

БИОЛОГИЯ, МОРФОЛОГИЯ И СИСТЕМАТИКА ГИДРОБИОНТОВ

УДК 582.276

ДВА НОВЫХ ВИДА РОДА *Cryptomonas* (Cryptophyta: Cryptophyceae) ИЗ НАЦИОНАЛЬНОГО ПАРКА КАТТЬЕН (ВЬЕТНАМ)

© 2024 г. Н. А. Мартыненко^{a, b, *}, Е. С. Гусев^{a, b}, Фан Чонг Хуан^b

^aИнститут проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

^bПриморское отделение Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра, Нячанг, Вьетнам

* e-mail: nikita-martynenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.11.2023 г.

После доработки 12.12.2023 г.

Принята к публикации 13.12.2023 г.

Описано два новых вида рода *Cryptomonas* из Национального парка Каттьен (Вьетнам) – *Cryptomonas pascheri* и *C. playfairii*, на основании морфологических характеристик и молекулярно-генетического анализа регионов 18S, 28S, ITS2 рДНК и *psbA* хпДНК, а также концепции компенсаторных замен оснований (CBCs). Оба вида входят в одну кладу с *C. lundii*. *C. pascheri* морфологически схож с другими видами клады, а *C. playfairii* имеет существенные морфологические различия. У каждого из описанных видов выявлены молекулярно-генетические отличия от родственных видов в кладе *C. lundii*.

Ключевые слова: криптофитовые водоросли, клада *Cryptomonas lundii*, *Cryptomonas pascheri* sp. nov., *Cryptomonas playfairii* sp. nov., биоразнообразие, тропический регион, Вьетнам

DOI: 10.31857/S0320965224060033, **EDN:** WYWKUQ

ВВЕДЕНИЕ

Представители рода *Cryptomonas* Ehrenberg emend. Hoef-Emden & Melkonian (Cryptomonadales, Cryptophyceae) широко распространены и встречаются в различных местах обитания, как в пресных водоемах, так и в снегах и почвах (Javornický, Hindák, 1970; Hoef-Emden, Archibald, 2017; Martynenko et al., 2022a). В этот род входят сравнительно небольшие (5–50 мкм) одноклеточные организмы с двумя жгутиками, дорсовентральным строением и отличающиеся от других криптонад развитостью комплекса борозда-глотка, выстланного эжектосомами, а также наличием пигмента фикоэритрина 566 у фотосинтезирующих видов (Hill, Rowan, 1989; Clay et al., 1999) или лейкопластами у бесцветных видов (бывший род “*Chilomonas*”). Фотосинтезирующие криптофитовые водоросли имеют пластиды, появившиеся в результате вторичного эндосимбиоза. Предполагается, что их предок “поглотил” клетку красной водоросли и сохранил ее, тем самым придав себе и следующим поколениям фотосинтетическую способность. Результат этого эндосимбиоза – наличие четырех ДНК-содержащих органелл: ядра клетки-хозяина криптофитовой водоросли, ее митохондрий, хлоропласта

красной водоросли и ее остаточного ядра, называемого нуклеоморфом (Douglas et al., 1991). Все фотосинтезирующие виды рода *Cryptomonas* содержат хлоропласты, в то время как некоторые гетеротрофные виды утратили ключевые гены хлоропластного генома и способность к фотосинтезу (Tanifuji et al., 2020). Показано (George et al., 2023), что клетка *Cryptomonas* представляет собой эндосимбиотический конгломерат, содержащий как минимум семь геномов: четыре от различных органелл, два генома симбиотических бактерий и геном фага, живущего в одной из бактерий. Уникальная организация генома клетки сделала криптонад модельной группой для изучения эволюции органелл и их метаболических и геномных взаимодействий.

Традиционно в систематике криптонад использовали морфологические признаки – форма и размеры клетки, форма хлоропласта, количество пиреноидов, форма и строение борозды и глотки (Киселев, 1954; Матвиенко, Литвиненко, 1977). С появлением методов сканирующей электронной микроскопии изучение ультраструктуры перипласта криптонад позволило выявить новые отличительные признаки и провести первые ревизии отдельных родов (Hill, Wetherbee,

1989; Hill, 1991a, 1991b). Однако последующая ревизия, проведенная 20 лет назад (Hoef-Emden, Melkonian, 2003) с помощью комплексного подхода, то есть параллельного изучения морфологических характеристик культур водорослей (световая и электронная микроскопия) и анализа нуклеотидного состава регионов рДНК этих же штаммов, выявила молекулярно-генетическое сходство родов *Cryptomonas* Ehrenberg, *Chilomonas* Ehrenberg, *Pseudocryptomonas* Vicudo & Tell и *Campylomonas* Hill. Последние три рода стали синонимами рода *Cryptomonas* Ehrenberg emend. Hoef-Emden & Melkonian (Hoef-Emden, Melkonian, 2003). В ходе этих исследований выявлен диморфизм рода *Cryptomonas*, заключающийся в том, что на разных стадиях жизненного цикла клетки одного вида различаются по размерам, форме, строению перипласта (“криптоморфа” с полигональными пластинками и “кампиломорфа” с цельным чехлом), форме борозды и другим признакам. С помощью полифазного подхода изучено разнообразие этого рода в Европе (Hoef-Emden, Melkonian, 2003; Hoef-Emden, 2007), Южной Кореи (Choi et al., 2013), России (Martynenko et al., 2020a, 2022b; Gusev et al., 2022; Кулизин и др., 2022). Почти в каждой из вышеперечисленных работ происходило обогащение выборки новыми штаммами и, как следствие, увеличивалось разнообразие группы для региона. К настоящему времени в мире насчитывают 72 таксономически принятых вида рода *Cryptomonas* (Guiry, Guiry, 2023), из них только 30 либо описаны, либо типифицированы, опираясь на молекулярно-генетические данные, обязательные для идентификации данной группы организмов (Hoef-Emden, Melkonian, 2003; Hoef-Emden, 2007; Gusev et al., 2022), т. е. можно констатировать, что ревизии с использованием современных методов подверглись <50% из описанных на основе морфологии таксонов.

Несомненно, изучение новых территорий должно расширить наши представления о разнообразии и биогеографии рода. Тропический регион в этом плане может принести много новых открытий, поскольку здесь сосредоточено несколько центров биоразнообразия. Территория Вьетнама включена в центр биоразнообразия Индо-Бирмы, характеризующийся исключительным видовым богатством различных групп организмов (Mittermeier et al., 2011). Например, детальное изучение синуровых водорослей (Synurales, Chrysophyceae) Вьетнама показало исключительное разнообразие этих организмов по сравнению с другими тропическими регионами (Gusev et al., 2023). В целом данные по тропической флоре криптонад еще достаточно скудны. Известны четыре вида рода *Cryptomonas* из субтропического региона Австралии, описанные на основе изучения морфологического строения (Playfair, 1921).

В настоящее время из тропического региона уже также описаны четыре новых вида криптофитовых водорослей на основе молекулярно-генетических методов: три из Вьетнама (Gusev et al., 2020; Martynenko et al., 2020b, 2022a) и один из Индии (Gusev et al., 2021).

