

***Stigonema lichenoides* sp. nov. (Nostocales, Cyanobacteria):
новый вид, выделенный из лишайника *Ephebe lanata***

Е. Н. Патова¹, Д. М. Шадрин¹, С. С. Шалыгин², И. В. Новаковская¹

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

²Центр исследования сложных углеводов, Атенс, США

Автор для переписки: E. N. Patova, patova@ib.komisc.ru

Резюме. Дано описание нового для науки вида цианобактерии *Stigonema lichenoides* Patova, Novakovskaya, Shalygin et Shadrin, sp. nov., фотобионта цианобионтного лишайника *Ephebe lanata*. Образцы были собраны на каменистом субстрате в горной тундре Северного Урала. Приведено подробное морфологическое описание, обсуждаются различия данного вида с близкими таксонами из рода *Stigonema*. С использованием последовательностей 16S–23S рРНК проведен молекулярно-филогенетический анализ исследуемых образцов. Соотнесение морфологических и молекулярных данных, а также сравнение полученных последовательностей образцов с данными, имеющимися в базе NCBI, позволило выделить новый вид рода *Stigonema*.

Ключевые слова: Cyanobacteriota, Cyanophyta, *Stigonema*, морфология, филогения, цианобионт, Северный Урал, Россия.

***Stigonema lichenoides* sp. nov. (Nostocales, Cyanobacteria): a new species
isolated from the lichen *Ephebe lanata***

E. N. Patova¹, D. M. Shadrin¹, S. S. Shalygin², I. V. Novakovskaya¹

¹Institute of Biology of Komi Science Center of the Ural Branch of the Russian Academy
of Sciences, Syktывkar, Russia

²Complex Carbohydrate Research Center, Athens, USA

Corresponding author: E. N. Patova, patova@ib.komisc.ru

Abstract. A new cyanobacterium species *Stigonema lichenoides* Patova, Novakovskaya, Shalygin et Shadrin, sp. nov., a photobiont of the cyanolichen *Ephebe lanata*, has been described. The samples were collected from rocky substrates in the mountain tundra of the Northern Urals. A detailed morphological description is given and differences between this species and related taxa of the genus *Stigonema* are discussed. A molecular phylogenetic analysis of the studied samples was performed using 16S–23S rRNA sequences. The correlation of morphological and molecular data, as well as the comparison of the sequences obtained from the samples with data available in the NCBI database, allowed the identification of a new species of the genus *Stigonema*.

Keywords: Cyanobacteriota, Cyanophyta, *Stigonema*, morphology, phylogeny, cyanobiont, Northern Urals, Russia.

К роду *Stigonema* C. Agardh ex Bornet et Flahault (пор. Nostocales, сем. Stigonemataceae) относят виды с нитчатыми и слоевищными талломами, корковидной или кустистой формы, состоящие из свободных, извитых трихомов с настоящим

(Т-образным) ветвлением (Komárek, 2013; Guiry, Guiry, 2023; Strunecký *et al.*, 2023). Нити дифференцированы на базальные и латеральные (одинаковые или отличающиеся по ширине), трихомы одно-многорядные, окружены плотными слизистыми чехлами, обычно желтовато-коричневого цвета. Виды рода фиксируют молекулярный азот, благодаря наличию гетероцит. Размножение гормогониями, выделяющимися из концов трихомов и ветвей, морфологически они отличаются от вегетативных трихомов (Komárek, 2013; Guiry, Guiry, 2023). На сегодняшний день во всем мире таксономически принято 67 видов, 22 вариации и 5 форм, к синонимам отнесено 6 видовых названий, 5 вариаций и 10 форм (Guiry, Guiry, 2023).

Виды *Stigonema* встречаются с высоким обилием (часто доминируют в сообществах) в различных биотопах по всему миру. Наибольшее разнообразие отмечено в тропических регионах (Komárek, 2013; Guiry, Guiry, 2023). Многие виды растут аэрофитно или субаэрофитно на коре деревьев или влажных камнях, встречаются в горных и арктических тундрах (Patova *et al.*, 2016, 2023; Davydov, 2018; Davydov, Patova, 2018), в Антарктиде (Rippin *et al.*, 2018), в водоемах и болотах (Komárek, 2013), а также являются фотобионтами ряда лишайников, в том числе, рода *Ephebe* Fr. (Geitler, 1932; Elenkin, 1936; Butle, Allsopp, 1972; James, 2007; Stenroos *et al.*, 2011).

Ряд видов рода *Stigonema* хорошо отличимы по морфологическим характеристикам, но для большей части диагностические морфометрические признаки имеют сходные значения, включая размеры нитей и трихомов основных и боковых ветвей, размеры клеток и гетероцит, что вызывает трудности при определении видов данного рода. Использование молекулярных подходов для оценки биологического разнообразия рода также затруднено, так как почти все виды рода *Stigonema* относятся к некультивируемым организмам, они практически не растут на искусственных питательных средах, поэтому для их классификации применяют секвенирование одиночных клеток или филаментов, полученных из природных образцов (Mareš *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015). Трудности возникают и при идентификации *Stigonema* в симбиозе с грибами, образующими лишайники рода *Ephebe* (Ascomycota, Lichinales, Lichenaceae). Грибной компонент данного лишайника обитает в слизи крупных кустистых видов рода *Stigonema*, пронизывая основные и боковые ветви талломов, поэтому лишайники данного рода не отличаются по внешнему облику от дерновинок *Stigonema*, что подробно было описано в работе А. А. Еленкина (Elenkin, 1936). При этом, в симбиозе клеточные структуры *Stigonema* сохраняют свойства свободноживущих цианобактерий, что показало изучение их ультраструктуры (Butle, Allsopp, 1972). *Ephebe* — космополитный род цианобионтных лишайников, насчитывающий 12 видов (James, 2007; Stenroos *et al.*, 2011). На северо-востоке европейской части России в северных регионах Урала обитает только один вид — *Ephebe lanata* (L.) Vain., отмеченный однажды на Приполярном Урале Я. Хермассон и Т. Н. Пыстиной (Myrdal, 2022). Благодаря способности цианобактерии фиксировать молекулярный азот

(Hitch, Millban, 1975), этот вид лишайника может осваивать каменистые субстраты, лимитированные по содержанию биогенных элементов, но находки вида в горных тундрах Урала единичны (Myrdal, 2022).

