

Новые находки двух редких видов зеленых водорослей (Chlorophyta) в снежниках Приполярного Урала и Западного Саяна

И. В. Новаковская¹, Е. Н. Патова¹, Е. Г. Макеева^{2,3}, Д. М. Шадрин¹

¹Институт биологии Коми научного центра УрО РАН, Сыктывкар, Россия

²Государственный природный заповедник «Хакасский», Абакан, Россия

³Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова, Абакан, Россия

Автор для переписки: И. В. Новаковская, novakovskaya@ib.komisc.ru

Резюме. Два редких вида, *Chlamydomonas proteus* и *Xerochlorella minuta*, выделены из проб снега в местах массового «цветения» водорослей на Приполярном Урале и Западном Саяне. В результате изучения штаммов с применением световой микроскопии и молекулярно-генетических методов (анализ нуклеотидных последовательностей 18S и ITS2 рДНК) получены новые данные по морфологии, экологии и распространению этих видов. *Chlamydomonas proteus* является первой подтвержденной молекулярно-генетическими методами находкой на территории России.

Ключевые слова: криофильные водоросли, характеристика штаммов, «цветение» снега, горные регионы, Россия.

New records of two rare species of green algae (Chlorophyta) from snowfields of the Subpolar Urals and the Western Sayan

I. V. Novakovskaya¹, E. N. Patova¹, E. G. Makeeva^{2,3}, D. M. Shadrin¹

¹Institute of Biology of Komi Science Center of the Ural Branch of the Russian Academia of Sciences, Syktyvkar, Russia

²Khakassky State Nature Reserve, Abakan, Russia

³Katanov Khakass State University, Abakan, Russia

Corresponding author: I. V. Novakovskaya, novakovskaya@ib.komisc.ru

Abstract. Two rare species, *Chlamydomonas proteus* and *Xerochlorella minuta*, were isolated from snow samples in sites of “algal blooms” in the Subpolar Urals and Western Sayan. As a result of the study of strains using light microscopy and molecular genetic methods (the nucleotide sequence analysis of 18S and ITS2 rDNA), new data on morphology, ecology and distribution of these species were obtained. The data expanded the species’ diagnostic characteristics. *Chlamydomonas proteus* is the first record on Russian territory supported by molecular studies.

Keywords: cryophilic algae, characterization of strains, snow “bloom”, mountain regions, Russia.

Водоросли — группа фотоавтотрофных организмов, которые приспособились к существованию в самых разнообразных местах обитания, включая снежники и ледники высокогорных районов мира, в том числе, Арктику. В условиях низких температур и высокой солнечной радиации, характерных для таких регионов, способна развиваться лишь ограниченная группа криофильных видов с особыми

физиологическими механизмами адаптации к экстремальным условиям (Mock, Thomas, 2008; Hoham, Remias, 2020; Peng *et al.*, 2021). В полярных и арктических регионах эти организмы при определенных условиях могут активно развиваться на снежной поверхности (вызывая так называемое «цветение» снега), окрашивая снег в различные цвета, в том числе, оттенки красного или оранжевого (Komárek, Nedbalová, 2007; Vimercati *et al.*, 2019). Окраска поверхности снега связана с запасанием в цитоплазме водорослей вторичного каротиноида астаксантина, который защищает клетку от фотосинтетически активного (ФАР) и УФ-излучений. При этом, в клетках у криофильных водорослей образуются в значительном количестве полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), которые уменьшают их повреждение при отрицательных температурах (Hoham, Remias, 2020).

В целом, известно несколько сотен видов водорослей снега и льда из разных систематических групп (*Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Cryptophyta* и др.) (Kol, 1968; цит. по Matsuzaki *et al.*, 2015), однако большинство из них относятся к зеленым водорослям порядка *Chlamydomonadales*, представители которого наиболее часто вызывают красное «цветение» снега (Procházková *et al.*, 2019; Hoham, Remias, 2020).

Несмотря на то, что «цветение» снега — широко распространенное природное явление, криофильные водоросли остаются недостаточно изученной группой. В настоящее время, благодаря активному применению полифазного подхода, а также метода ДНК-метабаркодинга, было выявлено их скрытое разнообразие и описаны новые таксоны. Сложностью при изучении этой экологической группы является то, что они не всегда развиваются в культуре, в связи с чем некоторые представители известны только в виде покоящихся стадий — цист, и именно в такой форме содержатся в мировых коллекциях. Например, Matsuzaki *et al.* (2018), в ходе выполненной с использованием молекулярно-генетических методов таксономической ревизии широко распространенного и, казалось бы, хорошо изученного вида криофильных зеленых водорослей *Chloromonas nivalis* (Chodat) Hoham et Mullet, показали, что его цисты, собранные из разных регионов и идентифицируемые как *C. nivalis*, принадлежат более чем одному виду. Другим наглядным примером может служить работа Procházková *et al.* (2019), где авторы описали новый род снежных водорослей *Sanguina* Leya et al. (*Chlorophyceae*, *Chlamydomonadales*), включающий два вида, *S. nivaloides* Procházková et al. и *S. aurantia* Leya et al., которые имеют космополитное распространение в полярных и альпийских регионах. Авторам не удалось получить активно растущие изоляты этих видов, поэтому описание таксонов было выполнено на основании морфологии цист, выделенных из окрашенного снега, а филогенетическое положение видов и установление нового рода — на основании молекулярно-генетического анализа изолятов (Procházková *et al.*, 2019).

В целом, криофильные водоросли представляют большой интерес для биотехнологии и промышленности, так как способны производить холодоактивные ферменты и белки, вторичные метаболиты, поглощающие УФ-излучение,

антиоксиданты, омега-3 ПНЖК и др. (Leya *et al.*, 2009; Remias *et al.*, 2012; PUFAChain Consortium, 2017; Leya, 2022). В связи с этим, эта группа водорослей представляет интерес не только с точки зрения фундаментальных, но и прикладных исследований.

Несмотря на то, что изучение снежных водорослей северных регионов Урала и Западного Саяна стало проводиться относительно недавно, уже получены первые сведения об их разнообразии, в частности, было выявлено 29 видов из 5 отделов (Novakovskaya *et al.*, 2018, 2022). Большинство штаммов выделено в культуру и поддерживается в коллекции водорослей ИБ Коми НЦ УрО РАН (СΥΚΟΑ).

Цель данной работы — дополнить и обобщить сведения по морфологии, экологии, географии и филогении двух штаммов водорослей, выделенных при «цветении» снега на Приполярном Урале и Западном Саяне.

