

**Національна Академія наук України
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МИХАЙЛЮК ТЕТЯНА ІВАНІВНА

УДК 582.26:582.232

ДИСЕРТАЦІЯ

**ВОДРОСТІ ТА ЦІАНОБАКТЕРІЇ БІОЛОГІЧНИХ
ГРУНТОВИХ КІРОЧОК: РІЗНОМАНІТТЯ, ФІЛОГЕНІЯ,
ТАКСОНОМІЯ, ЕКОЛОГІЯ, ПОШИРЕННЯ**

03.00.05 – Ботаніка

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело




Т.І. Михайлюк

Науковий консультант: **Виноградова Оксана Миколаївна**

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник

Київ – 2021

Всі вимірювання ідентичні 

АНОТАЦІЯ

Михайлюк Т.І. Водорості та ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок: різноманіття, філогенія, таксономія, екологія, поширення. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису за сукупністю наукових статей.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.05 – Ботаніка. – Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота є завершеним оригінальним дослідженням, присвяченим комплексному вивченню водоростей та ціанобактерій біологічних ґрунтових кірочок окремих екосистем Європи (приморських дюн, лісів та гіпергалінних відвалів України і Німеччини), пустель, напівпустель і лісів Південної Америки (Чилі) та тундрових екосистем полярних регіонів (Свальбард і Антарктичні острови), з висвітленням їх різноманіття, філогенії, таксономії окремих груп, екологічних особливостей та поширення. Особливу увагу приділено філогенії і таксономії Klebsormidiophyceae (Streptophyta) як домінуючих представників у біокірочках помірної зони. Роботу виконано із використанням класичних та сучасних молекулярно-філогенетичних методів (інтегративний підхід), застосованих до ідентифікації водоростей і ціанобактерій.

Біологічні ґрунтові кірочки (біокірочки) – комплексні мікроекосистеми, що розвиваються на поверхні ґрунту та включають бактерії, ціанобактерії, водорості, мікроскопічні гриби, лишайники, мохи, протисти, безхребетні. Ґрунтові біокірочки є початковою (піонерною) стадією формування ґрунтів; вони стабілізують поверхню ґрунту, покращують вологоутримуючу здатність, фізико-хімічні якості та сприяють підвищенню родючості. Ґрунтові біокірочки поширені у всіх кліматичних зонах Землі в умовах, де ріст вищих рослин лімітований несприятливими факторами середовища. Незважаючи на активні дослідження біокірочок, низка питань все ще чекає свого вирішення. Зокрема,

недостатньо відомостей по біогеографії кірочок, залежності видового складу їх організмів від екологічних і географічних факторів, багато територій та екоотопів все ще досліджені недостатньо, майже всі відомості про видовий склад водоростей та ціанобактерій біокірочок отримані на основі морфологічного вивчення, молекулярно-філогенетичні методи оцінки їх біорізноманіття увійшли у практику відносно недавно, існують значні прогалини у таксономії водоростей та ціанобактерій біокірочок.

Метою роботи було дослідити видове різноманіття водоростей та ціанобактерій ґрунтових біокірочок різноманітних за кліматичними і екологічними умовами регіонів, використовуючи інтегративний підхід (комплекс морфолого-культуральних та молекулярно-філогенетичних методів); виявити особливості екології та поширення водоростей і ціанобактерій, вивчити філогенію та провести таксономічні ревізії окремих таксонів, приділяючи особливу увагу представникам *Klebsormidiophyceae* як домінуючим організмам, що формують біокірочки в умовах помірної зони.

Загалом, у біокірочках окремих регіонів та екосистем, виявлено 313 видів водоростей та ціанобактерій (*Chlorophyta* – 160 видів, *Streptophyta* – 30, *Ochrophyta* – 48 (*Xanthophyceae* – 26, *Eustigmatophyceae* – 4 та *Bacillariophyceae* – 18), *Cyanobacteria* – 75). Виявлено переважання зелених водоростей при значній ролі ціанобактерій в біокірочках балтійських та чорноморських дюн, ціанобактерій – приморських екосистем Азовського моря, зелених водоростей при майже повній відсутності ціанобактерій – лісів Німеччини, зелених ульвофіцієвих водоростей, витривалих до засолення – штучних гіпергалінних екосистем Німеччини, унікальних представників роду *Klebsormidium* – у біокірочках напівпустель та лісів Чилі, жовтозелених водоростей – полярних регіонів.

Біокірочки прибережних дюн Європи характеризуються переважанням зелених водоростей при значному різноманітті ціанобактерій, при цьому роль деяких вологолюбних представників вища у вологіших та прохолодніших умовах Балтійських островів (загалом 86 видів), натомість у біокірочках

чорноморських дюн (60 видів) виявлено більше галофільних видів. Біокірочки приморських екосистем мису Казантип (54 види), що розвиваються на ракушняковому піску та глинистих осипах, мають своєрідний видовий склад і характеризуються високим різноманіттям та переважаною роллю ціанобактерій. Видовий склад водоростей і ціанобактерій біокірочок приморських дюн визначається, перш за все, текстурою піску (за гранулометричним аналізом), а також його хімічним складом (переважно електропровідністю, рН, вмістом карбонатів і фосфору), крім того, кліматичними особливостями регіону. На прикладі водоростей та ціанобактерій біокірочок балтійських дюн показано, що використання інтегративного підходу дозволяє уточнити ідентифікацію низки домінуючих та рідкісних таксонів, які в цілому склали близько 15% виявлених видів. На прикладі біокірочок лісів центральної Німеччини, в яких переважають зелені водорості (52 види), показано, що рівень лісового порядкування суттєво впливає на склад водоростей біокірочок, які стають значно різноманітнішими, ймовірно у зв'язку з порушенням рослинного покриву через рубки та насадження. У біокірочках штучно створених гіпергалінних екосистем Німеччини (30 видів) відзначено високе різноманіття *Ulvothraceae*. Більшість виявлених таксонів водоростей і ціанобактерій (60% видового складу) відомі як представники, що є витривалими до засолення, серед них відзначено 18 нових філогенетичних ліній. Серед чотирьох рослинно-кліматичних зон Чилі (86 видів), біокірочки пустелі Атакама найбільш бідні та складені одноклітинними представниками. Біокірочки інших локалітетів (найрізноманітніші у сухих лісах) створені унікальними видами *Klebsormidium*, описаними як нові для науки таксони. Біокірочки полярних регіонів (82 види на Свальбарді та 49 – Антарктичних островах) мали різноманітний видовий склад еукаріотичних водоростей, представлених низькою різноманітністю, та були багаті на представників *Xanthophyceae*.

На основі інтегративного підходу виявлено нові таксони в межах класу *Klebsormidiophyceae* (*Streptophyta*) – роди *Interfilum* та *Streptosarcina*. Таким

чином, окреслено загальну філогенію класу, що містить організми, домінуючі у ґрунтових біокірочках помірної зони. Наразі клас включає 5 родів: *Klebsormidium*, *Interfilum*, *Hormidiella*, *Streptosarcina* та *Entransia*, серед яких представлені як таксони з нитчастою сланню, так і з пакетоподібною та розгалуженою. Центральну філогенетичну лінію класу розділено на 7 основних суперклад (A, B, C, D, E, F, G), що відповідають роду *Interfilum* (суперклада A) та різним філогенетичним лініям *Klebsormidium* (решта суперклад). Запропоновано штами, що можуть слугувати референтними для 8 видів *Klebsormidium*, описано 7 нових видів та 2 різновидності *Klebsormidium* з філогенетичної клади G, які були виділені з біокірочок Європи, Африки, Південної та Північної Америки. Переважний розвиток *Klebsormidium* з клади G у екотопах Південної півкулі змушує переглянути уявлення про *Klebsormidium* як водорість-космополіта.

Вивчення ділення клітин класу показало, що воно відбувається за механізмом, близьким до споруляції. Формування різних морфотипів пов'язано з формою клітин, текстурою клітинної оболонки, механічними взаємозв'язками клітин та впливом середовища. Виявлено нову філогенетичну лінію серед Streptophyta (рід *Streptofilum*), що характеризується унікальним клітинним покривом (субмікроскопічні органічні лусочки своєї волоскоподібної будови). Враховуючи відокремлене філогенетичне положення та унікальність клітинної будови, дана лінія може претендувати на ранг нового класу серед Streptophyta.

На основі дослідження штамів рідкісних та цікавих у флористико-екологічному сенсі зелених водоростей та ціанобактерій, описано 7 видів з родів *Parietochloris*, *Tetrademus*, *Aliterella*, *Oculatella*, *Cyanocohniella*, проведено емендацію та епітипіфікацію 5 видів (*Actinochloris*, *Eremochloris*, *Xerochlorella*, *Crinalium*) та запропоновано 4 номенклатурні комбінації (*Heterochlamydomonas*, *Xerochlorella*, *Timaviella*).

Молекулярно-філогенетичними методами показано широке, ймовірно космополітичне, поширення в межах обох півкуль видів родів *Bracteacoccus*,

Watanabea, *Elliptochloris*, *Edaphochlorella*, *Xerochlorella*, *Pleuraestrosarcina*, *Interfilum*. З іншого боку, поширення кількох видів *Klebsormidium* з філогенетичної суперклади G, на основі наших даних, переважно відбувається в межах Південної півкулі.

Загалом, описано 2 роди, 18 видів і 2 різновидності водоростей та ціанобактерій, здійснено емендацію та епітипіфікацію 16 видів та запропоновано 6 номенклатурних комбінацій.

Ключові слова: водорості, ціанобактерії, біологічні ґрунтові кірочки, різноманіття, молекулярна філогенія, таксономія, Klebsormidiophyceae, екологія, поширення

SUMMARY

Mikhailyuk T.I. Algae and cyanobacteria of biological soil crusts: diversity, phylogeny, taxonomy, ecology, distribution. – Qualifying scientific work, collection of scientific manuscripts.

The thesis for the Degree of Doctor of Biological Sciences for speciality 03.00.05 – «Botany». M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv, 2021.

The thesis represents complete original investigation devoted complex study of algae and cyanobacteria from biological soil crusts of some ecosystems of Europe (maritime sand dunes, forests and hypersaline tailing piles of Ukraine and Germany), deserts, semi-deserts and forests of South America (Chile) and tundra ecosystems of Polar Regions (Svalbard and Antarctic islands). The investigation was focused on biodiversity, phylogeny and taxonomy of some groups of algae and cyanobacteria as well as ecological peculiarities and distribution. The main attention was paid to the phylogeny and taxonomy of Klebsormidiophyceae (Streptophyta) as dominating

representatives in biocrusts of temperate climatic zone. The thesis was completed using classical and modern molecular-phylogenetic methods (an integrative approach) applied for identification of algae and cyanobacteria.

Biological soil crusts (biocrusts) are complex microecosystems developed on soil surface and included bacteria, cyanobacteria, algae, microscopic fungi, lichens, mosses, protists and invertebrates. Soil crusts are the first (pioneer) stage of soil formation. They can stabilize the soil surface; improve water retention and soil structure, increase soil fertility. Soil biocrusts distribute in all climatic zones of the Earth, in conditions where the growth of higher plants are limited by unfavorable environmental factors. Despite active investigation of biocrusts some questions are still unresolved: information concerning biogeography of soil crust organisms and influence of ecological factors on their species composition and diversity are limited; some regions are little investigated. Almost all available data on microalgal and cyanobacterial biocrust species composition have been obtained through morphological studies. Molecular phylogenetic methods have just begun to be applied to the study of the biocrust organisms biodiversity. Taxonomy of some groups of algae and cyanobacteria inhabiting in biocrusts are still problematic.

The aim of our thesis was:

- to investigate species composition of algae and cyanobacteria from soil biocrusts of climatically and ecologically different regions, using an integrative approach (the complex of morphological, cultural and molecular-phylogenetic methods);
- to reveal the peculiarities of ecology and distribution of algae and cyanobacteria;
- to study the phylogeny and complete taxonomic revisions of some algal and cyanobacterial groups paying the main attention to the representatives of Klebsormidiophyceae as organisms forming biocrusts in temperate climatic zone.

Totally, 313 species of algae and cyanobacteria were found in biocrusts of some regions and ecosystems (Chlorophyta – 160 species, Streptophyta – 30,

Ochrophyta – 48 (Xanthophyceae – 26, Eustigmatophyceae – 4 and Bacillariophyceae – 18), Cyanobacteria – 75). Predominance of green algae together with considerable role of cyanobacteria was indicated in biocrusts of sand dunes of Baltic and Black sea coasts; cyanobacteria was the most abandoned in biocrusts of coastal ecosystems of the Sea of Azov; green algae were leading group together with almost complete absence of cyanobacteria in biocrusts of German forests; Ulvophyceae (Chlorophyta) tolerant to saline environment were abandoned in artificial hypersaline ecosystems of Germany; unique taxa of *Klebsormidium* were dominating in biocrusts of semi-deserts and forests of Chile; Xanthophyceae were numerous and abandoned in polar regions.

Soil biocrusts of coastal sand dunes of Europe were characterized by predominance of green algae and considerable abundance of cyanobacteria. The role of some hydrophilous taxa was higher in humid and cool conditions of Baltic islands (totally 86 species), whereas more halophilic species were found in biocrusts of Black sea coast (60 species). Biocrusts of maritime ecosystems of cape Kazantip (54 species), which developed on the conquina beach and clay screes, had specific composition and characterized by high diversity and prevailing role of cyanobacteria. Sand texture (granulometric composition) and sand chemical peculiarities (mainly electrical conductivity, pH, carbonate content and the total phosphorus content) as well as climate peculiarities of the respective region are the main factors influenced the cyanobacterial and algal community structure of biocrusts in coastal dunes. Using an integrative approach allows more precise identification for some dominating and rare species (about 15% of the composition) of biocrust algae and cyanobacteria from Baltic dunes.

Investigation of biocrusts from forests of central Germany (52 species) with domination of green algae showed that the level of forest management essentially influenced algal species composition which starts to be more diverse perhaps because of disturbing of soil and plant cover through cutting and planting. High diversity of Ulvophyceae (Chlorophyta) was registered in biocrusts of potash tailing piles from central Germany. The most part of green algae and cyanobacteria (60% of species

composition, totally found 30 species) from these artificial hypersaline ecosystems are known as salty-tolerant representatives, among them 18 new unique phylogenetic lineages were found.

Among four investigated vegetation and climatic zones of Chile (86 species), biocrusts of the Atakama Desert (arid climate) is characterized by the lowest species richness and composed with unicellular algae and cyanobacteria. The biocrusts of other localities (the most diverse is in the dry forests, Mediterranean climate) formed by unique *Klebsormidium* species described as new for science taxa. The biocrusts of Polar Regions had diverse species composition of eukaryotic algae (82 species were registered in biocrusts of Svalbard and 49 species were found on Antarctic islands) represented by low abundance (the crusts formed by lichens and mosses), and considerable diversity of Xanthophyceae which typical for cold regions.

It was confirmed based on an integrative approach that *Interfilum* is a representative of Klebsormidiophyceae (Streptophyta); new genus *Streptosarcina* with two species was described as well. Thus, general phylogeny of the class which includes algae dominating in the biocrusts of temperate zone was determined. Now the class contains 5 genera: *Klebsormidium*, *Interfilum*, *Hormidiella*, *Streptosarcina* and *Entransia*, among them taxa with filamentous as well as packet-like and branched thalli are present. The central phylogenetic lineage of the class was divided on 7 main superclades (A, B, C, D, E, F, G), which correspond to the genus *Interfilum* (superclade A) and different phylogenetic lineages of *Klebsormidium* (other superclades). The reference strains were proposed for 8 *Klebsormidium* species; 7 new species and 2 varieties of *Klebsormidium* from phylogenetic superclade G isolated from biocrusts of Europe, Africa, North and South America were described. Prevalent development of clade G *Klebsormidium* in terrestrial ecosystems of South hemisphere forces to revision of the genus concept as alga cosmopolitan in distribution.

The study of cell division of the Klebsormidiophyceae showed that vegetative cells divide by mechanism close to sporulation. Formation of different morphotypes depends on shape of cells, texture of cell walls, mechanical interactions between cells

and the influence of environmental conditions. New phylogenetic lineage among Streptophyta (genus *Streptofilum*) with unique cell coverage (submicroscopic organic scales of specific piliform shape) was discovered. The lineage may pretend on the rank of a new class among Streptophyta taking into consideration separate phylogenetic position and uniqueness of cell structure.

Investigation of the strains of rare and interesting algae and cyanobacteria revealed to describe 7 new species (from genera *Parietochloris*, *Tetradesmus*, *Aliterella*, *Oculatella*, *Cyanocohniella*), provide emendation and epitypification of 5 species (*Actinochloris*, *Eremochloris*, *Xerochlorella*, *Crinalium*) and propose 4 taxonomical combinations (*Heterochlamydomonas*, *Xerochlorella*, *Timaviella*).

Investigation of the biocrust diversity using molecular phylogenetic methods showed wide, possibly cosmopolitan, distribution within both hemispheres some species of green algae: *Bracteacoccus*, *Watanabea*, *Elliptochloris*, *Edaphochlorella*, *Xerochlorella*, *Pleuraistrosarcina*, *Interfilum*. While distribution of some species of clade G *Klebsormidium* is realized mostly within South hemisphere.

Totally 2 new genera, 18 species and 2 varieties of algae and cyanobacteria were described, emendation and epitypification were provided for 16 species and 6 taxonomical combinations were proposed.

Key words: algae, cyanobacteria, biological soil crusts, diversity, molecular phylogeny, taxonomy, Klebsormidiophyceae, ecology, distribution

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Основні наукові результати дисертації опубліковані у фахових виданнях, віднесених до першого і другого кuartилів (Q1 і Q2), відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports

1. **Mikhailyuk T.**, Sluiman H., Massalski A., Mudimu O., Demchenko E., Kondratyuk S., Friedl T. (2008). New streptophyte green algae from terrestrial habitats and an assessment of the genus *Interfilum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *J. Phycol.*, 44, 1586–1603. doi:10.1111/j.1529-8817.2008.00606.x
2. Rindi F., **Mikhailyuk T.**, Sluiman H.J., Friedl T., López-Bautista J.M. (2011). Phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Mol. Phyl. Evol.*, 58(2), 218–231. doi:10.1016/j.ympev.2010.11.030
3. **Mikhailyuk T.**, Holzinger A., Massalski A., Karsten U. (2014). Morphology and ultrastructure of *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Streptophyta) with special reference to cell division and thallus formation. *Eur. J. Phycol.*, 49(4), 395–412. doi:10.1080/09670262.2014.949308
4. **Mikhailyuk T.**, Glaser K., Holzinger A., Karsten U. (2015). Biodiversity of *Klebsormidium* (Streptophyta) from alpine biological soil crusts (Alps, Tyrol, Austria, and Italy). *J. Phycol.*, 51(4), 750–767. doi:10.1111/jpy.12316
5. Schulz K., **Mikhailyuk T.**, Dreßler M., Leinweber P., Karsten U. (2016). Biological soil crusts from coastal dunes at the Baltic Sea: cyanobacterial and algal biodiversity and related soil properties. *Microb. Ecol.*, 71, 178–193. doi:10.1007/s00248-015-0691-7
6. Borchhardt N., Baum C., **Mikhailyuk T.**, Karsten U. (2017). Biological Soil Crusts of Arctic Svalbard – Water Availability as Potential Controlling Factor for Microalgal Biodiversity. *Frontiers in Microbiology*, 8, Article 1485. doi:10.3389/fmicb.2017.01485
7. Borchhardt N., Schiefelbein U., Abarca N., Boy J., **Mikhailyuk T.**, Sipman H.J.M., Karsten U. (2017). Diversity of algae and lichens in biological soil crusts of Ardley

- and King George islands, Antarctica. *Antarctic Science*, 29(3), 229–237. doi:10.1017/S0954102016000638
8. Glaser K., Donner A., Albrecht M., **Mikhailyuk T.**, Karsten U. (2017). Habitat-specific composition of morphotypes with low genetic diversity in the green algal genus *Klebsormidium* (Streptophyta) isolated from biological soil crusts in Central European grasslands and forests. *Eur. J. Phycol.*, 52(2), 188–199. doi:10.1080/09670262.2016.1235730
 9. Glaser K., Baumann K., Leinweber P., **Mikhailyuk T.**, Karsten U. (2018). Algal richness in BSCs in forests under different management intensity with some implications for P cycling. *Biogeosciences*. 15(13), 4181–4192. doi:10.5194/bg-15-4181-2018
 10. **Mikhailyuk T.**, Lukešová A., Glaser K., Holzinger A., Obwegeser S., Nyporko S., Friedl T., Karsten U. (2018). New taxa of Streptophyte algae (Streptophyta) from terrestrial habitats revealed using an integrative approach. *Protist*, 169(3), 406–431. doi:10.1016/j.protis.2018.03.002
 11. **Mikhailyuk T.**, Glaser K., Tsarenko P., Demchenko E., Karsten U. (2019). Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast, in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria. *Eur. J. Phycol.* 54(3), 263–290. doi:abs/10.1080/09670262.2018.1557257
 12. Samolov E., **Mikhailyuk T.**, Lukešová A., Glaser K., Büdel B., Karsten U. (2019). Usual alga from unusual habitats: biodiversity of *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) from the phylogenetic superclade G isolated from biological soil crusts. *Mol. Phyl. Evol.*, 133, 236–255. doi:org/10.1016/j.ympcv.2018.12.018
 13. Jung P., **Mikhailyuk T.**, Emrich D., Baumann K., Dultz S., Büdel B. (2020). Shifting Boundaries: ecological and geographical range extension based on three new species in the cyanobacterial genera *Aliterella*, *Cyanocohniella* and *Oculatella*. *J. Phycol.*, 56(5), 1216–1231. doi:10.1111/jpy.13025-19-170
 14. **Mikhailyuk T.**, Holzinger A., Tsarenko P., Glaser K., Demchenko E., Karsten U. (2020): *Dictyosphaerium*-like morphotype in terrestrial algae: what is *Xerochlorella*

(Trebouxiophyceae, Chlorophyta)? *J. Phycol.*, 56(3), 671–686.
doi:10.1111/jpy.12974-19-186

15. Rybalka N., **Mikhailyuk T.**, Darienko T., Dultz S., Blanke M., Friedl. T. (2020). Genotypic and phylogenetic diversity of new isolates of terrestrial Xanthophyceae (Stramenopiles) from maritime sandy habitats. *Phycologia*, 59(6), 506–514. doi:org/10.1080/00318884.2020.1802950

**Статті у інших виданнях, індексованих у міжнародних наукометричних
базах даних**

1. **Mikhailyuk T.**, Demchenko E.M., Kondratyuk S.Ya. (2003). *Parietochloris ovoideus* sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a new aerophyte alga from Ukraine. *Algol. Stud.*, 110, 1–16.
2. **Mikhailyuk T.**, Vinogradova O.N., Glaser K., Karsten U. (2016). New Taxa for the Flora of Ukraine, in the Context of Modern Approaches to Taxonomy of Cyanoprokaryota / Cyanobacteria. *Intern. J. Algae*, 18(4), 301–320.
3. **Mikhailyuk T.**, Vinogradova O.N., Glaser K., Demchenko E., Karsten U. (2018). Diversity of Terrestrial Algae of Cape Kazantip (the Sea of Azov, Ukraine) and Some Remarks on their Phylogeny and Ecology. *Intern. J. Algae*, 20(4), 313–338.
4. Vinogradova O.N., **Mikhailyuk T.I.** (2018). On the taxonomy and nomenclature of some terrestrial taxa of *Plectonema* s.l. (Cyanophyceae). 1. The case of *Plectonema edaphicum*. *Intern. J. Algae*, 20(3), 211–224.
5. Vinogradova O.N., **Mikhailyuk T.**, Glaser K., Holzinger A., Karsten U. (2018). New species of *Oculatella* (Synechococcales, Cyanobacteria) from terrestrial habitats of Ukraine. *Укр. ботан. журн.*, 75(2), 149–159. doi:10.15407/ukrbotj74.06.509
6. **Mikhailyuk T.**, Vinogradova O.N., Holzinger A., Glaser K., Samolov E., Karsten U. (2019). New record of the rare genus *Crinalium* Crow (Oscillatoriales, Cyanobacteria) from sand dunes of the Baltic Sea, Germany: epitypification and emendation of *Crinalium magnum* Fritsch et John based on an integrative approach. *Phytotaxa*, 400(3), 165–179. doi:org/10.11646/phytotaxa.400.3.4

7. Samolov E., Baumann K., Büdel B., Jung P., Leinweber P., **Mikhailyuk T.**, Karsten U., Glaser K. (2020). Biodiversity of algae and cyanobacteria in biological soil crusts collected along a climatic gradient in Chile using an integrative approach. *Microorganisms*, 8(7), 1047. doi:10.3390/microorganisms8071047
8. Sommer V., **Mikhailyuk T.**, Glaser K., Karsten U. (2020). Uncovering Unique Green Algae and Cyanobacteria Isolated From Biocrusts in Highly Saline Potash Tailing Pile Habitats, Using an Integrative Approach. *Microorganisms*, 8(11), 1667. doi: 10.3390/microorganisms8111667

Розділ у монографії

1. **Михайлюк Т.І.**, Лукешова А., Массальський А., Фрідл Т. (2013). Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей порядку Klebsormidiales (Klebsormidiophyceae, Streptophyta)). В кн.: Молекулярна філогенія і сучасна таксономія наземних спорових рослин / Відп. ред. Кондратюк С.Я. К: Наук. думка, 2013, 95–145.

Наукові праці, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. **Mikhailyuk T.**, Demchenko E.M., Kondratyuk S.Ya. Algae of granitic outcrops from the left bank of Pivdennyi Bug River (Ukraine). *Biology and Taxonomy of Green Algae IV: Intern. Symposium*, Smolenice-Castl, Slovakia, June 24-28, 2002, 63.
2. **Mikhailyuk T.**, Kondratyuk S.Ya. Epiphytic algae of some lichen species. *XVII Intern. Botanical Congress*, Vienna, Austria, 17-23 July 2005, 445.
3. **Mikhailyuk T.**, Demchenko E.M., Massalski A.-K. *Massjukia* gen. nov. (Chlorophyta, Charophyceae), a new aerophytic algae from granite outcrops (Ukraine). *Algae in terrestrial ecosystems: Intern. Confer.*, Kaniv, 27-30 September 2005, 52.
4. **Mikhailyuk T.**, Sluiman H., Massalski A., Mudimu O., Demchenko E., Kondratyuk S., Friedl T. New streptophyte green algae from terrestrial habitats and an assessment of the genus *Interfilum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Biology and Taxonomy*

- of green algae V: Intern. Symposium*, Smolenice-castle, Slovakia, June 25-29, 2007, 46.
5. Sluiman H., **Mikhailyuk T.**, Friedl T., Beck A. Phylogenetic analysis of the 516 and 1506 group I introns of the Klebsormidiales (Klebsormidiaceae, Streptophyta). *Biology and Taxonomy of green algae V: Intern. Symposium*, Smolenice-castle, Slovakia, June 25-29, 2007, 67–68.
 6. **Mikhailyuk T.**, Sluiman H.J., Rindi F., Massalski A.K., Mudimu O., Friedl T. *Interfilum* and *Klebsormidium* are closely related streptophycean algae. *Algal Culture Collections 2008*, 9-10 June 2008, Oban, UK, 22.
 7. Rindi F., **Mikhailyuk T.**, Sluiman H.J., Friedl T., Lopes-Bautista J.M. Shedding light into green chaos: a reassessment of the classification of the Klebsormidiales (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) based on molecular evidence. *9-th Intern. Phycol. Congress, Informal Workshop “Freshwater green algal systematics”*, Tokyo, Japan, 2-8 August 2009, 5.
 8. **Mikhailyuk T.**, Pröschold, T., Holzinger, A., Karsten, U. Biodiversity of *Klebsormidium* from highland soil crusts (Alps, Tyrol, Austria). *Advances in modern phycology: V Intern. Confer.*, 23-25 May 2012, Kyiv, Ukraine, 374–375.
 9. **Mikhailyuk T.** Biological soil crusts from sand dunes of maritime ecosystems. *Network Meeting of the Alexander von Humboldt Foundation*. Conference Volume. 20-22 March 2013, Hannover, 183–184.
 10. **Mikhailyuk T.**, Pröschold T., Holzinger A., Karsten U. Biodiversity of *Klebsormidium* from highland soil crusts (Alps, Tyrol, Austria) *BioSyst. EU 2013. Global Systematics!*, 18-22 February 2013, Vienna, Austria, 141.
 11. **Mikhailyuk T.**, Schulz K., Karsten U. Algal and cyanobacterial component of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic sea coast (Germany). *15-th Scien. Confer. of the section Phycology of the German Botanical Society*, 23-26 February 2014, Stralsund, Germany, 54.
 12. Glaser K., Borchhardt N., Schulz K., Baumann K., Leinweber P., **Mikhailyuk T.**, Karsten U. Linking biological soil crust diversity to ecological functions. *European*

- Geosciences Union. General Assembly 2016*. Vienna, Austria, 17-22 April 2016. Geophysical Research Abstracts, 2016, 18. Abstract number 5790.
13. Виноградова О.М., Михайлюк Т.І., Громакова А.Б. До вивчення ціанобактеріальних кірочок крейдяних відслонень Харківської області. *XIV з'їзд Українського Ботанічного Товариства*, 25-26 квітня 2017 р.
14. Samolov E., Glaser K., Baumann K., Leinweber P., Jung P., Büdel B., **Mikhailyuk T.**, Karsten U. Biological soil crusts in Chile along a precipitation gradient. *European Geosciences Union. General Assembly 2017*, 23–28 April 2017, Vienna, Austria, Geophysical Research Abstracts, 2017, 19, Abstract number 1368.
15. **Mikhailyuk T.**, Lukešová A., Glaser K., Holzinger A., Obwegeser S., Nyporko S., Friedl T., Karsten U. New lineages of streptophyte algae (Streptophyta) from terrestrial habitats revealed by an integrative approach. *17-th Scien. Confer. of the Phycology Section of the German Botanical Society*, March 11–14, 2018, Berchtesgaden, Germany, 63.
16. **Mikhailyuk T.** New and rare taxa of algae and cyanobacteria from biological soil crusts revealed using an integrative approach. *9-th Bonn Humboldt Award Winners' Forum "Frontiers in Biogeography, Ecology, Anthropology, and Evolution. Humboldt and the 'Cosmos' revisited in the 21st Century"*. 16–20 October 2019, Bonn, Germany, 305–306.
17. **Mikhailyuk T.**, Tsarenko P., Glaser K., Holzinger A., Demchenko E., Karsten, U. *Dictyosphaerium*-like morphotype in terrestrial algae: what is *Xerochlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)? *Advances in modern phycology: VI Intern. Confer.*, 15-17 May 2019, Kyiv, Ukraine, 69–70.
18. Vynogradova O.M., **Mikhailyuk T.**, Gromakova A.B. New and interesting records of cyanobacteria in biological soil crusts from chalk outcrops of Kharkiv region (Ukraine). *Advances in modern phycology: VI Intern. Confer.*, 15-17 May 2019, Kyiv, Ukraine, 122–123.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ	11
ПЕРЕЛІК ОСНОВНИХ УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	21
ВСТУП	23
РОЗДІЛ 1. РІЗНОМАНІТТЯ, ФІЛОГЕНІЯ, ЕКОЛОГІЯ ТА ПОШИРЕННЯ ВОДОРОСТЕЙ І ЦІАНОБАКТЕРІЙ У ҐРУНТОВИХ БІОКІРОЧКАХ ОКРЕМИХ НАЗЕМНИХ ЕКОСИСТЕМ ТА РЕГІОНІВ	31
1.1. Водорості і ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок прибережних піщаних дюн Балтійського моря (Німеччина)	31
1.1.1. Аналіз різноманіття водоростей і ціанобактерій біологічних ґрунтових кірочок прибережних дюн Балтійського моря (Німеччина) у зв'язку з характеристиками піску	31
1.1.2. Склад біологічних ґрунтових кірочок прибережних дюн Балтійського моря (Німеччина) в контексті інтегративного підходу до таксономії водоростей і ціанобактерій	48
1.2. Водорості і ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок прибережних екосистем Азовського та Чорного морів (Україна)	77
1.2.1. Водорості і ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок приморських екосистем мису Казантип (Азовське море, Україна)	77
1.2.2. Водорості і ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок приморських піщаних дюн Дунайського біосферного заповідника (Одеська область, Україна)	104
1.3. Водорості і ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок лісових екосистем центральної Німеччини, що знаходяться під різним рівнем лісового упорядкування	143
1.4. Водорості і ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок гіпергалінних відвалів після видобутку поташу (Німеччина)	156

1.5. Водорості і ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок різних рослинно-кліматичних зон Чилі (Південна Америка) в контексті інтегративного підходу щодо оцінки їхнього різноманіття	196
1.6. Водорості біологічних ґрунтових кірочок полярних регіонів	225
1.6.1. Водорості біологічних ґрунтових кірочок арктичного острова Свальбард (Норвегія)	225
1.6.2. Водорості біологічних ґрунтових кірочок островів Ардлі та Короля Георга (Антарктида)	238
РОЗДІЛ 2. KLEBSORMIDIOPHYCEAE (STREPTOPHYTA) ЯК ДОМІНУЮЧА ГРУПА У БІОКІРОЧКАХ ПОМІРНОЇ ЗОНИ	248
2.1. Молекулярна філогенія, морфологія, таксономія, різноманіття Klebsormidiphyceae (Streptophyta)	248
2.1.1. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей класу Klebsormidiphyceae (Streptophyta)	248
2.1.2. Філогенетичні взаємозв'язки центральних родів Klebsormidiphyceae – <i>Interfilum</i> та <i>Klebsormidium</i> (Streptophyta)	308
2.1.3. Морфологія та ультраструктура центральних родів Klebsormidiphyceae – <i>Interfilum</i> і <i>Klebsormidium</i> (Streptophyta)	323
2.2. Молекулярна філогенія, таксономія, різноманіття та біологія роду <i>Klebsormidium</i>	342
2.2.1. Різноманіття <i>Klebsormidium</i> у альпійських біологічних ґрунтових кірочках (Альпи, Тіроль, Австрія та Італія)	342
2.2.2. Різноманіття <i>Klebsormidium</i> у біологічних ґрунтових кірочках лук та лісів центральної Німеччини	361
2.2.3. Звичайна водорість з незвичайних місцезростань: різноманіття <i>Klebsormidium</i> з філогенетичної суперклади G	374
2.3. Молекулярна філогенія, таксономія, різноманіття та біологія роду <i>Interfilum</i>	395
2.4. Молекулярна філогенія, таксономія, різноманіття та біологія родів <i>Streptosarcina</i>, <i>Streptofilum</i> і <i>Hormidiella</i>	414

РОЗДІЛ 3. ВОДОРОСТІ І ЦІАНОБАКТЕРІЇ БІОЛОГІЧНИХ ҐРУНТОВИХ КІРОЧОК, ЦІКАВІ З ФЛОРИСТИКО-ТАКСОНОМІЧНОЇ ТОЧКИ ЗОРУ

.....	441
3.1. Філогенія і таксономія зелених та жовтозелених водоростей – мешканців біокірочок	441
3.1.1. Таксономія та біологія роду <i>Parietochloris</i> (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)	441
3.1.2. <i>Dictyosphaerium</i> -подібний морфотип серед наземних водоростей: молекулярна філогенія, таксономія та біологія роду <i>Xerochlorella</i> (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)	458
3.1.3. Молекулярна філогенія та біологія наземних Xanthophyceae (Ochrophyta) з приморських піщаних місцезростань: роди <i>Xanthonema</i> , <i>Pleurochloris</i> , <i>Heterococcus</i>	475
3.2. Рідкісні ціанобактерії в біокірочках: філогенія, таксономія, екологія	485
3.2.1. Нові види з родів <i>Cyanocohniella</i> , <i>Aliterella</i> та <i>Oculatella</i> (Cyanobacteria)	485
3.2.2. Нові види роду <i>Oculatella</i> (Synecococcales, Cyanobacteria) з наземних місцезростань України	502
3.2.3. Знахідка рідкісної ціанобактерії роду <i>Crinalium</i> з піщаних дюн узбережжя Балтійського моря (Німеччина)	516
3.2.4. Нові таксони для флори України в контексті сучасного підходу до таксономії ціанобактерій: роди <i>Oculatella</i> , <i>Nodosilinea</i> та <i>Roholtiella</i>	532
3.2.5. Таксономія та номенклатура деяких наземних ціанобактерій роду <i>Plectonema</i> s.l.	553
ВИСНОВКИ	568
ДОДАТОК 1. СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ	572

ПЕРЕЛІК ОСНОВНИХ УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- SAG – колекція культур водоростей університету м. Геттінген, Німеччина
- UTEX – колекція культур водоростей університету Техасу (США)
- CCAP – колекція культур водоростей та протистів (Великобританія)
- BCCO (Чехія) – колекція ґрунтових водоростей та ціанобактерій при Біологічному центрі колекції організмів, Чеська Академія наук
- IBASU-A – колекція культур мікроводоростей Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
- ASKU – колекція культур водоростей Київського університету імені Тараса Шевченка, Україна
- KW – гербарій Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
- 18S rRNA, SSU – ядерний ген, що кодує малу субодиницю рибосомальної РНК еукаріот
- 16S rRNA – ядерний ген, що кодує малу субодиницю рибосомальної РНК прокаріот
- ITS – internal transcribed spacer, внутрішній транскрибований спейсер еукаріот
- 16S-23S ITS – внутрішній транскрибований спейсер прокаріот
- rbcL* – хлоропластний ген, що кодує великий ланцюг ферменту рибульозо-1.5-біфосфат-карбоксилази/оксигенази
- psbA/rbcL* – міжгенна ділянка (спейсер), що межує з геном *rbcL*
- ML – maximum likelihood, метод максимальної правдоподібності
- NJ – neighbor joining, метод приєднання сусідів
- ME – minimum-evolution, метод мінімуму еволюції
- MP – maximum parsimony, метод максимальної економії
- AIC – Akaike information criterion, інформаційний критерій Акаїка
- NCBI – Національний центр біотехнологічної інформації, Генбанк
- 1N та 3N BBM – середовище Болда зі стандартною та потроєною кількістю азоту
- BG-11 – середовище для ціанобактерій
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool, програма пошуку схожості між біологічними послідовностями

CBCs – Compensatory Base Changes, компенсуючі заміни нуклеотидів

hemi-CBCs – напів-компенсуючі заміни нуклеотидів

a.s.l. – above sea level, над рівнем моря

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Біологічні ґрунтові кірочки (біокірочки) – комплексні мікроекосистеми, що розвиваються на поверхні ґрунту, досягаючи товщини від кількох міліметрів до кількох сантиметрів. До складу біокірокочок входять різноманітні організми, включаючи бактерії, ціанобактерії, водорості, мікроскопічні гриби, лишайники, мохи, протисти, безхребетні. Матрикс біокірочки формують нитчасті ціанобактерії родів *Microcoleus*, *Scytonema*, *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Nostoc*, *Calothrix* та ін., еукаріотичні нитчасті водорості (*Klebsormidium*, *Zygonium*, *Prasiola*), протонема та ризоїди мохів. Інші організми (бактерії, мікроскопічні гриби, одноклітинні та пакет-формуєчі водорості) заселяють утворену ретикулярну структуру, заповнюючи порожнини та забезпечуючи прихистком і живленням різноманітних представників *Protista* та безхребетних тварин.

