

УДК 631.466.3

## ВЫБОР ПОДХОДА ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОЧВЕННЫХ КОККОИДНЫХ ЗЕЛЕНых МИКРОВОДОРОСЛЕЙ (TREBOUXIOPHYCEAE, CHLOROPHYTA)

© 2018 г. А. Д. Темралеева\*, С. В. Москаленко,  
Е. А. Портная

*Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения  
РАН,*

*Россия, 142290 Пущино, ул. Институтская, 2*

\* <http://orcid.org/0000-0002-3445-0507> e-mail: [temraleeva.anna@gmail.com](mailto:temraleeva.anna@gmail.com)

Описываются морфологический и молекулярно-генетический подходы, использованные при идентификации зеленых микроводорослей класса Trebouxiophyceae из коллекции ACSSI. В бурой полупустынной и каштановой почвах были обнаружены водоросли *Muriella terrestris*, в погребенной лугово-каштановой почве – *Edaphochlorella mirabilis*. Еще 3 штамма являются новыми неописанными таксонами: ACSSI 014 – новый вид рода Watanabea, изолированный из серой лесной почвы и имеющий пиреноид с крахмальной оберткой в отличие от типового вида, и ACSSI 104 и 144 – Nannochloris-подобный род, представители которого найдены в солонце и каштановой почве и обладают скудными морфологическими признаками. Показано, что ни один критерий в отдельности: морфологический или иной признак, вычисление генетических дистанций, анализ и сравнение вторичной структуры ITS2, поиск компенсаторных замен и молекулярных подписей – не позволяет надежно классифицировать таксоны. В связи с чем необходимо использовать полифазный подход в систематике водорослей, особенно при идентификации таксонов с простой клеточной морфологией, которые часто встречаются в почвах.

*Ключевые слова:* дистанции, молекулярные подписи, 18S рРНК, вторичная структура ITS2, ACSSI

**DOI:** 10.19047/0136-1694-2018-93-105-120

### ВВЕДЕНИЕ

Почвенные водоросли – разнообразная группа фототрофных микроорганизмов, обитающих на поверхности и в толще почвы и отражающих ее генезис и состояние (Штина и др., 1998). Про- и эукариотические водоросли являются неотъемлемым компонентом почвенной микрофлоры и выполняют важные функции накопления

органического вещества, азотфиксации, противозэрозийной деятельности, участвуют в малом биологическом круговороте и влияют на водный режим почвы ([Голлербах, Штина, 1969](#)). Надежность их таксономической идентификации имеет в первую очередь чисто утилитарную, прикладную роль для всех аспектов их изучения, так как работа с любым биологическим объектом невозможна без его определения. Каждый из современных методов идентификации, основанный на анализе морфологических, биохимических, ультраструктурных, экологических и молекулярно-генетических данных, решает эту задачу с бóльшим или мéньшим успехом, имея разные преимущества и ограничения. Поэтому комплексный подход (*polyphasic approach*), комбинирующий несколько методов, значительно повышает надежность идентификации. Преимуществом классического ботанического подхода, основанного на сравнении морфологических признаков зеленых водорослей, является большой объем данных, накопленный в течение нескольких сотен лет. К недостаткам следует отнести трудности идентификации криптофитических видов, а также видов со скудной морфологией. Так, повсеместно распространенные в различных биотопах мелкие коккоидные зеленые микроводоросли вызывают значительные затруднения при идентификации из-за простоты строения. Однако хорошо разделяются методами молекулярной систематики ([Zhang et al., 2008](#); [Neustupa et al., 2009, 2013](#); [Krienitz et al., 2011](#); [Somogyi et al., 2011](#); [Darienko et al., 2010, 2016](#); [Fucíková et al., 2014](#); [Song et al., 2015](#); [Barcyte et al., 2017](#)).

Целью настоящей работы стала идентификация некоторых коккоидных зеленых микроводорослей из коллекции ACSSI на основе анализа морфологических признаков, гена 18S рРНК и спейсера ITS2.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

**Изоляция и культивирование штаммов водорослей.** Объектами исследования стали восемь штаммов зеленых микроводорослей класса Trebouxiophyceae (Chlorophyta), депонированных в Альгологическую коллекцию ACSSI (<http://acssi.org>) под номерами 014, 060, 102, 104, 122, 130, 135 и 144. Штаммы изолировали из почвенный образцов (табл. 1) при нанесении почвенной суспензии на

**Таблица 1.** Характеристика изученных штаммов ACSII

Порядок	Вид	№	Почва*
Chlorellales	<i>Muriella terrestris</i>	060	Бурая полупустынная почва, Калмыкия
		122	Каштановая пахотная почва, Волгоградская область
		135	Каштановая почва, Волгоградская область
		130	Каштановая почва, Волгоградская область
		<i>Nannochloris</i> sp.	104
144	Каштановая почва, Волгоградская область		
Trebouxiales	<i>Watanabea pyrenoidosa</i> sp.nov.		014
Trebouxiophyceae <i>ordo incertae sedis</i>	<i>Edaphochlorella mirabilis</i>	102	Погребенная лугово-каштановая почва, Волгоградская область

\* Название почвы дано в полевых условиях с последующим лабораторным уточнением в соответствии с классификацией почв СССР ([Классификация .... 1977](#)).