Материал и методы

Место отбора проб. Штаммы микроводорослей были выделены летом 2019 г. с поверхности «красного» снега на Приполярном Урале — снежник среди каменистых осыпей, хребет Малдындырд (951 м над ур. м., 65°12'23"N, 60°12'07"E) и на Западном Саяне — снежник в лиственнично-кедровом лесу, хребет Кохош (1782 м над ур. м., 51°44'59.82"N, 89°50'4.68"E). Пробы снега отбирали в стерильные пластиковые пробирки объемом 15 мл Greiner Bio-One (Австрия), а также в чашки Петри с агаризованными средами 3N BBM и BG-11 (Bischoff, Bold, 1963; Riprka *et al.*, 1979).

Исследование морфологии. Для изучения морфологических особенностей клеток получены монокультуры, выращенные на жидких и агаризованных средах 3N BBM и BG-11 с добавлением стерильной талой воды (использован снег из мест отбора проб). Выделенные штаммы хранятся в холодильной камере при следующих условиях: освещенность — 45 мкмоль м⁻²с⁻¹ ФАР (фитолампа Uniel ULI-P11-35W/SPFR IP40 WHITE, Китай), период 12:12 ч (день/ночь), температура 10 °С.

Изучение морфологии штаммов выполнено на световом микроскопе Nikon Eclipse 80 i (Япония), оборудованного системой дифференциального интерференционного контраста (ДИК) и видеофиксации изображений при увеличениях ×40 и ×100. Микрофотографии выполнены с помощью камеры Nikon DS-2Mv (Япония). Для визуализации слизи использовали одну каплю водного раствора метиленового синего (1.5%). Идентификацию видов проводили с привлечением отечественных и зарубежных определителей (Ettl, 1983; Andreyeva, 1998; Ettl, Gärtner, 2014), а также обзорных статей (Pringsheim, 1930; Gromov *et al.*, 1977; Mikhailyuk *et al.*, 2020). Таксономия и номенклатура водорослей приведены по AlgaeBase (Guiry, Guiry, 2024), фитогеографические характеристики — по определителям и базе данных AlgaeBase (Guiry, Guiry, 2024) и списку водорослей-индикаторов (Barinova *et al.*, 2006, 2019).

Выделение ДНК и ПЦР. Выделение ДНК и анализ нуклеотидных последовательностей 18S и ITS2 рДНК выполнен в Центре коллективного пользования «Молекулярная биология» Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН. ДНК выделяли из двухнедельных культур штаммов с помощью набора FastDNASpinKit (QBioGene, Канада) в соответствии с инструкциями производителя и хранили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до использования. Амплификацию ДНК последовательностей проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл ScreenMix (Евроген, Россия), по 5 мкл каждого праймера (конечная концентрация 0.3 мкМ) (Евроген, Россия), 9 мкл воды без нуклеаз и 1 мкл ДНК (10–100 нг). Амплификацию проводили с использованием праймеров, указанных в табл. 1.

Таблица / Table 1

Праймеры для амплификации участков ДНК, использованные в анализе /
Primers used for amplification of DNA fragments in this study

Маркер / Marker	Праймер / Primer	Последовательность / Sequence	Источники / References
18S	18S-FA	5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'	Nakazawa, Nozaki, 2004; Nakada <i>et al.</i> , 2007, 2010
	18S-RB	5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'	
	18S-FC	5'-GGGAGGTAGTGACAAIAAATA-3'	
	18S-RD	5'-GCTGGCACCAGACTTGCCCTC-3'	
	18S-FE	5'-GGGAGTATGGTCGCAAGGCTG-3'	
	18S-RF	5'-CCCGTGTTGAG TCAAATTAAG-3'	
	18S-FA2	5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3'	
18S-RB2	5'-GATCCTTCTGCAGGTTACCTACG-3'		
ITS2	ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	

Условия ПЦР включали: предварительную денатурацию при $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин; далее 35 циклов: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 с, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ (для 18S), $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (для ITS2) в течение 30 с и $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 мин; окончательная элонгация при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин. Продукты ПЦР после электрофореза в 1% агарозном геле окрашенном бромистым этидием визуализировали в УФ-свете. Для анализа размеров ампликонов использовали 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия). Продукты ПЦР очищали от агарозного геля с помощью набора «ColGen» (Синтол, Россия). Концентрацию ДНК и ПЦР продуктов измеряли на флуориметре Qubit 3 (Invitrogen, США). Секвенирование проводили с использованием набора реагентов «GENSEQ» (Синтол, Россия) на приборе НАНОФОР 05 (Синтол, Россия).

Филогенетический анализ. Пятнадцать последовательностей 18S *Chlamydomonas* и членов семейства Chlamydomonadaceae были извлечены из GenBank (BLAST, NCBI, 2024) и использованы для филогенетического анализа штамма SYKOA Ch-133-19; семь последовательностей для ITS – SYKOA Ch-200-17. Для построения дерева в основном использовали последовательности

из Коллекции культур водорослей Геттингенского университета (SAG), Коллекции культур водорослей и простейших (CCAP) и Коллекции культур водорослей Техасского университета в Остине (UTEX). В качестве внешней группы при анализе последовательностей 18S выбран *Bracteacoccus minor* (Schmidle ex Chodat) J. Petrová (SAG 221-1, KF673367) и ITS2 — *Lobosphaera incisa* (Reisigl) U. Karst. et al. (SAG 2468, LC366923). Выравнивание и реконструкцию филогенетических деревьев производили в программе MEGA X (<http://www.megasoftware.net>).

Выравнивание последовательностей выполняли с использованием алгоритма ClustalW. Для построения деревьев был использован метод максимального правдоподобия (MLE) с параметрами по умолчанию. Бутстреп поддержка — 1000 повторений.

Результаты и обсуждение

Выделенные штаммы *Chlamydomonas proteus* и *Xerochlorella minuta* поддерживаются в коллекции живых культур водорослей Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (Global Catalogue of Microorganisms GCM-1125, <https://ib.komisc.ru/sykoa>). Ниже приведена их подробная характеристика.

Chlamydomonas proteus E. G. Pringsh.

(Fig. 1)

Таксономическое положение вида: отдел Chlorophyta, класс Chlorophyceae, порядок Chlamydomonadales, семейство Chlamydomonadaceae.

Место сбора. Выделен из снежника на Западном Саяне — хребет Кохош.

Номер штамма в коллекции: SYKOA Ch-133-19 (<https://ib.komisc.ru/sykoa/collection/282/>).

Последовательность: GenBank OP709368 (18S rDNA).