Цель данной работы – описать два новых вида рода *Cryptomonas* с помощью молекулярно-генетического и морфологического подходов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Регион исследования. Сбор проб проведен в рамках экспедиции по теме “Эколан 3.2” (задача 3) Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра в феврале 2020 г. Культуры криптофитовых водорослей (всего три штамма), использованные в данной работе, были получены из водных объектов Национального парка Каттхен: рукав р. Донгнай, протекающий в пределах охраняемой территории (11°27'2" с.ш., 107°26'34"), и оз. Бау Сау в центральной части парка (11°27'34" с.ш., 107°20'41" в.д.) (рис. 1). Описание водных объектов приведено в работе (Gusev et al., 2017). Пробы планктона отбирали с помощью планктонной сети с размером ячеи 20 мкм, пробы перифитона – с субстрата с помощью пробирки объемом 15 мл. Территория Национального парка Каттхен находится в зоне тропического муссонного климата с четко выраженной сезонностью и годовым поступлением осадков 2 450 мм (Blanc et al., 2000; Хохлова и др., 2017). Пик влажного сезона наблюдается в августе–сентябре, когда выпадает до 400–450 мм осадков в месяц, что часто приводит к затоплению значительной части территории парка, с декабря по март осадков обычно не наблюдается (Дещеревская и др., 2013). Относительная влажность воздуха в течение года ~70% при среднегодовой температуре ~26°C.

Выделение в культуру и изучение морфологии клеток. Клетки изолировали с помощью микропипетки и культивировали на среде WC (Andersen, 2005) при температуре 22°C и световом периоде 12:12. Для исследований под световым микроскопом живые клетки обездвигивали путем погружения в агарозу с низкой температурой гелеобразования (Hoef-Emden, Melkonian, 2003) и изучали с помощью дифференциального интерференционного контраста (ДИК) с масляным иммерсионным объективом ×100 с помощью микроскопа Nexcore NE920. Исследовали форму и размеры клеток, расположение борозды и глотки, хлоропласты, наличие и расположение пиреноидов. Для описания применяли номенклатуру из работы (Hoef-Emden, Melkonian, 2003). Световые микрофотографии получали с помощью камеры BUC5F-830CC.

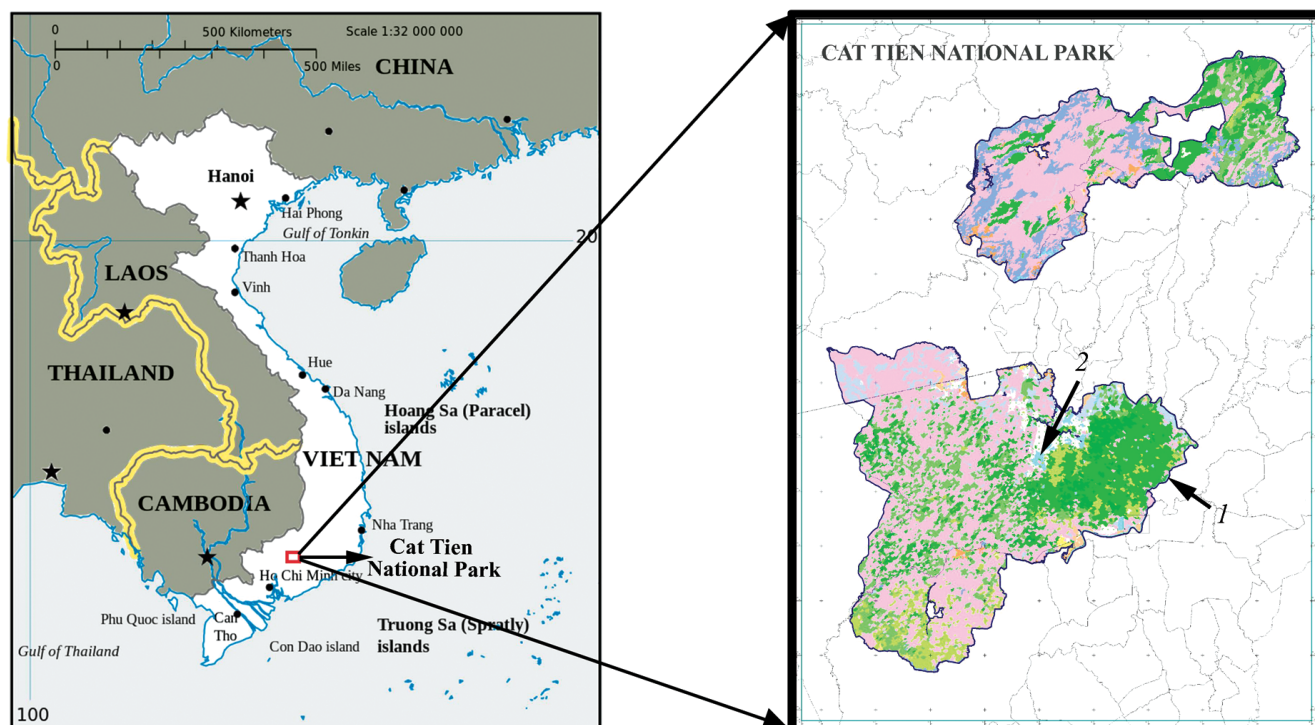


Рис. 1. Карта-схема района исследований (национальный парк Каттъян, Вьетнам). Стрелками обозначены места отбора проб: 1 – рукав р. Донгнай, 2 – оз. Бай Сау.

Выделение и амплификация ДНК. ДНК выделяли из моноклональных штаммов с помощью раствора для выделения ДНК InstaGene фирмы BioRad (USA), согласно методике производителя. Амплификацию фрагментов рибосомальных регионов (18S, 28S и ITS2 рДНК), а также хлоропластного гена *psbA* проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Реакционную смесь для проведения ПЦР подготавливали с помощью готовой смеси реактивов ScreenMix (“Евроген”, Россия). Для амплификации фрагмента ядерного гена малой рибосомальной субъединицы рДНК (18S, 1573 пн) использовали следующие праймеры: 18S_CrN1F, 18S_826F, 18S_956R, 18S_BRK. Фрагмент гена большой субъединицы рДНК (28S, 959 пн) амплифицировали с помощью праймеров crLSU_29F и crLSU_942R, рибосомальный межгенный спейсер ITS2 (348–429 пн) – с помощью crITS_03F и crITS_05R (Choi et al., 2013). Амплификацию регионов рибосомального кластера проводили при следующих условиях: начальная денатурация – 5 мин при 95°C, далее 35 циклов денатурации при 94°C (30 с), отжига праймеров при 52°C (30 с), элонгации при 72°C (50–80 с) и финальной элонгации при 72°C (10 мин). Фрагмент хлоропластного гена *psbA* амплифицировали с помощью праймеров psbAF и psbAR (Choi et al., 2013) при аналогичных условиях ПЦР, за исключением температуры отжига праймеров (50°C). Контроль результатов ПЦР осуществляли путем горизонтального электрофореза продуктов

ПЦР в 1.5%-ном агарозном геле в 1.5 × TAE буфере (Tris-acetate-EDTA), окрашивания SYBR Safe (“Bio-Rad”, USA) и фотографирования в проходящем ультрафиолетовом свете в системе геле-документации GelDoc XR (“Bio-Rad”, USA). Очистку фрагментов ДНК подготавливали с помощью ExoSAP-ITkit (Affymetrix, SantaClara, CA, USA) согласно протоколу производителя. Для реакции секвенирования применяли набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, USA), в качестве праймеров использовали сначала прямую, а затем обратную последовательности, указанные для ПЦР. Очистку продуктов реакции секвенирования от непрореагировавших меченых нуклеотидов осуществляли с помощью набора BigDye® XTerminator TM Purification Kit (“Applied Biosystems”, USA). Нуклеотидные последовательности определяли методом Сэнжера с двух сторон нуклеотидной последовательности при помощи прямого и обратного праймеров, указанных для ПЦР с последующим электрофорезом с использованием секвенатора Genetic Analyzer 3500 (“Applied Biosystems”, USA).

