

Санкт-Петербургский государственный университет
Биологический факультет
Кафедра ботаники

Андреева Светлана Алексеевна

**Филогения некоторых групп навикулоидных диатомовых
водорослей**

Выпускная квалификационная работа магистранта

Научные руководители:

доцент, к.б.н. Балашова Н. Б. (СПбГУ)

в.н.с., к.б.н. Куликовский М. С. (ИБВВ РАН)

Санкт-Петербург

2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Макросистематика и филогенетика диатомовых водорослей.....	8
1.2. Генетические маркеры в работах по филогении диатомовых водорослей.....	11
1.3. Систематика и молекулярная филогения навиколоидных диатомовых водорослей.....	15
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	
2.1. Места отбора проб.....	22
2.2. Культивирование.....	22
2.3. Молекулярные методы.....	23
2.4. Микроскопия.....	24
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	
3.1. Систематика родов <i>Pinnularia/Caloneis</i> и поиск морфологических критериев для разделения внутривидовых таксонов.....	26
3.2. Филогенетическое положение родов <i>Geissleria</i> и <i>Paraplaconeis</i> , и значение порового аппарата в систематике.....	36
3.3. Филогенетическое положение диатомовых водорослей из родов <i>Diadesmis</i> и <i>Humidophila</i>	46
3.4. Филогенетическое положение представителей из рода <i>Aneumastus</i>	52
3.5. Филогенетическое положение представителей из рода <i>Seminavis</i>	55
ВЫВОДЫ.....	58
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	59
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	66

ВВЕДЕНИЕ

Диатомовые водоросли (от греч. diatome – расщепление, разрывание) - одноклеточные, одиночные или колониальные эукариотические микроскопические организмы. Они широко распространены в водных (морских и пресноводных), наземных и воздушных экосистемах, где являются основой пищевой цепи и участвуют в глобальном цикле углерода, кислорода и кремния. Диатомеи являются прекрасными индикаторами состояния окружающей среды, включая оценку качества воды пресноводных экосистем (Round et al., 1990). Диатомовые водоросли покрыты кремниевым панцирем, который хранится в отложениях длительное время, что позволяет их использовать в экологических исследованиях, палеолимнологических реконструкциях, в работах по разведке газа и нефти, археологии, криминалистике и т.д. (Smol, Stoermer, 2010).

Диатомеи стали исследовать с начала XVIII века (Round et al., 1990), но несмотря на такое длительное изучение их, мы имеем далеко не полное представление о систематике этих организмов. Одной из сложнейших групп в изучении таксономии и морфологии являются навикулоидные диатомовые водоросли. Навикулоидные диатомеи характеризуются симметричным в трёх плоскостях панцирем и щелевидным швом на каждой створке и называются так по характерному роду *Navicula* Vory. После описания рода *Navicula* в 1822 году, в этот таксон стали включать все водоросли, имеющие такую навикулоидную симметрию. Так что род *Navicula*, без сомнения, является сборным таксоном (Round et al., 1990).

С развитием электронной микроскопии, а также с исследованием живых клеток диатомей стало очевидным значительно более широкое морфологическое разнообразие внутри диатомовых водорослей и, в частности, в роде *Navicula*, что привело к многочисленным таксономическим ревизиям. В результате многие прежние виды рода *Navicula* были перемещены в новые роды, например, *Haslea* Simonsen, *Proschkinia* Karayeva, *Parlibellus* Cox, *Luticola* Mann, *Hippodonta* Lange-Bertalot et al., *Eolimna* Lange-Bertalot, Schiller, *Mayamaea* Lange-Bertalot или в старые восстановленные роды, например, *Sellaphora* Mereschowsky, *Placoneis* Mereschowsky, *Dickieia* Berkeley (Mann, 1989, 1994a; Cox 1987, 2003).

С описанием огромного количества новых таксонов возникла новая классификационная система в монографии «The Diatoms» (Round et al., 1990). Однако эта система, созданная более 25 лет назад, не включала данные молекулярно-генетических исследований и много новых родов, описанных за последнее время, в том числе и из навикулоидных диатомовых водорослей. Поэтому применение молекулярно-генетических

методик для данной группы организмов было крайне необходимым (Ehara et al., 2000; Medlin et al., 1996a, b, 2000; Fox, Sorhannus, 2003).

Специальных работ по филогении навикулоидных диатомовых водорослей не так уж и много. Обычно эту группу водорослей берут в анализе для лучшего разрешения филогенетических деревьев (Theriot et al., 2010; Ruck, Theriot, 2011; Sorhannus, Fox, 2012; Stepanek, Kociolek, 2014) Цикл публикаций К. Брюдер и Л.К. Медлин (Bruder, Medlin, 2007, 2008a,b; Bruder et al., 2008) посвящён навикулоидным представителям и включает, помимо типичных навикулоидных водорослей, также цимбеллоидные, гомфонемоидные и ахнантоидные для более детального анализа. Эти данные показали близкую связь между исследуемыми группами организмов и зачастую размытость границ между ними, что пока ещё вызывает трудности в понимании систематического положения различных таксонов.

Цель работы: анализ систематического положения отдельных, ранее не изученных или слабоизученных, групп навикулоидных диатомовых водорослей на основе морфологии створок, хлоропластов и молекулярно-генетических критериев.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. изучить филогенетическое положение новых штаммов из родов *Pinnularia* Ehrenberg и *Caloneis* Cleve для анализа целесообразности разделения этих таксонов и поиска соотношения между морфологическими признаками и молекулярными данными;
2. определить филогенетическое положение родов *Geissleria* Lange-Bertalot et Metzeltin и *Paraplaconeis* Kulikovskiy et al. для определения значения симметрии в систематике навикулоидных и цимбеллоидных диатомовых водорослей;
3. провести молекулярно-генетический и морфологический анализ новых представителей из родов *Humidophila* Lowe et al. и *Diadesmis* Kützing с описанием новых таксонов и анализом целесообразности разделения этих родов;
4. провести молекулярно-генетический анализ рода *Aneumastus* Mann et Stickle для подтверждения отнесения этого таксона к семейству Mastogloiaceae;
5. провести филогенетический анализ новых штаммов из рода *Seminavis* Mann и определить значение дорсивентральности для систематики навикулоидных диатомовых водорослей.

Научная новизна. Создана и в настоящее время поддерживается большая коллекция культур - более 1000 штаммов диатомовых водорослей из озера Байкал, Индонезии, Вьетнама и Монголии. В работе описано или предложено несколько новых для науки видов диатомей. Выявлены основные морфологические признаки, наиболее пригодные для таксономических исследований. Создан банк генетической информации для всех штаммов

диатомовых водорослей, а также получены генетические последовательности по двум генам (18S рРНК и *rbcL*) для определённых таксонов, в некоторых случаях, по которым отсутствовала информация до настоящего времени. Проведен филогенетический анализ для нескольких родов, по которым ранее не было данных.

Теоретическая и практическая значимость. Выполненная работа направлена на увеличение сведений о систематическом положении навикулоидных диатомовых водорослей. Полученные генетические последовательности позволят расширить представления о филогенетических взаимоотношениях в этой группе водорослей. Новые данные будут основой для корректного определения диатомовых водорослей, а также послужат базой для дальнейших филогенетических исследований, разработки экологического мониторинга с использованием таких подходов, как баркодинг.

Апробация работы. Результаты исследований представлены на XIII Международной научной конференции альгологов «Диатомовые водоросли: современное состояние и перспективы исследований» (Борок, Россия, 2013), 8th Central European Diatom Meeting (Загреб, Хорватия, 2014), III Международной научной конференции «Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге» (Борок, Россия, 2014), XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных ЛОМОНОСОВ-2015 (Москва, Россия, 2015), XIV Международной научной конференции диатомологов «Диатомовые водоросли: успехи, проблемы и перспективы исследований» (Звенигород, Россия, 2015), III (XI) Международной ботанической конференции молодых учёных (Санкт-Петербург, Россия, 2015), Международной конференции «Проблемы систематики и географии водных растений» (Борок, Россия, 2015).

Публикации.

Андреева С.А., Гусев Е.С., Куликовский М.С. Особенности строения хлоропластов в разных родах диатомовых водорослей из озера Байкал: документация и возможности использования в систематике. Диатомовые водоросли: современное состояние и перспективы исследований. Материалы XIII Международной научной конференции альгологов, 24-29 августа 2013. Борок, Россия. 2013. С. 18.

Киселёв Г.А., Балашова Н.Б., Андреева С.А. К флоре диатомовых водорослей государственного природного заповедника «Усть-Ленский». Диатомовые водоросли: современное состояние и перспективы исследований. Материалы XIII Международной научной конференции альгологов, 24-29 августа 2013. Борок, Россия. 2013. С. 122-123.

Andreeva S., Ulanova A. Morphological observations on *Olifantiella* species in the Greek coastal waters. Abstract book of the 8th Central European Diatom Meeting, April 10-13, 2014. Zagreb, Croatia. P. 10.

Андреева С.А., Гусев Е.С., Анненкова Н.В., Куликовский М.С. Молекулярная филогения некоторых пресноводных моношовных диатомовых водорослей: значение шва в систематике группы. Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге. Материалы докладов III Международной научной конференции, 24-29 августа 2014. Борок, Россия. Ярославль. 2014. С. 7-8.

Куликовский М.С., Андреева С.А., Гусев Е.С., Анненкова Н.В. Морфология и филогения рода *Geissleria* Lange-Bertalot et Metzeltin: к вопросу о роли таксономических признаков в систематике диатомовых водорослей. Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге. Материалы докладов III Международной научной конференции, 24-29 августа 2014. Борок, Россия. Ярославль. 2014. С. 19.

Kulikovskiyy M., Gusev E., Andreeva S., Annenkova N. Phylogenetic position of the diatom genus *Geissleria* Lange-Bertalot et Metzeltin and description of two new species from Siberian mountain lakes. 2014. Phytotaxa. Vol. 177. Iss.5. P. 249–260.

Андреева С.А., Анненкова Н.В., Гусев Е.С. Морфология и молекулярная филогения некоторых пресноводных моношовных диатомовых водорослей. Ломоносов-2015, секция "Биология", подсекция "Микология и альгология". Тезисы докладов XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных, 13-17 апреля 2015. Москва, Россия. Москва. МАКС Пресс. 2015. С. 191-192.

Андреева С.А., Мальцев Е.И., Подунай Ю.А., Гусев Е.С., Куликовский М.С. Молекулярно-генетическое разнообразие диатомовых водорослей в водоёмах Байкальской рифтовой зоны: первые результаты. Материалы XIV Международной научной конференции диатомологов "Диатомовые водоросли: успехи, проблемы и перспективы исследований», 24-29 августа 2015. Вопросы современной альгологии. Специальный выпуск. 2015. С. 6-7.

Андреева С.А., Мальцев Е.И., Подунай Ю.А., Гусев Е.С., Анненкова Н.В., Куликовский М.С. Филогенетическое положение диатомового рода *Diadesmis* и морфологические критерии выделения новых родов. Тезисы докладов III (XI) Международной Ботанической Конференции молодых учёных в Санкт-Петербурге, 4-9 октября 2015. Санкт-Петербург 2015. С. 48.

Андреева С.А., Мальцев Е.И., Подунай Ю.А., Гусев Е.С., Анненкова Н.В., Куликовский М.С. Филогения и морфология диатомовых водорослей рода *Diadesmis* Kützing. Материалы Международной конференции «Проблемы систематики и географии водных растений», 21-24 октября 2015. Борок, Россия. Ярославль 2015. С. 7.

Куликовский М.С., Андреева С.А., Гусев Е.С., Кузнецова И.В., Анненкова Н.В. Молекулярная филогения моношовных диатомовых водорослей: роль шва в эволюции и систематике. 2016. Известия РАН. Серия биологическая. № 5. С. 1-11.

Андреева С.А., Куликовский М.С., Мальцев Е.И., Подунай Ю.А., Гусев Е.С. Молекулярно-генетическое исследование диатомовых водорослей из родов *Diadesmis* и *Humidophila* (Bacillariophyceae). Ботанический журнал (в печати).

Связь работы с научными программами, темами. Работа выполнена при поддержке грантов Фонда Президента РФ (МК-5681.2012.4, МК-1128.2014.4), РФФИ 12-04-33078-мол-а-вед, РФФИ 14-04-01406-а, РФФИ 15-29-02739 офи_м и РНФ 14-14-00555.

Структура и объём работы. Работа состоит из введения, двух глав, выводов, списка литературы, одного приложения. Работа изложена на 69 страницах машинописного текста, содержит 30 рисунков, 3 таблицы. Список литературы включает 149 источника, в том числе 146 иностранных.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность и сердечную благодарность научным руководителям к.б.н., в.н.с. Максиму Сергеевичу Куликовскому (ИБВВ РАН) и к.б.н. и доценту Наталии Борисовне Балашовой (СПбГУ) за возможность работать над любимой темой и постоянную помощь и внимание на всех этапах проведения и написания работы, к.б.н., ст.н.с. Евгению Ивановичу Мальцеву (ИБВВ РАН), к.б.н., ст.н.с. Евгению Сергеевичу Гусеву и м.н.с. Юлии Александровне Подунай (ФГБУН «КНС - ПЗ РАН») за неоценимую помощь при выполнении работы, д.б.н., проф. Н.И. Стрельниковой (СПбГУ) за постоянное внимание к работе, семье за поддержку, понимание и терпение за всё время выполнения работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Макросистематика и филогенетика диатомовых водорослей

Диатомовые водоросли представляют собой класс в отделе Heterokontophyta (Van den Hoek et al., 1995) или отделе Ochrophyta (Cavalier-Smith, 2002, 2003). Монадные представители данных таксонов характеризуются хлоропластами с четырёхмембранными оболочками и трёхтилакоидными ламеллами, хлорофиллами а и с, митохондриями с трубчатыми кристами, двумя жгутиками – длинным и коротким. Длинный жгутик покрыт двумя рядами трёхчастных мастигонем, тогда как короткий жгутик гладкий; в переходной зоне жгутиков обычно имеется спиральная структура. Однако у диатомовых водорослей всего лишь один жгутик, имеющий трёхчастные мастигонемы, на гаметах в жизненном цикле некоторых центрических диатомей. Но и у этого жгутика отсутствуют переходная спираль, центральная пара микротрубочек и микротрубочковые корешки, базальные тела состоят из дуплетов, а не триплетов микротрубочек. Следы наличия второго гладкого заднего жгутика совсем отсутствуют (Van den Hoek et al., 1995; Von Stosch, 1950). Запасным продуктом диатомовых водорослей является хризоламинарин, откладывающийся вне хлоропласта. Хлоропласты диатомей, содержащие хлорофиллы а, с1, с2, с3, β-каротины и ксантофилы, возникли в результате вторичного эндосимбиоза гетеротрофного предка с красной водорослью. Так, на данное событие указывает наличие четырёх мембран в оболочке хлоропласта (Keeling, 2010). Однако есть молекулярные доказательства того, что некоторые линии с хлоропластом красных водорослей, а именно диатомей и гаптофитовые, могли изначально иметь хлоропласт зелёных водорослей, который впоследствии заменился на хлоропласт красных (Petersen et al., 2007; Frommolt et al., 2008; Moustafa et al., 2009). Типичной характеристикой диатомовых водорослей является наличие поверх плазмалеммы панциря из аморфного кремнезёма. Таким образом, диатомовые водоросли являются чётко обособленной группой, что было подтверждено и морфологическими, и молекулярными данными (Bhattacharya et al., 1992; Leipe et al., 1994; Medlin et al., 1997).

Согласно пигментному составу и молекулярным данным сестринской линией диатомовых водорослей внутри отдела Heterokontophyta считаются окрашенные двужгутиковые монады из класса Bolidophyceae (Andersen, 2004), у которых, однако, нет кремниевых структур и которые потеряли возможность их синтезировать вторично. В новые молекулярно-генетические исследования был включён порядок Parmales, представителей которого раньше не удавалось культивировать (Ichinomiya et al., 2011). Эти мелкие одноклеточные организмы, имеющие кремнезёмные клеточные покровы и гены, ответственные за силификацию (Yamada et al., 2014), оказались в классе Bolidophyceae, что

также свидетельствует об их близости к диатомеям (Ichinomiya et al., 2011). Такие образом, новые данные указывают на тесную эволюционную связь между диатомовыми водорослями и представителями порядка *Parmales* и класса *Bolidophyceae*.

Систематика диатомовых водорослей является одним из важнейших вопросов диатомологии. Становление различных систем диатомей и принципы их построения подробно рассмотрены некоторыми авторами (Мережковский, 1903; Макарова, 1986; Williams, 2007; Williams, Kociolek, 2010). Но в настоящее время нет чётко устоявшейся системы диатомовых водорослей.

Традиционно диатомовые водоросли делят на центрические и пеннатные формы по строению панциря, а именно, по расположению структурных элементов на створке и по симметрии самого панциря, а также по типу полового процесса и морфологии хлоропластов (Round et al., 1990). В центрических диатомеях выделяют обычно радиально-центрические, у которых округлый панцирь с радиальной симметрией, и би- или мультиполярные группы, имеющие продолговатый, треугольный, квадратный и т.д. вариант панциря с разными вариантами симметрии; тогда как у пеннатных водорослей вытянутый панцирь с билатеральной симметрией (Schütt, 1896). Пеннатные диатомовые водоросли являются изогамными или анизогамными организмами и чаще всего содержат несколько пластинчатых пристеночных хлоропластов, тогда как центрические – оогамными с многочисленными дисковидными пластидами (Edlund, Stoermer, 1997; Cherpurnov et al., 2004). Пеннатные диатомеи в пределах своей группы делятся на шовных и бесшовных (Simonsen, 1979).

Такая система, являясь удобной, применялась в ряде классификаций диатомовых водорослей с различными модификациями (Schütt, 1896; Bessey, 1900; Hustedt, 1930; Karsten, 1928; Simonsen, 1979; Глезер и др., 1988). Однако термины центрический и пеннатный являются только описательными и не имеют таксономического значения.

Наибольшее распространение в конце прошлого века получила система Ф.Е. Раунда с соавторами (Round et al., 1990), построенная на основе морфологических данных. Здесь диатомовые водоросли рассматриваются как отдел, в котором выделяют три класса: *Coscinodiscophyceae* (центрические), *Fragilariophyceae* (пеннатные бесшовные) и *Bacillariophyceae* (пеннатные шовные), предоставляя одинаковый ранг шовным и бесшовным диатомеям. Существование этих трёх классов никогда не подтверждалось молекулярными данными; хотя была показана монофилитичность пеннатных шовных диатомей фактически в различных филогенетических исследованиях (Medlin et al., 1996a; Medlin, Kaczmarska, 2004 и т.д.). Таким образом, согласно молекулярно-генетическим данным пеннатные шовные диатомовые водоросли являются монофилитической группой,

а центрические и пеннатные бесшовные - парафилитическими (Medlin et al., 1993, 1996a,b; Sorhannus et al., 1995; Medlin, Kaczmarska, 2004; Sorhannus, 2004; Alverson, Theriot, 2005).

Ряд учёных (Alverson, Theriot, 2005; Mann, Evans, 2007; Theriot et al., 2009) суммировали результаты наиболее успешных молекулярно-генетических исследований, сделанных для диатомей высокого таксономического ранга. В настоящее время существует две принципиально отличных филогенетических системы, построенных на основе молекулярно-генетических данных, под руководством Медлин (Medlin) и под руководством Э. Тэриота (Theriot).

Самая первая филогенетическая работа по диатомовым водорослям была проведена группой Медлин (Medlin et al., 1993). Было показано, что центрические и пеннатные бесшовные диатомовые водоросли являются парафилетическими группами. Новые данные конфликтовали с общепринятым пониманием того, что диатомеи делятся на две естественные группы центрических и пеннатных. Чем больше видов включалось в филогенетические деревья (Medlin et al., 1996a, b; Kooistra, Medlin, 1996), тем становилось яснее, что существует две группы центрических диатомей: радиально-центрические и биполярно-центрические. Однако порядок *Thalassiosirales* с радиально-центрическими представителями группировался с биполярно-центрической группой диатомовых водорослей (Medlin et al., 1996a, b).

На основании полученных молекулярно-генетических данных был сформирован новый вариант макросистемы диатомовых водорослей (Medlin, Kaczmarska, 2004). В этой системе отдел *Bacillariophyta* подразделяется на два подотдела: *Coscinodiscophytina* и *Bacillariophytina*. Подотдел *Coscinodiscophytina* с единственным классом *Coscinodiscophyceae* объединяет центрические диатомеи с радиально-симметричными створками. В подотдел *Bacillariophytina* входят классы *Mediophyceae* (центрические диатомовые с би- или мультиполярными створками и обычно с центральными выростами, а также порядок *Thalassiosirales* с радиально-симметричными представителями) и *Bacillariophyceae* (пеннатные диатомеи). Этот вариант системы ещё называют СМВ гипотезой (Theriot et al., 2009) по названиям включённых в неё классов (*Coscinodiscophyceae/Mediophyceae/Bacillariophyceae*). Монофилия этих трёх классов была подтверждена, но нужно соблюдать определённые критерии, а именно: использовать выравнивания для вторичной структуры малой субъединицы рРНК и включать множество внешних групп (Medlin, 2010; Medlin et al., 1993; Medlin, Kaczmarska, 2004; Sato, 2008). В перечисленных работах наблюдается хорошая корреляция молекулярных данных с морфологическими признаками, которые были включены в анализ. Помимо особенностей строения створок, подотделы различаются по ряду репродуктивных и цитологических

признаков, в первую очередь, по морфологии ауксоспор и пиреноидов, а также по характеристикам аппарата Гольджи (Kaczmarska et al., 2013; Medlin, Kaczmarska, 2004). Данная гипотеза имеет своих последователей (Sims et al., 2006; Sorhannus, 2004, 2007).

Однако СМВ-гипотеза поддерживается не всеми учёными (Theriot et al., 2009, 2010). Стали возникать разногласия по поводу того, стоит ли вообще таксономически признавать новые классы (Williams, Kociolek, 2007; Medlin, 2010). Было показано, что различия в результатах от исследования к исследованию подтверждают тот факт, что подотдел *Coscinodiscophytina* и класс *Mediophyceae* могут и не быть монофилетическими. Тем более, что другие исследователи (Adl et al., 2005, 2007) в своей работе отметили, что подотдел *Coscinodiscophytina* и класс *Mediophyceae* являются, по всей видимости, парафилетическими.

Таким образом, возник альтернативный взгляд на систематику диатомовых водорослей, основанный на результатах молекулярно-генетических исследований, а именно, постепенное развитие от центрической к пеннатной симметрии, что было предложено группой Тэриота (Theriot et al., 2010). Предполагают, что радиально-центрические диатомеи дают начало полярно-центрическим представителям, которые, переходят в бесшовные пеннатные, а те в шовные пеннатные диатомовые водоросли. Данная точка зрения была поддержана рядом учёных (Adl et al., 2005; Williams, Kociolek, 2007). Существование трёх монофилетических классов из СМВ-гипотезы не подтверждается.

Несомненно, любые изменения в выборе таксонов, используемых для построения молекулярной филогении, или критериев выравнивания последовательностей могут привести к несколько различающимся результатам. Поэтому различия в филогенетических деревьях возникают достаточно часто, что даёт возможность существовать разным гипотезам, касающимся выделения крупных таксономических единиц.

1.2. Генетические маркеры в работах по филогении диатомовых водорослей

В настоящее время для оценки филогенетических отношений внутри диатомовых водорослей применяют молекулярно-генетический анализ с привлечением различных групп генетических маркеров. В таблице 1 представлено практически всё разнообразие генов, а также публикации, в основном по навикулоидным диатомеям (в связи с темой данной работы), в которых эти гены использовались. В диатомологии пользуются популярностью три возможные группы филогенетических маркеров: ядерные, хлоропластные и митохондриальные.

Таблица 1. Список генов, используемых в публикациях по филогении навикулоидных диатомовых водорослей.

Расположение гена в клетке	Ген	Основные публикации по филогении навикулоидных диатомовых водорослей и других представителей с щелевидным швом (в хронологическом порядке)										
		Beszteri et al., 2001	Medlin, Kaczmarska, 2004	Jones et al., 2005	Bruder, Medlin, 2007, 2008a,b; Bruder et al., 2008	Souffreau et al., 2011	Sorhannus, Fox, 2012	Theriot et al., 2010; Kociolek et al., 2013	Kulikovskiy et al., 2014	Nakov et al., 2014	Witkowski et al., 2014	Theriot et al., 2015
ядро	18S рРНК											
	5.8S рРНК											
	28S рРНК											
хлоропласт	<i>rbcL</i>											
	<i>atpB</i>											
	<i>psaA</i>											
	<i>psaB</i>											
	<i>psbA</i>											
	<i>psbC</i>											
	<i>rpoA</i>											
митохондрия	<i>coxI</i>											

1.2.1. Ядерные маркеры

Ядерные маркеры представляют собой три кодирующих участка: 18S (малая субъединица рРНК), 5.8S и 28S (большая субъединица рРНК) ядерные гены, а также четыре внутригенных спейсера: ITS1, ITS2, ETS и IGS (Alverson, Kolnick, 2005). Ядерные гены стали первыми применяться в филогенетическом анализе, тем самым привнеся кардинальные изменения в уже существующую традиционную систему диатомовых водорослей (Medlin et al, 1993, 1996a, 1996b; Kooistra, Medlin, 1996).

Ген 18S рРНК является самым используемым в молекулярно-генетических исследованиях (Van der Auwera, De Wachter, 1998). В диатомогии данный генетический маркер применялся в работах по изучению положения внутри других гетероконтных организмов (Daugbjerg, Andersen, 1997), по реконструкции эволюции основных классов диатомей (Medlin, Kaczmarska, 2004) или по оценке монофилетичности диатомовых порядков или родов (Beszteri et al, 2001) или наличия криптических видов (Sarno et al., 2005). Данная молекула является функционально стабильным эволюционным маркером, развивающимся независимо от морфологии (Bhattacharya et al., 1992). Рибосомальная РНК имеет вторичную структуру, поэтому существуют вариации в выравнивании последовательностей данного гена: одни предпочитают первичную структуру рРНК, другие же – вторичную (Medlin, Kaczmarska, 2004; Medlin, 2016). Также существует две модели для вторичной структуры 18S рРНК: модель И. Ван де Пира с сильно изменчивым

баркодинговым регионом V4 (Van de Peer 1993, 1998) и модель Р.Р. Гутелла, в которой нет подтвержденной вторичной структуры для этого региона (Theriot et al., 2009). Из-за отсутствия вторичной структуры для региона V4 в модели Гутелла, выравнивание последовательностей проводится по первичной структуре, что может повлиять на конечный результат (Medlin, 2016).

Сейчас для упрощения филогенетического анализа часто используют баркодинговый регион V4 (Nelles et al., 1984), вместе с фланкирующими участками составляющий 390-410 пн от фрагмента 18S рНК, длиной приблизительно в 1800 пн, и представляющийся крупнейшим и наиболее сложным среди других изменчивых участков внутри гена 18S рНК (Nickrent, Sargent, 1991). Данный регион имеет ряд преимуществ, что повышает его популярность: короткий, достаточно вариабельный для идентификации тех или иных видов и консервативный в местах присоединения праймеров, тем самым упрощая процедуры амплификации и секвенирования (Zimmermann et al., 2011).

Ген 28S рНК является более вариабельным участком, нежели 18S рНК (Van der Auwera, De Wachter, 1998), что вызывает сложности при выравнивании. Данный ген удобен при разделении очень близких видов. Из-за крупного размера 28S рНК (около 3300 пн) его редко секвенируют полностью, и в основном используются небольшие участки для филогенетического анализа, чаще всего D1/D2 регион, длиной 600 пн (Trobaajo et al., 2009, 2010), но есть и другие участки. Было показано, что генетическая дивергенция у другого региона D1/D5 28S рНК выше, чем у генов *rbcL*, *psbA*, 5.8S и 18S рНК и что 28S рНК является лучшим генетическим маркером в таксономических исследованиях (Lee et al., 2013).

Внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2) представляет собой короткие некодирующие регионы с консервативными фланкирующими участками. Они располагаются между малой и большой субъединицами рНК: ITS1 между 18S и 5.8S рНК, тогда как ITS2 между 5.8S и 28S рНК. Из-за своей относительно высокой скорости развития ITS маркеры являются хорошим инструментом в разрешении отношений на уровне видов и популяций (Zechman et al., 1994). Последовательности ITS использовались при рассмотрении отношений внутри комплекса видов *Sellaphora pupula* (Kützing) Mereschkovsky, демонстрируя множественные расходящиеся копии ITS рНК в пределах отдельных клонов видов *Sellaphora* и чрезвычайную сложность в выравнивании ITS1, и ITS2 среди разных демонов. Таким образом, данный участок не очень удобен в крупных филогенетических анализах (Behnke et al., 2004). А.Амато с соавторами (Amato et al., 2007) оценивали насколько хорошо четыре генетических маркера (28S, ITS1 и ITS2 рНК, и *rbcL*) отличаются между комплексом видов *Pseudonitzschia delicatissima* (Cleve) Heiden / *P.*

pseudodelicatissima (Hasle) Hasle, и изменения ITS2 показали лучшую согласованность с репродуктивной совместимостью и морфологией.

Ген 5.8S рРНК чаще всего используют вместе с ITS маркерами также в качестве баркодингового участка (Urbánková, Veselá, 2013). Этот ген был отклонен в некоторых исследованиях из-за существенного внутриклонального разнообразия, которое препятствует выравниванию даже близко связанных линий (Behnke et al., 2004; Pouličková et al., 2010; Trobajo et al., 2010). Однако данный маркер показывает достаточную универсальность и хорошую дискриминационную мощь при оценке с использованием набора данных, содержащих широкий спектр диатомовых таксонов.

1.2.2. Хлоропластные гены

Хлоропластный геном содержит преимущественно белок-кодирующие гены, которые используются для филогенетического анализа. Удобство хлоропластных генов заключается в том, что при их исследовании вероятность амплификации контаминантной ДНК (например, грибов) намного ниже, чем ядерных маркеров. Поэтому в диатомологии используется большое число таких генов.

Самым популярным хлоропластным геном считается ген *rbcL*, использовавшийся в ряде работ по филогенетике диатомовых водорослей (Jones et al., 2005; Bruder, Medlin, 2007, 2008a, 2008b; Bruder et al., 2008; Souffreau et al., 2011). Этот ген кодирует большую субъединицу рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилазы/оксигеназы (РУБИСКО), фермента ответственного за фиксацию углерода. Этот маркер, приблизительно длиной в 1428-1434 пн, может использоваться частично, делеции и инсерции в нём редки, скорость эволюции выше, чем у 18S рРНК (Evans et al., 2008), несёт значительный филогенетический сигнал (Källersjö et al., 1999). Ген *rbcL* считается удобным при изучении эволюции диатомовых водорослей на уровне порядка или рода (Mann et al., 2001).

Остальные хлоропластные гены не являются часто используемыми, как *rbcL*, и появляются в ограниченном количестве работ. Ген *psbA* кодирует D1 белок реакционного центра фотосистемы II (Souffreau et al., 2011; Nakov et al., 2014). По мнению авторов (Lee et al., 2013), данный ген не является хорошим маркером в таксономических исследованиях. Другой хлоропластный ген *psbC* кодирует белок CP43 в фотосистеме II (Sorhannus, Fox, 2012; Theriot et al., 2010; Kociolek et al., 2013). Ген *psaA* кодирует белок A1, а ген *psaB* – белок A2 реакционного центра фотосистемы I. Ген *atpB* кодирует β субъединицу АТФ-синтазы (Theriot et al., 2015).

Группа из семи хлоропластных генов, включавших *rbcL*, *psbA*, *psbC*, *psaA*, *psaB* и *atpB*, была проанализирована в обобщающей работе Тэриота с соавторами (Theriot et al.,

2015). Было показано, что по отдельности эти гены не несут достаточный сигнал, чтобы обеспечить какое-либо понимание филогении диатомей. Однако совокупные данные по данным генам способны преодолеть эту проблему.

Ген *groA* является более варибельным, нежели *rbcL*, и кодирует α -субъединицу РНК-полимеразы (Fox, Sorhannus, 2003; Sorhannus, Fox, 2012).

1.2.3. Митохондриальные гены

Митохондриальный геном развивается быстрее, чем ядерный, и, следовательно, существует огромный потенциал для конкретных информативных областей (Chantangsi et al. 2007). Так как митохондрии делятся бинарно без рекомбинации, их гены менее подвержены вставкам, делециям или другим крупным перестройкам, вводящим неоднозначные изменения в последовательностях.

Митохондриальный ген *coxI* кодирует субъединицу I цитохромоксидазы с и является баркодинговым регионом, требующим для каждой отдельной группы соответствующие специфичные праймеры, что вызывает трудности при работе с данным генетическим маркером (Evans et al., 2007). Было показано, что ген является относительно варибельным для разрешения отношений диатомовых на уровне порядка (Ehara et al., 2000).

Обзор о генах, приведённый выше, является опорой при выборе маркеров для филогенетического анализа в данной работе (см. Главу 2. Материалы и методы).

1.3. Систематика и молекулярная филогения навикулоидных диатомовых водорослей

В 1786 году О.Ф. Мюллер описал новый вид *Vibrio tripunctatus*, а в 1822 году Ж.Б. Бори де Сен-Венсан отнёс его к новому роду *Navicula* и назвал *Navicula tripunctata* (O.F. Müller) Bory. Таким образом, с этого момента начинается история рода *Navicula*. Навикулоидными, в широком смысле, можно назвать пеннатные диатомовые водоросли, симметричные в трёх плоскостях с центральной, не содержащей фибулу, щелевидной шовной системой на каждой створке.

Разными авторами были предприняты попытки определения таксономического положения представителей из рода *Navicula*. Например, П.Т. Клеве (Cleve, 1894, 1895) в работу по шовным диатомовым водорослям «Synopsis of the naviculoid diatoms» включил, наряду с навикулоидными диатомеями, также асимметричные роды *Gomphonema* Ehrenberg, *Cymbella* C.A. Agardh, *Rhoicosphenia* Grunow и *Amphora* Ehrenberg, и одношовные роды *Cocconeis* Ehrenberg, *Achnanthes* Bory и *Achnantheidium* Kützing (внутри рода *Achnanthes*). Ф. Шютт (Schütt, 1896) исключил одношовные роды из навикулоидных диатомей, тогда как Г. Карстен (Karsten, 1928) перенёс асимметричные роды в таксоны

Gomphonemoideae и Cymbelloideae, удачно описав навикулоидные диатомовые водоросли на основе их симметрии. И Ф. Хустедт (Hustedt, 1933), а также Р. Патрик и Ч.Р. Раймер (Patrick, Reimer, 1966, 1975) поместили одношовные и двушовные навикулоидные роды в разные подпорядки и порядки. Роды *Gomphonema* и *Cymbella* были сгруппированы в единственное подсемейство Gomphocymbelloideae в пределах семейства Naviculaceae Хустедтом, тогда как Патрик и Раймер поместили их в собственные семейства Gomphonemaceae и Cymbellaceae рядом с семейством Naviculaceae в порядке Naviculales. Представителей из рода *Navicula* эти авторы включили в семейство Naviculaceae.

Долгое время род *Navicula* был одним из самых многочисленных по количеству видов среди шовных диатомей, и считалось, что «*Navicula* had traditionally been a dump for all bilaterally symmetrical raphid diatoms lacking particularly distinctive features»¹ (Round et al., 1990). Однако с развитием электронной микроскопии, а также с исследованием живых клеток диатомей стало очевидным значительно более широкое морфологическое разнообразие внутри данного рода, что привело к многочисленным таксономическим ревизиям. В результате многие прежние виды рода *Navicula* были перемещены в новые отдельные роды, например, *Haslea*, *Proschkinia*, *Parlibellus*, *Luticola*, *Hippodonta*, *Eolimna*, *Mayamaea* и многие другие, или в старые восстановленные роды, например, *Sellaphora*, *Placoneis*, *Muelleria* Frenguelli (Mann, 1989; Cox 1987; Spalding, Stoermer, 1997). Подробные изменения представлений об объёме рода *Navicula* рассмотрены в таблице 2. В последней классификации, основанной на морфологии створок (Round et al., 1990), авторы распределили большинство шовных диатомей между 10 порядками и 34 семействами в пределах подкласса Bacillariophycidae, класса Bacillariophyceae. Четыре порядка сейчас содержат диатомовые водоросли, ранее помещённые в семейство Naviculaceae (Hustedt, 1933; Patrick, Reimer, 1966). В сравнении с большинством других ранних работ, основанных на морфологии створок, в описание порядков и семейств была включена и морфология хлоропластов (Round et al., 1990).

Род *Navicula sensu stricto* в современном понимании, основывающемся на признаках типа данного рода (*Navicula tripunctata*), охватывает виды бывшей секции Lineolatae (Cleve, 1894, 1895; Hustedt, 1930). Представители данного рода имеют по два боковых хлоропласта, створки с характерными апикально удлинёнными ареолами, прикрытыми изнутри гименом, и дополнительным ребром, защищающим внутреннюю щель шва, открывающуюся косо (Cox, 1999; Lange-Bertalot, 2001). Для них, а также для новых видов, положение которых являлось неопределённым на момент обнародования, даже было предложено «временное

¹ «Род *Navicula* традиционно был свалкой для всех билатерально-симметричных шовных диатомовых водорослей без определённых отличительных черт».

хранилище» в виде формального рода *Naviculadicta* (Lange-Bertalot, Moser, 1994). Однако эта концепция не получила полного признания исследователей (Kociolek, 1996).

Таблица 2. Изменения представлений об объеме рода *Navicula*

Род в «классическом» широком понимании	Роды, выделенные или восстановленные (в хронологическом порядке)
<i>Navicula</i> Bory 1822	<i>Diadesmis</i> Kützing 1844
	<i>Craticula</i> Grunow 1868
	<i>Sellaphora</i> Mereschkowsky 1902
	<i>Placoneis</i> Mereschkowsky 1903
	<i>Muelleria</i> Frenguelli 1945
	<i>Haslea</i> Simonsen 1974
	<i>Lyrella</i> Karajeva 1978
	<i>Proschkinia</i> Karayeva 1978
	<i>Parlibellus</i> Cox 1988
	<i>Aneumastus</i> Mann et Stickle 1990
	<i>Cavinula</i> Mann et Stickle 1990
	<i>Cosmioneis</i> Mann et Stickle 1990
	<i>Fallacia</i> Stickle et Mann 1990
	<i>Luticola</i> Mann 1990
	<i>Petroneis</i> Stickle et Mann 1990
	<i>Biremis</i> Mann et Cox 1990
	<i>Scolioneis</i> Mann 1990
	<i>Nupela</i> Vyverman et Compère 1991
	<i>Naviculadicta</i> Lange-Bertalot 1994
	<i>Chamaepinnularia</i> Lange-Bertalot et Krammer 1996
	<i>Geissleria</i> Lange-Bertalot et Metzeltin 1996
	<i>Hippodonta</i> Lange-Bertalot et al. 1996
	<i>Lunella</i> Snoeijs 1996
	<i>Eolimna</i> Lange-Bertalot et Schiller 1997
	<i>Fistulifera</i> Lange-Bertalot 1997
	<i>Mayamaea</i> Lange-Bertalot 1997
	<i>Fogedia</i> Witkowski et al. 1997
	<i>Adlafia</i> Lange-Bertalot 1998
	<i>Microcostatus</i> Johansen et Sray 1998
	<i>Sieminskia</i> Metzeltin et Lange-Bertalot 1998
<i>Kobayasiella</i> Lange-Bertalot 1999	
<i>Luticola</i> Mann 1999	
<i>Neidiopsis</i> Lange-Bertalot et Metzeltin 1999	
<i>Alveovallum</i> Lange-Bertalot et Krammer 2000	
<i>Decussata</i> Lange-Bertalot et Metzeltin 2000	

<i>Lecohuia</i> Lange-Bertalot 2000
<i>Amicula</i> Witkowski et al. 2000
<i>Austariella</i> Witkowski et al. 2000
<i>Cocconeopsis</i> Witkowski et al. 2000
<i>Kurpiszia</i> Witkowski et al. 2000
<i>Playaensis</i> Spaulding et Kociolek 2002
<i>Lacunicula</i> Lange-Bertalot et al. 2003
<i>Navigiolum</i> Lange-Bertalot et al. 2003
<i>Germainiella</i> Lange-Bertalot et Metzeltin 2005
<i>Labellicula</i> Van De Vijver et Lange-Bertalot 2005
<i>Krsticiella</i> Levkov 2007
<i>Veigaludwigia</i> Lange-Bertalot et Rumrich 2007
<i>Prestauroneis</i> Bruder et Medlin 2008
<i>Brevilinea</i> Siver et al. 2008
<i>Envekadea</i> Van de Vijver et al. 2009
<i>Microfissurata</i> Lange-Bertalot et al. 2009
<i>Boreozonacola</i> Lange-Bertalot et al. 2010
<i>Crucicostulifera</i> Taylor et Lange-Bertalot 2010
<i>Rexlowea</i> Kociolek et Thomas 2010
<i>Altana</i> Kulikovskiy et al. 2012
<i>Buryatia</i> Kulikovskiy et al. 2012
<i>Genkalia</i> Kulikovskiy et al. 2012
<i>Khursevichia</i> Kulikovskiy et al. 2012
<i>Lacustriella</i> Lange-Bertalot et al. 2012
<i>Ochigma</i> Kulikovskiy et al. 2012
<i>Paraplaconeis</i> Kulikovskiy et al. 2012
<i>Pseudofallacia</i> Liu et al. 2012
<i>Luticulopsis</i> Levkov et al. 2013
<i>Humidophila</i> Lowe et al. 2014
<i>Ninastrelnikovia</i> Lange-Bertalot et Fuhrmann 2014
<i>Lacunoelolymna</i> Tudesque 2015

Из обзора, приведённого выше, видно, что систематическое положение навикулоидных диатомовых водорослей менялось и существовавшая система *Navicula sensu stricto* не состоятельна. Поэтому применение молекулярно-генетических методик для этой группы водорослей было крайне необходимым. Известно, что на основе эволюционной истории генетических последовательностей можно оценить филогенетические отношения различных организмов, в том числе и диатомовых водорослей (Ehara et al., 2000; Medlin et al., 1996a, b; Fox, Sorhannus, 2003).

Специальных публикаций по молекулярной филогении навикулоидных диатомовых водорослей не так уж и много; обычно данную группу включают в анализ для лучшего разрешения филогенетических деревьев (Theriot et al., 2010; Ruck, Theriot, 2011; Sorhannus,

Фох, 2011; Stepanek, Kociolek, 2014). Основные работы по филогении навикулоидных диатомовых водорослей представлены в таблице 1.

Самая первая работа (Beszteri et al., 2001) была осуществлена в начале XXI века на основе гена 18S рРНК для 6 навикулоидных диатомей, точнее для представителей семейства Naviculaceae (Krammer, Lange-Bertalot, 1986), поэтому в исследование были включены, помимо самого рода *Navicula*, виды родов *Amphora*, *Gomphonema*, *Eolimna* и *Phaeodactylum* Bohlin. Данная работа, несомненно, была полезна, но недостаточна для более ясного понимания филогении навикулоидных диатомовых водорослей.

Другая публикация из цикла «Evolution of the diatoms» включила в анализ пеннатные представители с щелевидным швом совместно с другими группами диатомей (Medlin, Kaczmarska, 2004). Авторы, на основе ядерного гена 18S рРНК и морфологических характеристик, предложили новую систему диатомовых водорослей, где навикулоидные виды попали в класс Bacillariophyceae подотдела Bacillariophytina. Продолжением данной работы оказываются современные исследования, выполненные Брюдер и Медлин (Bruder, Medlin, 2007, 2008a,b; Bruder et al., 2008) и включавшие, помимо типичных навикулоидных водорослей, также цимбеллоидные, гомфонемоидные и ахнантоидные формы для более детального анализа. Эти данные показали близкую связь между исследуемыми группами организмов и зачастую размытость границ между ними. В этом цикле работ авторы использовали уже три генетических маркера: 18S рРНК, 28S рРНК и *rbcL* для исследования систематического положения пресноводных навикулоидных диатомовых водорослей.

Одна из работ данного цикла (Bruder, Medlin, 2007) была посвящена филогенетическому положению рода *Placoneis* Mereschkowsky, который был вторично выделен из рода *Navicula* (Cox, 1987) и помещён в семейство Сymbellaceae порядка Сymbellales на основе морфологических характеристик хлоропласта (Round et al., 1990). Молекулярно-генетический анализ, проведённый в данной работе, также помещает род *Placoneis* в этот же порядок. И вид *Navicula hambergii* Hustedt, чьё положение в роде *Navicula sensu stricto* казалось сомнительным, был отнесён к роду *Placoneis* на основе морфологических и молекулярно-генетических критериев. Таким образом, монофилия рода *Placoneis* и вида *P. hambergii* (Hustedt) Bruder является хорошо поддерживаемой, тогда как их отношения с другими представителями порядка Сymbellales варьируют в зависимости от используемого гена.

Другая работа цикла (Bruder, Medlin, 2008a) представляет собой анализ 72 видов пресноводных навикулоидных диатомовых водорослей, где были поддержаны многие группы диатомей, установленных традиционными морфологическими методами. Близкая связь родов *Luticola* и *Diademsis* в филогенетических деревьях хорошо согласуется с

системой Раунда (Round et al., 1990), в которой эти роды помещены в семейство Diadesmaceae. Хорошо поддержанная монофилия вида *Eolimna minima* Lange-Bertalot et Schiller и рода *Sellaphora* согласуется с мнением (Behnke et al., 2004), что вид *E. minima* следует поместить в семейство Sellaphoraceae или даже в сам род *Sellaphora*. Род *Mayamaea* оказался сестринским кладе *Pinnularia/Caloneis*. Роды *Craticula* Grunow и *Stauroneis* Ehrenberg, помещенные в семейство Stauroneidaceae (Round et al., 1990), оказались близкими родственниками в филогенетических анализах, основанных на морфологических данных (Cox, Williams, 2000) и результатах данного исследования. Также в этой работе было показано, что роды *Gomphonema*, *Cymbella*, *Cymbopleura* (Krammer) Krammer, *Encyonema* Kützing и *Placoneis* образуют монофилетичную группу, только отношения между этими родами различаются в разных филогениях. Монофилия порядка Cymbellales, а также семейств Cymbellaceae и Gomphonemataceae (Round et al., 1990) была подтверждена. Род *Gomphonema* был поделен на две группы, основываясь на внешнем покрове ареол. Род *Amphora* оказался не монофилитичным, и две группы, составляющие его, соответствуют под родам *Amphora* и *Halamphora* (Cleve) Levkov. Пресноводные и морские моношовные диатомовые водоросли не формируют монофилетичную группу, хотя некоторые отдельные виды и являются монофилетичными. Пресноводные моношовные роды расходятся внутри навикулоидных пеннатных диатомей, но взаимоотношения между пресноводными моношовными и навикулоидными пеннатными диатомеями пока не могут быть ясно определены. Пресноводные моношовные представители формируют 2 клады: с родами *Cocconeis* и *Planothidium* Round et Bukhtiyarova в одной и с родами *Achnantheidium* и *Pauliella* Round et Basson в другой кладе. Такое деление на 2 группы согласуется с наличием двух семейств в работе Раунда с соавторами (Round et al., 1990), хотя там и не были упомянуты *Planothidium* и *Pauliella*. Морские представители рода *Achnanthes sensu stricto* родственны порядку Bacillariales по строению внешнего порового аппарата. Это разделение пресноводных и морских моношовных родов тем не менее не поддерживает независимость порядка Achnanthesales, как было определено в работе Раунда с соавторами (Round et al., 1990).

В следующей публикации (Bruder, Medlin, 2008b) представители из рода *Hippodonta* оказались сестринскими роду *Navicula sensu stricto*, но проявляют свою независимость от рода *Navicula* на основании морфологических и молекулярных признаков.

Работа Брюдер с коллегами (Bruder et al., 2008) отвергает традиционное разделение родов *Pinnularia* и *Caloneis*, поскольку ни в одном филогенетическом дереве они не формируют отдельных монофилетических клад. Полученные молекулярные результаты поддерживают существование групп, определённых в статье К. Краммера и Х. Ланге-

Берталота (Krammer, Lange-Bertalot, 1985). Согласно другой работе (Souffreau et al., 2011) род *Caloneis* не восстанавливался в качестве монофилетического, тем самым подтверждая мнение, что этот род эволюционно не имеет смысла и должен быть объединён с родом *Pinnularia*.

Интересным был ряд работ, проведённый для отдельных представителей навикулоидных родов или тех, которых считали таковыми. В одной из таких публикаций (Jones et al., 2005) были показаны явные отличия родов *Petroneis* Stickle et Mann и *Lyrella* Karayeva от рода *Navicula sensu stricto*, с привлечением огромного количества морфологических признаков и филогенетического анализа с использованием хлоропластного генетического маркера *rbcL*, и их близость к цимбеллоидным диатомовым водорослям. Похожая статья с подобными выводами была написана для другого рода *Geissleria*, который морфологически и молекулярно-генетически относится также к цимбеллоидным диатомеям (Kulikovskiy et al., 2014).

Результаты филогенетического анализа (Kocielek et al., 2013) по ядерному и хлоропластным генам продемонстрировали положение бесшовного рода *Diprora* Main внутри навикулоидной линии, тесно связанное с семейством Sellaphoraceae. По-видимому, представители рода *Diprora* вторично потеряли шовную систему, что связывают с их пещерным образом жизни. В остальном эти диатомеи, в основном, разделяют признаки типично навикулоидных диатомовых водорослей.

Был проведён комплексный анализ для навикулоидного рода *Biremis* Mann et Cox (Witkowski et al., 2014), филогенетический анализ которого показал его близкую связь с родами *Neidium* Pfitzer и *Scoliopleura* Grunow.

Молекулярно-филогенетические построения вскрыли большое число несоответствий в существующих морфологических системах на более низких уровнях иерархии, требующих формального номенклатурного разрешения. Понятно, что в обозримом будущем систему диатомей ждут кардинальные изменения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Места отбора проб

Материалом для данной работы послужили пробы планктона, бентоса и перифитона из пресноводных и солёных водоёмов Индонезии, Вьетнама, Монголии и России, отобранных сотрудниками ИБВВ РАН им. И.Д. Папанина.

В Индонезии пробы были собраны из пресноводных водоёмов в центральной части острова Суматра - вулканического озера Тоба, в центральной части острова Южный Сулавеси - озёра Товути и Матано, на острове Бали в озёрах Батур и Братан, а на островах Ванги-Ванги и Хога – с морской акватории.

Во Вьетнаме сборы были проведены в пресноводных водоёмах национального парка Каттхен на юге страны.

В Монголии отбор проб происходил в западной части пресноводного озера Хубсугул на севере страны, а также в северо-восточных частях солёных озёр Тэлмэн-Нуур и Ойгон-Нуур на западе страны.

В России пробы отбирались в пресноводном озере Байкал на восточном берегу рядом с деревнями Энхалук и Оймур, на восточном - рядом с мысом Котельниковским и на северо-восточном - в бухте Аяя, а также в средней части озера Байкал с Ушканьих островов. Сборы проводились в пресноводном озере Фролиха на северо-востоке от озера Байкал и в реках Левая и Правая Фролиха.

Краткая характеристика точек сбора, их координаты и номера полученных штаммов представлены в таблице 1 приложения.

2.2. Культивирование

Выделение отдельных клеток диатомовых водорослей проводилось из нефиксированных проб с помощью стеклянной пипетки Пастера под световым инвертированным микроскопом Zeiss Axio Vert. A1 (Германия), с очищением каждой клетки в нескольких каплях стерилизованной воды и помещением в лунку (300мкл) планшета для иммуноферментного анализа. Альгологически чистые монокультуры водорослей содержались в жидкой среде WC (Guillard, Lorenzen, 1972) в чашках Петри при 10°C с чередованием 12-часовых темновых и световых фаз. Штаммы были проанализированы после одного месяца культивирования. Список культур и название видов представлены в таблице 1 (см. приложение).

2.3. Молекулярные методы

2.3.1. Выделение ДНК

Выделение геномной и хлоропластной ДНК из диатомовых водорослей производилось с помощью наборов: NucleoSpin® Plant II фирмы MACHEREY-NAGEL (Германия), InstaGene Matrix фирмы BIORAD (США) и К-СОРБ фирмы Синтол (Россия) в соответствии с протоколом производителей.

2.3.2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Последовательности, кодирующие баркодинговый регион V4 и фланкирующие участки 18S рРНК (390-410 н.), были амплифицированы с использованием праймеров D512 и D978 (Zimmermann et al., 2011). Амплификация баркодингового участка V4 включала начальную денатурацию при 95°C (5 мин), за которой следовали 28 циклов, включающих денатурацию при 94°C (30 сек), отжиг праймеров при 52°C (40 сек) и элонгацию при 72°C (1 мин), и затем финальную элонгацию при 72°C (5 мин).

Последовательности, кодирующие хлоропластный ген *rbcL*, были амплифицированы с помощью праймеров *rbcL404* (Ruck et Theriot, 2011) и *rbcL1255* (Alverson et al., 2007). Амплификация данного региона включала начальную денатурацию при 95°C (5 мин), за которой следовали 44 цикла, включающих денатурацию при 94°C (30 сек), отжиг праймеров при 60°C (30 сек) и элонгацию при 72°C (2 мин), и затем финальная элонгация при 72°C (10 мин) (Abarca et al., 2014).

Амплификация участков осуществлялась при помощи готовой смеси для ПЦР ScreenMix (Евроген, Россия).

Полученные ПЦР-продукты визуализировались методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (1%), окрашиваясь SYBR® Safe (Life Technologies, США).

2.3.3. Очистка ПЦР-продуктов

Очистка ПЦР-продуктов осуществлялась с помощью смеси из FastAP, 10× FastAP Buffer, Exonuclease I (Thermo Fisher Scientific, США) и воды.

2.3.4. Секвенирование

Расшифровка нуклеотидных последовательностей проводилась с двух сторон при помощи прямого и обратного праймеров, указанных для ПЦР, и системы Big Dye (Applied Biosystems, США) с последующим электрофорезом с использованием секвенатора Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США) на базе ИБВВ РАН.

2.3.5. Обработка данных

Редактирование и сборка консенсусных последовательностей проводилась путём визуального сопоставления прямой и обратной хроматограмм в программах FinchTV (ver. 1.4.0) и Mega6 (Tamura et al., 2013).

Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводилось с помощью программы Mafft (version 7), используя модели G-INS-i и E-INS-i (Katoh, Toh, 2010).

2.3.6. Построение филогенетических деревьев

Филогенетические деревья строились методами Байеса (BI) и максимального правдоподобия (ML) с использованием моделей GTR+G+I. BI анализ проводили с помощью программы MrBayes-3.2.5 (Ronquist et Huelsenbeck, 2003). Запускали в двух повторностях три «горячих» и одну «холодную» марковские цепи в течение 10^6 циклов с отбором каждого сотого генерированного дерева. Из полученных деревьев первые 25% были отброшены; на основе остальных, имеющих стабильные оценки параметров моделей нуклеотидных замещений и правдоподобия, получено филогенетическое древо и апостериорные вероятности его ветвления. ML анализ был проведен с помощью программы PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010). При этом использовали непараметрический бутстреп анализ с 100 репликами.

2.4. Микроскопия

2.4.1. Подготовка проб для микроскопии заключалась в вываривания проб с диатомовыми водорослями в 36-38% перекиси водорода на плитке с температурой более 1000C° в химических стаканах. После этого полученный материал промывался дистиллированной водой посредством отстаивания осадка с диатомовыми водорослями более 6 часов и последующим декантированием. Процедура повторялась не менее шести раз.

2.4.2. Световая микроскопия

Постоянные препараты изготавливались с использованием смолы Naphrax® (Великобритания) и исследовались на световом микроскопе прямого света Zeiss AxioScope A1 (Германия), оснащенного иммерсионным объективом Axio Cam ERc 5s (x100/n.a.1.4, DIC).

2.4.3. Сканирующая электронная микроскопия

Для приготовления препаратов для сканирующей электронной микроскопии несколько капель суспензии очищенных панцирей водорослей наносились на отполированную поверхность металлического столика. После полного испарения воды столик помещался в ионную напылительную установку, где напылялся тонкий проводящий слой золота. Ультраструктура панциря диатомей изучалась в центре коллективного

пользования ИБВВ РАН на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6510LV (Япония).

2.4.4. Трансмиссионная электронная микроскопия

Для исследования диатомовых водорослей в трансмиссионном микроскопе проваренные в перекиси панцири концентрировались с помощью центрифуги. Концентрированный осадок помещался на сетки, покрытые формаваровой плёнкой (EMS FF200-Cu-50, Electron Microscopy Sciences, США).