Ґрунтові біокірочки є початковою (піонерною) стадією формування ґрунтів. Вони стабілізують поверхню ґрунту через зв'язування разом піщаних зерен та часточок, покращують вологоутримуючу здатність ґрунтів. Через накопичення та перетворення органічної речовини, покращують фізико-хімічні якості ґрунтів та сприяють підвищенню їхньої родючості (Belnap & Lange, 2001). Дають “помешкання” та “харч” для гетеротрофних мікроорганізмів, таким чином грають важливу екологічну роль у первинній продукції та кругообігу речовин у ґрунті; закріплюють “рухливі” ґрунти та піщані дюни, сприяючи їхньому заростанню (Weber et al., 2016).

Ґрунтові біокірочки поширені у всіх кліматичних зонах Землі в умовах, де ріст вищих рослин лімітований несприятливими факторами середовища: в аридних та напіваридних екосистемах, холодних регіонах – полярних та альпійських високогір'ях, екстремальних мікромісцезростаннях помірної зони – ксерофітних степах, лісових стежках, стінах яруг, прибережних піщаних дюнах та ін., а також порушених місцезростаннях – місцях пожеж, шахтних відвалах тощо. Загалом біокірочки вкривають близько 12% земної поверхні (Rodriguez-Caballero et al., 2018). Особливо вагоме значення вони мають в екосистемах з

аридним кліматом, вкриваючи до 85-95% поверхні незадернованих пісків пустель Азії та Африки (Lange et al., 1992; Büdel et al., 2009).

Незважаючи на активні дослідження біокірочок, низка питань все ще чекає свого вирішення. Зокрема, недостатньо відомостей по біогеографії кірочок, залежності їхнього видового складу від екологічних і географічних факторів. Думка про те, що біокірочки формує обмежена кількість організмів за провідної ролі космополітної ціанобактерії *Microcoleus vaginatus*, не пройшла випробування часом. Дослідження засвідчують значно різноманітніший видовий склад водоростей та ціанобактерій ґрунтових біокірочок та суттєву залежність їхньої таксономічної структури від низки факторів середовища. Багато територій та екотопів (Африка, Північна та Південна Америка, Австралія, полярні та гірські регіони, приморські дюни) все ще досліджені недостатньо. Найкраще вивчені біокірочки аридних областей, тоді як відомостей стосовно біокірочок помірних зон суттєво менше. Майже всі відомості про видовий склад водоростей та ціанобактерій біокірочок отримані на основі морфологічного вивчення; молекулярно-філогенетичні методи оцінки їх біорізноманіття увійшли у практику відносно недавно. Все ще існують значні прогалини у таксономії водоростей та ціанобактерій біокірочок.

Отже, флористико-систематичне, еколого-географічне та молекулярно-філогенетичне вивчення водоростей та ціанобактерій, як основного структурно-функціонального компоненту біокірочок є актуальним як з фундаментальної, так і з прикладної точки зору.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася відповідно до наукової тематики відділів ліхенології та бріології, а також фікології, ліхенології та бріології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, зокрема, держбюджетних тем «Таксономічне різноманіття та флорогенетичні зв'язки лишайників, мохоподібних та наземних водоростей гранітних відслонень Українського кристалічного щита» (№ держреєстрації 0102U006747), «Лишайники, мохоподібні та наземні водорості лісових екосистем: різноманіття, екологія,

таксономія, молекулярна філогенія» (№ держреєстрації 0113U000003), «Продромус альгофлори, бріофлори та ліхенобіоти України» (№ держреєстрації 0118U003009), а також у рамках міжнародних проектів “Molecular phylogenetic and morphological revision of terrestrial streptophycean green algae” (2007-2009, INTAS Fellowship for Young Scientists, Ref. Nr 06-1000014-6216), “Morphological characters of the cosmopolitan green algal genus *Klebsormidium* are relevant as adaptative traits for survival in alpine soil crusts” (2011, DAAD, Section: 322, Codenumber: A/11/05271), “Biological soil crusts from sand dunes of maritime ecosystems” (2012–2015, 2016, 2019, Georg Forster Fellowship for Experienced Researchers and Renewed research stays, Alexander von Humboldt Foundation), стипендій університетів м. Росток (Німеччина) та м. Інсбрук (Австрія).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи: дослідити видове різноманіття водоростей та ціанобактерій біологічних ґрунтових кірочок різноманітних за кліматичними і екологічними умовами регіонів, використовуючи інтегративний підхід; виявити особливості екології та поширення водоростей і ціанобактерій у біокірочках, вивчити філогенію та провести таксономічні ревізії окремих таксонів, приділяючи особливу увагу представникам *Klebsormidiophyceae* як домінуючим організмам, що формують біокірочки в умовах помірної зони.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

1. Дослідити видове різноманіття водоростей та ціанобактерій біокірочок недостатньо вивчених та різноманітних за кліматичними і екологічними умовами регіонів: прибережних піщаних дюн, лісових екосистем та гіпергалінних відвалів Європи, пустель, напівпустель та лісів Південної Америки, екосистем полярних регіонів.

2. Встановити специфіку таксономічної структури альгоугруповань біокірочок, що розвиваються у різних ектопах в умовах помірного, субтропічного, тропічного та полярного клімату.

3. Виявити особливості видового складу водоростей та ціанобактерій досліджених біокірочок в залежності від впливу окремих екологічних та кліматичних факторів.

4. Вивчити молекулярно-філогенетичні особливості окремих штамів водоростей та ціанобактерій біокірочок і уточнити ідентифікацію певних видів (криптичні таксони) на основі інтегративного підходу.

5. Оцінити закономірності поширення водоростей та ціанобактерій у біокірочках різних географічних регіонів і екосистем.

6. Використовуючи власні та колекційні штами, провести таксономічну ревізію представників класу Klebsormidiophyceae (Streptophyta) як домінуючих організмів біокірочок помірної зони.

7. Дослідити морфологічні, філогенетичні та ультратонкі особливості штамів рідкісних та недостатньо вивчених представників водоростей і ціанобактерій з метою уточнення їх систематичного положення та проведення таксономічних ревізій.

Об'єкт дослідження – водорості та ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок.

Предмет дослідження – різноманіття водоростей та ціанобактерій біокірочок різних за кліматичними і екологічними умовами регіонів, особливості екології та поширення, філогенія і таксономія.

Методи дослідження – польові, камеральні, морфологічні, методи культур, світлової мікроскопії, трансмісійної електронної мікроскопії, молекулярно-філогенетичні, порівняльно-флористичні, статистичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше проведено комплексне дослідження водоростей та ціанобактерій ґрунтових біокірочок екологічно та географічно різних екосистем помірної зони Європи, рослинно-кліматичних зон Чилі та тундрових екосистем полярних регіонів. Виявлено особливості видового складу водоростей і ціанобактерій у біокірочках цих регіонів: переважання зелених водоростей при значній ролі ціанобактерій на балтійських та чорноморських дюнах, ціанобактерій – у приморських екосистемах

Азовського моря, зелених водоростей при майже повній відсутності ціанобактерій – у лісах Німеччини, зелених ульвофіцієвих водоростей, витривалих до засолення – у штучних гіпергалінних екосистемах Німеччини, унікальних представників роду *Klebsormidium* – у напівпустелях та лісах Чилі, жовтозелених водоростей – у полярних регіонах. Вперше проведено дослідження з використанням інтегративного підходу водоростей та ціанобактерій біокірочок морських прибережних екосистем Європи (на прикладі Балтійського, Чорного та Азовського морів). Виявлено, що видовий склад водоростей і ціанобактерій біокірочок дюн визначається текстурою та хімічним складом (переважно електропровідністю, рН, вмістом карбонатів і фосфору) піску, а також кліматичними особливостями регіону. На прикладі водоростей та ціанобактерій біокірочок балтійських дюн показано, що використання інтегративного підходу дозволяє уточнити ідентифікацію низки домінуючих та рідкісних таксонів, які в цілому склали близько 15% виявлених видів. На прикладі лісів Німеччини показано, що рівень лісового менеджменту суттєво впливає на склад водоростей біокірочок, які стають різноманітнішими, ймовірно у зв'язку з порушенням рослинного покриву через вирубки та насадження. Уперше вивчено штучні гіпергалінні екосистеми Німеччини (відвали після видобутку поташу) з використанням інтегративного підходу, що призвело до виявлення 18 нових філогенетичних ліній. Уперше проведено вивчення з використанням інтегративного підходу водоростей і ціанобактерій біокірочок чотирьох рослинно-кліматичних зон Чилі: пустель, напівпустель, сухих та вологих лісів. Доповнено відомості щодо вивчення еукаріотичних водоростей біокірочок полярних регіонів (Свальбарду та Антарктичних островів) і показано їхній багатий видовий склад. На основі інтегративного підходу виявлено нові таксони в межах класу *Klebsormidiophyceae* (*Streptophyta*) – роди *Interfilum* та *Streptosarcina*. Окреслено загальну філогенію класу, що нині включає 5 родів та водорості як з нитчастою сланню, так і з пакетоподібною та розгалуженою. Центральну філогенетичну лінію класу розділено на 7 основних суперклад. Відкрито та охарактеризовано групу

Klebsormidium з філогенетичної суперклади G, відзначено її переважне поширення у біокірочках Південної півкулі, що змушує переглянути уявлення про *Klebsormidium* як водорість-космополіт. Вперше доведено, що ділення клітин *Klebsormidiophyceae* відбувається за механізмом, близьким до споруляції; запропоновано схеми, що пояснюють формування таломів різної морфологічної структури в межах класу. Виявлено нову філогенетичну лінію серед стрептофітових водоростей, описану як рід *Streptofilum*, що характеризується унікальним клітинним покривом, складеним субмікроскопічними органічними лусочками своєї будови. Загалом, описано як нові для науки 2 роди, 18 видів і 2 різновидності водоростей і ціанобактерій, здійснено емендацію та епітипіфікацію 16 видів та запропоновано 6 нових номенклатурних комбінацій, виявлено 15 таксонів, нових для флори України.

Практичне значення одержаних результатів. Матеріали, одержані в результаті дослідження (стосовно філогенії і таксономії *Klebsormidiophyceae*), використані при підготовці фундаментальних зведень «Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography» (V. 4, 2014), «Флора водоростей України» (т. 12, вип. 2, 2016) та «Atlas sinic a řas ĀR 2» (Āeské Budějovice, 2018), а також враховані у колективних монографіях «Лишайники, мохоподібні та наземні водорості гранітних каньйонів України» (2011) та «Молекулярна філогенія і сучасна таксономія наземних спорових рослин» (2013). Вони будуть враховані при складанні «Продромусу альгофлори України» (в процесі підготовки) та можуть бути використані при підготовці визначників зелених водоростей і ціанобактерій України і Західної Європи. Результати роботи наразі використовуються в учбовому процесі в університеті м. Росток (Німеччина), а також при підготовці PhD студентів в Інституті ботаніки, при викладанні курсів «Молекулярна філогенія рослин і грибів» та «Культивування водоростей з основами біотехнології». Біля 300 особисто виділених штамів водоростей зберігаються в колекції університету м. Росток (Німеччина), 30 увійшли до колекцій SAG (Німеччина), BCCO (Чехія) та IBASU-A (Україна).

Вони можуть бути використані для відбору об'єктів біотехнологічних досліджень і в учбовому процесі у вищих навчальних закладах. 240 власноруч отриманих нуклеотидних послідовностей (18S/16S рРНК та регіон ITS, *rbcL*) водоростей та ціанобактерій поповнили міжнародну базу NCBI та слугують референтними послідовностями при ідентифікації водоростей і ціанобактерій.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним дослідженням автора. Обґрунтування теми дисертації, визначення напрямків і методів роботи та узагальнення даних і їхня науково-теоретична інтерпретація здійснені безпосередньо здобувачем. Польові дослідження, камеральне опрацювання матеріалу культурально-мікроскопічними та філогенетичними методами, аналіз та узагальнення даних щодо водоростей і ціанобактерій біокірочок приморських регіонів (Німеччина, Україна) виконані автором особисто або при його активній участі. При співпраці за флористико-екологічними проектами по вивченню різноманіття водоростей біокірочок лісів та гіпергалінних відвалів Німеччини, рослинно-кліматичних зон Чилі та полярних регіонів автор брав активну участь в опрацюванні матеріалу культурально-мікроскопічними методами, ідентифікації видів, аналізі філогенетичних даних, а також узагальненні матеріалів та науково-теоретичній інтерпретації результатів. При співпраці за проектами щодо таксономії представників Klebsormidiophyceae (Streptophyta), зелених та жовтозелених водоростей і ціанопрокаріот автором проведені культурально-мікроскопічні та філогенетичні дослідження, взято участь у підготовці матеріалу та інтерпретації результатів електронно-мікроскопічних досліджень, проведено аналіз та узагальнення даних особисто або при активній участі. У публікаціях, виданих у співавторстві, здобувач є активним членом творчого колективу, права співавторів не порушені.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи були апробовані на засіданнях відділів ліхенології та бріології і фікології, ліхенології та бріології, сектору нижчих рослин і вченої ради Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, семінарах в

університетах міст Росток, Геттінген (Німеччина) та Інсбрук (Австрія), а також доповідалися на численних наукових зібраннях: 9th Bonn Humboldt Award Winners' Forum (16-20 жовтня 2019 р., Бонн, Німеччина), Advances in modern phycology: VI International Conference (15-17 травня 2019 р., Київ, Україна), 17th Scientific Conference of the Phycology Section of the German Botanical Society (11-14 березня 2018 р., Берхтесгаден, Німеччина), XIV з'їзд Українського Ботанічного Товариства (25-26 квітня 2017 р., Київ, Україна), European Geosciences Union, General Assembly 2017 (23-28 квітня 2017 р., Відень, Австрія), European Geosciences Union, General Assembly 2016 (17-22 квітня 2016 р., Відень, Австрія), 15th Scientific Conference of the section of Phycology of the German Botanical Society (23-26 лютого 2014 р., Штральсунд, Німеччина), BioSyst.EU 2013. Global Systematics (18-22 лютого 2013 р., Відень, Австрія), Network Meeting of the Alexander von Humboldt Foundation (20-22 березня 2013 р., ГанOVER, Німеччина), «Advances in Modern Phycology» V International Conference (23-25 травня 2012 р., Київ, Україна), 9-th International Phycological Congress, Informal Workshop «Freshwater green algal systematics» (2-8 серпня 2009 р., Токіо, Японія), «Algal Culture Collections 2008» (9-10 червня 2008 р., Обан, Велика Британія), International Symposium «Biology and Taxonomy of green algae V» (25-29 червня 2007 р., Смоленіце, Словаччина), International Conference «Algae in terrestrial ecosystems» (27-30 вересня 2005 р., Канів, Україна), XVII International Botanical Congress (17-23 липня 2005 р., Відень, Австрія), Biology and Taxonomy of Green Algae IV (24-28 червня 2002 р., Смоленіце, Словаччина).

Публікації. Основні положення дисертаційної роботи відображено в 42 наукових публікаціях, серед яких 15 статей опубліковано у виданнях, що входять до першого (Q1) та другого (Q2) кuartилів за галуззю знань, яка відповідає темі наукового дослідження, відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports. Серед решти публікацій, 8 статей у інших виданнях, індексованих у міжнародних наукометричних базах

даних, розділ колективної монографії та 18 публікацій – у матеріалах наукових форумів.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота складається із вступу, списку публікацій автора, анотації, трьох розділів основної частини та висновків. Повний обсяг дисертації становить 571 стор.

**РОЗДІЛ 1. РІЗНОМАНІТТЯ, ФІЛОГЕНІЯ, ЕКОЛОГІЯ ТА ПОШИРЕННЯ
ВОДОРОСТЕЙ І ЦІАНОБАКТЕРІЙ У ҐРУНТОВИХ БІОКІРОЧКАХ
ОКРЕМИХ НАЗЕМНИХ ЕКОСИСТЕМ ТА РЕГІОНІВ**

**1.1. Водорості і ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок прибережних
піщаних дюн Балтійського моря (Німеччина)**

**1.1.1. Аналіз різноманіття водоростей і ціанобактерій біологічних
ґрунтових кірочок прибережних дюн Балтійського моря (Німеччина) у
зв'язку з характеристиками піску**

Biological Soil Crusts from Coastal Dunes at the Baltic Sea: Cyanobacterial and Algal Biodiversity and Related Soil Properties

Karoline Schulz¹ · Tatiana Mikhailyuk² · Mirko Dreßler³ · Peter Leinweber⁴ · Ulf Karsten¹

Received: 16 March 2015 / Accepted: 12 October 2015 / Published online: 27 October 2015
 © Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Biological soil crusts (BSCs) are known as “ecosystem-engineers” that have important, multifunctional ecological roles in primary production, in nutrient and hydrological cycles, and in stabilization of soils. These communities, however, are almost unstudied in coastal dunes of the temperate zone. Hence, for the first time, the biodiversity of cyanobacterial and algal dominated BSCs collected in five dunes from the southern Baltic Sea coast on the islands Rügen and Usedom (Germany) was investigated in connection with physicochemical soil parameters. The species composition of cyanobacteria and algae was identified with direct determination of crust subsamples, cultural methods, and diatom slides. To investigate the influence of soil properties on species composition, the texture, pH, electrical conductivity, carbonate content, total contents of carbon, nitrogen, phosphorus, and the bioavailable phosphorus-fraction (PO_4^{3-}) were analyzed in adjacent BSC-free surface soils at each study site. The data

indicate that BSCs in coastal dunes of the southern Baltic Sea represent an ecologically important vegetation form with a surprisingly high site-specific diversity of 19 cyanobacteria, 51 non-diatom algae, and 55 diatoms. All dominant species of the genera *Coleofasciculus*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Nostoc*, *Hydrocoryne*, *Leptolyngbya*, *Klebsormidium*, and *Lobochlamys* are typical aero-terrestrial cyanobacteria and algae, respectively. This first study of coastal sand dunes in the Baltic region provides compelling evidence that here the BSCs were dominated by cyanobacteria, algae, or a mixture of both. Among the physicochemical soil properties, the total phosphorus content of the BSC-free sand was the only factor that significantly influenced the cyanobacterial and algal community structure of BSCs in coastal dunes.

Keywords Cryptogamic crusts · Biocrusts · Sand dunes · Soil algae · Cyanobacteria · Diatoms · Phosphorus

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00248-015-0691-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Karoline Schulz
 karoline.schulz@uni-rostock.de

¹ Institute of Biological Sciences, Applied Ecology and Phycology, University of Rostock, Albert-Einstein-Str. 3, 18059 Rostock, Germany

² M.H. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Science of Ukraine, Tereshchenkivska St. 2, Kyiv UA-01001, Ukraine

³ Institute of Biological Sciences, Department of Botany and Botanical Garden, University of Rostock, Wismarsche Str. 8, 18051 Rostock, Germany

⁴ Faculty of Agricultural and Environmental Science, Soil Science, University of Rostock, Justus-von-Liebig-Weg 6, 18051 Rostock, Germany

Introduction

Coastal dunes are unique ecosystems in the transition zone between terrestrial and marine environments, where interactions between geology, climate, and vegetation create highly dynamic environments [1, 2]. These eolian and sand-driven landforms are formed by the interaction of wind and waves, and exhibit, related to their temporal and spatial dynamics, intrinsic values as important and unique habitats. Additionally, coastal dunes provide an essential source of natural sand replenishment and serve as protective barriers against coastal flooding and erosion [1, 3]. Coastal dune systems are harsh environments with a wide variety of environmental stresses such as strong wind and substrate mobility, scarcity of nutrients and soil water, occasionally extremely high temperatures near surface, intense radiation, flooding, and salt spray [1, 4].

Under these conditions, the growth and the development of a closed vascular plant cover are limited, and only specialized organism communities can be established, which include biological soil crusts (BSCs).

BSCs are soil particle-associated communities of cyanobacteria, algae, microfungi, lichens, liverworts, mosses, and bacteria in different proportions, living within or immediately on top of the uppermost millimeter of soil thereby forming coherent layers at the soil surface [5]. BSCs are distributed worldwide in all climatic zones [e.g., 6–8], and as multifunctional communities, they have important ecological roles. They stabilize the soil surface [9], increase the content of soil organic matter and the nitrogen concentration through photosynthesis and nitrogen fixation [10, 11], influence nutrient cycling [12], modulate hydrological processes [13], and consequently, influence the establishment and performance of vascular plants [14].

BSCs are highly diverse communities. There are hundreds of different species of cyanobacteria and algae which can be found in association with BSCs [15]. Especially, large filamentous cyanobacteria as well as filamentous algae are important for the development of BSCs, because their filaments and sticky mucilaginous sheaths glue soil particles together. In contrast, due to their limited biomass, unicellular cyanobacterial and algal species are usually of secondary importance in the formation of BSCs. Most of these unicellular species are green algae which can reach high species numbers in soil crusts [5]. Furthermore, Bacillariophyceae are also typical components to be found in BSCs [16, 17].

The distribution of all BSC-associated organisms and their further development result from complex interactions with the prevailing environmental factors. Microclimatic conditions (e.g., temperature and moisture), soil texture, pH, and carbonate content are only some of the abiotic factors that alter BSCs [18, 19]. However, these pedo-climatic and biogeochemical factors vary from site to site, sometimes over orders of magnitude, and thus, disclosing their effect on the BSC community structure still requires site-specific studies over a wide range of terrestrial habitats.

Most of the knowledge that exists about the distribution, adaptations, and functions of crust organisms is derived from studies on BSCs in semiarid and arid environments, where they can be a main component of the vegetation [20, 21]. Taking into account the crucial ecological functions of BSCs in terrestrial ecosystems, it is surprising that BSCs in habitats of temperate regions with more humid conditions are only fragmentarily investigated [see also 22]. One of these habitats is the coastal dune system. The limited literature about BSCs in coastal dunes worldwide indicates that they contribute to the stabilization, enrichment of nutrients, and the establishment of higher plants in these ecosystems [9, 23–25]. However, BSCs in coastal dunes of the temperate region are still almost unstudied.

Consequently, the aim of the present study was, for the first time, to comprehensively investigate BSCs in coastal dunes of the temperate zone on the German Baltic Sea islands Rügen and Usedom, with a special focus on the diversity of cyanobacteria and algae as well as on the influence of abiotic parameters.

The main questions of this study were the following:

1. Which species occur in these specific coastal dune BSCs and which are dominant?
2. Do certain soil properties influence the species composition of the BSCs in coastal dunes?

Material and Methods

Study Area

BSCs were investigated in coastal dunes on the two largest islands of Germany, Rügen, and Usedom (926 and 445 km², respectively). Rügen and Usedom are located at the southwestern shore of the Baltic Sea belonging to the German federal state of Mecklenburg-Western Pomerania (Fig. 1). Both islands are influenced by an oceanic continental transitional climate. The mean annual temperature is 8–8.5 °C with the lowest mean temperature of –3–1 °C in January and highest mean temperature of 19–20 °C in August. The mean annual precipitation varies between 500 and 600 mm, with February being the month with lowest mean precipitation and July that with the highest mean precipitation, 30–40 and 50–70 mm, respectively (measurement period of all climatic factors: 1961–1990; [26]).

BSCs were investigated along a transect at the three study sites Glowe, Prora, and Baabe on Rügen and the two study sites Karlshagen and Zempin on Usedom, stretching from the northeast coast of Rügen in a southeastern direction to the northwest coast of Usedom (Fig. 1). The investigated coastal dune systems differed in their morphological characteristics, vegetation cover, and degree of degradation. The dunes in Glowe and Prora had a width between 4 and 8 m, while in Baabe, Karlshagen, and Zempin, the dunes reached widths between 15 and 20 m. Moreover, the two latter systems were with 4 m twice as high as the three other dunes. All dune systems were partly fenced except the one in Prora. Hence, this latter dune was highly degraded due to human trampling and showed only little vegetation with a dominance of *Festuca* sp. The other dune systems had undestroyed and dense vegetation mainly consisted of *Ammophila arenaria* (L.) Link. In addition, *Hippophae rhamnoides* L., *Artemisia campestris* L., *Artemisia*

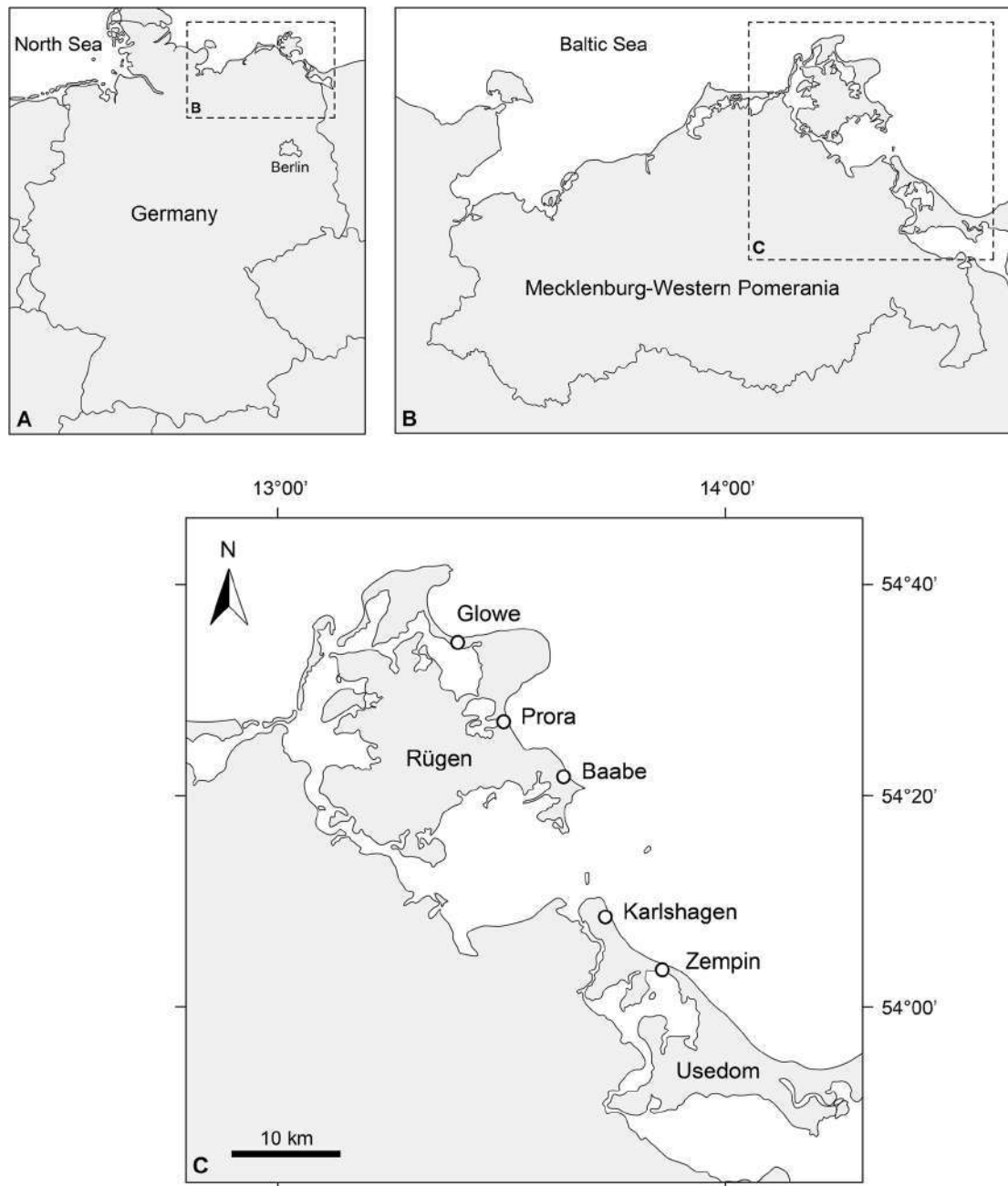


Fig. 1 The islands Rügen and Usedom, and the investigated dune study sites (c) belonging to the federal state of Mecklenburg-Western Pomerania (b) in the northeastern part of Germany (a)

maritima L., *Leymus arenarius* (L.) Hochstetter, *Rosa rugosa* Thunberg, *Tussilago farfara* L., *Dianthus* sp., *Carex* sp., *Pinus sylvestris* L., and single species of Fabaceae and Asteraceae were also present in different proportions at the dune systems. The bare sandy ground (ground without vegetation of higher plants) between the higher plants was covered by green cyanobacterial and algal crusts. At each dune, a plot with an area of 2×2 m was randomly chosen, and the coverage of BSCs in

relation to the bare ground estimated. In Glowe, 40 % of the dune plot was bare ground of which 40 % was covered with BSCs. In Prora, 80 % of the dune plot was bare ground of which 10 % was covered with thin BSCs. In Baabe, 25 % of the dune plot was bare ground of which 30 % was covered with BSCs. In Karlshagen, 25 % of the dune plot was bare ground of which 95 % was covered with BSCs, and in Zempin, 40 % of the plot was bare ground of which 70 % was covered with BSCs.

Sampling

Two random cyanobacterial and algal BSC samples and two adjacent BSC-free soil samples were collected at each study site on 8 October 2013. Sampling of BSCs was carried out by pushing a spatula gently below the crust in order to take as sparse amounts of surrounding soil as possible. The spatula with the crust was then lifted, and the sample was carefully transferred in a small paper box for subsequent analysis of the diversity of cyanobacteria and algae. These samples of BSCs had a surface area of approximately 6×6 cm. With a shovel, a BSC-free soil sample next to the BSCs (max. 40 cm distance) of approximately 5×5×5 cm was taken and filled into a small freezing bag for nutrient analysis. An additional soil sample of approximately 10×10×10 cm was taken and filled into a big freezing bag for the determination of other soil properties. In total, ten BSCs and ten soil samples were collected. In the laboratory, the samples were air-dried and stored in the dark until further analysis.

Cultivation and Determination of Cyanobacteria and Non-diatom Algae

For the determination of cyanobacteria and non-diatom algae enrichment cultures and unialgal cultures were used. To obtain enrichment cultures, small amounts of material (c. 2×2 mm) were taken randomly out of the crust and placed on the surface of solid 1 N Bold's Basal Medium (1 N BBM) made with 1.5 % agar in Petri dishes [27]. Afterward, the samples were exposed at room temperature under a photon fluence rate of approximately 30 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (light source: Osram Daylight Lumilux Cool White lamps (L36W/840); Osram) and a 16:8 h light-dark cycle. The identification of cyanobacterial and algal taxa started after a growth phase of 2 to 4 weeks. Because for the identification of cyanobacteria and algae knowledge of developmental stages of certain species and genera is necessary, enrichment cultures were purified into unialgal strains, using 1 N BBM for cyanobacteria and 3 N BBM (BBM modified by the addition of triple nitrate concentration; [28]) for algae. These cultures were kept under the same cultivation conditions as the enrichment cultures.

Cyanobacteria and non-diatom algae were determined morphologically under an inverted light microscope (Olympus IX70, oil immersion) at 1000-fold magnification. The identification was mainly based on Ettl and Gärtner [29] as well as on Komárek and Anagnostidis [30–32] for algae and cyanobacteria, respectively (further references about the identification of cyanobacteria and algae are given in Online Resource 1).

Determination of Diatoms

For the identification of diatoms, combusted slides were prepared. 0.5–0.6 g of crust material were filled in 5 mL glass vials with 4 mL of distilled water. These glass vials were strongly shaken. Immediately after shaking, 100 μL of overlying water was gently dripped on glass cover slips, which were dried on air, combusted in a muffle oven (Elektra M26) at 550 °C for 35 min and after cooling mounted onto glass microscope slides using Naphrax[®].

Diatom species were morphologically identified using a light microscope (Zeiss Axioplan, oil-immersion Plan-Apochromat objective, aperture 1.4) with 1000-fold magnification based on Krammer and Lange-Bertalot [33, 34], Krammer [35], Witkowski et al. [36], Lange-Bertalot [37], Lange-Bertalot et al. [38], and Hofmann et al. [39]. In the slides, the proportion of each single diatom taxa within the total Bacillariophyceae community was estimated independent from cyanobacteria and non-diatom algae of the crust samples with a scale ranging from 1 (very rare) over 2 (rare/occasionally), 3 (regular), 4 (subdominant), to 5 (dominant).

Direct Determination of Dominant Cyanobacterial and Non-diatom Algal Taxa

In addition to the culture approach and the diatom slides mentioned above, the dominant BSC phototrophic microorganisms were directly identified in freshly collected, undisturbed samples. For direct determination of cyanobacterial and non-diatom algal taxa in BSCs, three subsamples of crust material (c. 1×1 cm) were rewetted in tap water for 20 min. Cyanobacteria and non-diatom algae were morphologically identified under an inverted light microscope (Olympus IX70) with 400-fold and/or 1000-fold magnification, depending on size of soil particles within the crust samples. The portions of occurring cyanobacterial and non-diatom algal taxa were estimated using a scale ranging from 1 (very rare) over 2 (rare/occasionally), 3 (regular), 4 (subdominant), to 5 (dominant). In contrast to the numbers of species, which were identified in enrichment cultures, mostly only a small proportion of cyanobacteria and non-diatom algae were found directly in crust material. Thus, all cyanobacterial and non-diatom algal taxa, which were not found directly in crust material but were identified in the enrichment cultures, got 1 as dominance level, because they appeared to occur very rarely in the investigated BSCs.

Analyses of Soil Substrates

All soil analyses were done according to standard protocols [40]. Prior to the analyses, the air-dried soil samples were sieved <2 mm. For determination of the particle size

distribution, the soil was treated with hydrochloric acid (HCl), hydrogen peroxide (H₂O₂), and tetrasodium diphosphate (Na₄P₂O₇). For the determination of the sand subfractions (coarse 2–0.63 mm, medium 0.2–0.63 mm, fine 0.063–0.2 mm), 10 g of soil was transferred on a set of analytical sieves with decreasing mesh size which were rinsed with tap water. The sieves together with the remaining sand were dried at 105 °C and weighed before and after removal of the sand fractions. An automated sedimentation/decantation analysis (Sedimat 4–12, UGT GmbH, Müncheberg, Germany) was used to determine the percentage of silt (0.002–0.063 mm) and clay (<0.002 mm) fractions in an additional subsample of 10 g of soil. The pH was measured in a 1:2.5 soil/water solution by adding 10 g of soil to 25 mL of distilled water. This suspension was thoroughly mixed twice during 1 h, and the pH was measured with a glass electrode (pH Meter 540 GLP, WTW GmbH, Weilheim, Germany). The electrical conductivity was measured in a soil extract, prepared from a suspension of 10 g of soil and 100 mL of distilled water, which was mechanically shaken for 1 h and filtered through folded filters (Microprocessor Conductivity Meter LF196, WTW GmbH, Weilheim, Germany). For gas-volumetric determination of the carbonate content, the soil was finely ground to <1 mm using a Pulverisette 2 ball mill (Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Germany). The CO₂ released following the addition of HCl (37 %) was measured in a Scheibler apparatus and used for the calculation of the carbonate content.

Prior to elemental analyses, the air-dried soil samples were ground with a ball mill to <1 mm. Total carbon (TC) and total nitrogen (TN) were determined with a CHNS-Analyzer (VARIO EL, Elementar Analysensysteme, Hanau, Germany) using 30 mg of soil together with 30 mg of tungsten trioxide (WO₃) as catalyst, which were packed together in tin-foil and transferred into the analyzer for high-temperature combustion. Total phosphorus (TP) was determined by mixing 0.5 g of soil with 2 mL of nitric acid (HNO₃) and 6 mL of HCl for microwave-assisted digestion at 200 °C (Mars Xpress, CEM GmbH, Kamp-Lintfort, Germany). The digest was filled up with ultrapure water to 100 mL, and the P concentration in this solution was determined by atomic emission spectroscopy at 214.914 nm with inductively coupled plasma (ICP-AES, JobinYvon 238 Ultrace, Instruments S.A. GmbH, Grasbrunn, Germany). Bioavailable phosphorus (PO₄³⁻) was determined photometrically using the malachite-green method by mixing 1.5 g of soil with 37.5 mL of ultrapure water. This suspension was incubated for 22 h at room temperature, mechanically shaken for 1 h and filtrated. The filtrate was mixed with 3 mL of sulfuric acid (H₂SO₄; 24 %), 5 mL of malachite-solution, and 5 mL of molybdate solution and filled up with ultrapure water to 50 mL. The PO₄³⁻ concentration was determined spectrophotometrically at 623 nm.

Statistics

All multivariate analyses of the data were performed using the statistic program Canoco for Windows 4.5. For the statistical analyses of species data (Table 1), the mean values of two BSCs for each study site were used. The frequency data of diatoms and the frequency data of cyanobacteria and non-diatom algae have two different reference systems, because of the different methods used for investigation and identification of diatoms and all other algae and cyanobacteria. For that reason, the diatom data were excluded from statistical analyses. However, the species data and the soil properties data of the dune study sites were analyzed with a direct gradient analysis. The direct gradient analysis was used to show similarities and differences in the crust communities at the five dune sites and to investigate the variations of species composition in relation to environmental factors. The longest gradient of the first unmodified detrended correspondence analysis (DCA) was 1.7; hence, a redundancy analysis (RDA) was performed. The RDA was run with focus scaling on inter-sample distance and centering and standardization by species. Species scores were post-transformed through divisions by standard deviation. The Monte Carlo permutation test with 499 performed permutations was used to test a significant influence of environmental factors on the obtained data distribution.