Построение деревьев. Полученные последовательности были проверены вручную и собраны в программах BioEdit v. 7.1.3 и MegaX (Kumar et al., 2018). Для выравнивания в массив данных добавляли из базы данных GenBank¹ 66 последо-

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

вательностей рода *Cryptomonas* из различных морфологических групп. Два вида рода *Rhodomonas* G. Karsten (штаммы C5/6 и E12/23), а также *Guillardia theta* D.R.A. Hill & R. Wetherbee и штамм ССМР 644 вида *Hemiselmis andersenii* С.Е. Lane & J.M. Archibald добавляли в массив данных в качестве аутгруппы. Последовательности были выровнены в программе MAFFT v. 7 с использованием модели E-INS-i (Kato, Toh, 2010), сложные для выравнивания регионы исключали из массива данных. Для выявления филогенетических связей среди криптонад было построено филогенетическое дерево, содержащее последовательно все три консервативных гена у 73 штаммов: 18S + 28S рДНК + *psbA* хпДНК. Также построено филогенетическое дерево на основании анализа ядерного межгенного транскрибируемого спейсера 2 (ITS2 рДНК) у 69 штаммов рода *Cryptomonas*. Трудно выравниваемые фрагменты спейсера исключали из анализа. Филогенетический анализ методом максимального правдоподобия (ML) осуществляли в программе MEGA X, используя 1000 бутстреп-реплик, а также с помощью Байесовского подхода (BI) в программе MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). При BI-анализе создавали 5 млн генераций цепей Маркова, отбирая пробы каждые 100 генераций. Первые 25% проб (до выхода значений $-lnL$ на плато) исключались из анализа как “burn-in”.

Подбор модели эволюции для нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA X с использованием двух критериев: информационного критерия Акаике (Akaike information criterion, AIC) (Akaike, 1974) и байесовского информационного критерия (Bayesian information criterion, BIC) (Schwarz, 1978)). Визуализацию и редактирование деревьев проводили в программах FigTree v. 1.4.2 и Adobe Photoshop CC v. 19.0.

Построение вторичных структур рРНК. Для аннотации последовательностей ITS2 использовали онлайн-сервер ITS2-Annotation tool.² Вторичные структуры региона ITS2 рРНК моделировали в программе mfold v. 2.5 (Zuker, 2003). При их построении учитывали обще-эукариотические особенности, такие как наличие неспаренных пиримидиновых оснований в седьмой позиции второй шпильки (Caisová et al., 2013), а также число нуклеотидов между шпильками и их границы (Schultz et al., 2005). В качестве шаблона использовали структуру ITS2 рРНК штамма M1634 *Cryptomonas* sp. (Hoef-Emden, 2007). Полученную структуру визуализировали в программе PseudoViewer3 (Byun, Han, 2006). Для разграничения видов вторичные структуры проверяли на наличие компенсаторных замен (CBCs) согласно подходам

Coleman (2000, 2009) и Müller et al. (2007). Вторичную структуру 28S рРНК также моделировали с помощью программы mfold, в качестве шаблона использовали аналогичную структуру рРНК *Apis mellifera* L. (Gillespie et al., 2006). Обозначение шпилек приведено в работе (Wuyts et al., 2001).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе изучения флоры водоемов тропического леса Каттген выделено в культуру три штамма, представляющих два вида рода *Cryptomonas* (рис. 2). Клетки культур VNG 2079 и VNG 2083 имели одинаковую морфологию и сходные размеры 18–26 мкм длиной, 10–12 мкм шириной, 9–10 мкм толщиной. В отличие от них, клетки штамма VNG 2086 имели размеры 26–32 мкм в длину, 16–21 мкм в ширину, 16–19 мкм в толщину. Клетки штаммов VNG 2079 и VNG 2083 имели до четырех пиреноидов, у клеток штамма VNG 2086 они не обнаружены (рис. 2).

На филогенетическом дереве, построенном на основании анализа совмещенного массива нуклеотидных данных 18S + 28S рДНК + *psbA* хпДНК, полученные штаммы входили в кладу, исходно образованную видом *C. lundii* Hoef-Emden (Hoef-Emden, Melkonian, 2003) и близкородственными таксонами, с высокими значениями апостериорной вероятности и бутстреп-поддержки (BI = 0.97/ML = 93). Данная кладка состоит из штаммов *C. lundii*: M0850, изолированного из Германии, и R 179 из России, а также видов *Cryptomonas kisselevii* Gusev, Kulizin & Martynenko (штаммы NN 3 и NN 21), *C. platyuris* Skuja emend. Gusev, Kulizin & Martynenko (NN 8 и R 244), известных из России, и *C. vietnamica* Gusev et al. (VN 873 и VN 877) из Вьетнама. Внутри этой клады происходит разделение на видовые подклады (рис. 3).

Ветвь штамма VNG 2086 является сестринской к подкладе *C. platyuris* с максимальным значением апостериорной вероятности (BI). Подклада штаммов VNG 2079 и VNG 2083, имеющих одинаковые нуклеотидные последовательности, родственна подкладе *C. vietnamica* с низкой поддержкой BI, но высокой ML поддержкой (0.52/96).

На дереве, построенном на основании анализа последовательностей межгенного транскрибируемого спейсера 2 (ITS2) рДНК, выявленная при анализе консервативных генов топология повторилась, но уже с другими величинами статистических поддержек. Так, общая кладка *C. lundii* имела максимальные поддержки. Ветвь штамма VNG 2086 была родственной *C. platyuris*, но уже с высокими значениями BI и ML (1/98). Подклада штаммов VNG 2079 и VNG 2083 также была родственной подкладе *C. vietnamica*, однако из-за длины ветвей — без статистически значимых поддержек (рис. 4).