Обработка всех полученных фотографий проводилась с помощью Adobe Photoshop (version 13.0).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Систематика родов *Pinnularia*/*Caloneis* и поиск морфологических критериев для разделения внутривидовых таксонов

Род *Pinnularia* был описан в 1843 году на основе вида *P. viridis* (Nitzsch) Ehrenberg (Ehrenberg, 1843), и в настоящее время содержит приблизительно 2000 видов и внутривидовых таксонов (Krammer, 1992, 2000). Представители данного рода встречаются преимущественно в пресных водоёмах, а также в солоноватых и солёных местах обитания (Round et al., 1990). Морфологически род *Pinnularia* характеризуется навикулоидными створками с высоким загибом и многорядными штрихами, заключёнными в камеры; такие штрихи ещё называют альвеолярными (Cox, Ross, 1981). До появления сканирующей электронной микроскопии особенности штрихов не были видны.

Через некоторое время после выделения рода *Pinnularia* был предложен другой близкий ему род *Caloneis* с *C. amphibaena* Cleve в качестве типового вида (Cleve, 1894). Характерными основаниями для выделения рода *Caloneis* являлись особенности морфологии штрихов (Cleve, 1894; Krammer, Lange-Bertalot, 1985). Согласно этим авторам, штрихи у представителей рода *Caloneis* обычно параллельные и дивергентные (редко конвергентные) на концах, не отчётливо пунктирные, образующие одну или несколько продольных линий в плоскости створки. Однако такую черту, как продольная линия, различимую только в световом микроскопе, также можно встретить и у видов рода *Pinnularia* (Hustedt, 1930).

С этого времени огромное количество диатомологов пыталось найти морфологические признаки, которые могли бы чётко и непротиворечиво разделить роды *Pinnularia* и *Caloneis*. Изобретение сканирующей электронной микроскопии в середине XX века дало возможность объяснить продольные линии, как кремнистые пластины, покрывающие отверстия альвеол с внутренней стороны, и различить ареолы в многорядных штрихах (Kolbe, Gölz, 1943). Такие тонкости структуры штрихов было невозможно увидеть на момент описания рода *Caloneis*, поэтому авторы, перечисленные выше, высказывали мнение по поводу неделимости родов *Pinnularia* и *Caloneis* на основании морфологии штрихов.

В монографии Раунда с соавторами (Round et al., 1990) было описано много новых родов, однако ревизия не коснулась рода *Pinnularia*, так как также возникали сомнения по поводу традиционных границ этого рода и самостоятельности рода *Caloneis*. Д.Г. Манн (Mann, 2001) поддерживал точку зрения о том, что род *Caloneis* нужно включить в род

Pinnularia. Он утверждал, что оба рода имеют общий план строения и что различия между этими таксонами распознаются интуитивно (Mann, 2001).

Разными авторами было определено много подгрупп внутри комплекса *Pinnularia/Caloneis* на разных таксономических уровнях. Например, на основе морфологии порового аппарата (Krammer, 1992, 2000; Krammer, Lange-Bertalot, 1985; Patrick, Reimer, 1966), а также строения хлоропластов живых клеток (Cox, 1988). Несмотря на детальные таксономические исследования в этом комплексе, учёными (Witkowski et al., 2000) всё-таки поддерживалось существование отдельного рода *Caloneis*. Поэтому были необходимы молекулярно-генетические исследования, которые смогли бы внести ясность в понимание комплекса *Pinnularia/Caloneis* на родовом и видовом уровнях.

Первая работа по филогенетике комплекса таксонов *Pinnularia/Caloneis* была опубликована Брюдер с коллегами (Bruder et al., 2008) и включала всего 14 видов. Данное исследование подтвердило существование трёх групп, определённых в статье Краммера и Ланге-Берталота на основе строения альвеол (Krammer, Lange-Bertalot, 1985). В статье 2011 года (Souffreau et al., 2011) рассматривалось время происхождения этого комплекса видов, для чего было использовано 39 штаммов. Результаты этого исследования показали, что род *Caloneis* не является монофилетическим и что существует три главных молекулярных клады, включающих и *Pinnularia*, и *Caloneis*, однако полученные результаты никак не получалось соотнести с морфологическими признаками.

Исследование, осуществлённое нами, посвящено попыткам разрешения сложившейся сложной ситуации в группе видов *Pinnularia/Caloneis* на ранее не использованных штаммах с привлечением морфологических и молекулярно-генетических данных, а также описанию нового рода, близкого данной группе. Филогенетическое дерево было построено на основе хлоропластного гена *rbcL* и баркодингового региона V4 18S рРНК с использованием последовательностей 11 собственных штаммов (выделены синим и красным цветами, рис. 1), а также 43 последовательности из GenBank (идентификационные номера нуклеотидных последовательностей представлены на дереве после видовых названий, рис. 1). *Stephanodiscus minutulus* (Kützing) Cleve et Möller, *S. hantzschii* Grunow и *Skeletonema menzellii* Guillard et al. были использованы в качестве внешней группы.

Виды из комплекса *Pinnularia/Caloneis*, используемые в построенном филогенетическом дереве, формируют отдельные клады, которые отчётливо коррелируют с морфологическими данными. Однако есть представители, которые расположены обособленно, что в некоторых случаях можно также объяснить морфологическими исследованиями.

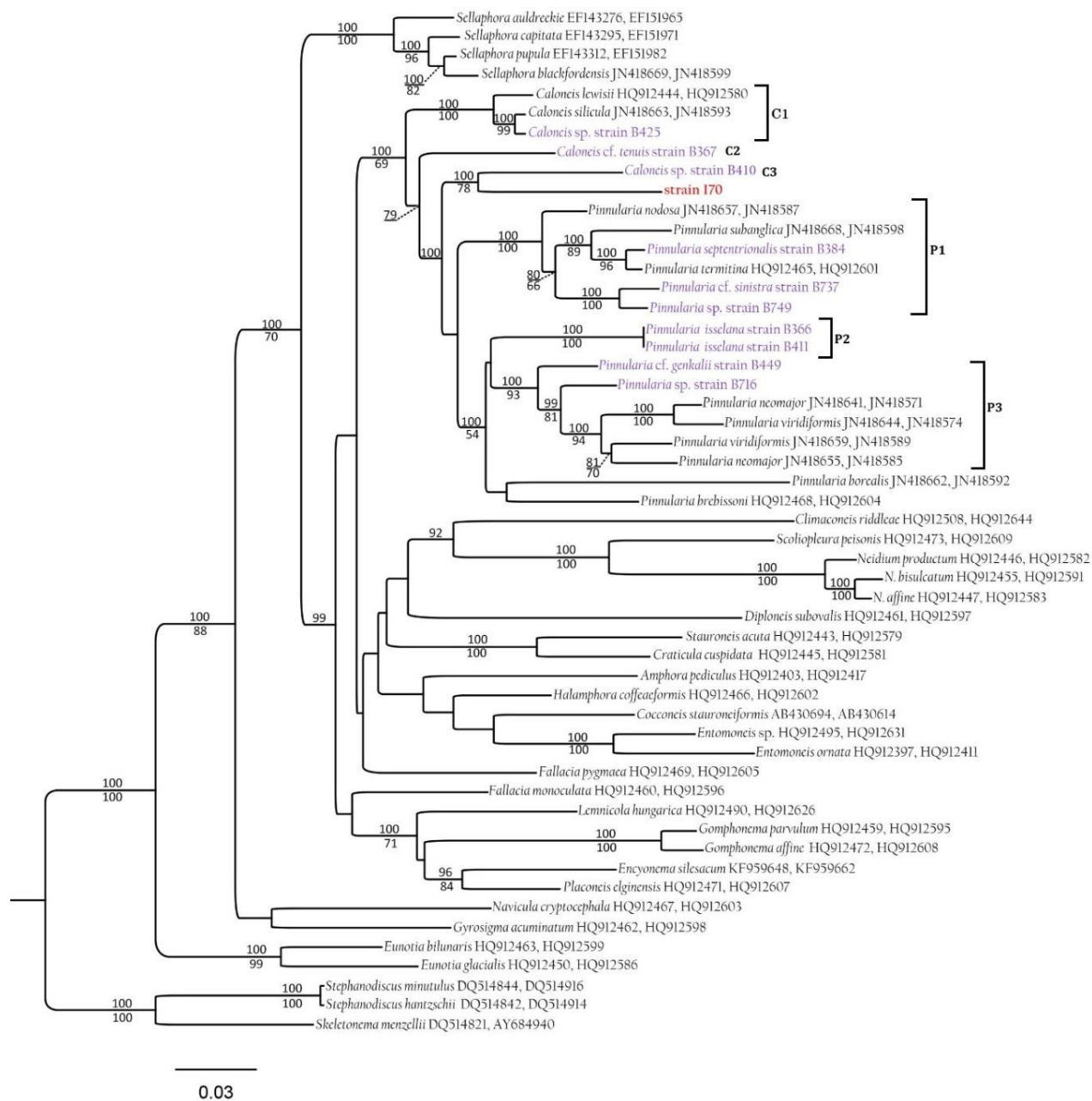


Рисунок 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе фрагмента гена *rbcL* и региона V4 18S рРНК. Цифры на ветвях соответствуют апостериорным вероятностям (снизу, < 50 не показаны) и значениям бутстреп-анализа (сверху, < 50 не показаны). Синим и красным цветами выделены штаммы, нуклеотидные последовательности которых получены нами.

На филогенетическом дереве диатомовые водоросли из рода *Caloneis* формируют 3 морфологических типа. Группа, представляющая первый морфотип, образует кладу C1 (рис. 1) с хорошей степенью достоверности (BI 100, ML 100) и включает 2 вида из GenBank: *C. lewisii* Patrick и *C. silicula* Ehrenberg (Cleve), и штамм *Caloneis* sp. (B425), полученный нами. Штамм B425 характеризуется эллиптическими створками с несколько расширенной центральной частью, узким прямоугольным центральным полем, длиной 14-19 мкм, шириной 6 мкм и параллельными штрихами (25 штрихов на 10 мкм) (рис. 2). Для данной группы организмов (клада C1) свойственна общая схема строения шва и порового аппарата.

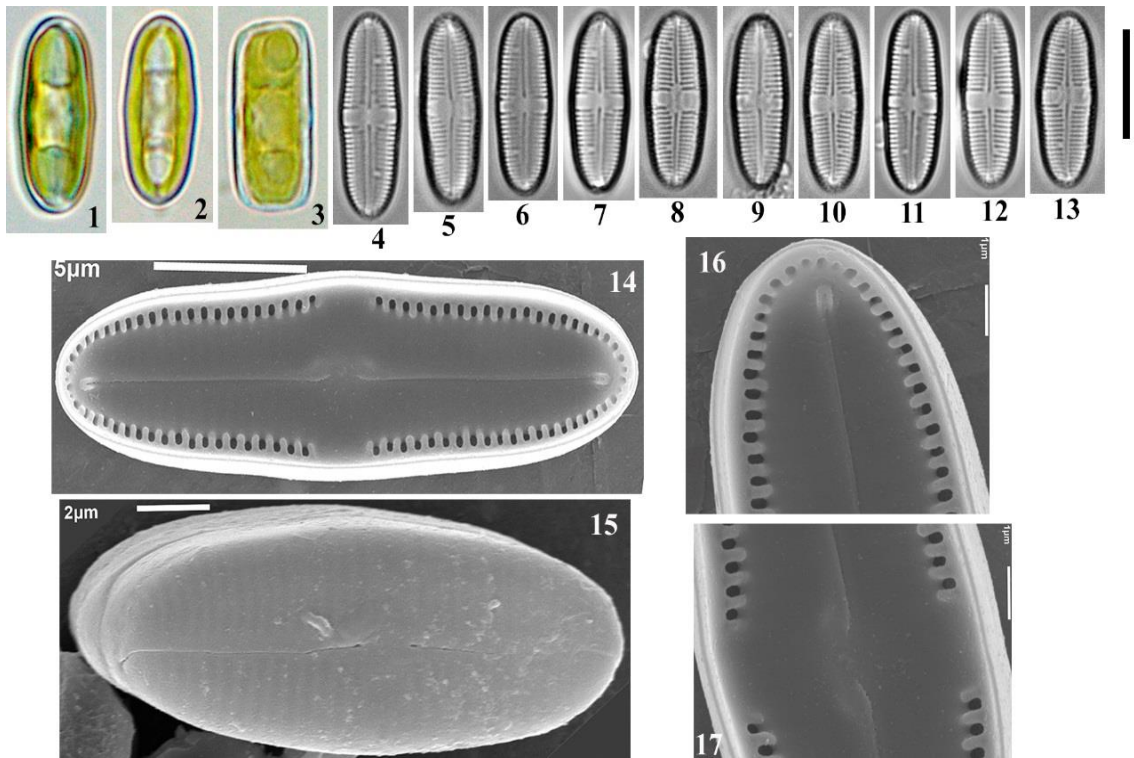


Рисунок 2. *Caloneis* sp. СМ: 1, 2 – живая клетка со створки; 3 – живая клетка с пояска; (4-13) – общий вид створок. Масштабная линейка 10 мкм. СЭМ: 14 – общий вид створки с внутренней стороны; 15 – общий вид створки с внешней стороны; 16 – конец створки с внутренней стороны; 17 – центральная часть створки с внутренней стороны. На всех фотографиях представлен штамм В425.

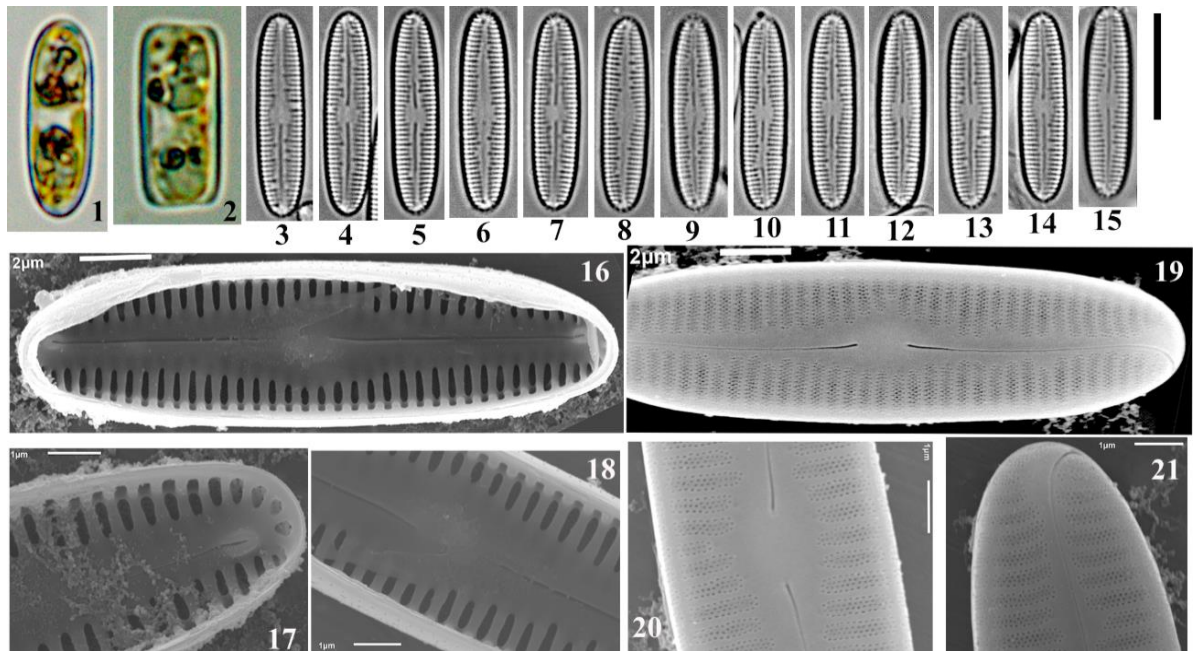


Рисунок 3. *Caloneis* cf. *tenuis*. СМ: 1 – живая клетка со створки; 2 – живая клетка с пояска; (3-15) – общий вид створок. Масштабная линейка 10 мкм. СЭМ: 16 – общий вид створки с внутренней стороны; 17 – конец створки с внутренней стороны; 18 – центральная часть створки с внутренней стороны; 19 – общий вид створки с внешней стороны; 20 – центральная часть створки с внешней стороны; 21 – конец створки с внешней стороны. На всех фотографиях представлен штамм В367.

Шов с внутренней стороны створки является явно прерывающимся (рис. 2: 4-13, 14, 17). С внешней стороны штрихи являются многорядными и состоят из мелких ареол (рис. 2: 15),

а с внутренней стороны альвеолы закрыты кремнистым слоем, приблизительно на 3/4, и открываются только небольшими круглыми отверстиями ближе к загибу створки (рис. 2: 16-17). Такой кремнистый слой в световом микроскопе создаёт впечатление продольных линий, которые являются характерной чертой *Caloneis sensu lato* (рис. 2: 4, 6, 11). Живые клетки характеризуются Н-образными хлоропластами (рис. 2: 1-3).

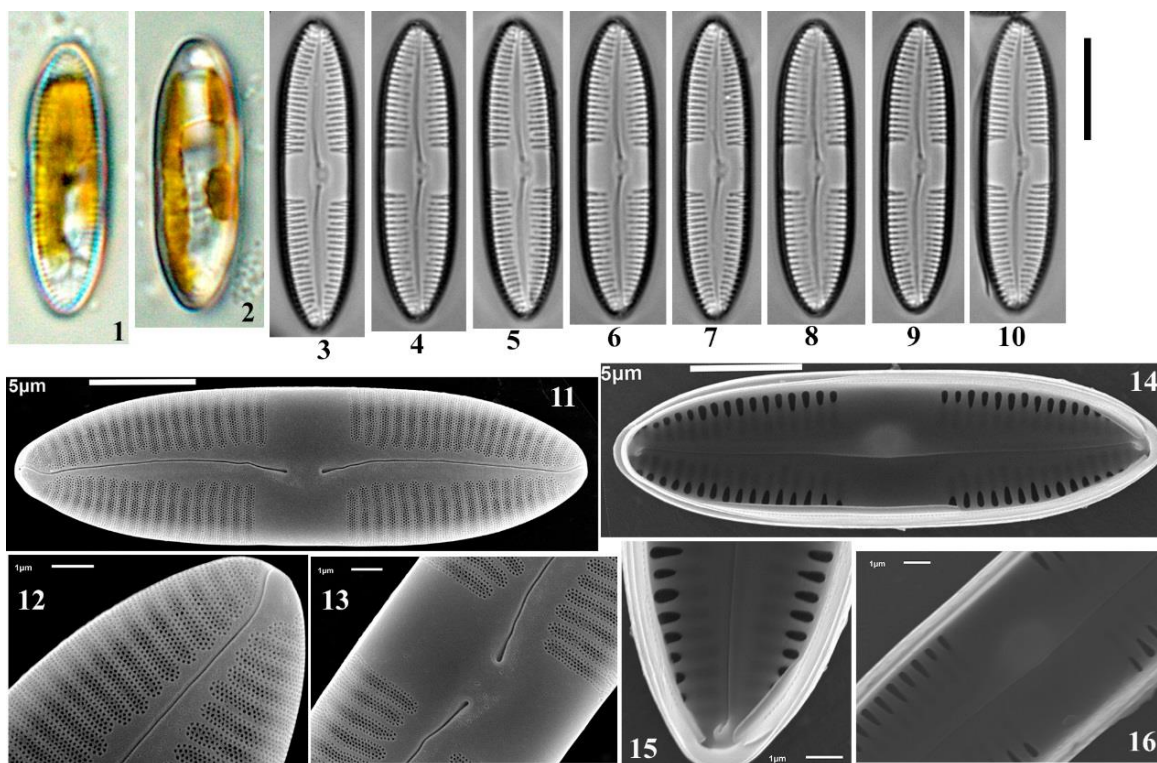


Рисунок 4. *Caloneis* sp. СМ: (1-2) – живая клетка со створки (штамм В390); (3-10) – общий вид створок (штамм В410). Масштабная линейка 10 мкм. СЭМ: 11 – общий вид створки с внешней стороны; 12 – конец створки с внешней стороны; 13 – центральная часть створки с внешней стороны; 14 – общий вид створки с внутренней стороны; 15 – конец створки с внутренней стороны; 16 – центральная часть створки с внутренней стороны (штамм В390).

Второй морфотип (С2) представлен всего лишь одним штаммом *Caloneis* cf. *tenuis* (Gregory) Krammer (В367) (рис. 3). Данный штамм В367 характеризуется линейными створками с тупо закругленными концами, узким осевым полем, небольшим круглым центральным полем, длиной 16-19 мкм, шириной 4 мкм и параллельными штрихами (25 штрихов на 10 мкм) (рис. 3). Здесь иной тип строения порового аппарата. С наружной стороны штрихи также являются многорядными и состоят из мелких ареол (рис. 3: 19-21), однако с внутренней стороны кремнистый слой занимает приблизительно 1/3 альвеолярного отверстия, являющегося овальным и находящегося ближе к загибу створки (рис. 3: 16-18). Шов с внутренней стороны также является отчётливо прерывающимся. Живые клетки содержат Н-образный хлоропласт (рис. 3: 1-2).

Третий морфотип (С3) в филогенетическом дереве с хорошей степенью достоверности (BI 100, ML 78) включает один штамм *Caloneis* sp. (В410), однако,

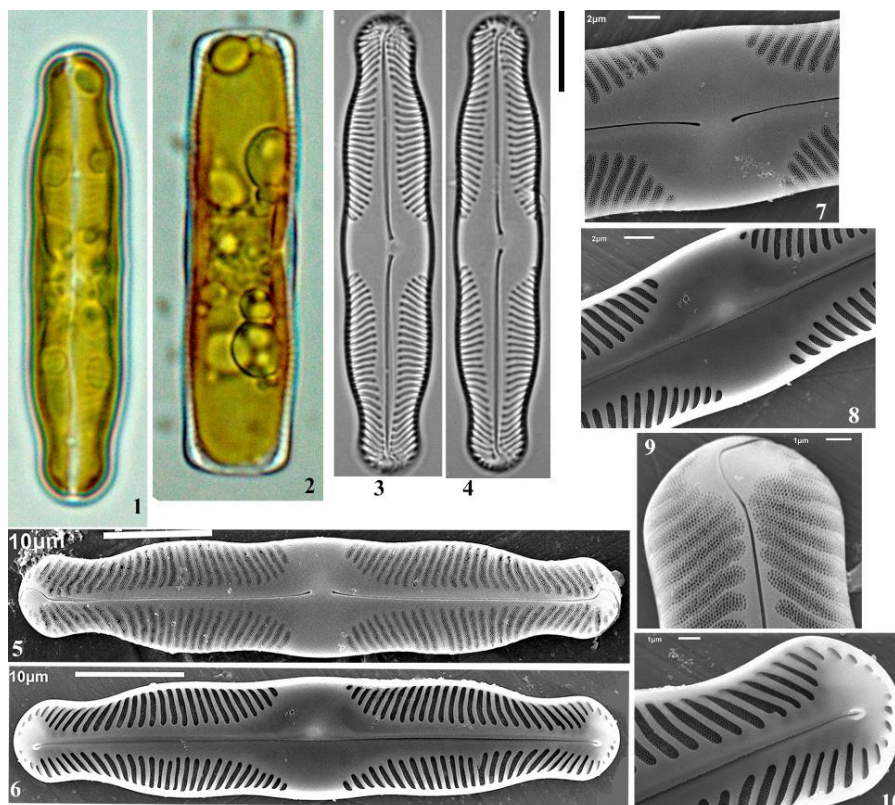


Рисунок 5. *Pinnularia septentrionalis*. СМ: 1- живая клетка со створки; 2 – живая клетка с пояска; (3-4) – общий вид створок. Масштабная линейка 10 мкм. СЭМ: 5 - общий вид створки с внешней стороны; 6 – общий вид створки с внутренней стороны; 7 – центральная часть створки с внешней стороны; 8 – центральная часть створки с внутренней стороны; 9 – конец створки с внешней стороны; 10 – конец створки с внутренней стороны. На всех фотографиях представлен штамм В384.

морфология клеток рассматривалась для двух культур (В410 и В390), для лучшей демонстрации характерных признаков. Данные культуры характеризуются ланцетными створками с практически параллельными сторонами, прямоугольным центральным полем, расширенным до концов створки, длиной 25-29 мкм, шириной 6-7 мкм и параллельными штрихами, немного дивергирующими на концах (18-20 штрихов на 10 мкм) (рис. 4). У них непрерывный шов с внутренней стороны (рис. 4: 14, 16). Альвеолы в этом случае закрыты на 2/3 кремнезёмным слоем с внутренней стороны, отверстие открывается ближе к загибу створки (рис. 4: 14-16). С наружной стороны штрихи являются многорядными и состоят из мелких ареол (рис. 4: 12-13). Хлоропласт является Н-образным (рис. 4: 1-2).

Типовой вид рода *Caloneis amhisbaena* не был включён в филогенетический анализ, так как нуклеотидные последовательности выбранных генетических маркеров являются сильно отличными, что приводит к эффекту притяжения длинных ветвей и искажает всё дерево. Таким образом обособленность данного типового вида от других представителей рода вызывает сомнения в принадлежности этих представителей к роду *Caloneis*, что несомненно требует уточнения.

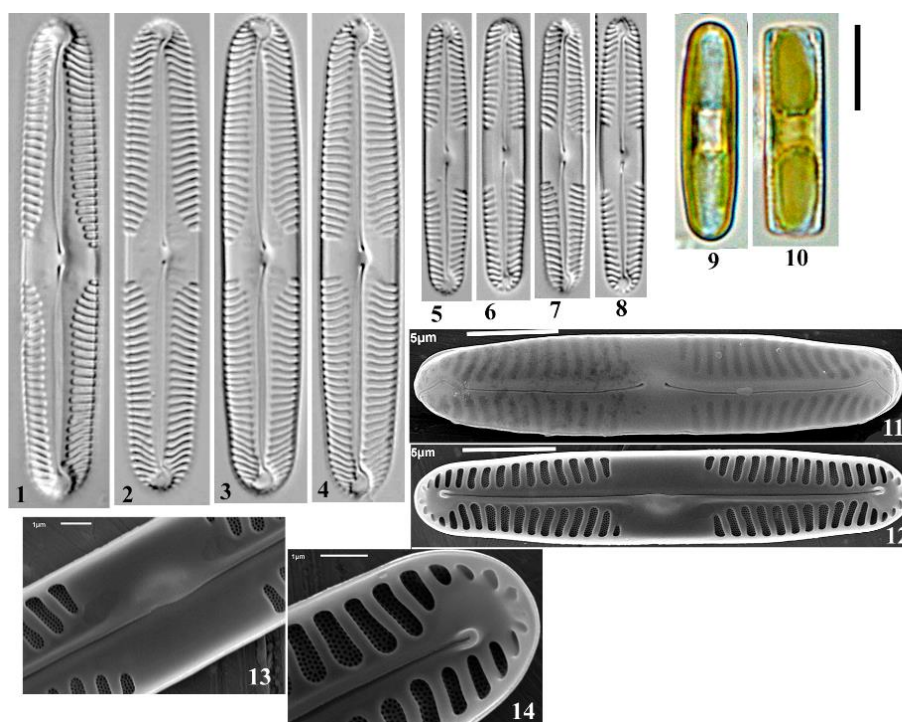


Рисунок 6. *Pinnularia* sp. СМ: (1-4) – общий вид створок (штамм В749). *Pinnularia* cf. *sinistra*. СМ: (5-8) – общий вид створок (штамм В737); 9 – живая клетка со створки (штамм В412); 10 – живая клетка с пояска (штамм В412). Масштабная линейка 10 мкм. СЭМ: 11 – общий вид створки с внешней стороны; 12 – общий вид створки с внутренней стороны; 13 – центральная часть створки с внутренней стороны; 14 – конец створки с внутренней стороны (штамм В407).

