выборки для филогенетического анализа вошли 59 штаммов. Названия таксонов приведены согласно Международной электронной базе данных AlgaeBase (Guiry M.D., Guiry G.M., 2021). В программе BioEdit по алгоритму ClustalW было выполнено множественное выравнивание. Реконструированное методом максимального правдоподобия (ML) в программе IQ-TREE (с оценкой достоверности топологии сверхбыстрым бутстреп-анализом и тестированием эволюционной модели с помощью AIC критерия) филогенетическое дерево было использовано для разграничения видов с помощью алгоритма Poisson tree processes (PTP) на онлайн-сервере <https://species.h-its.org/>.

Для разграничения видов в массиве данных применяли метод автоматического поиска межвидового пробела/разрыва (gap) в генетических дистанциях (automatic barcode gap discovery, ABGD) (Puillandre et al., 2012) на онлайн-сервере <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>. Для анализа ABGD использовалась матрица генетических дистанций, рассчитанная по методу максимального правдоподобия в программе IQ-TREE. При ABGD методе результаты анализировались как в режиме начального разделения (initial partition), так и в режиме рекурсивного разделения (recursive partition). Третьим методом была обобщенная смешанная модель Юла с учетом целостности видов (general mixed Yule coalescent model, GMYC) (Fujisawa, Barraclough, 2013), реализованная в пакете 'splits' для языка программирования R v. 3.4.4 (<https://www.R-project.org/>). Для GMYC анализа использовалось ультраметрическое дерево, реконструированное в программе BEAST v. 1.10.4.

Реконструкция дерева в BEAST проводилась по четырем видообразовательным моделям: модель видообразования Юла (Yule speciation model) (Aldous, 2001) со строгими молекулярными часами; модель видообразования Юла с расслабленными молекулярными часами со скоростями эволюции, распределенными по логнормальному распределению; модель видообразования рождения–гибели видов (birth-death speciation model) (Lambert, Stadler, 2013) со строгими молекулярными часами; модель видообразования рождения–гибели видов с расслабленными молекулярными часами со скоростями эволюции, распределенными по логнормальному распределению. Выбор лучшей видообразовательной модели осуществляли с помощью сравнения значений маргинального правдоподобия, рассчитанных методом последовательного семплирования (path sampling analysis) (Lartillot, Philippe, 2006) в программе BEAST v. 1.10.4. При реконструкции дерева в программе BEAST задавалось 50000000 генераций для Марковских цепей и 250000 генераций Марковских цепей и 200 шагов для расчета маргинального правдоподобия. При данных параметрах все значения ESS статистики – показателя сходимости BEAST анализа – были более 200. Для визуализации результатов использовалось ультраметрическое байесовское филогенетическое дерево. Выборка деревьев сверхбыстрого бутстреп-анализа, полученная

в программе IQ-TREE, была совмещена с топологией байесовского ультраметрического дерева для расчета бутстреп-поддержек методом максимального правдоподобия (сверхбыстрый бутстреп-анализ). Таким образом, поддержка топологии ультраметрического байесовского дерева была оценена байесовским методом с помощью апостериорных вероятностей и бутстреп-анализа. Для расчета бутстреп-поддержек применяли ранее разработанный нами алгоритм (Temraleeva et al., 2018), реализованный с помощью функций пакета APE (Paradis et al., 2004) для языка программирования R v. 3.4.4. В качестве внешней группы при филогенетических реконструкциях выбрали представителя сестринского рода *Chlorella* (*Trebouxio-phyceae*, *Chlorophyta*) – *C. vulgaris*. Распределения генетических дистанций были визуализированы в виде гистограммы в среде статистического программирования R v. 3.4.4.

Генетические различия между нуклеотидными последовательностями охарактеризовали с помощью генетических дистанций (K2P дистанций), которые вычислялись в программе MEGA 6.0. Боксплот генетических дистанций построен в среде статистического программирования R v. 3.4.4 (<https://www.R-project.org/>). Для сравнения топологии деревьев использовали данные статей (Krienitz et al., 2004; Luo et al., 2006; Hoshina et al., 2010, 2017; Pröschold et al., 2010, 2011, 2020; Bock et al., 2011; Hoshina, Nakada, 2018).

Фолдинг ITS1 и ITS2 проводили с помощью веб-сервера RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) в соответствии с принципом минимальной энергии. При оценке правильности предсказания вторичной структуры ITS1 и ITS2 ориентировались на работы А. Coleman (2015) и L. Caisová с соавторами (Caisová et al., 2013) соответственно. Сравнение вторичной структуры спейсеров между штаммами, поиск консервативных мотивов и компенсаторных замен (CBC) осуществляли в программе 4SALE (Seibel et al., 2008). При анализе ITS2 для разделения видов особое внимание уделено подходу *sensu* А. Coleman (2000, 2015), согласно которому наличие даже одной CBC в консервативных регионах ITS2 (5 п. н. шпильки I, 10 п. н. шпильки II, вся шпилька III) у двух микроводорослей коррелирует с их половой несовместимостью. Вторичные структуры спейсеров визуализированы в программе PseudoViewer3.

**Статистический анализ различных признаков представителей рода *Micractinium*.** Для сравнительного анализа признаки штаммов были закодированы в виде бинарных векторов. Длина бинарного вектора была равна количеству его возможных состояний, при этом каждый элемент соответствовал определенному состоянию. Для анализируемых штаммов в позиции, соответствующей состоянию признака, записывалась 1, остальные элементы имели значение 0. Все бинарные векторы, определяющие состояния каждого из признаков для всех исследуемых штаммов, были сведены в единую таблицу. В анализе использовались штаммы, для которых были известны состояния 80 % рассматриваемых признаков и более, остальные штаммы исключались из анализа.

На основе бинарной таблицы состояний признаков была проведена визуализация сходства и различия штаммов с

**Таблица 1.** Размеры вегетативных клеток исследуемых штаммов

Штамм	Размер, мкм		
	средний	минимальный	максимальный
ACSSI 198, ACSSI 287	4.3 ± 1.08*	2.2	6.2
ACSSI 343, ACSSI 344, ACSSI 345	5.7 ± 1.61	3.2	10.5
ACSSI 332	4.4 ± 1.04	2.5	6.1

Примечание. Для каждого штамма проведено 200 измерений.  
\* Указано стандартное отклонение.