Клетки одиночные, двужгутиковые, эллипсоидной или эллипсоидно-яйцевидной формы, оболочка нежная, иногда на заднем полюсе отстает от протопласта, в верхней части клетки небольшой выпуклый носик (Fig. 1A–B). Жгутики равны длине клетки или в 1.5 раза длиннее. Жгутиковая фаза у водоросли кратковременна, при наблюдениях обычно она не превышала 10 мин. Затем жгутики скручиваются и опадают. Хлоропласт боковой, мантиевидный. Один шаровидный пиреноид в центре клетки с массивной крахмальной оберткой из нескольких отдельных зерен. Ядро одно, расположено в нижней части. Стигма эллипсоидной формы, сдвинута к центру клетки, в верхней части расположены две сократительные вакуоли (Fig. 1A–B). Колонии слизистые, зеленого цвета на агаре. Клетки могут достигать 13 мкм дл. и 10 мкм шир. С возрастом клетки округляются, наблюдается незначительное утолщение и усиленное ослизнение их клеточных оболочек, слизь с концентрическими слоями (Fig. 1E–G). Размер клеток может достигать 19 мкм в дл. и 16 мкм в шир. В старых клетках могут наблюдаться многочисленные вакуоли (Fig. 1C). Размножение происходит за счет формирования преимущественно 2–4 (8) зооспор под оболочкой материнской клетки (Fig. 1D).

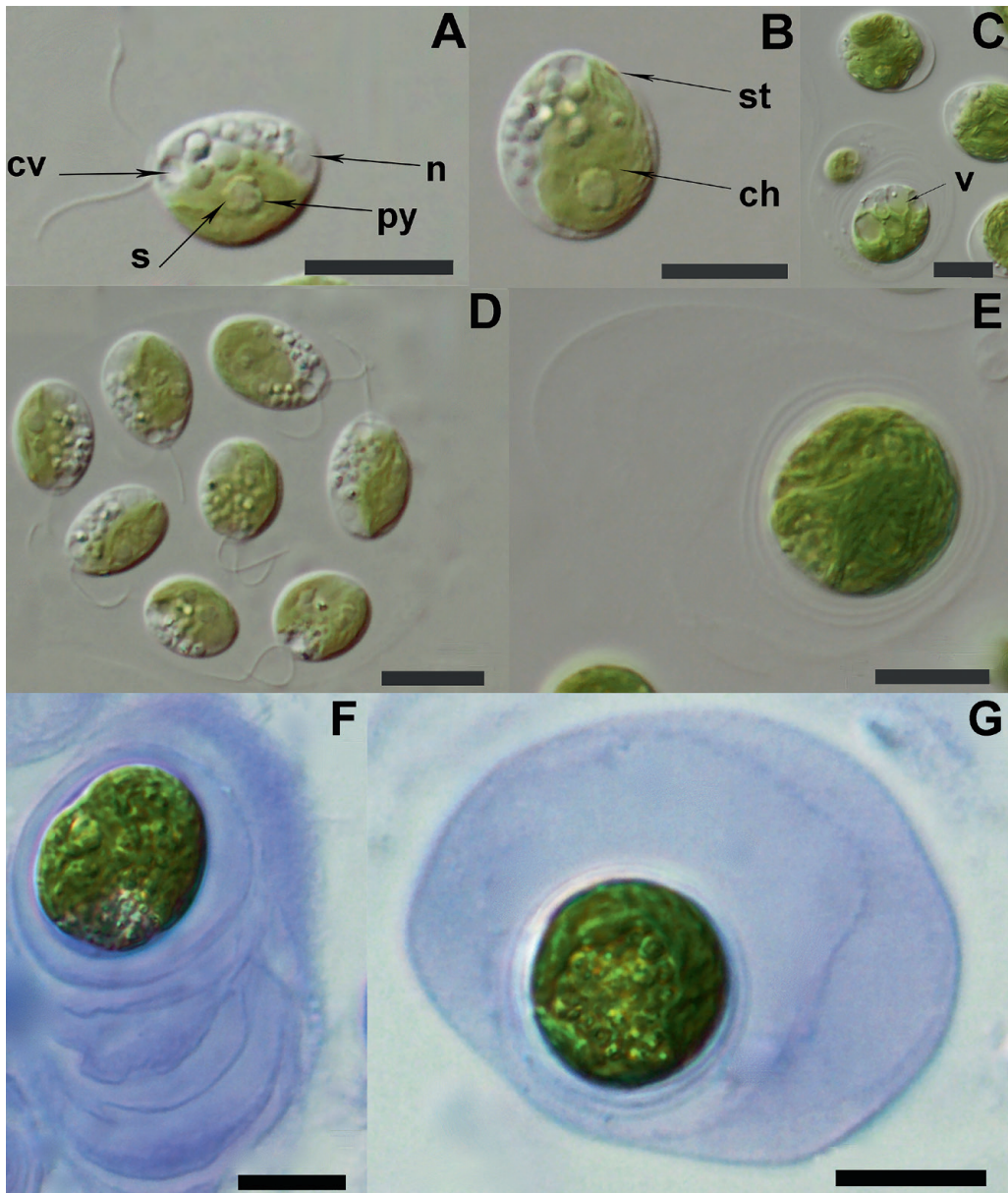


Fig. 1. *Chlamydomonas proteus* (SYKOA Ch-133-19).

A, B – вегетативные клетки (A – с жгутиками, B – без жгутиков) / A, B – vegetative cells (A – flagellate cell, B – unflagellate cell); C – старые клетки с вакуолями / old cells with vacuoles; D – зооспорангий с зооспорами / zoosporangium with zoospores; E–G – старые клетки, окруженные концентрически слоистой слизью (F, G – окраска метиленовым синим) / old cells surrounded by concentrically layered mucus (F, G – staining with methylene blue). Обозначения / Symbols: ch – хлоропласт / chloroplast; cv – сократительная вакуоль / contractile vacuole; n – ядро / nucleus; py – пиреноид / pyrenoid; s – крахмал / starch; st – стигма / stigma.

Масштабные линейки / Scale bars: 10 μm.

Xerochlorella minuta (J. B. Petersen) Mikhailyuk et P. M. Tsarenko (Fig. 2)
≡ *Dictyosphaerium minutum* J. B. Petersen.
= *Chlorella umbelloidea* Tell.

Таксономическое положение вида: отдел Chlorophyta, класс Trebouxiophyceae, порядок и семейство Trebouxiophyceae incertae sedis.

Место сбора. Выделен из снежника Приполярного Урала — хребет Малдындыр.

Номер штамма в коллекции: SYKOA Ch-200-17 (<https://ib.komisc.ru/sykoa/collection/281/>).

Последовательность: GenBank OQ925396 (ITS2 rDNA).

Клетки одиночные или в небольших 2–4-клеточных колониях (Fig. 2A–C), со слабой, едва заметной слизистой оболочкой. Клетки яйцевидные, широко эллипсоидные, от 3–6 до 5–7 мкм в диам., в старых культурах почти шаровидные, соединены своими узкими концами с полулунными или крестообразными остатками материнской (спорангиальной) оболочки (Fig. 2D). Хлоропласт пристенный, чашевидный, занимает половину или 2/3 внутренней поверхности клеток, с пиреноидом, окруженным несколькими (5–6) крахмальными зернами. Бесполое размножение с помощью 2–4 автоспор.