Цель настоящего исследования — описание выявленного нового вида цианобактерии рода *Stigonema* — фотобионта лишайника *Ephebe lanata*, собранного в горных тундрах Северного Урала и изучение его морфологических и молекулярно-генетических особенностей.

Материал и методы

Место отбора проб

Образцы для исследования были собраны авторами статьи 19 VI 2018 на Северном Урале в окрестностях горы Пеленья ($63^{\circ}23'07''\text{N}$, $58^{\circ}54'20''\text{E}$, 794 м над ур. м.) на валуне по краю углубления с накопившимися атмосферными осадками (Fig. 1). Район исследований расположен на северо-востоке европейской части России, в Вуктыльском административном районе Республики Коми и входит в границы национального парка «Югыд-Ва» (Atlas..., 2011). Климат суровый и резко континентальный, что обусловлено географическим положением района и значительной высотой хребтов (Atlas..., 2011).

Исследование морфологии

Изучение морфологии образцов проводили с применением светового микроскопа (СМ) Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japan), оснащенного дифференциальной интерференционно-контрастной системой, и флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse E400 (Nikon, Japan). Микрофотографии были сделаны камерой Nikon Digital Sight Ds-2Mv, и на стереоскопическом микроскопе ЛОМО МПС-1 с цифровой камерой (ЛОМО, Россия).

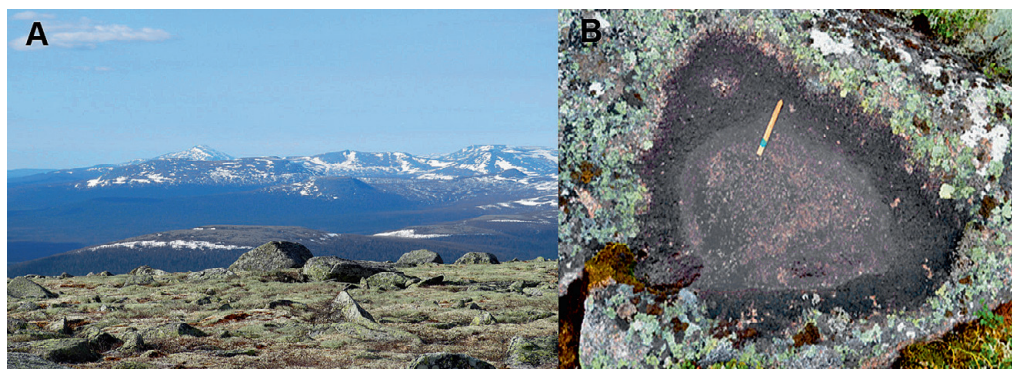


Fig. 1. Место отбора проб *Stigonema lichenoides* на Северном Урале / Sampling site for *Stigonema lichenoides* in the Northern Urals.

А — гольцовый пояс плато горы Пеленья / alpine belt of the Pelen'ya Plateau;
В — разрастания колоний на камне / growth of colonies on the stone.

Выделение ДНК и ПЦР

Для исследования молекулярно-генетических характеристик проведено выделение ДНК с использованием набора DNEasy PlantMiniKit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Перед выделением ДНК для разрушения плотных полисахаридных чехлов, окружающих талломы *Stigonema*, образцы, отобранные для молекулярного анализа, были быстро нагреты в дистиллированной воде до кипения, а затем резко охлаждены.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) фрагментов проводили в 50 мкл смеси, содержащей 10 мкл ScreenMix («Евроген», Россия), по 10 мкл каждого праймера (0.3 мкМ) («Евроген», Россия), 18 мкл ddH₂O («Панэко», Россия) и 2 мкл ДНК-матрицы (1 ÷ 100 нг). Праймеры для амплификации участков ДНК, использованные в анализе, и условия проведения полимеразной цепной реакции представлены в табл. 1.

Таблица / Table 1

Праймеры и условия проведения полимеразной цепной реакции /
Primers and conditions used for the polymerase chain reaction

Маркер / Marker	Праймер / Primer	Последовательность нуклеотидов прямого / обратного праймеров (5'-3') / Sequence positions of forward / reverse primers (5'-3')	Источники / References	Условия ПЦР / PCR conditions
16S рPHK	CYA106L/ fD1	CGGACGGGTGAGTAACGC- GTGA/ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Nübel <i>et al.</i> , 1997 / Weisburg <i>et al.</i> , 1991	94 °C — 5 min; 94 °C — 1 min, 60 °C — 1 min, 72 °C — 1 min, 35 cycles; 72 °C — 5 min
	CYA781R (a)/ CY- A781(b)	GACTACTGGGGTATCTAATC- CCATT/ GACTACAGGGGTATCTAATC- CCTTT	Nübel <i>et al.</i> , 1997 / Nübel <i>et al.</i> , 1997	94 °C — 5 min; 94 °C — 1 min, 60 °C — 1 min, 72 °C — 1 min, 35 cycles; 72 °C — 5 min
	f712/r1090	ACCCAGTAGTCCTAGCCGT/ GTTTGTACACCGGCAGTCTCT	Svenning <i>et al.</i> , 2005 / Svenning <i>et al.</i> , 2005	95 °C — 5 min; 95 °C — 30 sec, 42 °C — 30 sec, 72 °C — 45 sec, 35 cycles; 72 °C — 4 min
	fC2/rD1	CGCAACCCTCGTTTTTAGTT/ AAGGAGGTGATCCAGCC	Svenning <i>et al.</i> , 2005 / Weisburg <i>et al.</i> , 1991	95 °C — 5 min; 95 °C — 30 sec, 42 °C — 30 sec, 72 °C — 45 sec, 35 cycles; 72 °C — 4 min
ITS рPHK	322/340	TGTACACACCGCCCGTC/ CTCTGTGTGCCTAGGTATCC	Iteman <i>et al.</i> , 2000	95 °C — 5 min; 95 °C — 30 sec, 55 °C — 30 sec, 72 °C — 1 min, 35 cycles; 72 °C — 5 min

Продукты ПЦР (на электрофореze выделен один бент, который и был секвенирован) разделяли в 1.5% агарозном геле на основе трис-ацетат-этилен диаминтетрауксусной кислоты (ТАЭ). Очищали продукты ПЦР из агарозного геля с использованием набора ColGen («Синтол», Россия) согласно инструкции производителя. Секвенирование полученных фрагментов проводили на генетическом анализаторе НАНОФОР 05 («Синтол», Россия). Выделение ДНК, ПЦР и секвенирование проводили с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Молекулярная биология» ИБ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар.