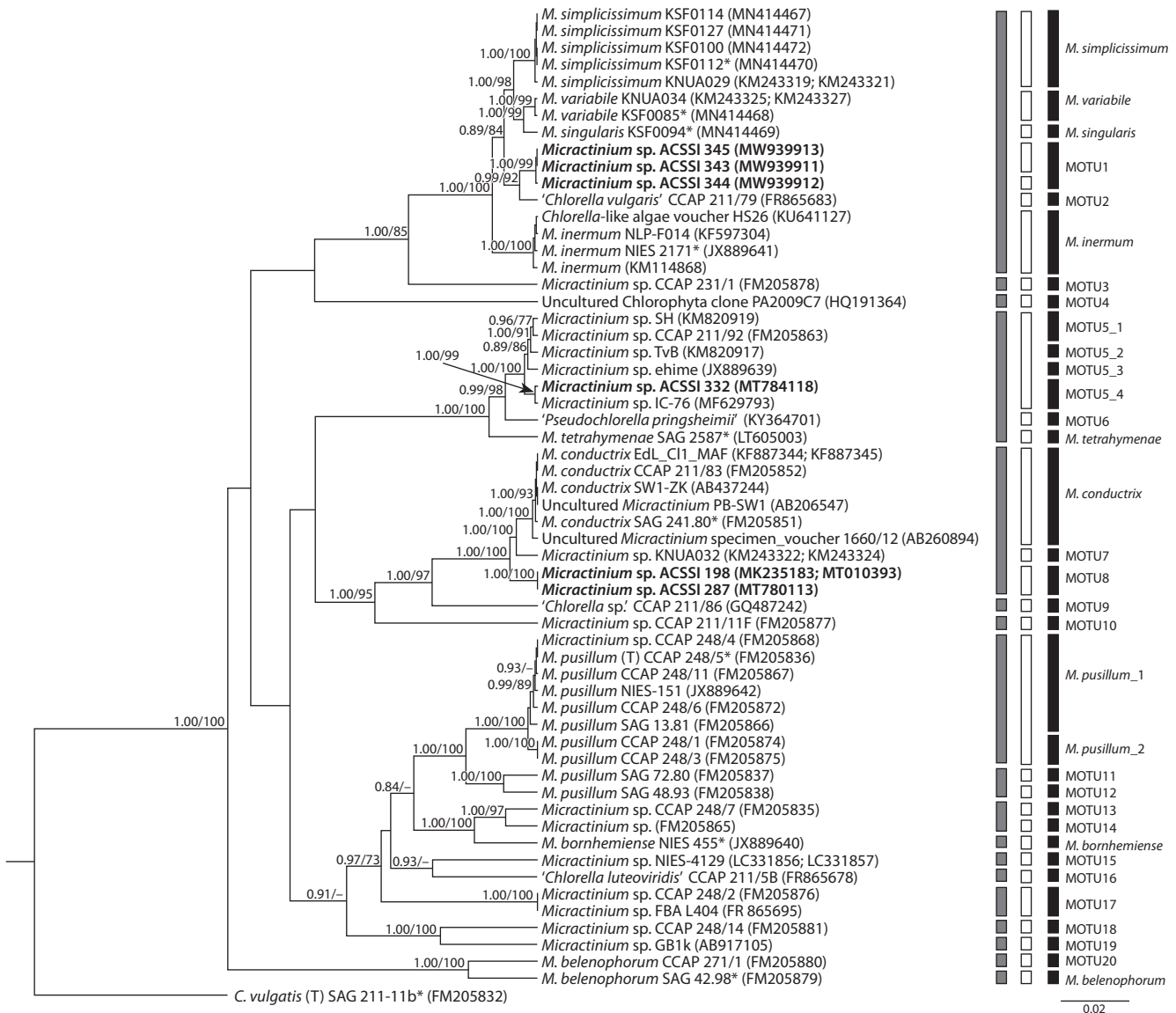
помощью многомерного шкалирования, для которого использовалась матрица дистанций Жаккарда (единица минус доля общих ненулевых состояний в общем количестве ненулевых состояний у двух сравниваемых штаммов). При расчете для каждой пары штаммов исключались признаки, не определенные для одного из штаммов. Значимость признака в общем распределении дистанций между штаммами определяли с помощью теста Мантела (Mantel, 1967) на базе коэффициента корреляции Пирсона; достоверность корреляции устанавливали перестановочным тестом (10000 перестановок). При проведении теста Мантела сопоставляли общую матрицу дистанций Жаккарда с матрицами дистанций, рассчитанными для каждого признака в отдельности. Чем выше значение коэффициента корреляции Пирсона для рассматриваемого признака, тем больший вклад он вносит в разделение штаммов. Все расчеты выполнены с помощью функций пакета ‘vegan’ (Dixon, 2003) для языка программирования R.

## Результаты

**Морфология штаммов ACSSI.** Все изученные штаммы имели *Chlorella*-подобный морфотип: клетки одиночные, шаровидной формы, не продуцируют щетинки. Размеры вегетативных клеток ACSSI 343, ACSSI 344 и ACSSI 345 были выше, чем ACSSI 198, ACSSI 287 и ACSSI 332 (табл. 1).

Хлоропласт пристенный, преимущественно чашевидный. Однако у штаммов ACSSI 343, ACSSI 344 и ACSSI 345 во взрослых клетках встречается блюдцевидный хлоропласт (~20 %) и полый шаровидный с отверстием (~20 %). Пиреноид один, шаровидный или широкоовальный с сегментированной крахмальной оберткой. У всех штаммов наблюдали бесполое размножение с помощью автоспор. У штаммов ACSSI 343, ACSSI 344 и ACSSI 345 их количество варьировало от 2 до 8. У штаммов ACSSI 198, ACSSI 287 отмечалось, как правило, 2–4 автоспоры (редко 8), тогда как у ACSSI 332 – не более 4 автоспор. Исходя из морфологических характеристик, исследуемые штаммы изначально были отнесены к роду *Chlorella*.

**Филогенетический анализ.** Лучшей моделью эволюции ДНК для исследуемого набора нуклеотидных последовательностей (18S–ITS1–5.8S–ITS2) считается GTR + I + G (AIC = 38198.0101), которая использовалась во всех дальнейших расчетах. Результаты path sampling анализа показали, что оптимальной моделью для рекон-



**Рис. 1.** Укорененное ультраметрическое филогенетическое дерево зеленых микроводорослей рода *Micractinium*, построенное методом Байеса (BI) на основе последовательностей генов 18S и 5.8S рPHK и спейсеров ITS1 и ITS2 (2546 п. н.).