твердую питательную среду BG11 с азотом (1% агар, pH 7.0) и дальнейшем многократном пересеве отдельных колоний до получения альгологически чистых культур. Все изоляты культивировали в климатостате при стандартных условиях (температура 23–25°C, свет 60–75  $\mu\text{моль фотонов}/(\text{м}^2 \text{ с})$ , фотопериод 12 ч).

**Микроскопия.** Изучение морфологии и жизненных циклов штаммов проводили методами световой микроскопии (светлое поле и интерференционный контраст) с помощью микроскопов Leica DM750 “Leica microsystems” и Carl Zeiss Axio Scope A1 “Carl Zeiss Microscopy GmbH” (Германия) в ЦКП ИФХиБПП РАН. Результаты наблюдений документировали рабочими рисунками и фотографиями, снятыми с помощью цветных цифровых камер “Видеозавр” (Россия) и Carl Zeiss MRc 5 (Германия). Для таксономической идентификации проводили несколько прижизненных цитохимических реакций: на крахмал – раствором Люголя, на слизь – 1%-ным раствором туши. Сроки

наблюдения за штаммами составляли до 6 месяцев. При морфологической идентификации штаммов зеленых микроводорослей учитывали тип организации таллома, наличие и толщину слизистых оболочек, количество и тип хлоропластов, наличие и структуру пиреноида, форму и размеры клеток, способы размножения и другие характеристики. Названия таксонов приведены согласно Международной электронной базе данных AlgaeBase ([Guiry, Guiry, 2018](#)).

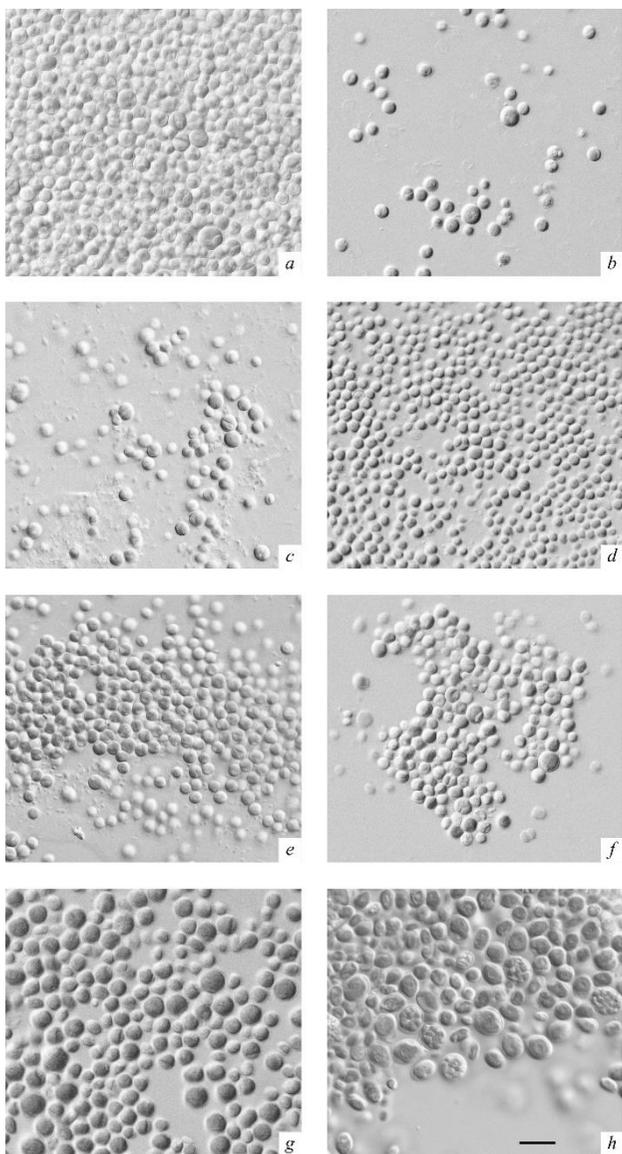
**Выделение, амплификация, очистка и секвенирование ДНК.** ДНК выделяли из биомассы микроводорослей с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit “Qiagen” (США), следуя протоколу производителя. При амплификации использовали готовую смесь для ПЦР Screen Mix-HS “Евроген” (Россия). Для амплификации гена 18S рРНК выбрали праймеры и условия из статьи Katana et al. ([2001](#)), для ITS2 использовали универсальные праймеры из статьи White et al. ([1990](#)) с оптимизированными условиями ПЦР: 95°C – 3 мин; 95°C – 30 с, 57.6°C – 30 с, 72°C – 1 мин, 35 циклов; 72°C – 10 мин. Детекцию целевых ПЦР-продуктов проводили электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Для дальнейшей очистки ампликонов из геля применяли набор Cleanup Mini “Евроген” (Россия). Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли на базе ЗАО “Синтол” (Россия).