На основании изучения морфологии штаммов SYKOA Ch-133-19 и SYKOA Ch-200-17, а также данных, полученных в результате молекулярно-филогенетического исследования (см. ниже), штаммы были отнесены к видам *Chlamydomonas proteus* и *Xerochlorella minuta*, соответственно.

Chlamydomonas proteus — редкий вид, встречается в наземных и водных местообитаниях. Вид был описан Pringsheim (1930), аутентичный штамм выделен Pringsheim из лужи на песке недалеко от г. Хиршберг (Докси), Богемия (Чехия). Позднее, в 1982 г., E. Hegewald обнаружил этот вид в водохранилище на р. Мёне, в западной Германии (Ettl, 1983; Guiry, Guiry, 2024). Также отмечены находки этого вида в степных почвах заповедника «Аскания-Нова» (Kostikov *et al.*, 2001).

В результате наблюдения и изучения *Chlamydomonas proteus* в культуре были получены новые данные, касающиеся морфометрических и морфологических признаков этого вида. Выявлено, что клетки безжгутиковых стадий *C. proteus* по размерам крупнее на 3–4 мкм, чем указано в литературе (9 мкм дл. и 6 мкм шир.) (Pringsheim, 1930; Ettl, 1983). Кроме того, отмечено, что при старении клетки еще больше увеличиваются в диаметре (на несколько мкм), и их размер превышает размер подвижных клеток до двух раз. Помимо этого, нам впервые удалось выявить особенности строения оболочек у стареющих клеток *C. proteus* (вокруг клеток формируется мощная слоистая слизь) (Fig. 1E–G), которые ранее не были известны у этого вида. Появление мощной слоистой слизи при старении клеток описано у многих представителей семейства Chlamydomonadaceae (Demchenko, Mikhailyuk, 2012; Pröschold *et al.*, 2018; Mikhailyuk *et al.*, 2019; Novakovskaya *et al.*, 2023). Изучение поведения клеток *C. proteus* позволило нам

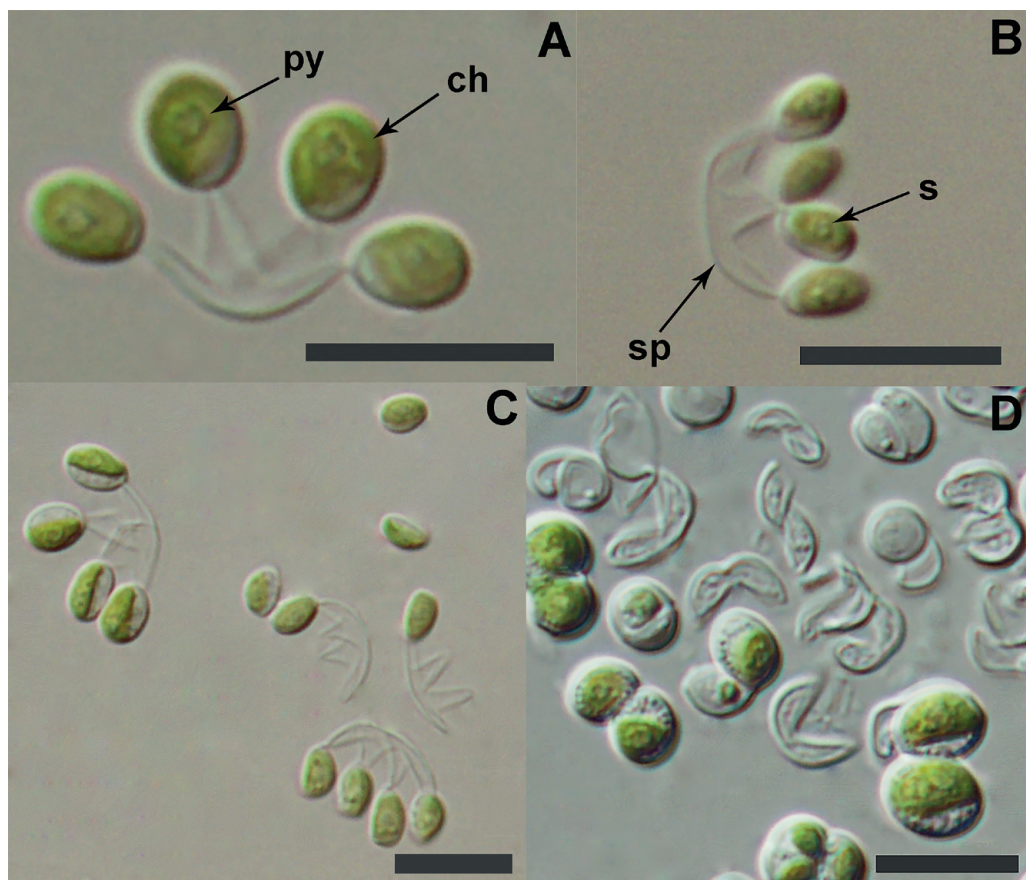


Fig. 2. *Xerochlorella minuta* (SYKOA Ch-200-17).

A–C – четырехклеточные колонии / four-cell colonies; D – старые клетки и пустые клеточные оболочки / old cells and empty cell walls. Обозначения / Symbols: ch – хлоропласт / chloroplast; py – пиреноид / pyrenoid; s – крахмал / starch; sp – фрагменты спорангиальной оболочки / fragment of sporangial wall.

Масштабные линейки / Scale bars: 10 μm.

наблюдать процесс, напоминающий слияние гамет (Fig. 3). Ранее для *C. proteus* было показано, что при смешивании культур разных штаммов этого вида наблюдается образование подвижных гамет, их копуляция и развитие зигот (10–13 мкм в диам.) с толстой волнистой оболочкой (Gromov *et al.*, 1977). Несмотря на то, что в культуре у штамма SYKOA Ch-133-19 мы также наблюдали разные стадии слияния гамет (Fig. 3), последующего развития зигот с толстой волнистой оболочкой мы не увидели. Возможно, это связано с условиями культивирования и/или физиологическим состоянием культуры, которые привели к тому, что зиготы не формировались.