² <http://its2-old.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/cgi-bin/index.pl?annotator>

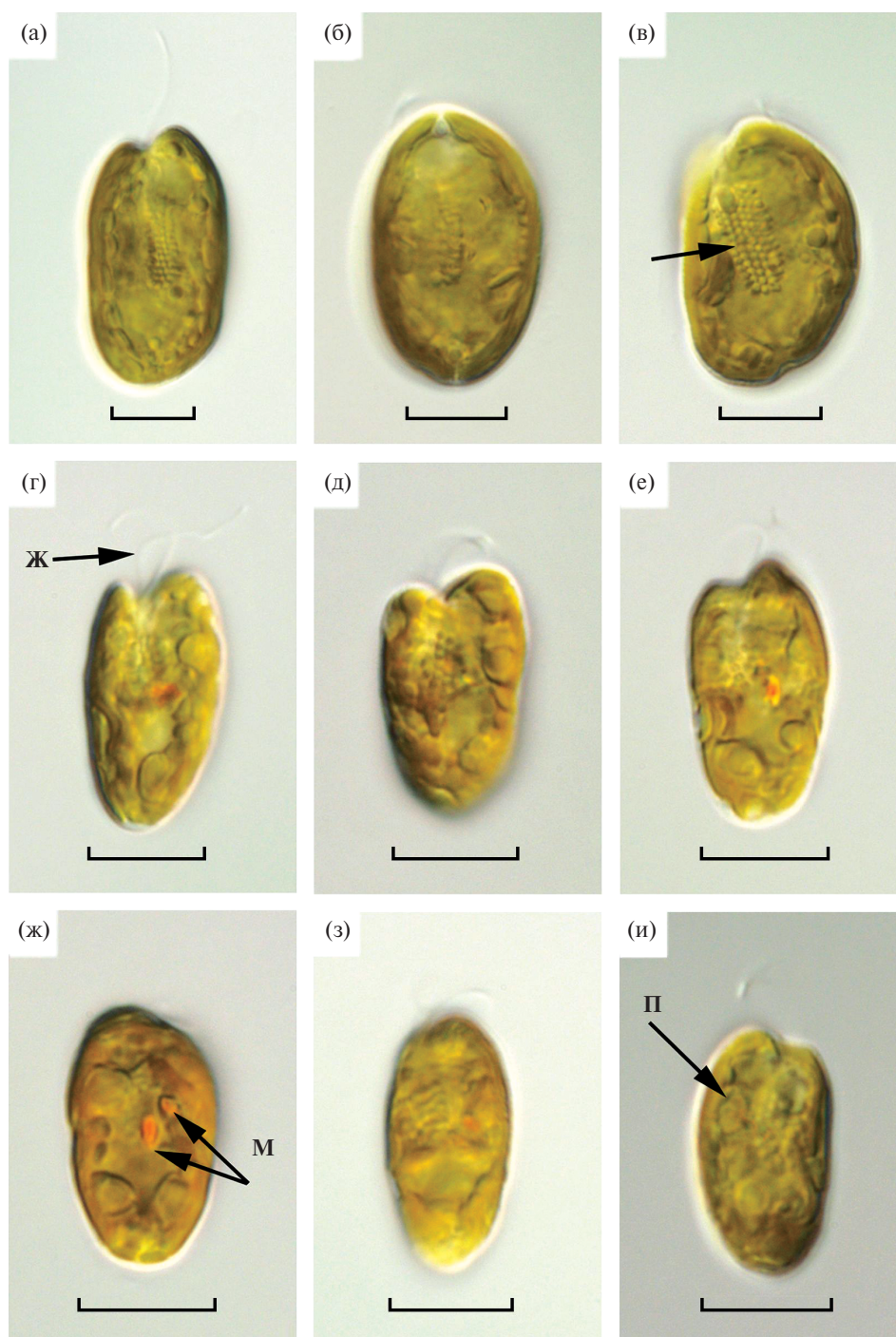


Рис. 2. Новые для науки виды рода *Cryptomonas* из Вьетнама: а–в – *Cryptomonas pascheri* sp. nov. (а – вид с брюшной стороны, б – вид с дорсальной стороны, в – вид сбоку (левая сторона)); г–и – *Cryptomonas playfairii* sp. nov. (г–е – вид с брюшной стороны (е – клетка частично повернута налево), ж – вид с дорсальной стороны, з – вид сбоку (левая сторона), и – вид сбоку (правая сторона)). Стрелками обозначены: г – глотка, выстланная эжектосомами, ж – жгутики, м – тельца Мопла, п – пиреноид. Шкала – 10 мкм.

Ниже приведены морфологические описания новых видов рода *Cryptomonas* и данные об их распространении.

***Cryptomonas pascheri* Martynenko et Gusev sp. nov.** (рис. 2а–2в).

Cells flattened in dorso-ventral plane, more or less symmetrical. In broad view, cells are wide elliptical.

Apex in ventral view with a shallow notch, antapex is rounded. In lateral view, cell with rounded apex and rounded antapex, and has a convex dorsal part. One plastid without visible pyrenoids. The furrow-gullet system extends to one half of the cell and lined with ejectosomes. Cells (absolute minimum and maximum values of strain VNG 2086) 26–32 μm long, 16–21 μm