**Молекулярно-филогенетический анализ.** Для молекулярно-филогенетического анализа была составлена выборка из 55 последовательностей гена 18S рРНК штаммов зеленых микроводорослей, которая включала собственные данные и данные GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей выполнили в программе BioEdit по алгоритму ClustalW. Общая длина анализируемых последовательностей для гена 18S рРНК составила 1772 п.н. При наличии интронов в гене 18S рРНК они были удалены из выравнивания. Для выбора модели нуклеотидных замен использовали программу jModelTest. Реконструкцию филогенетических взаимосвязей осуществляли методом максимального правдоподобия (ML) в программе PhyML. В качестве внешней группы выбрали представителя другого класса (Chlorophyceae) – *Tetracystis tetrastora* SAG 98.80. Статистическая поддержка топологии деревьев была оценена с помощью бутстреп-анализа (1000 повторностей) и указана в узлах ветвей. Генетические различия между нуклеотидными последовательностями охарактеризовали с помощью генетических дистанций.

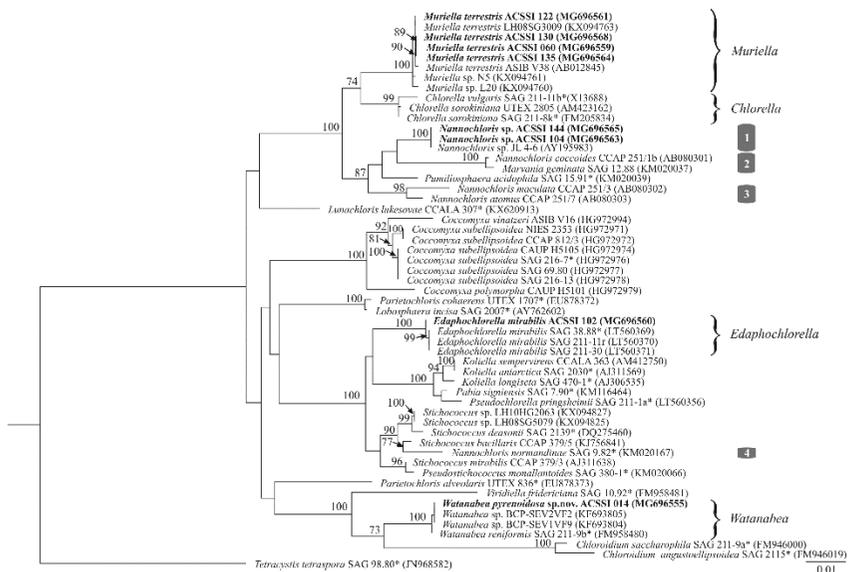
Мерой генетических различий являлся процент несовпадений нуклеотидов при попарном сравнении выровненных последовательностей, вычисление которого провели в программе MEGA 5.0. Для анализа вторичной структуры ITS2 выполняли аннотацию спейсера в ITS2 DataBase (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>), его фолдинг с помощью веб-сервера Mfold (<http://unafold.rna.albany.edu>) и визуализацию с помощью программы PseudoViewer3 (Byun, Han, 2009). Сравнение вторичной структуры между штаммами, поиск консервативных мотивов и компенсаторных замен осуществляли в программе 4SALE (Seibel et al., 2006). При оценке правильности фолдинга ITS2 Chlorophyta ориентировались на работу Caisová et al. (2013).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Штаммы ACSSI 060, выделенный из бурой полупустынной почвы, и 122, 130 и 135, выделенные из каштановой почвы, имели мелкие размеры (диаметр клетки не превышал 5–7 мкм), шаровидную форму клетки, одно ядро, один пристенный хлоропласт у молодых клеток и несколько – у зрелых (рис. 1a–1d). Пиреноид отсутствовал, размножение – с помощью автоспор. В соответствии с описанными признаками был поставлен предварительный морфологический диагноз – *Muriella terrestris*, который впоследствии подтвердился по 18S рРНК-филогении. Все штаммы рода *Muriella* образовали отдельную независимую кладу со 100%-ной статистической поддержкой (рис. 2). Генетические дистанции по гену 18S рРНК внутри рода не превышали 0.3%, различия с ближайшими родственниками из рода *Chlorella* – *C. vulgaris* и *C. sorokiniana* составили 1.2–1.5%. ITS2 изученных штаммов не отличался, компенсаторных замен (СВС) выявлено не было. Ниже приводим анализ вторичной структуры ITS2 штамма ACSSI 135 (MG696581). Длина спейсера составила 262 нуклеотида и характеризовалась нетипичной разветвленной III шпилькой (рис. 3a). Ранее у некоторых зеленых водорослей была показана раздвоенная I шпилька, которая является апоморфным признаком представителей “core Sphaeropleales” (Keller et al., 2008). Раздвоенная III шпилька ITS2 зеленых микроводорослей рода *Muriella* описывается впервые.