Представители рода *Pinnularia* в филогенетическом дереве формируют три чётких клады: P1, P2 и P3. Первая группа (P1) образована с высокой степенью достоверности (BI 100, ML 100) 3 штаммами из GenBank: *Pinnularia nodosa* (Ehrenberg) W.Smith, *P. subanglica* Krammer и *P. termitina* (Ehrenberg) Patrick, а также 3 нашими собственными штаммами, представленными видами *P. septentrionalis* Krammer (B384), *P. cf. sinistra* Krammer (B737) и *Pinnularia* sp. (B749) Для исследования морфологии *P. cf. sinistra* также дополнительно были рассмотрены штаммы В407 и В412 (рис. 6: 9-14). *P. septentrionalis* (штамм В384) характеризуется линейными створками с волнистыми краями, оттянутыми головчатыми концами, центральным полем, расширенным до краёв, длиной 53-56 мкм, шириной 9-11 мкм и штрихами радиальными у центра и конвергентными к концам (12 штрихов на 10 мкм) (рис. 5). Штаммы, представляющие виды *P. cf. sinistra*, (В407, В412, В737) и *Pinnularia* sp. (В749), имеют линейные створки с несколько оттянутыми головчатыми концами, широкое центральное поле, длину 24-25 мкм (В407, В412), 30-32 мкм (В737), 51-53 мкм (В749) и ширину 5-5,5 мкм (В407, В412, В737), 8-9 мкм (В749), а также штрихи, радиальные к центру и конвергентные к концам (10-12 штрихов (В749), 14 штрихов (остальные) на 10 мкм) (рис. 6). Данная группа организмов (P1) характеризуется с внутренней стороны непрерывным швом (рис. 5: 6, 8; рис. 6: 12, 13) и полностью открытыми альвеолами (рис. 5: 6, 8, 10; рис. 6: 1-4, 12, 14). С внешней стороны штрихи являются многорядными и состоят из мелких

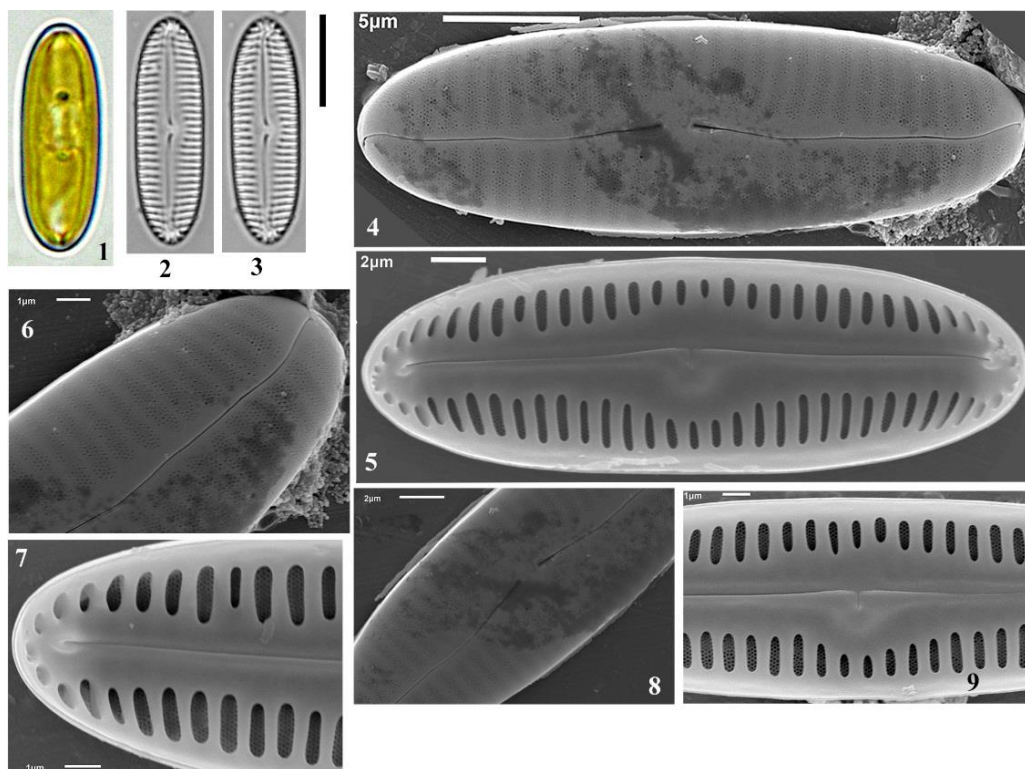


Рисунок 7. *Pinnularia isselana*. СМ: 1 – живая клетка со створки; (2-3) – общий вид створки (штамм В366). Масштабная линейка 10 мкм. СЭМ: 4 – общий вид створки с внешней стороны; 5 – общий вид створки с внутренней стороны; 6 – конец створки с внешней стороны; 7 – конец створки с внутренней стороны; 8 – центральная часть створки с внешней стороны; 9 – центральная часть створки с внутренней стороны (штамм В411).

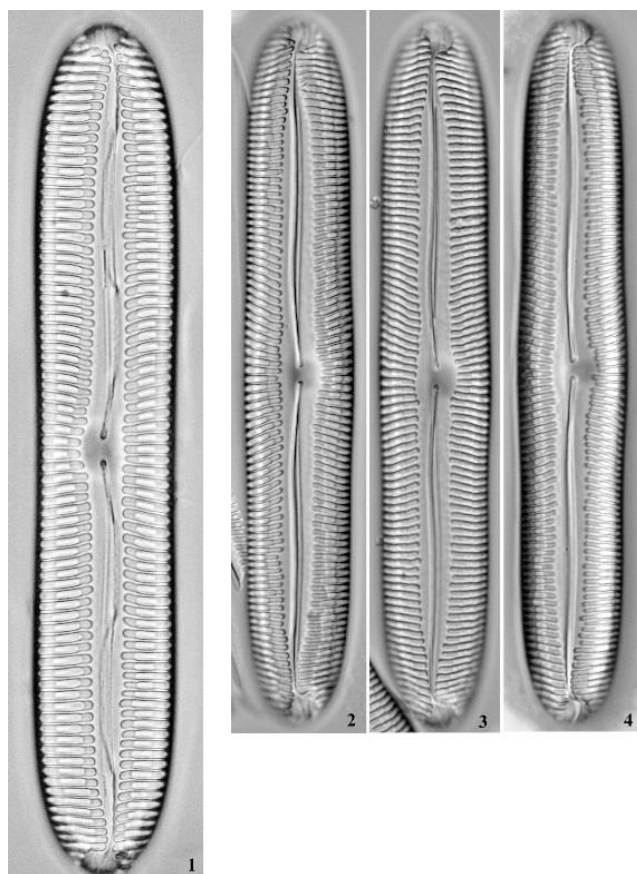


Рисунок 8. СМ: 1 – общий вид створки *Pinnularia* cf. *genkalii* (В449); (2-4) – общий вид створок *Pinnularia* sp (В716). Масштабная линейка 10 мкм.

хлоропласта (рис. 5: 1, 2), либо одиночные Н-образные хлоропласты (рис. 6: 9, 10).

Вторая группа (P2) представлена 2 штаммами одного вида *P. isselana* Krammer (B366 и B411), который по морфологическим признакам близок первой группе *Pinnularia* (P1). Представители данного вида характеризуются овальными створками, длиной 22-26 мкм, шириной 7 мкм и практически параллельными штрихами (14 штрихов на 10 мкм) (рис. 7). Здесь также на створке с внутренней стороны непрерывный шов (рис. 7: 5, 9) и открытые альвеолы (рис. 7: 5, 7, 9), с наружной стороны штрихи многорядные и состоят из мелких ареол (рис. 7: 4, 6, 8). Хлоропласт является Н-образным (рис. 7: 1).

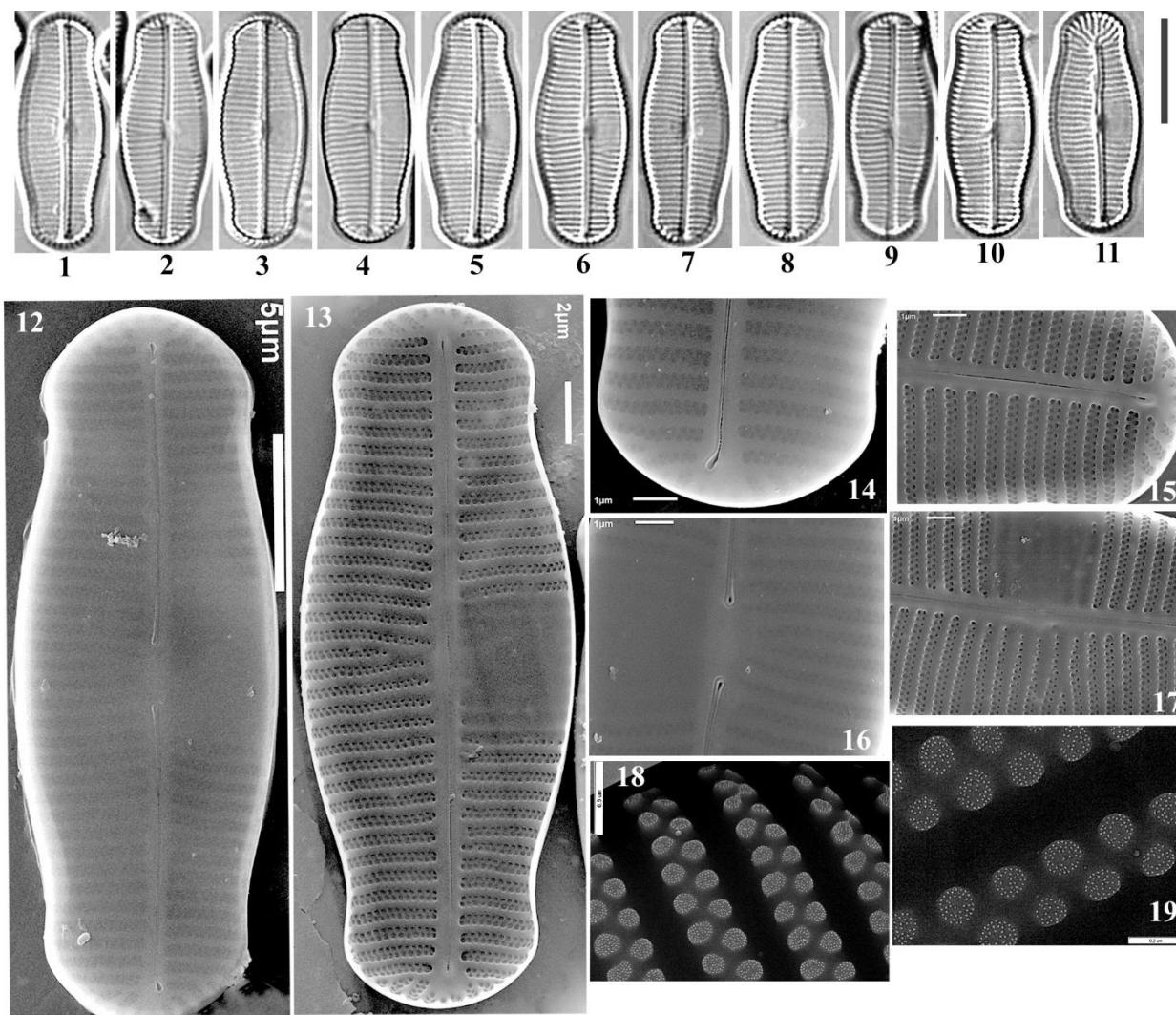


Рисунок 9. *Metzeltinia indonesica*. СМ: (1-11) – общий вид створок. Масштабная линейка 10 мкм. СЭМ: 12 – общий вид створки с внешней стороны; 13 – общий вид створки с внутренней стороны; 14 – конец створки с внешней стороны; 15 – конец створки с внутренней стороны; 16 – центральная часть створки с внешней стороны; 17 – центральная часть створки с внутренней стороны. ТЭМ: 18, 19 – ультраструктура порового аппарата. На всех фотографиях представлен штамм I70.

Третья группа *Pinnularia* (P3) с достаточной степенью достоверности (BI 100, ML 93) образуют отдельную кладу, включающую 4 штамма из GenBank: 2 представителя из вида *P. neomajor* Krammer и 2 из *P. viridiformis* Krammer, и 2 штамма, полученных нами:

вид *P. cf. genkalii* Krammer et Lange-Bertalot (B449) и *Pinnularia* sp. (B716). Вид *P. cf. genkalii* (штамм B449) имеет линейные створки, длину 130 мкм, ширину 20 мкм и практически параллельные штрихи, немного конвергентные ближе к центру (8 штрихов на 10 мкм) (рис. 8:1). Штамм B716 представлен линейными створками, длиной 106-109 мкм, шириной 15-16 мкм штрихами, радиальными к центру и конвергентными на концах (8-9 штрихов на 10 мкм) (рис. 8: 2-4). Диатомовые водоросли из данной группы (P3) характеризуются с внутренней стороны альвеолами, закрытыми с обеих сторон кремнистым слоем, что видно на световых фотографиях, как две продольных полосы с каждой стороны от шва (рис. 8: 1-4).

Виды *P. borealis* Ehrenberg и *P. brebissoni* (Kützing) Rabenhorst располагаются несколько обособленно на дереве (рис. 1), по всей видимости, из-за своих морфологических особенностей. *P. borealis* характеризуется короткими, широкими и многорядными штрихами, тогда как *P. brebissoni* имеет длинные, узкие, с небольшим количеством рядов ареол штрихи. Однако для более детальных исследований и чёткого понимания тех или иных представителей необходимо большее количество штаммов и их анализ.

Полученное филогенетическое дерево (рис. 1) включает, помимо уже известных представителей родов *Pinnularia* и *Caloneis*, новый ранее неизвестный штамм I70 (выделен красным цветом на дереве). Этот штамм является близким комплексу видов *Pinnularia/Caloneis*, однако, достоверно (BI 100, ML 78) отличается от других клад на филогенетическом дереве, а также по морфологическим параметрам он имеет явные существенные отличия (рис. 9). Таким образом, мы предлагаем описать этот штамм I70, как новый род *Metzeltinia* Andreeva, Kulikovskiy, Maltsev, Podunai gen. prov.

Таксономическое описание нового рода и вида.

Род *Metzeltinia* Andreeva, Kulikovskiy, Maltsev, Podunai gen. prov.

Этимология. Название рода *Metzeltinia* посвящено известному диатомологу и систематику Дитмару Мэтцелтину (Ditmar Metzeltin).

Типовой вид. *Metzeltinia indonesica* Andreeva, Kulikovskiy, Maltsev, Podunai sp. prov. (рис. 9).

Описание. Створки овальные с головчатыми концами (рис. 9: 1-13). Поверхность клеток плоская (рис. 9: 12, 13). Размеры створок (n=28): длина 21-23 мкм, ширина 9 мкм. Осевое поле узкое, линейное (рис. 9: 1-13). Центральное поле является прямоугольным, асимметричным, находясь на одной из полустворок (рис. 9: 1-13, 16, 17). С внешней стороны проксимальные концы шва являются каплевидными и повернуты в противоположную сторону от дистальных также каплевидных концов шва и от центрального асимметричного поля (рис. 9: 12, 14, 16). Шов является прямым, нитевидным (рис. 9: 1-13). На створке с внутренней стороны шов является непрерывным, дистальные

концы шва заканчиваются небольшой хеликтогlossой (рис. 9: 13, 15, 17). Штрихи являются узкими, двурядными, параллельными, немного радиальными к центру (рис. 9: 12-17); 16-17 штрихов на 10 мкм. Штрихи состоят из круглых ареол, покрытых мелко-перфорированным гименом с внешней стороны (рис. 9: 12, 14, 16). На створке с внутренней стороны отверстия альвеол являются полностью открытыми, а сами альвеолы являются слабо выраженными (рис. 9: 18-19). На концах штрихи радиально расходятся (рис. 9: 12-15).

Тип. Бентос и перефитон морского национального парка Вакатоби, юго-восточная часть острова Сулавеси, Индонезия. S5° 28.002' E123° 45.677'. Собрано 24.10.2014 Е.С. Гусевым (препарат № 01942/170 в коллекции ИБВВ РАН).

Этимология. Видовой эпитет соответствует месту обнаружения данного вида.

Данное исследование показало, что комплекс таксонов *Pinnularia/Caloneis* характеризуется общим морфологическим признаком - наличием альвеол у всех представителей данного комплекса. Однако границы родов *Pinnularia* и *Caloneis* поставлены под сомнение, как и в ряде других работ (Сох, 1988; Kolbe, Götz, 1943; Mann, 2001; Round et al., 1990), так как этот комплекс морфологически является гетерогенным строению порового аппарата, шва и хлоропластов.

Таким образом, нами был проведен молекулярно-генетический анализ, который позволил выявить молекулярные клады, хорошо согласующиеся с морфологическими различиями. Эти различия связаны в первую очередь со строением порового аппарата, а именно наличием или отсутствием кремнеземного слоя, закрывающего альвеолы с внутренней стороны, и самим развитием этого слоя, а также строением шва и морфологией хлоропласта. Нам удалось установить соотношение между молекулярными данными и морфологическими признаками на новых штаммах. Также был описан новый род *Metzeltinia* gen. nov. Всё вышеперечисленное позволяет выдвинуть гипотезу о необходимости масштабной ревизии родов *Pinnularia* и *Caloneis* и возможности описания ряда новых родов.

3.2. Филогенетическое положение родов *Geissleria* и *Paraplaconeis*, и значение порового аппарата в систематике

Род *Geissleria* описали в 1996 году, и в качестве типового вида был выбран таксон *Geissleria moseri* Metzeltin et al (Lange-Bertalot, Metzeltin, 1996). Данный род *Geissleria* включал таксоны из секции *Annulatae* Hustedt огромного сборного рода *Navicula* (Krammer, Lange-Bertalot, 1986). Новый таксон характеризуется одиночными клетками и двушовными, изополярными створками (Lange-Bertalot, Metzeltin, 1996; Lange-Bertalot, 2001). Шов представляет собой простую щель и не является сложно устроенным (рис. 10: 14-16; 11: 21-

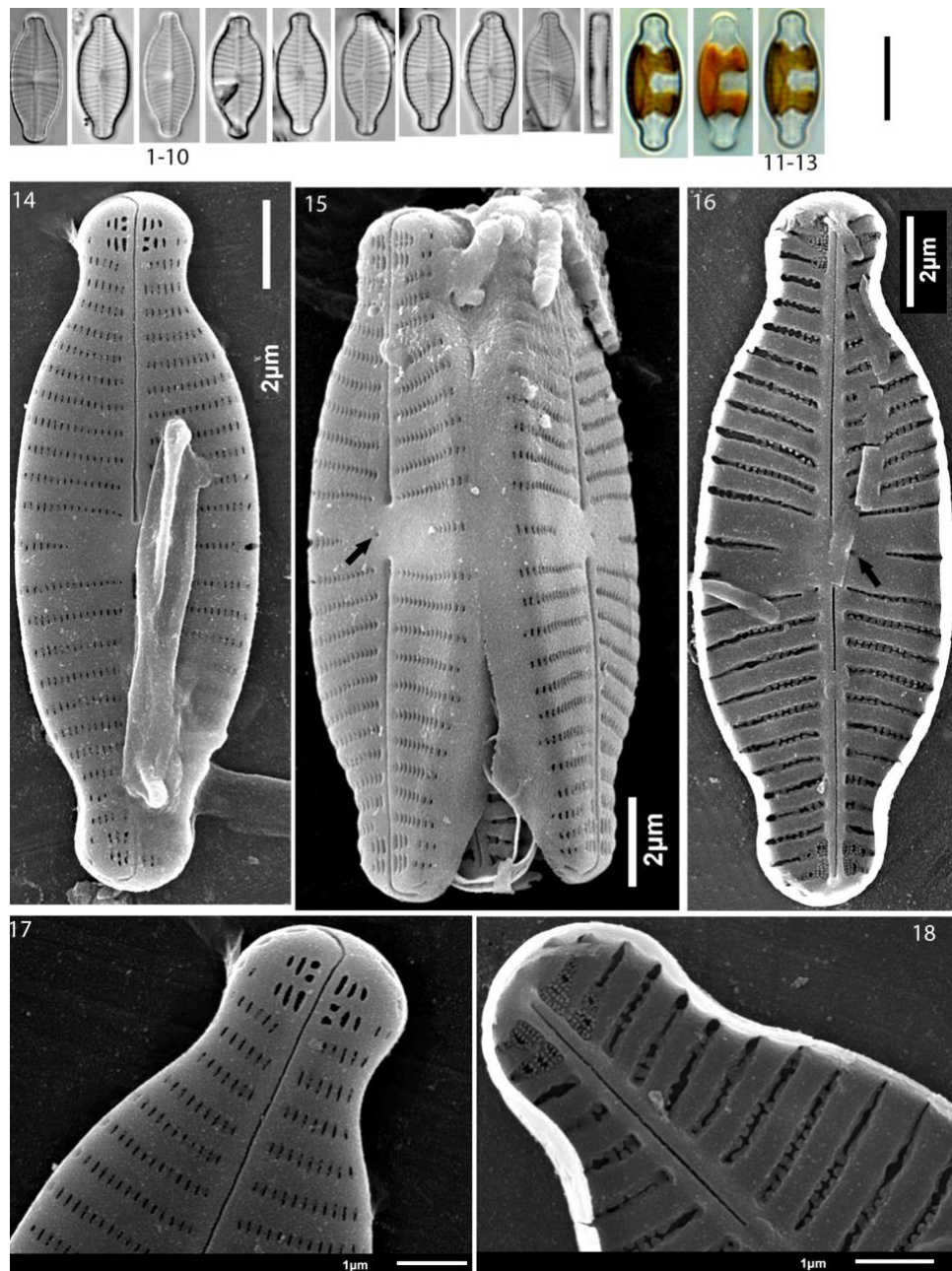


Рисунок 10. *Geissleria baicalosimilis*. СМ: (1-10) – общий вид створок; (11-13) – общий вид живых клеток. Масштабная линейка 10 мкм. СЭМ: 14, 15- общий вид створок с внешней стороны; 16 – общий вид створки с внутренней стороны; 17 – конец створки с внешней стороны; 18 – конец створки с внутренней стороны. На всех фотографиях представлен штамм В 088.

23), в отличие от шва других представителей рода *Navicula*. Многие виды обладают простой изолированной порой, близкой к центральному узелку (рис. 10: 15, 16). А самой уникальной чертой рода *Geissleria* является группа своеобразных субполярных удлиненных ареол (annulus); с внутренней стороны эти ареолы имеют многочисленные бородавчатые наросты (Lange-Bertalot, Metzeltin, 1996, Lange-Bertalot, 2001) (рис. 10: 16, 18; 11: 23).

В данной работе нам удалось выделить в культуру и затем включить в филогенетический анализ представителей рода *Geissleria*, с описанием двух новых видов, *G. baicalosimilis* Kulikovskiy, Gusev, Andreeva et Annenkova (штамм В 088) и *G. frolikhiensis*

Kulikovskiy, Gusev, Andreeva et Annenkova (штамм В 369) (Kulikovskiy et al., 2014) (рис. 10, 11).

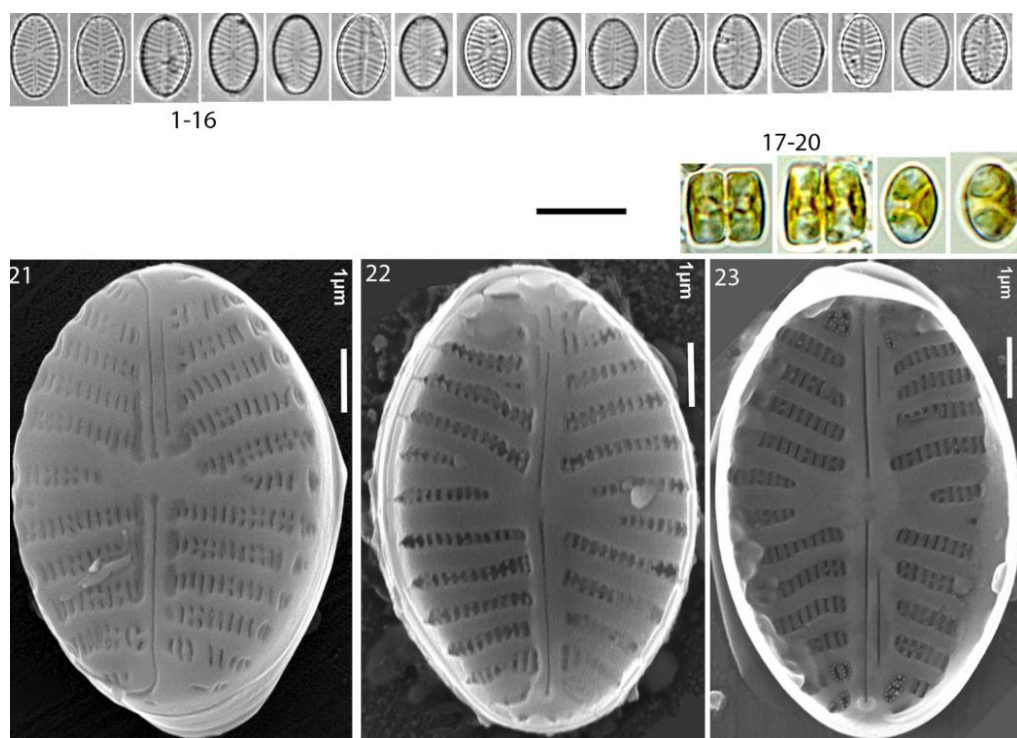


Рисунок. 11. *Geissleria frolikhiensis*. СМ: (1-16) – общий вид створок; (17-20) – общий вид живых клеток. Масштабная линейка 10 мкм. СЭМ: 21, 22- общий вид створок с внешней стороны; 23 – общий вид створки с внутренней стороны. На всех фотографиях представлен штамм В 369.

Таксономические описания новых видов.

Geissleria baicalosimilis Kulikovskiy, Gusev, Andreeva et Annenkova (рис. 10).

Описание. Створки эллиптические, с оттянутыми, головчатыми концами (рис. 10: 1-10). Размер створок: длина - 14-15,6 мкм, ширина - 5-6 мкм. Центральное поле небольшое, прямоугольное. Осевое поле узкое (рис. 10: 14-16). С внешней стороны дистальные концы шва повёрнуты в сторону вторичной полустворки и продолжаются на загибе створки, проксимальные концы шва каплевидные (рис. 10: 14, 15, 17). С внутренней стороны дистальные концы шва имеют небольшую хеликтогlossу, проксимальные концы шва простые (рис. 10: 16, 18). Шов прямой, нитевидный, с наружной стороны без видимого стернума (рис. 10: 14, 15) и с внутренней стороны погружённый в стернум (рис. 10: 16, 18). Штрихи слегка радиальные (16-17 штрихов на 10 мкм) (рис. 10: 14-18). Ареолы щелевидные (рис. 10: 14, 15, 17). Конечные ареолы представлены двумя рядами ареол с более крупными размерами, чем ареолы в штрихах, и они покрыты бородавчатыми наростами с внутренней стороны (рис. 10: 17, 18). Одна изолированная точка расположена рядом с центральным узелком (рис. 10: 15, 16). Имеется одиночный хлоропласт, поделённый на две седловидных

пластины, лежащих по обеим створкам и соединённых перешейком, который лежит напротив пояска (рис. 10: 11-13).

Тип. Обрастания на дереве, погружённом в воду, лужа рядом с заливом, в 8 км от деревни Энхалук, озеро Байкал, Россия. N52°27.042 E106°53.215. Собрано 14.07.2011 М.С. Куликовским (препарат №18589/B088 в коллекции ИБВВ РАН).

Этимология. Видовой эпитет данного вида соответствует его сходству с видом *Geissleria similis* (Krasske) Lange-Bertalot et Metzeltin и месту обнаружения.

Результаты наблюдений. Вид *G. baicalosimilis* очень похож на вид *G. similis*. Однако легко отличить данные виды друг от друга по количественным и качественным характеристикам. Вид *G. baicalosimilis* имеет большее количество штрихов в 10 мкм (16–17, а не 15) и ареол в 10 мкм штриха (65–70, а не 60), чем *G. similis*. У вида *G. similis* штрихи в центральной области длинные и практически достигают центрального узелка. Также у представителей вида *G. similis* только по две удлинённых поры (одна есть в каждом штрихе), тогда как *G. baicalosimilis* имеет шесть или более удлинённых пор.

Geissleria frolikhiensis Kulikovskiy, Gusev, Andreeva et Annenkova (рис. 11).