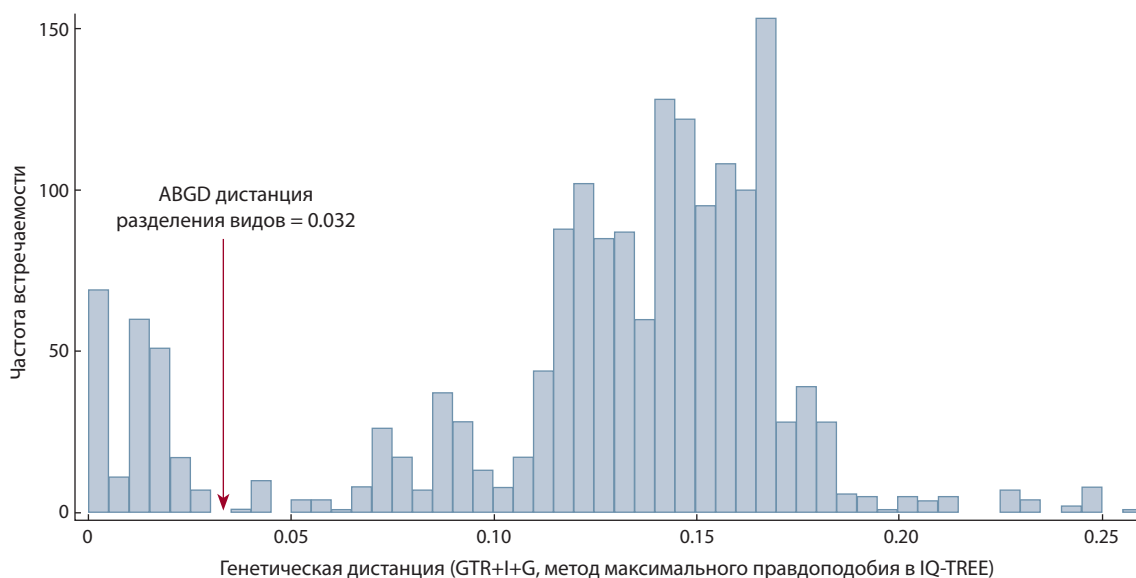
В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны апостериорные вероятности (PP) и бутстреп-значения (BP); значения PP < 0.7 и BP < 70 % не показаны. Модель нуклеотидных замен – GTR + I + G. Жирным шрифтом выделены штаммы ACSSI; звездочкой отмечены аутентичные штаммы; (T) – типовой вид. Прямоугольниками обозначена кластеризация различными методами разграничения видов: серый цвет – ABGD, белый – PTP, черный – GMYC.

струкции филогенетического дерева байесовским методом в программе BEAST является модель видообразования рождения–гибели видов с расслабленными молекулярными часами со скоростями эволюции, распределенными по логнормальному распределению (наименьшее значение показателя маргинального правдоподобия  $L_n(L) = -18996.049$ ). Филогенетическое дерево, реконструированное по этой видообразовательной модели, использовалось для дальнейшего анализа. Принципиальных отличий топологии BEAST дерева (рис. 1) от топологии IQ-TREE (Прил. 1)<sup>1</sup> в узлах с высокой поддержкой не выявлено.

По итогам анализа все шесть штаммов принадлежали роду *Micractinium* (см. рис. 1). Штаммы ACSSI 343,

ACSSI 344 и ACSSI 345 с высокими статистическими поддержками (апостериорные вероятности PP = 0.89, бутстреп-значения BP = 84 %) объединяются с одноклеточными, не продуцирующими щетинки видами *M. simplicissimum*, *M. variabile*, *M. singularis* и штаммом CCAP 211/79. Сестринским к ним стал *M. inermum* (PP = 1.00, BP = 100 %). Уровень генетических различий между штаммами ACSSI 343, ACSSI 344, ACSSI 345 и сестринскими кластерами составлял 0.7–0.9 %. Штамм ACSSI 332 с максимальными статистическими поддержками кластеризовался с *Chlorella*-подобными штаммами TvB, SH, CCAP 211/92, ehime, IC-80. Сестринскими филогенетическими линиями к данному кластеру являются неверно идентифицированная *Pseudochlorella pringsheimii* и *M. tetrahymenae* (PP = 0.99–1.00, BP = 98–100 %). Штамм ACSSI 332 в составе гена 18S рPHK, в отличие от TvB, SH,

<sup>1</sup> Приложения 1 и 2 см. по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2022-26/appx1.pdf>



**Рис. 2.** Распределение генетических дистанций между представителями рода *Micractinium*. Показана граница разделения видов, определенная методом ABGD.

CCAP 211/92, не имеет интрона. Генетические дистанции между ним и штаммами TvB, SH, CCAP 211/92, ehime, IC-80 варьировали в диапазоне 0.1–0.5 %, с линиями *P. pringsheimii* и *M. tetrahymenae* – 1.1–1.2 %. *M. conductrix* и штамм KNUA032 с *Chlorella*-подобным морфотипом (статистические поддержки максимальны) – сестринские к штаммам ACSSI 198, 287. Уровень генетических различий находился в диапазоне от 0.7 до 1.3 %.

**Вторичная структура ITS1 и ITS2.** Длина ITS1 изучаемых штаммов составляла 238–267 н., ITS2 – 242–243 н. Вторичные структуры ITS1 и ITS2 в целом соответствовали моделям, предложенным А. Coleman (2000, 2015) для эукариотических организмов. Штаммы ACSSI 343, ACSSI 344 и ACSSI 345 имели 1 CBC в шпильке III ITS1 по сравнению с *M. inermum*, 1 CBC в консервативном регионе шпильки II и 1 CBC в варибельной шпильке IV ITS2 по сравнению с *M. simplicissimum*. Штаммы ACSSI 332, 198, 287 не имели CBC по сравнению с сестринскими видами. Однако штаммы ACSSI 198, 287 отличались от *M. conductrix* структурой шпильки II ITS2. Мисматч в ее верхней части у штаммов ACSSI 198, 287 состоял из четырех неспаренных нуклеотидов, а у *M. conductrix* – из десяти.

**Разграничение видов.** Дистанционный метод разграничения видов ABGD выделил в составе рода *Micractinium* 18 MOTU (операционных таксономических единиц) видового уровня, не считая внешнюю группу. ABGD дистанция разделения видов при попарном сравнении последовательностей равнялась 0.032 (рис. 2). Результаты ABGD анализа в диапазоне дистанций разделения видов по вариантам алгоритма начального разделения (initial partition) и рекурсивного разделения (recursive partition) совпали друг с другом.

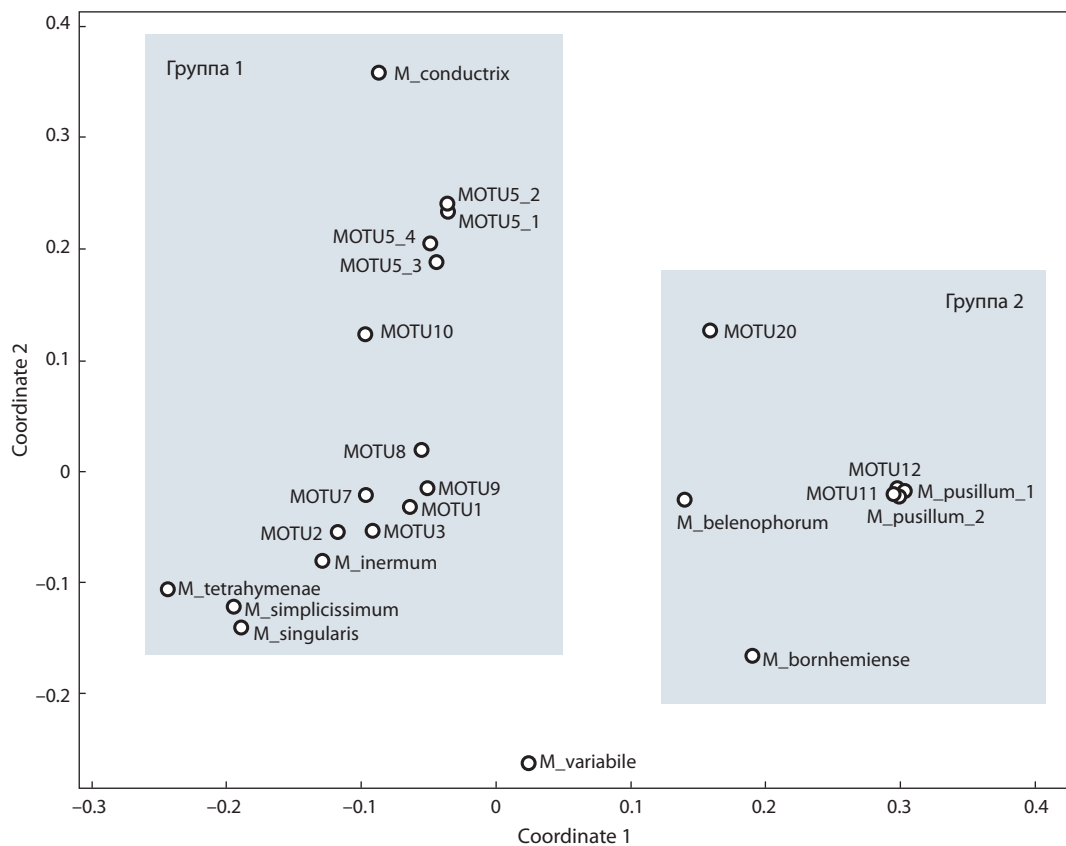
С помощью метода GMYC было выделено наибольшее количество кластеров видового уровня – 33 (дистанция разделения видов 0.0015). Статистическая поддержка результатов разграничения  $P = 1.07493e-07 < 0.05$ , следо-