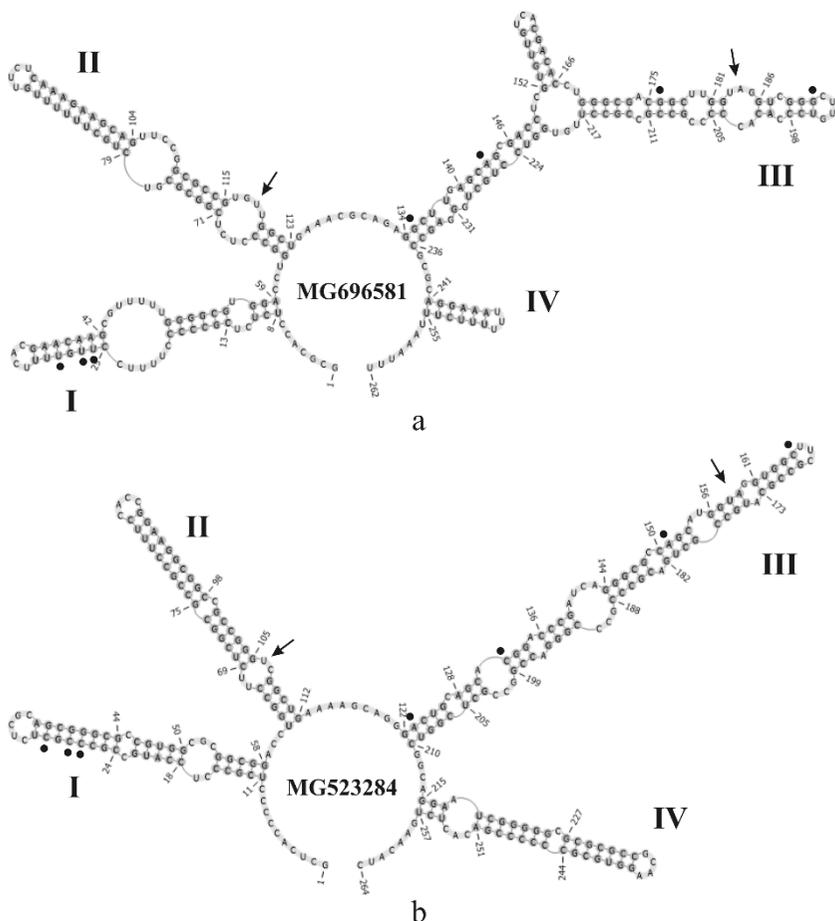


**Рис. 1.** Фотографии штаммов *Muriella terrestris* ACSSI 060 (a), ACSSI 122 (b), ACSSI 130 (c), ACSSI 135 (d); *Nannochloris* sp. ACSSI 104 (e), ACSSI 144 (f); *Edaphochlorella mirabilis* ACSSI 102 (g); *Watanabea pyrenoidosa* sp. nov. ACSSI 014 (h). Шкала 10 мкм.



**Рис. 2.** Укорененное филогенетическое дерево зеленых микроводорослей класса Trebouxiophyceae, построенное методом максимального правдоподобия (ML), на основе последовательностей гена 18S рРНК. В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны бутстреп-значения ML; значения <70% не показаны. Модель нуклеотидных замен: GTR+I+G. Жирным шрифтом выделены штаммы ACSSI, звездочкой отмечены аутентичные штаммы. Цифрами на сером фоне обозначены представители полифилетичного рода *Nannochloris*.

Штаммы ACSSI 104 и 144, изолированные из солонца и каштановой почвы, соответственно, характеризовались очень простой морфологией сходной с *Mychonastes homosphaera*: мелкие шаровидные клетки 3–5 мкм в диаметре, одно ядро и один пристенный хлоропласт, отсутствие пиреноида, размножение автоспорами (рис. 1e–1f). По литературным данным *Mychonastes homosphaera* повсеместно встречается в почвах России ([Андреева, 1998](#)). Однако 18S рРНК-анализ установил местоположение обоих штаммов в классе Trebouxiophyceae, а не Chlorophyceae, где находится род *Mychonastes* ([Krienitz et al., 2011](#)). Вероятно, что представители рода *Mychonastes* распространены в водных экосистемах, а находки *Mychonastes homosphaera* в почвах сомнительны. На дереве 18S рРНК штаммы ACSSI 104 и 144 кластеризовались со штаммом, идентифицирован-



**Рис. 3.** Сравнение вторичной структуры ITS2 *Muriella terrestris* ACSSI 135 (a) и *Edaphochlorella mirabilis* ACSSI 102 (b). Стрелками отмечены консервативные мотивы II и III шпилек, черными точками – компенсаторные замены.