Описание. Створки от эллиптических до линейно-эллиптических с тупо закруглёнными концами (рис. 11: 1-16). Размер створок: длина – 8-9 мкм, ширина - 5 мкм. Центральное поле небольшое, прямоугольное. Осевое поле узкое, линейное. С внешней и внутренней сторон осевое поле представлено небольшим стернумом (рис. 11: 21-23). С наружной стороны центральные концы шва каплевидные, дистальные концы шва повёрнуты в одну сторону к вторичной полустворке и продолжают на загибе створки (рис. 11: 21-22). С внутренней стороны центральные концы шва простые, дистальные концы шва имеют небольшую хеликтогlossу (рис. 11: 23). Шов прямой, нитевидный (рис. 11: 21-23). Штрихи радиальные (18-20 штрихов на 10 мкм) и представлены одним рядом удлинённых ареол. Ареолы являются щелевидными (70 ареол. На концах ареолы удлинённые и с бородавчатыми наростами (рис. 11: 21-23). Изолированная пора отсутствует. Имеется одиночный хлоропласт, поделённый на две седловидных пластины, лежащих по обеим створкам и соединённых перешейком, который лежит напротив пояска (рис. 11: 17-20).

Тип. Фитопланктон, озеро Фролиха, Россия. N55°27.005 E109°58.649. Собрано 26.07.2012 М.С. Куликовским (препарат № 80/B369 в коллекции ИБВВ РАН).

Этимология. Видовой эпитет соответствует месту обнаружения данного вида.

Результаты наблюдений. Вид *G. frolikhiensis* похож на *Geissleria acceptata* (Hustedt) Lange-Bertalot et Metzeltin, но отличается относительно большими и более овальными створками (а не линейно-овальными). *G. acceptata* имеет изолированную пору, структуру,

отсутствующую у вида *G. frolikhiensis*. (Novais et al., 2013). *G. irregularis* Kulikovskiy et al из озера Байкал отличается асимметричными створками. Похожих видов в Байкале больше не известно.

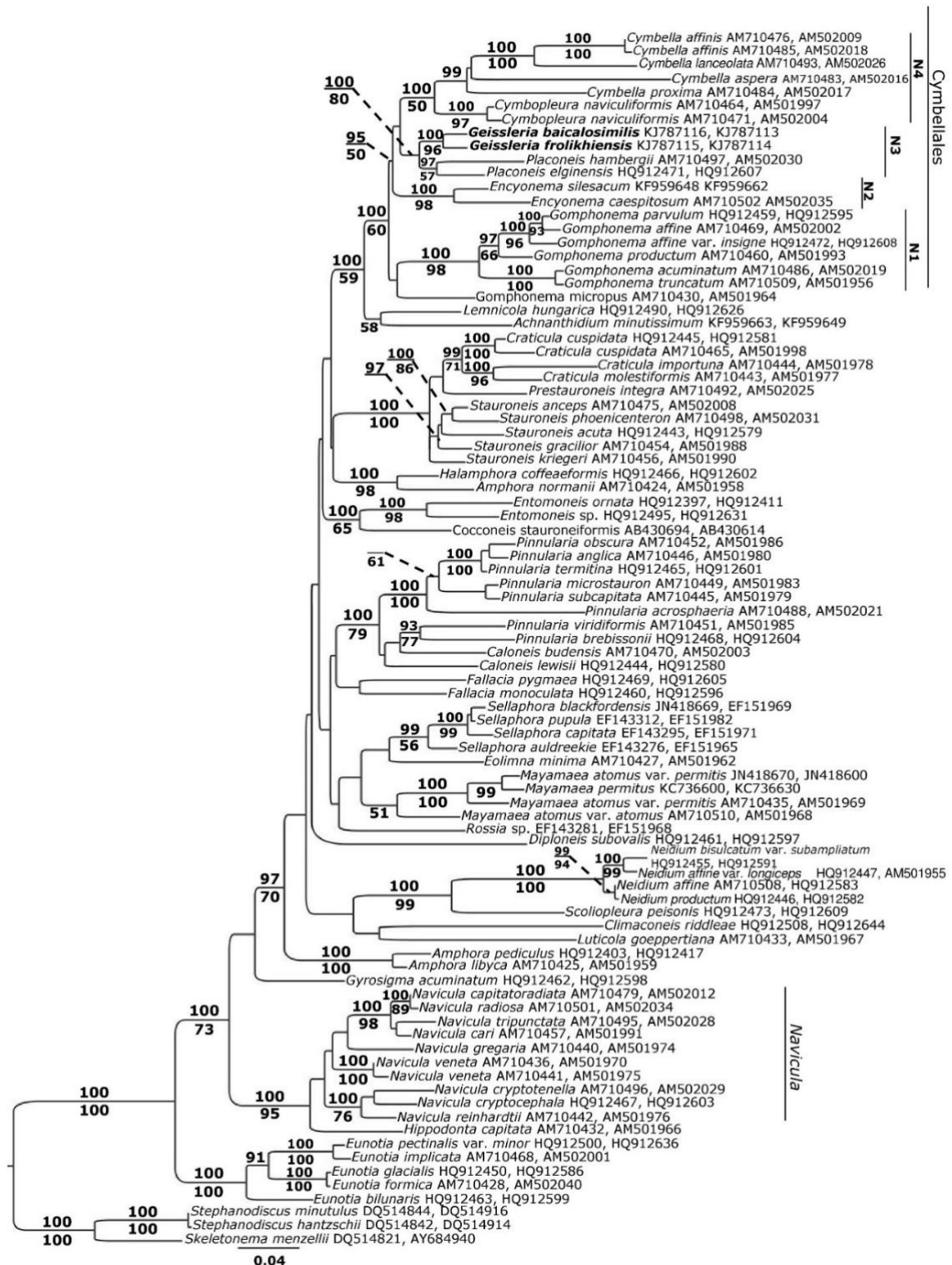


Рисунок 12. Филогенетическое дерево, построенное на основе региона V4 18S рРНК и фрагмента гена *rbcL*. Цифры на ветвях соответствуют апостериорным вероятностям (снизу, < 50 не показаны) и значениям бутстреп-анализа (сверху, < 90 не показаны). Полу жирный шрифт применён для штаммов, нуклеотидные последовательности которых получены нами.

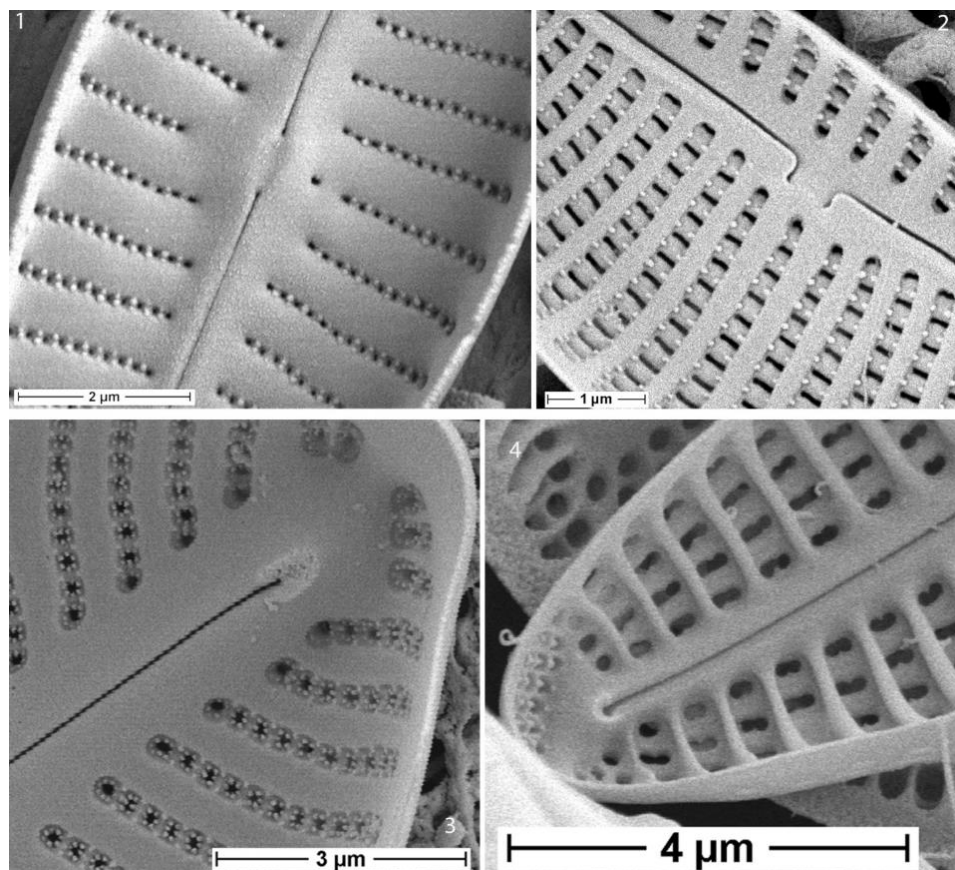


Рисунок 13. СЭМ: 1 - *Geissleria* sp., центральная часть створки с внутренней стороны; 2 - *Encyonema* sp., центральная часть створки с внутренней стороны; 3 - *Placoneis* sp., конец створки с внутренней стороны; 4 - *Cymbella* sp., конец створки с внутренней стороны. Фотографии любезно предоставлены М,С Куликовским.

Ланге-Берталот (Lange-Bertalot, 2001) полагал, что систематическое положение рода *Geissleria* должно быть внутри навикулоидных диатомовых водорослей. Однако другие исследователи (Novais et al., 2013) считали, что отсутствие внутреннего гимена, покрывающего ареолы и представленного в *Navicula sensu stricto*, а также присутствие дополнительных маленьких подпорок между ареолами сближает род *Geissleria* с цимбеллоидными диатомовыми водорослями. Такие черты, как наличие изолированной поры в центральной области, а также отсутствие внутреннего ребра, типичного для *Navicula*, у видов рода *Geissleria* показывают, что род *Geissleria* не должен быть помещён в семейство Naviculaceae. За исключением навикулоидной симметрии, которая есть и у *Geissleria*, и у *Navicula*, все остальные морфологические черты *Geissleria* типичны для цимбеллоидных таксонов (Kulikovskiy et al., 2012, 2014).

Был проведён молекулярно-генетический анализ представителей рода *Geissleria* на основе баркодингового региона V4 18S рРНК и фрагмента хлоропластного гена *rbcL* (рис.

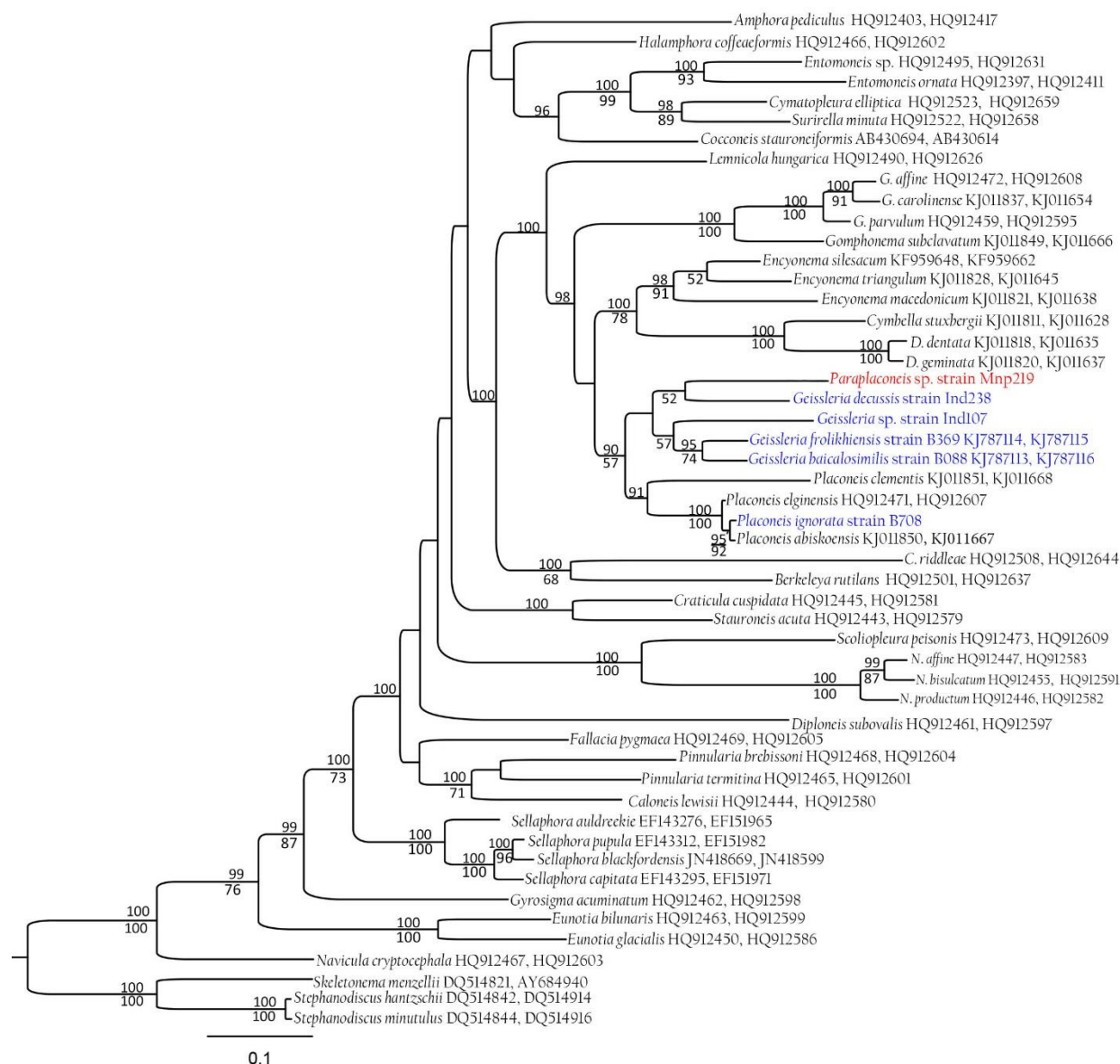


Рисунок 14. Филогенетическое дерево, построенное на основе региона V4 18S рРНК и фрагмента гена *rbcL*. Цифры на ветвях соответствуют апостериорным вероятностям (снизу, < 50 не показаны) и значениям бутстреп-анализа (сверху, < 90 не показаны). Красным и синими цветами выделены штаммы, нуклеотидные последовательности которых получены нами.

12). Два новых вида (*G. baicalosimilis* и *G. frolikhiensis*) различаются как морфологически, так и генетически. Генетическая дистанция между 18 рРНК фрагментами (422 пн) составила 0.012, тогда как между *rbcL* фрагментами (912 пн) - 0.022. В построенное дерево были включены виды из навикулоидных, одношовных и цимбеллоидных групп (всего 88 последовательностей). В качестве внешней группы были взяты виды *Stephanodiscus minutulus*, *S. hantzschii* и *Skeletonema menzellii*. Виды рода *Geissleria* попали в крупную кладу Symbellales с высокой степенью достоверности (ML 60, BI 100). Внутри этой клады образовалось четыре группы с хорошей поддержкой: группа с представителями рода *Gomphonema* (ML 98, BI 100, клада N1, без *Gomphonema micropus* Kützing), группа с представителями рода *Encyonema* (ML 98, BI 100, клада N2) и группа с цимбеллоидными

диатомеями (ML 50; BI 100, клада N4), а также группа, включающая виды родов *Placoneis* и *Geissleria* (ML 80, BI 100, клада N3). Таким образом, было показано, что род *Geissleria* принадлежит к гомфо-цимбеллоидным диатомеям, а ближайшим родственным таксоном является род *Placoneis*.

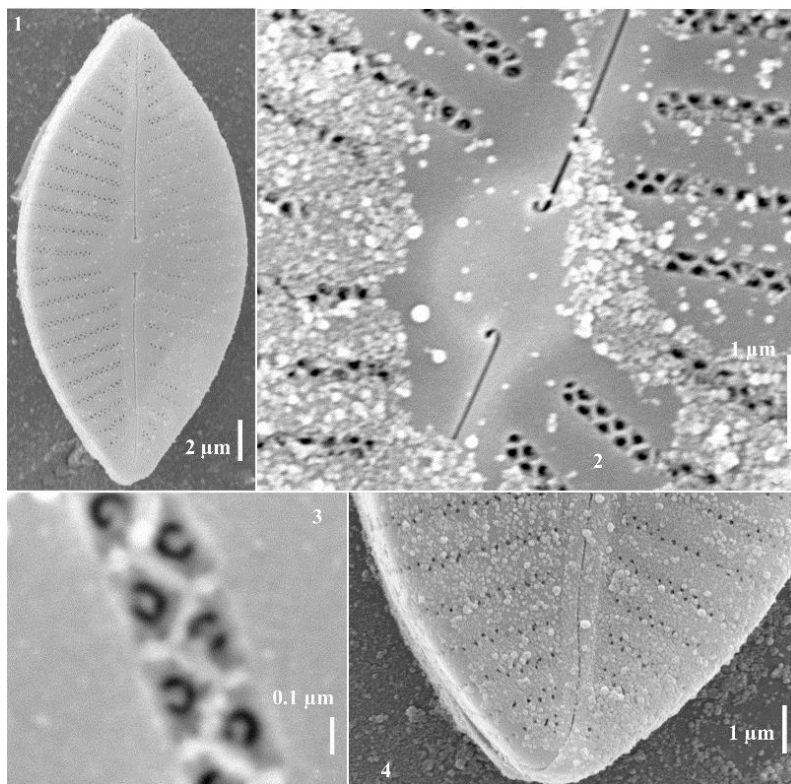


Рисунок 15. *Paraplaconeis kornevae* Kulikovskiy, Gusev et Lange-Bertalot. СЭМ: 1 – общий вид створки с внешней стороны; 2 – центральная часть створки с внутренней стороны; 3 – детальный вид штриха с внутренней стороны; 4 – конец створки с внешней стороны. На всех фотографиях представлен штамм В033.

Похожая ситуация характерна и для видов рода *Placoneis*. Они также имеют навикулоидную симметрию, и долгое время рассматривались внутри рода *Navicula sensu lato* (Cox, 1987). Однако род *Placoneis* отличается от навикулодных диатомовых водорослей и филогенетически является близким цимбеллоидным диатомеям на основе структуры порового аппарата, морфологии хлоропласта и типа полового процесса (Round et al., 1990; Bruder, Medlin 2007; Kermarrec et al., 2011). К.С. Мережковский (Mereschkowsky, 1903a) описал род *Placoneis* именно на основе структуры хлоропласта, которая похожа на хлоропласт рода *Geissleria* (рис. 10: 11-13; 11: 17-20): большой, одиночный хлоропласт, поделённый на две седловидных пластины, лежащих по обеим створкам и соединённых перешейком, который лежит напротив пояска (Cox, 1987; Round et al., 1990). Сейчас представителей рода *Placoneis* рассматривают в цимбеллоидных диатомовых водорослях (Round et al., 1990).

Специфичной чертой цимбеллоидных родов является структура ареол. Род *Geissleria* обладает такой же структурой ареол (прямые щелевидные поры без гимена), как у *Symbella* и *Encyonema* (Cox, 2004) (рис. 13). Наличие подпорок на внутренней стороне ареол является типичным для цимбеллоидных диатомовых водорослей, таких как *Symbella*, *Encyonema*, *Symbopleura* и *Placoneis* (Krammer, 2003; Cox 2004) (рис. 13). В родах *Geissleria*, *Encyonema* и *Symbopleura* подпорки расположены на рёбрах между щелевидными ареолами (рис. 13).

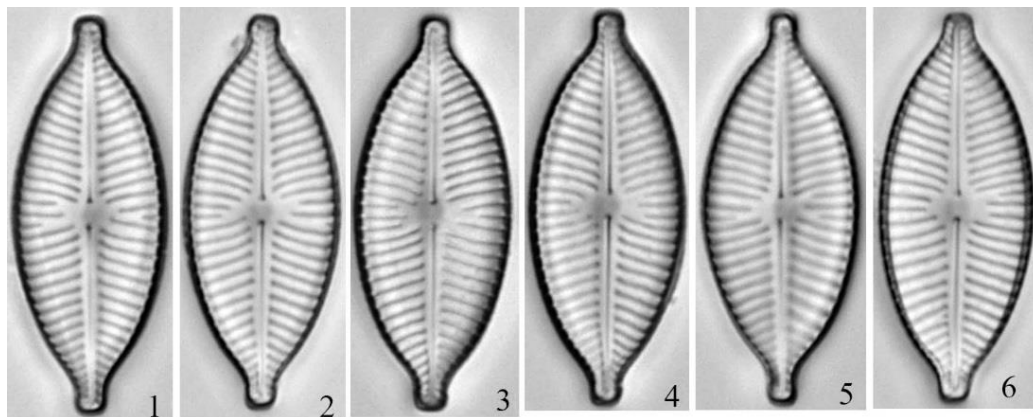


Рисунок 16. *Paraplaconeis* sp. СМ: (1-6) – общий вид створок. Масштабная линейка 10 мкм. На всех фотографиях представлен штамм Mnp 219.

Подпорки представлены по краям конечных ареол в роде *Geissleria* (рис. 10: 16, 18; 11: 23). Эти бочонкообразные подпорки совпадают с подпорками по краям ареол в незакрытых порах рода *Placoneis* (рис. 13: 3). В роде *Placoneis* эти подпорки покрыты округлыми кремнезёмными бляшками, и такой тип порового аппарата называется тектулюмом (tectulum, что значит маленькая крыша) (Cox, 2004). Похожего типа подпорки характерны для пор в поровых полях рода *Symbella*.

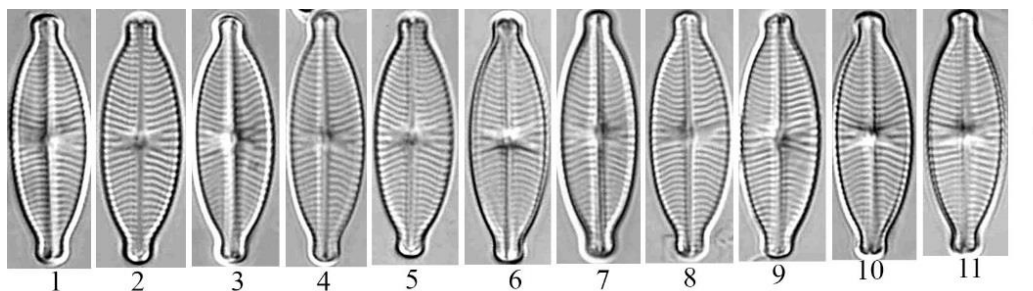


Рисунок 17. *Geissleria decussis*. СМ: (1-11) - общий вид створок. Масштабная линейка 10 мкм. На всех фотографиях представлен штамм Ind 238.

Выделение рода *Paraplaconeis* (Kulikovskiy et al., 2012) из рода *Placoneis* позволило разграничить представителей рода *Placoneis sensu lato* по характерным признакам порового аппарата (рис. 15). В род *Paraplaconeis* были помещены виды, имеющие двурядные штрихи, каждая ареола в которых отделена прямоугольными перекладинами, расположенными зигзагообразно (рис. 15: 2, 3). Внутри каждой ареолы имеется копьёобразный вырост, различимый при высоком разрешении электронного микроскопа (рис. 15: 3). Наличие

перекладин, разделяющих ареолы с внутренней стороны, объединяет этот род с родами *Cymbella* и *Encyonema*, а выросты внутри ареол с родом *Gomphonema*.

В данной работе рассмотрено филогенетическое положение представителя рода *Paraplaconeis* (штамм Mnp 219) с использованием собственных данных (6 штаммов), а также с привлечением данных из GenBank (45 штаммов). В качестве внешней группы были взяты виды *Stephanodiscus hantzschii*, *S. minutulus* и *Skeletonema menzellii*. Штамм Mnp 219 характеризуется ланцетными створками с оттянутыми концами (рис. 16). Данный штамм имеет длину 31-33 мкм и ширину 12 мкм. Шов прямой, нитевидный. Дистальные концы шва повернуты в одну сторону, к загибу створки. Проксимальные концы шва являются каплевидными и повернуты в ту же сторону, что дистальные. Осевое поле узкое, расширяющееся к центру. Центральное поле овальное. Штрихи двурядные, радиальные (11 штрихов в 10 мкм).

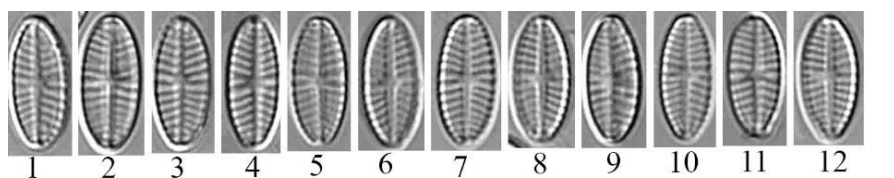


Рисунок 18. *Geissleria* sp. SM: (1-12) – общий вид створок. Масштабная линейка 10 мкм. На всех фотографиях представлен штамм Ind 107.

Филогенетический анализ показал с достаточной степенью достоверности (BI 90, ML 57), что штамм, представляющий род *Paraplaconeis*, явно является независимым от рода *Placoneis* и, по всей видимости, близким представителям из рода *Geissleria*. Было показано, что перечисленные роды формируют общую группу с гомфо-цимбеллоидными диатомеями, представленными родами *Gomphonema*, *Encyonema*, *Cymbella*, *Didymosphenia* M. Schmidt. (рис. 14).

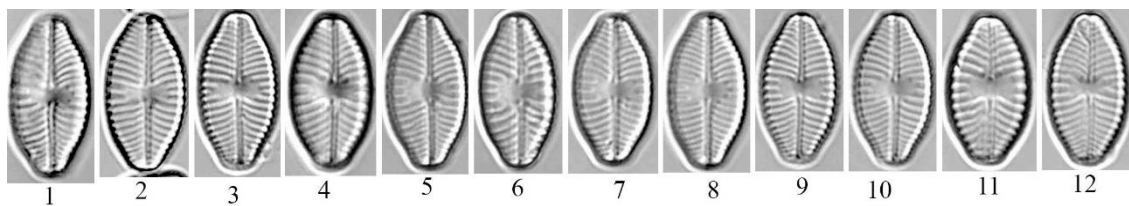


Рисунок 19. *Placoneis ignorata*. SM: (1-12) общий вид створок. Масштабная линейка 10 мкм. На всех фотографиях представлен В 708.

Род *Geissleria* представлен 4 собственными штаммами: *G. baicalosimilis* (В 360) (рис 10), *G. frolikhiensis* (В 088) (рис. 11), *G. decussis* (Østrup) Lange-Bertalot et Metzeltin (Ind 238) (рис. 17) и *Geissleria* sp. (Ind 107) (рис. 18). Характеристика штаммов В 360 и В 088 представлена выше. Клетки штамма Ind 238 (рис. 17) характеризуются ланцетными створками с головчатыми концами, длиной 22 мкм и шириной 7 мкм. Шов прямой, нитевидный. Осевое поле узкое, линейной. Центральное поле овальное. Штрихи

однорядные, радиальные (18 штрихов в 10 мкм). Штамм Ind 107 (рис. 18) имеет овальные створки, длиной 10-11 мкм и шириной 4 мкм. Осевое поле узкое, линейное. Центральное поле небольшое, овальное. Штрихи однорядные, радиальные (16 штрихов в 10 мкм).

Род *Placoneis* представлен тремя штаммами из GenBank и одним собственным: *Placoneis ignorata* (Schimanski) Lange-Bertalot (B 708). Штамм B 708 характеризуется ланцетными створками с клиновидными концами, длиной 14-17 мкм и шириной 7-9 мкм. Шов прямой, нитевидный. Осевое поле узкое, линейное. Центральное поле овальное. Штрихи однорядные, радиальные (16 штрихов в 10 мкм) (рис. 19).

Таким образом, впервые показано, что представители родов *Geissleria* и *Paraplaconeis* относятся к цимбеллоидным диатомовым водорослям, несмотря на навикулоидную симметрию. Это подтверждено молекулярными данными и морфологическими особенностями, а именно структурой порового аппарата (наличие тектулюма) и морфологией хлоропластов.

Полученные данные подтверждают мнение Манна и Э. Кокс (Mann, 1981; Cox, 2004, 2012) о том, что сходство в строении порового аппарата имеет важное значение в систематике диатомовых водорослей, а симметрия панциря не играет важной роли.

3.3. Филогенетическое положение диатомовых водорослей из родов *Diadesmis* и *Humidophila*

Род *Diadesmis* был описан в 1844 году. Позднее в данный род были переведены бывшие виды рода *Navicula*, так что до последнего момента род *Diadesmis* содержал около 75 таксонов (Fourtanier, Kociolek, 2011). При описании рода *Diadesmis* не был указан голотип, таким образом, в качестве типового вида был выбран *Diadesmis confervaceae* Kützing (Round et al., 1990). Но часть видов данного рода морфологически отличалась от типового, что позволило поместить гетерогенную группу видов сначала в подрод *Paradiadesmis* Lange-Bertalot et Le Cohu (Rumrich et al., 2000), а затем описать новый род *Humidophila* (Lowe et al., 2014). Однако данный род *Humidophila* был выделен исключительно на основе морфологических данных, без проведения молекулярно-генетического анализа. Таким образом, исследования филогенетического положения рода *Humidophila* были необходимы для оценки обоснованности выделения этого рода. Что и было сделано в данной работе с использованием морфологических и молекулярно-генетических данных.