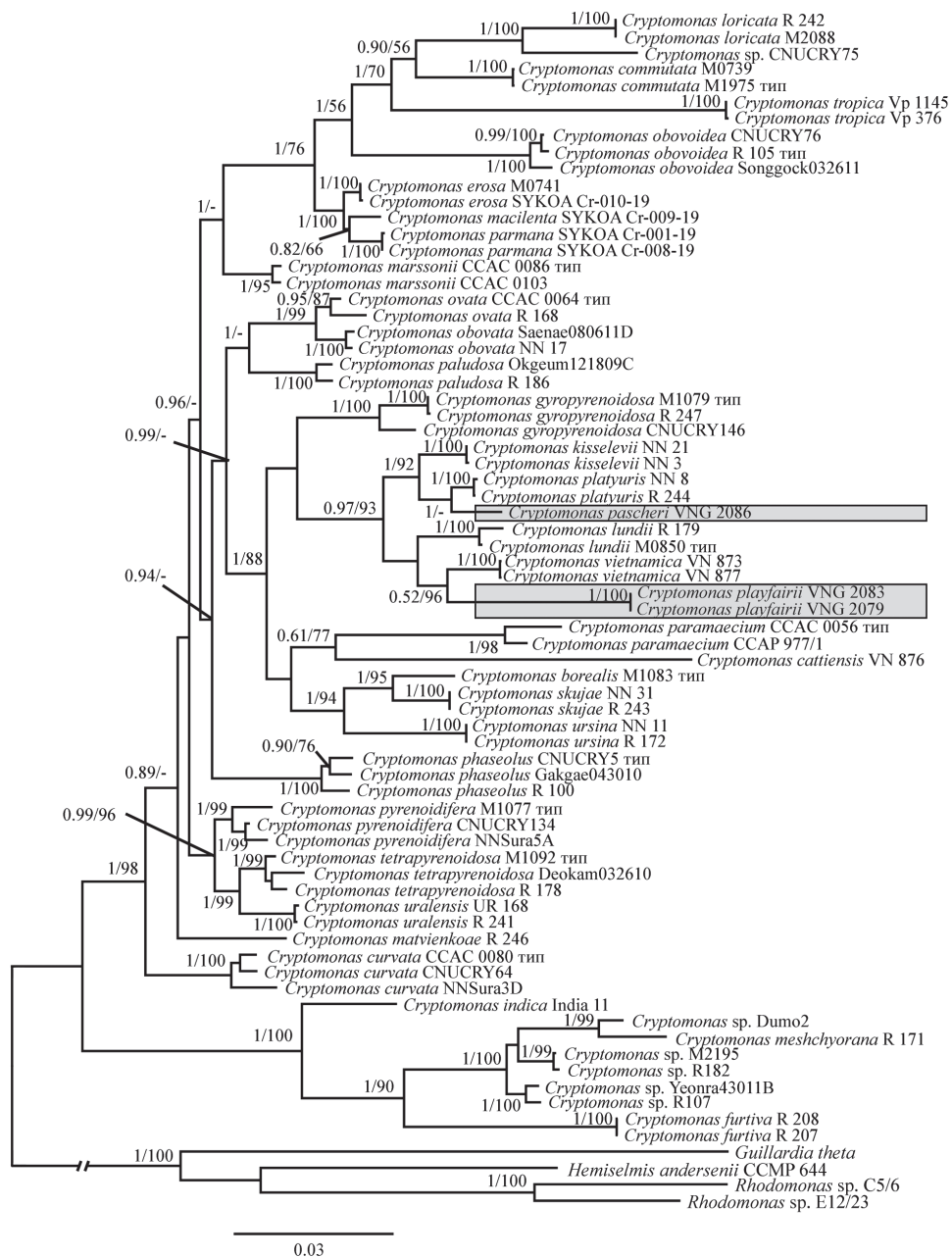


Рис. 3. Дерево, отображающее филогенетические связи 69 представителей рода *Cryptomonas*. Роды *Rhodomonas*, *Hemiselmis* и *Guillardia* выбраны в качестве внешней группы. Новые виды *C. pascheri* и *C. playfairii* выделены прямоугольниками. Дерево построено на основании сравнения нуклеотидных последовательностей консервативных маркеров: фрагментов генов малой и большой рибосомальных субъединиц ядерной ДНК (18S и 28S рДНК) и фрагмента гена *psbA* хлДНК с помощью Байесовского подхода (BI) и методом максимального правдоподобия (ML). В узлах – Байесовская апостериорная вероятность (слева) и величина бутстрепа ML (справа).

wide, 16–19 μm thick. Species differs from others of the genus by nuclear ITS2, LSU and SSU rDNA, and chloroplast *psbA* gene nucleotide sequences. Diagnostic molecular characters are presented below.

CrpaschLSU01_1 stands in the helix C1/e1, including the terminal loop: [GCGCAGCGGGAUC CUAAGGCUGGAGCUUGCUGCAACCGCAU CAUGCCGUUGCGC] [((((((((((.....(((.....)))))).....)))))).....)]),

CrpaschLSU01_2 is in the terminal part of the helix C1/e3, including the apical loop: [AGACAAG GCUCGGAGGGCGGAAGGGUAACACCGACU GGCUCGCGGCGCAUGA] [...(((.....(((.....(((.....)))))).....)))).....)],

CrpaschITS201_1 encompasses the 5'-part of ITS2-molecule's helix III, including IIIa and IIIb conservative regions:

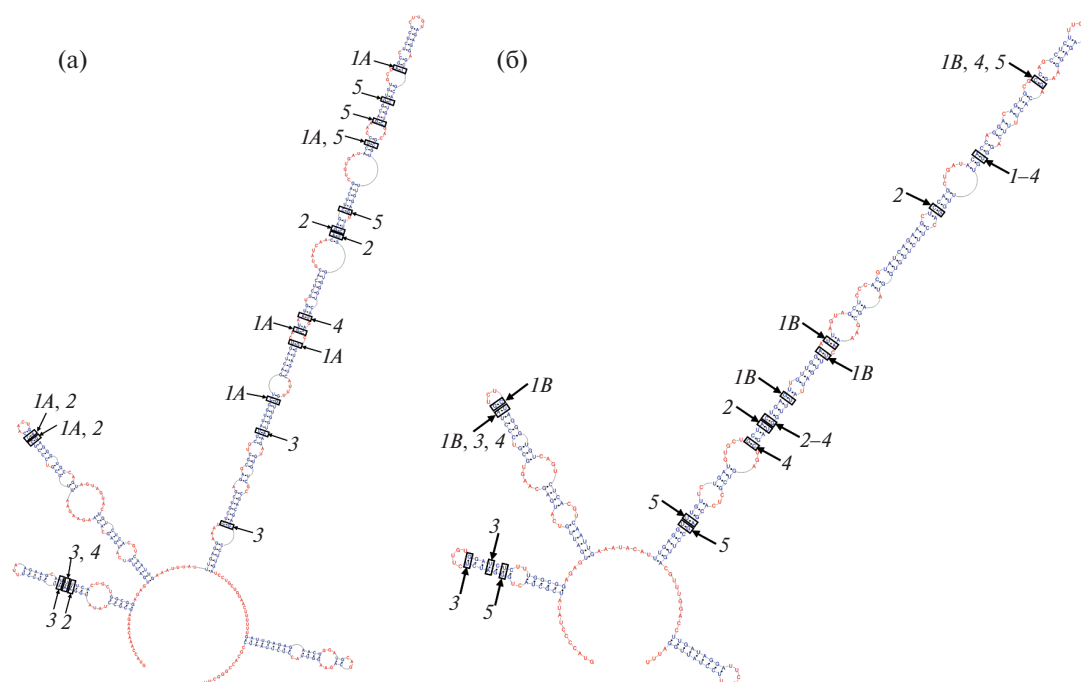


Рис. 5. Модели вторичной структуры ядерного внутреннего транскрибируемого спейсера 2 у исследуемых видов. Черные прямоугольники обозначают позиции компенсаторных замен оснований (CBCs) между *C. pascheri* (a), *C. playfairii* (б) и обозначенными на рисунке видами, где 1A – *C. playfairii* VNG 2079, 1B – *C. pascheri* VNG 2086, 2 – *C. kisselevii* NN 21, 3 – *C. lundii* CCAC 0107, 4 – *C. platyuris* R 244, 5 – *C. vietnamica* VN 873.

штаммами вида *C. lundii*. Вид *C. lundii* описан из пруда в Германии (Hoef-Emden, Melkonian, 2003). За основу морфотипа вида взят рисунок, приведенный J.W.G. Lund (1942), в честь которого впоследствии и был назван вид. Отдельная ветвь, образованная единственным на тот момент штаммом *C. lundii* CCAC 0107 (=CCAP 979/69 = M0850), входила в кладу “LB” (“long branch”) вместе с видами *C. gyropyrenoidosa* Hoef-Emden & Melkonian, *C. borealis* Skuja emend. Hoef-Emden & Melkonian и *Cryptomonas paramaecium* (Ehrenberg) Hoef-Emden & Melkonian (Hoef-Emden, Melkonian, 2003). Клада названа так из-за наличия у ее представителей ускоренных темпов изменения пластидного генома, выявленного в анализах хлоропластных генов (Hoef-Emden, 2005; Hoef-Emden et al., 2005), что приводит к образованию длинных ветвей на филогенетическом дереве. Однако, добавление новых штаммов из различных природных зон дифференцировало эту кладу на комплексы близкородственных видов. Так, из водоемов Вьетнама был описан первый вид, родственник *C. lundii* – *C. vietnamica* (Gusev et al., 2020). Затем из водоемов России описали еще виды из комплекса *C. lundii*: *C. kisselevii* и *C. platyuris* (Gusev et al., 2022). Вид *C. kisselevii* морфологически схож с *C. lundii*, хотя имеет более округлые клетки. В то же время *C. platyuris*, известный из России и Европы, морфологически почти не отличим от *C. vietnamica* из Вьетнама и основной

характеристикой, разграничивающей эти виды, остаются молекулярно-генетические признаки.