ным как *Nannochloris* sp. Однако род *Nannochloris* оказался полифилеточным: виды *Nannochloris eucaryotum*, *Nannochloris maculata* и *Nannochloris atomus* перешли в новый род *Picochlorum*, *Nannochloris coccoides* в новый род *Marvania* (Henley et al., 2004). Штаммы ACSSI с *Nannochloris/Mychonastes*-подобной морфологией не группируются ни с *Mychonastes*, который относится к

другому классу водорослей – Chlorophyceae, ни в пределах класса Trebouxiophyceae с истинным представителем рода – аутентичным штаммом *Nannochloris normandinae* SAG 9.82. Это позволяет предположить, что изученные штаммы являются видами нового неопищенного рода класса Trebouxiophyceae с очень простой морфологией и, по-видимому, широко распространены в почвах. Генетические дистанции по 18S рРНК гену между штаммами внутри предлагаемого рода составили 0%, с близкими родами *Marvania* и *Pumilosphaera* – 2.1 и 1.2% соответственно.

Штамм ACSSI 102, изолированный из погребенной луговоскештановой почвы (возраст погребения около 2 тыс. лет), по данным морфологии идентифицирован как *Chlorella mirabilis*. Он обладал следующими признаками (рис. 1g): клетки одиночные, шаровидные, 3–8 мкм в диаметре; хлоропласт один пристенный, чашевидный; пиреноид один хорошо заметный, с крахмальной оберткой из мелких зерен; ядро одно, с трудом различимо; размножение автоспорами шаровидной, яйцевидной или коротко эллипсоидной формы, обычно по 2–4; пустые оболочки автоспорангиев в культуре отсутствуют. Также ранее показано присутствие спорополленина, устойчивого к химическому и биологическому воздействию биополимера, в клеточной стенке штамма ACSSI 102 ([Temraleeva et al., 2017](#)). Данный вид не группировался с истинными хлореллами, например, с *C. vulgaris* и *C. sorokiniana*, и на этом основании недавно был перенесен в новый род – *Edaphochlorella* ([Darienko et al., 2016](#)). 18S рРНК-анализ подтвердил принадлежность изученного штамма данному роду. В гене 18S рРНК была только 1 замена при сравнении с аутентичным штаммом *E. mirabilis* SAG 38.88. Вторичная структура ITS2 исследованного штамма (MG523284) оказалась практически идентичной ITS2 аутентичного штамма SAG 38.88. СВС между штаммами выявлено не было. Спейсер имел все отличительные признаки вторичной структуры ITS2 зеленых водорослей ([Coleman, 2007](#); [Buchheim et al., 2011](#); [Caisová et al., 2013](#)): длина 264 нуклеотида; 4 неразветвленные шпильки (helix); пиримидин-пиримидиновое несовпадение (mismatch) – неспаренный участок U-U, U-C, C-C во II шпильке; III шпилька самая длинная и содержит мотив 5' GGUAGG 3' на верхушке (рис. 3b). Сравнение вторичных структур ITS2 двух родов *Muriella* (ACSSI 135) и *Edaphochlorella*

(ACSSI 102) показало наличие 7 компенсаторных замен, причем 4 из них в консервативной III шпильке.

Таким образом, ACSSI 102 был идентифицирован как *Edaphochlorella mirabilis* – вид, который, вероятно, повсеместно распространен в современных дневных почвах, а также способен сохраняться за счет мелких размеров и присутствия в клеточной стенке спорополленина в погребенных тысячи лет назад почвах.

Еще один интересный представитель класса Trebouxiophyceae – штамм ACSSI 014 – изолирован из серой лесной почвы. Он был морфологически сходен с членами рода *Elliptochloris* (рис. 1h): клетки одиночные, молодые эллипсоидно-удлиненной формы 3.5–5.0 мкм шириной и 7.0–10 мкм длиной, по мере старения приобретают широкоэллипсоидную или шаровидную форму диаметром 5.0–10 мкм; оболочка тонкая; хлоропласт в молодых клетках лентовидный, занимает половину клеточного пространства, в зрелых клетках лопастной, рассеченный, занимает почти все пространство; ядро одно; пиреноид один, с оберткой из нескольких крупных зерен крахмала, в зрелых клетках иногда плохо различим; автоспоры крупные по 2–4 эллипсоидные или яйцевидные (иногда 1 автоспора может быть крупнее остальных) или мелкие по 16–32 заостренные эллипсоидные или яйцевидные (одинакового размера); 1–2 автоспоры часто остаются внутри спорангия. Зооспоры и половой процесс у штамма за весь период наблюдения отмечены не были. Однако 18S рРНК-анализ неожиданно утвердил положение исследуемого штамма внутри клады *Watanabea*. При сравнении последовательностей гена 18S рРНК штамма ACSSI 014 и аутентичного штамма *W. reniformis* SAG 211-9b выявлена одна замена и наличие интрона длиной 362 п.н. у последнего. Кроме того, от *W. reniformis* штамм ACSSI 014 отличался формированием большего количества автоспор, наличием пиреноида с крахмальной оберткой и почвенным, а не водным местообитанием. Таким образом, приведенные различия могут быть основанием для выделения данного штамма в новый вид – *W. pyrenoidosa* sp. nov. и изменения морфологического диагноза рода *Watanabea*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на возможность использования различных подходов: описательной морфологии и морфометрии, учета