Results

Species Composition

In total, 125 cyanobacterial and algal taxa were found in association with BSCs in coastal dunes using a combination of direct determination, culture approach, and diatom slides (Tables 1 and 2). Nineteen species of cyanobacteria in 13 genera were determined (one species of Chroococcales, eight species of Nostocales, ten species of Oscillatoriales). Furthermore, 38 species of Chlorophyta in 27 genera (26 species of Chlorophyceae, 12 species of Trebouxiophyceae), seven species of Streptophyta in four genera (one species of Chlorokybophyceae, five species of Klebsormidiophyceae, one species of Zygnematophyceae), and 61 species of Heterokontophyta in 28 genera (four species of Xanthophyceae, two species of Eustigmatophyceae, 55 species of Bacillariophyceae) were identified.

Cyanobacteria and Non-diatom Algae

The total species number of cyanobacteria and non-diatom algae was smallest in the BSCs of Glowe (28 species) and largest in the BSCs of Karlshagen (40 species) (Fig. 2). All investigated BSCs had more non-diatom algal taxa than cyanobacterial species. Additionally, in terms of cyanobacteria,

Table 1 Complete list of cyanobacterial and non-diatom algal species found in ten BSCs from five coastal dune study sites on Rügen and Usedom and the estimated abundance of the single taxa in the investigated crusts

Species	Glowe		Prora		Baabe		Karlshagen		Zempin	
	BSC	BSC	BSC	BSC	BSC	BSC	BSC	BSC	BSC	BSC
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Cyanophyceae										
<i>Calothrix</i> cf. <i>elenkinii</i> Kossinskaja						1	1			
<i>Chroococcus helveticus</i> Nägeli										1
<i>Coleofasciculus</i> sp.	1			4						
<i>Hassallia</i> sp.							1		2	
<i>Hydrocoryne</i> sp.					4		1	5		
<i>Leptolyngbya edaphica</i> (Elenkin) Anagnostidis & Komárek	1		1	1		1	1		1	3
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>henningsii</i> (Lemmermann) Anagnostidis						3	1		1	1
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>notata</i> (Schmidle) Anagnostidis & Komárek					3		4	1	1	3
<i>Lyngbya</i> sp.	3	5	1	3						
<i>Microcoleus vaginatus</i> Gomont ex Gomont	2	1	5	4	1	1	2	3		1
<i>Nodosilinea</i> sp.	1		1	1	2	1	1	1	1	1
<i>Nostoc</i> cf. <i>commune</i> Vaucher ex Bornet & Flahault							3			3
<i>Nostoc</i> cf. <i>edaphicum</i> Kondratieva		1		1	2	2	4	2	1	4
<i>Nostoc</i> cf. <i>linckia</i> Bornet ex Bornet & Flahault	1					1		1		1
<i>Nostoc</i> sp.					1					1
<i>Phormidium</i> cf. <i>corium</i> Gomont ex Gomont					1					
<i>Pseudophormidium hollerbachianum</i> (Elenkin) Anagnostidis					1	1			1	1
<i>Tolypothrix</i> cf. <i>tenuis</i> Kützing ex Bornet & Flahault					2	2				
<i>Trichocoleus</i> sp.				2	1	1	1			1
Chlorophyceae										
<i>Actinochloris sphaerica</i> Korschikov				1						
<i>Acutodesmus obliquus</i> (Turpin) Hegewald & Hanagata	1	1	3		1		1	1		1
<i>Bracteacoccus</i> cf. <i>minor</i> (Chodat) Petrová		1	1							
<i>Bracteacoccus</i> sp.	1	1	1	1	1	1		1	1	
<i>Carteria</i> cf. <i>crucifera</i> Korshikov ex Pascher			1				1			
<i>Chlamydomonas</i> cf. <i>callunae</i> Ettl							1			
<i>Chlamydomonas</i> cf. <i>moewusii</i> Gerloff								2		
<i>Chlamydomonas</i> cf. <i>reisigii</i> Ettl			1							
<i>Chlorococcum</i> cf. <i>oleofaciens</i> Trainor & Bold			1			1				
<i>Chlorobion lunulatum</i> Hindák	1		1				1			1
<i>Chloromonas</i> cf. <i>augustae</i> (Skuja) Pröschold, Marin, Schlösser & Melkonian			1							
<i>Chloromonas actinochloris</i> Pröschold, Marin, Schlösser & Melkonian			1	1						1
<i>Chloromonas</i> cf. <i>reticulata</i> (Goroschankin) Wille emend. Pröschold, Marin, Schlösser & Melkonian		1	1							
<i>Graesiella emersonii</i> (Shihara & Krauss) Nozaki, Katagiri, Nakagawa, Aizawa & Watanabe						1				
<i>Lobochlamys</i> cf. <i>culleus</i> (Ettl) Pröschold, Marin, Schlösser & Melkonian						1				1
<i>Lobochlamys</i> spec	1	3	4		1					
<i>Monoraphidium</i> cf. <i>pusillum</i> (Printz) Komárková-Legnorová	1	1	1	1	1	1	1	1		1
<i>Neochloris</i> cf. <i>gelatinosa</i> Herndon		1								
<i>Podohedra bicaudata</i> Geitler								1		
<i>Scenedesmus</i> sp.						1	1			1
<i>Spongiochloris</i> cf. <i>incrassata</i> Chantanachat & Bold					1					1
<i>Spongiochloris</i> cf. <i>minor</i> Chantanachat & Bold			1					1		
<i>Spongiochloris spongiosa</i> (Vischer) Starr					1					

Table 1 (continued)

Species	Glowe		Prora		Baabe		Karlshagen		Zempin	
	BSC 1	BSC 2	BSC 1	BSC 2	BSC 1	BSC 2	BSC 1	BSC 2	BSC 1	BSC 2
<i>Tetracystis sarcinalis</i> Schwarz				1	1	1	1	1		
<i>Tetracystis</i> sp.							1	1		
Trebouxiophyceae										
<i>Chlorella chlorelloides</i> (Naumann) Bock, Krienitz & Pröschold	1								1	1
<i>Chlorella vulgaris</i> Beyerinck	1	1	1		1		1	1		1
<i>Chloroidium ellipsoideum</i> (Gerneck) Darienko, Gustavs, Mudimu, Menendez, Schumann, Karsten, Friedl & Pröschold			1					1		
<i>Dictyosphaerium</i> sp.								1		
<i>Diplosphaera chodatii</i> Bialosukniá	1		1						1	
<i>Elliptochloris subsphaerica</i> (Reisigl) Ettl & Gärtner	1	1	1	1					1	
<i>Geminella interrupta</i> Turpin										1
<i>Koliella</i> sp.			1							
<i>Leptosira</i> cf. <i>erumpens</i> (Deason & Bold) Lukesová								1		
<i>Myrmecia</i> cf. <i>biatorellae</i> Petersen										1
<i>Pseudochlorella</i> sp.								1		
<i>Pseudococcomyxa</i> cf. <i>simplex</i> (Mainx) Fott				1	1			1		
<i>Stichococcus bacillaris</i> Nägeli	1		1	1		1		1	1	
Chlorokybophyceae										
<i>Chlorokybus atmophyticus</i> Geitler								1		
Klebsormidiophyceae										
<i>Interfilum paradoxum</i> Chodat & Topali	1		1		1		1			1
<i>Klebsormidium crenulatum</i> (Kützing) Ettl & Gärtner	1								5	
<i>Klebsormidium flaccidum</i> (Kützing) Silva, Mattox & Blackwell	4	1	3		4	4		2	2	2
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>nitens</i> (Meneghini) Lokhorst	1			1	1	1				
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>subtile</i> (Kützing) Tracanna ex Tell		1		2			1			
Zygnematophyceae										
<i>Cylindrocystis crassa</i> De Bary	1			1						1
Xanthophyceae										
<i>Pleurochloris meiringensis</i> Vischer			1					1		
<i>Bumilleriopsis</i> cf. <i>peterseniana</i> Vischer & Pascher										1
<i>Xanthonema</i> cf. <i>bristolianum</i> (Pascher) Silva	1		1		1		1	1		1
<i>Xanthonema exile</i> (Klebs) Silva		1						1		
Eustigmatophyceae										
<i>Eustigmatos magnus</i> (Petersen) Hibberd					1		1	1	1	
<i>Vischeria helvetica</i> (Vischer & Pascher) Hibberd						1	1			

1 very rare, 2 rare/occasional, 3 regular, 4 subdominant, 5 dominant

the BSCs of Glowe and Prora (both seven species) had half as many species as the BSCs of Baabe, Karlshagen, and Zempin (12 to 14 species). For non-diatom algal species, the BSCs of Prora and Karlshagen (28 and 29 species) exhibited larger species numbers than those of Glowe, Baabe, and Zempin (20 to 22 species) (Fig. 2).

The most common species, which occurred in almost all investigated BSCs, were the cyanobacteria *Nodosilinea* sp., *Leptolyngbya edaphica* (Elenkin) Anagnostidis and

Komárek, *Microcoleus vaginatus* Gomont ex Gomont and *Nostoc* cf. *edaphicum* Kondratieva and the algae *Bracteacoccus* sp., *Monoraphidium* cf. *pusillum* (Printz) Komárková-Legnárová, *Acutodesmus obliquus* (Turpin) Hegewald and Hanagata, *Chlorella vulgaris* Beyerinck, and *Klebsormidium flaccidum* (Kützing) Silva, Mattox and Blackwell (Table 1). In contrast, some cyanobacteria and non-diatom algae were only found in BSCs from one of the five study sites (Table 1).

Table 2 Complete list of diatom species found in ten BSCs from five coastal dune study sites on Rügen and Usedom and the estimated abundance of the single species of all diatom taxa in the investigated crusts

Species	Glowe		Prora		Baabe		Karlishagen		Zempin	
	BSC 1	BSC 2	BSC 1	BSC 2	BSC 1	BSC 2	BSC 1	BSC 2	BSC 1	BSC 2
<i>Achnanthes coarctata</i> (Brébisson) Grunow	5	5	5	3	2	3		1		1
<i>Actinocyclus</i> sp.						1				1
<i>Amphora</i> cf. <i>indistinct</i> Levkov				1						
<i>Amphora indistinct</i> Levkov		1			1					
<i>Caloneis amphisbaena</i> (Bory de Saint Vincent) Cleve						1				
<i>Catenula adhaerens</i> (Mereschkowsky) Mereschkowsky					1		1			
<i>Cocconeis</i> cf. <i>neothumensis</i> Krammer					1		1			
<i>Cocconeis neothumensis</i> Krammer					1		1			
<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg			1							
<i>Cocconeis placentula</i> var. <i>euglypta</i> (Ehrenberg) Grunow		1								
<i>Cocconeis scutellum</i> var. <i>scutellum</i> Ehrenberg	1	1								
<i>Cocconeis</i> sp. A			1				1	1		
<i>Cocconeis</i> sp. B					1			1		1
<i>Cocconeis</i> sp. C				1						
<i>Cocconeis</i> sp. D	1									
<i>Epithemia</i> cf. <i>turgida</i> (Ehrenberg) Kützing				1						
<i>Fallacia</i> cf. <i>florinae</i> (Møller) Witkowski	1									
<i>Fallacia</i> cf. <i>tenera</i> (Hustedt) Mann	1									
<i>Fallacia clepsidroides</i> Witkowski	1	1			1	1				1
<i>Fallacia tenera</i> (Hustedt) Mann	1	1								
<i>Fistulifera</i> cf. <i>pellicolosa</i> (Brébisson) Lange-Bertalot				1						
<i>Fragilaria martyi</i> (Héribaud-Joseph) Lange-Bertalot				1			1			
<i>Fragilaria</i> s.l. A	1									
<i>Fragilaria</i> s.l. B							1			
<i>Fragilaria</i> s.l. C								1		
<i>Fragilaria</i> s.l. D								1		
<i>Fragilaria</i> s.l. E								1		
<i>Fragilaria schulzii</i> Brockmann				1						
<i>Hantzschia abundans</i> Lange-Bertalot		4				4				
<i>Hantzschia amphioxys</i> (Ehrenberg) Grunow	4	2		5	2	5	3	3		1
<i>Hantzschia</i> sp.						2				
<i>Luticola</i> cf. <i>cohnii</i> (Hilse) Mann			1				2	2		1
<i>Luticola cohnii</i> (Hilse) Mann group	1	3	3	1	1		4	5		1
<i>Luticola</i> sp.						1				
<i>Mayamaea atomus</i> var. <i>atomus</i> (Kützing) Lange-Bertalot								1		
<i>Muelleria</i> sp.	2	1								
<i>Navicula</i> cf. <i>paul-schulzii</i> Witkowski & Lange-Bertalot				1						
<i>Navicula</i> cf. <i>syvertsenii</i> Witkowski, Metzeltin & Lange-Bertalot		1								
<i>Navicula vimineoides</i> Giffen			1	1			1	1		
<i>Opephora burchardiae</i> Witkowski							1	1		
<i>Opephora</i> cf. <i>minuta</i> (Cleve-Euler) Witkowski							1			
<i>Opephora</i> sp.							1			
Pennate A						1				
Pennate B	1									
Pennate C							1			
<i>Pinnularia</i> aff. <i>intermedia</i> (Lagerstedt) Cleve	3	3	1		2			1		1

Table 2 (continued)

Species	Glowe		Prora		Baabe		Karlshagen		Zempin	
	BSC 1	BSC 2	BSC 1	BSC 2	BSC 1	BSC 2	BSC 1	BSC 2	BSC 1	BSC 2
<i>Pinnularia borealis</i> var. <i>borealis</i> Ehrenberg					1	2				
<i>Pinnularia</i> cf. <i>intermedia</i> (Lagerstedt) Cleve					2	1		1		1
<i>Pinnularia intermedia</i> (Lagerstedt) Cleve	5	5	3	2	5	4	5	4		5
<i>Placoneis clementis</i> (Grunow) Cox					1					
<i>Planothidium</i> cf. <i>lemmermannii</i> (Hustedt) Morales						1				
<i>Planothidium delicatulum</i> (Kützing) Round & Bukhtiyarova		1	2	1	1	2	1	1	1	
<i>Planothidium lemmermannii</i> (Hustedt) Morales		1	1	1	1		1			1
<i>Planothidium</i> sp.	1	2	1	1	1	2	1	1		1
<i>Staurophora</i> sp.			2		3	4				1

1 very rare, 2 rare/occasional, 3 regular, 4 subdominant, 5 dominant

Diatoms

The total number of diatom species at a single study site ranged from 14 species in the BSCs of Zempin to 26 species in the BSCs of Karlshagen (Fig. 2). Diatom species, which were present in nearly all dune BSCs were *Achnanthes coarctata* (Brébisson) Grunow, *Hantzschia amphioxys* (Ehrenberg) Grunow, *Pinnularia intermedia* (Lagerstedt) Cleve, *Planothidium* sp., and species of the *Luticola cohnii* (Hilse) Mann group (Table 2). Additionally, there were also several diatom species, which occurred only in the BSCs from one study site (Table 2).

In comparison with cyanobacteria and non-diatom algae, the diatoms were not dominant in BSCs, but several species showed a higher abundance than others. Six highly abundant diatom species could be identified, which represent typical aero-terrestrial species and showed differences between BSCs of the study sites (Fig. 3 and Table 2). The most abundant diatom species was *Pinnularia intermedia*, followed by *Hantzschia amphioxys*. The two diatom species *Achnanthes coarctata* and *Hantzschia abundans* were only abundant in BSCs from the Rügen sites. In addition, *Staurophora* sp.

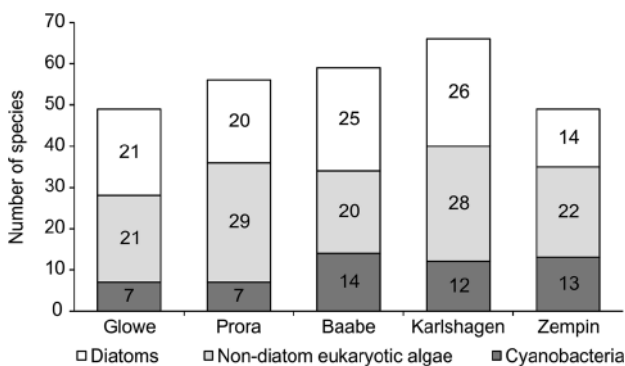


Fig. 2 Total species number of cyanobacteria, non-diatom algae, and diatoms in two BSCs for each of the five coastal dune study sites on Rügen and Usedom. Numbers in bars indicate the species numbers

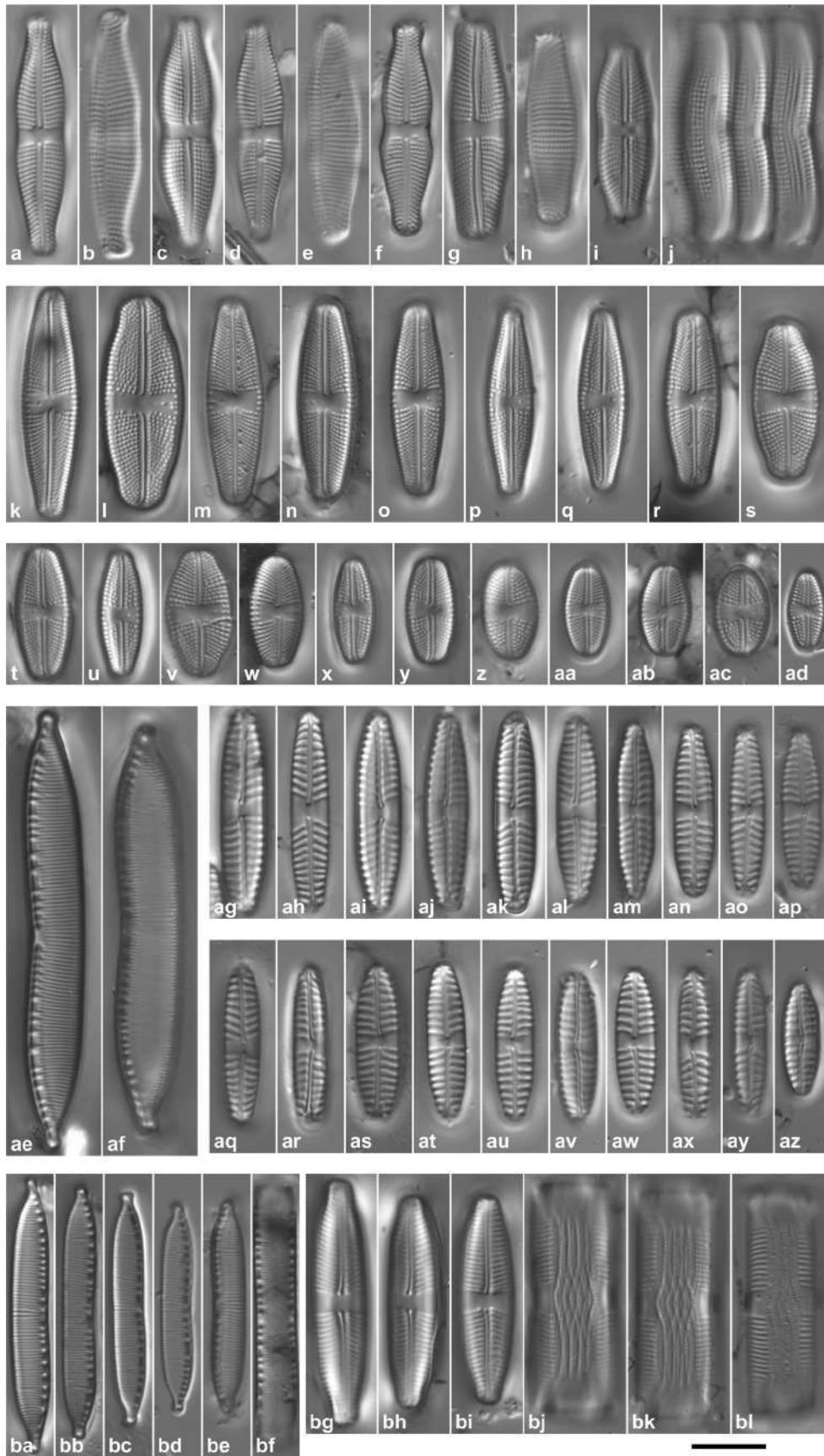
was abundant only in BSCs of Baabe. In the BSCs from Zempin, *Pinnularia intermedia* was identified as the only abundant species (Table 2).

Dominant Species

In total, nine dominant cyanobacteria and algae were identified in the investigated BSCs with six species of cyanobacteria (*Microcoleus vaginatus*, *Hydrocoryne* sp., *Nostoc* cf. *edaphicum*, *Coleofasciculus* sp., *Leptolyngbya* cf. *notata*, and *Lyngbya* sp.) and three species of algae (*Klebsormidium flaccidum*, *Klebsormidium crenulatum*, and *Lobochlamys* sp.) (Fig. 4). There were five BSCs dominated by cyanobacteria and three BSCs dominated by algae, and two BSCs showed a mixed dominance of cyanobacteria and algae (Table 1). Each crust was different in terms of the dominant species even at the same study site. However, the two soil crusts of Karlshagen were only dominated by cyanobacteria. The algal species *Klebsormidium flaccidum* and *Lobochlamys* sp. were only dominant in BSCs of Rügen. Except the one *Klebsormidium crenulatum* dominated crust of Zempin, all investigated BSCs of Usedom were dominated by cyanobacteria (Table 1).

Physicochemical Soil Properties

The soil texture classification according to the German texture classification system [41] revealed for all sites the texture class “Sandy sand” (Ss). The further differentiation revealed the subclasses “medium sand” for the samples from Glowe and Prora, “fine sandy medium sand” for the sample from Baabe and Zempin, and “fine sand” for the sample from Karlshagen (Table 3). However, in the samples of Baabe and Zempin, the subfractions medium sand and fine sand were visually very similar, and thus, the soil texture was close to the border of the respective adjacent texture subclass. Generally, it appeared that the



◀ **Fig. 3** Abundant diatom species of BSCs from five dune study sites on Rügen and Usedom. *Achnanthes coarctata* (a–j), *Luticola cohnii*-group (k–ad), *Hantzschia abundans* (ae–af), *Pinnularia intermedia* (ag–az), *Hantzschia amphioxys* (ba–bf) and *Stauropora* sp. (bg–bl). Scale bar at 10 μ m

texture became finer and the specific surface of the mineral part of the BSCs larger in a northwestern to south-eastern direction, except for the site Zempin. The pH was neutral at all investigated sites, ranging from 7.1 (Zempin) to 7.5 (Karlshagen). The electrical conductivity and the

carbonate content decreased from Glowe (41.5 μ S cm^{-1} ; 11.1 %) to Zempin (15.5 μ S cm^{-1} ; 0.7 %), but there were only slight differences between Baabe, Karlshagen, and Zempin (Table 3).

The elemental contents of the soils showed the lowest TC (0.67 g kg^{-1}) in Karlshagen and the highest TC (10.79 g kg^{-1}) in Glowe (Table 3). TN was more uniform among the study sites, ranging from 0.09 g kg^{-1} in Zempin to 0.21 g kg^{-1} in Baabe with the values for Glowe (0.13 g kg^{-1}), Karlshagen (0.13 g kg^{-1}), and Prora (0.14 g kg^{-1}) in between and very similar. The soil sample from Karlshagen had the lowest TP

Fig. 4 Dominant cyanobacterial and non-diatom algal species of BSCs from coastal dune study sites on Rügen and Usedom. Cyanobacteria and algae in culture (a, b, d, f–k, o, p, r, s) and direct in crust material (c, e, l–n, q): *Microcoleus vaginatus* (a–c), *Hydrocoryne* sp. (d, e), *Nostoc* cf. *edaphicum* (f, g), *Coleofasciculus* sp. (h, i), *Leptolyngbya* cf. *notata* (j, k), *Lyngbya* sp. (l–n), *Klebsormidium flaccidum* (o), *Klebsormidium crenulatum* (p, q), and *Lobochlamys* sp. (r, s). Scale bars at 10 μ m

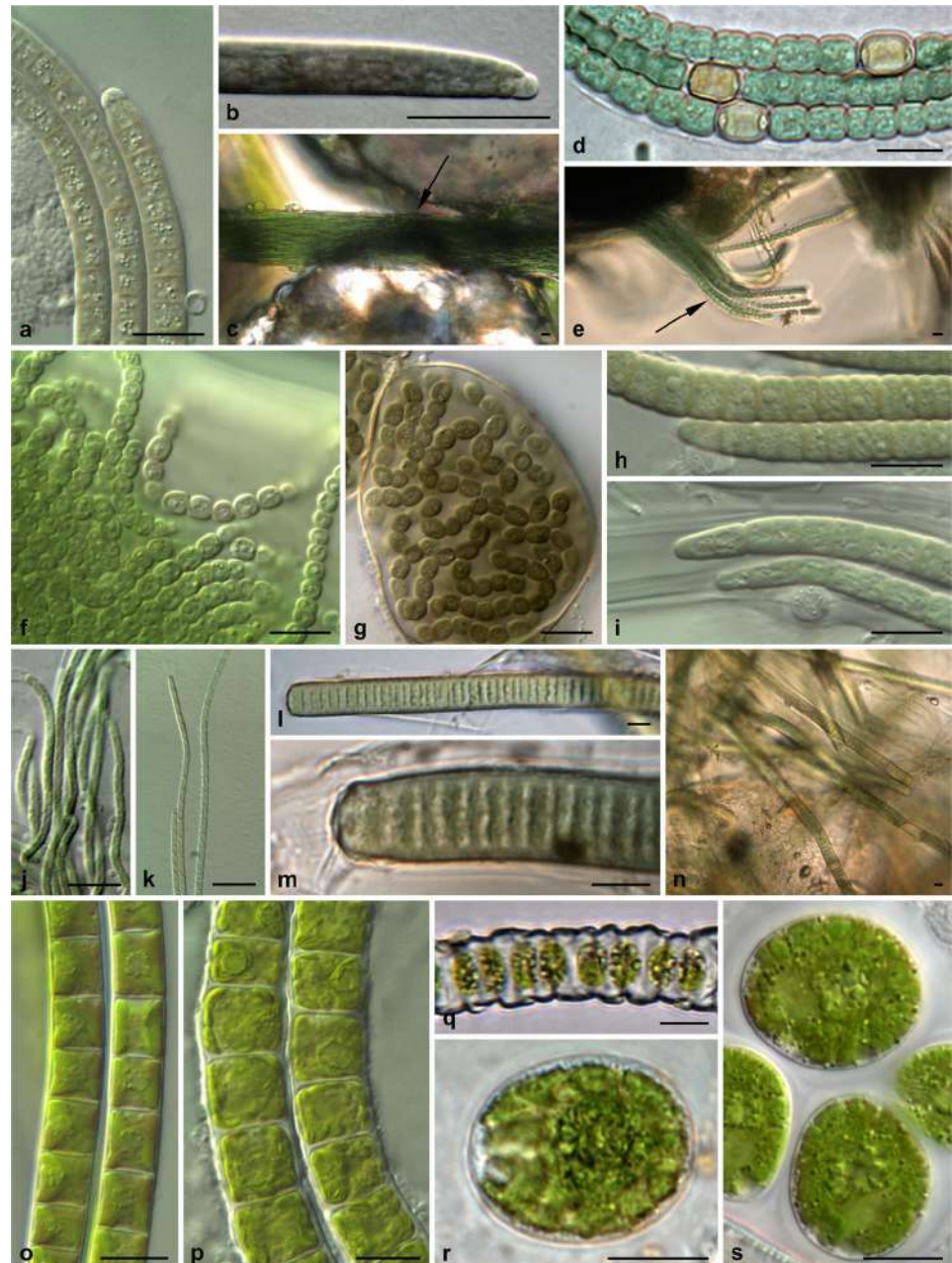


Table 3 Physical and chemical properties of BSC-free surface soils of the coastal dune study sites on Rügen and Usedom used in this study

	Glowe	Prora	Baabe	Karlshagen	Zempin
Coordinates	54° 34.196' N 13° 27.486' O	54° 28.525' N 13° 34.360' O	54° 21.759' N 13° 42.954' O	54° 08.256' N 13° 49.683' O	54° 04.172' N 13° 58.035' O
Clay (%)	0.9	0.7	0.7	0.1	0.6
Silt (%)	2.6	2.7	1.3	2.9	3.0
Fine sand (%)	12.8	2.5	22.6	89.2	16.7
Medium sand (%)	83.2 ^a	89.0 ^a	75.0 ^b	7.8 ^c	79.7 ^b
Coarse sand (%)	0.5	5.2	0.3	0	0
pH (H ₂ O)	7.17	7.22	7.29	7.53	7.05
Electrical conductivity (μS cm ⁻¹)	41.5	32.5	21.0	17.0	15.5
CaCO ₃ (%)	11.1	5.6	1.5	0.8	0.7
TC (g kg ⁻¹)	10.79	5.42	2.25	0.67	0.79
TN (g kg ⁻¹)	0.13	0.14	0.21	0.13	0.09
TP (g kg ⁻¹)	0.31	0.23	0.11	0.09	0.16
PO ₄ ³⁻ (mg kg ⁻¹)	0.64	3.04	2.76	5.18	4.32
PO ₄ ³⁻ -P (% TP)	0.067	0.432	0.820	1.881	0.882

TC total carbon, TN total nitrogen, TP total phosphorus, PO₄³⁻ bioavailable phosphorus, PO₄³⁻-P calculated solubility of TP

^a Soil texture class: medium sand

^b Soil texture class: fine sandy medium sand

^c Soil texture class: fine sand

(0.09 g kg⁻¹), and that from Glowe had the highest TP content (0.31 g kg⁻¹). In contrast, the PO₄³⁻ concentration and the calculated solubility of TP (PO₄³⁻-P as percentage of TP) were largest in Karlshagen (5.18 mg PO₄³⁻ kg⁻¹=1.881 % of TP) and smallest in Glowe (0.64 mg PO₄³⁻ kg⁻¹=0.067 % of TP). The TP content and its solubility were similar in Baabe and Zempin, and the soil sample from Prora showed more TP than the latter two samples; however, a smaller portion of this was soluble as PO₄³⁻ (Table 3).

Species Composition and Soil Properties

The species compositions of cyanobacteria and non-diatom algae in ten dune BSCs as well as the relationship of these species compositions with the soil properties from the five dune study sites were analyzed with an RDA. The RDA separated all dune study sites from each other and indicated a significant correlation between the species composition of the BSCs and the TP in the soil ($p < 0.026$) in our data set (Fig. 5). On the first axis, which explains approximately 51 % of the variance within the species composition of the sites, Karlshagen, Zempin, and Baabe are on the left side of the RDA plot closer to each other compared to Prora and Glowe on the right side of the plot (Fig. 5). This arrangement of Baabe, Karlshagen, and Zempin as one group and Glowe and Prora as a second group was found to be statistically significant ($p < 0.018$). The direction of the arrows in the plot indicates at which study site the parameter has a

greater influence. Except TP, all other analyzed factors showed no significant correlation with the species composition of BSCs from the dune study sites ($p > 0.346$) in our data set (Fig. 5). However, the soil parameters electrical conductivity, carbonate content, and particle size distribution are also arranged along the first axis, indicating that they might have an influence on the species composition of the BSCs as well, but exhibited no statistical significance in the presented data set. Total carbon (TC) is also arranged along the first axis in the RDA plot but was not considered for the interpretation, because it is strongly co-correlated with the carbonate content at the study sites ($R^2 = 0.993$).

Discussion

Species Composition and Dominant Species

BSCs can host a variety of many different species. Several studies on cyanobacterial and algal composition of BSCs in different ecosystems revealed a diversity of cyanobacteria and algae ranging from just a few up to over one hundred species [42–44]. Overall, in the present study, 125 cyanobacteria and algae were identified in association with BSCs of dunes from the Baltic Sea coast. Compared to former studies on BSCs in coastal dunes, which described 1 to 11 cyanobacterial and algal species, our study showed a remarkable high diversity of cyanobacteria and algae [23, 25]. Studies on BSCs in drier

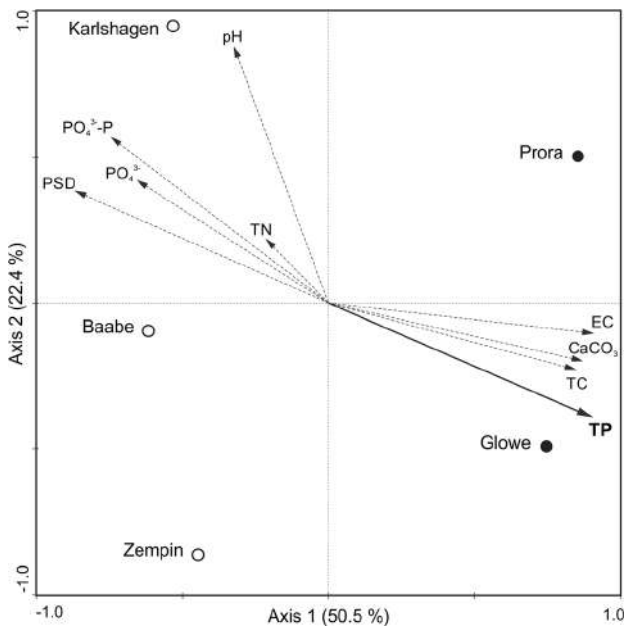


Fig. 5 RDA based on the cyanobacterial and non-diatom algal species composition of ten BSCs (mean of two BSCs for each study site) and the soil properties from five coastal dune study sites on Rügen and Usedom. Study sites with *open circles* represent one group which is statistically significant different from another group build of study sites with *filled circles* ($p < 0.018$). Soil properties without statistical significance are shown with *dotted arrows* ($p > 0.346$), and those with statistical significance with *bold arrows* ($p < 0.026$). Percentage at the axis indicates the variance within the species data explained by each axis for the distribution of the study sites in the plot. *TP* total phosphorus, PO_4^{3-} bioavailable phosphorus, $PO_4^{3-}-P$ calculated solubility of TP, *TN* total nitrogen, *TC* total carbon, $CaCO_3$ calcium carbonate, *PSD* particle size distribution, *EC* electrical conductivity

regions, for instance, of Mexico [17], South Africa [21], and Central Europe [45] indicated 66, 88, and 45 cyanobacterial and algal species, respectively. Hence, our recorded species number is more comparable with investigations made in other environments than coastal dunes.

BSCs of dunes of the Baltic Sea in the present study contained a common suite of species, with abundant non-diatom algae and cyanobacteria, as well as diverse diatom floras. Although cyanobacteria are often most abundant in BSCs [16, 21], the investigated dune BSCs showed higher numbers of non-diatom algae compared to cyanobacteria. However, former studies on BSCs also identified more algae than cyanobacteria [17, 42, 44]. Hence, the high non-diatom algal diversity found in the present study is in agreement with other investigations.

Nevertheless, it could be possible that the number of cyanobacterial and algal species was still underestimated. Previous studies showed that a combination of several independent techniques is necessary for a comprehensive evaluation of the species diversity in BSCs, because algae

are often underestimated with direct determination, while cyanobacteria are difficult to detect with a culture approach [e.g., 45, 46]. In the present study, three dominant cyanobacteria (*Coleofasciculus* sp., *Lyngbya* sp. and *Hydrocoryne* sp.), as detected by direct microscopy, were only rarely found in the enrichment cultures and could not be cultivated. To overcome these problems, many researchers started to combine the morphological identification of species with molecular analyses [21, 25]. But, even the molecular techniques still sometimes fail to detect some cyanobacteria and algae [47, 48].

In contrast to cyanobacteria and non-diatom algae, diatom species are typically identified with the help of specific diatom slides [49]. With 55 species, the diatom flora of the investigated BSCs was surprisingly high, compared to most other biodiversity studies on BSCs, where the number of diatom species often varied between no and up to ten species [17, 23, 50]. Nevertheless, studies on BSCs in the 1980s in xeric habitats of North America also revealed with 20 and 24 taxa considerable diatom richness and a widespread distribution of diatoms in soils [16, 51]. In these studies, specific diatom slides were prepared for their identification, a quality approach which seems to be neglected in current investigations. Whether all the recorded diatom species in the present study represent, indeed, components of BSCs remains an open question. Diatoms and other microalgae are known to be air-transported over hundreds of kilometers [52]. Especially near beaches, marine and brackish water diatoms can be wind-blown during stormy conditions [53]. Hence, it could not be excluded that some of the diatom species found were wind (sea-spray) or wave transported and hence only temporary guests in the coastal dune BSCs.

The community structure of BSCs at the sampling date is normally characterized by the organisms, which are identified directly in soil crust material [45]. In most cases, filamentous soil cyanobacteria and algae dominate BSCs, because they play a major role in the development of these micro-systems [49]. Consequently, it is not surprising that most of the investigated dune BSCs were dominated by filamentous cyanobacterial and algal species. The most important cyanobacterial genera for the soil crust formation in the Baltic Sea dunes were *Coleofasciculus*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Nostoc*, *Hydrocoryne*, and *Leptolyngbya*. Filamentous algae of the genus *Klebsormidium* were essential as well. In addition, one unicellular algal species of the genus *Lobochlamys* showed dominance in one of these dune BSCs. All the dominant filamentous cyanobacterial and algal genera present in the investigated BSCs of coastal dunes are most common and widespread genera with a broad ecological amplitude, which frequently occur in terrestrial habitats of dry regions (for comparison, see [15]).

Influence of Abiotic Parameters on Species Composition

BSCs develop through the interaction of cyanobacterial and algal filaments and sheaths with soil particles. The considerable physiochemical heterogeneity of soils results in a number of specific microenvironments, which might have effects on the species composition of newly developing soil crusts. In this first investigation of BSCs of coastal dunes, a statistically significant influence of the total phosphorus (TP) concentration in the sand on the species composition of cyanobacteria and algae at the study sites ($p < 0.026$) was found (Fig. 5).

Phosphorus (P) is one of the essential elements for growth of phototrophic organisms but in most cases not easily bioavailable for organisms because it is bound in unweathered minerals [54]. The addition of easily soluble P ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) to developing BSCs in virgin soils at newly deglaciated areas of the high Andes, Peru, allowed the phototrophs to grow sooner and faster, and to reach a higher percentage areal cover than treatments just receiving nitrogen (N) or the control [55]. Thus, there is strong evidence that P limitation may be an important factor controlling initiation and development of BSCs in such areas [55]. These and our finding could be a hint to consider P as a factor that influences the establishment and species composition of cyanobacteria and algae of BSCs in coastal dunes. However, future studies are necessary to test this hypothesis, because it cannot be proven with the available data only.