вательно, в массиве достаточно данных для получения достоверных результатов. С помощью метода PTP выделено 30 видов, что близко к результатам метода GMYC. Результаты разграничения видов методами ABGD, GMYC и PTP приведены на филогенетическом дереве (см. рис. 1). Все кластеры видового уровня, выделенные указанными методами, имеют высокие статистические поддержки ( $PP = 0.95-1.00$ ,  $BP = 90-100\%$ ).

**Многомерное шкалирование.** Для уточнения таксономического статуса мы соотнесли MOTU, выделенные алгоритмом GMYC, с их морфологическими, физиологическими, экологическими и молекулярно-генетическими характеристиками (Прил. 2). Отметим, что при проведении многомерного шкалирования из генетических характеристик учитывали только наличие интрона, тогда как остальные параметры обсуждаем отдельно. По результатам анализа исследованные MOTU были разделены на две группы (рис. 3).

Группа 1 объединяла штаммы с одиночными клетками, не продуцирующие щетинки. Внутри нее только представители MOTU5\_1 и MOTU5\_2 объединялись в одну подгруппу. Остальные виды/MOTU имели уникальное положение. Отдельно отметим, что исследуемые штаммы ACSSI 343, ACSSI 344, ACSSI 345 (MOTU1) и штаммы ACSSI 198, ACSSI 287 (MOTU8) не формировали одного комплекса видами, родственными согласно результатам филогенетического анализа. Штамм ACSSI 332 и IC-80 (MOTU5\_4) локализованы рядом со штаммом ehime (MOTU5\_3), тогда как представители MOTU5\_1, MOTU5\_2 несколько удалены.

Все штаммы группы 2, напротив, имеют щетинки и, как правило, образуют колонии. Штаммы, изначально идентифицированные как *M. pusillum*, образовали единую группу. Остальные виды были весьма удалены друг от друга. Промежуточное положение между группами занимает *M. variabile*, у которого лишь часть популяции способна в присутствии альгофагов продуцировать



**Рис. 3.** Диаграмма рассеяния точек (MOTU) в пространстве двух координат многомерного шкалирования, построенная на основе сходства и различия штаммов по совокупности признаков.

**Таблица 2.** Результаты теста Мантелла

Признак	Кодировка признака	Значение коэффициента корреляции Пирсона	<i>p</i> -значение перестановочного теста для оценки достоверности значения коэффициента корреляции
Способность продуцировать щетинки	<b>B</b>	<b>0.56</b>	<b>0.0001</b>
Форма (одиночные клетки или колонии)	<b>A</b>	<b>0.50</b>	<b>0.0001</b>
Тип хлоропласта	<b>E</b>	<b>0.45</b>	<b>0.0001</b>
Количество интронов	<b>J</b>	<b>0.38</b>	<b>0.0001</b>
Тип размножения	<b>F</b>	<b>0.37</b>	<b>0.0002</b>
Максимальный размер клеток	<b>D</b>	<b>0.36</b>	<b>0.0002</b>
Форма клеток	<b>C</b>	<b>0.35</b>	<b>0.0004</b>
Образ жизни	<b>H</b>	<b>0.32</b>	<b>0.0003</b>
Потребность в витаминах группы B	G	0.19	0.087
Отношение к температуре	I	0.12	0.13

Примечание. Признаки с достоверной значимостью выделены жирным шрифтом.

щетинки и формировать колонии. Согласно результатам теста Мантелла, помимо способности продуцировать щетинки и формировать колонии, значимыми признаками при разграничении MOTU считались тип хлоропласта, количество интронов, тип размножения, максимальный размер клеток и их форма, образ жизни (табл. 2).

### Обсуждение

Метод ABGD, основанный на анализе матриц генетических дистанций, по сравнению с другими методами выделил наименьшее количество MOTU видового уровня при наибольшей дистанции их разделения. Это согласуется с исследованиями S. Zou с коллегами (Zou et al., 2016a, b),

которые также отмечали более низкую чувствительность данного метода. Алгоритмы GMYC и PTP, использующие в качестве исходных данных филогенетические деревья, способны фиксировать особенности генетической дивергенции между штаммами, выделяют большее количество предполагаемых видов и лучше согласуются с современной концепцией статуса MOTU результаты алгоритма GMYC, который выявил максимальное количество потенциальных видов, были соотнесены с их морфологическими, физиологическими, экологическими и молекулярно-генетическими характеристиками.

**Морфологические характеристики.** Все представители рода *Micractinium*, для которых известны морфологические характеристики, имели ряд общих черт: коккоидная организация таллома, один пристенный хлоропласт, один пиреноид, окруженный сегментированной крахмальной оберткой, бесполое размножение автоспорами. Важными морфологическими критериями являются способность продуцировать щетинки и формировать колонии (Krienitz et al., 2004; Luo et al., 2006). В соответствии с этими признаками в рамках рода можно выделить два морфотипа: *Chlorella*-подобный (в стандартных условиях клетки одиночные, не продуцируют щетинки) и *Micractinium*-подобный (одиночные клетки или колонии, продуцирующие щетинки), что подтверждается результатами многомерного шкалирования (см. рис. 3). К значимым морфологическим характеристикам для представителей рода *Micractinium* относятся также тип хлоропласта, максимальный размер и форма клеток. Однако в целом морфология рода достаточно скудна. В ходе исследования не выявлено ни одного признака, который можно было бы рассматривать как универсальный инструмент для разграничения видов. Так, фенотипы *M. simplicissimum* и *M. singularis* крайне схожи, и морфологически их разделить достаточно проблематично. Отметим, что микроводоросли рода *Micractinium* обладают высокой фенотипической пластичностью и их морфотип может изменяться в зависимости от «пастбищной» нагрузки со стороны альгофагов (Krienitz et al., 2004; Luo et al., 2006). Например, у части клеток вида *M. variabile*, который обычно демонстрирует *Chlorella*-подобный морфотип, при высоком трофическом давлении альгофагов наблюдается формирование колоний и продуцирование щетинок (Chae et al., 2019). В то же время *M. pusillum*, *M. bornhemiense*, *M. belenophorum* при длительном культивировании, особенно на твердом агаре, могут перестать продуцировать щетинки и формировать колонии (Krienitz et al., 2004; Luo et al., 2006).