биохимических, физиологических и экологических показателей, вычисления генетических дистанций, анализа и сравнения вторичной структуры ITS2, поиска компенсаторных замен и молекулярных подписей – общей проблемой при идентификации маленьких зеленых шариков – почвенных коккоидных зеленых микроводорослей остается субъективность выбора признака (морфологической или иной характеристики, молекулярного маркера) и установление его границ для конкретной таксономической категории. Поэтому в настоящее время в систематике водорослей принят полифазный подход, который отражает высказывание одного из основателей теории эволюции Ч. Дарвина: “Нет никакого сомнения, что организмы, подобно другим предметам, могут быть классифицированы различно: или искусственно, на основании отдельных признаков, или более естественно, на основании суммы признаков” ([1991](#)).

### БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают признательность зав. кафедрой ботаники Учебно-научного центра “Институт биологии” Киевского национального университета им. Т. Шевченко, д.б.н., проф. И.Ю. Костикову за ценные консультации по анализу вторичной структуры ITS2, а также к.б.н., с.н.с. лаборатории археологического почвоведения ИФХиБПП РАН М.В. Ельцову за организацию полевой экспедиции, помощь в описании почв и отборе образцов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №16-34-60020 мол\_а\_дк.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Андреева В.М.* Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). СПб.: Наука, 1998. 351 с.
2. *Голлербах М.М., Штина Э.А.* Почвенные водоросли. Л.: Наука, 1969. 228 с.
3. *Дарвин Ч.* Происхождение видов путем естественного отбора. Л.: Наука, 1991. 539 с.
4. Классификация и диагностика почв СССР. М.: Колос, 1977. 224 с.
5. *Штина Э.А., Зенова Г.М., Манучарова Н.А.* Альгологический мониторинг почв // Почвоведение. 1998. № 12. С.1449–1461.
6. *Barcyste D., Hodac L., Nedbalová L.* Lunachloris lukesovae gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid green alga isolated from soil

in South Bohemia, Czech Republic // *European J. of Phycology*. 2017. V. 52. No. 3. P. 281–291

7. *Buchheim M.A., Keller A., Koetschan C. et al.* Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: to-wards an automated reconstruction of the green algal tree of life // *PLoS ONE*. 2011. V. 6. No. 2. P. e16931.

8. *Byun Y., Han K.* PseudoViewer3: generating planar draw-ings of large-scale RNA structures with pseudoknots // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. P. 1435–1437.

9. *Caisová L., Marin B., Melkonian M.* A Consensus Secondary Structure of ITS2 in the Chlorophyta Identified by Phylogenetic Reconstruction // *Protist*. 2013. V. 164. P. 482–496.

10. *Coleman A.W.* Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. 3322–3329.

11. *Darienko T., Gustavs L., Mudimu O., Menendez C.R., Schumann R., Karsten U., Friedl T., Proschold T.* Chloroidium, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to Chlo-rella (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // *European J. of Phycology*. 2010. V. 45. No. 1. P. 79–95.

12. *Darienko T., Gustavs L., Pröschold T.* Species concept and nomenclatural changes within the genera *Elliptochloris* and *Pseudochlorella* (Trebouxiophyceae) based on an integrative approach // *J. Phycol.* 2016. V. 52. P. 1125–1145. doi: 10.1111/jpy.12481

13. *Fucíková K., Lewis P.O., Lewis L.A.* Widespread desert affiliation of trebouxiophycean algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) including discovery of three new desert genera // *Phycol. Res.* 2014. V. 62. No. 4. P. 294–305.

14. *Guiry M.D., Guiry G.M.* *AlgaeBase* // World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. 2018. URL: <http://www.algaebase.org> (searched on 19 March 2018)

15. *Henley W.J., Hironaka J.L., Guillou L., Buchheim M.A., Buchheim J.A., Fawley M.W., Fawley K.P.* *Picochlorum oklahomensis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // *Phycologia*. 2004. V. 43. P. 641–652.

16. *Katana A., Kwiatowski J., Spalik K., Zakryś B., Szalacha E., Szymańska H.* Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA // *J. Phycol.* 2001. V. 37. No. 3. P. 443–451.

17. *Keller A., Schleicher T., Förster F., Ruderisch B., Dandekar T., Müller T., Wolf M.* ITS2 data corroborate a monophyletic chlorophycean DO-group (Sphaeropleales) // *BMC Evol Biol.* 2008. V. 8. P. 218. doi: 10.1186/1471-2148-8-218

18. *Krienitz L., Bock C., Dadheech P.K., Proschold T.* Taxonomic reassessment of the genus *Mychonastes* (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species // *Phycologia*. 2011. V. 50. No. 1. P. 89–106.

19. *Neustupa J., Nemcová Y., Eliás M., Skaloud P.* *Kalinella bambusicola* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid *Chlorella*-like

subaerial alga from Southeast Asia // *Phycological Research*. 2009. V. 57. No. 3. P. 159–169.