Проведенные микроскопические исследования с использованием световой и сканирующей электронной микроскопии показали, что выделенные штаммы принадлежат таксонам, представленным в таблице 3.

Таблица 3. Штаммы, использованные в работе

Номер штамма	Вид	Номер в GenBank (18S рРНК)	Номер в GenBank (<i>rbcL</i>)
В 360	<i>Humidophila frolihiensis</i>	KU570061	KU951589
Ind 124	<i>Diadesmis gomphonemoides</i>	KU570063	KU951591
VN 333	<i>Diadesmis paraconfervaceae</i>	KU951585	KU951596
VN 408	<i>Diadesmis paraconfervaceae</i>	KU951586	KU951595
VN 407	<i>Diadesmis paraconfervaceae</i>	KU951597	KU951594
Ind 24	<i>Diadesmis confervaceae</i>		
Ind 265	<i>Diadesmis confervaceae</i>	KU570064	KU951592

В данной работе было предложено к описанию три новых вида: *Humidophila frolihiensis* Andreeva, Kulikovskiy et Gusev sp. prov., *Diadesmis gomphonemoides* Kulikovskiy, Andreeva et Glushchenko sp. prov и *D. paraconfervaceae* Kulikovskiy, Andreeva et Gusev sp. prov.

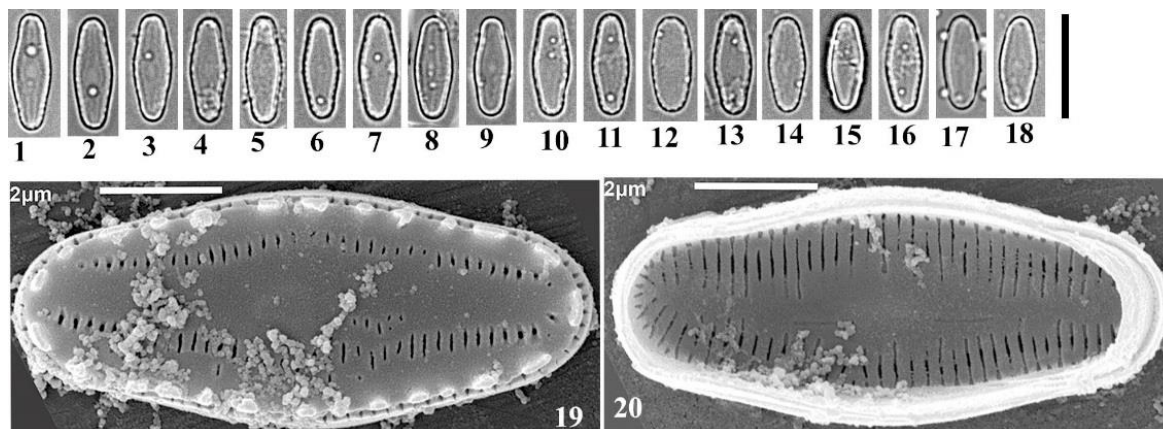


Рисунок 20. *Humidophila frolihiensis*. СМ: (1-18) – общий вид створок. Масштабная линейка 10 мкм. СЭМ: 19 – общий вид створки с внешней стороны; 20 – общий вид створки с внутренней стороны. На всех фотографиях представлен штамм В 360.

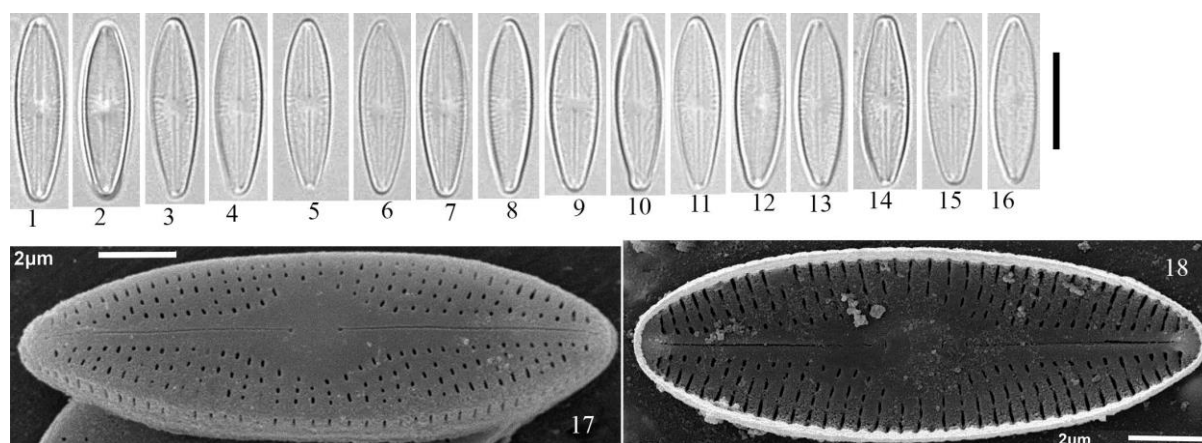


Рисунок 21. *Diadesmis gomphonemoides*. СМ: (1-16) – общий вид створок. Масштабная линейка 10 мкм. СЭМ: 17 – общий вид створки с внешней стороны. 18 – Общий вид створки с внутренней стороны. На всех фотографиях представлен штамм Ind 124.

Таксономические описания новых видов.

Humidophila frolihiensis Andreeva, Kulikovskiy et Gusev sp. nov.

Описание. Створки овальные со слегка оттянутыми круглыми концами (рис. 20:1-18). Размер створок: длина - 9-11 мкм, ширина - 3,5-4 мкм. Поверхность створки плоская. Осевое поле широкое, расширяющееся в средней части ближе к загибу створки (рис. 20: 19-20). Шов у большей части створок редуцирован (рис. 20: 19). Если шов есть, то прямой, щелевидный (рис. 20: 20). По краю створки имеются соединительные шипы для формирования колоний (рис. 20: 19). Штрихов 50 на 10 мкм, представлены удлиненными одиночными ареолами, покрытыми с внутренней стороны плоским гименом (рис. 20: 19-20).

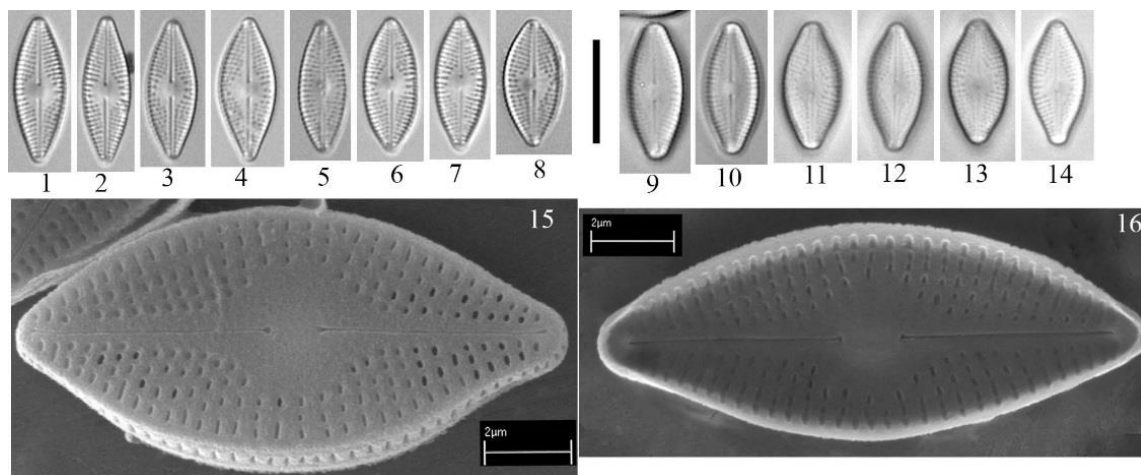


Рисунок 22. *Diadesmis paraconfervaceae*. СМ: (1-14) – общий вид створок ((1-8) – штамм VN 333, (9-14) – штамм VN 407). Масштабная линейка 10 мкм. СЭМ: 15 – общий вид створки с внешней стороны; 16 – общий вид створки с внутренней стороны (штамм VN333).

Тип. Фитопланктон, озеро Фролиха, Россия. N55°27.005 E109°58.649. Собрано 26.07.2012 М.С. Куликовским (препарат № 80/В360 в коллекции ИБВВ РАН).

Этимология. Видовой эпитет соответствует месту обнаружения данного вида.

Diadesmis gomphonemoides Kulikovskiy, Andreeva et Glushchenko sp. nov.

Описание. Створки имеют ланцетные створки с клиновидными концами (рис. 21: 1-18). Размер створок: длина - 17-19 мкм, ширина - 4,5-5 мкм. Осевое поле узкое, расширяющееся к центру, центральное поле ланцетное. Шов прямой, нитевидный (рис. 21: 17-18). Наружные проксимальные концы шва каплевидные (рис. 21: 17). Внутренние проксимальные концы шва Т-образные (рис. 21: 18). Наружные дистальные концы прямые (рис. 21: 17). Внутренние дистальные концы шва простые, заканчиваются небольшой хеликтогlossой (рис. 21: 18). Штрихи радиальные, 30 штрихов в 10 мкм, 3-4 ареолы в пределах штриха. В средней части створки штрихи укорочены и радиально расположены, 25 штрихов в 10 мкм, 2 ареолы в штрихе (рис. 21: 17-18). Ареолы удлиненные, овальные,

округлые, неправильной формы. На загибе створки имеются одиночные удлиненные ареолы (рис. 21).

Тип. Фитопланктон, пруд, остров Южный Сулавеси, S2° 54.585' E119° 53.014'. Собрано в ноябре 2014 года Е.С. Гусевым (препарат №01831/Ind124 в коллекции ИБВВ РАН).

Этимология. Видовой эпитет соответствует гомфонемоидной форме данного таксона.

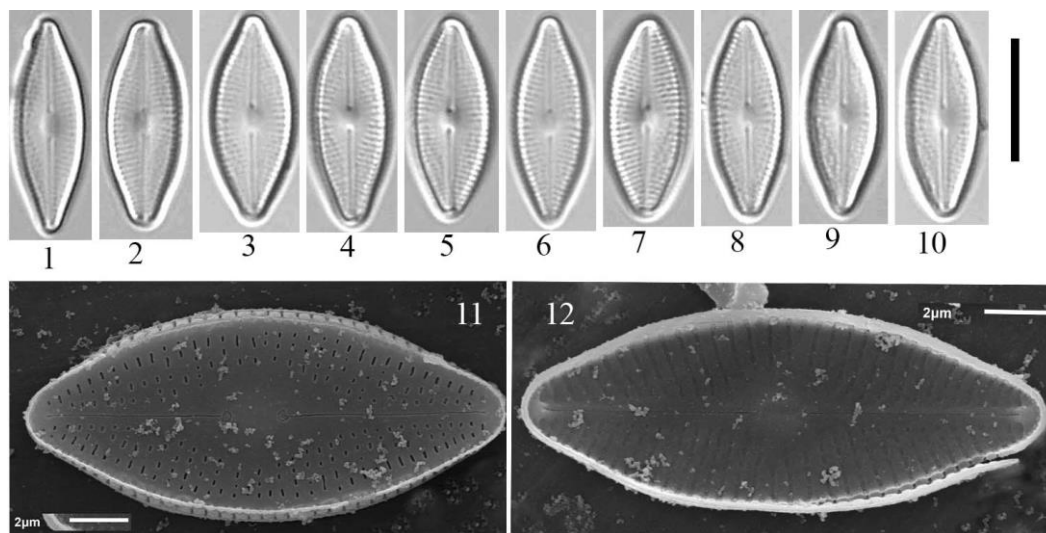


Рисунок 23. *Diadesmis confervaceae*. СМ: (1-10) – общий вид створок. Масштабная линейка 10 мкм. СЭМ: 11 – общий вид створки с внешней стороны; 12 – общий вид створки с внутренней стороны. На всех фотографиях представлен штамм Ind 24.

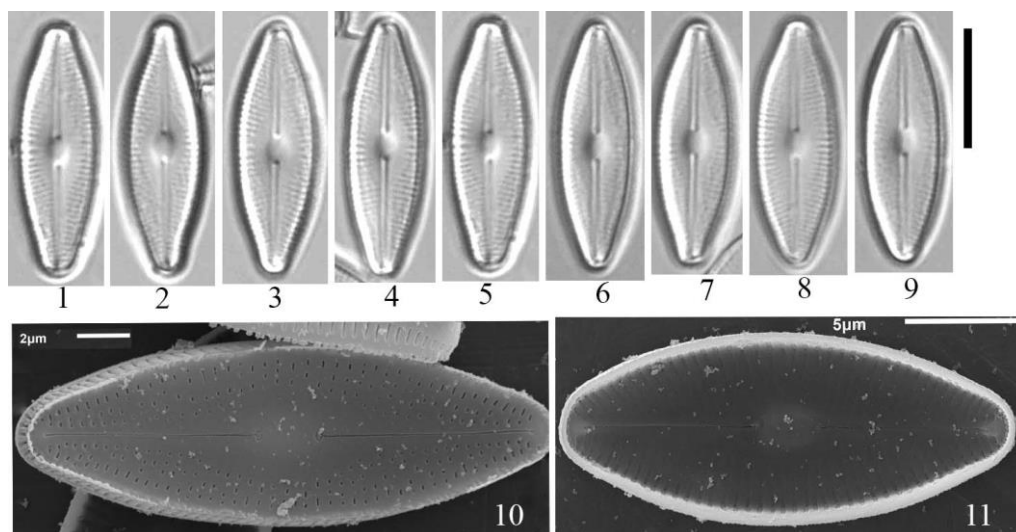


Рисунок 24. *Diadesmis confervaceae*. СМ: (1-9) – общий вид створок. Масштабная линейка 10 мкм. СЭМ: 10 – общий вид створки с внешней стороны; 11 – общий вид створки с внутренней стороны. На всех фотографиях представлен штамм Ind 265.

Diadesmis paraconfervaceae Kulikovskiy, Andreeva et Gusev sp. prov.

Описание. Створки являются овальными с оттянутыми концами (рис. 22: 1-14). Размер створок: длина - 14-16 мкм, ширина - 5-6 мкм. Центральное поле крупное, круглое, осевое поле линейное. Шов прямой, нитевидный (рис. 22: 15, 16). Наружные проксимальные концы шва каплевидные (рис. 22: 15). Внутренние проксимальные концы шва также

каплевидные (рис. 22: 16). Наружные дистальные концы прямые (рис. 22: 15). Внутренние дистальные концы шва простые, заканчиваются небольшой хеликтогlossой (рис. 22: 16). Штрихи радиальные, 20 штрихов в 10 мкм, 3-4 ареолы в пределах штриха. В средней части створки штрихи укорочены, 2-4 ареолы в штрихе. Ареолы овальные или неправильной формы (рис. 22: 15, 16). На загибе створки имеются одиночные удлиненные ареолы (рис. 22: 15).

Тип. Временный водоём, национальный парк Катъен, Вьетнам. Собрано 22.11.2010 Е.С. Гусевым (препарат VN333 в коллекции ИБВВ РАН).

Этимология. Видовой эпитет соответствует видовому эпитету другого близкого вида *Diadasmus confervaceae*.

Результаты наблюдений. Вид *D. paraconfervaceae* отличается от вида *D. confervaceae* количеством штрихов. У *D. paraconfervaceae* их 20 на 10 мкм, а у *D. confervaceae* – 25 штрихов на 10 мкм.

Также в работе были использованы 3 штамма *D. confervaceae* (штаммы Ind 24, Ind 265), клетки которых характеризуется овальными створками с оттянутыми концами, у Ind 24 15-17 мкм длиной и 5-7 мкм шириной (рис. 23: 1-10), у Ind 265 19-21,5 мкм длиной и 5,5-7 мкм шириной, соответственно (рис. 24: 1-9). Центральное поле крупное, круглое, переходящее в осевое поле, сужающееся к концам. Шов прямой, нитевидный (рис. 23: 11, 12; 24: 10, 11). Наружные проксимальные концы шва в виде епископского посоха (рис. 23: 11; 24: 10). Внутренние проксимальные концы шва крючковидные (рис. 23: 12; рис. 24: 11). Наружные дистальные концы прямые (рис. 23: 11; 24: 10). Внутренние дистальные концы шва простые, заканчиваются небольшой хеликтогlossой (рис. 23: 12; рис. 24: 11). Штрихи радиальные, 25 штрихов в 10 мкм, 3-4 ареолы в пределах штриха; в средней части створки штрихи укорочены, 2-3 ареолы в штрихе; у концов штрихи чаще расположены, 30 штрихов 10 мкм. Ареолы овальные, округлые, неправильной формы (рис. 23: 11, 12; 24: 10, 11). На загибе створки имеются одиночные удлиненные ареолы (рис. 23: 11; 24: 10).

Таким образом, представители рода *Diadasmus* характеризуются однорядными штрихами, состоящими из 3-4 ареол, тогда как у диатомей из рода *Humidophila* в составе штриха всего одна удлиненная ареола. Именно структура порового аппарата послужила основой для описания нового рода *Humidophila* (Lowe et al., 2014).

Нами было построено филогенетическое дерево на основе хлоропластного гена *rbcL* и баркодингового региона V4 18S рРНК с использованием последовательностей 7 собственных штаммов (выделены красным цветом, рис. 25), а также 39 последовательностей из GenBank (идентификационные номера нуклеотидных последовательностей после

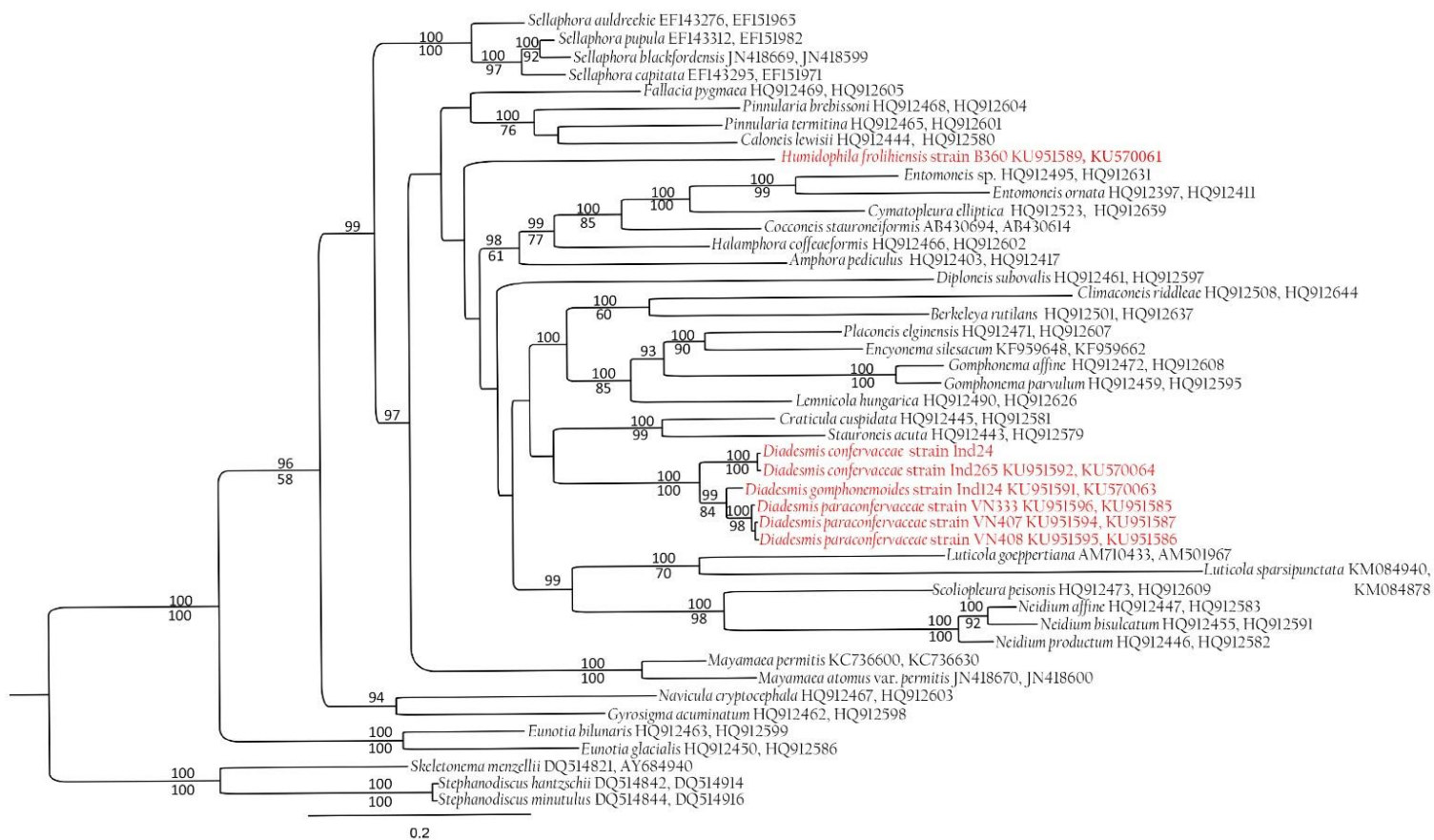


Рисунок 25. Филогенетическое дерево, построенное на основе фрагмента гена *rbcL* и региона V4 18S рРНК. Цифры на ветвях соответствуют апостериорным вероятностям (снизу, < 50 не показаны) и значениям бутстреп-анализа (сверху, < 90 не показаны). Красным цветом выделены штаммы, нуклеотидные последовательности которых получены нами.

видовых названий, рис. 25). *Stephanodiscus minutulus*, *S. hantzschii* и *Skeletonema menzellii* были использованы в качестве внешней группы. Последовательности ДНК длиной 374 - 435 н., исследованные в данной работе, депонированы в базе данных GenBank (номера последовательностей представлены в таблице 3).

Согласно филогенетическому дереву диатомовые водоросли из родов *Diadlesmis* и *Humidophila* не образуют единую группу (рис. 25, выделены красным цветом). Штаммы, представляющие род *Diadlesmis* с достаточной степенью достоверности (ML 100, BI 100) образуют независимую кладу. При этом внутри данной клады четко выделяются три чётких группы, соответствующие трём разным видам: *Diadlesmis gomphonemoides*, *D. confervaceae* и *D. paraconfervaceae*. Вид *Humidophila frolihiensis* (штамм В 360) располагается отдельно от представителей рода *Diadlesmis*. Такая независимость клад свидетельствует о том, что выделение нового рода *Humidophila* из рода *Diadlesmis* подтверждается не только морфологическими особенностями, но и молекулярно-генетическими критериями. Также это свидетельствует о невозможности включения представителей рода *Humidophila* в одно семейство Diadlesmidaceae с родом *Diadlesmis*. Отсутствие близких таксонов, на основе

молекулярных данных, а также морфологические различия ставят вопрос о необходимости описания нового семейства для рода *Humidophila*.

3.4. Филогенетическое положение представителей из рода *Aneumastus*

Род *Aneumastus* был описан в 1990 году (Round et al., 1990), типовым видом которого является *A. tusculus* (Ehrenberg) Mann et Stickle (рис. 26). Представители этого вида характеризуются одиночными клетками с Н-образным хлоропластом. Они имеют навикулоидные овальные створки с головчатыми концами (рис. 26: 1-6). Вид *A. tusculus* (штамм Мпр 71) имеет длину 46 мкм и ширину 16-17 мкм (рис. 26: 1-4). Поверхность створки плоская (рис. 26: 5). Осевое поле узкое, линейное; центральное поле расширенное, прямоугольное (рис. 26: 5, 6, 8). Штрихи радиальные (10 штрихов в 10 мкм) (рис. 26: 1-6).

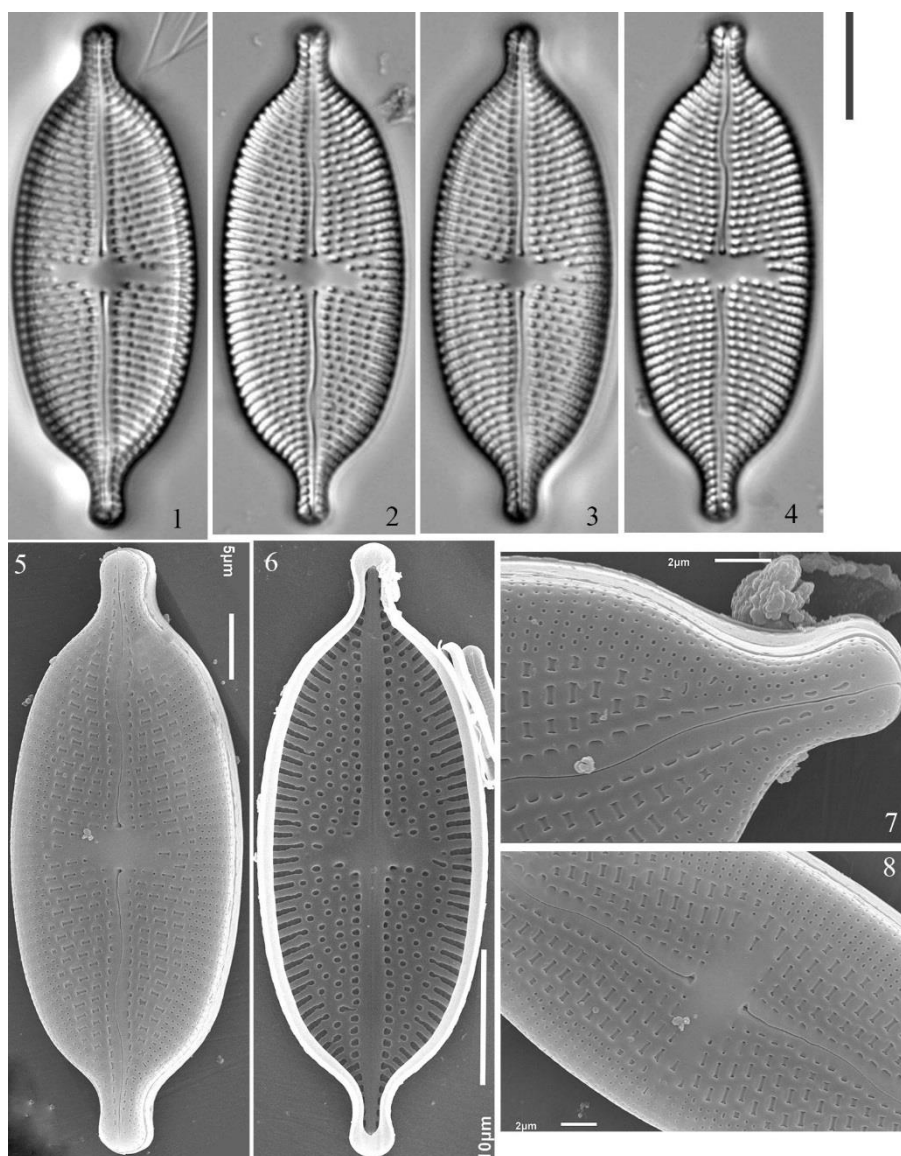


Рисунок 26. *Aneumastus tusculus*. СМ: (1-4) – общий вид створок. Масштабная линейка 10 мкм. СЭМ: 5 – общий вид створки с внешней стороны; 6 – общий вид створки с внутренней стороны; 7 – конец створки с внешней стороны; 8 – центральная часть створки с внешней стороны. На всех фотографиях представлен штамм Мпр 71.