**Размножение.** Основной тип размножения видов рода *Micractinium* – бесполое, посредством автоспор. Исключение на данный момент составляют штаммы *M. pusillum*, для которого отмечен половой процесс по типу оогамии (Krienitz et al., 2004; Luo et al., 2006). Однако, по данным полногеномного анализа, у многих микроводорослей класса *Trebouxiophyceae* с бесполом размножением были обнаружены мейотические гены, наличие которых предполагает половой процесс (Fučíková et al., 2015). В отношении представителей *Micractinium* этот вопрос пока остается открытым и нуждается в изучении.

**Потребность в витаминах и образ жизни.** Большая часть видов относится к свободноживущим организмам и не испытывает необходимости в добавлении витаминов при культивировании в лабораторных условиях. При этом специфической чертой *M. conductrix* является потребность в витаминах B<sub>1</sub> и B<sub>12</sub> для нормального осуществления процессов жизнедеятельности. Данный вид – облигатный эндосимбионт, в естественной среде получающий витамины от организма-хозяина (Vorobyev et al., 2009; Hoshina et al., 2010; Pröschold et al., 2011). Примечательно, что другие облигатные эндосимбионты клады *Chlorella* (*C. variabilis*, *Carolibrandtia ciliaticola*) также растут только на средах, обогащенных витаминами (Pröschold et al., 2011; Hoshina et al., 2017; Hoshina, Nakada, 2018). Штамм CCAP 211/11F, изолированный из лишайника, и факультативный эндосимбионт *M. tetrahymenae* культивируются на средах, в составе которых есть B<sub>1</sub> и B<sub>12</sub>. Однако информация о том, что без них жизнедеятельность штаммов невозможна, отсутствует. Согласно результатам многомерного шкалирования, образ жизни – одна из значимых характеристик при разграничении видов, тогда как потребность в витаминах группы B – узкоспецифическое свойство, характерное лишь для *M. conductrix*. Тем не менее оно является уникальной чертой данного вида и помогает отделить его от «сестринских» еще на стадии культивирования.

**Температура.** По отношению к температуре представители рода *Micractinium* в большинстве своем проявляют мезофильность (Hong et al., 2015). В то же время *M. simplicissimum*, *M. variabile*, *M. singularis* и штамм *Micractinium* sp. KNUA032 выдерживают воздействие низких температур. Они способны выживать и размножаться при температурах до +5 °C, демонстрируя свои криотолерантные свойства. Одной из основных стратегий адаптации этих видов микроводорослей является поддержание жизнедеятельности за счет накопления ненасыщенных жирных кислот (Hong et al., 2015; Chae et al., 2019). Штаммы TvV, SH, CCAP 211/92 – термофилы, способные выдерживать воздействие высоких температур (Adar et al., 2016). Штамм ACSSI 332 предположительно устойчив к высоким температурам, так как был изолирован из горячего источника. Вопрос о термофильности родственных им штаммов ehime и IC-76 остается неизученным. Многомерное шкалирование показало, что устойчивость к воздействию экстремально низких или высоких температур – это специфические свойства, характерные лишь для небольшого числа видов. Однако именно такие виды имеют большой биотехнологический потенциал, в связи с чем нуждаются в тщательном изучении (Onay et al., 2014; Adar et al., 2016; Chae et al., 2021).

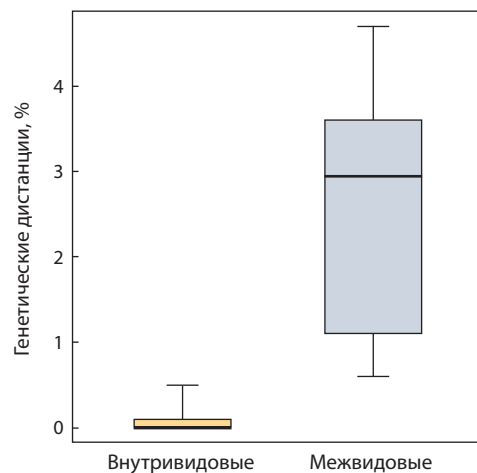
**Интрон.** Как вспомогательный инструмент для разграничения видов он был эффективен при доказательстве видового статуса штамма KNUA032, кластера ACSSI 198, ACSSI 287 и представителей *M. conductrix*, все штаммы которого имеют в составе гена 18S рРНК интрон длиной 324 н. Состав этого интрона и его специфическое положение в 18S рРНК неоднократно рассматривались исследователями как характерная особенность данного вида (Vorobyev et al., 2009; Hoshina et al., 2010; Spanner et al., 2020). Также интрон был полезен при разграничении штаммов



*M. belenophorum*: штамм ССАР 271/1, в отличие от аутентичного штамма SAG 42.98, в гене 18S рРНК имеет интрон длиной 315 н. В то же время наличие интронов у части видов может указывать на начавшиеся процессы видообразования, происходящие пока на популяционном уровне (Gaonkar et al., 2018). Так, например, R. Hoshina с коллегами (Hoshina et al., 2021) в рамках клады *Chlorella* обнаружили в некоторых географически изолированных друг от друга популяциях *C. variabilis*, что длина интронов может варьировать. В роде *Micractinium* сходная ситуация наблюдается среди представителей MOTU5, имеющих сходную морфологию, генетические дистанции внутри-видового уровня и без СВС (см. Прил. 2). У штаммов TvB, SH (MOTU5\_1), ССАР 211/92 (MOTU5\_2), в отличие от родственных eime (MOTU5\_3), АСССИ 332 и IC-76 (MOTU5\_4), в составе гена 18S рРНК присутствует интрон длиной 351 н. Иными словами, несмотря на то что интрон является статистически значимым признаком при разграничении MOTU, его нельзя использовать как ключевой критерий при разделении видов, а лишь как вспомогательный.

**Сравнительный анализ вторичной структуры внутренних транскрибируемых спейсеров.** Применение СВС-подхода *sensu* (Coleman, 2000, 2015), основанного на поиске СВС исключительно в консервативных регионах ITS2, было успешным для отделения штаммов SAG 48.93 и SAG 72.80 от «истинных» представителей *M. pusillum*, *M. conductrix* от штамма KNUA032, а также аутентичного штамма *M. belenophorum* SAG 42.98 от штамма ССАР 271/1. Низкая эффективность СВС-подхода *sensu* Coleman для разграничения видов зеленых микродорослей с невысокой генетической дивергенцией отмечена также в работах (Hoshina, Fujiwara, 2013; Song et al., 2018). Поэтому сейчас при разграничении видов рода *Micractinium* часто учитываются все СВС в ITS1 и ITS2 (Hoshina, Fujiwara, 2013; Chae et al., 2019; Pröschold et al., 2020). Однако, например, между видами *M. singularis* и *M. variabile* СВС отсутствуют как в ITS1, так и в ITS2. При этом виды различаются между собой структурой шпильки I ITS2 (Chae et al., 2019).