Морфологически *C. pascheri* похож на *C. kisselevii*, но в каждом из филогенетических анализов входит в отдельную подкладу, образованную совместно с *C. platyuris*. Для разграничения этих видов использовали метод анализа компенсаторных замен оснований (CBCs) во вторичной структуре ITS2 рРНК. Концепцию CBC успешно применяли для разграничения видов рода *Cryptomonas* (например, Hoef-Emden, 2007; Gusev et al., 2022; Martynenko et al., 2022a). По мнению Coleman (2000) и Müller et al. (2007), наличие компенсаторных замен во вторичной структуре ITS2 рРНК можно использовать для разграничения видов. Согласно данной концепции, два организма/штамма, чьи последовательности ITS2 отличаются хотя бы на одну CBC в консервативных областях шпилек Helix II и Helix III, представляют собой два разных биологических вида (Coleman, 2000). По данным (Müller et al., 2007, Wolf et al., 2013) наличие хотя бы одной CBC во всей молекуле ITS2 достаточно для разделения видов. Описанный нами вид *C. pascheri* отличается необычно длинным спейсером ITS2 (427 пн) при вариации длины 338–368 пн у других представителей клады, что выражается в удлинении каждой из шпилек. Также *C. pascheri* имеет пять компенсаторных замен со схожим с ним морфологически *C. kisselevii* и две – с близким филогенетически

видом *C. platyuris*. Различия с другими близкими видами показаны на рис. 5а.

Клетки *C. playfairii*, имеющие меньшие размеры и до четырех пиреноидов, отличаются от других представителей клады *C. lundii*. Из филогенетически близких к кладе *C. lundii* видов пиреноиды присутствуют только у *C. gyropyrenoidosa*, имеющего четыре пиреноида в разной плоскости, и *C. cattiensis* Martynenko, Gusev, Kapustin & Guseva (Martynenko et al., 2020b), клетки которого больше и снабжены только двумя пиреноидами. Морфологически *C. playfairii* сравним с представителями клады PyrX (Hoef-Emden, 2007), имеющими мелкие клетки и отличающиеся между собой только по молекулярно-генетическим признакам. В этой кладе четыре пиреноида присутствуют лишь у *C. indica* Gusev et al. (Gusev et al., 2021). Наличие четырех пиреноидов указано также для *C. tetrapyrenoidosa* Skuja emend. Hoef-Emden & Melkonian и *C. uralensis* Martynenko, Gusev, Kulizin & Guseva (Martynenko et al., 2020a). Возможно, морфотип вида *C. playfairii* представлен так называемой “криптоморфой”, в то время как остальные представители клады представлены “кампиломорфой”, что и обуславливает такие различия. Для точного установления морфологических форм (крипто- и кампиломорф), возможно, соответствующих гаплоидной и диплоидной стадиям (Altenburger et al., 2020), требуется более подробное изучение жизненного цикла и исследования с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, что не было задачей данного исследования.

На филогенетических деревьях, построенных на основании набора данных 18S+28SpДНК+*psbA* хлДНК и отдельно массиве ITS2 рДНК, выявлено отдельное положение подклады *C. playfairii*. Во всех анализах наиболее близким к *C. playfairii* видом был *C. vietnamica*. Анализ компенсаторных замен во вторичной структуре ITS2 рДНК выявил наличие компенсаторных замен между *C. playfairii* и близкими ему видами. Данный вид отличается от *C. vietnamica* четырьмя заменами пар оснований (рис. 5б).

Несмотря на активное изучение криптофитовых водорослей за последние 20 лет, разнообразие этой группы еще сильно недооценено (Gusev et al., 2022; Hornberger et al., 2023). Новые нуклеотидные последовательности штаммов криптофитовых водорослей и данные метабаркодингового анализа расширяют уже известное разнообразие в кладах и образуют новые клады на филогенетическом древе (Hoef-Emden, Archibald, 2017; Hornberger et al., 2023). Также данные, полученные в результате высокопроизводительного секвенирования природных проб, позволяют изучить биогеографию группы. Например, исследование малого эфемерного водоема площадью 20 м² выявило 16 ASV

(amplicon sequences variants) уже известных видов рода *Cryptomonas* и дополнительно еще 13 клад, не отнесенных ни к одному из описанных видов (Hornberger et al., 2023). Также в работе Hornberger et al. (2023) были выявлены ASV, принадлежащие *Cryptomonas lundii* (ASV 109 и ASV 201). Однако при ближайшем рассмотрении, данные варианты также имеют компенсаторные замены по сравнению с типовым штаммом для *C. lundii* CCAC 0107. Таким образом, вид *C. lundii* был подтвержден молекулярно-генетическими данными только в Германии (Hoef-Emden, Melkonian, 2003) и России (Кулизин и др., 2022). Однако во вторичной структуре ITS2 у штаммов из водоемов России имеются восемь нуклеотидных замен, одна hemi-CBC и одна CBC по сравнению с типовым штаммом. Это свидетельствует, что организмы, отмеченные в России, могут представлять собой криптофитический таксон в составе клады *C. lundii*. Изучение трех штаммов криптофитовых водорослей, изолированных в тропическом регионе, позволило найти и описать два новых вида из клады *C. lundii*, но действительное разнообразие в группе еще предстоит выяснить. Считается, что криптомонады – это космополитные организмы (Hoef-Emden, 2007). При этом, данная группа организмов наиболее изучена в умеренной зоне Северного Полушария (Hoef-Emden, Melkonian, 2003; Hoef-Emden, 2007). В тропическом регионе представители пресноводных криптомонад почти не исследованы. В начале XX в. из субтропического региона Австралии описано четыре вида рода *Cryptomonas*: *C. ampulla* Playfair, *C. maxima* Playfair, *C. gemma* Playfair, *C. oblonga* Playfair (Playfair, 1921). Все эти таксоны требуют ревизии, причем, на основании цвета хлоропластов, последние два из них отнесены к роду *Chroomonas* (Pascher, 1925). Также к настоящему времени из тропического региона уже описаны четыре новых вида криптофитовых водорослей из различных местообитаний на основе молекулярно-генетических методов. Виды *C. vietnamica* и *C. cattiensis* описаны из водоемов Вьетнама (Gusev et al., 2020; Martynenko et al., 2020b), *Cryptomonas tropica* Martynenko, Kezlya & Gusev – из почв тропического леса (Martynenko et al., 2022a). Из горного водохранилища Индии описан *C. indica* (Gusev et al., 2021). Все четыре описанных таксона пока не отмечены за пределами тропического региона. Таким образом, наша находка двух новых для науки видов расширяют данные о разнообразии рода *Cryptomonas* в целом и дополняют данные об уникальности флоры тропического региона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на долгую историю изучения, криптофитовые водоросли до сих пор остаются слабо изученными организмами и в пресных, и