Филогенетический анализ

Длина полученной нами последовательности для исследованного образца 16S-23S рРНК составила 1861 пар нуклеотидов (п. н.). Матрица сравниваемых данных для построения филогении составила 1241 п. н., что соответствовало средней длине сравниваемых последовательностей. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием алгоритма ClustalW в программе MEGAX (Thompson *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 2008). При построении молекулярно-филогенетического дерева мы использовали нуклеотидные последовательности, полученные нами, а также данные других авторов, доступные в базах данных NCBI (Clark *et al.*, 2016; NCBI, 2023) и BOLD Systems (BOLD Systems, 2023). В качестве внешней группы при построении дерева были взяты последовательности *Microcystis panniformis* штамм VN425 (AB666076) и *M. aeruginosa* штамм SAG 46.80 (KM019997). Молекулярно-филогенетический анализ был произведен в программе MEGAX с использованием метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) и с применением параметров по умолчанию (p-distance). Надежность полученной топологии была подтверждена бутстреп-тестом с 1000 повторений. Генетические дистанции были рассчитаны в программе MEGAX с использованием параметров по умолчанию (p-distance).

Потенциальные вторичные структуры региона ITS были предсказаны в онлайн-версии Mfold (Zuker, 2003) и обработаны в Adobe Illustrator 2020 (Adobe System Inc., Сан-Хосе, Калифорния, США).

Полученные последовательности гена 16S–23S рРНК были зарегистрированы в GenBank (NCBI).

Результаты и обсуждение

Stigonema lichenoides Patova, Novakovskaya, Shalygin et Shadrin, sp. nov. (Figs. 2, 3)

Diagnosis. *Stigonema lichenoides* is phenotypically distinct from other *Stigonema* species by form of colony growth (they form branched bush-like tufts), the large size of the main filaments and vegetative cells, the formation of chroococcoid packets, as well as small hormogonies developed on the main filaments and lateral branches. Differs

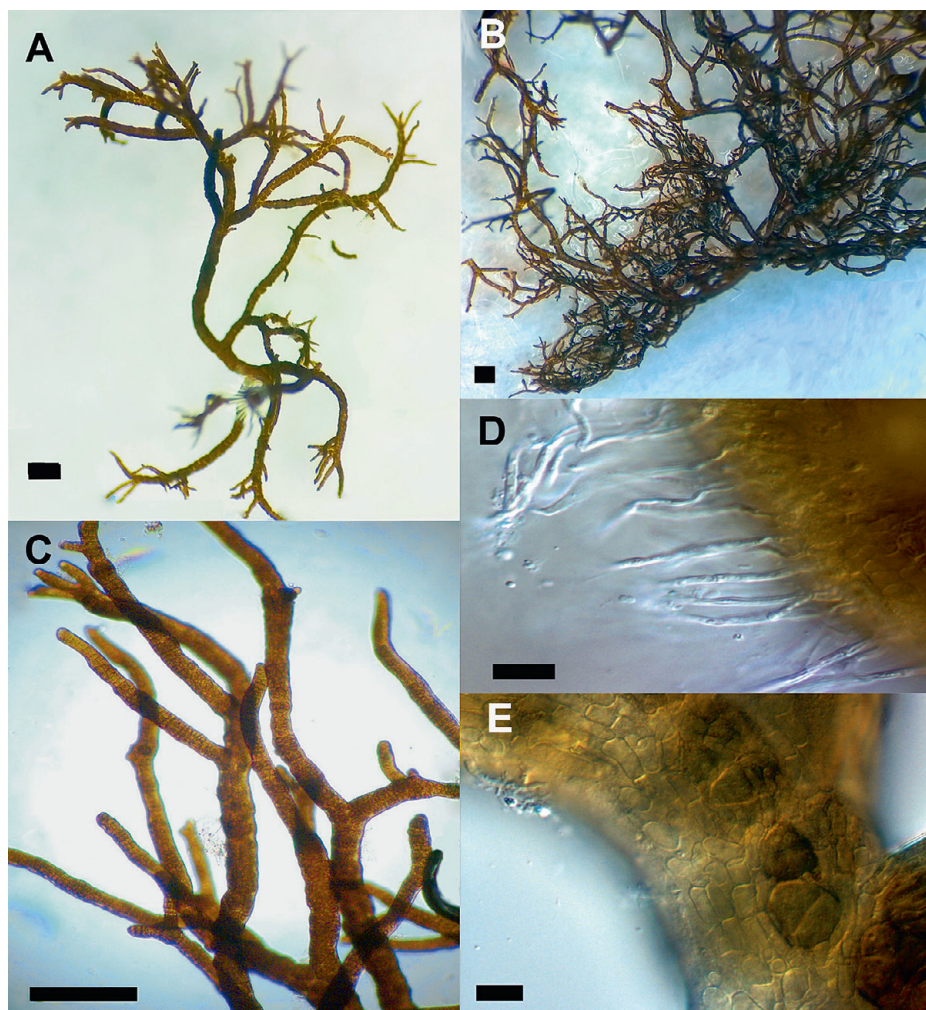


Fig. 2. *Stigonema lichenoides* (SYKO № 1017-A).