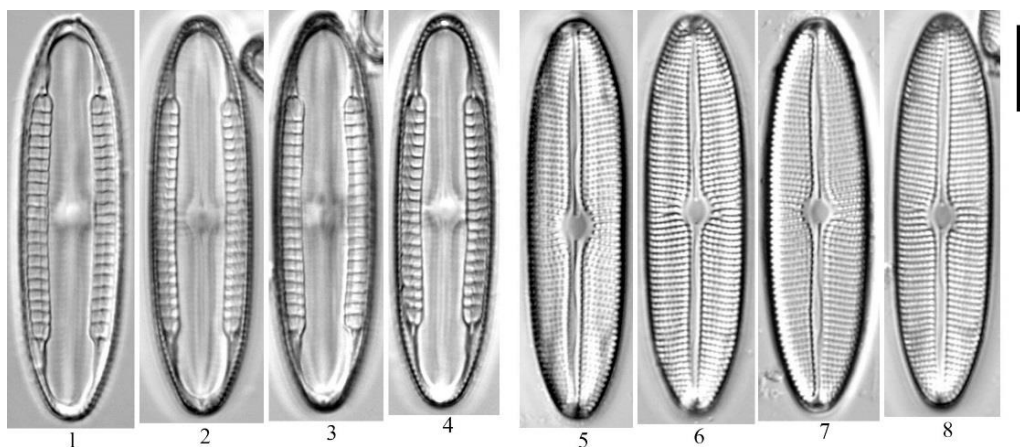


Рисунок 27. *Mastogloia dansei*. СМ: (1-8) – общий вид створок с внешней стороны. Масштабная линейка 10 мкм. На всех фотографиях представлен штамм Ind 427.

С наружной стороны ближе к центральной зоне штрихи являются однорядными, и ареолы щелевидные, тогда как ближе к загибу створки штрихи двурядные, и ареолы мелкие, круглые (рис. 26: 5, 7, 8). С внутренней стороны штрихи везде являются однорядными, а ареолы удлинёнными ближе к загибу створки и округлыми ближе к центральной области (рис. 26: 6). Такая структура порового аппарата является отличительной особенностью данного рода. Шов нитевидный, не прямой (рис. 26: 5, 7, 8). Дистальные концы шва с внешней стороны извилистые (рис. 26: 5, 7). Проксимальные концы шва с внешней стороны каплевидные и повёрнуты к противоположному направлению от направления дистальных концов шва (рис. 26: 5, 8). Характеристика, представленная выше для вида *A. tusculus*, без сомнения, соответствует всему роду *Aneumastus*.

Долгое время род *Aneumastus* помещался в род *Navicula*. Но такие характеристики, как структура шва и порового аппарата, а также морфология хлоропласта сближают представителей рода *Aneumastus* с родом *Mastogloia* Thwaites (Hajos, 1973). Это было отражено в системе Раунда с соавторами (Round et al., 1990), согласно которой род *Aneumastus* помещён вместе с родом *Mastogloia* (рис. 27) в семейство Mastogloiaceae порядка Mastogloiales. Однако у видов рода *Aneumastus* нет камер (партект), выступающих внутрь клетки от первого вставочного ободка (вальвокопулы) и имеющих у диатомей из рода *Mastogloia* (рис. 27: 1-4). Также представители рода *Aneumastus* в основном пресноводные, тогда как род *Mastogloia* включает морские и солоноватоводные таксоны. Тем не менее это не мешает им быть близкими родственниками по морфологическим признакам.

До настоящего времени не изучалось филогенетическое положение диатомовых водорослей из рода *Aneumastus*. В данной работе удалось выделить в культуру один штамм типового вида *A. tusculus* и проанализировать его положение по двум генам (*rbcL* и 18S

рРНК) (выделен красным цветом, рис. 28). Также были использованы 38 последовательностей из GenBank, из которых 3 в качестве внешней группы: *Stephanodiscus minutulus*, *S. hantzschii* и *Skeletonema menzellii* (идентификационные номера нуклеотидных последовательностей после видовых названий, рис. 28).

Филогенетический анализ показал, что род *Aneumastus* с высокой степенью достоверности (BI 100, ML 99) близок роду *Mastogloia*. Таким образом, нами впервые изучено филогенетическое положение рода *Aneumastus* и подтверждено мнение (Round et al., 1990), что два рассматриваемых рода являются родственными и должны быть помещены в одно семейство.

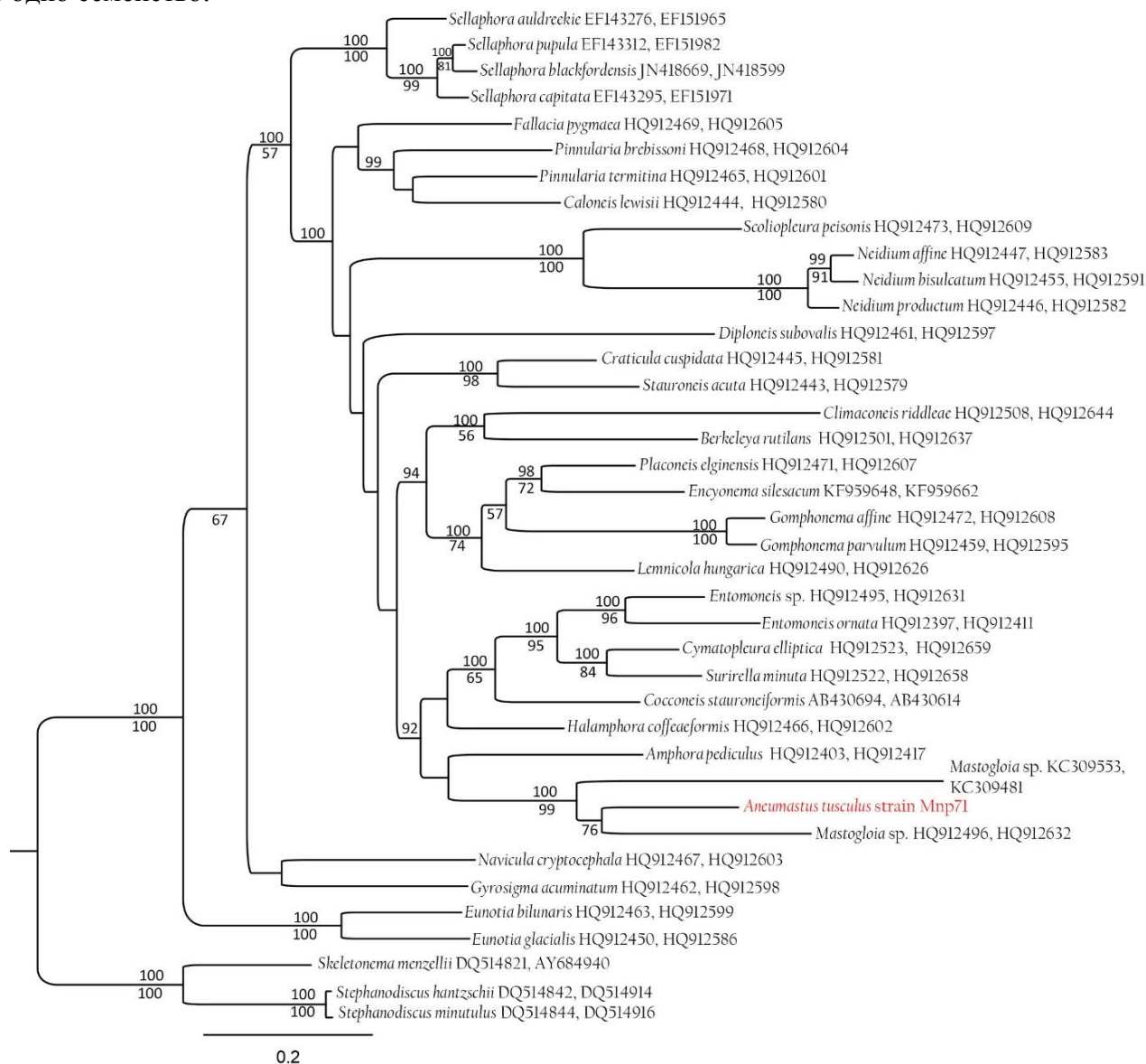


Рисунок 28. Филогенетическое дерево, построенное на основе фрагмента гена *rbcL* и региона V4 18S рРНК. Цифры на ветвях соответствуют апостериорным вероятностям (снизу, < 50 не показаны) и значениям бутстреп-анализа (сверху, < 90 не показаны). Красным цветом выделен штамм, нуклеотидные последовательности которого получены нами.

3.5. Филогенетическое положение представителей из рода *Seminavis*

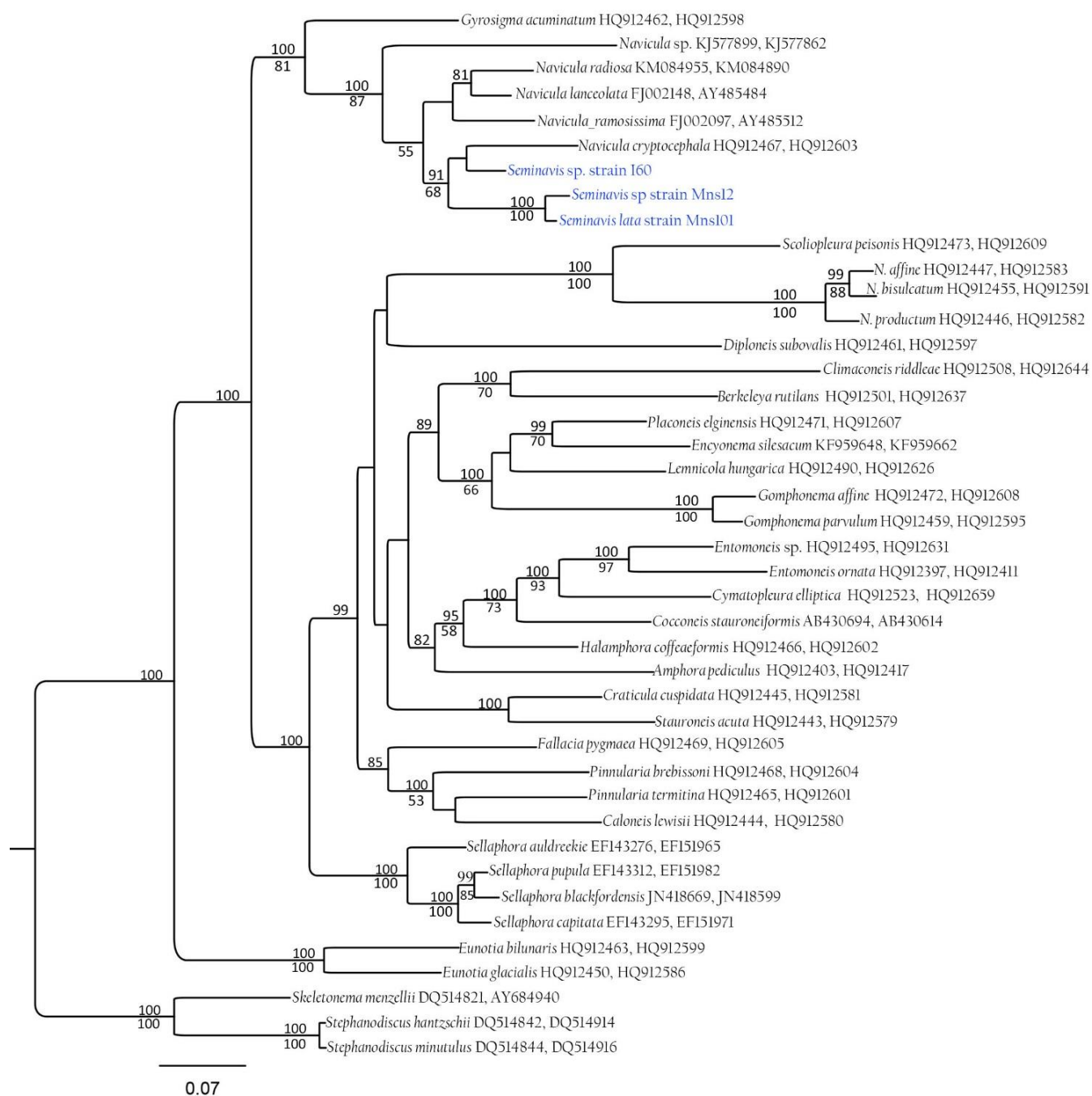


Рисунок 29. Филогенетическое дерево, построенное на основе фрагмента гена *rbcL* и региона V4 18S рРНК. Цифры на ветвях соответствуют апостериорным вероятностям (снизу, < 50 не показаны) и значениям бутстреп-анализа (сверху, < 80 не показаны). Синим цветом выделены штаммы, нуклеотидные последовательности которых получены нами.

Дорсивентральный род *Seminavis* был описан в 1990 году, и в качестве типового вида был выбран *Seminavis gracilenta* Mann (Round et al., 1990). Искусственность рода *Amphora*, из которого был выделен род *Seminavis* (Danielidis, Mann, 2002, 2003; Round et al., 1990), была известна более ста лет (Cleve, 1895; Mereschkovsky, 1903b), однако ревизия этого рода откладывалась долгое время (Mann, 1994b). Неестественность рода *Amphora* связывалась с

тем, что разные группы таксонов внутри этого рода имеют разную морфологию панциря и хлоропластов, поясковую структуру и ауксоспорообразование (Round et al., 1990; Mann, 1993, 1994b) и, по всей видимости, связаны с довольно разными шовными диатомеями. Единственное, что объединяло все эти группы, это строгая дорсивентральность. В большинстве случаев пока ещё неизвестно с какими именно шовными диатомовыми водорослями связаны эти группы (Danielidis, Mann, 2002). Однако для рода *Seminavis* является бесспорным тот факт, что он относится к семейству Naviculaceae (Round et al., 1990), включающего также роды *Navicula*, *Trachyneis* Cleve, *Pseudogomphonema* Medlin, *Rhoikoneis* Grunow, *Haslea* и *Cymatoneis* Cleve. Общими чертами между родами *Seminavis* и *Navicula* являются морфология хлоропластов и пиреноидов, структура шва и поясков, штрихи и ауксоспорообразование (Cox, 1999; Mann, 1989; Mann, Stickle, 1989; Round et al., 1990). Также общие черты есть у *Seminavis* и с другими представителями семейства Naviculaceae (Cox, 1999; Medlin, 1985, 1991; Medlin, Round, 1986; Round et al., 1990).

Ранее уже изучалось филогенетическое положение представителей рода *Seminavis*, и было показано, что род *Seminavis* является близким роду *Navicula* (Evans et al., 2008). Для нас также представляется интересным изучить филогенетическое положение рода *Seminavis* с использованием новых штаммов. Нам удалось выделить в культуру и включить в филогенетический анализ 3 штамма, представляющих данный род (штаммы I 60, Mns 12, Mns 101) (на дереве выделены синим цветом, рис. 29).

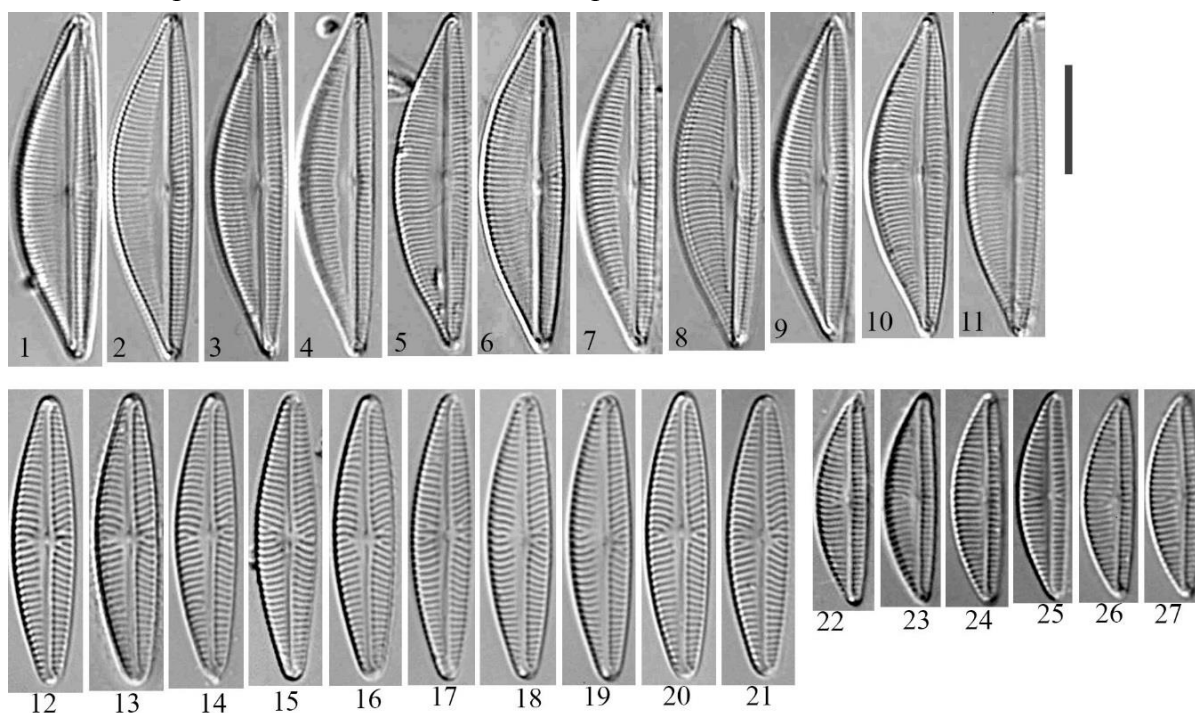


Рисунок 30. СМ: (1-11) – общий вид створок *Seminavis* sp. (штамм I 60); (12-21) – общий вид створок *Seminavis* sp. (штамм Mns 12); (22-27) – общий вид створок *Seminavis lata* (штамм Mns 101). Масштабная линейка 10 мкм.

Все штаммы имеют дорсивентральные створки (рис. 30). Представленные клетки характеризуются узким осевым полем, немного расширенным в центральной области. Клетки штамма I 60, представляющие *Seminavis* sp., имеют длину 32-34 мкм и ширину 7-8 мкм, параллельные штрихи, 20 штрихов в 10 мкм (рис. 30: 1-11). Клетки штамма Mns 12, представленные *Seminavis* sp., обладают длиной 28-29 мкм, шириной 6 мкм, радиальными штрихами (16 штрихов в 10 мкм) (рис. 30: 12-21). Клетки штамма Mns 101 представляют *Seminavis lata* и характеризуются длиной 20 мкм, шириной 5 мкм, радиальными штрихами (16 штрихов в 10 мкм).

Филогенетическое дерево было построено на основе хлоропластного гена *rbcL* и баркодингового участка V4 18S рРНК с использованием, помимо наших штаммов, 39 последовательностей из GenBank (идентификационные номера нуклеотидных последовательностей представлены на дереве после видовых названий, рис. 29). Филогенетический анализ показал, что представители дорсивентрального рода *Seminavis* с достаточной степенью достоверности (BI 100, MI 87) образуют общую кладу с диатомеями из изополярного рода *Navicula*, что свидетельствует о резонности размещения родов *Navicula* и *Seminavis* в одном семействе Naviculaceae.

Однако проведённый молекулярно-генетический анализ ставит под сомнение целесообразность выделения *Seminavis* из рода *Navicula sensu stricto*. Два этих рода различаются только симметрией панциря и створок, по всем остальным параметрам они сходны (Danielidis, Mann, 2002, 2003). Таким образом, данные показывают, что использование дорсивентральности не является столь важным признаком при описания новых таксонов на родовом уровне.

ВЫВОДЫ

1. Филогенетический анализ представителей родов *Pinnularia* и *Caloneis* поставил под сомнение существующие границы этих таксонов на основе морфологии порового аппарата, шва и хлоропластов и показал возможность соотнесения молекулярно-генетических данных с морфологическими.
2. На основе морфологии порового аппарата и первых молекулярно-генетических данных предложено описание нового рода *Metzeltinia* gen. nov. из рода *Pinnularia*.
3. Впервые показано, что представители родов *Geissleria* и *Paraplaconeis* относятся к цимбеллоидным диатомовым водорослям, несмотря на навикулоидную симметрию панциря. Это подтверждено молекулярными данными и морфологическими особенностями, а именно структурой порового аппарата и морфологией хлоропластов. Описано два новых для науки вида из рода *Geissleria*: *G. baicalosimilis* и *G. frolikhiensis*.
4. Подтверждена обоснованность выделения рода *Humidophila* из рода *Diadesmis* на основе молекулярно-генетических данных. Предложено к описанию три новых для науки вида: *Diadesmis gomphonemoides* sp. nov., *D. paraconfervaceae* sp. nov. и *Humidophila frolihiensis* sp. nov.
5. Впервые выделен в культуру штамм рода *Aneumastus* и проведён его молекулярно-генетический анализ. На основе морфологических и молекулярно-генетических данных показана целесообразность включения рода *Aneumastus* в семейство Mastogloiaceae.
6. Проведённый молекулярно-генетический анализ с использованием новых штаммов из дорсивентрального рода *Seminavis* ставит под сомнение использование дорсивентральности как важного признака при описания новых таксонов навикулоидных диатомовых водорослей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Глезер З.И., Макарова И.В., Моисеева А.И., Николаев В.А. (ред.). Диатомовые водоросли СССР (ископаемые и современные). Т. II. Вып. 1. 1988. Л.: Наука. 116 с.
- Макарова И.В. Классификация диатомовых водорослей на современном этапе и проблема построения их филогенетической системы. *Ботанический журнал*. 1986. Т. 71, №6. С. 713-722.
- Мережковский К.С. К морфологии диатомовых водорослей. 1903. Казань: Типолитография Императорского Университета. 430 с.
- Abarca N. Jahn R., Zimmermann J., Enke N. Does the cosmopolitan diatom *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing have a biogeography? *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9. Iss. 1. P. 1-8.
- Adl S.M., Leander B.S., Simpson A.G.B., Archibald J.M., Anderson O.R., Bass D., Bowser S.S., Brugerolle G., Farmer M.A., Karpov S., Kolisko M., Lane C.E., Lodge D.J., Mann D.G., Meisterfeld R., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S.E., Smirnov A.V., Spiegel F. Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst. Biol.* 2007. Vol. 56. P. 684–689.
- Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G.U.Y., Fensome R.A., Fredericq S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis, L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., McCourt R.M., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S.E., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F.W., Taylor M.F.J.R. The new higher-level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukar. Microbiol.* 2005. Vol. 52. P. 399–451.
- Alverson A.J., Cannone J.J., Gutell R.R., Theriot E.C. The evolution of elongate shape in diatoms. *J. Phycol.* 2006. Vol. 42. P. 655–668.
- Alverson A.J., Kolnick L. Intragenomic nucleotide polymorphism among small subunit (18S) rDNA paralogs in the diatom genus *Skeletonema* (Bacillariophyta). *J. Phycol.* 2005. Vol. 41. P. 1248–1257.
- Alverson A.J., Theriot E.C. Comments on recent progress toward reconstructing the diatom phylogeny. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2005. Vol. 5. P. 57-62.
- Alverson A.J., Jansen R.K., Theriot E.C. Bridging the Rubicon: Phylogenetic analysis reveals repeated colonization's of marine and fresh waters by thalassiosiroid diatoms. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2007. Vol. 45. P. 193–210.
- Amato A., Kooistra W.H.C.F., Levialdi Ghirona J.H., Mann D.G., Proschold T., Montresor M. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist.* 2007. Vol. 158. P. 193-207.
- Andersen R.A. Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae. *A. J. Bot.* 2004. Vol. 91. Iss. 10. P. 1508-1522.
- Behnke A., Friedl T., Chepurinov V. A., Mann D. G. Reproductive compatibility and rDNA analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). *J. Phycol.* 2004. Vol. 40. P. 193–208.
- Bessey C.E. The modern conception of the structure and classification of diatoms, with a revision of the tribes and a rearrangement of the North American Genera. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 1900. Vol. 21. P. 61–86.
- Beszteri B., Acs E., Makk J., Kovacs G., Marialigeti K., Kiss K.T. Phylogeny of six naviculoid diatoms based on 18S rDNA sequences. *I. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. Vol. 51. P. 1581-1586.
- Bhattacharya D., Medlin L.K., Wainwright P.O., Ariztia E.V., Bibeau C., Stickel S.K., Sogin M.L. Algae containing chlorophyll- a, b, c are paraphyletic: molecular evolutionary analysis of the Chromophyta. *Evolution.* 1992. Vol. 46. P. 1801–1817.
- Bruder K., Medlin L. K. Molecular assessment of phylogenetic relationships in selected species/genera in naviculoid diatoms. I. The genus *Placoneis*. *Nova Hedwigia.* 2007. Vol. 85. P. 331-352.
- Bruder K., Medlin L.K. Morphological and molecular investigations of naviculoid diatoms. II. Selected genera and families. *Diat. Res.* 2008a. Vol. 23. Iss. 2. P. 283-329.
- Bruder K., Medlin L.K. Morphological and molecular investigations of naviculoid diatoms. III. *Hippodonta* and *Navicula* s.s. *Diat. Res.* 2008b. Vol. 23. Iss. 2. P. 331-347.

- Bruder K., Sato S., Medlin L.K. Morphological and molecular investigations of naviculoid diatoms. IV. *Pinnularia* vs. *Caloneis*. *Diat. Res.* 2008. Vol. 24. P. 8-24.
- Cavalier-Smith T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *I. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. Vol. 52. Iss. 2. P. 297-354.
- Cavalier-Smith T. Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *Eur. J. Protist.* 2003. Vol. 39. Iss. 4. P. 338-348.
- Chantangsi C., Lynn D.H., Brandl M.T., Cole J.C., Hetrick N., Ikononi P. Barcoding ciliates: a comprehensive study of 75 isolates of the genus *Tetrahymena*. *I. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. Vol. 57. P. 2412–2425.
- Chepurnov V.A., Mann D.G., Sabbe K., Vyverman W. Experimental studies on sexual reproduction in diatoms. *I. Review Cyt.* 2004. Vol. 237. P. 91–154.
- Cleve P.T. Synopsis of the naviculoid diatoms. Part I. Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar. 1894. 194 pp.
- Cleve P.T. Synopsis of the naviculoid diatoms. Part II. Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar. 219 pp.
- Cox E.J. *Placoneis* Mereschkowsky: the re-evaluation characterized by its chloroplast type. *Diat. Res.* 1987. Vol. 2. P. 145-157.
- Cox E.J. Variation within the genus *Pinnularia* Ehrenb.: further evidence for the use of live material in diatom systematics? In: Proceedings of the 9th International Diatom Symposium, Bristol. 1988. P. 437–447.
- Cox E.J. Studies on the diatom genus *Navicula* Bory. VIII. Variation in valve morphology in relation to the generic diagnosis based on *Navicula tripunctata* (O.F. Müller) Bory. *Diat. Res.* 1999. Vol. 14. Iss. 2. P. 207-237.
- Cox E.J. *Placoneis* Mereschkowsky (Bacillariophyta) revisited: resolution of several typification and nomenclatural problems, including the generitype. *Bot. J. Linn. Soc.* 2003. Vol. 141. P. 53-83.
- Cox E.J. Pore occlusion in raphid diatoms – a reassessment of their structure and terminology, with particular reference to members of the Cymbellales. *Diat. Res.* 2004. Vol. 20. P. 33-46.
- Cox E.J. Ontogeny, homology, and terminology – wall morphogenesis as an aid to character recognition and character state definition for pennate diatom systematics. *J. Phycol.* 2012. Vol. 48. P. 1-31.
- Cox E.J., Ross R. The striae of pennate diatoms. In: Proc. 6th Diatom Symposium. 1981. P. 267-278.
- Cox E. J., Williams D. M. Systematics of naviculoid diatoms, the interrelationships of some taxa with a stauros. *Eur. J. Phycol.* 2000. Vol. 35. P. 273-282.
- Cox E.J., Williams D.M. Systematics of naviculoid diatoms (Bacillariophyta): a preliminary analysis of protoplast and frustule characters for family and order level classification. *Syst. Biodivers.* 2006. Vol. 4. P. 385-399.
- Danielidis D.B., Mann D.G. The systematics of *Seminavis* (Bacillariophyta): the lost identities of *Amphora angusta*, *A. ventricosa* and *A. macilenta*. *Eur. J. Phycol.* 2002. Vol. 37. P. 429-448.
- Danielidis D.B., Mann D.G. New species and new combinations in the genus *Seminavis* (Bacillariophyta). *Diat. Res.* 2003. Vol. 18. Iss. 1. P. 21-39.
- Daughjerg N., Andersen R.A. A molecular phylogeny of the heterokont algae based on analyses of chloroplast-encoded *rbcL* sequence data. *J. Phycol.* 1997. Vol. 33. P. 1031-1041.
- Edlund M.B., Stoermer E.F. Ecological, evolutionary, and systematic significance of diatom life histories. *J. Phycol.* 1997. Vol. 33. P. 897-918.
- Ehara M., Inagaki Y., Watanabe K.I., Ohama T. Phylogenetic analysis of diatom *coxI* genes and implications of a fluctuating GC content on mitochondrial genetic code evolution. *Curr. Genet.* 2000. Vol. 37. P. 29-33.
- Ehrenberg C.G. Mittheilungen über 2 neue asiatische Lager fossiler Infusorien-Erden aus dem russischen Trans-Kaukasien (Grusien) und Sibirien. Bericht über die zur Bekanntmachung geeigneten Verhandlungen der Königlich-Preussischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin. 1843. P. 43-49.
- Evans K. M., Wortley A. H., Mann, D. G. An assessment of potential diatom “barcode” genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist.* 2007. Vol. 158. P.349-364.