Использовать характерные структурные различия во вторичной структуре внутренних транскрибируемых спейсеров в качестве аналога СВС среди членов рода *Micractinium* впервые предложили R. Hoshina с коллегами (Hoshina et al., 2010), которые обнаружили специфическую особенность во вторичной структуре ITS2 у *M. conductrix*. У всех представителей клады *Chlorella* в целом и рода *Micractinium* в частности шпилька II ITS2 состоит из двух двуцепочечных областей, сочлененных «локтеобразной» выпуклостью (elbow-like bulge). По сравнению с другими видами *M. conductrix* имеет большой «локоть» из 10 неспаренных нуклеотидов (bachelor nucleotides), тогда как у других видов – от трех до шести неспаренных нуклеотидов. Мы считаем, что данную особенность можно рассматривать в качестве «молекулярной подписи» *M. conductrix*. Для сравнения: у сестринских штаммов KNUA032, АСССИ 198 и АСССИ 287 было всего четыре неспаренных нуклеотида в этой области. Таким образом, СВС-подход не является универсальным инструментом для разграничения видов рода *Micractinium*. Кроме того,



**Рис. 4.** Генетические дистанции внутри рода *Micractinium*.

Границы бокса показывают первый и третий квартили; жирная горизонтальная линия – медианное значение; «усы» – размах.

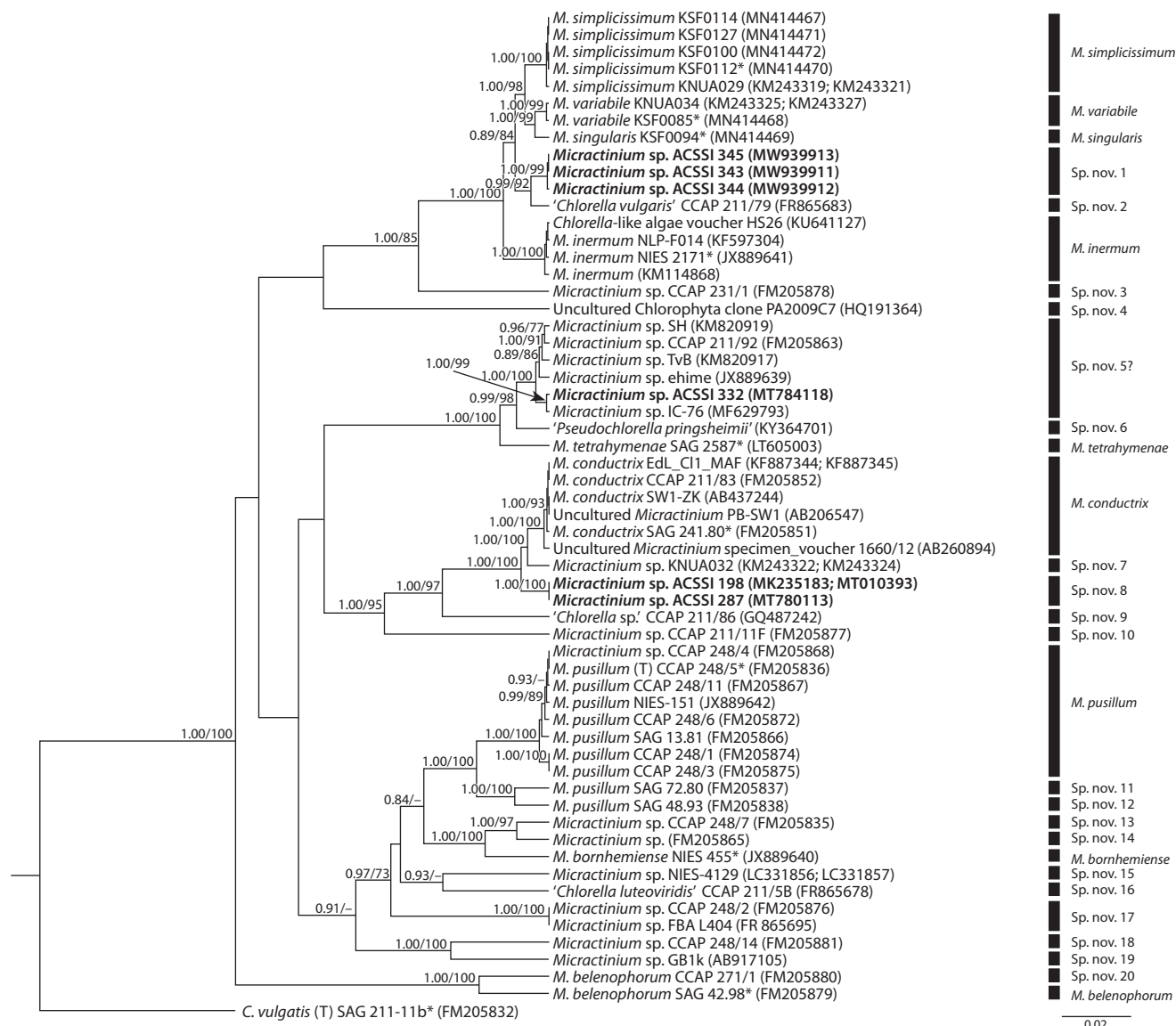
при анализе внутренних транскрибируемых спейсеров не следует ограничиваться только поиском СВС в консервативных областях, важно также учитывать особенности строения их вторичных структур.

**Генетические дистанции.** Сравнительный анализ уровня генетических различий фрагмента 18S–ITS1–5.8S–ITS2 исследуемых штаммов с такими диакритическими признаками, как форма и размеры клеток, способность продуцировать щетинки, тип хлоропласта, наличие интронов в гене 18S рРНК, наличие СВС в ITS1 и ITS2, молекулярные подписи, отношение к температуре, потребность в витаминах, образ жизни, кластеризация методами ABGD, GMYC, PTP, позволил уточнить внутри- и межвидовые уровни генетических различий (рис. 4). Внутри видов генетические дистанции варьировали в диапазоне 0–0.5 %, между видами – 0.6–4.7 %. Минимальные генетические дистанции были отмечены между одноклеточными и не продуцирующим щетинки криотолерантными антарктическими видами *M. singularis* и *M. variabile*, который под влиянием «пастбищной» нагрузки способен формировать колонии и выпускает щетинки. Максимальные генетические дистанции – между *Chlorella*-подобным криотолерантом *M. simplicissimum* и *M. bornhemiense*, обладающим в стандартных условиях классическим *Micractinium*-подобным морфотипом.

По итогам комплексного анализа вышеописанных параметров в рамках рода *Micractinium* было выявлено 29 видов (рис. 5), в том числе кандидаты в три новых вида из Альгологической коллекции АСССИ, валидацию которых еще предстоит выполнить.