A, B — макроскопические нити / macroscopic filaments; C — боковое ветвление / branches; D — грибные гифы в нижней части основных нитей / fungal hyphae in the lower part of main filaments; E — поверхность трихомов с уплотненными клетками / the surface of the filaments with compacted cells.

Масштабные линейки / Scale bars: A–C — 200 μ m, D, E — 10 μ m.

from other species of *Stigonema* by phylogenetic position based on partial 16S and ITS rRNA gene phylogenies.

Holotype: SYKO № 1017-A, Herbarium of the Institute of Biology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (SYKO), Syktyvkar, Russia. <https://ib.komisc.ru/sykoa/eng/collection/277/>

GenBank accession number: MT090674 (16S–23S rRNA).

Type locality: Russia, Northern Urals, Mount Pelen'ya, photobiont in lichen *Ephebe lanata*, 63°23'07"N, 58°54'20"E, 794 m above sea level.

Etymology. The name derives from the Latin noun «lichen» (lichen) and the suffix «-oides» (-oid, like) — «similar to a lichen» and is due to the symbiotic way of life of the cyanobacterium with the ascomycetes and formation of *Ephebe* lichen.

Morphological description. The filaments heteropolar, forming branched bush-like colonies or tufts, closely intertwined with each other, attached to the substrate. The filaments black-brown, black-green, or black (Fig. 2A–C). The form of growth is typical for the genus *Stigonema*. Under the microscope fungal hyphae (Fig. 2D) and a compacted layer of outer cells are visible (Fig. 2E). The main filaments up to 2–8 mm long, 60–100(200) µm wide, the branches 20–50 µm wide. The lateral branches usually attenuated towards ends and rounded (Fig. 2C). Sheaths smooth, firm, gelatinous, yellow-brown, dark brown to black. The main filaments usually 4–6- rarely multiseriate, the branches 2–4-seriate (Fig. 3A–D). In the main filaments, some of the cells are collected in mucous chroococcoid packets (Fig. 3B, E). Cells hemispherical or elongated, isodiametric, 10–16(20) µm in diameter. Heterocytes rarely, lateral or intercalary, laterally flattened, hemispherical, 8–10 µm in diameter. Hormogonia uniseriate, formed on lateral branches, 30–35(40) µm long, 8–10(15) µm wide (Fig. 3F).

Ecology and distribution. Lichen photobiont, living on rocky substrates (silicate rocks) in mountain tundra.

Морфологическое описание. Нити гетерополярные, в виде разветвленных кустиков, тесно переплетающихся друг с другом, прикрепленные к субстрату. Нити образуют прямостоячие кустиковидные пучки, черно-коричневые, черно-зеленые или черные (Fig. 2A–C). Сохранена форма роста и ветвления цианобактерии, характерная для рода *Stigonema*. В нижних частях нитей видны грибные гифы (Fig. 2D) и уплотненный слой наружных клеток (Fig. 2E). Дл. нитей 2–8 мм; шир. основных нитей 60–100(200) мкм, шир. боковых нитей 20–50 мкм. Боковые ветви слегка утончаются на концах и закруглены (Fig. 2C). Слизистые чехлы твердые, плотные, студенистые, желто-коричневые, темно-коричневые до черного, утолщены. Основные нити 4–6- реже многорядные, боковые — 2–4-рядные (Fig. 3A–D). В основных нитях часть клеток собрана в слизистые хроококкоидные пакеты (Fig. 3B, E). Клетки полусферические или удлинённые, изодиадрические, 10–16(20) мкм в диам. Гетероциты редкие, латеральные или интеркалярные, сплюснутые с боков, полусферические, 8–10 мкм в диам. Гормогонии однорядные, образуются на боковых веточках, 30–35(40) мкм дл., 8–10(15) мкм шир. (Fig. 3F).

Диагноз. *Stigonema lichenoides* фенотипически отличается от других видов рода *Stigonema* формой роста колоний (формируют кустиковидные пучки), крупными размерами основных нитей и вегетативных клеток, формированием хроококкоидных пакетов, а также гормогониями небольших размеров на основных и боковых ветвях. Отличается также от других видов рода *Stigonema* филогенетическим положением, основанным на частичной филогении генов 16S–23S рПНК.