20. *Neustupa J., Nemcová Y., Veselá J., Steinová J., Skaloud P.* Parachloroidium gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel genus of coccoid green algae from subaerial corticolous biofilms // *Phycologia*. 2013. V. 52. No. 5. P. 411–421.

21. *Seibel P.N., Muller T., Dandekar T., Schultz J., Wolf M.* 4SALE – A tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing // *BMC Bioinformatics*. 2006. V. 7. P. 498.

22. *Somogyi B., Felföldi T., Solymosi K., Makk J., Homonnay Z.G., Horváth G., Turcsi E., Boddi B., Márialigeti K., Voros L.* Chloroparva pannonicagen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) – a new picoplanktonic green alga from a turbid, shallow soda pan // *Phycologia*. 2011. V. 50. No. 1. P. 1–10.

23. *Song H.Y., Zhang Q., Liu G.X., Hu Z.Y.* Polulichloris henanensis gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga // *Phytotaxa*. 2015. V. 218. No. 2. P. 137–146.

24. *Temraleeva A.D., Moskalenko S.V., El'tsov M.V., Vagapov I.M., Ovchinnikov A.Yu., Gugalinskaya L.A., Alifanov V.M., Pinskiy D.L.* Stability and morphological and molecular-genetic identification of al-gae in buried soils // *Eurasian Soil Science*. 2017. V. 50. No. 8. P. 952–960. doi: 10.1134/S1064229317080129

25. *White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR Protocols*. San Diego: Acad. Press, 1990. Pt. 3. P. 315–322.

26. *Zhang J., Huss V.A.R., Sun X., Chang K., Pang D.* Morphology and phylogenetic position of a trebouxiophycean green alga (Chlorophyta) growing on the rubber tree, *Hevea brasiliensis*, with the description of a new genus and species // *European J. Phycology*. 2008. V. 43. No. 2. P. 185–193.

## **CHOOSING AN APPROACH FOR IDENTIFICATION OF SOIL COCCOID GREEN MICROALGAE (TREBOUXIOPHYCEAE, CHLOROPHYTA)**

**A. D. Temraleeva, S. V. Moskalenko, E. A. Portnaya**

*Institute of physico-chemical and biological problems in soil science RAS,  
Russia, 142290, Pushchino, Institutskaya str., 2*

\* <http://orcid.org/0000-0002-3445-0507> e-mail: [temraleeva.anna@gmail.com](mailto:temraleeva.anna@gmail.com)

The article describes the morphological and molecular genetic approaches used to identify the green microalgae of the Trebouxiophyceae class from the ACSSI collection. In the brown semi-desert and chestnut soils, we found *Muriella terrestris*. In the buried meadow-chestnut soil we found *Edaphochlorella*

*mirabilis*. Three more strains are characterized as new uncharacterized taxa: ACSSI 014 is a new species related to the genus *Watanabea* isolated from gray forest soil, with a pyrenoid surrounded by several starch grains, in contrast to the type species, and ACSSI 104 and 144 are a *Nannochloris*-like genus, whose representatives were found in solonetz and chestnut soil and are characterized by poor morphological specificities. It is shown that no single criterion (either morphological or other specificity, calculation of genetic distances, analysis and comparison of the ITS2 secondary structure, search for compensatory changes and molecular signatures) does not allow reliable classification of taxa. Therefore, due to this fact, it is necessary to apply a polyphasic approach in the systematics of algae, especially when identifying taxa with simple cellular morphology, which are often found in soils.

*Keywords*: distances, molecular signatures, 18S rRNA, ITS2 secondary structure, ACSSI

## REFERENCES

1. Andreeva V.M. *Terrestrial and aerophilic green algae (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales)*, Sankt-Peterburg, Nauka Publ., 1998, 351 p. (in Russian).
2. Gollerbakh M.M., Shtina E.A. *Soil algae*. Leningrad, Nauka Publ., 1969, 228 p. (in Russian).
3. Darwin Ch. *The origin of species by means of natural selection*, Leningrad, Nauka Publ., 1991, 539 p. (in Russian).
4. *Classification and Diagnostics of Soils of the Soviet Union*, Moscow, Kolos Publ., 1977. (in Russian).
5. Shtina E.A., Zenova G.M., Manucharova N.A. Algological monitoring of soils, *Pochvovedenie*, 1998, No 12, pp. 1449–1461. (In Russian).
6. Barcyte D., Hodac L., Nedbalová L. *Lunachloris lukesovae* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid green alga isolated from soil in South Bohemia, Czech Republic, *European J. Phycology*, 2017, V. 52, No. 3, pp. 281–291.
7. Buchheim M.A., Keller A., Koetschan C. et al. Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: to-towards an automated reconstruction of the green algal tree of life, *PLoS ONE*, 2011, V. 6, No. 2, p. e16931.
8. Byun Y., Han K. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots, *Bioinformatics*, 2009, V. 25, pp. 1435–1437.
9. Caisová L., Marin B., Melkonian M. A *Consensus Secondary Structure of ITS2 in the Chlorophyta Identified by Phylogenetic Reconstruction*, *Protist*, 2013, V. 164, pp. 482–496.