в морских экосистемах. Новые молекулярно-генетические данные позволяют описывать новые для науки таксоны из различных регионов планеты. Активно исследуется биоразнообразие тропического региона, в частности, Вьетнама, где на основании изучения трех новых штаммов описаны два новых вида рода *Cryptomonas* – *C. pascheri* sp. nov. и *C. playfairii* sp. nov. Выявленные виды по данным анализа нескольких генетических регионов относятся к одной кладе, но имеют разные морфологические характеристики. К настоящему времени молекулярно-генетические характеристики являются единственными надежными признаками для разграничения видов рода *Cryptomonas*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы глубоко признательны вьетнамским и российским коллегам, администрации и персоналу Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра за помощь в организации и выполнении экспедиционных работ, Д.А. Капустину за помощь в сборе материала в национальном парке Катъен, П.В. Кулизину за помощь в подготовке изображений криптомонад.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Изучение проб, выделение водорослей в культуру, молекулярно-генетические и морфологические исследования и анализ данных выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20–14–00211). Экспедиция во Вьетнам проведена при финансовой поддержке Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра (Тема Э-3.2, задача 3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Децерева О.А., Авилон В.К., Ба Зуи Динь и др. 2013. Современный климат национального парка Катъен (южный Вьетнам): использование климатических данных для экологических исследований // Геофизические процессы и биосфера. Т. 12. № 2. С. 5.

Киселев И.А. 1954. Пирофитовые водоросли // Определитель пресноводных водорослей СССР. Вып. 6.

Кулизин П.В., Мартыненко Н.А., Гусев Е.С. и др. 2022. Новые для флоры России виды рода *Cryptomonas* (Cryptophyceae) // Биология внутр. вод. № 3. С. 222. <https://doi.org/10.31857/S032096522203010X>

Матвієнко О.М., Литвиненко Р.М. 1977. Пірофітові водорості – Руггофйта // Визначник прісноводних водоростей Української РСР. Т. 3. Ч. 2. Киев: Наук. думка.

Хохлова О.С., Мякина Т.Н., Кузнецов А.Н., Губин С.В. 2017. Морфогенетические особенности почв Национального парка Катъен, Южный Вьетнам // Почвоведение. № 2. С. 176. <https://doi.org/10.7868/S0032180X1612008X>

Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification // IEEE Trans. Autom. Control. V. 19(6). P. 716. <https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>

Altenburger A., Blossom H.E., Garcia-Cuetos L. et al. 2020. Dimorphism in cryptophytes – The case of *Teleaulax amphioxeia/Plagioselmis prolunga* and its ecological implications // Sci. Adv. V. 6(37). eabb1611. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb1611>

Andersen R.A. 2005. Algal Culturing Techniques. Oxford: Elsevier Acad. Press.

Blanc L., Maury-Lechon G., Pascal J.P. 2000. Structure, floristic composition and natural regeneration in the forests of Cat Tien National Park, Vietnam: an analysis of the successional trends // J. Biogeogr. V. 27(2). P. 141. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2000.00347.x>

Byun Y., Han K. 2006. PseudoViewer: web application and web service for visualizing RNA pseudoknots and secondary structures // Nucleic Acids Res. V. 34 (Suppl. 2). P. 416. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl210>

Caisová L., Marin B., Melkonian M. 2013. A consensus secondary structure of ITS2 in the Chlorophyta identified by phylogenetic reconstruction // Protist. V. 164(4). P. 482. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.04.005>

Choi B., Son M., Kim J.I., Shin W. 2013. Taxonomy and phylogeny of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae, Cryptophyta) from Korea // Algae. V. 28(4). P. 307. <https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.4.307>

Clay B.L., Kugrens P., Lee R.E. 1999. A revised classification of the Cryptophyta // Bot. J. Linn. Soc. 131(2). P. 131. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1999.tb01845.x>

Coleman A.W. 2000. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence // Protist. V. 151(1). P. 1. <https://doi.org/10.1078/1434-4610-00002>

Coleman A.W. 2009. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide // Mol. Phylogenet. Evol. V. 50(1). P. 197. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.10.008>

Douglas S.E., Murphy C.A., Spencer D.F., Gray M.W. 1991. Cryptomonad algae are evolutionary chimaeras of two phylogenetically distinct unicellular eukaryotes // Nature. № 350(6314). P. 148. <https://doi.org/10.1038/350148a0>

George E.E., Barcytė D., Lax G. et al. 2023. A single cryptomonad cell harbors a complex community of organelles, bacteria, a phage, and selfish elements // Curr. Biol. V. 33(10). P. 1982. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.04.010>

Gillespie J.J., Johnston J.S., Cannone J.J., Gutell R.R. 2006. Characteristics of the nuclear (18S, 5.8 S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA genes