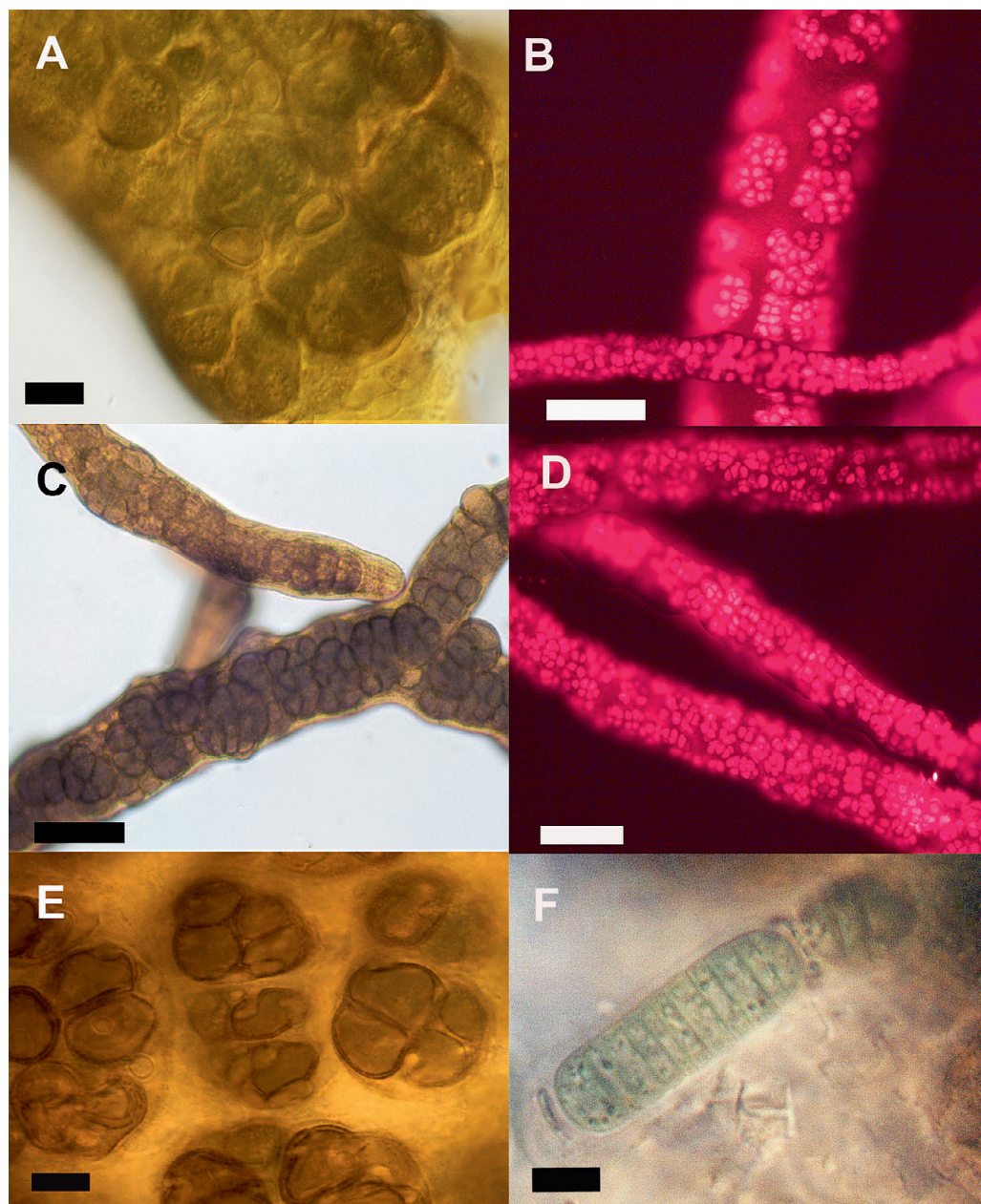


Fig. 3. *Stigonema lichenoides* (SYKO № 1017-A).

A, B — многорядные основные нити / multiseriate main trichomes; C, D — многорядные боковые нити / multiseriate branches; E — клетки, собранные в хроококкоидные пакеты / cells grouped in chroococcoid stages; F — гормогоний / hormogonia.

B, D — флуоресцентная микроскопия / fluorescence microscopy.

Масштабные линейки / Scale bars: A, E, F — 10 µm, B–D — 50 µm.

Голотип: гербарный образец SYKO № 1017-А, Гербарий Института биологии ФИЦ Коми научного центра Уральского отделения РАН (ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН) (SYKO), Сыктывкар, Россия. <https://ib.komisc.ru/sykoa/eng/collection/277/>

Последовательность зарегистрирована в GenBank под номером: MT090674 (16S–23S rRNA).

Типовое местонахождение: Россия, Северный Урал, гора Пеленья, фотобионт в лишайнике *Ephebe lanata*, 63°23'07"N, 58°54'20"E, 794 м над ур. м.

Этимология. Название происходит от латинского существительного «lichen» (лишайник) и суффикса «-oides» (-видный, -образный) — «похожий на лишайник» и обусловлено симбиотическим образом жизни цианобактерии с аскомицетами и формированием лишайника *Ephebe*.

Экология и распространение. Фотобионт лишайника, обитающего на каменистых субстратах (силикатные породы) в горных тундрах.

Сравнение *Stigonema lichenoides* со сходными по морфологии видами

В табл. 2 приведены сравнительные характеристики для видов рода *Stigonema*, которые имеют наибольшее морфологическое сходство с *S. lichenoides*. Это виды, основные нити которых имеют крупные размеры (от 50 мкм шириной) с многорядными трихомами, сформированными двумя и более рядами клеток, а также с хорошо развитыми боковыми ветвями. *S. lichenoides* отличается формой роста колоний, крупными размерами основных нитей (уступает только *S. robustum*¹) и вегетативных клеток, формированием в старых частях нитей хроококкоидных пакетов, объединяющих по 4–12 клеток, а также гормогониями небольших размеров, формирующихся на боковых ветвях. Отличается и экология вида: *S. lichenoides* отмечен в симбиозе с грибом, формирующим лишайник. Необходимо отметить, что, как и большинство сравниваемых видов, исследуемый образец был собран на увлажненных каменистых субстратах в гольцовом поясе Уральских гор умеренной зоны. В альпийском поясе встречается также *S. informe*, но данный вид отличается от нашего образца более малыми размерами и строением колоний. Остальные виды распространены в степных, субтропических и тропических регионах (табл. 2).

Анализ на основе последовательности гена 16S–23S рРНК

Как уже отмечалось ранее, виды рода *Stigonema* плохо культивируются на питательных средах (Mareš *et al.*, 2015). В связи с этим, в мировых коллекциях практически отсутствуют типовые штаммы, что затрудняет изучение морфологии и филогении для этого рода. В настоящее время исследование молекулярно-генетических особенностей видов рода *Stigonema* проводится в основном с применением технологии «single cell sequencing» из природных образцов (Mareš *et al.*,

¹ Авторы таксонов приведены в примечании к табл. 2.

Таблица 2 / Table 2

Сравнение *Stigonema lichenoides* со сходными по морфологии таксонами* /
Comparison of *Stigonema lichenoides* with morphologically similar taxa*