Молекулярно-генетические данные подтверждают сходство изученного штамма с видом *Chlamydomonas proteus*. Последовательность SYKOA Ch-133-19

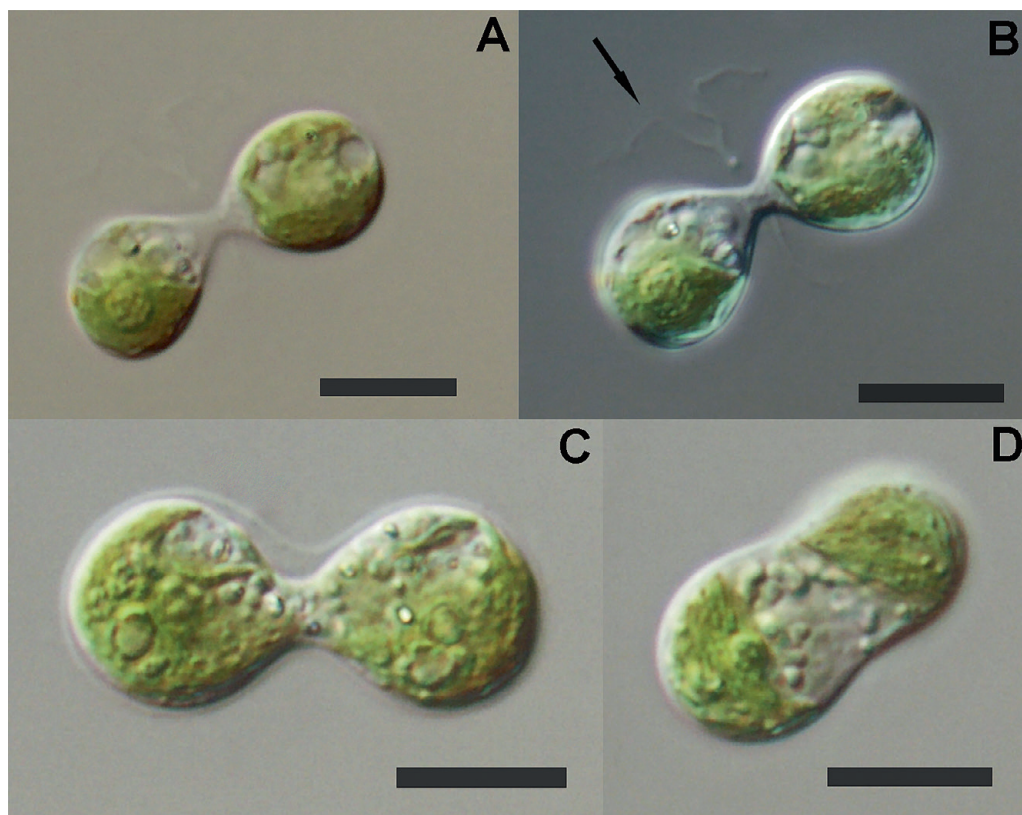


Fig. 3. Разные стадии слияния гамет *Chlamydomonas proteus* (SYKOA Ch-133-19) / Different stages of *Chlamydomonas proteus* gamete fusion (SYKOA Ch-133-19).

A, B – слияние двужгутиковых гамет (B – фотография выполнена методом ДИК с поляризационной линзой, стрелкой указаны жгутики) / fusion of biflagellate gametes (B – LM micrographs performed by DIC method with a polarizing lens, the arrow indicates flagella); C, D – последующие стадии слияния протопластов / subsequent stages of protoplast fusions. Масштабные линейки / Scale bars: 10 μ m.

имела высокое нуклеотидное сходство (99.8%) с аутентичным штаммом *C. proteus* SAG 41.72 (Fig. 4) и образовала с ним одну кладу со 100% поддержкой.

Согласно имеющимся сводкам по водорослям (Shtina, 1997; Shtina *et al.*, 1998; Patova, Novakovskaya, 2018; Egorova *et al.*, 2020), *Chlamydomonas proteus* является первой находкой на территории России, подтвержденной не только морфологическими, но и молекулярно-генетическими методами.

Род *Xerochlorella* Fučíková *et al.* с типовым видом *X. olmiae* Fučíková *et al.* были описаны Fučíková *et al.* (2014) на основании изучения почвенных образцов из Северной Америки. В ходе дальнейших исследований было показано, что *X. olmiae* является конспецифичным описанному ранее виду *Dictyosphaerium minutum* (последний был перенесен в род *Xerochlorella* как *X. minuta*) (Mikhailyuk *et al.*, 2020).

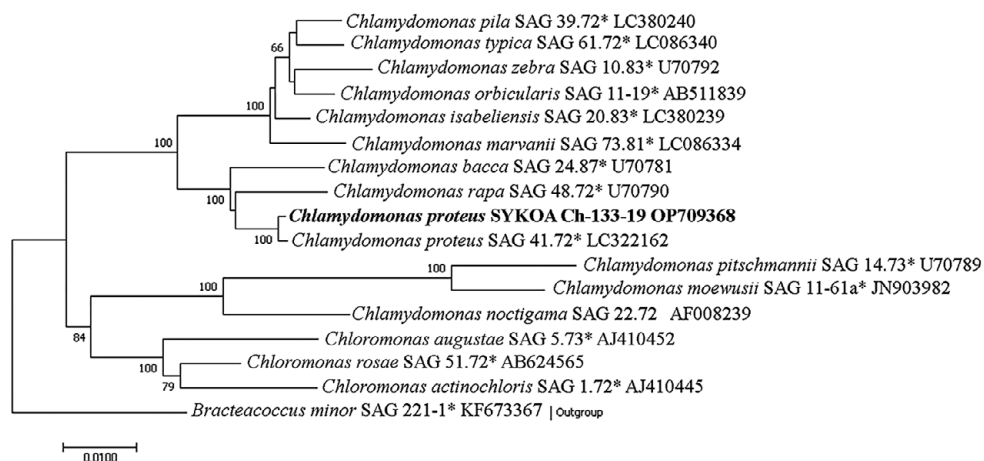


Fig. 4. Филогенетическое дерево *Chlamydomonas*, построенное методом MLE на основе последовательностей 18S рДНК / Phylogenetic tree of *Chlamydomonas* constructed by the MLE method based on 18S rDNA sequences.

На узлах показана бутстреп поддержка (>50%) / Bootstrap values (>50%) are indicated at the nodes; * — аутентичный штамм / authentic strain.

При этом, в ходе ревизии *Xerochlorella*, Mikhailyuk *et al.* (2020) уточнили описание данного рода, однако не в полном соответствии с Кодексом номенклатуры процитировали типовой вид. Авторы в качестве типа привели *X. minuta*, однако, как указано Guiry, Guiry (2024): “Mikhailyuk *et al.* (2020: 683) incorrectly list *Xerochlorella minuta* (J. B. Petersen) Mikhailyuk *et P. M. Tsarenko* as the type species of *Xerochlorella*. The type is always the type of the original name which is *Xerochlorella olmiae* Fucíková, P. O. Lewis *et L. A. Lewis*, the correct name for which is currently *Xerochlorella minuta*. - (31 July 2020) - M. D. Guiry¹.” На данный момент к роду *Xerochlorella* относят 2 вида: *X. minuta* (= *X. olmiae*), а также вид *X. dichotoma* (H. P. Ling *et R. D. Seppelt*) Mikhailyuk *et P. M. Tsarenko*.