Furthermore, it seems unlikely that a single environmental factor is responsible for the differences in BSC community structures. Except the amount of TP in the sand, no other tested factor showed a statistically significant correlation with the species composition in the present study ($p > 0.392$). This might be due to the small number of samples and analyzed environmental factors as well as to the lack of replicates. However, electrical conductivity, carbonate content, and particle size distribution were also arranged along the first axis in the RDA plot (Fig. 5) indicating that these factors might have an influence on the composition of cyanobacteria and algae of BSCs as well. Electrical conductivity and carbonate content have been shown previously to influence the species composition of BSCs [56]. In addition, an influence of soil texture on the development and composition of BSCs has also been reported, and some authors even hypothesize that soils with higher silt and clay content promote the succession and species richness of BSCs [21, 56]. This can of course not be tested in coastal dunes, as they are wind- and wave-driven deposits of sand with only minimal proportion of silt and clay. However, the investigated dunes differed in their sand subfractions as well as in the presence of cyanobacteria. BSCs of dunes consisting of finer sand material showed a higher diversity of cyanobacteria with many Nostocales species. In contrast, BSCs developed on coarser sand were

dominated by large and highly mobile cyanobacteria (*Coleofasciculus* sp. and *Microcoleus vaginatus*). Belnap and coauthors [5, 13] noted that less stable sediments and very sandy soils (>90 %) are generally dominated by cyanobacteria. In contrast to this general statement, in the present study, BSCs were also dominated by algae or a combination of both. Other studies also identified filamentous algae as dominant species in BSCs on sandy substrates, including coastal dunes [9, 25, 57].

Almost all studies on BSCs where a dominance of algae was recorded were conducted in the temperate zone [9, 18, 23, 45]. As Büdel [15] summarized, BSCs with a dominance of algae appear to be limited to soils in temperate regions. Nevertheless, this statement is only valid concerning the dominance of algae. Although algae are not dominant in dry regions, they are successful colonizers of BSCs as they are present in high species numbers [21, 42].

In conclusion, BSCs of dunes of the Baltic Sea coast represent an ecologically important and abundant, but so far unstudied, vegetation form. The high biodiversity of cyanobacteria and algae, particularly diatoms, as BSC components was surprising. The diverse diatom flora found in dune BSCs emphasizes the use of specific diatom slides, an easy method for a comprehensive recording of the diatom richness in future studies. From all the tested physicochemical parameters, only TP could be identified as factor shaping site-specific species composition of cyanobacteria and algae. But, there is additional evidence that electrical conductivity, carbonate content, and soil texture might influence the coastal dune BSCs as well. More in-depth investigations are needed for a better understanding of crust composition and development in coastal dunes and the role of TP in these processes. Therefore, a wide set of BSC samples as well as environmental factors should be analyzed especially to prove the influence of the TP and other soil parameters.

Acknowledgments We thank Elena Heilmann, Dr. Dana Zimmer, and Britta Balz (Soil Science, University of Rostock, Germany) for their technical support during soil analyses as well as Dr. Anastasia Kryvenda and Natalya Rybalka (University of Göttingen, Germany) for help in identification of some Xanthophyceae. The work has been partly funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Priority Program 1374 “Infrastructure-Biodiversity-Exploratories” (Project Crustfunction KA899/28-1) and the Leibniz Science Campus Phosphorus Research Rostock. T.M. thanks the Alexander von Humboldt Foundation for financial support (Georg-Forster research fellowship at the University of Rostock).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Martínez ML, Psuty NP, Lubke RA (2004) A perspective on coastal dunes. In: Martínez ML, Psuty NP (eds) Coastal dunes: ecology and conservation. Springer-Verlag, pp 3–10
- Miller TE, Gornish ES, Buckley HL (2009) Climate and coastal dune vegetation: disturbance, recovery, and succession. *Plant Ecol* 206:97–104. doi:10.1007/s11258-009-9626-z
- Virginia Marine Resources Commission (1989) Coastal primary sand dunes/beaches guidelines. Guidelines for the permitting of activities which encroach into coastal primary sand dunes/beaches. Reprinted 1993
- García Novo F, DíazBarradas MC, Zunzunegui M, GarcíaMora R, GallegoFernández JB (2004) Plant functional types in coastal dune habitats. In: Martínez ML, Psuty NP (eds) Coastal dunes: ecology and conservation. Springer-Verlag, pp 155–169
- Belnap J, Büdel B, Lange OL (2001) Biological soil crusts: characteristics and distribution. In: Belnap J, Lange OL (eds) Biological soil crusts: structure, function, and management. Springer-Verlag, pp 3–30
- Breen K, Lévesque E (2008) The influence of biological soil crusts on soil characteristics along a high arctic glacier foreland, Nunavut, Canada. *Arct Antarct Alp Res* 40:287–297. doi:10.1657/1523-0430(06-098)[BREEN]2.0.CO;2
- Fischer T, Veste M, Bens O, Hüttl RF (2012) Dew formation on the surface of biological soil crusts in central European sand ecosystems. *Biogeosciences* 9:4621–2628. doi:10.5194/bg-9-4621-2012
- Colesie C, Gommeaux M, Green ATG, Büdel B (2013) Biological soil crusts in continental Antarctica: Garwood Valley, southern Victoria Land, and Diamond Hill, Darwin Mountains region. *Antarct Sci* 26:115–123. doi:10.1017/S0954102013000291
- Van den Acker JAM, Jungerius PD (1985) The role of algae in the stabilization of coastal dune blowouts. *Earth Surf Proc Land* 10: 189–192. doi:10.1002/esp.3290100210
- Grote EE, Belnap J, Housman DC, Sparks JP (2010) Carbon exchange in biological soil crusts communities under differential temperatures and soil water contents: implications for global change. *Glob Chang Biol* 16:2763–2774. doi:10.1111/j.1365-2486.2010.02201.x
- Belnap J (2002) Nitrogen fixation in biological soil crusts from southeast Utah, USA. *Biol Fertil Soils* 35:128–135. doi:10.1007/s00374-002-0452-x
- Wu Y, Rao B, Wu P, Liu Y, Li G, Li D (2013) Development of artificially induced biological soil crusts in fields and their effects on top soil. *Plant Soil* 370:115–124. doi:10.1007/s11104-013-1611-6
- Belnap J (2006) The potential roles of biological soil crusts in dryland hydrologic cycles. *Hydrol Process* 20:3159–3178. doi:10.1002/hyp.6325
- Harper KT, Belnap J (2001) The influence of biological soil crusts on mineral uptake by associated vascular plants. *J Arid Environ* 47: 347–357. doi:10.1006/jare.2000.0713
- Büdel B (2001) Synopsis: comparative biogeography and ecology of soil-crust biota. In: Belnap J, Lange OL (eds) Biological soil crusts: structure, function, and management. Springer-Verlag, pp 141–152
- Ashley J, Rushforth SR, Johansen JR (1985) Soil algae of cryptogamic crusts from the Uintah Basin, Utah, U.S.A. *Great Basin Nat* 45:432–442
- Flechtner VR, Johansen JR, Clark WH (1998) Algal composition of microbiotic crusts from the central desert of Baja California, Mexico. *Great Basin Nat* 58:295–311
- Hoppert M, Reimer R, Kemmling A, Schröder A, Günzl B, Heinken T (2004) Structure and reactivity of a biological soil crust from a xeric sandy soil in Central Europe. *Geomicrobiol J* 21:183–191. doi:10.1080/01490450490275433
- Lukešová A, Hoffmann L (1996) Soil algae from acid rain impacted forest areas of the Krušné Hory Mts. 1. Algal communities. *Vegetatio* 125:123–136. doi:10.1007/BF00044646
- Tomas AD, Dougill AJ (2006) Distribution and characteristics of cyanobacterial soil crusts in the Molopo Basin, South Africa. *J Arid Environ* 64:270–283. doi:10.1016/j.jaridenv.2005.04.011
- Büdel B, Darienko T, Deutschewitz K, Dojani S, Friedl T, Mohr KI, Salisch M, Reisser W, Weber B (2009) Southern African biological soil crusts are ubiquitous and highly diverse in drylands, being restricted by rainfall frequency. *Microb Ecol* 57:229–247. doi:10.1007/s00248-008-9449-9
- Büdel B, Colesie C, Green TGA, Grube M, Lázaro Suau R, Loewen-Schneider K, Maier S, Peer T, Pintado A, Raggio J, Ruprecht U, Sancho LG, Schroeter B, Türk R, Weber B, Wedin M, Westberg M, Williams L, Zheng L (2014) Improved appreciation of the functioning and importance of biological soil crusts in Europe: the Soil Crust International Project (SCIN). *Biodivers Conserv* 23:1639–1658. doi:10.1007/s10531-014-0645-2
- De Winder B (1990) Ecophysiological strategies of drought-tolerant phototrophic microorganisms in dune soils. Dissertation, University of Amsterdam
- Pluis JLA, de Winder B (1990) Natural stabilization. *Catena Suppl* 18:195–208
- Smith SM, Abed RMM, Garcia-Pichel F (2004) Biological soil crusts of sand dunes in Cape Cod National Seashore, Massachusetts, USA. *Microb Ecol* 48:200–208. doi:10.1007/s00248-004-0254-9
- Müller-Westermeier G, Kreis A, Dittmann E, Barfus K, Czeplak G, Riecke W (2003) *Klimaatlas Bundesrepublik Deutschland Teil 3 Bevölkerung, Globalstrahlung, Anzahl der Tage klimatologischer Ereignisse, Phänologie*. (Deutscher Wetterdienst)
- Bischoff HW, Bold HC (1963) Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Phycol Stud* IV Univ Texas Publ 6318:1–95
- Starr RC, Zeikus JA (1993) UTEX – the culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures. *J Phycol* 29:1–106. doi:10.1111/j.0022-3646.1993.00001.x
- Ettl H, Gärtner G (2014) *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*, 2nd edn. Springer, Berlin
- Komárek J, Anagnostidis K (1998) *Cyanoprokaryota 1 Teil: Chroococcales. Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd 19/1. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin
- Komárek J, Anagnostidis K (2005) *Cyanoprokaryota 2 Teil: Oscillatoriales. Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd 19/2. Spektrum, Akad. Verl., München
- Komárek J (2013) *Cyanoprokaryota. Heterocytous genera, Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd. 19/3. Springer Spektrum
- Krammer K, Lange-Bertalot H (1991a) *Bacillariophyceae 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae*. In: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Band 2/3. Gustav Fischer Verlag
- Krammer K, Lange-Bertalot H (1991b) *Bacillariophyceae 4. Teil: Achnantheaceae*. In: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Band 2/4. Gustav Fischer Verlag
- Krammer K (2000) The genus *Pinnularia*. In: *Diatoms of Europe Vol. 1*. A.R.G. Gantner Verlag K.G
- Witkowski A, Lange-Bertalot H, Metzeltin D (2000) *Diatom flora of marine coasts vol. 1, Iconographia Diatomologica*. A.R.G. Gantner Verlag
- Lange-Bertalot H (2001) *Navicula sensu stricto*. 10 genera separated from *Navicula sensu lato*. *Frustulia*. In *Diatoms of Europe Vol. 2*. A.R.G. Gantner Verlag K.G
- Lange-Bertalot H, Cavacini P, Tagliaventi N, Alfinito S (2003) *Diatoms of Sardinia. Rare and 76 new species in rock pools and other ephemeral waters. Iconographia Diatomologica*. In *Annotated*

- diatom monographs vol. 12: biogeography - ecology – taxonomy. A.R.G. Gantner Verlag
39. Hofmann G, Werum M, Lange-Bertalot H (2013) Diatomeen im Süßwasser-Benthos von Mitteleuropa. Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis. Über 700 der häufigsten Arten und ihre Ökologie. Koeltz Scientific Books
 40. Blume H-P, Stahr K, Leinweber P (2011) Bodenkundliches Praktikum, 3rd edn. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
 41. Ad hoc- Arbeitsgruppe Boden (2005) Bodenkundliche Kartieranleitung, 5. Aufl. Hannover
 42. Johansen JR, Ashley J, Rayburn WR (1993) Effects of rangefire on soil algal crusts in semiarid shrub-steppe of the lower Columbia Basin and their subsequent recovery. *Great Basin Nat* 53:73–88
 43. Cabała J, Rhamonov O (2004) Cyanophyta and algae as an important component of biological crust from the Pustynia Błędowska Desert (Poland). *Polish Bot J* 49:93–100
 44. Lukešová A (2001) Soil algae in brown coal and lignite post-mining areas in Central Europe (Czech Republic and Germany). *Restor Ecol* 9:341–350. doi:10.1046/j.1526-100X.2001.94002.x
 45. Langhans TM, Storm C, Schwabe A (2009) Community assembly of biological soil crusts of different successional stages in a temperate sand ecosystem, as assessed by direct determination and enrichment techniques. *Microb Ecol* 58:394–407. doi:10.1007/s00248-009-9532-x
 46. Hawkes CV, Flechtner VR (2002) Biological soil crusts in a xeric Florida shrubland: composition, abundance, and spatial heterogeneity of crusts with different disturbance histories. *Microb Ecol* 43: 1–12. doi:10.1007/s00248-001-1017-5
 47. Garcia-Pichel F, López-Cortés A, Nübel U (2001) Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado Plateau. *Appl Environ Microbiol* 67:1902–1910. doi: 10.1128/AEM.67.4.1902-1910.2001
 48. Cardon ZG, Gray DW, Lewis LA (2008) The green algal underground: evolutionary secrets of desert cells. *Bioscience* 58:114–122. doi:10.1641/B580206
 49. Johansen JR (1993) Cryptogamic crusts of semiarid and arid lands of North America. *J Phycol* 29:140–147. doi:10.1111/j.0022-3646.1993.00140.x
 50. Kaštovská K, Elster J, Štíbal M, Šantrůčková H (2005) Microbial assemblages in soil microbial succession after glacial retreat in Svalbard (High Arctic). *Microb Ecol* 50:396–407. doi:10.1007/s00248-005-0246-4
 51. Johansen JR, Rushforth SR, Brotherson JD (1981) Subaerial algae of Navajo National Monument, Arizona. *Great Basin Nat* 41:433–439
 52. Darby DA, Burckle LH, Clark DL (1974) Airborne dust on the Arctic ice pack, its composition and fallout rate. *Earth Planet Sci Lett* 24:166–172. doi:10.1016/0012-821X(74)90093-4
 53. Lee TF, Eggleston PM (1989) Airborne algae and cyanobacteria. *Grana* 28:63–66. doi:10.1080/00173138909431014
 54. Walker TW, Syers JK (1976) The fate of phosphorus during pedogenesis. *Geoderma* 15:1–19
 55. Schmidt SK, Nemergut DR, Todd BT, Lynch RC, Darcy JL, Cleveland CC, King AJ (2012) A simple method for determining limiting nutrients for photosynthetic crusts. *Plant Ecol Divers* 5: 513–519. doi:10.1080/17550874.2012.738714
 56. Anderson DC, Harper KT, Holmgren RC (1982) Factors influencing development of cryptogamic soil crusts in Utah deserts. *J Range Manag* 35:180–185. doi:10.2307/3898386
 57. Levin N, Kidron GJ, Ben-Dor E (2007) Surface properties of stabilizing coastal dunes: combining spectral and field analyses. *Sedimentology* 54:771–788. doi:10.1111/j.1365-3091.2007.00859.x

1.1.2. Склад біологічних ґрунтових кірочок прибережних дюн Балтійського моря (Німеччина) в контексті інтегративного підходу до таксономії водоростей і ціанобактерій



Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria

Tatiana Mikhailyuk^a, Karin Glaser ^b, Petro Tsarenko^a, Eduard Demchenko^a and Ulf Karsten^b

^aM.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereshchenkivska Str. 2, Kyiv 01004, Ukraine;

^bInstitute of Biological Sciences, Applied Ecology and Phycology, University of Rostock, Albert-Einstein-Strasse 3, D-18059 Rostock, Germany

ABSTRACT

Most of the data on biodiversity, ecology and biogeography of microalgae and cyanobacteria are based on classical morphological approaches. However, morphological identification of these microorganisms is often possible only to higher taxonomic ranks such as genus, because of low morphological diversity and high variability along with the presence of cryptic taxa. This study compared the species composition of cyanobacteria, and green and streptophyte microalgae, isolated from biological soil crusts (BSCs) of maritime sand dunes (Baltic Sea, Germany) and identified through culture-dependent morphological methods combined with molecular phylogenetic data. Phylogenetic analyses (based on SSU rRNA and ITS-1,2 for microalgae, or the SSU-LSU ITS region for cyanobacteria) provided unambiguous identifications of 20 strains (37.7% of all strains investigated) to species level; the identifications had to be corrected after preliminary morphological determination of eight strains. For 27 strains (50.9%), identification with molecular markers was possible only to genus or group of closely related species, because a modern taxonomic revision of these taxa is preliminary, incomplete or non-existent. Identification to genus was problematic for six strains (11.3%). This combination of morphological and molecular methods (integrative approach) resulted in the discovery of rare, taxonomically or ecologically interesting taxa, and in the description of a new species of *Tetrademus* (*T. arenicola* sp. nov.), a new combination for *Chlamydomonas callunae* (*Heterochlamydomonas callunae* comb. nov.), epitypification of the rare alga *Actinochloris sphaerica* and emendation of the recently described *Eremochloris sphaerica*. A microscopic culture-dependent method and an integrative approach provided similar results concerning the cyanobacterial and algal diversity of BSCs of Baltic sand dunes in general. However, this investigation using an integrative approach allowed us to precisely identify species of several important taxa (the most common and dominant species) in the community structure of BSCs, and also certain rare representatives.

ARTICLE HISTORY Received 19 April 2018; Revised 10 October 2018; Accepted 18 October 2018


KEYWORDS Biological soil crusts; Chlorophyta; Cyanobacteria; integrative approach; ITS; SSU rRNA; Streptophyta

Introduction

Biological soil crusts (BSCs) are complex microecosystems comprised of many different organisms including bacteria, fungi, algae, protists, lichens, mosses and invertebrates. BSCs are widely distributed in all climate zones where the growth of higher plants is limited by unfavourable environmental factors such as low water availability (Belnap & Lange, 2001; Weber *et al.*, 2016). The many important ecological functions of BSCs include biogeochemical cycling of nutrients and organic matter, food chains, soil stabilization and improvement of soil structure and fertility, especially in drylands (deserts, savannas, xerophytic steppes, maritime sand dunes) and disturbed regions (burn or post-mining areas, etc.). BSCs are currently being intensively investigated in geological, hydrological and ecophysiological contexts (Belnap & Gillette, 1998; Evans & Belnap, 1999; Evans & Lange, 2001; Karsten *et al.*, 2010; Karsten & Holzinger, 2012, 2014; Wu *et al.*, 2013; Büdel & Colesie, 2014) as well as in the

context of their biodiversity, ecology and biogeography (Johansen & Rushforth, 1985; Lukešová, 2001; Flechtner *et al.*, 1998, 2008; Kaštovská *et al.*, 2005; Büdel *et al.*, 2009, 2016; Mikhailyuk *et al.*, 2015; Seppelt *et al.*, 2016; Rosentreter *et al.*, 2016; Borchhardt *et al.*, 2017). However, some questions concerning BSCs are still unresolved.

Many datasets on the composition of cyanobacteria and algae in BSCs are now available, although knowledge concerning their biogeography and their occurrence as a function of ecological factors remains insufficient. Some regions (Africa, North and South America, Australia, polar and mountain habitats) are still little investigated (Büdel *et al.*, 2016), and most importantly, almost all available data on microalgal and cyanobacterial BSC species composition have been obtained through morphological studies. Molecular phylogenetic methods have just begun to be applied to the study of the biodiversity of BSC organisms (Büdel *et al.*, 2009, 2016). Using an

CONTACT Tatiana Mikhailyuk  t-mikhailyuk@ukr.net

© 2019 British Phycological Society

integrative approach, which includes microscopic and molecular phylogenetic, culture-dependent and culture-independent methods, provides the most detailed possible information about the true biodiversity of BSC microalgae and cyanobacteria.

There is a similar situation of a general lack of comprehensive investigations based on molecular analysis for studies on the biodiversity of many other ecological groups of microalgae inhabiting soils, tree bark, stone substrates, caves, etc. However, in recent years, several publications have appeared that combine complex molecular phylogenetic investigations with classical morphological methods (integrative approach) for a deeper understanding of biodiversity questions (Büdel *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2010; Zammit *et al.*, 2011; Balzano *et al.*, 2012; Flechtner *et al.*, 2013; Hallmann *et al.*, 2013; Kulichová *et al.*, 2014; Patzelt *et al.*, 2014; Brinkmann *et al.*, 2015; Hodač *et al.*, 2015). Nevertheless, the morphological identification of many microalgal groups is still quite challenging because of a general lack of characteristic morphological features, and hence light-microscopy techniques are often inadequate. In addition, microscopic identification is, at best, usually possible only to higher taxonomic ranks such as genera or species complexes, not to species level, although this is generally accessible by methods of molecular phylogeny.

Species lists from the above-mentioned publications based on molecular phylogenetic methods or an integrative approach mainly include taxa that were identified only to the level of genus or species complexes. Kulichová *et al.* (2014), for example, reported 29 algal taxa found on tree bark in Slovenia and Italy. Only four of these taxa (13.8%) were identified to species level, although with some uncertainty (e.g. cf.-taxa), while the other taxa were assigned only to class or genus. Similarly, Balzano *et al.* (2012) investigated the biodiversity of planktonic phytoflagellates in the Pacific and Arctic oceans, and were able to identify only five of the 21 listed taxa (23.8%) to species level. In the study of Hodač *et al.* (2015) on green microalgae of calcifying biofilms from karstic streams in Germany, the authors provided a more optimistic picture: 20 of 34 taxa (58.8%) were determined to species level, while the identification of a further 13 taxa was possible to a group of related species (cf.-species). Therefore, molecular phylogenetic methods, which are necessary to resolve problems of correct algal identification, were recognized as a powerful instrument for floristic and taxonomic investigations, although still with some limitations.

The aim of our investigation was an evaluation and comparison of the species composition of cyanobacteria and green and streptophyte microalgae isolated from BSCs of maritime sand dunes on the Baltic Sea islands Rügen and Usedom in Germany. The

strains were obtained and tentatively identified on the basis of culture-dependent morphological methods (Schulz *et al.*, 2016), and now have been analysed with molecular phylogenetic markers. The results of comparisons of morphological characters of the algal and cyanobacterial strains investigated and phylogenetic data, as well as taxonomic decisions concerning rare and interesting finds, are provided below. The advantages, problems and perspectives of this integrative approach to the study of the biodiversity of algae and cyanobacteria are discussed.

Materials and methods

Strains, culture conditions, light microscopy

The material for the present study consisted of 53 unialgal and cyanobacterial cultures, isolated from BSCs collected from sand dunes on the Baltic Sea coast at five localities on Rügen and Usedom islands, Mecklenburg-West Pomerania, Germany. Study area, sampling sites, isolation procedure and culture conditions have been described in a previous paper (Schulz *et al.*, 2016). The strains are kept in a culture collection at the University of Rostock, and some of them (see below) were deposited in the SAG (Culture Collection of Algae at Göttingen University).

Some additional strains were isolated from similar BSC habitats (maritime sand dunes), to include other localities in the present study: four strains from the Baltic Sea coast at Warnemünde and Heiligendamm, Mecklenburg-West Pomerania, Germany, and one strain from the Black Sea coast at the Danube Delta Biosphere Reserve, Kiliya District, Odessa region, Ukraine. Three strains originating from the SAG and UTEX collections were also investigated, for comparison with original isolates.

Purified strains were maintained on 3N BBM with vitamins for microalgae (Starr

& Zeikus, 1993) and on BG-11 medium for cyanobacteria (Stanier *et al.*, 1971), all at 20°C and 25 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Osram Lumilux Cool White lamps L36W/840) in a light/dark cycle of 12:12 h L:D. Morphological examinations of unialgal cultures were performed using Olympus BX51 and BX53 light microscopes with Nomarski DIC optics (Olympus Ltd, Hamburg, Germany). Photomicrographs were taken with digital cameras (Olympus UC30 and LC30) attached to the microscopes, and processed by the Olympus software cellSens Entry. Morphological identification of the BSC organisms was based mainly on Ettl (1983), Lokhorst (1996) and Ettl & Gärtner (2014) for green and streptophyte microalgae, and on Kondratyeva (1968), Komárek & Anagnostidis (2005) and Komárek (2013) for cyanobacteria, as well as on numerous monographs and

papers devoted to taxonomic revisions of the taxa of interest (Table 1). Species lists based on morphological identification of algae and cyanobacteria from BSCs of Rügen and Usedom were published by Schulz *et al.* (2016).

DNA isolation, PCR and sequencing

Genomic DNA of cyanobacterial and algal strains was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences of the SSU rRNA gene together with the SSU-LSU ITS region for cyanobacteria or the ITS-1-5.8S-ITS-2 region for microalgae were amplified using a Taq PCR Mastermix Kit (Qiagen GmbH), and the primers SSU-4-forw and ptLSU C-D-rev (Marin *et al.*, 2005) for cyanobacteria, and EAF3, ITS055R (Marin *et al.*, 1998, 2003) together with algal-specific primers G800R, G730F and G500F (T. Pröschold, personal communication) for green and streptophyte algae. Amplifications were performed in a T-Gradient ThermoBlock thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany). The PCRs were performed using conditions described in our previous paper (Mikhailyuk *et al.*, 2018). PCR products were cleaned using a Qiagen PCR purification kit (Qiagen GmbH) according to the manufacturer's instructions. Cleaned PCR products were sequenced commercially by Qiagen Company using the primers SSU-4-forw, Wil 6, Wil 12, Wil 14, Wil 5, Wil 9, Wil 16 and ptLSU C-D-rev (Wilmotte *et al.*, 1993; Marin *et al.*, 2005) for cyanobacteria and G800R, N82F, 536R, 920R, 1400R, 920F, 1400F, GF, ITS2F and ITS05R (Marin *et al.*, 1998, 2003; Pröschold *et al.*, 2005) for microalgae. The resulting sequences were assembled and edited using Geneious software (version 8.1.8; Biomatters). They were deposited in GenBank under the accession numbers MH688842–MH688856 and MH703734–MH703778.

Phylogenetic analyses and ITS-2 secondary structure

Sequences of the isolates were compared to those from reference strains at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), using BLASTn queries (Altschul *et al.*, 1997) to search for the closest relatives. For the comparison, nucleotide sequences of representatives of: the orders Synechococcales (52 sequences) and Nostocales (37), Cyanobacteria; classes Chlorophyceae (115), Trebouxiophyceae (82) and Ulvophyceae (33), Chlorophyta; along with Klebsormidiophyceae (24), Streptophyta were used. Multiple alignments of the nucleotide sequences of the SSU rRNA gene were made using the Mafft web server (version 7; Katoh & Toh, 2008), followed by manual editing in the program BioEdit (version 7.2). Alignments for the phylogeny of the SSU-LSU ITS region of cyanobacteria or the ITS-1,2

region of microalgae were performed manually in BioEdit, taking into account the secondary structure of the RNA. The models of the secondary structure of the SSU-LSU ITS region of cyanobacteria or the ITS-2 region of the microalgae were constructed according to published data (see Table 1 for references). Helices were folded with the online software mfold (Zuker, 2003) and viewed in the online tool PseudoViewer (Byun & Han, 2009). The evolutionary model that was best suited to the database used was selected based on the lowest AIC value (Akaike, 1974) and calculated in MEGA (version 6, Tamura *et al.*, 2013). Phylogenetic trees were constructed in the program MrBayes 3.2.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), using an evolutionary model GTR + G + I, with 5 000 000 generations. Two of the four runs of the Markov chain Monte Carlo were made simultaneously, with the trees taken every 500 generations. Split frequencies between runs at the end of the calculations were below 0.01. The trees selected before the likelihood rate reached saturation were subsequently rejected. The reliability of tree topology was verified by maximum-likelihood analysis (ML), using the program GARLI 2.0, and the bootstrap support was calculated with 1 000 replicates.

The results of the SSU rRNA phylogeny were used for molecular identification of algae and cyanobacteria to genus level, as recommended by Leliaert *et al.* (2014). Data for the ITS phylogeny based on the secondary structure were used for identification at the species level. Models of the secondary structure of ITS-2 were prepared and analysed for strains of *Eremochloris* and *Tetradasmus*, using recommendations by Coleman (2000). Compensatory base changes (CBCs), base-pair indels (mismatches, deletions, single or unpaired bases) and the positions of conservative regions of ITS-2 were estimated using recommendations by Demchenko *et al.* (2012).

Results

SSU rRNA phylogeny

Phylogenetic analyses of the SSU rRNA of cyanobacteria and green algae found in the BSC communities are presented in Figs 1–4 and Supplementary figs S1, S2. Forty-three original strains of Synechococcales, Oscillatoriales, Nostocales, Chlorophyceae, Trebouxiophyceae and Ulvophyceae were included in the phylogenetic analyses. These isolates, together with 10 strains of Klebsormidiophyceae (involved in the ITS-1,2 analysis, see below), were represented by 41 morphospecies, which equaled 64.1% of the taxa list published by Schulz *et al.* (2016).

Numerous strains of the Oscillatoriales clustered in clades corresponding to the genera *Hormoscilla* Anagnostidis & Komárek (Gomontiellaceae),

Table 1. Comparison of morphological identification of respective strains from BSCs of Baltic sea sand dunes with phylogenetic data.

Strain	Morphospecies, published in Schulz <i>et al.</i> , 2016	Species after phylogenetic revision	Remarks on species identification	Taxonomic revisions, references
Complete coincidence of morphological and molecular identification to species level				
Ru-1-1	<i>Chlorococcum</i> cf. <i>oleofaciens</i> Trainor & Bold	<i>Chlorococcum oleofaciens</i>	The SSU rRNA and ITS-1,2 sequences of original strain are close to authentic strain of <i>Ch. oleofaciens</i> (SAG 213-11).	Kawasaki <i>et al.</i> , 2015
Ru-0-4 Us-7-10 Us-s-7-4	<i>Chlorella vulgaris</i> Beyerinck	<i>Chlorella vulgaris</i>	The SSU rRNA and ITS-1,2 sequences of all original strains are close to authentic strain of <i>Ch. vulgaris</i> (SAG 211/11b).	Krienitz <i>et al.</i> , 2004; Bock <i>et al.</i> , 2011
Ru-1-2 Ru-1-3 Us-2-4 Us-7-7	<i>Klebsormidium flaccidum</i> (Kützing) Silva, Mattox & Blackwell	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	The ITS-1,2 sequences of all original strains are close to authentic strain of <i>K. flaccidum</i> (SAG 2307).	Mikhailyuk <i>et al.</i> , 2015
Us-6-7	<i>Klebsormidium crenulatum</i> (Kützing) Lokhorst	<i>Klebsormidium crenulatum</i>	The ITS-1,2 sequences of original strain are close to authentic strain of <i>K. crenulatum</i> (SAG 37.86).	Mikhailyuk <i>et al.</i> , 2015
Ru-6-3	<i>Elliptochloris subsphaerica</i> (Reisigl) Ettl & Gärtner	<i>Elliptochloris subsphaerica</i>	The SSU rRNA sequence of the original strain and sequence of conserved regions of SSU rRNA, which are proposed for identification on species level (helices E23_1/E23_2, 43 and 49), are close to authentic strain of <i>E. subsphaerica</i> (SAG 2202).	Darienko <i>et al.</i> , 2016
Ru-s-3-4	<i>Actinochloris sphaerica</i> Korshikov	<i>Actinochloris sphaerica</i>	The strains identified as <i>Actinochloris</i> sp. cluster in Chloromonadina clade (Flechtner <i>et al.</i> , 2013), but our strain together with SAG 23.93 (identified as <i>A. sphaerica</i> , isolated from soil, Germany) fell into Moewusinia as sister lineage to authentic strain of <i>Radiosphaera dissecta</i> (Korshikov) Starr (<i>Macrochloris dissecta</i> Korshikov) UTEX 121. SAG 23.93 and our isolate have identical SSU rRNA and close ITS-1,2 sequences and represented the same species, which differ from UTEX 121. Epitypification of <i>A. sphaerica</i> is proposed here.	Korshikov, 1953
Us-1-5	<i>Chlamydomonas</i> cf. <i>callunae</i> Ettl	<i>Heterochlamydomonas callunae</i> (Ettl) comb. nov.	The strain fell in the clade of <i>Heterochlamydomonas</i> (Reinhardtinia). Taxonomic revision of the group was not proposed, but morphological characters of <i>Ch. callunae</i> showed that it should be transferred to <i>Heterochlamydomonas</i> Cox & Deason. Comparison with authentic strain SAG 68.81 showed high morphological and phylogenetic similarity with our strain and with other species of <i>Heterochlamydomonas</i> . Taxonomic combination is proposed here.	Ettl, 1976, 1983
Coincidence of morphological and molecular identification to the group of closely related species				
Ru-s-4-3	<i>Chloromonas actinochloris</i> Pröschold, Marin, Schlösser & Melkonian	<i>Chloromonas</i> cf. <i>actinochloris</i>	The strain is close to authentic strain of <i>Ch. actinochloris</i> (SAG 1.72), but represented a separate lineage.	Pröschold <i>et al.</i> , 2001; Matsuzaki <i>et al.</i> , 2013
Ru-8-1	<i>Klebsormidium</i> cf. <i>nitens</i> (Kützing) Lokhorst	<i>Klebsormidium</i> cf. <i>nitens</i>	The strain is close to authentic strain of <i>K. nitens</i> (SAG 13.91), but represented another lineage.	Mikhailyuk <i>et al.</i> , 2015
Us-s-6-2	<i>Hormoscilla pringsheimii</i> Anagnostidis & Komárek	<i>Hormoscilla</i> cf. <i>pringsheimii</i>	Preliminary revision showing phylogenetic position of the family and its characters was made, but phylogeny inside the group and generic and species concepts were not proposed. Our isolate essentially differs from authentic strain SAG 1407-1 according SSU rRNA and SSU-LSU ITS sequences.	Bohunická <i>et al.</i> , 2015

(Continued)

Table 1. (Continued).

Strain	Morphospecies, published in Schulz <i>et al.</i> , 2016	Species after phylogenetic revision	Remarks on species identification	Taxonomic revisions, references
Ru-s-3-5	<i>Carteria</i> cf. <i>crucifera</i> Korschikov	' <i>Carteria</i> ' cf. <i>crucifera</i>	Original strain is close to other strains of <i>Crucicarteria</i> , but it represents a separate lineage, perhaps another species of the genus, differed ecologically. Taxonomic revision of the group was preliminary.	Nozaki <i>et al.</i> , 1994, 1997
Ru-6-12	<i>Microcoleus vaginatus</i> Gomont ex Gomont	<i>Microcoleus</i> cf. <i>vaginatus</i>	<i>Microcoleus vaginatus</i> group contains several species, revision of which was not proposed.	Strunecký <i>et al.</i> , 2013
Us-2-2	<i>Nostoc</i> cf. <i>edaphicum</i> Kondratieva	<i>Nostoc</i> cf. <i>edaphicum</i>	Several genetically close strains identified as <i>N. edaphicum</i> , but the type of the species and species concept inside the genus are unknown.	Miscoe <i>et al.</i> , 2016; Hrouzek <i>et al.</i> , 2013
Coincidence of morphological and molecular identification, but the taxa require further revision				
Us-1-6 Ru-1-9	<i>Tetracystis sarcinalis</i> Schwarz	' <i>Tetracystis</i> ' cf. <i>sarcinalis</i>	The strain is close to authentic strain of <i>Tetracystis sarcinalis</i> (SAG 19.94) (Reinhardtinia), but the type of genus <i>Tetracystis</i> Brown & Bold (<i>T. aeria</i> Brown & Bold, SAG 89.80) is in Moewusinia. Perhaps these strains represent a separate genus. The material needs further investigation.	–
Ru-6-15	<i>Spongiochloris</i> cf. <i>minor</i> Chantanachat & Bold	' <i>Spongiochloris</i> ' sp.	Original strain fell to the clade that contained authentic strain of <i>Spongiochloris excentrica</i> Starr (SAG 280-1) which is morphologically close to <i>S. minor</i> . However, type species of <i>Spongiochloris</i> Starr (<i>S. spongiosa</i> (Vischer) Starr, UTEX 1) is in <i>Stephanosphaerina</i> . A new genus should be described.	–
Us-7-12	<i>Chlorella chlorelloides</i> (Naumann) Bock, Krienitz & Pröschold (= <i>Dictyosphaerium chlorelloides</i> (Nauman) Komárek & Perman)	<i>Xerochlorella</i> cf. <i>olmiae</i> Fučíková, P. O. Lewis & L.A. Lewis	The SSU rRNA sequences of original strain is close to authentic strain of <i>Xerochlorella olmiae</i> (UTEX B 2993), species identification was not possible because ITS sequence of authentic strain is not available. Perhaps <i>Dictyosphaerium</i> -morphotype is typical for the genus, but this should be proved by further investigations.	Fučíková <i>et al.</i> , 2014b
Coincidence of morphological and molecular identification to the genus level				
Ru-6-5 Ru-6-4	<i>Lobochlamys</i> sp.	<i>Lobochlamys</i> sp.	The strains formed a separate lineage within <i>Lobochlamys</i> Pröschold, Marin, Schlösser & Melkonian (<i>Oogamochlamydia</i>), perhaps representing one species.	Pröschold <i>et al.</i> , 2001
Ru-6-16	<i>Diplosphaera chodatii</i> Bialosuknia	<i>Diplosphaera</i> sp.	Some taxa were revised in the <i>Diplosphaera/Stichococcus</i> group, but there was no general taxonomic revision.	Neustupa <i>et al.</i> , 2007; Eliáš & Neustupa, 2009; Hodač <i>et al.</i> , 2016
Ru-s-3-3	<i>Myrmecia</i> cf. <i>biatorellae</i> Petersen	<i>Myrmecia</i> sp.	The group was determined as a separate lineage, but not revised in details.	Neustupa <i>et al.</i> , 2011
Us-7-5	<i>Nostoc</i> cf. <i>linckia</i> Bornet ex Bornet & Flahault	<i>Nostoc</i> sp.	Despite a lot of papers describing new species, the structure of the genus and species concept are not resolved. Perhaps close to our strain Us-2-2, but morphologically different.	Miscoe <i>et al.</i> , 2016; Hrouzek <i>et al.</i> , 2013; Singh <i>et al.</i> , 2016
Us-1-4 Ru-0-3	<i>Hassalia</i> sp. <i>Tolypothrix</i> cf. <i>tenuis</i> Kützing ex Bornet & Flahault	<i>Hassalia</i> sp. <i>Tolypothrix</i> sp.	The group is not revised in general, but some taxa were described	Flechtner <i>et al.</i> , 2002; Hauer <i>et al.</i> , 2014; Hentschke <i>et al.</i> , 2016
Correct morphological identification to the genus level only				
Ru-s-4-5 Us-s-7-3	<i>Bracteacoccus</i> cf. <i>minor</i> (Schmidle ex Chodat) Petrová	<i>Bracteacoccus aggregatus</i> Tereg	The SSU rRNA and ITS-2 sequences of original strains are close to authentic strain of <i>B. aggregatus</i> (G2-3=UTEX B 2972).	Fučíková <i>et al.</i> , 2012

(Continued)

Table 1. (Continued).