- Evans K.M., Wortley A.H., Simpson G.E. A molecular systematic approach to explore diversity within the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). *J. Phycol.* 2008. Vol. 44. P. 215–231
- Fourtanier E., Kociolek J.P. 2011. Catalogue of Diatom Names. <http://research.calacademy.org/research/diatoms/names/Index.asp>.
- Fox M.G., Sorhannus U.M. RpoA: a useful gene for phylogenetic analysis in diatoms. *J. Eukar. Microbiol.* 2003. Vol. 50. P. 471–475.
- Frommolt R., Werner S., Paulsen H., Goss R., Wilhhelm C., Zauner S., Maier U.G., Grossman A.R., Bhattacharya D., Lohr M. Ancient recruitment by chromists of green algal genes encoding enzymes for carotenoid biosynthesis. *Mol. Biol. Evol.* 2008. Vol. 25. P. 2653–2657.
- Guillard R.R.L., Lorenzen C.J. Yellow-green algae with chlorophyllide c. *J. Phycol.* 1972. Vol. 8. P. 10–14.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New Algorithms and methods to estimate Maximum-Likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 2010. Vol. 59. Iss. 3. P. 307–321.
- Ichinomiya M., Yoshikawa S., Kamiya M., Ohki K., Takaichi S., Kuwata A. Isolation and characterization of Parmales (Heterokonta/Heterocontophyta/Stramenopiles) from the Oyashio region, Western North Pacific. *J. Phycol.* 2011. Vol. 47. P. 144–151.
- Hajos M. Diatomees du Pannonien Inferieur provenant di basin Neogene de Csakvar. *Acta Bot. Acad. Sci. Hung.* 1973. Vol. 18. P. 95–118.
- Hustedt F. Bacillariophyta (Diatomeae). In: A. Pascher (ed.), Die Süßwasser-Flora Mitteleuropas. Gustav Fischer, Jena. Zweite Auflage. 1930. Heft 10. 466 pp.
- Hustedt F. Die Kieselalgen Deutschlands, Osterreichs und der Schweiz unter Berücksichtigung der übrigen Länder Europas sowie der angrenzenden Meeresgebiete. In: Dr L. Rabenhorst (ed.), Kryptogamen flora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 7. 1933. Teil 2, Lief. 3. P. 321–432.
- Jones H.M., Simpson G.E., Stickle A.J., Mann D.G. Life history and systematics of *Petronis* (Bacillariophyta), with special reference to British waters. 2005. *Eur. J. Phycol.* Vol. 40. Iss. 1. P. 61–87.
- Kaczmarzka I., Poulickova A., Sato S., Edlund M.B., Idei M., Watanabe T., Mann D.G. Proposals for a terminology for diatom sexual reproduction, auxospores and resting stages. *Diat. Res.* 2013. Vol. 28. P. 1–32.
- Kallersjii M., Albert V.A., Farris J.S. Homoplasy increases phylogenetic structure. *Cladistics.* 1999. Vol. 15. P. 91–93.
- Karsten G. Bacillariophyta (Diatomeae). In: Die natürlichen Pflanzenfamilien (Engler A., Prantl K., editors). W. Engelmann, Leipzig. 1928. Vol. 2. P. 105–303.
- Katoh K., Toh H. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics.* 2010. Vol. 26. P. 1899–1900.
- Keeling P.J. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2010. Vol. 365. P. 729–748
- Kermarrec L., Ector L., Bouchez A., Rimet F., Hoffmann L. A preliminary phylogenetic analysis of the Cymbellales based on 18S rDNA gene sequencing. *Diat. Res.* 2011. Vol. 26. Iss. 3. P. 305–315.
- Kociolek J.P. Comment: Taxonomic instability and the creation of *Naviculadicta* Lange-Bertalot in Lange-Bertalot, Moser, a new catch-all genus of diatoms. *Diat. Res.* 1996. Vol. 11. Iss. 1. P. 219–222.
- Kociolek J.P., Stepanek J. G., Lowe R.L., Johansen J.R., Sherwood A.R. Molecular data show the enigmatic cave-dwelling diatom *Diprora* (Bacillariophyceae) to be a raphid diatom. *Eur. J. Phycol.* 2013. Vol. 48. Iss. 4. P. 474–484.
- Kociolek J.P., Williams D.M. Unicell ontogeny and phylogeny: examples from the diatoms. *Cladistics.* 1987. Vol. 3. P. 274–284.
- Kolbe R.W., Gözl E. Elektronenmikroskopische Diatomeenstudien. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 1943. Vol. 61. Iss. 3. P. 91–98.
- Kooistra W., De Stefano M., Mann D.G., Salma N., Medlin L.K. Phylogenetic position of *Toxarium*, a pennate-like lineage within centric diatoms (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 2003. Vol. 39. P. 185–197.

- Kooistra W.H.C.F., Medlin L.K. Evolution of the diatoms (Bacillariophyta). IV.A reconstruction of their age from small subunit rRNA coding regions and fossil record. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1996. Vol. 6. P. 391–407.
- Kooistra W. H. C. F., De Stefano M., Mann D. G., Medlin L. K. The phylogeny of the diatoms. *Progress in Molecular and Subcellular Biology.* 2003. Vol. 33. P. 59-97.
- Krammer K. *Pinnularia* – eine Monographie der europäischen Taxa. Bibliotheca Diatomologica. 1992. Vol. 26. 353 pp.
- Krammer K. The genus *Pinnularia*. Diatoms of Europe. 2000. Vol. 1. 703 pp.
- Krammer K. *Cymbopleura, Delicata, Navicymbula, Gomphocymbellopsis, Afrocybella*. Diatoms of Europe 2003. Vol.4. 529 pp.
- Krammer K., Lange-Bertalot H. Naviculaceae. Neue und wenig bekannte Taxa, neue Kombinationen und Synonyme sowie Bemerkungen zu einigen Gattungen. Bibliotheca Diatomologica. 1985. Vol. 9. 250 pp.
- Krammer K., Lange-Bertalot H. Bacillariophyceae 1. Teil: Naviculaceae. Süswasserflora von Mitteleuropa. 1986. Vol. 2. Iss. 1. 876 pp.
- Kulikovskiy M.S, Gusev E.S., Andreeva S.A., Annenkova N.V. Phylogenetic position of the diatom genus *Geissleria* Lange-Bertalot et Metzeltin and description of two new species from Siberian mountain lakes. *Phytotaxa.* 2014. Vol. 177. Iss. 2. P. 249-260.
- Kulikovskiy M.S., Lange-Bertalot H., Metzeltin D., Witkowski A. Lake Baikal: hotspot of endemic diatoms. *Iconographia Diatomologica.* 2012. Vol. 23. 608 pp.
- Lange-Bertalot H. *Navicula* sensu stricto, 10 genera separated from *Navicula* sensu lato, *Frustulia*. Diatoms of Europe: Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. 2001. Vol. 2. 526 pp.
- Lange-Bertalot H., Metzeltin D. Indicators of oligotrophy - 800 taxa representative of three ecologically distinct lake types, Carbonate buffered - Oligodystrophic - Weakly buffered soft water. *Iconographia Diatomologica.* 1996. Vol. 2. 390 pp.
- Lange-Bertalot H., Moser G. *Brachysira*. Monographie der Gattung. Wichtige Indikator-Species für das Gewässer-Monitoring und *Naviculadicta* nov. gen. Ein Lösungsvorschlag zu dem Problem *Navicula* sensu lato ohne *Navicula* sensu stricto. Bibliotheca Diatomologica. 1994. Vol. 29. 212 pp.
- Lee M.-A., Faria D.G., Han M.-S., Lee J., Kiet J.-S. Evaluation of nuclear ribosomal RNA and chloroplast gene markers for the DNA taxonomy of centric diatoms. *Bioch. Syst. Ecol.* 2013. Vol. 50. P. 163-174.
- Leipe D.D., Wainwright P.O., Gunderson J.H., Porter D., Patterson D.J., Valois F., Himmerich S., Sogin M.L. The stramenopiles from a molecular perspective: 16S-like rRNA sequences from *Labirinthuloides minuta* and *Cafeteria roenbergensis*. *Phycologia.* 1994. Vol. 33. P. 153-162.
- Lowe R.L., Kociolek J.P., Johansen J.R., Van de Vijver B., Lange-Bertalot H., Kopalova K. *Humidophila* gen. nov., a new genus for a group of diatoms (Bacillariophyta) formerly within the genus *Diademsis*: species from Hawai'i, including one new species. *Diat. Res.* 2014. Vol. 30. Iss. 2. P. 117-131.
- Mann D.G. Sieves and flaps: siliceous minutiae in the pores of raphid diatoms. Proceedings of the 6th Diatom Symposium. 1981. P. 279-300.
- Mann D.G. The use of the central raphe endings as a taxonomic character. *I. Syst. Evol.* 1982. Vol. 141. P. 143-152.
- Mann D.G. The diatom genus *Sellaphora*: separation from *Navicula*. *Brit. Phycol. J.* 1989. Vol. 24. P. 1-20.
- Mann D.G. Patterns of sexual reproduction in diatoms. *Hydrobiologia.* 1993. Vol. 269/270. P. 11-20.
- Mann D.G. Auxospore formation, reproductive plasticity and cell structure in *Navicula ulvacea* and the resurrection of the genus *Dickieia* (Bacillariophyta). *Eur. J. Phycol.* 1994a. Vol. 29. P. 141-157.
- Mann D.G. The systematics of amphoroid diatoms: the life history of *Amphora arcus*. *Nova Hedwigia.* 1994b. Vol. 58. P. 335-352.
- Mann D.G. A discussion of *Caloneis* and related genera. *Diatom.* 2001. Vol. 17. P. 29-36.
- Mann D.G., Evans K.M. Molecular genetics and the neglected art of diatomics. Unraveling the algae – the past, present and future of algal systematics. 2007. P. 231–265.
- Mann D.G., Simpson G.E., Sluiman H.J., Möller M. *RbcL* gene tree of diatoms: a second large data-set for phylogenetic reconstruction. *Phycologia.* 2001. Vol. 40. P. 1-2.

- Mann D.G., Stickle A.J. Meiosis, nuclear cyclosis, and auxospore formation in *Navicula sensu stricto* (Bacillariophyta). *Br. Phycol. J.* 1989. Vol. 24. P. 167-181.
- Medlin L.K. A reappraisal of the diatom genus *Rhoiconeis* and the description of *Campylopyxis*, gen. nov. *Br. Phycol. J.* 1985. Vol. 20. P. 313-328.
- Medlin L.K. Evidence for parallel evolution of frustule shape in two lines of pennate diatoms from the periphyton. *Diat. Res.* 1991. Vol. 6. P. 109-124.
- Medlin L.K. Pursuit of a natural classification of diatoms: an incorrect comparison of published data. *Eur. J. Phycol.* 2010. Vol. 45. P. 155–166.
- Medlin L.K. Evolution of the diatoms: major steps in their evolution and a review of the supporting molecular and morphological evidence. *Phycologia.* 2016. Vol. 55. Iss. 1. P. 79–103.
- Medlin L. K., Cooper A., Hill C., Wrieden S., Wellbrock U. Phylogenetic position of the Chromista plastids based on small subunit rRNA coding regions. *Curr. Genet.* 1995. Vol. 28. P. 560-565.
- Medlin L.K., Gersonde R., Kooistra W.H.C.F., Wellbrock U. Evolution of the diatoms (Bacillariophyta): II. Nuclearencoded small-subunit rRNA sequences comparisons confirm a paraphyletic origin for the centric diatoms. *Mol. Biol. Evol.* 1996a. Vol. 13. P. 67–75.
- Medlin L.K., Gersonde R., Kooistra W.H.C.F., Wellbrock U. Evolution of the diatoms (Bacillariophyta). III. Molecular evidence for the origin of the Thalassiosirales. *Nova Hedwigia.* 1996b. Vol. 112. P. 221–234.
- Medlin L.K., Kaczmarek I. Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision. *Phycologia.* 2004. Vol. 43. Iss. 3. P. 245-270.
- Medlin L.K., Kooistra W.H.C.F., Potter D., Saunders G.W., Anderson R.A. Phylogenetic relationships of the ‘golden algae’ (haptophytes, heterokonts, chrysophytes) and their plastids. *Plant Syst. Evol.* 1997. Vol. 11. P. 187-210.
- Medlin L.K., Round F.E. Taxonomic studies of marine gomphonemoid diatoms. *Diat. Res.* 1986. Vol. 1. P. 205-225.
- Medlin L.K., Williams D.M., Sims P.A. The evolution of the diatoms (Bacillariophyta). I. Origin of the group and assessment of the monophyly of its major divisions. *Eur. J. Phycol.* 1993. Vol. 28. P. 261-275.
- Mereschkovsky C. Über *Placoneis*, ein neues Diatomeen-Genus. *Beih. Bot. Centralbl.* 1903a. Vol. 15. P. 1-29.
- Mereschkovsky C. Les types de l'endochrome chez les diatomees. *Bot. Zap.* 1903b. Vol. 21. P. 107-193.
- Moustafa A., Beszteri B., Maier U.G., Bowler C., Valentin K.U., Bhattacharya D. Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. *Science.* 2009. Vol. 324. P. 1724–1726.
- Nakov T., Ruck E.C., Galachyants Y., Spaulding S.A., Theriot E.C. Molecular phylogeny of the Cymbellales (Bacillariophyceae, Heterokontophyta) with a comparison of models for accommodating rate variation across sites. *Phycologia.* 2014. Vol. 53. Iss. 4. P. 359-373.
- Nelles L., Fang B. L., Volckaert G., Vandenberghe A., De Wachter R. Nucleotide sequence of a crustacean 18S ribosomal RNA gene and secondary structure of eukaryotic small subunit ribosomal RNAs. *Nucleic Acid Research.* 1984. Vol. 12. P. 8749–8768.
- Nickrent D. L., Sargent M. L. An overview of the secondary structure of the V4 region of eukaryotic small-subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acid Research.* 1991. Vol. 19. P. 227–235.
- Novais M.H., Wetzel C.E., Van de Vijver B., Morais M.M., Hoffmann L., Ector L. New species and combinations in the genus *Geissleria* (Bacillariophyceae). *Cryptogamie, Algologie.* 2013. Vol. 34. Iss. 2. P. 117-148.
- Patrick R., Reimer C.W. The diatoms of the United States exclusive of Alaska and Hawaii. Monographs of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. 1966. Vol. 13. Iss. 1. 688 pp.
- Patrick R., Reimer C.W. The diatoms of the United States exclusive of Alaska and Hawaii. Monographs of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. 1975. Vol. 13. Iss. 2. Part 1. 213 pp.
- Petersen J., Teich R., Brinkmann H., Cerff R. A “green” phosphoribulokinase in complex algae with red plastids: evidence for a single secondary endosymbiosis leading to haptophytes, cryptophytes, heterokonts, and dinoflagellates. *J. Mol. Evol.* 2007. Vol. 62. P. 43–57.

- Pouličková A., Veselá J., Neustupa J., Škaloud P. Pseudocryptic diversity versus cosmopolitanism in diatoms: a case study on *Naviculla cryptocephala* Kütz. (Bacillariophyceae) and morphologically similar taxa. *Protist*. 2010. Vol. 161. P. 353 – 368.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003. Vol. 19. Iss. 12. P. 1572-1574.
- Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. The diatoms: Biology and morphology of the genera. Cambridge University Press, Cambridge. 1990. 747 pp.
- Ruck E.C., Theiot E.C. Origin and evolution of the canal raphe system in diatoms. *Protist*. 2011. Vol. 162. P. 723–737.
- Rumrich U., Lange-Bertalot H., Rumrich M. Diatomeen der Anden – von Venezuela bis Patagonien/Feuerland. *Iconographia Diatomologica*. 2000. Vol. 9. 649 pp.
- Sarno D., Kooistra W.H.C.F., Medlin L., Percopo I., Zingone A. Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species with the description of four new species. *J. Phycol.* 2005. Vol. 41. P. 151-176.
- Sato S. Phylogeny of araphid diatoms, inferred from morphological and molecular data. PhD Dissertation. 2008.
- Schütt F. Bacillariales (Diatomeae). Die natürlichen Pflanzen familien. 1896. Vol. 1. Iss. 1b. P. 31-150.
- Simonsen R. The diatom system: Ideas on phylogeny. *Bacillaria*. 1979. Vol. 2. P. 9-71.
- Sims P.A., Mann D.G., Medlin L.K. Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data. *Phycologia*. 2006. Vol. 45. Iss. 4. P. 361-402.
- Smol J.P., Stoermer E.F. The diatoms: applications for the environmental and earth sciences. Cambridge University Press. 2010. 667 pp.
- Sorhannus U. Diatom phylogenetics inferred based on direct optimization of nuclear-encoded SSU rRNA sequences. *Cladistics*. 2004. Vol. 20. P. 487-497.
- Sorhannus U. A nuclear-encoded small-subunit ribosomal RNA timescale for diatom evolution. *Marine Micropaleontology*. 2007. Vol. 65. P. 1–12.
- Sorhannus U., Fox M.G. Phylogenetic analyses of a combined data set suggest that the *Attheya* lineage is the closest living relative of the pennate diatoms (Bacillariophyceae). *Protist*. 2012. Vol. 163. P. 252–262.
- Sorhannus U., Gasse F., Perasso R., Baroin-Touranchau A. A preliminary phylogeny of diatoms based on 28S ribosomal RNA sequence data. *Phycologia*. 1995. Vol. 34. P. 65-73.
- Souffreau C., Verbruggen H., Wolfe A.P., Vanormelingen P., Siver P.A., Cox E.J., Mann D.G., Van de Vijver B., Sabbe K., Vyverman W. A time-calibrated multi-gene phylogeny of the diatom genus *Pinnularia*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2011. Vol. 61. P. 866-879.
- Spalding S.A., Kociolek J. P., Wong D. A taxonomic and systematic revision of the genus *Muelleria* (Bacillariophyta). *Phycologia*. 1999. Vol. 38. Iss. 3. P. 314-341.
- Spalding S.A., Stoermer E.F. Taxonomy and distribution of the genus *Muelleria* Frenguelli. *Diat. Res.* 1997. Vol. 12. P. 95-113.
- Stepanek J.G, Kociolek J.P. Molecular phylogeny of *Amphora sensu lato* (Bacillariophyta): an investigation into the monophyly and classification of the amphoroid diatoms. *Protist*. 2014. Vol. 165. P. 177-195.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013. Vol. 30. P. 2725-2729.
- Theiot E.C., Alverson A.J., Gutell R. The limits of nuclear-encoded SSU rDNA for resolving the diatom phylogeny. *Eur. J. Phycol.* 2009. Vol. 44. P. 277–290.
- Theiot E.C., Ashworth M.P., Nakov T., Ruck E., Jansen R.K. Dissecting signal and noise in diatom chloroplast protein encoding genes with phylogenetic information profiling. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2015. Vol. 89. P. 28-36.
- Theiot E.C., Ashworth M., Ruck E., Nakov T., Jansen R.K. A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research. *Plant Ecol. Evol.* 2010. P. 278-296.
- Trobajo R., Clavero E., Chepurinov V.A., Sabbe K., Mann D.G., Ishihara S., Cox E.J. Morphological, genetic and mating diversity within the widespread bioindicator *Nitzschia palea* (Bacillariophyceae). *Phycologia*. 2009. Vol. 48. Iss. 6. P. 443-459.

- Trobajo R., Mann D.G., Clavero E., Evans K.M., Vanormelingen P., McGregor R.C. The use of partial *cox1*, *rbcL* and LSU rDNA sequences for phylogenetics and species identification within the *Nitzschia palea* species complex (Bacillariophyceae). *Eur. J. Phycol.* 2010. Vol. 45. Iss. 4. P. 413-425.
- Urbánková P., Veselá J. DNA-barcoding: A case study in the diatom genus *Frustulia* (Bacillariophyceae). *Nova Hedwigia. Beiheft.* 2013. Vol. 142. P. 147-162.
- Van der Auwera G., De Wachter R. Structure of the large subunit rDNA from a diatom, and comparison between small and large subunit ribosomal RNA for studying stramenopile evolution. *J. Eukar. Microbiol.* 1998. Vol. 45. P. 521-527.
- Van den Hoek C., Mann, D.G. Jahns H.M. Algae: an introduction to phycology. 1995. 623 pp.
- Van De Peer Y., Caers A., De Rijk P., De Wachter R. Database on the structure of small ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Research.* 1998. Vol. 26. P. 179–182.
- Van De Peer Y., Neefs J.M., De Rijk P., De Wachter R. Reconstructing evolution from eukaryotic small ribosomal subunit RNA sequences: calibration of the molecular clock. *J. Mol. Evol.* 1993. Vol. 37. P. 221–232.
- Von Stosch H.A. Oogamy in a centric diatom. *Nature.* 1950. Vol. 165. P. 531–532.
- Williams D.M. Classification and diatom systematics: the past, the present, and the future. Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics. 2007. Vol. 75. P. 57-91.
- Williams D.M., Kociolek J.P. Classifications of convenience: The meaning of names. *Diat. Res.* 2010. Vol. 25. P. 213–216.
- Williams D.M., Kociolek J.P. An overview of diatom classification with some prospects to the future. The Diatom World. Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology. 2011. Vol. 19. P. 49-91.
- Witkowski A., Barka F., Mann D.G., Li Ch., Weisenborn J.L.F., Ashworth M.P., Kurzydłowski K.J., Zgłobicka I., Dobosz S. A description of *Biremis panamae* sp. nov., a new diatom species from the marine littoral, with an account of the phylogenetic position of *Biremis* D.G. Mann et E.J. Cox (Bacillariophyceae). *PLoS ONE.* 2014. Vol. 9. Iss. 12. P. 1-24.
- Witkowski A., Lange-Bertalot H., Metzeltin D. Diatom flora of marine coasts I. *Iconographia Diatomologica.* 2000. Vol. 7. 925 pp.
- Yamada K., Ichinomiya M., Kuwata A., Kamiya M., Ohki K., Saitoh K., Nakamura Y., Sato N., Yoshikawa S. Effects of Silicon-Limitation on Growth and Morphology of *Triparma laevis* NIES-2565 (Pinales, Heterokontophyta) *PLoS ONE.* 2014. Vol. 9. Iss. 7. P. 1-8.
- Zechman F. W., Zimmer E. A., Theriot E. C. Use of ribosomal DNA internal transcribed spacers for phylogenetic studies in diatoms. *J. Phycol.* 1994. Vol. 30. P.507–512.
- Zimmermann J., Jahn R., Gemeinholzer B. Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene including new primers and protocols. *Org. Divers. Evol.* 2011. Vol. 11. P. 173–192.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Точки сбора проб и полученные штаммы

Номер штамма	Родовое/видовое название	Дата сбора пробы	Координаты точки сбора пробы	Место сбора
B033	<i>Paraplaconeis kornevae</i>	15.07.2011	N52°20.14 E106°50.52	Россия, озеро Байкал, восточный берег, рядом с деревней Оймур
B088	<i>Geissleria baicalosimilis</i>	14.07.2011	N52°27.042 E106°53.215	Россия, озеро Байкал, залив рядом с деревней Энхалук
B366	<i>Pinnularia isselana</i>	26.07.2012	N55°27.005 E109°58.649	Россия, озеро Фролиха, у базы, фитопланктон
B367	<i>Caloneis cf. tenuis</i>		N55°27.005 E109°58.649	Россия, озеро Фролиха, у базы, фитопланктон
B410	<i>Caloneis sp.</i>		N55°27.005 E109°58.649	Россия, озеро Фролиха, у базы, фитопланктон
B411	<i>Pinnularia isselana</i>		N55°27.005 E109°58.649	Россия, озеро Фролиха, у базы, фитопланктон
B390	<i>Caloneis sp.</i>		N55°27.005 E109°58.649	Россия, озеро Фролиха, у базы, фитопланктон
B425	<i>Caloneis sp.</i>		N55°27.005 E109°58.649	Россия, озеро Фролиха, у базы, фитопланктон
B369	<i>Geissleria frolikhiensis</i>		N55°27.005 E109°58.649	Россия, озеро Фролиха, у базы, фитопланктон
B360	<i>Humidophila frolihiensis</i>		N55°27.005 E109°58.649	Россия, озеро Фролиха, у базы, фитопланктон
B384	<i>Pinnularia septentrionalis</i>	26.07.2012	N55°26.254 E110°01.268	Россия, между реками Левая и Правой Фролиха, фитопланктон

B449	<i>Pinnularia cf. genkalii</i>	30.07.2012		Россия, озеро Байкал, бухта рядом с мысом Котельниковским, горячие ванны, фитопланктон
B412	<i>Pinnularia cf. sinistra</i>	28.07.2012		Россия, озеро Байкал, Ушканьи острова
B716	<i>Pinnularia sp.</i>	19.07.2014	N55°27.239 E110°15.336	Россия, озеро Нижнее Весы, бентос, ил со стороны водопада
B737	<i>Pinnularia cf. sinistra</i>	23.07.2014	N55°27.762 E110°04.308	Россия, устье реки Правая Фролиха, песок
B749	<i>Pinnularia sp.</i>	24.07.2014		Россия, озеро Байкал, бухта Ая, болото, отделённое песчаным берегом, детрит на песке
B708	<i>Placoneis ignorata</i>	24.07.2014		Россия, озеро Байкал, бухта Ая, болото, отделённое песчаным берегом, мох
I60	<i>Seminavis sp.</i>	23.10.2014		Индонезия, юго-восточная часть острова Сулавеси, остров Ванги-Ванги, залив, бентос и перифитон
I70	<i>Metzeltinia indonesica</i>	24.10.2014	S5° 28.002' E123° 45.677'	Индонезия, юго-восточная часть острова Сулавеси, остров Хога, морской национальный парк Вакатоби, во время отлива, бентос и перифитон

Ind124	<i>Diadismus gomphonemoides</i>		S2° 54.585' E119° 53.014'	Индонезия, остров Южный Сулавеси, район Тораджа, город Рантепао, фитопланктон
Ind24	<i>Diadismus confervaceae</i>	21.11.2014	N2° 27.005' E98° 58.081'	Индонезия, остров Суматра, озеро Тоба, с южного берега острова Сумасир
Ind265	<i>Diadismus confervaceae</i>	05.11.2014		Индонезия, остров Бали, озеро Батур, бентос и перифитон
Ind238	<i>Geissleria decussis</i>	04.11.2014	S 08° 16.579' E 115° 09.985'	Индонезия, остров Бали, западная часть озера Братан
Ind107	<i>Geissleria</i> sp.		S2° 47.061' E121° 30.421'	Индонезия, остров Южный Сулавеси, центральная часть озера Товути, песок
Ind427	<i>Mastogloia dansei</i>	23.09.2015	S2° 30.977' E121° 27.016'	Индонезия, остров Южный Сулавеси, восточный берег озера Матано, обрастания на <i>Chara</i> sp.
VN333	<i>Diadismus paraconfervaceae</i>	22.11.2010		Вьетнам, национальный парк Катъен, временный водоём в лесу
VN408	<i>Diadismus paraconfervaceae</i>	23.11.2010		Вьетнам, национальный парк Катъен, ручей в тропическом лесу
VN407	<i>Diadismus paraconfervaceae</i>	22.11.2010		Вьетнам, национальный парк Катъен, временный водоём в лесу

Mnp71	<i>Aneumastus tusculus</i>	19.07.2015	N50°44.258 E100°14.743	Монголия, западный берег озера Хубсугул, отделённый косой водоём, бентос, обрастания
Mnp219	<i>Paraplaconeis</i> sp.	07.07.2015	N48°05.892 E99°12.407	Монголия, озеро Ундор Цохёны- Нуур, планктон
Mns12	<i>Seminavis</i> sp.	10.07.2015	N48°52.317 E97°26.447	Монголия, северо-восточная часть озера Тэлмэн-Нуур, отгороженный косой песчаный залив, песок
Mns101	<i>Seminavis lata</i>	14.07.2015	N49°13.271 E96°43.631	Монголия, северо-восточная часть озера Ойгон-Нуур, планктон