По морфологии вид *Xerochlorella minuta* сходен с *Chlorella chlorelloides* (Naumann) C. Bock *et al.* (= *Dictyosphaerium chlorelloides* (Naumann) Komárek *et Perman*). Отличаются тем, что у *C. chlorelloides* пиреноид окружен 2(4) крахмальными зёрнами, и клетки в колонии соединены тонкими слизистыми тяжами, возникшими из остатков материнской оболочки. *X. minuta* имеет пиреноид с 5–6 крахмальными зёрнами, а разрывающиеся стенки спорангиев не превращаются в слизистые тяжи, а сохраняют исходную полулунную или крестообразную форму (Fig. 2).

На основе морфологических признаков, а также молекулярно-генетических данных, штамм SYKOA Ch-200-17 отнесен к *Xerochlorella minuta*. Сравнение

¹ «Mikhailyuk *et al.* (2020: 683) некорректно указывают *Xerochlorella minuta* (J. B. Petersen) Mikhailyuk *et P. M. Tsarenko* как типовой вид *Xerochlorella*. Типом всегда является тип оригинального имени таксона, которым является *Xerochlorella olmiae* Fucíková, P. O. Lewis *et L. A. Lewis*, корректное название которого в настоящее время *Xerochlorella minuta*. - (31 июля 2020 г.) - M. D. Guiry».

последовательности ITS2 изученного штамма с аналогичными последовательностями других штаммов из GenBank показало, что SYKOA Ch-200-17 с высокой поддержкой (97%) попадает в одну кладу с таксонами, которые ранее были объединены Mikhailyuk *et al.* (2020) в один вид *X. minuta* (Fig. 5). Исследованный штамм, в отличие от диагностических характеристик *X. minuta*, формирует 2–4-клеточные колонии (в литературе 2–4–8–16-клеточные) со слабой, едва заметной тонкой слизистой оболочкой (по данным литературы она может достигать толщины 2.1–5.0 мкм) (Ettl, Gärtner, 2014; Mikhailyuk *et al.*, 2020). Размерные характеристики соответствуют диагностическим признакам: от 3–6 до 5–7 мкм в диам. (по данным Mikhailyuk *et al.* (2020): (2.5)4.3–6(7.0)–(4.3)5–6.7(7.5)9 мкм в диам.).

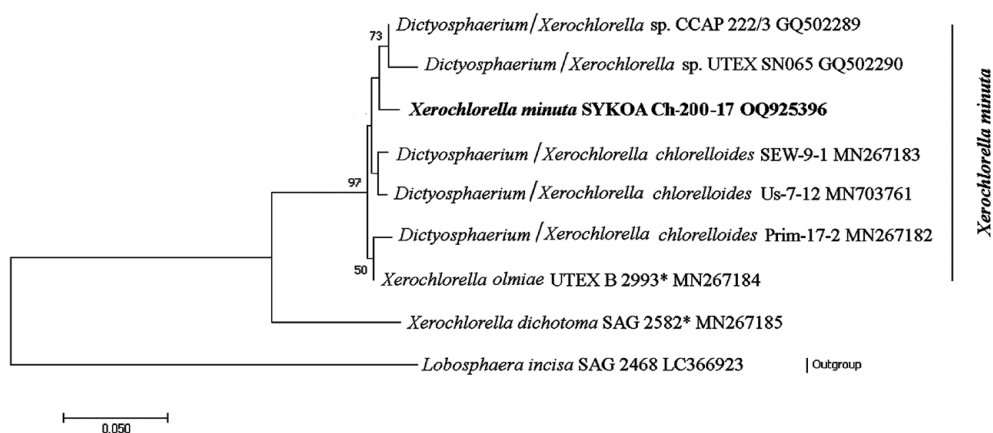


Fig. 5. Филогенетическое дерево *Xerochlorella*, построенное методом MLE на основе последовательностей ITS2 рДНК / Phylogenetic tree of *Xerochlorella* constructed by the MLE method based on ITS2 rDNA sequences.

На узлах показана бутстреп поддержка ($\geq 50\%$) / Bootstrap values ($\geq 50\%$) are indicated at the nodes; * – аутентичный штамм / authentic strain.

На данном этапе оценить реальное распространение *Xerochlorella minuta* достаточно сложно, так как ранее водоросли с подобными морфологическими признаками относили к виду *Dictyosphaerium chlorelloides*. Ettl, Gartner (2014) описывали его как широко распространенный в Европе (вид отмечен в Дании, Великобритании, Исландии, России), Азии и Антарктиде. В дальнейшем анализ последовательностей гена 18S рРНК и региона ITS у штаммов, идентифицированных как вид *D. chlorelloides*, показал, что этот морфотип является полифилетичным и формирует две независимые линии в кладах *Chlorella* и *Xerochlorella* (Krienitz *et al.*, 2010; Mikhailyuk *et al.*, 2020). Mikhailyuk *et al.* (2020) считают, что большинство обнаруженных ранее находок данного вида из почв относятся к *X. minuta*, а из водных местообитаний – к *C. chlorelloides*. Согласно Guiry, Guiry (2024), вид *X. minuta* отмечен в Дании, Словакии и Аргентине.

По нашим наблюдениям вид *Xerochlorella minuta* достаточно часто встречался в пробах окрашенного снега, отобранных из разных северных районов Урала и Западного Саяна. В коллекции SYKOA содержится два штамма, изолированных с поверхности снега. Ранее этот вид также был обнаружен в почвенных пробах Северного Урала — окрестности г. Пеленер (Novakovskaya, Patova, 2018) и Воркутинской тундры, окрестности пос. Советский, мохово-ерниковое сообщество (Andreyeva, 2004). Обнаружение водоросли *X. minuta* в пробах, отобранных со снежной поверхности, сочетающей условия водной и наземной сред, позволило расширить представление об экологии и распространении данного вида.

В результате проведенных исследований получены новые данные по морфологии изученных видов, что позволило уточнить их описание. Молекулярно-генетический анализ подтвердил систематическую принадлежность исследованных штаммов и их филогенетические связи. Расширены представления об экологии *Chlamydomonas proteus* и *Xerochlorella minuta*: эти виды впервые отмечены в криофильных условиях. Неоднократное обнаружение клеток *C. proteus* и *X. minuta* в местах «цветения» снега может свидетельствовать о высокой адаптационной возможности этих видов к экстремальным условиям. На основе полученных результатов эти водоросли можно отнести к психротолерантным видам (необлигатные криофилы), которые способны к вегетации при широком диапазоне температур ($T_{\min} > 0^{\circ}\text{C}$ и $T_{\text{opt.}} > 15^{\circ}\text{C}$).

Исследованные штаммы могут стать удобными объектами изучения механизмов устойчивости автотрофных микроорганизмов к длительному воздействию низких температур и высокой солнечной радиации.