10. Coleman A.W. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure, *Nucleic Acids Research*, 2007, V. 35, pp. 3322–3329.
11. Darienko T., Gustavs L., Mudimu O., Menendez C.R., Schumann R., Karsten U., Friedl T., Proschold T. Chloroidium, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to Chlorella (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), *European J. Phycology*, 2010, V. 45, No. 1, pp. 79–95.
12. Darienko T., Gustavs L., Pröschold T. Species concept and nomenclatural changes within the genera *Elliptochloris* and *Pseudochlorella* (Trebouxiophyceae) based on an integrative approach, *J. Phycology*, 2016, V. 52, pp. 1125–1145, doi: 10.1111/jpy.12481
13. Fucíková K., Lewis P.O., Lewis L.A. Widespread desert affiliation of trebouxiophycean algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) including discovery of three new desert genera, *Phycological Research*, 2014, V. 62, No. 4, pp. 294–305.
14. Guiry M.D., Guiry G.M. *AlgaeBase, World-wide electronic publication*, National University of Ireland, Galway, 2018. <http://www.algaebase.org>; searched on 19 March 2018.
15. Henley W.J., Hironaka J.L., Guillou L., Buchheim M.A., Buchheim J.A., Fawley M.W., Fawley K.P. *Picochlorum oklahomensis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), *Phycologia*, 2004, V. 43, pp. 641–652.
16. Katana A., Kwiatowski J., Spalik K., Zakryś B., Szalacha E., Szymańska H. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA, *J. Phycology*, 2001, V. 37, No. 3, pp. 443–451.
17. Keller A., Schleicher T., Förster F., Ruderisch B., Dandekar T., Müller T., Wolf M. ITS2 data corroborate a monophyletic chlorophycean DO-group (Sphaeropleales), *BMC Evolutionary Biology*, 2008, V. 8, p. 218, doi: 10.1186/1471-2148-8-218.
18. Krienitz L., Bock C., Dadheech P.K., Proschold T. Taxonomic reassessment of the genus *Mychonastes* (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species, *Phycologia*, 2011, V. 50, No. 1, pp. 89–106.
19. Neustupa J., Nemcová Y., Eliás M., Skaloud P. *Kalinella bambusicola* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid *Chlorella*-like subaerial alga from Southeast Asia, *Phycological Research*, 2009, V. 57, No. 3, pp. 159–169.
20. Neustupa J., Nemcová Y., Veselá J., Steinová J., Skaloud P. *Parachloroidium* gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel genus of coccoid green algae from subaerial corticolous biofilms, *Phycologia*, 2013, V. 52, No. 5, pp. 411–421.
21. Seibel P.N., Muller T., Dandekar T., Schultz J., Wolf M. 4SALE - A tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing, *BMC Bioinformatics*, 2006, V. 7, p. 498.

22. Somogyi B., Felfoldi T., Solymosi K., Makk J., Homonnay Z.G., Horváth G., Turcsi E., Boddi B., Márialigeti K., Voros L. *Chloroparva pannonicagen. et sp. nov.* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) - a new picoplanktonic green alga from a turbid, shallow soda pan, *Phycologia*, 2011, V. 50, No. 1, pp. 1–10.
23. Song H.Y., Zhang Q., Liu G.X., Hu Z.Y. *Polulichloris henanensis gen. et sp. nov.* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga, *Phytotaxa*, 2015, V. 218, No. 2, pp. 137–146.
24. Temraleeva A.D., Moskalenko S.V., El'tsov M.V., Vagapov I.M., Ovchinnikov A.Yu., Gugalinskaya L.A., Alifanov V.M., Pinskiy D.L. Stability and morphological and molecular-genetic identification of al-gae in buried soils, *Eurasian Soil Science*, 2017, V. 50, No. 8, pp. 952–960, doi: 10.1134/S1064229317080129
25. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*, PCR Protocols. San Diego: Acad. Press., 1990, Pt. 3, pp. 315-322.
26. Zhang J., Huss V.A.R., Sun X., Chang K., Pang D. *Morphology and phylogenetic position of a trebouxiophycean green alga (Chlorophyta) growing on the rubber tree, Hevea brasiliensis, with the description of a new genus and species*, *European J. Phycology*, 2008, V. 43. No. 2. pp. 185–193.

### Ссылки для цитирования

Темралеева А.Д., Москаленко С.В., Портная Е.А. Выбор подхода при идентификации почвенных коккоидных зеленых микроводорослей (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2018. Вып. 93. С. 105-120. doi: 10.19047/0136-1694-2018-93-105-120

Temraleeva A.D., Moskalenko S.V., Portnaya E.A. Choosing an approach for identification of soil coccoid green microalgae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), *Dokuchaev Soil Bulletin*, 2018, V. 93, pp. 105-120. doi:10.19047/0136-1694-2018-93-105-120