<i>Stigonema lichenoides</i> , sp. nov.	<i>Stigonema intermedium</i>	<i>Stigonema tufaceum</i>	<i>Stigonema informe</i>	<i>Stigonema multipartitum</i>	<i>Stigonema robustum</i>	<i>Stigonema dinghuense</i>
Форма колонии						
Кустиковидные, в пучках	Подушковидные, или нити одиночные	Подушковидные	Кустиковидные, корковидные	Пучки из толстых запутанных нитей	Пучки, корки или губчатые колонии	Дерновинки или подушковидные
Размер колонии, мм						
До 8 мм дл.	До 1–3 мм в диам.	До 1 мм в диам.	До 2 мм дл.	До 2 мм дл.	нд	нд
Окраска колонии						
Черно-коричневая, черно-зеленая, черная	Коричневая	Черная	Темно-оливково-зеленая	Голубовато-зеленая, коричневая, черная	Черная	Коричневая, черно-зеленая
Слизистые чехлы						
Желто-коричневые, черно-коричневые, до черного, толстые	Бесцветные, желто-коричневые, слоистые	Желто-коричневые, толстые, слоистые	Желто-коричневые, толстые, слоистые	Желтые, ржаво-коричневые	Коричневые или прозрачные, гладкие	Бесцветные, желтые, желто-коричневые
Основные нити						
Прямостоячие, прикрепленные базальной частью к субстрату	Стелющиеся, на концах прямостоячие	Стелющиеся, на концах прямостоячие	Прямостоячие, прикрепленные базальной частью к субстрату	Стелющиеся, на концах прямостоячие	Прямостоячие, прикрепленные базальной частью к субстрату	Стелющиеся, на концах прямостоячие
Ширина основных нитей, мкм						
60–100(до 200)	(35.7)40–60(80)	27–37(50)	40–70	80–120	49–160(333)	41.3–77.1.
Рядность основных нитей						
4–6(8)	(1)3–6(8)	2–6	4–6	до 8	до 8	до 5
Боковые ветви						

<i>Stigonema lichetoides</i> , sp. nov.	<i>Stigonema intermedium</i>	<i>Stigonema tufaceum</i>	<i>Stigonema informe</i>	<i>Stigonema multipartitum</i>	<i>Stigonema robustum</i>	<i>Stigonema dinghuense</i>
Длинные, иногда утончающиеся к концам	Короткие, неправильной формы	Утончаются к концам	Обычно изогнутые к концам	Расширены у основания	Утончающиеся к концам	Тоньше основных нитей, иногда с короткими гомогониями
Ширина боковых нитей, мкм						
20–50	28–50	27–37(50)	до 45	нд	нд	14.38–50.18
Рядность боковых нитей						
2–4	(1)2–4(6)	нд	нд	нд	2–6	нд
Форма вегетативных клеток / Vegetative cell shape						
Полусферическая или удлинённая, изодиаметрическая	Сферическая или неправильно округлая, изодиаметрическая	Сферическая	От сферической до округло-многоугольной	Округло-квадратная	Полусферическая, продолговато-изодиаметрическая	Сферическая, округло-квадратная, бочкообразная или полусферическая
Индивидуальные чехлы вегетативных клеток						
–	нд	+	+	–	+	–
Размер вегетативных клеток, диам. в мкм						
10–16(20)	4.8–13.7	нд	до 15–18	8–16(25)	10–15	8–18
Хроококкоидная стадия						
+	+	–	–	–	+	–
Гетероциты						
Редко	Очень редко	Редко	Часто	Нечасто	Нечасто	Нечасто
Размер гетероцит, мкм						
8–10	нд	нд	нд	8–12	5–9	6–13
Гомогонии						
Однорядные, редко, формируются на боковых веточках и основных нитях	Однорядные, формируются как боковые ветви на основных нитях	Формируются на концах ветвей	Однорядные, развиваются на концах боковых ветвей	Короткие, формируются на основных нитях	Развиваются на коротких ветвях	Однорядные, формируются на боковых ветвях

Продолжение таблицы 2

<i>Stigonema lichenoides</i> , sp. nov.	<i>Stigonema intermedium</i>	<i>Stigonema tufaceum</i>	<i>Stigonema informe</i>	<i>Stigonema multipartitum</i>	<i>Stigonema robustum</i>	<i>Stigonema dinghuense</i>
Размер гормониев, мкм						
30–35 × 8–10(15)	14–33 × 11.2–16.5	45 × 12	45 × 18	40–70 × 15–20	нд	13–27 × 35–59
Экология / Ecology						
Симбионт лишайника, сырые камни	Свободноживущий, поверхность илистой почвы, на мхах в торфяниках	Свободноживущий, сырые камни, торфянистые почвы	Свободноживущий, сырые скалы и камни, водные биотопы	Свободноживущий, водные биотопы	Свободноживущий, сырые почвы и камни, водные биотопы	Свободноживущий, сырые скалы
Распространение						
Горные тундры	Лесостепь	Широко распростран	Альпийский пояс и его аналоги	Тропики	Тропики	Субтропики

Примечание / Note. * Версия таблицы на английском языке представлена в электронном приложении² / The English version of the table is available as Supplementary material². Морфологические признаки *S. intermedium* Kondrat., *S. tufaceum* Cooke ex Bornet et Flahault, *S. informe* Kütz. ex Bornet et Flahault, *S. multipartitum* Gardner и *S. robustum* Gardner приведены по Komárek (2013); *S. dinghuense* G.-F. Song et R.-H. Li — по Song *et al.* (2015). нд — нет данных; (–) — признак отсутствует.

² Электронное приложение доступно в конце страницы статьи на веб-сайте журнала (<https://doi.org/10.31111/nsnr/2023.57.2.A15>).

2015; Clark *et al.*, 2016). В GenBank достаточно широко представлены сведения по последовательности генов 16S рРНК, *nifH*, *rbcL* и *rbcLX*, при этом практически отсутствует информация о последовательностях ITS рРНК.

Сравнительный анализ последовательностей гена 16S рРНК исследуемого нами образца (SYKO № 1017-A, NCBI MT090674) с последовательностями, взятыми из баз генетических данных NCBI (2023) и BOLD Systems (2023), показал высокое сходство с представителями рода *Stigonema* и объединил их в одну хорошо поддерживаемую монофилетическую кладу (Fig. 4). При этом, исследуемый нами образец не сгруппировался на молекулярно-филогенетическом дереве ни с одним из сравниваемых видов, о чем свидетельствует низкий уровень его нуклеотидного сходства с наиболее близко расположенными к нему на дереве видами.

Анализ генетических дистанций показал, что минимальный порог отличия нашего образца от других видов, включенных в анализ, составил 2.3%. При этом между другими сравниваемыми видами данный порог был на порядок ниже и составил 0.2%, что указывает на самостоятельность исследуемого образца (табл. 3).