## Заключение

К настоящему времени в составе рода *Micractinium* описано с применением совокупности морфологических и молекулярно-генетических методов всего 9 видов, но по результатам проведенного анализа его истинное видовое богатство оказалось существенно выше – не менее 29 видов. Метод разграничения ABGD, использующий матрицу генетических дистанций, является менее «чув-



**Рис. 5.** Предполагаемое разделение видов внутри рода *Micractinium* на основании комплексного анализа признаков.

Жирным шрифтом выделены штаммы ACSSI, исследуемые в рамках данной работы; звездочкой отмечены аутентичные штаммы; (Т) – типовый вид, «?» – таксономический статус нуждается в уточнении.

ствительным» и позволил выделить всего 18 MOTU видо-вого уровня, тогда как более совершенные топологические алгоритмы GMYC и PTP – 33 и 30 соответственно. По нашему мнению, GMYC и PTP более реалистично отражают систематику рода *Micractinium* и могут быть использованы как эффективный вспомогательный инструмент для разграничения видов.

Многомерное шкалирование качественных признаков рассматриваемых штаммов показало, что наиболее значимыми для представителей рода *Micractinium* являются способность продуцировать щетинки и формировать колонии, тип хлоропласта, наличие интронов, тип размножения, максимальный размер клетке и их форма, образ жизни. Однако не обнаружено ни одного признака, который можно было бы рассматривать в качестве универсального видо-вого критерия. Потребность в витаминах группы В и устойчивость к воздействию экстремально низких или

высоких температур – это узкоспецифические свойства, характерные лишь для небольшого числа видов и помогающие при их отграничении от «сестринских» видов. Применение СВС-подхода, основанного на поиске СВС в консервативных регионах ITS2, было успешным только для отделения «истинных» представителей криптических видов (SAG 48.93, SAG 72.80) от *M. pusillum*, *M. conductrix* от штамма KNUA032 и *M. belenophorum* от штамма CCAP 271/1. При анализе ITS1 и ITS2 помимо поиска СВС следует учитывать особенности строения их вторичных структур. По итогам анализа генетических дистанций нуклеотидных последовательностей 18S–ITS1–5.8S–ITS2 можно предположить, что внутривидовые различия находятся в пределах 0–0.5 %, а межвидовые – в пределах 0.6–4.7 %.

Таким образом, используя морфологические, физиологические, экологические и генетические характеристики

(полифазный подход), удалось охарактеризовать 29 видов в рамках рода *Micractinium* и предложить дополнительные критерии их разделения. Среди штаммов Альгологической коллекции АСССИ были обнаружены кандидаты в три новых вида рода *Micractinium*, валидацию которых еще предстоит выполнить.

## Список литературы

- Вайшля О.Б., Кулятов Д.В. Перспективные виды микроводорослей для биodeградации поллютантов водных экосистем юга Западной Сибири. *Изв. СамГЦ РАН*. 2011;1(4):787-789.  
[Vayshlya O.B., Kulyatov D.V. Microscopic alga species promising as biodegraders of water ecosystem pollutants in southern West Siberia. *Izvestia Samarskogo Nauchnogo Tsentra RAN = Proceedings of the Samara Research Center of the Russian Academy of Sciences*. 2011;1(4):787-789. (in Russian)]
- Adar O., Kaplan-Levy R.N., Banet G. High temperature Chlorellaceae (Chlorophyta) strains from the Syrian-African Rift Valley: the effect of salinity and temperature on growth, morphology and sporulation mode. *Eur. J. Phycol.* 2016;51(4):387-400. DOI 10.1080/09670262.2016.1193772.
- Aldous D.J. Stochastic models and descriptive statistics for phylogenetic trees, from Yule to today. *Stat. Sci.* 2001;16:23-24. DOI 10.1214/ss/998929474.
- Bock C., Krienitz L., Pröschold T. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*. 2011; 11(2):293-312. DOI 10.5507/fof.2011.028.
- Caisová L., Marin B., Melkonian M. A consensus secondary structure of ITS2 in the Chlorophyta identified by phylogenetic reconstruction. *Protist*. 2013;164:482-496. DOI 10.1016/j.protis.2013.04.005.
- Chae H., Lim S., Kim H., Choi H.-G., Kim J.H. Morphology and phylogenetic relationships of *Micractinium* (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) taxa, including three new species from Antarctica. *Algae*. 2019;34(4):267-275. DOI 10.4490/algae.2019.34.10.15.
- Chae H., Seo J.B., Kim S., Youn E.J. Antarctic freshwater microalga, *Micractinium simplicissimum*, suppresses inflammation. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2021;21(7):4098-4103(6). DOI 10.1166/jnn.2021.19158.
- Coleman A.W. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist*. 2000;151:1-9. DOI 10.1078/1434-4610-00002.
- Coleman A.W. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure. *Trends Genet.* 2015;31(3):157-163. DOI 10.1016/j.tig.2015.01.002.
- Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J. Veg. Sci.* 2003;14(6):927-930.
- Fawley M.W., Fawley K.P., Owen H.A. Diversity and ecology of small coccoid green algae from Lake Itasca, Minnesota, USA, including *Meyerella planktonica*, gen. et sp. nov. *Phycologia*. 2005;44:35-48.
- Fučíková K., Pažoutová M., Rindi F. Meiotic genes and sexual reproduction in the green algal class Trebouxiophyceae (Chlorophyta). *J. Phycol.* 2015;51(3):419-430. DOI 10.1111/jpy.12293.
- Fujisawa T., Barraclough T.G. Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed Yule coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Syst. Biol.* 2013; 62(5):707-724. DOI 10.1093/sysbio/syt033.
- Gaonkar C.C., Piredda R., Minucci C., Mann D.G., Montresor M., Sarno D., Kooistra W.H.C.F. Annotated 18S and 28S rDNA reference sequences of taxa in the planktonic diatom family Chaetocerotaceae. *PLoS One*. 2018;13(12):e0208929. DOI 10.1371/journal.pone.0208929.
- Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. (Cited on April 16, 2021). Available from: <http://www.algaebase.org>
- Hong J.W., Jo S.-W., Cho H.-W., Nam S.W., Shin W., Park K.M., Lee K.I., Yoon H.-S. Phylogeny, morphology, and physiology of *Micractinium* strains isolated from shallow ephemeral freshwater in Antarctica. *Phycol. Res.* 2015;63:212-218. DOI 10.1111/pre.12097.
- Hoshina R., Fujiwara Y. Molecular characterization of *Chlorella* cultures of the National Institute for Environment Studies culture collection with description of *Micractinium inermum* sp. nov., *Didymogenes sphaerica* sp. nov. and *Didymogenes soliella* sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *Phycol. Res.* 2013;61(2):124-132. DOI 10.1111/pre.12010.
- Hoshina R., Iwataki M., Imamura N. *Chlorella variabilis* and *Micractinium reisseri* sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae): redescription of the endosymbiotic green algae of *Paramecium bursaria* (Peniculia, Oligohymenophorea) in the 120th year. *Phycol. Res.* 2010;58(3):188-210. DOI 10.1111/j.1440-1835.2010.00579.x.
- Hoshina R., Kobayashi M., Suzuki T., Kusuok Y. *Brandtia ciliaticola* gen. et sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) a common symbiotic green coccoid of various ciliate species. *Phycol. Res.* 2017; 66(1):76-81. DOI 10.1111/pre.12194.
- Hoshina R., Nakada T. *Carolibrandtia* nom. nov. as a replacement name for *Brandtia* Hoshina (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *Phycol. Res.* 2018;66(1):82-83. DOI 10.1111/pre.12208.
- Hoshina R., Tsukii Y., Harumoto T., Suzuki T. Characterization of a green *Stentor* with symbiotic algae growing in an extremely oligotrophic environment and storing large amounts of starch granules in its cytoplasm. *Sci. Rep.* 2021;11:2865. DOI 10.1038/s41598-021-82416-9.
- Krienitz L., Hegewald E.H., Hepperle D., Huss V.A.R., Rohr T., Wolf M. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia*. 2004;43:529-542. DOI 10.2216/i0031-8884-43-5-529.1.
- Krivina E., Temraleeva A. Identification problems and cryptic diversity of *Chlorella*-clade microalgae (Chlorophyta). *Microbiology*. 2020; 89(6):720-732. DOI 10.1134/S0026261720060107.
- Lambert A., Stadler T. Birth-death models and coalescent point processes: the shape and probability of reconstructed phylogenies. *Theor. Popul. Biol.* 2013;90:113-128. DOI 10.1016/j.tpb.2019.07.002.
- Lartillot N., Philippe H. Computing Bayes factors using thermodynamic integration. *Syst. Biol.* 2006;55:195-207.
- Lipstein B., Hurwitz S. The nutritional value of sewage-grown samples of *Chlorella* and *Micractinium* in broiler diets. *Poultry Sci.* 1983;62(7):1254-1260. DOI 10.3382/ps.0621254.
- Luo W., Krienitz L., Pflugmacher S., Walz N. Genus and species concept in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Chlorellaceae): genotype versus phenotypical variability under ecosystem conditions. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 2005;29:170-173. DOI 10.1080/03680770.2005.11901988.
- Luo W., Pflugmacher S., Pröschold T., Walz N., Krienitz L. Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Protist*. 2006;157:315-333. DOI 10.1016/j.protis.2006.05.006.
- Luo W., Pröschold T., Bock C., Krienitz L. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Plant Biol.* 2010;12:545-553. DOI 10.1111/j.1438-8677.2009.00221.x.
- Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 1967;27(2):209-220.
- Mehrabadi A., Farid M.M., Craggs R. Potential of five different isolated colonial algal species for wastewater treatment and biomass energy production. *Algal Res.* 2017;21:1-8. DOI 10.1016/j.algal.2016.11.002.
- Onay M., Sonmez C.A., Oktem H., Yücel M. Thermo-resistant green microalgae for effective biodiesel production: isolation and characterization of unicellular species from geothermal flora of Central Anatolia. *Bioresour. Technol.* 2014;169:62-71. DOI 10.1016/j.biortech.2014.06.078.
- Paradis E., Claude J., Strimmer K. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*. 2004;20(2):289-290. DOI 10.1093/bioinformatics/btg412.