Благодарности

Работа выполнена в рамках Госзадания №122040600026-9. Авторы признательны к.б.н., доценту МГУ имени М. В. Ломоносова М. А. Гололобовой за обсуждение рукописи, полезные советы и редакторские правки, а также анонимным рецензентам за высказанные замечания и ценные предложения.

References / Литература

- Andreyeva V. M. 1998. *Pochvennyye i aerofil'nye zelenyye vodorosli (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales)* [Terrestrial and aerophilic green algae (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales)]. St. Petersburg: 352 p. [Андреева В. М. 1998. *Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales)*. СПб.: 352 с.].
- Andreyeva V. M. 2004. Terrestrial nonmotile green algae (Chlorophyta) of Vorkuta tundra (Komi republic). *Novosti sistematiki nizshikh rastenii* 37: 3–8. [Андреева В. М. 2004. Почвенные неподвижные зеленые водоросли (Chlorophyta) Воркутинской тундры (Республика Коми). *Новости систематики низших растений* 37: 3–8].
- Barinova S. S., Belous E. P., Tsarenko P. M. 2019. *Al'goindikatsiya vodnykh ob'ektov Ukrainy: metody i perspektivy* [Algoindication of water bodies in Ukraine: methods and perspectives]. Haifa, Kiev: 367 p. [Барина С. С., Белоус Е. П., Царенко П. М. *Альгоиндикация водных объектов Украины: методы и перспективы*. Хайфа, Киев: 367 с.].
- Barinova S. S., Medvedeva L. A., Anissimova O. V. 2006. *Bioraznoobrazie vodoroslei-indikatorov okruzhayushchei sredy* [Diversity of algae indicators in environmental assessment]. Tel Aviv:

- 498 p. [Баринаова С. С., Медведева Л. А., Анисимова О. В. 2006. Биоразнообразии водорослей-индикаторов окружающей среды. Тель-Авив: 498 с.].
- Bischoff H. W., Bold H. C. 1963. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Phycological studies*. IV. Austoin: 95 p.
- BLAST, NCBI. 2024. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Data of access: 12 II 2024).
- Demchenko E. N., Mikhailyuk T. I. 2012. Peculiarities of sexual reproduction of some new for the flora of Ukraine and rare species of Volvocales (Chlorophyta). *Algologia* 22(1): 13–29. [Демченко Э. Н., Михайлюк Т. И. 2012. Особенности полового процесса у некоторых новых для флоры Украины и редких видов Volvocales (Chlorophyta). *Альгология* 22(1): 13–29].
- Egorova I. N., Sudakova E. A., Maksimova E. N., Tupikova G. S. 2020. Terrestrial algae of the mountains of South Siberia and North Mongolia. *Botanicheskii zhurnal* 105(2): 107–132. [Егорова И. Н., Судакова Е. А., Максимова Е. Н., Тупикова Г. С. 2020. Наземные водоросли гор Южной Сибири и Северной Монголии. *Ботанический журнал* 105(2): 107–132]. <https://doi.org/10.31857/S0006813620020027>
- Ettl H. 1983. *Chlorophyta I (Phytomonadina). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Bd 9*. Jena: 807 p.
- Ettl H., Gärtner G. 2014. *Syllabus der Boden-, Luft-und Flechtenalgen. 2 Aufl.* Berlin, Heidelberg: 773 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39462-1>
- Gromov B. V., Mamkaeva K. A., Titova N. N., Voinova G. N. 1977. *Chlamydomonas proteus* Pring. from the acid springs of the Kamchatka Peninsula. *Botanicheskii zhurnal* 62(7): 1049–1053. [Громов Б. В., Мамкаева К. А., Титова Н. Н., Войнова Г. Н. 1977. *Chlamydomonas proteus* Pring. из кислых источников полуострова Камчатка. *Ботанический журнал* 62(7): 1049–1053].
- Guiry M. D., Guiry G. M. 2024. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org> (Date of access: 13 III 2024).
- Fučíková K., Lewis P. O., Lewis L. A. 2014. Widespread desert affiliation of trebouxiophycean algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) including discovery of three new desert genera. *Phycological Research* 62(4): 294–305. <https://doi.org/10.1111/pre.12062>
- Hoham R. W., Remias D. 2020. Snow and glacial algae: a review. *Journal of Phycology* 56(2): 264–282. <https://doi.org/10.1111/jpy.12952>
- Kol E. 1968. Kryobiologie. Biologie und limnologie des schnees und eises. I. Kryovegetation. *Die Binnengewässer*. Vol. 24. Stuttgart: 216 p.
- Komárek J., Nedbalová L. 2007. Green cryosestic algae. *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Heidelberg: 321–342. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6112-7_17
- Kostikov I. Yu., Romanenko P. O., Demchenko E. M., Darienko T. M., Mykhailiuk T. I., Rybchinskyi O. V., Solonenko A. M. 2001. Algae of the soils of Ukraine (history and methods of research, system, synopsis of the flora). Kiev: 300 p. [Костиков И. Ю., Романенко П. О., Демченко Е. М., Дарієнко Т. М., Михайлюк Т. І., Рибчинський О. В., Солоненко А. М. 2001. *Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, конспект флори)*. Київ: 300 с.].
- Krienitz L., Bock C., Luo W., Pröschold T. 2010. Polyphyletic origin of the *Dictyosphaerium* morphotype within Chlorellaceae (Trebouxiophyceae). *Journal of Phycology* 46(3): 559–63. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00813.x>
- Leya T. 2022. The CCCryo Culture Collection of Cryophilic Algae as a valuable bioresource for algal biodiversity and for novel, industrially marketable metabolites. *Applied Phycology* 3(1): 167–188. <https://doi.org/10.1080/26388081.2020.1753572>
- Leya T., Rahn A., Lätz C., Remias D. 2009. Response of arctic snow and permafrost algae to high light and nitrogen stress by changes in pigment composition and applied aspects for biotechnology. *FEMS Microbiology Ecology* 67(3): 432–443. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00641.x>
- Matsuzaki R., Kawat-Toyooka H., Hara Y., Nozaki H. 2015. Revisiting the taxonomic significance of aplanozygote morphologies of two cosmopolitan snow species of the genus *Chloromonas* (Volvocales, Chlorophyceae). *Phycologia* 54(5): 491–502. <https://doi.org/10.2216/15-33.1>