Таблица 3 / Table 3

Сходство нуклеотидных последовательностей 16S рРНК представителей рода *Stigonema* (%) /
Similarity of 16S rRNA nucleotide sequences of representatives of the genus *Stigonema* (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1													
2	2.3												
3	3.8	3.3											
4	4.0	3.5	1.2										
5	2.6	3.4	3.6	3.6									
6	5.7	5.6	4.0	4.8	5.5								
7	2.6	2.7	4.0	3.7	1.3	5.7							
8	4.0	3.5	0.8	1.2	4.0	4.4	4.4						
9	2.7	3.5	3.8	3.7	0.2	5.6	1.5	4.1					
10	2.8	1.5	3.3	3.0	3.0	5.7	2.5	3.6	3.1				
11	3.2	1.8	3.2	2.7	2.9	5.3	2.4	3.6	3.1	1.8			
12	4.1	3.6	1.3	1.0	3.9	4.5	4.1	0.8	4.0	3.1	3.2		
13	2.5	1.0	3.0	3.6	2.7	5.0	2.9	3.5	2.9	1.9	2.3	3.6	

Примечание / Note: 1 — MT090674 *Stigonema lichenoides* SYKO N1017-A; 2 — KJ786941 *S. dinghuense* DHS0071; 3 — AJ544082 *S. ocellatum* SAG 48.90; 4 — KT867205 *S. parciramosum* clone Q15-5; 5 — KT867200 *S. cornutum* clone Q14-1; 6 — KT867196 *S. tuberculatum* clone LS6-2; 7 — KT867177 *S. anomalum* clone TM03-7; 8 — KT867160 *S. fragile* clone E3-3; 9 — KT867159 *S. turfaceum* clone Q1-2; 10 — KT867153 *S. hormoides* var. *subarcticum* clone J1-11; 11 — KT867137 *S. hormoides* clone Q9-2; 12 — KT867117 *S. informe* clone E2-2; 13 — KT867101 *S. panniforme* clone LS21-42.

Для анализа вторичной структуры ITS удалось получить данные только для двух образцов (Fig. 5). Длина спирали D1–D1' составила всего 65 п. н.

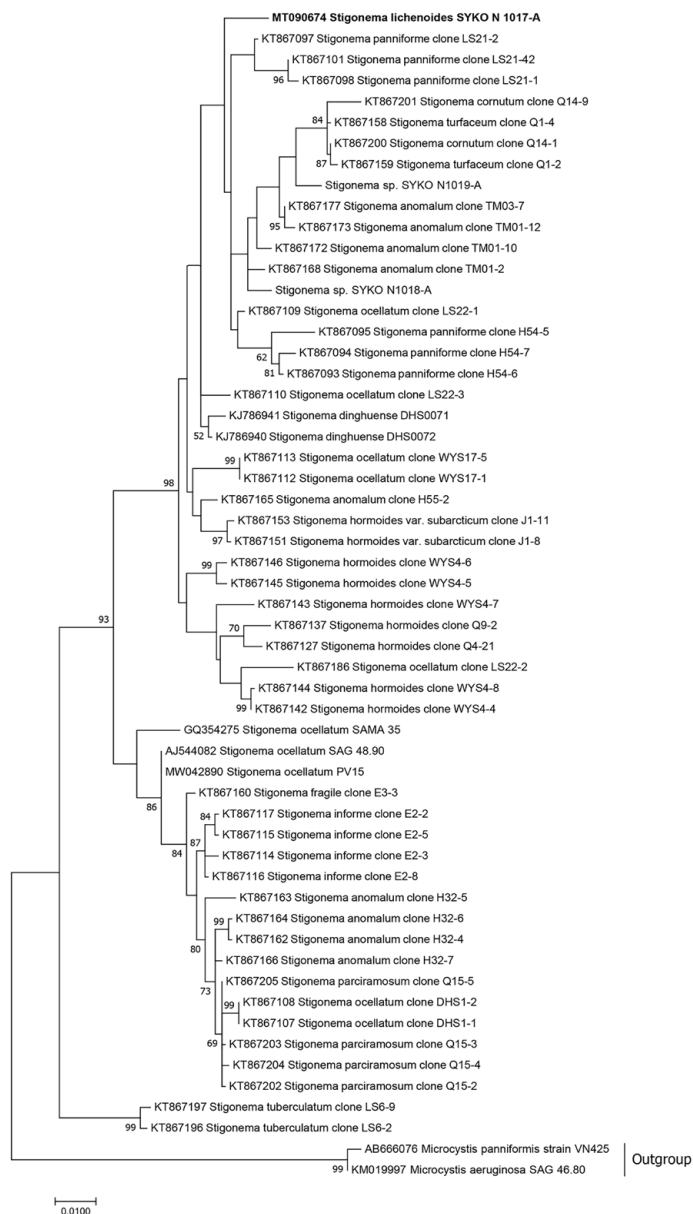


Fig. 4. Молекулярно-филогенетическое древо для представителей рода *Stigonema* построенное на основании сравнения последовательностей гена 16S рПНК с использованием метода максимального правдоподобия (ML) / The molecular phylogenetic tree for representatives of the genus *Stigonema* was constructed based on comparison of 16S rRNA gene sequences using the maximum likelihood (ML) method.

Последовательность исследуемого нами образца выделена жирным шрифтом. Указаны значения поддержки $\geq 50\%$ / In accordance with the selection we have given, the font is highlighted in bold. Bootstrap values ($\geq 50\%$) shown on the figure.

45 (U/C), в сравнении с *Stigonema* 04070 в позициях 44 (A/G0, 46 (A/U), 47 (A/G), 51 (U/A).

Анализ структуры спирали D1–D1' показал, что у исследованных образцов отличается длина последовательностей, присутствует большое количество нуклеотидных замен и вставок. Полагаем, что данный участок нуклеотидной последовательности (регион ITS) может быть использован как дополнительный признак при идентификации таксономической принадлежности представителей рода *Stigonema*.