- Pröschold T., Bock C., Luo W., Krienitz L. Polyphyletic distribution of bristle formation in Chlorellaceae: *Micractinium*, *Diacanthos*, *Didymogenes* and *Hegewaldia* gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycol. Res.* 2010;58:1-8. DOI 10.1111/j.1440-1835.2009.00552.x.
- Pröschold T., Darienko T., Silva P.C., Reisser W., Krienitz L. The systematics of *Zoochlorella* revisited employing an integrative approach. *Environ. Microbiol.* 2011;13:350-364. DOI 10.1111/j.1462-2920.2010.02333.x.
- Pröschold T., Pitsch G., Darienko T. *Micractinium tetrahymenae* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a new endosymbiont isolated from ciliates. *Diversity.* 2020;12:200. DOI 10.3390/d12050200.
- Puillandre N., Lambert A., Brouillet S., Achaz G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.* 2012;21:1864-1877. DOI 10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x.
- Schnepf E., Deichgräber G., Glaab M., Hegewald E. Bristles and spikes in chlorococcales: ultrastructural studies in *Acanthosphaera*, *Micractinium*, *Pediastrum*, *Polyedriopsis*, *Scenedesmus*, and *Siderocystopsis*. *J. Ultrastr. Res.* 1980;72:367-379. DOI 10.1016/S0022-5320(80)90071-4.
- Seibel P.N., Müller T., Dandekar T., Wolf M. Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE. *BMC Res. Notes.* 2008;1:1-91.
- Song H., Qinghua W.Q., Liu X., Hu Y., Long J., Guoxiang L.G., Hu Z. Phylogenetic diversity and taxonomic problems of the *Dictyosphaerium* morphotype within the *Parachlorella* clade (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *J. Eukaryot. Microbiol.* 2018;65:382-391. DOI 10.1111/jeu.12482.
- Spanner C., Darienko T., Biehler T., Sonntag B., Pröschold T. Endosymbiotic green algae in *Paramecium bursaria*: a new isolation method and a simple diagnostic PCR approach for the identification. *Diversity.* 2020;12(6):240. DOI 10.3390/d12060240.
- Temraleeva A., Moskalenko S., Mincheva E., Bukin Y., Sinetova M. *Spongiosarcinopsis terrestris* gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Chlorophyceae): a new genus of green algae from gray forest soil, Russia. *Phytotaxa.* 2018;376(6):291-300. DOI 10.11646/phytotaxa.376.6.4.
- Vorobyev K., Andronov E., Rautian M., Skoblo I., Migunova A., Kvitko K. An atypical *Chlorella* symbiont from *Paramecium bursaria*. *Protistology.* 2009;6(1):39-44.
- Wolf M., Hegewald E., Hepperle D., Krienitz L. Phylogenetic position of the Golenkiniaceae (Chlorophyta) as inferred from 18S rDNA sequence data. *Biologia.* 2003;58:433-6.
- Zou S., Fei C., Song J., Bao Y., He M., Wang C. Combining and comparing coalescent, distance and character-based approaches for barcoding microalgae: a test with *Chlorella*-like species (Chlorophyta). *PLoS One.* 2016a;11(4):e0153833. DOI 10.1371/journal.pone.0153833.
- Zou S., Fei C., Wang C., Gao Z., Bao Y., He M., Wang C. How DNA barcoding can be more effective in microalgae identification: a case of cryptic diversity revelation in *Scenedesmus* (Chlorophyceae). *Sci. Rep.* 2016b;6:36822. DOI 10.1038/srep36822.

#### ORCID ID

E.S. Krivina orcid.org/0000-0002-0849-5832  
A.D. Temraleeva orcid.org/0000-0002-3445-0507  
Yu.S. Bukin orcid.org/0000-0002-4534-3846

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.04.2021. После доработки 28.07.2021. Принята к публикации 06.08.2021.