Strain	Morphospecies, published in Schulz <i>et al.</i> , 2016	Species after phylogenetic revision	Remarks on species identification	Taxonomic revisions, references
Ru-6-8	<i>Chloromonas cf. reticulata</i> (Goroschankin) Gobi	<i>Chloromonas</i> sp.	The species was originally identified as <i>Ch. chlorococcoides</i> Ettl & Schwarz (synonym of <i>Ch. reticulata</i> (Pröschold <i>et al.</i> , 2001)), but it is phylogenetically distant from both species.	Pröschold <i>et al.</i> , 2001; Matsuzaki <i>et al.</i> , 2012, 2013
Ru-6-11 Us-2-1	<i>Nodosilinea</i> sp.	<i>Nodosilinea</i> cf. <i>epilithica</i> Perkerson & Casamatta	Our isolates are close to authentic strain of <i>N. epilithica</i> (Kovacic 1990/52). But revision of the genus is incomplete, perhaps includes more species.	Perkerson <i>et al.</i> , 2011
Ru-10-1	<i>Klebsormidium flaccidum</i>	<i>Klebsormidium fluitans</i> (F.Gay) Lokhorst	Our isolate is close to authentic strain of <i>K. fluitans</i> (SAG 9.96).	Rindi <i>et al.</i> , 2011; Mikhailyuk <i>et al.</i> , 2015
Ru-10-2 Ru-10-3	<i>Klebsormidium</i> cf. <i>subtile</i> (Kützing) Mikhailyuk, Glaser, Holzinger & Karsten	<i>Klebsormidium</i> sp.	Our isolates form a separate clade distant from authentic strain of <i>K. subtile</i> (SAG 384-1).	
Us-4-2	<i>Klebsormidium crenulatum</i>	<i>Klebsormidium mucosum</i> (Petersen) Lokhorst	Our isolate is close to authentic strain of <i>K. mucosum</i> (SAG 8.96).	
Ru-6-6	<i>Chloroidium ellipsoideum</i> (Gerneck) Darienko, Gustavs, Mudimu, Menendez, Schumann, Karsten, Friedl & Proschold	<i>Chloroidium</i> sp.	The SSU rRNA and ITS-1,2 sequences of original strain are quite close to authentic strains of <i>Ch. ellipsoideum</i> (SAG 3.95) and <i>Ch. angustellipsoideum</i> (Hanagata & Chihara) Darienko, Gustavs, Mudimu, Menendez, Schumann, Karsten, Friedl & Proschold (SAG 2115), but represented a separate lineage.	Darienko <i>et al.</i> , 2010
Ru-6-2	<i>Tetradesmus obliquus</i> (Turpin) Wynne (= <i>Acutodesmus obliquus</i> (Turpin) E. Hegewald & Hanagata)	<i>Tetradesmus arenicola</i> sp. nov.	The SSU rRNA and ITS-2 sequences of original strain and four other strains isolated from BSC of Germany and Ukraine are close to authentic strain of <i>Acutodesmus bajacalifornicus</i> (L. A. Lewis & Flechtner) E. Hegewald, Bock & Krienitz (BCP-LG2-VF16), but represented a separate lineage. This alga was described here as a new species (see below).	Hegewald & Wolf, 2003; Lewis & Flechtner, 2004; Sciuto <i>et al.</i> , 2015
Incorrect morphological identifications for both genus and species levels				
Ru-6-13	<i>Bracteacoccus</i> sp.	<i>Pseudomuriella aurantiaca</i> (Vischer) Hanagata	The SSU rRNA and ITS-1,2 sequences of original strain are close to authentic strain of <i>P. aurantiaca</i> (SAG 249-1, CCAP 249/1).	Fučíková <i>et al.</i> , 2011
Ru-s-4-2	<i>Stichococcus bacillaris</i> Nägeli	<i>Pseudostichococcus</i> cf. <i>monallantoides</i> Moewus	The SSU rRNA sequence of the original strain is close to authentic strain of <i>Pseudostichococcus monallantoides</i> (SAG 380-1), but ITS-1,2 sequences of both strains are essentially different, the strains are different ecologically as well.	Moewus, 1951; Hodač <i>et al.</i> , 2016
Ru-1-5	<i>Pseudophormidium hollerbachianum</i> (Elenkin) Anagnostidis (= <i>Plectonema boryanum</i> Gomont f. <i>hollerbachianum</i> Elenkin)	<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>boryana</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek	The group was determined as a separate lineage and distinguished as <i>Leptolyngbya sensu stricto</i> , but not revised in details.	Osorio-Santos <i>et al.</i> , 2014
Ru-0-2	<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>notata</i> (Schmidle) Anagnostidis & Komárek	<i>Stenomitos</i> sp.	The group was revised, but without clear determination on species level, phylogenetic position was determined for <i>S. rutilans</i> Miscoe & Johansen only.	Miscoe <i>et al.</i> , 2016
Us-6-3	<i>Leptolyngbya edaphica</i> (Elenkin) Anagnostidis & Komárek (= <i>Plectonema edaphicum</i> (Elenkin) Vaul.	<i>Timaviella</i> sp.	The genus with two species was recently described, but our isolate perhaps represents a separate species	Sciuto <i>et al.</i> , 2017
Us-6-4 Us-1-3	<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>henningsii</i> (Lemmermann) Anagnostidis	<i>Phormidesmis</i> sp.	Incomplete revision, described species <i>Phormidesmis priestleyi</i> (Fritsch) Komárek, Kaštovský, Ventura, Turicchia & Šmarda is polyphyletic, species concept of the group was not proposed.	Komárek <i>et al.</i> , 2009; Osorio-Santos <i>et al.</i> , 2014

(Continued)

Table 1. (Continued).

Strain	Morphospecies, published in Schulz <i>et al.</i> , 2016	Species after phylogenetic revision	Remarks on species identification	Taxonomic revisions, references
Us-1-1 Us-7-3	<i>Trichocoleus</i> sp.	' <i>Microcoleus</i> ' sp.	Our isolates are morphologically similar to <i>Trichocoleus sociatus</i> (West & G.S. West) Anagnostidis strain (SAG 26.92), but reference strains of <i>Trichocoleus</i> Anagnostidis are in Synechococcales. Our isolates and SAG 26.92 should be identified as ' <i>Microcoleus</i> ' species.	Mühlsteinová <i>et al.</i> , 2014
Ru-6-10	<i>Monoraphidium</i> cf. <i>pusillum</i> (Printz) Komárková-Legnorová	<i>Chlorolobion</i> sp.	The SSU rRNA sequence of original strain fell into group defined as genus <i>Chlorolobion</i> Korshikov. The taxonomy of the whole Selenastraceae is still not revised.	Garcia da Silva <i>et al.</i> , 2017
Ru-1-8	<i>Graesiella emersonii</i> (Shihara & Krauss) Nozaki, Katagiri, Nakagawa, Aizawa & Watanabe	<i>Coelastrella aroterrestrica</i> Tschaike, Gärtner & Kofler	The SSU rRNA and ITS-1,2 sequences of original strain are close to authentic strain of <i>C. aroterrestrica</i> (SWK-1_2). On the other hand sequences of several strains of <i>Chlorella emersonii</i> Shihara & Krauss are close to the original strain as well. The group needs further revision.	Tschaike <i>et al.</i> , 2008; Kaufnerová & Eliáš, 2013
Us-s-7-5	<i>Pseudochlorella</i> sp.	<i>Eremochloris sphaerica</i> Fucíková, P.O. Lewis & L.A. Lewis	The SSU rRNA and ITS-2 sequences of original strain are close to authentic strain of <i>E. sphaerica</i> (BCP-MX 219VF22=UTEX B 2994). Both strains have similar, quite prominent morphology which was not shown in original paper.	Fučíková <i>et al.</i> , 2014b
Ru-s-3-2	<i>Neochloris</i> cf. <i>gelatinosa</i> Herndon	<i>Desmochloris</i> cf. <i>halophila</i> (Guillard, Bold & Mc Entee) Watanabe, Kuroda & Maiwa	The SSU rRNA and ITS-1,2 sequences of original strain are close to authentic strain of <i>D. halophila</i> (CCAP 6006/1), but represented a separate lineage. This alga might be described as a new species, but it seems that group is more diverse (another close strain SAG 2397 was found) and more strains are necessary for final decision.	Darienko <i>et al.</i> , 2009

Microcoleus Desmazières *ex* Gomont, and an undescribed '*Microcoleus*'-like lineage, which represents a separate genus (Fig. 1). Original strains of Synechococcales were distributed among clades formed by the genera *Leptolyngbya* Anagnostidis & Komárek, *Phormidesmis* Turicchia, Ventura, Komárková & Komárek, *Stenomitos* Miscoe & Johansen, *Timaviella* Sciuto & Moro and *Nodosilinea* Perkerson & Casamatta (Fig. 1). Strains of the Nostocales were included in clades corresponding to the genus *Nostoc* Vaucher *ex* Bornet & Flahault and to the family Tolypothrichaceae (identified as species of *Tolypothrix* Kützing *ex* Bornet & Flahault and *Hassallia* Berkeley *ex* Bornet & Flahault) (Supplementary fig. S1).

Chlorophyceae strains were distributed among clades of the Volvocales: Reinhardtinia (genera '*Tetracystis*' and *Heterochlamydomonas*), Oogamochlamydia (*Lobochlamys* Pröschold, Marin, Schlösser & Melkonian), Chloromonadinia (*Chloromonas* Gobi), Moewusinia (*Actinochloris* Korshikov), Stephanosphaerina (*Chlorococcum* Meneghini), Crucicarteria ('*Carteria*'); and Sphaeropleales: *Bracteacoccus* Tereg, Radiococcaeae

sensu Fučíková *et al.* (2014a) ('*Spongiochloris*'), *Pseudomuriella* Hanagata, Selenastraceae (*Chlorolobion* Korshikov), *Coelastrella* Chodat, *Tetrademus* Smith (Figs 2, 3). Trebouxiophyceae strains were distributed among clades of *Diplosphaera/Stichococcus* (identified as *Diplosphaera* Bialosuknia), and the genera *Pseudostichococcus* Moewus, *Chlorella* Beyerinck, *Myrmecia* Printz, *Xerochlorella* Fucíková, P.O. Lewis & L.A. Lewis, *Chloroidium* Nadson, *Eremochloris* Fucíková, P.O. Lewis & L.A. Lewis, and *Elliptochloris* Tschermak-Woess (Fig. 4). One original strain of Ulvophyceae clustered in a clade formed by the genus *Desmochloris* Watanabe, Kuroda & Maiwa (Supplementary fig. S2). Strains of cyanobacteria and green algae were redefined, after phylogenetic analyses, as species of the genera mentioned (see Table 1).

Two strains from the public collection: SAG 68.81 *Chlamydomonas callunae* and SAG 23.93 *Actinochloris sphaerica* were analysed for comparison with our isolates. These strains were clustered in the clades Reinhardtinia and Moewusinia (Volvocales, Chlorophyceae), respectively, close to our isolates Us-1-5 and Ru-s-3-4.

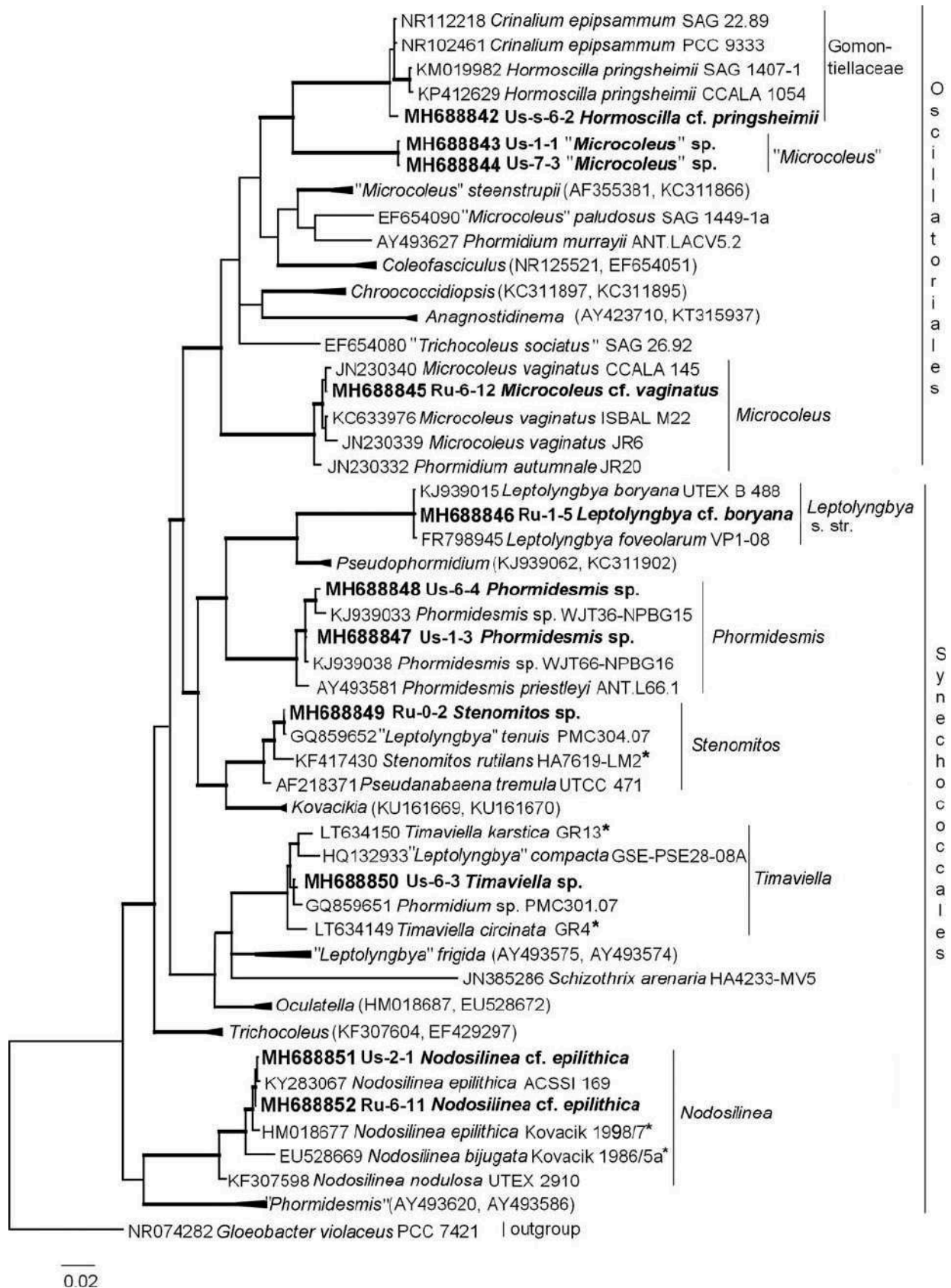


Fig. 1. Molecular phylogeny of Synechococcales and Oscillatoriales based on SSU rRNA sequence comparisons. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP); bold branches are supported in both analyses (Bayesian values > 0.9 and bootstrap values > 60%). Strains in bold represent newly sequenced cyanobacteria, strains marked with an asterisk are authentic. Clade designations follow Osorio-Santos *et al.* (2014), Miscoe *et al.* (2016), Patzelt *et al.* (2014), Bohunická *et al.* (2015), and Strunecký *et al.* (2013).

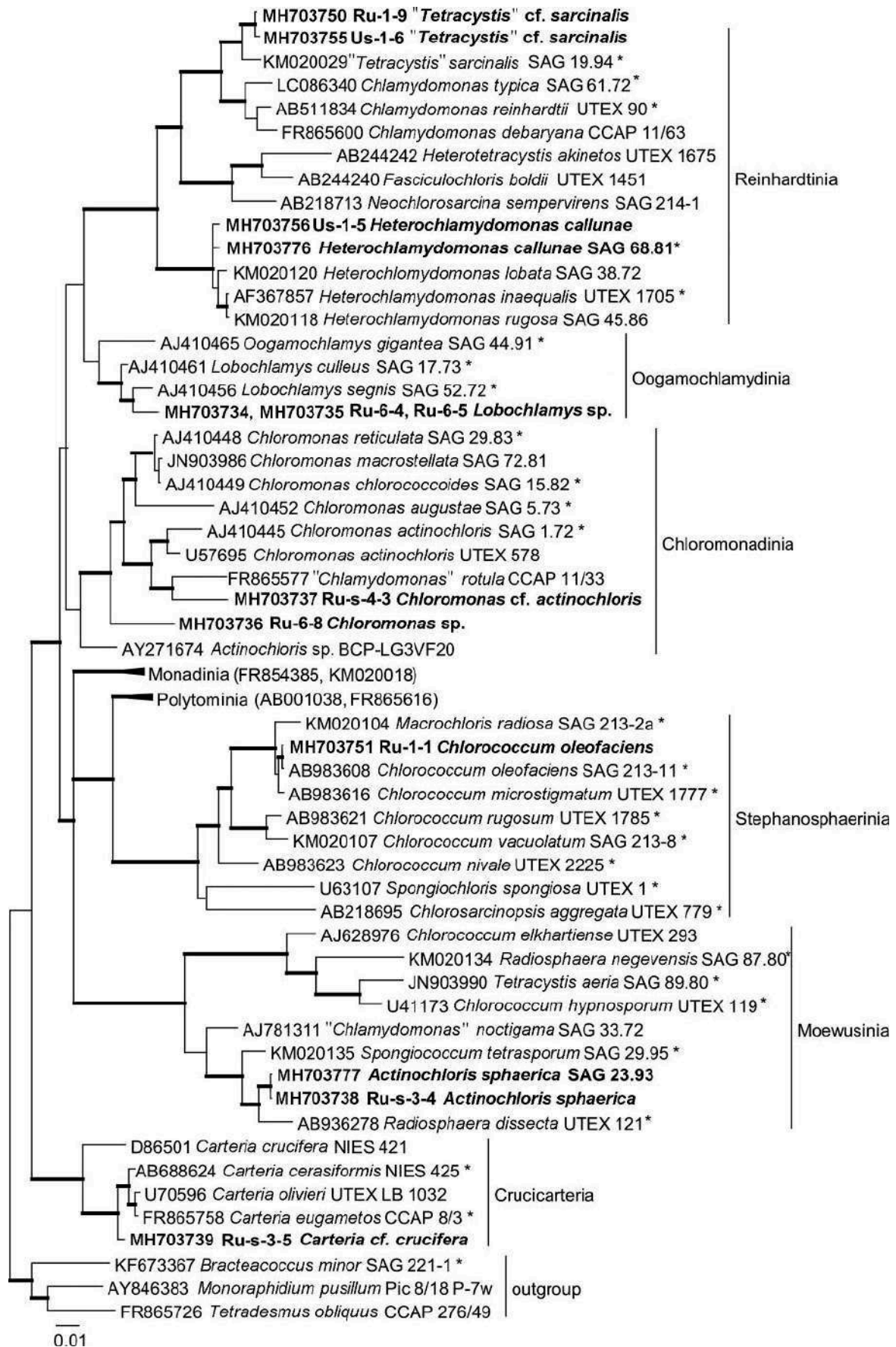


Fig. 2. Molecular phylogeny of Volvocales based on SSU rRNA sequence comparisons. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP); bold branches are supported in both analyses (Bayesian values > 0.9 and bootstrap values > 60%). Strains in bold represent newly sequenced algae, strains marked with an asterisk are authentic. Clade designations follow Nakada *et al.* (2008).

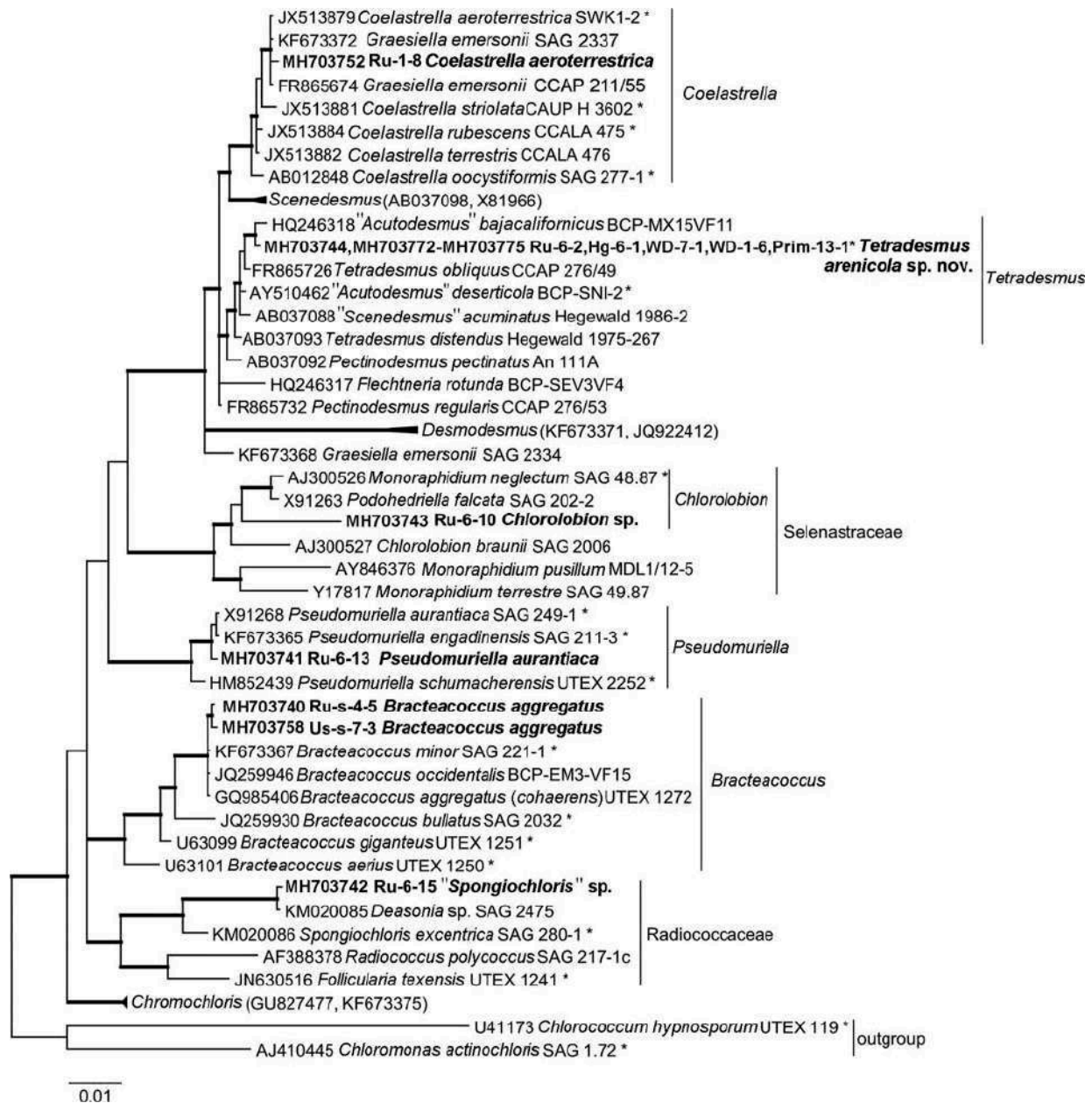


Fig. 3. Molecular phylogeny of Sphaeropleales based on SSU rRNA sequence comparisons. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP); bold branches are supported in both analyses (Bayesian values > 0.9 and bootstrap values > 60%). Strains in bold represent newly sequenced algae, strains marked with an asterisk are authentic. Clade designations follow Fučíková *et al.* (2014a) and Sciuto *et al.* (2015).

ITS phylogeny and ITS-2 secondary structure

The ITS sequences were included in deeper phylogenetic analyses using the ITS secondary structures. These analyses were provided mostly for genera with recent taxonomic revisions based on phylogenetic data, and defined phylogenetic relationships: *Nodosilinea* and *Timaviella* (Sinechococcales), *Chlorococcum*, *Bracteacoccus*, *Pseudomuriella*, *Coelastrella*, *Tetradesmus* (Chlorophyceae), *Chlorella*, *Chloroidium* (Trebouxiophyceae), *Desmochloris* (Ulvophyceae) and *Klebsormidium* Silva, Mattox &

Blackwell (Klebsormidiophyceae) (Figs 5–8, Supplementary figs S3–S9). Several of the strains investigated were assigned to clades formed by known, well-defined species: *Nodosilinea epilithica* (Authors of species are provided in Table 1) (Supplementary fig. S3), *Chlorococcum oleofaciens* (Fig. 5), *Bracteacoccus aggregatus* (Supplementary fig. S7), *Pseudomuriella aurantiaca* (Supplementary fig. S5), *Coelastrella aeroterrestica* (Supplementary fig. S6), and *Chlorella vulgaris* (Supplementary fig. S8). Other strains formed separate lineages within *Tetradesmus* (the closest species was *Acutodesmus*

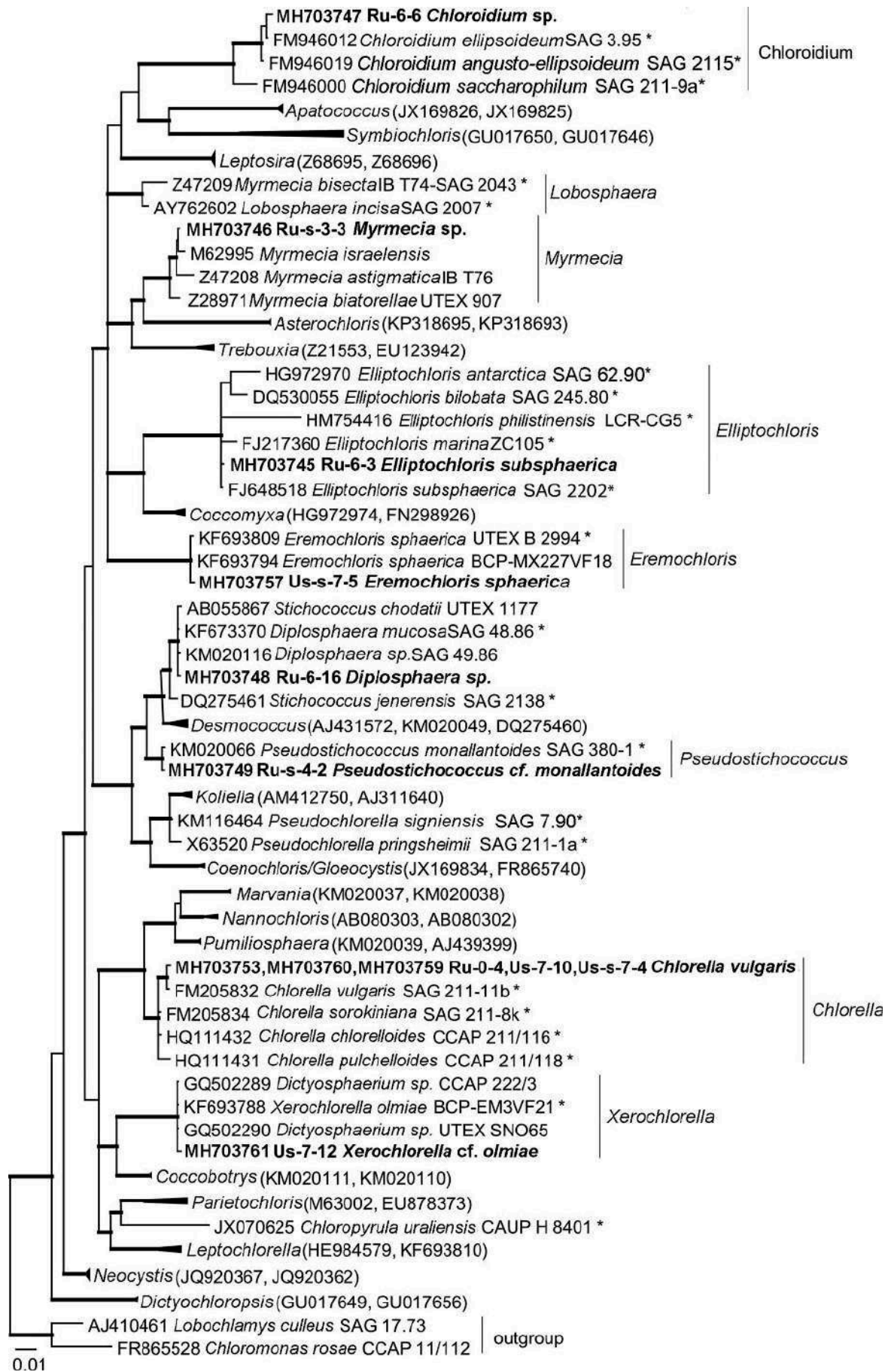
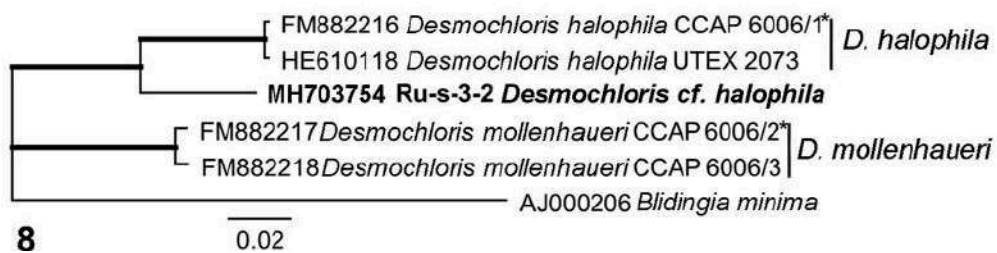
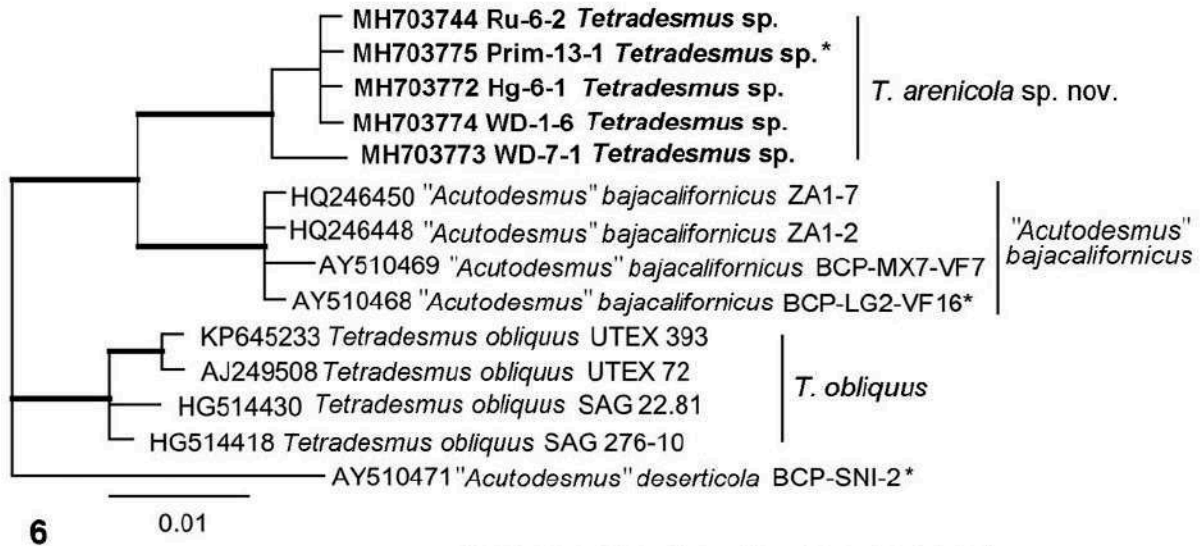
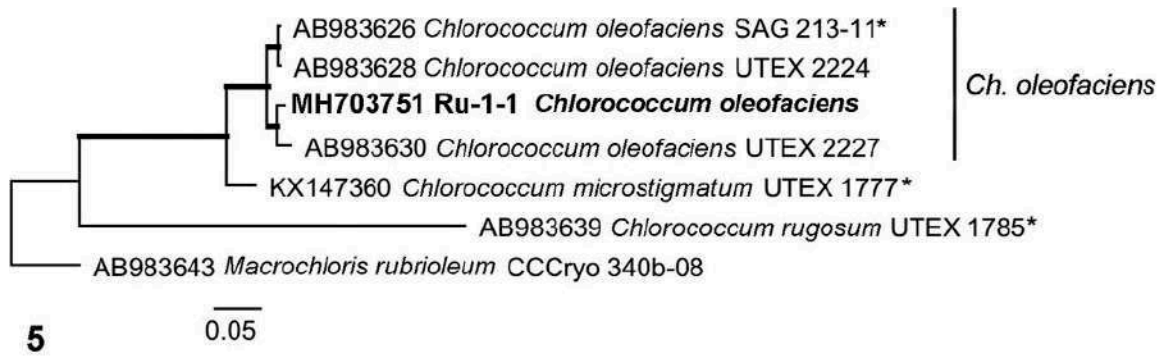


Fig. 4. Molecular phylogeny of Trebouxiophyceae based on SSU rRNA sequence comparisons. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP); bold branches are supported in both analyses (Bayesian values > 0.9 and bootstrap values > 60%). Strains in bold represent newly sequenced algae, strains marked with an asterisk are authentic. Clade designations follow Fučíková *et al.* (2014b), Hodač *et al.* (2015), and Darienko *et al.* (2016).



Figs 5–8. Molecular phylogeny of: **Fig. 5.** *Chlorococcum* (Chlorophyceae), **Fig. 6.** *Tetradesmus*, **Fig. 7.** *Chloroidium* (Trebouxiophyceae) and **Fig. 8.** *Desmochloris* (Ulvophyceae) based on ITS-1,2 or ITS-2 (*Tetradesmus*) rRNA sequence comparisons. Phylogenetic trees were inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP); bold branches are supported in both analyses (Bayesian values > 0.9 and bootstrap values > 60%). Strains in bold represent newly sequenced algae, strains marked with an asterisk are authentic.

(*Tetradesmus*) *bajacalifornicus*, Fig. 6), *Chloroidium* (the closest species were *Ch. ellipsoideum* and *Ch. angusto-ellipsoideum*, Fig. 7), and *Desmochloris* (the closest species was *D. halophila*, Fig. 8).

Ten strains of *Klebsormidium* were distributed among three main lineages: clades C, F and E (Supplementary fig. S9). Seven strains could be assigned to clades formed by known species, and were

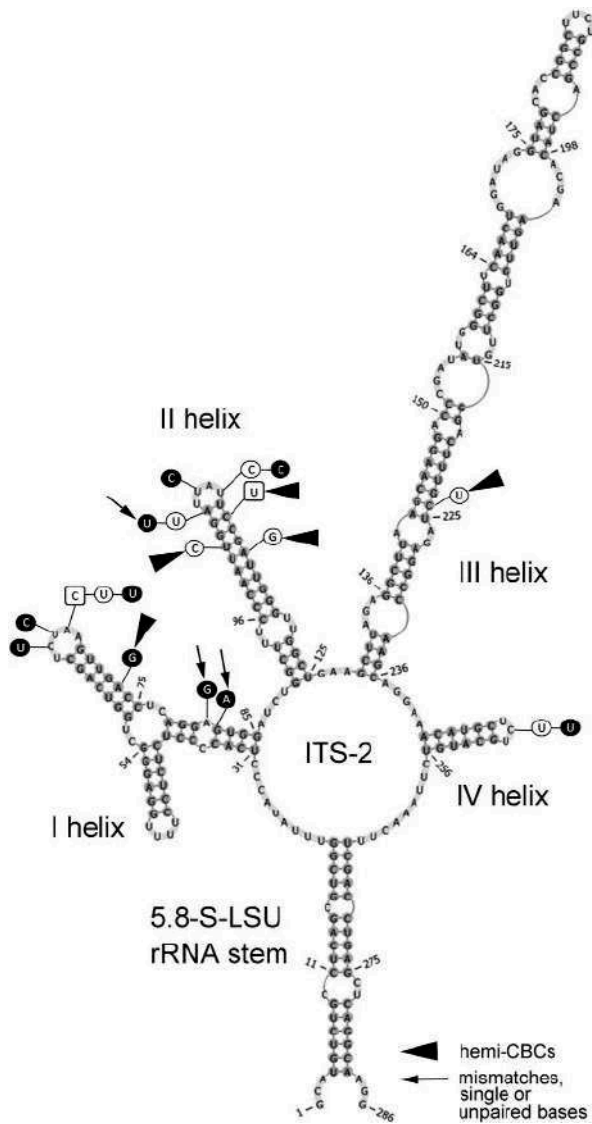


Fig. 9. ITS-2 secondary structure of the investigated strains of *Tetradesmus*. The structure of *T. arenicola* is presented, with the differences from the closely related species *T. bajacalifornicus*, BCP-LG2-VF-16 (white circles) and *T. obliquus*, UTEX 72 (black circles). Variation between different strains of *T. arenicola* is shown with white squares.

therefore identified as follows: *Klebsormidium flaccidum*, *K. crenulatum*, *K. mucosum* and *K. fluitans*. Other strains were included in lineages with an unknown species designation (*Klebsormidium* sp. in clade E) or formed lineages close to known taxa (*Klebsormidium* cf. *nitens* in clade E).