Таким образом, изучение морфологических, экологических и генетических особенностей цианобактерии, выделенной из *Ephebe lanata*, позволило описать новый для науки вид рода *Stigonema*, являющегося фотобионтом редкого для северных регионов Урала лишайника.

Благодарности

Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ № 22-24-00673 (<https://rscf.ru/project/22-24-00673/>). Авторы крайне признательны Т. Н. Пыстиной (Институт биологии Коми НЦ УрО РАН) за помощь в идентификации образцов лишайника, М. А. Гололобовой (МГУ имени М. В. Ломоносова) за помощь на всех этапах подготовки статьи, включая обсуждение результатов и редакционную правку, а также анонимным рецензентам за высказанные замечания и ценные предложения.

References / Литература

- Atlas Respubliki Komi* [Atlas of the Komi Republic]. 2011. Moscow: 448 p. [*Атлас Республики Коми*. 2011. М.: 448 с.].
- BOLD Systems. 2023. <http://www.boldsystems.org> (Data of access: 10 III 2023).
- Butler R. D., Allsopp A. 1972. Ultrastructural investigations in the Stigonemataceae (Cyanophyta). *Archiv für Mikrobiologie* 82: 283–299. <https://doi.org/10.1007/BF00424933>
- Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Sayers E. W. 2016. GenBank. *Nucleic Acids Research* 44: 67–72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>
- Davydov D. 2018. Checklist of cyanobacteria from the European polar desert zone. *Botanica* 24(2): 185–201. <https://doi.org/10.2478/botlit-2018-0018>
- Davydov D., Patova E. 2018. The diversity of Cyanoprokaryota from freshwater and terrestrial habitats in the Eurasian Arctic and Hypoarctic. *Hydrobiologia* 811: 119–137. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3400-3>
- Elenkin A. A. 1936. *Monographia algarum Cyanophycearum aquidulcium et terrestrium in finibus URSS inventarium. Pars generalis* [Bluegreen algae of the USSR. Monograph of freshwater and terrestrial Cyanophyceae discovered within the USSR. A common part]. Moscow–Leningrad: 682 p. [Еленкин А. А. 1936. *Синезеленые водоросли СССР. Монография пресноводных и наземных Сиауорфусеае, обнаруженных в пределах СССР. Общая часть*. М.–Л.: 684 с.].
- Geitler L. 1932. Cyanophyceae. Dr. L. Rabenhorst's *Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. Bd 14. Leipzig: 1196 p.
- Guiry M. D., Guiry G. M. 2023. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org> (Data of access: 20 IX 2023).
- Hitch C. J. B., Millban J. W. 1975. Nitrogen metabolism in lichens. VII. Nitrogenase activity and heterocyst frequency in lichens with blue-green phycobionts. *New Phytologist* 75(2): 239–244. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1975.tb01392.x>

- Iteman I., Rippka R., Tandeau de Marsac N., Herdman M. 2000. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA–23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology* 146(6): 1275–1286. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-6-1275>
- James P. 2007. *Nordic Lichen Flora. Vol. 3. Cyanolichens*. Uddevalla: 219 p.
- Komárek J. 2013. Cyanoprokaryota 3. Teil: Heterocytous genera. *Süßwasserflora von Mitteleuropa. Bd 19/3*. Berlin/Heidelberg: 1133 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2737-3>
- Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K. 2008. MEGA: A biologist–centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9(4): 299–306. <https://doi.org/10.1093/bib/bbn017>
- Mareš J., Lara Y., Dadáková I., Hauer T., Uher B., Wilmotte A., Kaštovský J. 2015. Phylogenetic analysis of cultivation-resistant terrestrial cyanobacteria with massive sheaths (*Stigonema* spp. and *Petalonema alatum*, Nostocales, Cyanobacteria) using single-cell and filament sequencing of environmental samples. *Journal of Phycology* 51(2): 288–297. <https://doi.org/10.1111/jpy.12273>
- Myrdal M. 2022. Botany (UPS). Museum of Evolution, Uppsala University. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/ufmslw> accessed via GBIF.org (Data of access: 26 IX 2023).
- NCBI. 2023. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Data of access: 26 IX 2023).
- Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8): 3327–3332. <https://doi.org/10.1128/aem.63.8.3327-3332.1997>
- Patova E. N., Novakovskaya I. V., Sivkov M. D. 2023. Cyanobacteria and algae in biological soil crusts of frost boils in the mountainous tundra of the Urals. *Eurasian Soil Science* 56: 184–197. <https://doi.org/10.1134/S1064229322601822>
- Patova E., Sivkov M., Patova A. 2016. Nitrogen fixation activity in biological soil crusts dominated by cyanobacteria in the Subpolar Urals (European North-East Russia). *FEMS Microbiology Ecology* 92(9): fiw131. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw131>
- Rippin M., Lange S., Sausen N., Becker B. 2018. Biodiversity of biological soil crusts from the Polar Regions revealed by metabarcoding. *FEMS Microbiology Ecology* 94(4): fiy036. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy036>
- Song G., Xiang X., Wang Z., Li R. 2015. Polyphasic characterization of *Stigonema dinghuense*, sp. nov. (Cyanophyceae, Nostocophycidae, Stigonemaceae), from Dinghu Mountain, south China. *Phytotaxa* 213(3): 212–224. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.213.3.2>
- Stenroos S., Ahti T., Lohtander K., Myllys L. (Eds.). 2011. *Suomen jäkäläopas* [Lichen Flora of Finland]. *Norrlinia* 21. Helsinki: 534 p.
- Strunecký O., Ivanova A. P., Mareš J. 2023. An updated classification of Cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis. *Journal of Phycology* 59: 12–51. <https://doi.org/10.1111/jpy.13304>
- Svenning M. M., Eriksson T., Rasmussen U. 2005. Phylogeny of symbiotic cyanobacteria within the genus *Nostoc* based on 16S rRNA sequence analyses. *Archives of Microbiology* 183: 19–26. <https://doi.org/10.1007/s00203-004-0740-y>
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173(2): 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31(3): 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>