- Matsuzaki R., Nozaki H., Kawachi M. 2018. Taxonomic revision of *Chloromonas nivalis* (Volvocales, Chlorophyceae) strains, with the new description of two snow-inhabiting *Chloromonas* species. *PLoS ONE* 13(3): e0193603. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193603>
- MEGA X. 2023. <http://www.megasoftware.net> (Data of access: 1 IV 2023).
- Mikhailyuk T., Glaser K., Tsarenko P., Demchenko E., Karsten U. 2019. Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria. *European Journal of Phycology* 54(3): 263–290. <https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1557257>
- Mikhailyuk T., Holzinger A., Tsarenko P., Glaser K., Demchenko E., Karsten U. 2020. *Dictyosphaerium*-like morphotype in terrestrial algae: what is *Xerochlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *European Journal of Phycology* 56(3): 671–686. <https://doi.org/10.1111/jpy.12974>
- Mock T., Thomas D. N. 2008. Microalgae in Polar regions: linking functional genomics and physiology with environmental conditions. *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology*. Heidelberg: 285–312. https://doi.org/10.1007/978-3-540-74335-4_17
- Nakada T., Nozaki H. 2007. Re-evaluation of three *Chlorogonium* (Volvocales, Chlorophyceae) species based on 18S ribosomal RNA gene phylogeny. *European Journal of Phycology* 42(2): 177–182. <https://doi.org/10.1080/09670260601145816>
- Nakada T., Shinkawa H., Ito T., Tomita M. 2010. Recharacterization of *Chlamydomonas reinhardtii* and its relatives with new isolates from Japan. *Journal of Plant Research* 123: 67–78. <https://doi.org/10.1007/s10265-009-0266-0>
- Nakazawa A., Nozaki H. 2004. Phylogenetic analysis of the Tetrasporalean genus *Asterococcus* (Chlorophyceae) based on 18S ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Japanese Botany* 79: 255–261.
- Novakovskaya I. V., Patova E. N. 2018. New and rare algae species (Chlorophyta, Streptophyta) in the soils of Russian European Northeast. *Bulletin of the Institute of Biology FRC Komi SC UB RAS* 2: 8–13. [Новаковская И. В., Патова Е. Н. 2018. Новые и редкие виды водорослей (Chlorophyta, Streptophyta) для почв северо-востока европейской части России. *Вестник Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН* 2: 8–13]. [https://doi.org/10.31140/j.vestnikib.2018.2\(204\).2](https://doi.org/10.31140/j.vestnikib.2018.2(204).2)
- Novakovskaya I. V., Patova E. N., Boldina O. N., Patova A. D., Shadrin D. M. 2018. Molecular phylogenetic analyses, ecology and morphological characteristics of *Chloromonas reticulata* (Goroshankin) Gobi which causes red blooming of snow in the Subpolar Urals. *Cryptogamie, Algologie* 39(2): 199–213. <https://doi.org/10.7872/crya/v39.iss2.2018.199>
- Novakovskaya I. V., Patova E. N., Makeeva E. G. 2022. Snow algae and cyanobacteria in several regions of the Urals and the Western Sayan. *Theoretical and Applied Ecology* 3: 149–156. [Новаковская И. В., Патова Е. Н., Макеева Е. Г. 2022. Снежные водоросли и цианобактерии ряда районов Урала и Западного Саяна. *Теоретическая и прикладная экология* 3: 149–156]. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-3-149-156>
- Novakovskaya I. V., Boldina O. N., Shadrin D. M., Patova E. N. 2023. *Heterochlamydomonas uralensis* sp. nov. (Chlorophyta, Chlamydomonadaceae), new species described from the mountain tundra community in the Subpolar Urals (Russia). *Diversity* 15: 673. <https://doi.org/10.3390/d15050673>
- Patova E. N., Novakovskaya I. V. 2018. Soil algae of the northeast of the European part of Russia. *Novosti sistematiki nizshikh rastenii* 52(2): 311–353. [Патова Е. Н., Новаковская И. В. 2018. Почвенные водоросли северо-востока европейской части России. *Новости систематики низших растений* 52(2): 311–353]. <https://doi.org/10.31111/nsnr/2018.52.2.311>
- Peng Z., Liu G., Huang K. 2021. Cold adaptation mechanisms of a snow alga *Chlamydomonas nivalis* during temperature fluctuations. *Frontiers in Microbiology* 11: 611080. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.611080>
- Pringsheim E. G. 1930. Neue Chlamydomonadaceen, welche in Reinkultur gewonnen wurden. *Archiv für Protistenkunde* 69: 95–102.

- Procházková L., Leya T., Křížková H., Nedbalová L. 2019. *Sanguina nivaloides* and *Sanguina aurantia* gen. et spp. nov. (Chlorophyta): The taxonomy, phylogeny, biogeography and ecology of two newly recognized algae causing red and orange snow. *FEMS Microbiology Ecology* 95(6): fiz064. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz064>
- Pröschold T., Darienko T., Krienitz L., Coleman A. W. 2018. *Chlamydomonas schloesseri* sp. nov. (Chlamydomophyceae, Chlorophyta) revealed by morphology, autolysin cross experiments, and multiple gene analyses. *Phytotaxa* 362(1): 21–38. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.362.1.2>
- PUFACChain Consortium. 2017. The value chain from microalgae to PUFA, project acronym: PUFACChain, grant no. 613303. FP7 Programme. European Commission, Brussels. <https://cordis.europa.eu/project/rcn/110872>
- Remias D., Schwaiger S., Aigner S., Leya T., Stuppner H., Lütz C. 2012. Characterization of an UV- and VIS-absorbing, purpurogallin-derived secondary pigment new to algae and highly abundant in *Mesotaenium berggrenii* (Zygnematophyceae, Chlorophyta), an extremophyte living on glaciers. *FEMS Microbiology Ecology* 79(3): 638–648. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01245.x>
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M., Stanier R. Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111(1): 1–61.
- Shtina E. A. 1997. *Flora vodoroslei basseina reki Vyatki* [Flora of algae of the Vyatka River basin]. Kirov: 96 p. [Штина Э. А. 1997. *Флора водорослей бассейна реки Вятки*. Киров: 96 с.]
- Shtina E. A., Kabirov R. R., Khaibullina L. S., Gaisina L. A., Fazlutdinova A. I., Sugachkova E. V. 1998. *Spisok vodoroslei, obnaruzhennykh v pochvakh na territorii byvshego SSSR* [List of algae found in soils on the territory of the former USSR]. Ufa: 33 p. Deposit in VINITI 18 XII 98, No 3759–B98. [Штина Э. А., Кабилов Р. Р., Хайбуллина Л. С., Фазлутдинова А. И., Сугачкова Е. В. 1998. *Список водорослей, обнаруженных в почвах на территории бывшего СССР*. Уфа: 33 с. Деп. в ВИНТИ 18 XII 1998, No 3759–B98].
- Vimercati L., Solon A. J., Krinsky A., Arán P., Porazinska D. L., Darcy J. L., Dorador C., Schmidt S. K. 2019. Nieves penitentes are a new habitat for snow algae in one of the most extreme high-elevation environments on Earth. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 51: 190–200. <https://doi.org/10.1080/15230430.2019.1618115>
- White T. J., Bruns T. D., Lee S. B., Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *M. A. Innis's PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: 315–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>