The ITS-2 sequence of *Tetradesmus* strain Ru-6-2 was compared with several other related strains isolated from BSCs of German and Ukrainian sand dunes. All these isolates together formed a separate clade (Fig. 6). The ITS-2 sequences of all analysed strains were identical with the exception of WD-7-1 which differed by two base pairs. ITS-2 secondary structure of these *Tetradesmus* isolates differed from the authentic strain of the phylogenetically

closely related species *A. bajacalifornicus* (BCP-LG2-VF-16) by three hCBCs (compensatory base changes), one mismatch and three differences in loops, as well as from the morphologically similar species *T. obliquus* (UTEX 72) by one hCBCs, three mismatches, single or unpaired bases and six differences in loops (Fig. 9).

For precise identification of the recently described *Eremochloris sphaerica*, an authentic strain of this species (UTEXB 2994) was investigated and a model of the ITS-2 secondary structure is presented (Fig. 10). The ITS-2 of the isolate Us-s-7-5 differed from the authentic strain in several mismatches, deletions of base pairs, and two hCBCs.

Morphological identification

Morphological observations on the strains studied are presented in Figs 11–61 and Supplementary figs S10–S38. Of the 53 strains investigated, 25 were unambiguously identified to the species level: *Leptolyngbya edaphica*, *Pseudophormidium hollerbachianum* (= *Plectonema boryanum* f. *hollerbachianum*), *Hormoscilla pringsheimii*, *Microcoleus vaginatus*, *Chloromonas actinochloris*, *Tetracystis sarcinalis*, *Actinochloris sphaerica*, *Graesiella emersonii*, *Tetradesmus obliquus* (= *Acutodesmus obliquus*), *Stichococcus bacillaris*, *Diplospira chodatii*, *Elliptochloris subsphaerica*, *Chloroidium ellipsoideum*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella chlorelloides* (= *Dictyosphaerium chlorelloides*), *Klebsormidium flaccidum* and *K. crenulatum*. The morphological characters of these strains corresponded completely to the descriptions of the respective taxa (Kondratyeva, 1968; Lokhorst, 1996; Komárek & Anagnostidis, 2005; Komárek, 2013; Ettl & Gärtner, 2014). Identification of the rare alga *Actinochloris sphaerica* was confirmed by comparison with another strain of this species, SAG 23.93 (Figs 28–33). *Chlorella chlorelloides* was initially identified as *Dictyosphaerium chlorelloides* and is characterized by a prominent *Dictyosphaerium*-like morphology, due to remnants of mother-cell walls and the pyrenoid consisting of several starch grains (Figs 56, 57).

Nineteen strains were tentatively identified, although with some uncertainty, mainly because of unclear morphological characters of the respective taxa: *Leptolyngbya* cf. *notata*, *Leptolyngbya* cf. *henningsii*, *Nostoc* cf. *edaphicum*, *Nostoc* cf. *linckia*, *Tolypothrix* cf. *tenuis*, *Chlamydomonas* cf. *callunae*, *Chloromonas* cf. *reticulata* (= *Chlamydomonas* cf. *chlorococcoides*), *Chlorococcum* cf. *oleofaciens*, *Spongiochloris* cf. *minor*, *Neochloris* cf. *gelatinosa*, *Monoraphidium* cf. *pusillum*, *Bracteacoccus* cf. *minor*, *Myrmecia* cf. *biatorellae*, *Klebsormidium* cf. *nitens* and *Klebsormidium* cf. *subtile*. A rare and morphologically distinct strain identified as *Carteria* cf. *crucifera* (Figs 34, 35) was, however, ecologically different from the respective species (Ettl, 1983). The

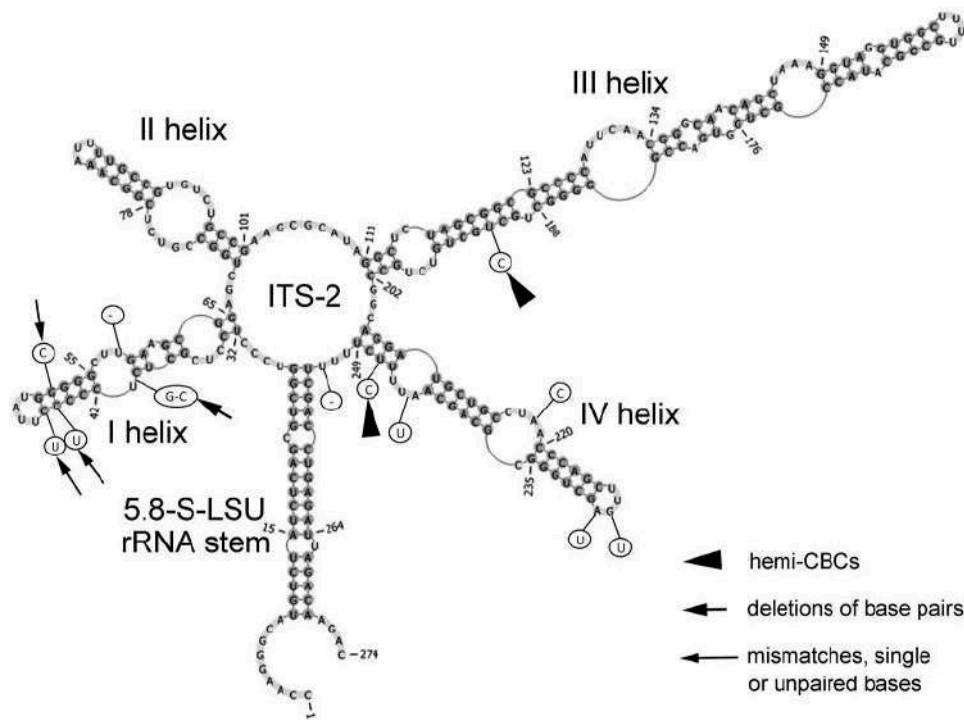


Fig. 10. ITS-2 secondary structure of investigated strains of *Eremochloris*. The structure of *E. sphaerica* (Us-s-7-5) is presented, with the differences from the authentic strain UTEX B 2994 (MH703778, white circles).

identification of *Chlamydomonas* cf. *callunae* was confirmed by comparison with the authentic strain of this species, SAG 68.81 (Figs 16–19).

Nine strains were identified only to genus level because of a lack of distinct morphological characters for species identification (*Nodosilinea* sp., *Hassalia* sp. and *Bracteacoccus* sp.) or morphological inconsistency with known species (*Trichocoleus* sp., *Lobochlamys* sp. and *Pseudochlorella* sp.). This last species was compared with an authentic strain of the recently described, phylogenetically close species *Eremochloris sphaerica*, UTEXB 2994 (Figs 53–55), and showed close morphological similarity to this representative.

Discussion

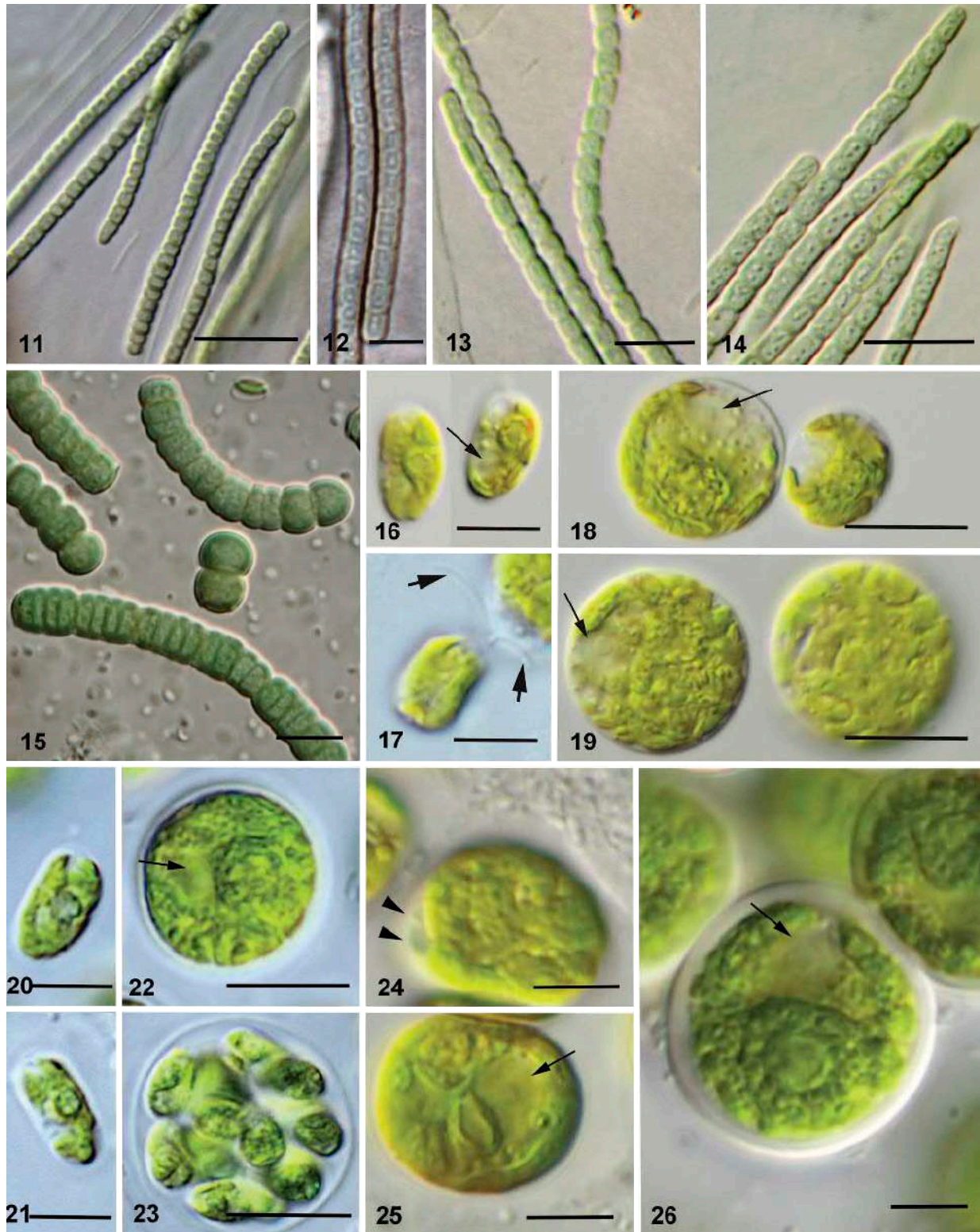
Comparison of morphological versus phylogenetic markers

Phylogenetic analyses of SSU rRNA sequences deal mostly with the phylogeny of cyanobacteria and green and streptophyte algae, as in the studies of Nakada *et al.* (2008), Rindi *et al.* (2011), Fučíková *et al.* (2014a, 2014b), Hauer *et al.* (2014), Osorio-Santos *et al.* (2014), Bohunická *et al.* (2015), Hodač *et al.* (2015), Sciuto *et al.* (2015) and Darienko *et al.* (2016, 2017). Table 1 summarizes the data used for comparison of morphological identification of the respective BSC strains with phylogenetic data. Some notes on final identifications and on taxonomic

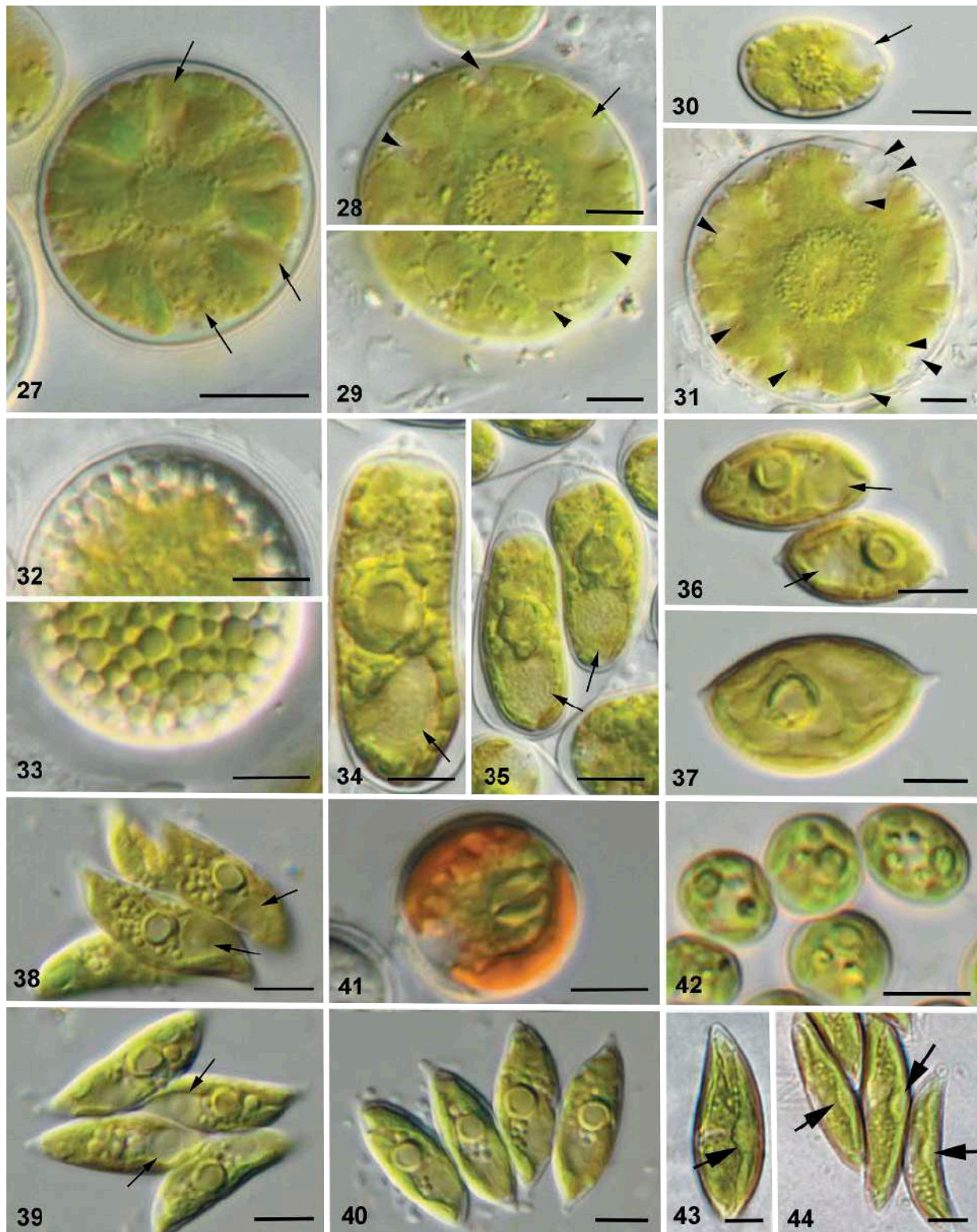
revisions based on this integrative approach are provided as well.

The data obtained during the comparisons are divided into several groups. The first group includes the results with complete coincidence of morphological and molecular identification to species level. These results were obtained exclusively for genera with recent taxonomic revisions, resolved phylogenetic relationships within genera, clear species concepts, and mostly using ITS phylogenies: *Chlorococcum oleofaciens* (Figs 2, 5), *Chlorella vulgaris* (Figs 4, Supplementary fig. S8), *Klebsormidium flaccidum*, and *K. crenulatum* (Supplementary fig. S9). The identification of *Elliptochloris subsphaerica* was confirmed using the SSU rRNA data (Fig. 4), because of the absence of the ITS region in the original sequence. However, the resolution based on SSU rRNA sequences is high in the genus *Elliptochloris*, and some conserved regions of this gene are reported as suitable for species identification (Darienko *et al.*, 2016).

Strain Us-1-5 was identified as *Chlamydomonas callunae* and clustered in the clade of *Heterochlamydomonas* Cox & Deason (Reinhardtina, Fig. 2). Morphological characters of *C. callunae* showed that it should be transferred to *Heterochlamydomonas* (Ettl, 1976, 1983), and hence our morphological identification was generally correct. We compared our isolate with the authentic strain of *Chlamydomonas callunae* SAG 68.81 and found that they were close phylogenetically and morphologically (Figs 2, 16–23). Therefore, we



Figs 11–26. Micrographs of strains of cyanobacteria and green algae. **Fig. 11.** Us-1-3 *Phormidesmis* sp. **Fig. 12.** Us-6-3 *Timaviella* sp. **Fig. 13.** Ru-6-11 *Nodosilinea* cf. *epilithica*. **Fig. 14.** Us-1-1 '*Microcoleus*' sp. **Fig. 15.** Us-s-6-2 *Hormoscilla* cf. *pringsheimii*. **Figs 16–23.** *Heterochlamydomonas callunae*: SAG 68.81 (Figs 16–19) and Us-1-5 (Figs 20–23): flagellated cells (zoospores), uneven flagella indicated (Figs 16, 17, 20, 21), adult vegetative cells (Figs 18, 19, 22), large vegetative cells with dissected chloroplast in optical section (left) and in surface view (right) (Fig. 19), zoosporangium (Fig. 23). **Figs 24, 25.** Ru-1-9 '*Tetracystis*' cf. *sarcinalis*: surface view (Fig. 24), optical section (Fig. 25). **Fig. 26.** Ru-1-1 *Chlorococcum oleofaciens*. Arrows indicate nuclei, large arrows indicate flagella, arrowheads indicate contractile vacuoles. Scale bars: Figs 11, 14, 15, 18, 19, 22, 23, 10 μm ; Figs 12, 13, 16, 17, 20, 21, 24–26, 5 μm .

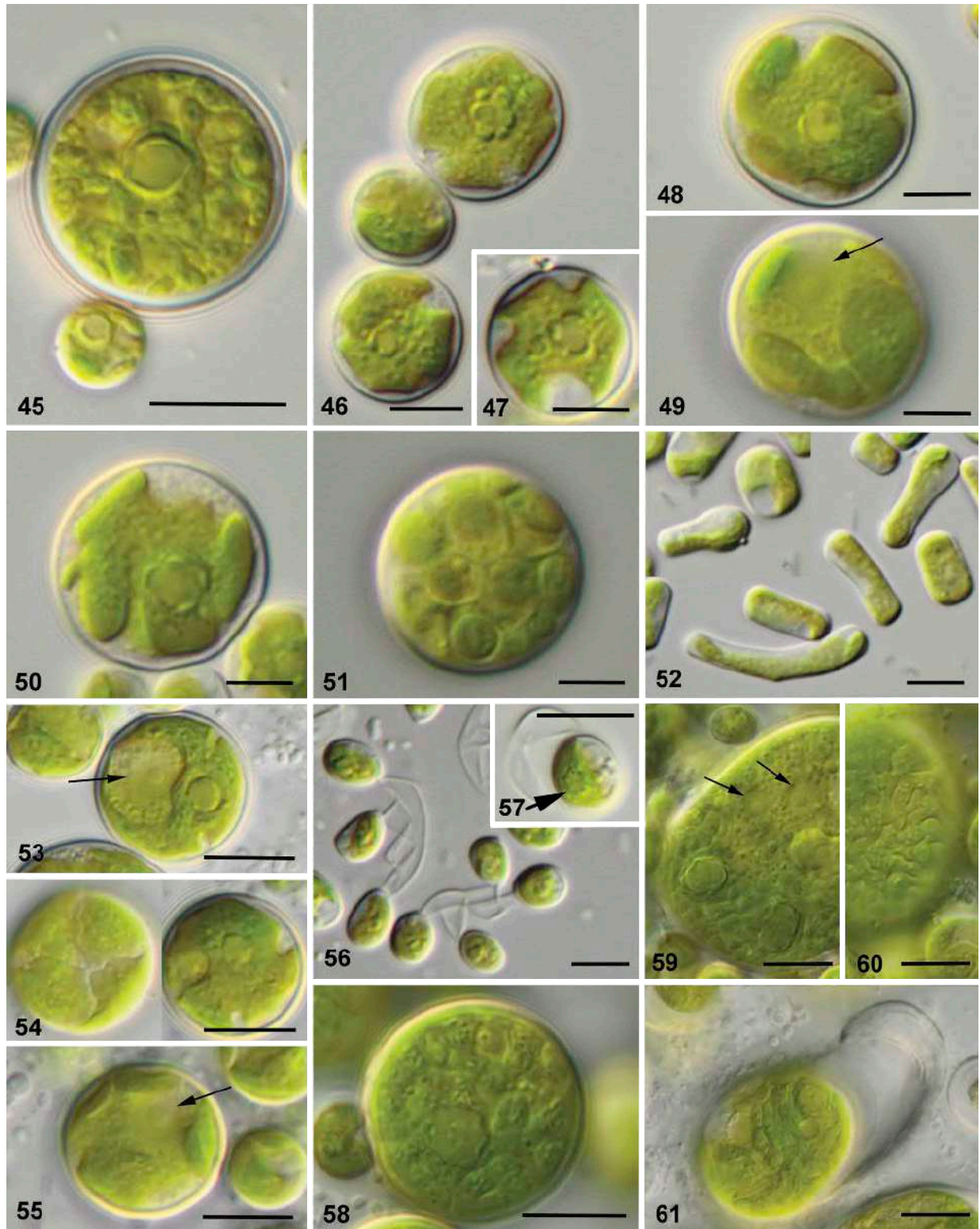


Figs 27–44. Micrographs of strains of green algae. **Figs 27–33.** *Actinochloris sphaerica*: Ru-s-3-4 (Fig. 27) and SAG 23.93 (Fig. 28–33): optical section (Figs 28, 32), surface view (Figs 29, 33), young cell originated from zoospore (Fig. 30), akinete (Figs 32, 33). **Figs 34, 35.** Ru-s-3-5 ‘*Carteria*’ cf. *crucifera*. **Figs 36–41.** *Tetrademus arenicola* sp. nov.: Prim-13-1 (Figs 36–38, 41) and WD-7-1 (Figs 39, 40): old cell with carotenoids (Fig. 41). **Fig. 42.** Ru-1-8 *Coelastrella aeroterrestica*. **Figs 43, 44.** Ru-6-10 *Chlorolobion* sp. Thin arrows indicate nuclei, thick arrows indicate pyrenoids, arrowheads indicate contractile vacuoles. Scale bars: Fig. 27, 10 μm ; Figs 28–44, 5 μm .

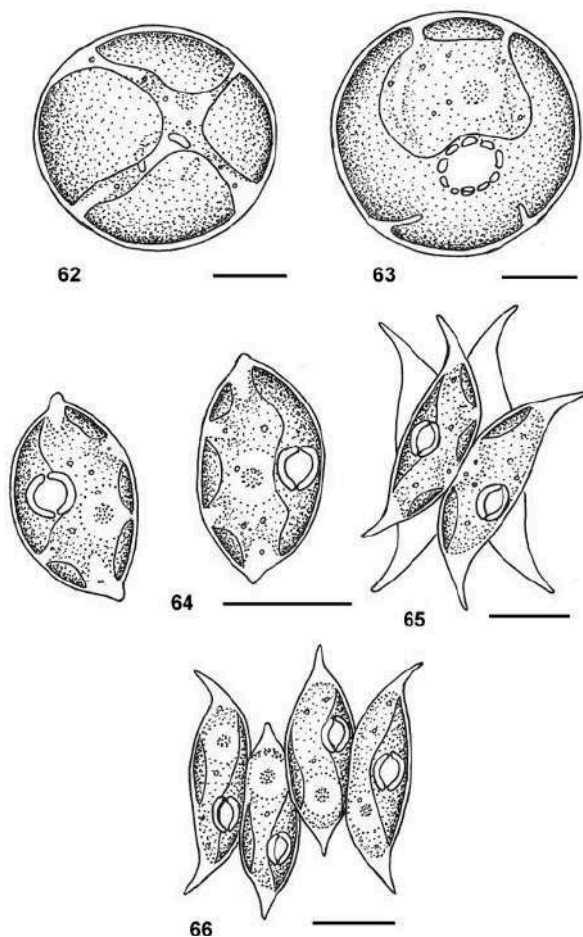
propose to transfer *Chlamydomonas callunae* to *Heterochlamydomonas* (see below).

Identification of *Actinochloris sphaerica* represents a special case, because a revision of the genus based

on phylogenetic data is still lacking. Available data on *Actinochloris* sp. isolated from a desert BSC in North America are given by Flechtner *et al.* (2013). This strain has an *Actinochloris*-like morphology, but clustered in



Figs 45–61. Micrographs of strains of green algae. **Fig. 45.** Ru-6-15 '*Spongiochloris*' sp. **Figs 46–55.** *Eremochloris sphaerica*: Us-s-7-5 (Figs 46–51) and UTEX B 2994 (Figs 53–55): young cells (Figs 46, 47); optical section (Fig. 48); surface view (Fig. 49); sporangium (Fig. 51), surface view (left, narrow spaces between chloroplast lobes are visible) and optical section (right) of the same cell (Fig. 54); surface view of cell with shorter chloroplast lobes (Fig. 55). **Fig. 52.** Ru-s-4-2 *Pseudostichococcus* cf. *monallantoides*. **Figs 56, 57.** Us-7-12 *Xerochlorella* cf. *olmiae*. **Figs 58–61.** Ru-s-3-2 *Desmochloris* cf. *halophila*: optical section (Fig. 59), surface view (Fig. 60), old cell with *Hormotila*-like mucilage outgrowth (Fig. 61). Thin arrows indicate nuclei, thick arrows indicate pyrenoids. Scale bars: 45, 53–55, 58–61, 10 μ m, 46–52, 56, 57, 5 μ m.



Figs 62–66. Drawings of interesting green algae. **Figs 62, 63.** *Eremochloris sphaerica*, UTEX B 2994: cells in surface view (Fig. 62) and in optical section (Fig. 63). **Figs 64–66.** Proposed new species *Tetradesmus arenicola*, Prim-13-1: lemon-shaped single cells (Fig. 64), cenobia (Figs 65, 66). Scale bars: 10 μm .

the clade Chloromonadina, Chlorophyceae (see Fig. 2). The isolate of the present study, together with the publicly available strain SAG 23.93, are representatives of the sister chlorophycean clade Moewusinia. Both SAG 23.93 and the new isolate Ru-s-3-4 showed identical SSU rRNA and similar ITS-1,2 sequences (which differed by only four nucleotides), and they also corresponded morphologically to the original description of *Actinochloris sphaerica* (Korshikov, 1953). SAG 23.93 and Ru-s-3-4 form a sister lineage to the authentic strain of *Radiosphaera dissecta* (*Macrochloris dissecta*) UTEX 121 (Fig. 2). This latter species was proposed as a synonym of *Actinochloris sphaerica* or a species close to *Actinochloris terrestris* (Ettl & Gärtner, 2014). It is obvious that all these taxa are closely related; however, Korshikov (1953) mentioned that they differ in the pyrenoid morphology and the presence/absence of multiple peripheral contractile vacuoles. The phylogeny developed in the present study indicated that the strains of *Actinochloris* Korshikov represent, at least, different

species (Fig. 2). An authentic strain of *Actinochloris sphaerica* was not proposed by Korshikov (1953); therefore, we propose strain SAG 23.93 as the epitype of this species, as a step toward improving the taxonomy of terrestrial green algae (see below).

The second group of data represented coincidence of morphological and molecular identification to the group of closely related species, because the original sequences formed sister lineages to authentic strains of the following species: *Chloromonas* cf. *actinochloris* (SSU rRNA phylogeny, Fig. 2) and *Klebsormidium* cf. *nitens* (ITS-1,2 phylogeny, Supplementary fig. S9). Isolates of cyanobacteria from the Homontiellaceae, *Hormoscilla* cf. *pringsheimii* (Fig. 1) and of the chlorophycean alga ‘*Carteria*’ cf. *crucifera* (Fig. 2) could not be unambiguously identified to species level because of the lack of detailed taxonomic revisions using phylogenetic data, such as for the Gomontiellaceae (Bohunická *et al.*, 2015). Furthermore, the SSU-LSU ITS sequences of the authentic strain of *Hormoscilla pringsheimii* (SAG 1407-1) and the original isolate are quite different. The BSC isolate Ru-s-3-5 of the present study is morphologically similar to the freshwater species ‘*Carteria*’ *crucifera*, but is obviously ecologically different, and a revision of this group is in the preliminary stages (Nozaki *et al.*, 1994, 1997). Strain Ru-6-12 clustered in a clade formed by isolates of *Microcoleus vaginatus* (Oscillatoriaceae, Fig. 1), but this group obviously contains several species (Strunecký *et al.*, 2013), although a revision has not been proposed. Strain Us-2-2 clustered in a clade with several isolates identified as *Nostoc edaphicum* (Supplementary fig. S1); however, no taxonomic revision of this group exists and hence the identification is not clear.

The third group of data represents coincidence of morphological and molecular identification, but the taxa require further revision. Strain Us-1-6 was identified as a morphospecies of *Tetracystis sarcinalis* and the sequence of this strain agreed with that of the authentic strain of the respective species (SAG 19.94, Fig. 2). However, the generic name of these representatives has to be changed because the type species of *Tetracystis* (*T. aerea*) is in a different lineage (Moewusinia, Nakada *et al.*, 2008, see Fig. 2).

The sequence of strain Ru-6-15 identified as *Spongiochloris* cf. *minor* clustered in the lineage determined as Radiococcaceae, Sphaeropleales (Fučíková *et al.*, 2014a, see Fig. 3), but the type of the genus *Spongiochloris* (*S. spongiosa*) is located within the Stephanosphaerina, Volvocales (Nakada *et al.*, 2008, see Fig. 2). The authentic strain of *Spongiochloris excentrica*, which is morphologically close to Ru-6-15, clustered in the clade Radiococcaceae (Sphaeropleales) as well, but represented a sister lineage (Fig. 3). Consequently, the morphologically defined genus

Spongiochloris is polyphyletic, and its members belong to different orders of Chlorophyceae.

Strain Us-7-12, identified as *Chlorella chlorelloides*, clustered in a clade with a recently described genus from desert BSCs, *Xerochlorella* Fučíková, P.O. Lewis & L.A. Lewis (Trebouxiophyceae) (Fučíková *et al.*, 2014b) (Fig. 4). Initially, isolates in the present study were identified as *Dictyosphaerium chlorelloides*, and then transferred to *Chlorella* following a taxonomic revision (Bock *et al.*, 2011). The presence of several sequences identified as *Dictyosphaerium* Nägeli in this clade (see Fig. 4) showed that the *Dictyosphaerium*-like morphotype is typical for members of the genus *Xerochlorella*. However, this information is not provided in the diagnosis of this genus (Fučíková *et al.*, 2014b) and hence a successful morphological identification of these representatives is impossible. Unambiguous species identification of the *Xerochlorella* isolate Us-7-12 is also impossible, because of the lack of an ITS sequence for the authentic strain in NCBI (the group was revised on the basis of SSU rRNA and *rbcL* phylogenies).

The fourth group of data represents coincidence of morphological and molecular identification to the genus level. Determination of species on the basis of phylogenetic data is currently not possible for these taxa. The situation is typical for groups with incomplete or no recent taxonomic revisions (see Table 1): *Lobochlamys* sp. (Oogamochlamydia, Chlorophyceae, Fig. 2); *Diplosphaera* sp. and *Myrmecia* sp. (Trebouxiophyceae, Fig. 4); and *Nostoc* sp., *Hassalia* sp. and *Tolypothrix* sp. (Nostocales, Supplementary fig. S1). For *Lobochlamys*, a revision based on phylogenetic data was conducted by Pröschold *et al.* (2001), although this genus probably includes a wider diversity of species than previously described.

The fifth group contains taxa with correct morphological identification to genus level only. This group typically represents species for which identification is limited due to a lack of prominent morphological characters. A typical example is the taxonomic revision of the genus *Bracteacoccus*, which revealed several cryptic species (Fučíková *et al.*, 2012). The ITS-2 phylogeny showed that isolates of the present study identified as *Bracteacoccus* cf. *minor* actually belong to the morphologically and phylogenetically closely related species *B. aggregatus* (Supplementary fig. S7). A sequence of a strain identified as *Chloromonas* cf. *reticulata* formed a separate lineage within Chloromonadina, but far distant from the respective species (Fig. 2). Sequences of two strains of *Nodosilinea* are close to the morphologically unclear *Nodosilinea epilithica* according to the SSU rRNA and SSU-LSU ITS data (Figs 1, Supplementary fig. S3). The ITS phylogeny provided a more precise identification of three strains

of *Klebsormidium* (Supplementary fig. S9), which have a generally uniform morphology combined with a high level of morphological plasticity, which is typical for the genus (Rindi *et al.*, 2011; Mikhailiuk *et al.*, 2015).

The ITS-1,2 phylogeny of strains of *Tetradasmus* and *Chloroidium* provide interesting examples, because they formed clearly separated lineages in the trees corresponding to new cryptic species inside the respective genera (see Figs 6, 7). Recent taxonomic revisions of the genus *Tetradasmus* (= *Acutodesmus*) indicated that the morphospecies *T. obliquus* (= *Acutodesmus obliquus*, *Scenedesmus acutus* Meyen) includes several cryptic species (Lewis & Flechtner, 2004; Sciuto *et al.*, 2015). The morphology of strain Ru-6-2 and four additional strains also isolated from sand-dune BSCs corresponded to the description of this morphospecies (Tsarenko, 1990; Ettl & Gärtner, 2014). The SSU rRNA phylogeny pointed to a high similarity of strains in the present study, compared to cryptic species described from desert BSCs, such as *Tetradasmus bajacalifornicus* (Fig. 3). However, the ITS-2 data (Fig. 6) indicated that the new isolates represent a sister lineage to *T. bajacalifornicus*. The ITS-2 secondary structures showed some differences from both *T. bajacalifornicus* (three hCBCs, one mismatch and three differences in loops) and *T. obliquus* (one hCBC, three mismatches, single or unpaired bases, and six differences in loops). These differences are important in the context of modern taxonomy, and justify the description of a new species (see below).

The sixth group represents strains with incorrect morphological identifications for both genus and species levels. Some of these strains belong to taxa with unclear morphological characters (cryptic genera and species): *Pseudomuriella aurantiaca*, originally identified as *Bracteacoccus* sp. (Fig. 3, Supplementary fig. S5); and *Pseudostichococcus* cf. *monallantoides* (Fig. 4), mentioned in the morphological species list as *Stichococcus bacillaris*. A similar incorrect identification occurred in Synechococcales: *Leptolyngbya* cf. *boryana* was identified as the morphologically similar *Pseudophormidium hollerbachianum*. Both these taxa were originally described as different forms of *Plectonema boryanum*: f. *boryanum* and f. *hollerbachianum*. The first taxon was transferred to *Leptolyngbya* as the type of the genus, and the second was included in *Pseudophormidium* (Komárek & Anagnostidis, 2005). According to the SSU rRNA phylogeny, the strain studied is representative of the clade *Leptolyngbya* and closely related to *L. boryana* (Fig. 1). Two strains of another cyanobacterium, '*Microcoleus*' (Oscillatoriales), were misidentified due to their morphological similarity to the genus *Trichocoleus* (Synechococcales). A similar misidentification occurred

with the public strain SAG 26.92, which represents a separate lineage inside Oscillatoriales (see Fig. 1). Some original strains of Synechococcales were morphologically similar to the morphospecies *Leptolyngbya notata*, *Leptolyngbya edaphica* (= *Plectonema edaphicum*) and *Leptolyngbya henningsii*. The sequences of these strains clustered in clades described as the new synechococcalean genera *Stenomitos*, *Timaviella*, and *Phormidesmis* according to the SSU rRNA phylogeny (Fig. 1). Incomplete taxonomic revisions of these genera do not allow us to determine the suitable species names for these taxa (Komárek *et al.*, 2009; Miscoe *et al.*, 2016; Sciuto *et al.*, 2017).

A molecular-taxonomic revision of the Selenastraceae is progressing, but not yet complete (Garcia da Silva *et al.*, 2017), and hence the identification of *Monoraphidium*-like taxa is still problematic on both species and genus levels. Isolate Ru-6-10, identified as the polyphyletic taxon *Monoraphidium pusillum*, clustered in the clade defined by *Chlorobion* (Garcia da Silva *et al.*, 2017, Fig. 3), but the designation of the species is still unclear. Strain Ru-1-8, identified as *Graesiella emersonii*, appeared in the clade formed by *Coelastrella* species (Chlorophyceae) in a close relationship to the recently described *Coelastrella aeroterrestica* (Tschaike *et al.*, 2008) (Fig. 3). The ITS-1,2 phylogeny of this group showed the same result (Supplementary fig. S6). Several strains of *Chlorella* (*Graesiella*) *emersonii* from the SAG and CCAP collections formed sister lineages in the SSU rRNA and ITS-1,2 phylogenies to Ru-1-8, as well as to the authentic strain of *C. aeroterrestica*. Furthermore, some strains of 'Chlorella' (*Graesiella*) *emersonii* (SAG 2334) even formed lineages outside the *Coelastrella* clade, according to the SSU rRNA phylogeny (Fig. 3). Consequently, the phylogenetic relationships of *C. aeroterrestica* and the polyphyletic morphospecies 'Chlorella' (*Graesiella*) *emersonii* (sometimes also identified as 'Chlorella' *fusca* Shihira & Krauss) should be re-evaluated.

Strain Us-s-7-5, identified as *Pseudochlorella* sp., clustered in the clade of the recently described genus *Eremochloris*, Trebouxiophyceae (Fig. 4). This strain has an unusual morphology and does not correspond to any known algal taxon. *Eremochloris* was described as a cryptic genus with unclear morphology (Fučíková *et al.*, 2014b). For identification of Us-s-7-5, the ITS-1,2 sequences of the authentic strain *E. sphaerica* UTEX B 2994 were obtained along with the ITS-2 secondary structure (Fig. 10). The ITS-2 sequences of UTEX B 2994 and Us-s-7-5 are very similar and differed only in a few mismatches, deletions of base pairs, and two hCBCs, which can be considered intraspecific variation. Therefore, Us-s-7-5 was identified as *E. sphaerica*. The two strains are very similar morphologically as well, and hence the data

presented serve to improve the morphological diagnosis of the species (see below).

The strain Ru-s-3-2, identified according to morphological data as *Neochloris* cf. *gelatinosa* (Chlorophyceae), appeared in the clade with rare algae from genus *Desmochloris* (Ulvophyceae). This strain was misidentified because of the similar morphology of adult vegetative cells and zoospores to the genus *Neochloris*, Chlorophyceae (Ettl & Gärtner, 2014). However, more detailed observations, especially on old cultures, showed distinct differences from *Neochloris* and some similarity to representatives of the Ulvophyceae. The SSU rRNA and ITS-1,2 phylogenies indicated that strain Ru-s-3-2 formed a sister lineage to the authentic strains of *Desmochloris halophila* and *D. mollenhaueri* (Fig. 8) and thus, possibly represents a separate species. The morphology of Ru-s-3-2 is different from known *Desmochloris* species. However, the presence of a strain of *D. cf. halophila* (SAG 2397) isolated from karstic streams (Hodač *et al.*, 2015) in close relationship to Ru-s-3-2 indicated that this group is probably more diverse than previously considered, and additional strains are necessary for final identification.