- of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera): structure, organization, and retrotransposable elements // *Insect Mol. Biol.* V. 15(5). P. 657.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00689.x>
- Guiry M.D., Guiry G.M. 2023. AlgaeBase. World-wide electronic publication. Galway: National University of Ireland.
<https://www.algaebase.org>; дата обращения 27 ноября 2023 г.
- Gusev E.S., Doan N.H., Nguyen N.L. 2017. Silica-scaled chrysophytes from Cat Tien National Park (Dong Nai Province, Vietnam) // *Nova Hedwigia.* V. 105(3). P. 347.
https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2017/0416
- Gusev E., Podunay Y., Martynenko N. et al. 2020. Taxonomic studies of *Cryptomonas lundii* clade (Cryptophyta: Cryptophyceae) with description of a new species from Vietnam // *Fottea, Olomouc.* V. 20(2). P. 137.
<https://doi.org/10.5507/fot.2020.004>
- Gusev E., Karthick B., Martynenko N. et al. 2021. *Cryptomonas indica* sp. nov. (Cryptophyceae: Cryptomonadales), a new species described from the Western Ghats, India // *Phytotaxa.* V. 518. P. 261.
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.518.4.3>
- Gusev E., Martynenko N., Kulizhin P., Kulikovskiy M. 2022. Molecular diversity of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae) in Russia // *Eur. J. Phycol.* V. 57(4). P. 526.
<https://doi.org/10.1080/09670262.2022.2031304>
- Gusev E., Martynenko N., Shkurina N. et al. 2023. An Annotated Checklist of Algae from the Order Synurales (Chrysophyceae) of Viet Nam // *Diversity.* V. 15(2). P. 183.
<https://doi.org/10.3390/d15020183>
- Hill D.R.A. 1991a. *Chroomonas* and other blue-green cryptomonads // *J. Phycol.* V. 27. P. 133.
<https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00133.x>
- Hill D.R.A. 1991b. A revised circumscription of *Cryptomonas* (Cryptophyceae) based on examination of Australian strain // *Phycologia.* V. 30. P. 170.
<https://doi.org/10.2216/i0031-8884-30-2-170.1>
- Hill D.R.A., Rowan K.S. 1989. The biliproteins of the Cryptophyceae // *Phycologia.* V. 28. P. 455.
<https://doi.org/10.2216/i0031-8884-28-4-455.1>
- Hill D.R.A., Wetherbee R. 1989. A reappraisal of the genus *Rhodomonas* (Cryptophyceae) // *Phycologia.* V. 28. P. 143.
<https://doi.org/10.2216/i0031-8884-28-2-143.1>
- Hoef-Emden K., Melkonian M. 2003. Revision of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae): a combination of molecular phylogeny and morphology provides insights into a long-hidden dimorphism // *Protist.* V. 154(3–4). P. 371.
<https://doi.org/10.1078/143446103322454130>
- Hoef-Emden K. 2005. Multiple independent losses of photosynthesis and differing evolutionary rates in the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae): combined phylogenetic analyses of DNA sequences of the nuclear and the nucleomorph ribosomal operons // *J. Mol. Evol.* V. 60. P. 183.
<https://doi.org/10.1007/s00239-004-0089-5>
- Hoef-Emden K., Tran H.D., Melkonian M. 2005. Lineage-specific variations of congruent evolution among DNA sequences from three genomes, and relaxed selective constraints on rbc L in *Cryptomonas* (Cryptophyceae) // *BMC Evol. Biol.* V. 5. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-5-56>
- Hoef-Emden K. 2007. Revision of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae) II: Incongruences between classical morphospecies concept and molecular phylogeny in smaller pyrenoid-less cells // *Phycologia.* V. 46(4). P. 402.
<https://doi.org/10.2216/06-83.1>
- Hoef-Emden K., Archibald J.M. 2017. Cryptophyta (Cryptomonads) // *Handbook of the Protists.* Cham: Springer International Publishing. P. 851.
- Hornberger L.O., Maggard I.J., Matthews R.A., Cahoon A.B. 2023. *Cryptomonas pyrenoidifera* organellar genomes and estimation of its ITS2 sequence diversity using lineage directed barcode primers // *Phycologia.* V. 62(3). P. 280.
<https://doi.org/10.1080/00318884.2023.2202069>
- Javornický P., Hindák F. 1970. *Cryptomonas frigoris* spec. nova (Cryptophyceae), the new cyst-forming flagellate from the snow of the High Tatras // *Biologia.* V. 25(4). P. 241.
- Katoh K., Toh H. 2010. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program // *Bioinformatics.* V. 26(15). P. 1899.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq224>
- Kumar S., Stecher G., Li M. et al. 2018. MEGAX: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* V. 35(6). P. 1547.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lund J.W.G. 1942. Contributions to our knowledge of British algae. VIII // *J. Bot.* V. 80. P. 57.
- Martynenko N.A., Gusev E.S., Kulizhin P.V. et al. 2020a. A new species of *Cryptomonas* (Cryptophyceae) from the Western Urals (Russia) // *Europ. J. Taxon.* V. 649. P. 1.
<https://doi.org/10.5852/ejt.2020.649>
- Martynenko N.A., Gusev E.S., Kapustin D.A. et al. 2020b. *Cryptomonas cattiensis* sp. nov. (Cryptophyceae: Cryptomonadales), a new species described from Vietnam // *Phytotaxa.* V. 454(2). P. 127.
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.454.2.4>
- Martynenko N., Kezlya E., Gusev E. 2022a. Description of a new species of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae: Cryptomonadales), isolated from soils in a tropical forest // *Diversity.* V. 14(11). P. 1001.
<https://doi.org/10.3390/d14111001>
- Martynenko N.A., Gusev E.S., Sterlyagova I.N., Kulikovskiy M.S. 2022b. Revealing hidden diversity in the *Cryptomonas erosa* clade (Cryptophyceae), with the description of two new species from acidic habitats // *Phycologia.* V. 61(2). P. 184.
<https://doi.org/10.1080/00318884.2022.2025727>
- Mittermeier R.A., Turner W.R., Larsen F.W. et al. 2011. Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots // *Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas.* Berlin: Springer. P. 3.

- Müller T., Philippi N., Dandekar T. et al. 2007. Distinguishing species // RNA. V. 13(9). P. 1469.
https://doi.org/10.1261/rna.617107
- Pascher A. 1925. Neue oder wenig bekannte Protisten. XV. Neue oder wenig bekannte Flagellaten. XIII // Archiv für Protistenkunde. V. 50. P. 486.
- Playfair G.I. 1921. Australian freshwater flagellates // Proceedings of the Linnaean Society of New South Wales. V. 46.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. V. 19(12). P. 1572.
https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180
- Schultz J., Maisel S., Gerlach D. et al. 2005. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota // RNA. V. 11(4). P. 361.
https://doi.org/10.1261/rna.7204505
- Schwarz G. 1978. Estimating the dimension of a model // The annals of statistics. V. 6(2). P. 61.
https://doi.org/10.1214/aos/1176344136
- Tanifuji G., Kamikawa R., Moore C.E. et al. 2020. Comparative plastid genomics of *Cryptomonas* species reveals fine-scale genomic responses to loss of photosynthesis // Genome Biol. Evol. V. 12(2). P. 3926.
https://doi.org/10.1093/gbe/evaa001
- Wolf M., Chen S., Song J. et al. 2013. Compensatory base changes in ITS2 secondary structures correlate with the biological species concept despite intragenomic variability in ITS2 sequences – A proof of concept // PloS ONE. V. 8(6). e66726.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066726
- Wuyts J., Van de Peer Y., De Wachter R. 2001. Distribution of substitution rates and location of insertion sites in the tertiary structure of ribosomal RNA // Nucleic Acids Res. V. 29(24). P. 5017.
https://doi.org/10.1093/nar/29.24.5017
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // Nucleic Acids Res. V. 31(13). P. 3406.
https://doi.org/10.1093/nar/gkg595

Two New Species of the Genus *Cryptomonas* (Cryptophyta: Cryptophyceae) from Cat Tien National Park (Vietnam)

N. A. Martynenko^{1,2,*}, E. S. Gusev^{1,2}, Phan Trong Huan²

¹A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²Coastal Branch of the Joint Vietnam-Russia Tropical Science and Technology Research Center, Nha Trang, Vietnam, Nha Trang, Vietnam

*e-mail: nikita-martynenko@yandex.ru

In this paper, we describe two new species of the genus *Cryptomonas* from Cat Tien National Park (Vietnam): *Cryptomonas pascheri* and *Cryptomonas playfairii*, based on morphological characteristics and molecular analysis of the 18S, 28S, ITS2 rDNA and *psbA* cpDNA regions. The concept of compensatory base substitutions (CBCs) was also used for delimiting taxa. Both species are included in the same clade with *C. lundii*. If *C. pascheri* is morphologically similar to other species of the clade, then *C. playfairii* has obvious morphological differences. Each of the described species has clear molecular differences from related species in the *C. lundii* clade.

Keywords: cryptophytes, *Cryptomonas lundii* clade, *Cryptomonas pascheri* sp. nov., *Cryptomonas playfairii* sp. nov., biodiversity, tropics, Vietnam