Rare algae found in BSCs from sand dunes of the Baltic Sea

During the present study, several rare cyanobacteria and algae were found in the BSCs. *Hormoscilla* cf. *pringsheimii* (Us-s-6-2) is such a cyanobacterial taxon, typical for terrestrial habitats (Bohunická *et al.*, 2015). It is characterized by short filaments with narrow cells, spherical in cross section (Fig. 15). This cyanobacterium belongs to the unusual family Gomontiellaceae, which unites rare and insufficiently investigated taxa (Bohunická *et al.*, 2015), and possibly strain Us-s-6-2 represents a new species because it differs in essentials from the authentic strain of *Hormoscilla pringsheimii*, according to phylogenetic data (see Fig. 1).

'*Tetracystis*' cf. *sarcinalis* (Ru-1-9, Us-1-6), also an interesting finding, is a typical alga for BSCs of German sand dunes (Schulz *et al.*, 2016). It forms diads and sarcinoid packets surrounded by layered mucilage. This taxon is characterized by the cup-shaped perforated chloroplast with a prominent pyrenoid consisting of two halves of starch and the presence of two contractile vacuoles (Figs 24, 25). This alga has so far been found in Croatian soils (Ettl & Gärtner, 2014) as well as on the walls of buildings and monuments in Spain (Uher *et al.*, 2005). An assumed close relationship of *T. sarcinalis* with *Neochlorosarcina* Watanabe (Reinhardtina), but not with other species of *Tetracystis* (Moewusinia), was previously expressed by Andreyeva (1998) on the

basis of morphological characters. The isolates of the present study are morphologically and genetically quite similar to the authentic strain, but with some differences, which might justify the proposal of a new species.

'*Carteria*' cf. *crucifera* (Ru-s-3-5) is a rare and unusual finding for terrestrial habitats, because members of the Crucicarteria are mostly typical for freshwater bodies, although a few species inhabit soil as well (Nozaki *et al.*, 1994). Ru-s-3-5 is characterized by the cruciform papilla typical for this group, H-shaped chloroplast, anterior stigma, and posterior nucleus (Figs 34, 35). Phylogenetic data (Fig. 2) showed that this strain perhaps represents a new species.

'*Spongiochloris*' cf. *minor* (Ru-6-15) is unique because of its phylogenetic position outside the Stephanosphaerina, indicating that *Spongiochloris* is a polyphyletic genus. Ru-6-15 is characterized by multinucleate cells, wall-less zoospores and a typical net-like chloroplast with a central pyrenoid consisting of two to four starch plates (Fig. 45). The phylogenetically closely related *S. excentrica* and many other species of *Spongiochloris* have pyrenoids with the same structure (Ettl & Gärtner, 2014), while the type of the genus, *S. spongiosa*, is characterized by a pyrenoid consisting of multiple starch grains. Therefore, *Spongiochloris* is perhaps polymorphic on a morphological level as well. More detailed investigations are necessary to clarify the taxonomic position of these two *Spongiochloris*-like genera.

Monoraphidium-like algae are typical of freshwater habitats (Tsarenko, 1990), although several species are also found in BSCs of Baltic Sea sand dunes as representative and abundant taxa (Schulz *et al.*, 2016), such as *Podohedra bicaudata* Geitler, *Chlorolobion lunulatum* and *Monoraphidium* cf. *pusillum*. The SSU rRNA sequence of this last isolate showed that it is actually a species of *Chlorolobion* (see Fig. 3). Morphological investigation of this strain clearly showed a naked pyrenoid (Figs 43, 44), which is typical for *Monoraphidium* Komárková-Legnerová (Marvan & Komárek, 1984; Krienitz *et al.*, 1986) and was recently reported for many strains of Selenastraceae (Garcia da Silva *et al.*, 2017).

The strain identified as *Pseudostichococcus* cf. *monallantoides* (Ru-s-4-2) exhibits a *Stichococcus*-like morphology. Despite a previous identification of this strain as a trivial *Stichococcus bacillaris*, a more detailed investigation showed an unusual, polymorphic cell shape (Fig. 52) and some characters that may be associated with budding, which is also found in this group (Eliáš & Neustupa, 2009).

Xerochlorella cf. *olmiae* is an ecologically interesting finding in BSCs of Baltic Sea sand dunes, after its recent description from desert soil of the USA as a cryptic genus and species (Fučíková *et al.*, 2014b). The isolate of the present study shows a prominent

Dictyosphaerium-like morphology and was initially identified as *Chlorella chlorelloides* (*Dictyosphaerium chlorelloides*). The presence of several other strains identified as *Dictyosphaerium* in the respective clade of the SSU rRNA phylogeny confirmed our observation (Fig. 4), although the true *Dictyosphaerium* (and *Dictyosphaerium*-like *C. chlorelloides*) is nested inside Chlorellales (Bock *et al.*, 2011). The isolate of the present study is also characterized by the presence of a pyrenoid (Figs 56, 57), a morphological feature lacking in the description of *Xerochlorella olmiae* (Fučíková *et al.*, 2014b). Unfortunately, identification to species level was impossible because of the lack of ITS sequences in databases. It is obvious that this interesting group requires additional revision, with deeper investigation of morphological characters.

Desmochloris cf. *halophila* (Ru-s-3-2) was a rare finding in the BSCs of these sand dunes. This taxon is characterized by multinucleate spherical or wide-ellipsoid cells with a richly dissected, striated chloroplast with one or several pyrenoids surrounded by several starch grains and biflagellate wall-less zoospores (Figs 58–61). All these characters are similar to the morphology of *Neochloris* (our preliminary identification). However, a more detailed investigation showed that Ru-s-3-2 formed large saccular cells with mucilaginous *Hormotila*-like outgrowths in old culture. The large cells produced autospores in packets which realized via gelatinization of the cell wall. Ru-s-3-2 is morphologically different from the known species *D. halophila* and *D. mollenhaueri* (Dariencko *et al.*, 2009), and probably represents a new species.

Proposed taxonomic changes of some investigated taxa of BSC green algae

Heterochlamydomonas callunae (Ettl) Mikhailyuk & Demchenko comb. nov. (Figs. 16–19)

Basionym: *Chlamydomonas callunae* Ettl, 1976, Beih. Nova Hedwigia 49: 571, pl. 123, fig. 2.

Type locality: Soil on floor of degraded pine forest with a rich cover of *Calluna vulgaris*, Schönhengst, Czech Republic.

Epitype (here designated): The authentic strain SAG 68.81 is permanently preserved in a metabolically inactive state (cryopreserved in liquid nitrogen) in the Sammlung von Algenkulturen, University of Göttingen, Germany.

Emended description

Flagellated cells obovoid, truncated in upper part and narrowed and rounded in basal part, (5.0) 6.5–8.7 × (2.0) 4–4.7 µm. Cell wall dense, without papilla. Flagella equal to or slightly longer than cell length.

During flagella formation, stages with slightly uneven flagella observed. Chloroplast parietal, smooth or dissected in 2–3 lobes. Pyrenoid single, spherical, surrounded by several starch grains, in the lateral, middle or upper part of cell. Stigma quite large, ellipsoid, anterior. Nucleus posterior. Two apical contractile vacuoles. Flagellated cells lose the flagella, increase in size and form spherical uninucleate coccoid stigma-less cells with chloroplast richly dissected and striated on the surface, and a large central pyrenoid surrounded by many small starch grains. Adult cells spherical, with two contractile vacuoles, surrounded by delicate mucilage, 11–16.5 µm in diameter. Asexual reproduction by zoospores formed in sporangia with 2–4 cells (flagellated cell described above). Sexual reproduction not observed.

Comments

The epitype strain corresponds to the diagnosis of *Chlamydomonas callunae* concerning the flagellated cells, although the diagnosis completely lacks information about the adult spherical cells. It seems that the alga corresponds to a *Palmellopsis*-like representative, with adult cells in the palmelloid stage and rapid formation of mobile zoospores after a transfer to fresh medium. Therefore, the flagellated cells of SAG 68.81 represent zoospores. On the other hand, the alga also corresponds morphologically to *Heterochlamydomonas*, due to the specific obovoid and apically truncated flagellated cells, and the morphology of the chloroplast, stigma and pyrenoid. The flagellated cells of SAG 68.81 have slightly uneven flagella during their formation, which also corresponds to the main character of *Heterochlamydomonas*. Our strain of *H. callunae* (Us-1-5) is morphologically similar to SAG 68.81, but is characterized by the formation of a denser mucilage envelope and a more prominent *Palmellopsis*-like stage. We also observed a larger number of zoospores in the sporangia (2-4-8-16) in Us-1-5 than is typical for the authentic strain. Both strains have closely similar sequences of SSU rRNA and ITS-1,2 (1 nucleotide difference each in SSU rRNA and ITS-2), and a more variable ITS-1 (8 nucleotide differences).

***Actinochloris sphaerica* Korschikov, 1953,
Protococcineae: 69, fig. 12 (Figs 28–33)**

Type locality: Pool with decaying leaves and soil, Kharkov, Ukraine.

Epitype (here designated): The strain SAG 23.93 (proposed here as the authentic strain of *Actinochloris sphaerica*), permanently preserved in a metabolically inactive state (cryopreserved in liquid nitrogen) in the Sammlung von Algenkulturen, University of Göttingen, Germany.

Comments: The epitype strain completely corresponds to the diagnosis of *A. sphaerica* (Korschikov,

1953). The main morphological characters of the species (richly dissected asteroid chloroplast, large pyrenoid surrounded by many small starch grains, many nuclei and many peripheral contractile vacuoles, zoospores surrounded by cell wall) mentioned in the original description (Korschikov, 1953: 69) are typical for strain SAG 23.93, proposed here as the epitype. The epitype strain was isolated from sandy loam soil of a winter barley field, Brandenburg, Güterfelde/Potsdam, Germany. This habitat is ecologically similar to the type locality and is part of the same geographic region (Europe).

***Eremochloris sphaerica* Fučíková, P.O. Lewis & L.A. Lewis, 2014b, Phycol. Res. 62: 304, fig. 1: f-i. emend. Mikhailuyuk & Demchenko (Figs 53–55, 62, 63)**

Type locality: Mexico, Baja California, desert soil.
Authentic strain: UTEX B 2994.

Emended description

Cells spherical or slightly ovoid, adult vegetative cells (15.0) 18.3–23.3 (29.4) µm in diameter, uninucleate. Chloroplast parietal, dissected on (3) 4–6 (8) clear, curved or undulated lobes. In some young cells, chloroplast with cruciform appearance in optical section. Chloroplast lobes of adult cells often long and covering entire inner cell surface, in this case spaces between lobes are visible as thin lines in surface view. Pyrenoid single, prominent, covered with several starch grains. Asexual reproduction by (4) 8–16 spherical autospores, 5.0–7.2 µm in diameter. Young cells spherical, with simple chloroplast that is further dissected in lobes. Sexual reproduction not observed.

Comments

This alga is morphologically distinct, despite the former statement that it is a cryptic representative with morphologically unclear characters (Fučíková *et al.*, 2014b). The strain isolated from a Baltic Sea sand dune (Us-s-7-5) and identified as the same species is the first report of this alga after its description and in temperate Europe. It is interesting that *Eremochloris sphaerica* has been found in different climatic and geographic regions, although in ecologically similar habitats: maritime sand dunes (Europe) and sandy desert soils (North America).

***Tetrademus arenicola* Mikhailuyuk & P. Tsarenko
sp. nov. (Figs 36–38, 41, 64–66)**

Cenobia 2–4-celled or cells mostly solitary in culture. Cenobia with different shapes, having volumetric coiled or linear, alternative and opposite shape. Cells lemon-shaped with pointed ends, fusiform or crescentic to wide-ellipsoid or subspherical, with small protrusions typically at one or both cell poles.

Adult cells in cenobia (17.1) 19.4–29.4 (32.6) μm in length, (6.7) 7.8–8.3 μm in width, single cells (11.1) 14.4–25.0 (30.6) μm in length, (6.7) 8.3–16.7 (18.0) μm in width. Cells uninucleate, with parietal chloroplast with wavy edges and single pyrenoid surrounded by two starch grains. Old cells spherical and filled with drops of orange oil. Reproduction by autospores, formed in sporangia by 2–4 spores. Sexual reproduction not observed.

HABITAT: Biological soil crusts from maritime sand dunes.

TYPE LOCALITY: Black Sea coast, Danube Delta Biosphere Reserve, Kiliya District, Odessa Region, Ukraine.

ICONOTYPE: Fig 64–66.

HOLOTYPE (*here designated*): AKW-32377, culture material of authentic strain Prim-13-1 (SAG 2564) preserved in 4% formaldehyde, Algotheca of the M. G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine.

AUTHENTIC STRAIN: Prim-13-1 was deposited in the Sammlung von Algenkulturen, University of Göttingen, Germany, under number SAG 2564, and in the Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine under number IBASU-A-522.

OTHER STRAINS: Ru-6-2, Hg-6-1, WD-1-6, WD-7-1 were isolated from the same habitat on the Baltic Sea coast, Germany and maintained in the Department of Applied Ecology and Phycology, University of Rostock, Germany.

ETYMOLOGY: arenicola = from the Latin word arena, meaning sand (referring to type habitat).

Table 2. Identification of dominant (d) and the most common species (c) of cyanobacteria and algae from BSC of Baltic sand dunes based on morphological methods and an integrative approach.

Morphological identification (Schulz <i>et al.</i> , 2016)	Identification using an integrative approach (present study)
<i>Leptolyngbya cf. notata</i> (d)	<i>Stenomitos</i> sp.
<i>Nodosilinea</i> sp. (c)	<i>Nodosilinea cf. epilithica</i>
<i>Microcoleus vaginatus</i> (d and c)	<i>Microcoleus cf. vaginatus</i>
<i>Coleofasciculus</i> sp. (d)	no data
<i>Lyngbya</i> sp. (d)	no data
<i>Nostoc cf. edaphicum</i> (d and c)	<i>Nostoc cf. edaphicum</i>
<i>Hydrocoryne</i> sp. (d)	no data
<i>Leptolyngbya edaphica</i> (c)	<i>Timaviella</i> sp.
<i>Lobochlamys</i> sp. (d)	<i>Lobochlamys</i> sp.
<i>Bracteacoccus</i> sp. (c)	<i>Pseudomuriella aurantiaca</i>
<i>Monoraphidium cf. pusillum</i> (c)	<i>Chlorolobion</i> sp.
<i>Tetradesmus obliquus</i> (= <i>Acutodesmus obliquus</i>) (c)	<i>Tetradesmus arenicola</i> sp. nov.
<i>Chlorella vulgaris</i> (c)	<i>Chlorella vulgaris</i>
<i>Klebsormidium flaccidum</i> (d and c)	<i>Klebsormidium flaccidum</i> and <i>K. fluitans</i>
<i>Klebsormidium crenulatum</i> (d)	<i>Klebsormidium crenulatum</i> and <i>K. mucosum</i>

Comments

The proposed new species is morphologically similar to the classical aquatic species *Tetradesmus obliquus* and the newly described cryptic terrestrial species *Acutodesmus (Tetradesmus) bajacalifornicus* and *A. (Tetradesmus) deserticola* (L.A.Lewis & Flechtner) E. Hegewald, Bock & Krienitz. The habitat of the terrestrial species (biological soil crusts on surface of sandy desert soil) is similar to the habitat of the proposed new species, although the type localities are distant from each other (North America *versus* Europe). The new species differs from the aquatic *T. obliquus* in its development in terrestrial habitats. It differs from *T. bajacalifornicus*, which has a naked pyrenoid, in having a pyrenoid with a prominent two-halved starch envelope; and from both cryptic terrestrial species by the random formation of colonies in culture as well as by the ITS-2 sequences. The new species is present in natural material as volumetric coiled coenobia (Figs 36–39) or single lemon-shaped cells.

Identification of BSC microalgae and cyanobacteria using an integrative approach: advantages, difficulties and perspectives

Using an integrative approach essentially facilitates and improves the identification of microalgal morphological characters that are cryptic, insufficiently clear, or variable. Molecular phylogenetic analysis allowed us to provide correct and unambiguous identifications for 20 strains (37.7% of all strains investigated) of algae and cyanobacteria to species level (*Chlorococcum oleofaciens*, *Elliptochloris subsphaerica*, *Pseudomuriella aurantiaca* and others). Identifications were corrected after preliminary morphological determinations for eight of the strains studied. However, for 12 (22.6%) of the strains, identification was only possible to the level of genus or group of closely related species, because modern taxonomic revisions of the underlying taxa are still lacking (*Leptolyngbya cf. boryana*, *Hassalia* sp., *Diplosphaera* sp. and others). Identification to genus level was problematic for six strains (11.3%, ‘*Spongiochloris*’ sp., ‘*Carteria*’ cf. *crucifera* and others). Identification to species level was impossible for 15 strains (28.3%) because these genera include more species than have been described using molecular-phylogenetic methods (*Microcoleus cf. vaginatus*, *Timaviella* sp., *Lobochlamys* sp., *Klebsormidium* sp. and others). Some of our morphospecies should perhaps be accepted as correctly identified taxa; however, it is impossible to confirm their identification because detailed taxonomic revisions of the respective taxa using morphological and molecular data have not been undertaken (*Phormidesmis* sp., preliminarily identified as *Leptolyngbya cf. henningsii*; or *Myrmecia* sp.,

identified as the morphospecies *Myrmecia* cf. *biatorellae*).

Data on identification of strains using an integrative approach considerably refined our knowledge of the species composition of cyanobacteria and algae from BSCs of Baltic sand dunes (Table 2). Molecular-phylogenetic methods resulted in the finding of a class (Ulvophyceae, Chlorophyta), which was not mentioned in our previous study based on classical morphological methods (Schulz *et al.*, 2016) because of the previous incorrect identification of the rare alga *Desmochloris* cf. *halophila* (see Table 1). The dominant and most common species of cyanobacteria and algae that play a general role in the community structure of BSCs from Baltic sand dunes, as well as the results of their identification based on an integrative approach are provided in Table 2. Twelve of the 15 taxa mentioned as dominant and the most common species in the BSCs were further investigated, using an integrative approach. Three dominant species of the BSCs studied were not further investigated because of the lack of the respective strains. Some of the dominant cyanobacteria in BSCs are problematic for culturing and molecular-phylogenetic investigation (Büdel *et al.*, 2009, 2016). Herein, taxonomic names are specified for eight species (53.3% of the list). The dominant taxa *Klebsormidium flaccidum* and *K. crenulatum* were identified correctly based on morphological data. However, some strains of these species were later redefined (according to molecular-phylogenetic data) as representatives of other, morphologically close species (*Klebsormidium fluitans* and *K. mucosum*). Using an integrative approach allowed us to find several interesting and rare algae, previously identified as trivial taxa (species of *Eremochloris*, *Xerochlorella*, *Chlorolobion*, *Desmochloris*, *Tetrademus*, etc.). Therefore, the microscopic culture-dependent method and an integrative approach provided similar results concerning the cyanobacterial and algal diversity of BSCs of Baltic sand dunes in general. However, investigation based on an integrative approach allowed us to considerably refine the knowledge of the species composition of taxa, and further determine the community structure of BSCs and rare representatives.

Molecular identification of algae is also complicated because of the absence of standard rules and criteria for taxa delimitation, especially to species level. Several molecular markers are used for algal identification and description: mostly the nuclear SSU rRNA, ITS region, and sometimes the LSU rRNA, plastid *rbcl*, Rubisco spacers (*psaA*, *psbA*), *matK*, *tufA* and others, or mitochondrial *cox1*, *cox3* and *cob* (Leliaert *et al.*, 2014). Identification of some taxa to species level was not possible in the present study because of the lack of ITS or other marker sequences in public databases. In addition, standard rules for species delimitation do not exist even if the

same molecular markers are considered; for example, using different barcode regions of ITS-2 for species delimitation (e.g. Demchenko *et al.*, 2012; Caisová *et al.*, 2013; Rybalka *et al.*, 2013). Therefore, identification of microalgae to species level is only possible if a modern species concept for the different groups can be developed and published in the future. On the other hand, developing standard rules among various algal groups might in principle be difficult because the algae are a polyphyletic group (Leliaert *et al.*, 2014).

Some BSC strains should be recognized as taxa that are impossible to identify using only morphological characters because of their uniformity and high variability: *Bracteacoccus*, *Pseudomuriella*, some *Tetrademus*, and *Klebsormidium*, which were recognized initially as cryptic species (Lewis & Flechtner, 2004; Fučíková *et al.*, 2011, 2012; Rindi *et al.*, 2011). Other taxa such as *Desmochloris* cf. *halophila* are difficult to identify because of high morphological parallelism between unrelated algal groups. On the other hand, molecular-taxonomy studies often ignore morphological markers. Although the modern approaches are excellent tools for the delimitation and description of microalgal and cyanobacterial taxa, it is still necessary to pay attention to morphological data as well. Despite a high number of cryptic algal and cyanobacterial taxa in nature, some representatives described as cryptic are morphologically well defined (*Eremochloris*, possibly *Xerochlorella*; Fučíková *et al.*, 2014b). The majority of recent data on biodiversity, ecology and biogeography of BSC microalgae and cyanobacteria are based on classical microscopic and morphological approaches (see Büdel *et al.*, 2016). Therefore, morphological and molecular phylogenetic approaches should be conducted together, to permit further progress in the knowledge of microalgae and cyanobacteria as key components of BSCs.

Acknowledgements

Our sincere thanks are extended to Dr Thomas Pröschold (University of Innsbruck, Austria) for permission to use algal specific primers designed by him, and Karoline Schulz (University of Rostock, Germany) for valuable help in the purification of the strains investigated. We thank Dr Maike Lorenz, University of Göttingen, Germany for help with depositing strains at SAG. We are deeply grateful to the 'Svitmed' Co., Ltd, Ukraine, for valuable help and support in obtaining equipment (T.M., E.D.).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This study was supported by a Georg-Forster research fellowship from the Alexander von Humboldt Foundation (T.M.). U.K. thanks the Deutsche Forschungsgemeinschaft for financial support (KA899/16).

Supplementary information

The following supplementary material is accessible via the Supplementary Content tab on the article's online page at <http://10.1080/09670262.2018.1557257>

Supplementary fig. S1. Molecular phylogeny of Nostocales based on SSU rRNA sequence comparisons.

Supplementary fig. S2. Molecular phylogeny of Ulvophyceae based on SSU rRNA sequence comparisons.

Supplementary figs S3-S6. Molecular phylogeny of *Nodosilinea* (Fig. S3) and *Timaviella* (Synechococcales) (Fig. S4), *Pseudomuriella* (Fig. S5) and *Coelastrella* (Fig. S6) (Chlorophyceae) based on SSU-LSU ITS (*Nodosilinea* and *Timaviella*), ITS-1,2 (*Pseudomuriella*, *Coelastrella*) sequence comparisons.

Supplementary figs S7, S8. Molecular phylogeny of *Bracteacoccus* (Chlorophyceae) (Fig. S7) and *Chlorella* (Trebouxiophyceae) (Fig. S8) based on ITS-2 sequence comparisons.

Supplementary fig. S9. Molecular phylogeny of Klebsormidiophyceae (Streptophyta) based on ITS-1,2 sequence comparisons.

Supplementary figs S10-S21. Fig. S10. Ru-1-5 *Leptolyngbya* cf. *boryana*. Figs S11, S12. Ru-0-2 *Stenomitos* sp. Fig. S13. Ru-6-12 *Microcoleus* cf. *vaginatus*. Fig. S14. Us-2-2 *Nostoc* cf. *edaphicum*. Figs S15, S16. Us-7-5 *Nostoc* sp. Fig. S17. Ru-0-3 *Tolypothrix* sp. Fig. S18. Ru-6-5 *Lobochlamys* sp.: cells in surface view (left) and in optical section (right). Fig. S19. Ru-s-4-3 *Chloromonas* cf. *actinochloris*. Figs S20, S21. Ru-6-8 *Chloromonas* sp.: young cell (Fig. S20).

Supplementary figs S22-S34. Fig. S22. Ru-s-4-5 *Bracteacoccus aggregatus*. Fig. S23. Ru-6-13 *Pseudomuriella aurantiaca*. Figs S24, S25. Ru-6-3 *Elliptochloris subsphaerica*: ellipsoid young cell and sporangium with rod-like autospores (Fig. S25). Figs S26-S28. Ru-s-3-3 *Myrmecia* sp.: optical section (Fig. S26), surface view (Fig. S27), zoosporangium (Fig. S28). Fig. S29. Ru-6-6 *Chloroidium* sp. Figs S30, S31. Ru-6-16 *Diplosphaera* sp. Fig. S32. Ru-0-4 *Chlorella vulgaris*. Fig. S33. Ru-1-2 *Klebsormidium flaccidum*. Fig. S34. Us-6-7 *Klebsormidium crenulatum*.

Supplementary figs S35-S38. Fig. S35. Ru-8-1 *Klebsormidium* cf. *nitens*. Fig. S36. Ru-10-1 *Klebsormidium fluitans*. Fig. S37. Ru-10-2 *Klebsormidium* cf. *subtile*. Fig. S38. Us-4-2 *Klebsormidium mucosum*.

Author contributions

T. Mikhailyuk: original concept, strains isolation, morphological and molecular investigations of strains, analysis and interpretation of data, drafting and editing of manuscript; K. Glaser: analysis and interpretation of molecular data and phylogenetic trees, editing of manuscript; P. Tsarenko: morphological observations of *Tetrademus* strains, analysis of data, editing of manuscript; E. Demchenko: strains isolation, morphological observations of some strains, analysis of data, editing of manuscript; U. Karsten: original concept, interpretation of data, editing of manuscript.

ORCID

Karin Glaser  <http://orcid.org/0000-0002-5962-3603>

References

- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *Automatic Control, IEEE Transactions on Automatic Control*, **19**: 716–723.
- Altschul, S.F., Madden, T.L. & Schäffer, A.A. (1997). Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**: 3389–3402.
- Andreyeva, V.M. (1998). *Terrestrial and Aerophilic Green Algae (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales)*. Nauka, St. Petersburg. (In Russian.)
- Balzano, S., Gourvil, P., Siano, R., Chanoine, M., Marie, D., Lessard, S., Sarno, D. & Vaulot, D. (2012). Diversity of cultured photosynthetic flagellates in the northeast Pacific and Arctic Oceans in summer. *Biogeosciences*, **9**: 4553–4571.
- Belnap, J. & Gillette, D.A. (1998). Vulnerability of desert biological soil crusts to wind erosion: the influences of crust development, soil texture, and disturbance. *Journal of Arid Environments*, **39**: 133–142.
- Belnap, J. & Lange, O.L. (2001). *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. Springer, Berlin.
- Bock, C., Krienitz, L. & Pröschold, T. (2011). Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*, **11**: 293–312.
- Bohunická, M., Mares, J., Hrouzek, P., Urahová, P., Lukes, M., Smarda, J., Komárek, J., Gaysina, L.A. & Strunecky, O. (2015). A combined morphological, ultrastructural, molecular, and biochemical study of the peculiar family Gomontiellaceae (Oscillatoriales) reveals a new cylindrospermopsin-producing clade of cyanobacteria. *Journal of Phycology*, **51**: 1040–1054.
- Borchhardt, N., Baum, C., Mikhailyuk, T. & Karsten, U. (2017). Biological soil crusts of Arctic Svalbard – water availability as potential controlling factor for microalgal biodiversity. *Frontiers in Microbiology*, **8**: Article 1485.
- Brinkmann, N., Hodač, L., Mohr, K.I., Hodačová, A., Jahn, R., Ramm, J., Hallmann, C., Arp, G. & Friedl, T. (2015). Cyanobacteria and diatoms in biofilms of two karstic streams in Germany and changes of their communities along calcite saturation gradients. *Geomicrobiology Journal*, **32**: 255–274.
- Büdel, B. & Colesie, C. (2014). Biological soil crusts. In *Antarctic Terrestrial Microbiology*. (Cowan, D., editor), 131–161. Springer, Berlin.
- Büdel, B., Dulić, T., Darienko, T., Rybalka, N. & Friedl, T. (2016). Cyanobacteria and algae of biological soil crusts. In *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. (Weber, B., Büdel, B. & Belnap, J., editors), 55–80. Springer, Berlin.
- Büdel, B., Darienko, T., Deutschewitz, K., Dojani, S., Friedl, T., Mohr, K. I., Salisch, M., Reisser, W. & Weber, B. (2009). Southern African biological soil crusts are ubiquitous and highly diverse in drylands, being restricted by rainfall frequency. *Microbial Ecology*, **57**: 229–47.
- Byun, Y. & Han, K. (2009). PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. *Bioinformatics*, **25**: 1435–1437.
- Caisová, L., Marin, B. & Melkonian, M. (2013). Consensus secondary structure of ITS2 in the Chlorophyta

- identified by phylogenetic reconstruction. *Protist*, **164**: 482–496.
- Coleman, A.W. (2000). The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist*, **151**: 1–9.
- Darienko, T., Friedl, T. & Pröschold, T. (2009). *Desmochloris mollenhaueri* – a new terrestrial ulvophycean alga from south-west African soils. (Molecular phylogeny and systematics of terrestrial Ulvophyceae I.). *Algological Studies*, **129**: 25–40.
- Darienko, T., Gustavs, L., Mudimu, O., Menendes, C., Schumann, R., Karsten, U., Friedl, T. & Pröschold, T. (2010). *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, **45**: 79–95.
- Darienko, T., Gustavs, L. & Pröschold, T. (2016). Species concept and nomenclatural changes within the genera *Elliptochloris* and *Pseudochlorella* (Trebouxiophyceae) based on an integrative approach. *Journal of Phycology*, **52**: 1125–1145.
- Darienko, T., Gustavs, L. & Pröschold, T. (2017). Toward a monograph of non-marine Ulvophyceae using an integrative approach (molecular phylogeny and systematics of terrestrial Ulvophyceae II.). *Phytotaxa*, **324**: 1–41.
- Demchenko, E., Mikhailyuk, T., Coleman, A.W. & Pröschold, T. (2012). Generic and species concepts in *Microglena* (previously the *Chlamydomonas monadina* group) revised using an integrative approach. *European Journal of Phycology*, **47**: 264–290.
- Eliáš, M. & Neustupa, J. (2009). *Pseudomarvania*, gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), a new genus for “budding” subaerial green algae *Marvania aerophytica* Neustupa et Šejnohová and *Stichococcus ampulliformis* Handa. *Fottea*, **9**: 169–177.
- Ettl, H. (1976). Die Gattung *Chlamydomonas* Ehrenberg (Chlamydomonas und die nächstverwandten Gattungen II). *Nova Hedwigia, Beiheft*, **49**: 1–1122.
- Ettl, H. (1983). Chlorophyta I. Phytomonadina. In *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, vol. 9: 1 (Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. & Mollenhauer, D., editors). Gustav Fischer, Stuttgart.
- Ettl, H. & Gärtner, G. (2013). *Syllabus der Boden-, Luft und Flechtenalgen*. 2nd ed. Spektrum Akademischer Verlag, Munich.
- Evans, R.D. & Lange, O.L. (2001). Biological soil crusts and ecosystem nitrogen and carbon dynamics. In *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management* (Belnap, J. & Lange, O.L., editors), 3–30. Springer, Berlin.
- Evans, R.D. & Belnap, J. (1999). Long-term consequences of disturbance on nitrogen dynamics in an arid ecosystem. *Ecology*, **80**: 150–160.
- Flechtner, V.R., Boyer, S.L., Johansen, J.R. & Denoble, M.L. (2002). *Spirirestis rafaelsis* gen. et sp. nov. (Cyanophyceae), a new cyanobacterial genus from arid soils. *Nova Hedwigia*, **74**: 1–24.
- Flechtner, V.R., Johansen, J.R. & Belnap, J. (2008). The biological soil crusts of the San Nicolas Island: enigmatic algae from a geographically isolated ecosystem. *Western North American Naturalist*, **68**: 405–436.
- Flechtner, V.R., Johansen, J.R. & Clark, W.H. (1998). Algal composition of microbiotic crusts from the central desert of Baja California, Mexico. *Great Basin Naturalist*, **58**: 295–311.
- Flechtner, V.R., Pietrasiak, N. & Lewis, L.A. (2013). Newly revealed diversity of green microalgae from wilderness areas of Joshua Tree National Park (JTNP). *Monographs of the Western North American Naturalist*, **6**: 43–63.
- Fučíková, K., Flechtner, V.R. & Lewis, L.A. (2012). Revision of the genus *Bracteacoccus* Tereg (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on a phylogenetic approach. *Nova Hedwigia*, **96**: 15–59.
- Fučíková, K., Lewis, P.O. & Lewis, L.A. (2014a). Putting *incertae sedis* taxa in their place: a proposal for ten new families and three new genera in Sphaeropleales (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, **50**: 14–25.
- Fučíková, K., Lewis, P.O. & Lewis, L.A. (2014b). Widespread desert affiliation of trebouxiophycean algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) including discovery of three new desert genera. *Phycological Research*, **62**: 294–305.
- Fučíková, K., Rada, J.C. & Lewis, L.A. (2011). The tangled taxonomic history of *Dictyococcus*, *Bracteacoccus* and *Pseudomuriella* (Chlorophyceae, Chlorophyta) and their distinction based on a phylogenetic perspective. *Phycologia*, **50**: 422–429.
- Garcia da Silva, T., Bock, C., Sant’Anna, C.L., Bagatini, I. L., Wodniok, S. & Vieira, A.A.H. (2017). Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): *rbcL*, 18S rDNA and ITS-2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, *Messastrum* gen. nov. and *Curvastrum* gen. nov. *Fottea, Olomouc*, **17**: 1–19.
- Hallmann, C., Stanek, L., Fritzlar, D., Hause-Reitner, D., Friedl, T. & Hoppert M. (2013). Molecular diversity of phototrophic biofilms on building stone. *FEMS Microbiology Ecology*, **84**: 355–372.
- Hauer, T., Bohunická, M., Johansen, J.R., Mares, J. & Berrendero-Gomez, E. (2014). Reassessment of the cyanobacterial family Microchaetaceae and establishment of new families Tolypothrichaceae and Godleyaceae. *Journal of Phycology*, **50**: 1089–1100.
- Hegewald, E. & Wolf, M. (2003). Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Acutodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae) as inferred from 18S rDNA and ITS-2 sequence comparisons. *Plant Systematics and Evolution*, **241**: 185–191.
- Hentschke, G.S., Johansen, J.R., Pietrasiak, N., Fiore, M.F., Rigonato, J., Sant’Anna, C.L. & Komárek, J. (2016). Phylogenetic placement of *Dapisostemon* gen. nov. and *Streptostemon*, two tropical heterocytous genera (Cyanobacteria). *Phytotaxa*, **245**: 129–143.
- Hodač, L., Brinkmann, N., Mohr K.I., Arp, G., Hallmann C., Ramm, J., Spitzer, K. & Friedl, T. (2015). Diversity of microscopic green algae (Chlorophyta) in calcifying biofilms of two karstic streams in Germany. *Geomicrobiology Journal*, **32**: 275–290.
- Hodač, L., Hallmann, C., Spitzer, K., Elster, J., Faßhauer, F., Brinkmann, N., Lepka, D., Diwan, V. & Friedl, T. (2016). Widespread green algae *Chlorella* and *Stichococcus* exhibit polar-temperate and tropical-temperate biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, **92**: fiw122.
- Hrouzek, P., Lukešová, A., Mareš, J. & Ventura, S. (2013). Description of the cyanobacterial genus *Desmonostoc* gen. nov. including *D. muscorum* comb. nov. as a distinct, phylogenetically coherent taxon related to the genus *Nostoc*. *Fottea, Olomouc*, **13**: 201–213.
- Johansen, J.R. & Rushforth, S.R. (1985). Cryptogamic soil crusts: seasonal variation in algal populations in the Tintic Mountains, Juab County, Utah. *The Great Basin Naturalist*, **45**: 14–21.
- Karsten, U. & Holzinger, A. (2012). Light, temperature, and desiccation effects on photosynthetic activity, and drought-induced ultrastructural changes in the green alga *Klebsormidium dissectum* (Streptophyta) from a High Alpine soil crust. *Microbial Ecology*, **63**: 51–63.

- Karsten, U. & Holzinger, A. (2014). Green algae in alpine biological soil crust communities: acclimation strategies against ultraviolet radiation and dehydration. *Biodiversity and Conservation*, **23**: 1845–1858.
- Karsten, U., Lütz, C. & Holzinger, A. (2010). Ecophysiological performance of the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Charophyceae, Streptophyta) isolated from an alpine soil crust with an emphasis on desiccation stress. *Journal of Phycology*, **46**: 1187–1197.
- Kaštovská, K., Elster, J., Stibal, M. & Šantručková, H. (2005). Microbial assemblages in soil microbial succession after glacial retreat in Svalbard (High Arctic). *Microbial Ecology*, **50**: 396–407.
- Katoh, K. & Toh, H. (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, **9**: 286–298.
- Kaufnerová, V. & Eliáš, M. (2013). The demise of the genus *Scotiellopsis* Vinatzer (Chlorophyta). *Nova Hedwigia*, **97**: 415–428.
- Kawasaki, Y., Nakada, T. & Tomita, M. (2015). Taxonomic revision of oil-producing green algae, *Chlorococcum oleofaciens* (Volvocales, Chlorophyceae), and its relatives. *Journal of Phycology*, **51**: 1000–1016.
- Komárek, J. (2013). Cyanoprokaryota. Heterocytous genera. In *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd. 19/3. Springer Spektrum, Berlin.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. (2005). Cyanoprokaryota. Oscillatoriales. In *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd 19/2. Spektrum Akademischer Verlag, Munich.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Ventura, S., Turicchia, S. & Šmarda, J. (2009). The cyanobacterial genus *Phormidesmis*. *Algological Studies*, **129**: 41–59.
- Kondratyeva, N.V. (1968). Class Hormogoniophyceae. In *Identification Manual of Freshwater Algae of Ukrainian SSR*. Nauk. Dumka Press, Kiev. (In Ukrainian.)
- Korshikov, A.A. (1953). Sub-Class Protococcineae. Vacuolales and Protococcales. *Identification Manual of Freshwater Algae of Ukrainian SSR*. V. Akad. Nauk USSR, Kiev. (In Ukrainian.)
- Krienitz, L., Hegewald, E.H., Hepperle, D., Huss, V.A.R., Rohr, T. & Wolf, M. (2004). Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia*, **43**: 529–542.
- Krienitz, L., Klein, G. & Böhm, H. (1986). Morphology and ultrastructure of some species of the genus *Monoraphidium* (Chlorellales). II. *Monoraphidium contortum*, *M. convolutum* and *M. pusillum*. *Algological Studies*, **44**: 331–350.
- Kulichová, J., Škaloud, P. & Neustupa, J. (2014). Molecular diversity of green corticolous microalgae from two sub-Mediterranean European localities. *European Journal of Phycology*, **49**: 345–355.
- Leliaert, F., Verbruggen, H., Vanormelingen, P., Steen, F., López-Bautista, J.M., Zuccarello, G.C. & De Clerck, O. (2014). DNA-based species delimitation in algae. *European Journal of Phycology*, **49**: 179–196.
- Lewis, L.A. & Flechtner, V.R. (2004). Cryptic species of *Scenedesmus* (Chlorophyta) from desert soil communities of Western North America. *Journal of Phycology*, **40**: 1127–1137.
- Lokhorst, G.M. (1996). Comparative taxonomic studies on the genus *Klebsormidium* (Charophyceae) in Europe. *Cryptogamic Studies*, **5**. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Lukešová, A. (2001). Soil algae in brown coal and lignite post-mining areas in central Europe (Czech Republic and Germany). *Restoration Ecology*, **9**: 341–350.
- Marin, B., Klingberg, M. & Melkonian, M. (1998). Phylogenetic relationships among the Cryptophyta: analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences support the monophyly of extant plastid-containing lineages. *Protist*, **149**: 265–276.
- Marin, B., Nowack, E.C.M. & Melkonian, M. (2005). A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist*, **156**: 425–432.
- Marin, B., Palm, A., Klingberg, M. & Melkonian, M. (2003). Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing Euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist*, **154**: 99–145.
- Marvan, P. & Komárek, J. (1984). Weighting and scaling of features in numerical evaluation of coccal green algae (genera of the Selenastraceae). *Algological Studies*, **37**: 363–399.
- Matsuzaki, R., Hara, Y. & Nozaki, H. (2012). A taxonomic revision of *Chloromonas reticulata* (Volvocales, Chlorophyceae), the type species of the genus *Chloromonas*, based on multigene phylogeny and comparative light and electron microscopy. *Phycologia*, **51**: 74–85.
- Matsuzaki, R., Nakada, T., Hara, Y. & Nozaki, H. (2013). Description of *Chloromonas kasaiae* sp. nov. (Volvocales, Chlorophyceae), based on comparative electron microscopy and molecular data. *Phycologia*, **52**: 239–245.
- Mikhailuyuk, T., Glaser, K., Holzinger, A. & Karsten, U. (2015). Biodiversity of *Klebsormidium* (Streptophyta) from alpine biological soil crusts (Alps, Tyrol, Austria, and Italy). *Journal of Phycology*, **51**: 750–767.
- Mikhailuyuk, T., Lukešová, A., Glaser, K., Holzinger, A., Obwegeser, S., Nyporko, S., Friedl, T. & Karsten, U. (2018). New taxa of streptophyte algae (Streptophyta) from terrestrial habitats revealed using an integrative approach. *Protist*, **169**: 406–431.
- Miscoe, L.H., Johansen, J.R., Vaccarino, M.A., Pietrasiak, N. & Sherwood, A.R. (2016). Novel cyanobacteria from caves on Kauai, Hawaii. *Bibliotheca Phycologica*, **120**: 75–152.
- Moewus, L. (1951). Systematische Bestimmung einzelliger grüner Algen auf Grund von Kulturversuchen. *Botaniska Notiser*, **4**: 287–309.
- Mühlsteinová, R., Johansen, J.R., Pietrasiak, N., Martin, M. P., Osorio-Santos, K. & Warren, S.D. (2014). Polyphasic characterization of *Trichocoleus desertorum* sp. nov. (Pseudanabaenales, Cyanobacteria) from desert soils and phylogenetic placement of the genus *Trichocoleus*. *Phytotaxa*, **163**: 241–261.
- Nakada, T., Misawa, K. & Nozaki, H. (2008). Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses. *Molecular Phylogeny and Evolution*, **48**: 281–291.
- Neustupa, J., Eliáš, M. & Šejnohová, L. (2007). A taxonomic study of two *Stichococcus* species (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) with a starch-enveloped pyrenoid. *Nova Hedwigia*, **84**: 51–63.
- Neustupa, J., Eliáš, M., Škaloud, P., Němcová, Y. & Šejnohová, L. (2011). *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga. *Phycologia*, **50**: 57–66.
- Nozaki, H., Aizawa, K. & Watanabe, M.M. (1994). A taxonomic study of four species of *Carteria* (Volvocales, Chlorophyta) with cruciate anterior papillae, based on cultured material. *Phycologia*, **33**: 239–247.
- Nozaki, H., Ito, M., Watanabe, M.M., Takano, H. & Kuroiwa, T. (1997). Phylogenetic analysis of

- morphological species of *Carteria* (Volvocales, Chlorophyta) based on *rbcL* gene sequences. *Journal of Phycology*, **33**: 864–867.
- Osorio-Santos, K., Pietrasiak, N., Bohunická, M., Miscoe, L. H., Kováčik, L., Martin, M.P. & Johansen, J.R. (2014). Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification. *European Journal of Phycology*, **49**: 450–470.
- Patzelt, D.J., Hodač, L., Friedl, T., Pietrasiak, N. & Johansen, J.R. (2014). Biodiversity of soil cyanobacteria in the hyper-arid Atacama Desert, Chile. *Journal of Phycology*, **50**: 698–710.
- Perkerson, R.B. III, Johansen, J.R., Kováčik, L., Brand, J., Kastovsky, J. & Casamatta, D.A. (2011). A unique pseudanabaenalean (Cyanobacteria) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data. *Journal of Phycology*, **47**: 1397–1412.
- Pröschold, T., Harris, E.H. & Coleman, A.W. (2005). Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, **170**: 1601–1610.
- Pröschold, T., Marin, B., Schlösser, U.G. & Melkonian, M. (2001). Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chloromonas* Gobi, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist*, **152**: 265–300.
- Rindi, F., Mikhailyuk, T.I., Sluiman, H.J., Friedl, T. & López-Bautista, J.M. (2011). Phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **58**: 218–231.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**: 1572–1574.
- Rosentreter, R., Eldridge, D.J., Westberg, M., Williams, L. & Grube, M. (2016). Structure, composition, and function of biocrust lichen communities. In *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management* (Weber, B., Büdel, B., Belnap, J., editors), 121–138. Springer, Berlin.
- Rybalka, N., Wolf, M., Andersen, R.A. & Friedl, T. (2013). Congruence of chloroplast- and nuclear-encoded DNA sequence variations used to assess species boundaries in the soil microalga *Heterococcus* (Stramenopiles, Xanthophyceae). *BMC Evolutionary Biology*, **13**: 39.
- Schulz, K., Mikhailyuk, T., Drefler, M., Leinweber, P. & Karsten, U. (2016). Biological soil crusts from coastal dunes at the Baltic Sea: cyanobacterial and algal biodiversity and related soil properties. *Microbial Ecology*, **71**: 178–193.
- Sciuto, K., Lewis, L.A., Verleyen, E., Moro, I. & La Rocca, N. (2015). *Chodatodesmus australis* sp. nov. (Scenedesmaceae, Chlorophyta) from Antarctica, with the emended description of the genus *Chodatodesmus*, and circumscription of *Flechtneria rotunda* gen. et sp. nov. *Journal of Phycology*, **51**: 1172–1188.
- Sciuto, K., Moschin, E. & Moro, I. (2017). Cryptic cyanobacterial diversity in the giant cave (Trieste, Italy): the new genus *Timaviella* (Leptolyngbyaceae). *Cryptogamie, Algologie*, **38**: 285–323.
- Seppelt, R.D., Downing, A.J., Deane-Coe, K.K., Zhang, Y. & Zhang, J. (2016). Bryophytes within biological soil crusts. In *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management* (Weber, B., Büdel, B., Belnap, J., editors), 101–120. Springer, Berlin.
- Singh, P., Shaikh, Z.M., Gaysina, L.A., Suradkar, A. & Samanta, U. (2016). New species of *Nostoc* (Cyanobacteria) isolated from Pune, India, using morphological, ecological and molecular attributes. *Plant Systematics and Evolution*, **302**: 1381–1394.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriology Reviews*, **35**: 171–205.
- Starr, R.C. & Zeikus, J.A. (1993). UTEX — the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *Journal of Phycology*, **29**(Suppl): 1–106.
- Strunecký, O., Komárek, J., Johansen, J., Lukešová, A. & Elster, J. (2013). Molecular and morphological criteria for revision of the genus *Microcoleus* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, **49**: 1167–1180.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**: 2725–2729.
- Tsarenko, P.M. (1990). *Brief Identification Manual of Chlorococcalean Algae of Ukrainian SSR*. Naukova Dumka, Kiev. (In Russian.)
- Tschaikner, A., Gärtner, G. & Kofler, W. (2008). *Coelastrella aeroterrestica* sp. nov. (Chlorophyta, Scenedesmoideae) – a new, obviously often overlooked aeroterrestrial species. *Algological Studies*, **128**: 11–20.
- Uher, B., Aboal, M. & Kovacik, L. (2005). Epilithic and chasmoendolithic phycoflora of monuments and buildings in South-Eastern Spain. *Cryptogamie, Algologie*, **26**: 275–358.
- Weber, B., Büdel, B. & Belnap, J. (2016). *Biological Soil Crusts: An Organizing Principle in Drylands*. Springer, Cham.
- Wilmotte, A., Van der Auwera, G. & De Wachter, R. (1993). Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC75 18, and phylogenetic analysis. *FEBS Letters*, **317**: 96–100.
- Wong, F.K.Y., Lacap, D.C., Lau, M.C.Y., Aitchison, J.C., Cowan, D.A. & Pointing, S.B. (2010). Hypolithic microbial community of quartz pavement in the high-altitude tundra of Central Tibet. *Microbial Ecology*, **60**: 730–739.
- Wu, Y., Rao, B., Wu, P., Liu, Y., Li, G. & Li, D. (2013). Development of artificially induced biological soil crusts in fields and their effects on top soil. *Plant and Soil*, **370**: 115–124.
- Zammit, G., Billi, D., Shubert, E., Kaštovský, J. & Albertano, P. (2011). The biodiversity of subaerophytic phototrophic biofilms from Maltese hypogea. *Fottea*, **11**: 187–201.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, **31**: 3406–3416.

1.2. Водорості і ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок прибережних екосистем Чорного та Азовського морів (Україна)

1.2.1. Водорості і ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок приморських екосистем мису Казантип (Азовське море, Україна)

Diversity of Terrestrial Algae of Cape Kazantip (the Sea of Azov, Ukraine) and Some Remarks on their Phylogeny and Ecology*

Mikhailyuk T.¹, Vinogradova O.¹, Glaser K.², Demchenko E.¹, & Karsten U.²

¹ *N.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine,*

2 Tereshchenkovskaya Str., Kiev 01004, Ukraine

² *University of Rostock, Institute of Biol. Sci., Department of Appl. Ecology and Phycology,*

3 Albert-Einstein-Strasse, Rostock D-18057, Germany

t-mikhailyuk@ukr.net

ABSTRACT: The article summarizes the results of a study on terrestrial algae of Cape Kazantip, conducted during the summer of 2012, on the territory of the Kazantip Nature Reserve and its environs. Samples of biological soil crusts from the coquina beach and clay scree, as well as lithophytic algal communities, were studied by direct light microscopy with subsequent culturing. For a number of strains of cyanobacteria and eukaryotic algae, phylogenetic analyses based on the nucleotide sequence of the 16S/18S *r*RNA gene, as well as the 16S-23S ITS region/ITS-1,2 were performed. The data clarified species identity and taxonomic position, and were to make a few interesting floristic records, supplementing the algal flora of Ukraine with new taxa of the genera *Oculatella* Zammit, Billi et Albertano, *Timaviella* Sciuto et Moro, *Roholtiella* Bohunická, Pietrasiak et Johansen, *Bracteacoccus* Tereg, *Interfilum* Chodat. In total, 73 species were identified from the divisions of *Cyanoprokaryota* (35), *Chlorophyta* (23), *Streptophyta* (5), and *Ochrophyta* (10). Lithophyton and soil crusts differed markedly in species diversity, taxonomic structure, and the dominant algal complex. Only 30.1% of the identified species were found in both types of habitats, while 41 species occurred in rock communities. Here, a high diversity of cyanobacteria, especially representatives of the order *Nostocales* and the group *Gloeocapsa* s. l., as well as *Trebouxiophyceae* and *Ulvophyceae* among green algae, were recorded. On limestone, in the chasmoendolithic communities, dominant species were *G. punctata* Nägeli and *Ctenocladus circinnatus* Borzi, while on the rock surface *Desmococcus olivaceus* (Pers. ex Ach.) J.R. Laundon and *Trentepohlia* sp. dominated. In the hypolithic communities on quartz, filamentous cyanobacteria prevailed. In biological crusts on the coquina and clay, 54 species were identified. Cyanobacteria were leading both in the number of species (42.6% of the total diversity) and in quantitative development. Species

* Originally published in *Algologia*, 2018, 28(4), pp. 363–386

of genera *Microcoleus* Desmazières ex Gomont, *Coleofasciculus* Siegesmund, Johansen et Friedl, *Hassallia* Berkeley ex Bornet et Flahault, *Nostoc* Vaucher ex Bornet et Flahault, *Scytonema* Agardh ex Bornet et Flahault, and some others dominated in the crusts studied. *Chlorophyta* (33.3%), among which the proportion of representatives of the class *Chlorophyceae* increased markedly, were the second in species diversity, but their abundance were low. Only once *Klebsormidium mucosum* (J.B. Petersen) Lokhorst (*Streptophyta*) dominated in a crust on the clay scree. Crusts from the coquina had higher species richness of cyanobacteria and algae (45 species, an average of 13.5 species per sample) as compared with clay screes (24/9.6). Among species discovered in the present study, only 13.7% were previously cited for this territory.

KEY WORDS: cyanopro bacteria, microalgae, terrestrial communities, lithophyton, soil crusts, Cape Kazantip, new records, Ukraine, 16S/18S *r*RNA, 16S-23S ITS region/ITS-1,2

INTRODUCTION

Sustainable and stable functioning of any ecosystem depends on maintaining the biogeochemical cycles, species diversity, and productivity (Chapin et al., 1997). Algae that live in non-aquatic habitats, especially under conditions of water deficiency, which severely limits the development of higher plants, are interesting both from the theoretical and applied point of view. In such dry habitats, the main primary producers are biological crusts consisting of cryptogams. In addition, species inhabiting ecologically harsh habitats often have unique physiological and biochemical characteristics and so their strains are of great interest in biotechnology (Biological..., 2003, 2016; Elbert et al., 2012; Varshney et al., 2015).

In Ukraine, interest in the study of biological crusts has arisen relatively recently (Kostikov et al., 2001). Data on terrestrial algae of Crimea mainly concern protected areas (Vinogradova, 1989; 1994; Prikhodkova, 1992; Kostikov and Darienko, 1996; Darienko, 2000). The lithophilic algae were studied in the Karadag Nature Reserve (Voytsekhovich et al., 2009), as well as the photobionts of lichens (Voytsekhovich, 2008, Voytsekhovich and Beck, 2016). Algae biodestructors of cultural monuments were studied in Massandra and Livadia castles (Darienko et al., 2008).

Data on terrestrial algae of Kazantip Nature Reserve are still scarce. Previously, studies covered only marine algal flora of the Kazantip Peninsula. An overview of these studies and an annotated list of phytobenthos (with the exception of diatoms) are given by Sadogurskiy et al. (2006). Later, studies of the microphytobenthos of the reserve were conducted with particular attention to diatom algae (Bondarenko, 2012a, b, 2013, 2017). Preliminary information on the taxonomic composition and peculiarities of epigeal and lithophytic communities were published earlier (Mikhailyuk, 2014), as well as some results

of molecular phylogenetic studies revealed taxa new for Ukraine (Mikhailyuk et al., 2016) and for science (Vinogradova et al., 2017).

The aim of the present article is to provide updated data on the species composition of terrestrial algae of Cape Kazantip with particular attention to their phylogeny and ecology.

MATERIALS AND METHODS

The material for the present study were collected in terrestrial habitats of Cape Kazantip (the territory of the Kazantip Natural Reserve and the spit near Lake Aktash) in summer 2012. In total, 14 samples were collected and processed, including 5 samples of lithophytic algae (epi- and chasmoendolithic communities on limestone outcrops, and hypolithic communities on quartz debris) and 9 samples of biological soil crusts from the conquina beach and clay scree. Algal biofilms from limestone and quartz were collected together with the substrate and placed in paper envelopes. Fragments of crusts (about 6 × 6 cm in size) were collected with a scalpel, if possible, intact, and transferred to paper boxes or Petri dishes. In the laboratory, the samples were dried and stored in the dark. Further processing of samples, including cultural, and morphological and molecular phylogenetic studies, were conducted in the Laboratory of Applied Ecology and Phycology, University of Rostock (Germany).

First, a small amount of crust were placed in Petri dishes with Bold (1N BBM) agarized medium (Bischoff and Bold, 1963). Cultures were grown under standard laboratory conditions, with 12-hour cycles of light and dark phases and photon fluence rates of 25 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ at $+20 \pm 5$ °C. The species composition of cyanobacteria and algae were studied by direct microscopy, in enrichment and unialgal cultures. Unialgal cultures were isolated using a stereomicroscope Olympus ZS40 (Tokyo, Japan) and purified from other organisms through multiple passages. Purified strains were maintained under the same conditions in media 3N BBM (Bischoff and Bold, 1963) and BG-11 (Stanier et al., 1971). The studies were carried out using Olympus IX70 and BX51 light microscopes with Nomarsky differential interference optics (DIC). Photomicrographs were taken with digital cameras ColorView II and Olympus UC30 attached to microscopes, and processed by software analySIS and cellSens Entry.

For a number of strains of cyanobacteria and green algae, molecular phylogenetic analyses based on nucleotide sequence of the 16S/18S *r*RNA gene, as well as the 16S-23S ITS region of cyanobacteria or ITS-1,2 of green algae were performed. Genomic DNA were extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences of the 16S/18S *r*RNA gene together with 16S-23S ITS/ITS-1,2 region were amplified using a set of Taq PCR Mastermix Kit (Qiagen GmbH) in a thermocycler T gradient Thermoblock (Biometra,

Germany) under the conditions described in our previous paper (Mikhalyuk et al., 2016). For cyanobacteria, primers SSU-4-forw and ptLSU C-D-rev (Marin et al., 2005) were used, for green algae a combination of standard – EAF3, ITS055R (Marin et al., 1998, 2003) and algal specific primers – G800R, G730F and G500F (T. Pröschold, pers. comm.). PCR products were cleaned using a Qiagen PCR purification kit (Qiagen GmbH) according to the manufacturer's instructions. Cleaned PCR products were sequenced commercially by Qiagen Company using primers SSU-4-forw, Wil 6, Wil 12, Wil 14, Wil 5, Wil 9, Wil 16, and ptLSU C-D-rev for cyanobacteria (Wilmotte et al., 1993; Marin et al., 2005) and G800R, N82F, 536R, 920R, 1400R, 920F, 1400F, GF, ITS2F, and ITS05R (Marin et al., 1998, 2003; Pröschold et al., 2005) for green algae. The resulting sequences were assembled and edited using Geneious software (version 8.1.8; Biomatters). They were deposited in GenBank under the accession numbers given in Figs 3–10.

For comparison with the original strains, the nucleotide sequences of cyanobacteria and green algae from the NCBI as well as BLASTn queries (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) to search for the closest relatives were used. Multiple alignment of the nucleotide sequences for phylogeny based on the 16S/18S *r*RNA gene were made using MAFFT web server (version 7, Katoh & Standley 2013) followed by manual editing in the program BioEdit (version 7.2). Alignment for the phylogeny of the 16S-23S ITS/ITS-1,2 region were performed manually in BioEdit, taking into account the secondary structure of the RNA in the region. The evolutionary model that is best suited to the used database were selected on the basis of the lowest AIC value (Akaike, 1974) calculated in MEGA (version 6, Tamura et al., 2013). Phylogenetic trees were constructed in the program MrBayes 3.2.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003), using an evolutionary model GTR + G + I, with 5,000,000 generations; for Klebsormidiales the model K2 + G was chosen. Two of the four runs of the Markov chain Monte Carlo were made simultaneously, with the trees, taken every 500 generations. Split frequencies between runs at the end of the calculations were below 0.01. The trees selected before the likelihood rate reached saturation were subsequently rejected. The reliability of tree topology were verified by maximum-likelihood analysis (ML), using the program GARLI 2.0, and the bootstrap support were calculated with 1,000 replicates.

The identification were based on a number of monographs (Ettl, 1978; Komárek and Fott, 1983; Lokhorst, 1996; Komárek and Anagnostidis, 2005; Kovalenko, 2009; Komárek, 2013; Ettl and Gärtner, 2014; Škaloud et al., 2018), as well as some articles on the phylogeny of certain taxa (Fučíková et al., 2012; Kaufnerová and Eliáš, 2012; Darienko et al., 2015, 2017; Kawasaki et al., 2015; Sciuto et al., 2017, etc.). The dominating species were identified by the results of direct microscopy, the relative abundance of the species were assessed according to the Starmah scale (Algae..., 1989). The frequency of occurrence (F) were determined as the ratio of the number of samples in which the species were recorded to the total number of samples studied.

For cyanoprokaryotes, we followed the classification system of Komárek et al. (2014) with some changes that appeared after its publication (Guiry and Guiry, 2018). Eukaryotic algae are given according to the system adopted in the compendiums, “Soil Algae of Ukraine” (Kostikov et al., 2001) and “Algae of Ukraine” (2009, 2011) taking into account changes in the modern interpretation of *Chlorophyta* s. l. (Guiry and Guiry, 2018).

RESULTS AND DISCUSSION

In the terrestrial habitats of Cape Kazantip, 73 species from four algal divisions were identified. Cyanoprokaryotes (47.9%) and green algae (31.5%) lead in species diversity; the percentage of other divisions ranged 6.8–13.7% (Table 1).

TABLE 1: Taxonomic structure of terrestrial algae of Cape Kazantip

Taxon (division, class, order)*	Number of species, units/%		
	Litophyton	Soil crusts	In total
Cyanoprokaryota	22/53.7	23/42.6	35/47.9
<i>Cyanophyceae</i>	22/53.7	23/42.6	35/47.9
<i>Chroococcales</i>	6/14.6	1/1.9	7/9.6
<i>Synechococcales</i>	8/19.5	10/18.5	12/16.4
<i>Oscillatoriales</i>	1/2.4	3/5.6	3/4.1
<i>Nostocales</i>	7/17.1	9/16.7	13/17.8
Chlorophyta	15/36.6	18/33.3	23/31.5
<i>Chlorophyceae</i>	3/7.3	8/14.8	8/11.0
<i>Trebouxiophyceae</i>	9/22.0	10/18.5	12/16.4
<i>Ulvophyceae</i>	3/7.3	0/0	3/4.1
Streptophyta	1.2/4	5/9.3	5/6.8
<i>Klebsormidiophyceae</i>	1.2/4	5/9.3	5/6.8
Ochrophyta	4/9.8	8/14.8	10/13.7
<i>Xanthophyceae</i>	0/0	1/1.9	1/1.4
<i>Eustigmatophyceae</i>	0/0	2/3.7	2/2.7
<i>Bacillariophyceae</i>	4/9.8	5/9.3	7/9.6
In total, units/%	41/100	54/100	73/100

* Since the taxonomy of many groups of algae is still under revision, the taxonomic structure of algal flora is discussed here using the most well-established taxonomic categories of the highest rank: orders in cyanoprokaryotes and classes in eukaryotic algae.

The taxonomic structure of the investigated flora were quite diverse. Among the orders of cyanoprokaryotes, *Nostocales* (17.8%) and *Synechococcales* (16.4%) rank top in species number; among the classes of eukaryotic algae – *Trebouxiophyceae* (16.4%) and *Chlorophyceae* (11.0). The generic spectrum of terrestrial algoflora include 50 genera, two-thirds (66%) of which are represented by 1 species. The genera *Nostoc* Vaucher ex Bornet et Flahault, *Leptolyngbya* Anagnostidis et Komárek (8.2% of identified species), and *Klebsormidium* Silva, Mattox et Blackwell (5.5%) were the most diversely represented in the studied habitats.

The occurrence of most species were low: 21 of them (28.8%) were found in one sample only. The most common in the studied habitats were *Microcoleus vaginatus*¹ (F = 78.6%), *Timaviella edaphica*, *Stichococcus bacillaris*, *Hantzschia amphioxys* (F = 57.1%), and *Bracteacoccus* cf. *minor*, *Nannochloris* sp., *Desmococcus olivaceus*, and *Elliptochloris subsphaerica* (F = 42.9% for each).

Lithophyton and biological soil crusts differed markedly in species diversity, taxonomic structure, and the dominant complex (Table 2). Only 22 species (30.1% of the total) were found in both types of habitats. In cultures isolated from limestone and quartz samples, 41 species had been identified; of these, more than half (53.7%) were cyanobacteria, followed by green algae (36.6%), and *Ochrophyta* species represented by diatoms (9.8%). Streptophytes played an insignificant role in the taxonomic structure of the lithophyton (2.4%); the representatives of *Xanthophyceae* and *Eustigmatophyceae* were not found.

At Cape Kazantip, macroscopical growth of lithophytic algae occurred both on the surface and in microcracks of rocks. Epilithic communities usually occupied shaded lower portions of limestone boulders, often facing the sea. Chasmoendolithic communities, inhabiting microcracks, exist in less variable and, accordingly, more favorable conditions. Ecological differences affected the composition of algal groups: we found 15 species in epilithic communities, and 32 species as chasmoendoliths. The dominant community complex was also different: *Gloeocapsa punctata* and *Ctenocladus circinnatus* (Fig. 1, *i-l*) abundantly developed in limestone cracks, while *Desmococcus olivaceus* (Fig. 1, *f*) and *Trentepohlia* sp. (Fig. 1, *m, n*) formed macroscopic growth on rock surfaces. The latter two species are typical aerophiles, known as the main components of the overgrowths of stones and tree bark in the temperate zone (Hoffmann, 1989; Nienow, 1996). *Gloeocapsa punctata* is a subaerophytic species typical for wet rocks (Kovalenko, 2009). *Ctenocladus circinnatus* is known from coastal ecotopes and other terrestrial habitats, mainly with increased salinity (Blinn, 1971; Liu et al., 2016), as well as in chasmoendolithic communities (Arino et al., 1996).

¹ The names of the authors of taxa are in Table 2.

The lithophyton also includes the hypolithic algal communities inhabiting the lower surface of fragments of quartz scattered on the clay slopes of the cape. This group is a transition between edaphone and lithophyton. This habitat is characterized by wet and moderately shaded conditions. Nine species of algae were found here, most of which (55.6%) are cyanobacteria. *Oculatella ucrainica* (Fig. 2, c) is noted as the species abundantly growing in cultures.

In general, the characteristic features of the lithophytic communities of Cape Kazantip represent high diversity of cyanobacteria, especially representatives of the order *Nostocales* and the *Gloeocapsa* s. l. group, as well as species of *Trebouxiophyceae* and *Ulvophyceae* among chlorophytes (Table 1). The predominance of representatives of these taxonomic groups is typical for the lithophytic communities of the temperate zone (Mikhailyuk, 2013).

As is known, biological soil crusts are formed in habitats free of vascular plants or if the plant cover is poor. These can be arid ecosystems, shores of water bodies with a migratory coastline, and the landscapes in which active erosion processes takes place (Büdel, 2002; Biological..., 2003, 2016). The last 2 examples refer to Cape Kazantip, where biological soil crusts were taken from the surface of conquina beach and clay outcrops. The main role in their formation belonged to cyanobacteria and eukaryotic algae. In total, 54 species from four divisions were identified (Table 1). The most diverse groups were cyanobacteria (42.6%) and green algae (33.3%), among which the proportion of *Chlorophyceae* significantly increased. They are represented by mostly common soil species (Kostikov et al., 2001).

The biological soil crusts from the surface of the conquina beach were more diverse (45 species, on average, 13.5 species per sample) compared to clay outcrops (24 species, on average, 9.6 species per sample). The taxonomic structure of algae also showed some differences. The percentage of diatoms (16.6%) and streptophytes (12.5%) on the clay surface is twice as high as in biological soil crusts than on conquina (8.8 and 6.7%, respectively). *Chlorophyta*, on the contrary, on conquina (35.6%) were more diverse than on clay (29.2%), mainly due to representatives of the class *Trebouxiophyceae*. However, in general, the composition of species found in biological soil crusts was largely similar: 62.5% of algae from clay outcrops were also found on the conquina beach (Table 2).

In most cases, cyanobacteria dominated in the studied biological soil crusts. Most often, it was *Microcoleus vaginatus* (Fig. 1, a, b) – a common crust-forming key species occurring in terrestrial conditions around the world (Biological..., 2003, 2016). It was accompanied by other filamentous cyanobacteria: *Scytonema ocellatum*, *Hassallia byssoidea* (Fig. 1, e), *Timaviella edaphica* (Fig. 2, d), and *Oculatella ucrainica* (Fig. 2, c). Sometimes, *Nostoc commune* and *N. edaphicum* formed macroscopic thalli. *Coleofasciculus chthonoplastes* (Fig. 1, c, d) joined the dominating complex on the saline areas of the Aktashsky spit. The streptophyte *Klebsormidium mucosum* (Fig. 1, h) appeared onle once as the dominant species in the biological soil crust from the clay outcrop.

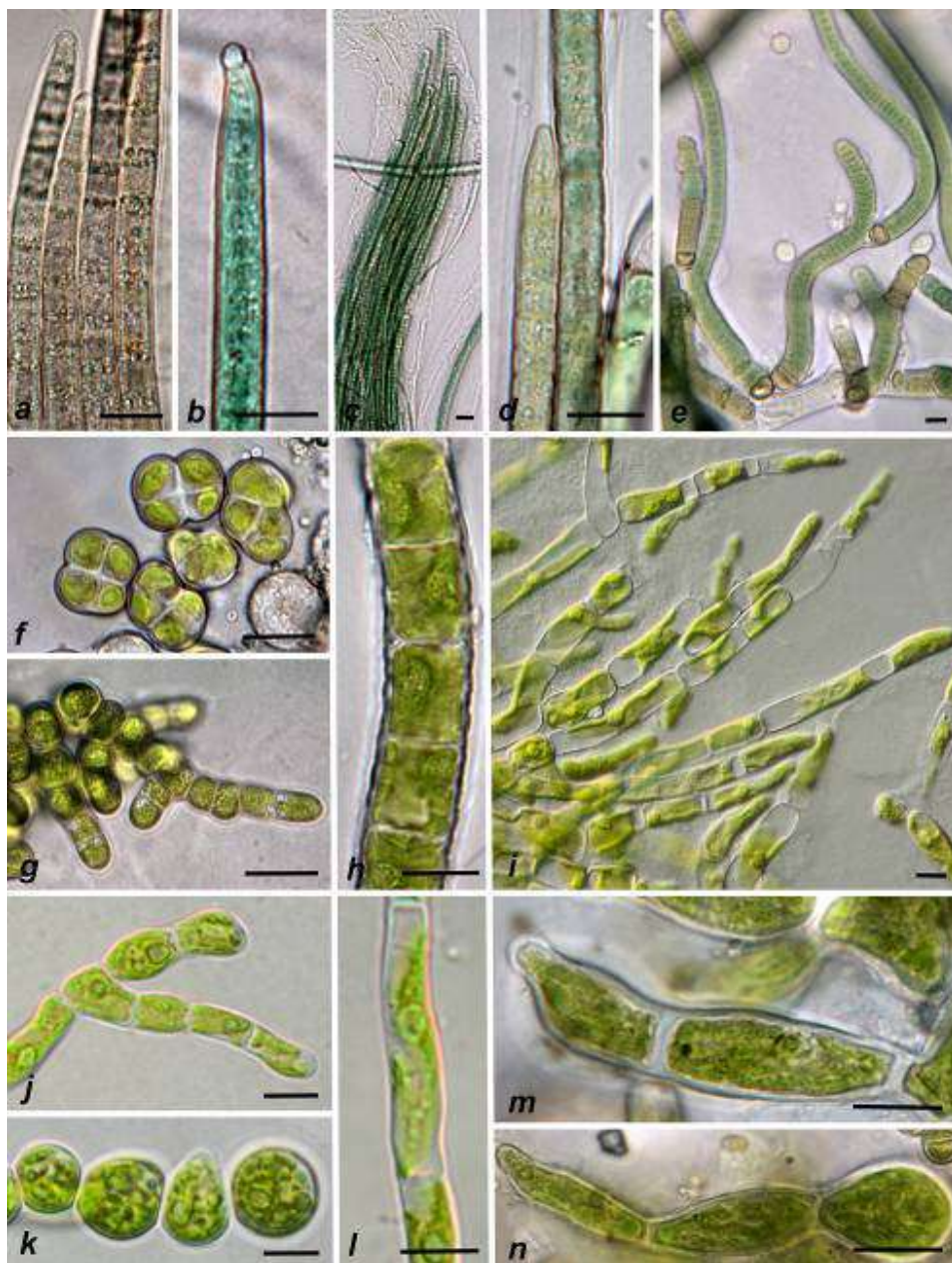


FIG. 1: Micrographs of cyanobacteria and algae dominant in terrestrial algal communities of Cape Kazantip: *a, b* – *Microcoleus vaginatus*, morphology of various strains; *c, d* – *Coleofasciculus chthonoplastes*; *e* – *Hassallia byssoidea*; *f, g* – *Desmococcus olivaceus*; *h* – *Klebsormidium mucosum*; *i-l* – *Ctenocladus circinnatus*; *m, n* – *Trentepohlia* sp. Scale 10 μm

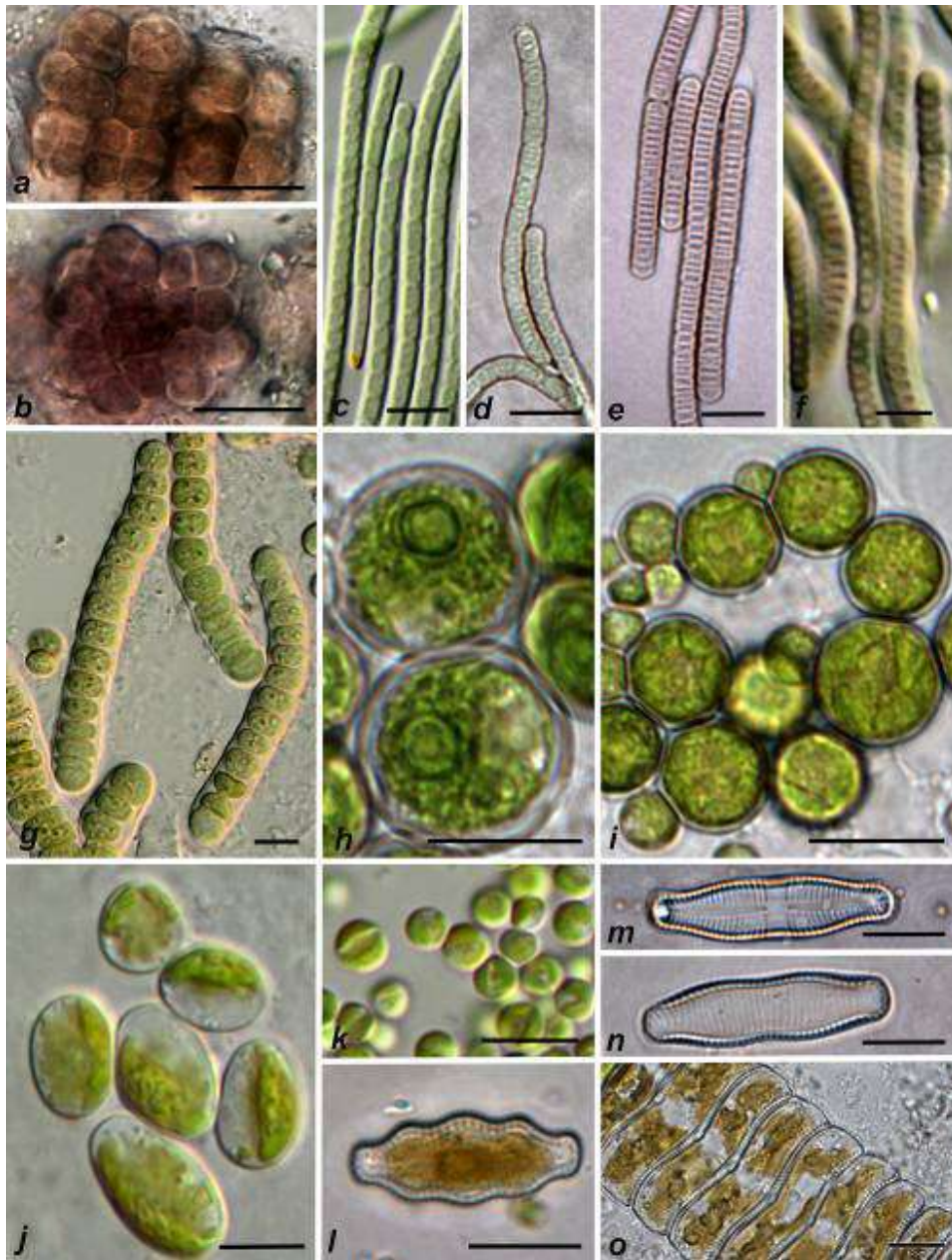


FIG. 2: Micrographs of new to the flora of Ukraine, rare and noteworthy species of cyanobacteria and algae identified in the terrestrial habitats of Cape Kazantip: *a, b* – *Gloeocapsopsis magma*; *c* – *Oculatella ucrainica*; *d* – *Timaviella edaphica*; *e, f* – "*Pseudophormidium*" *battersii*; *g* – *Roholtiella edaphica*; *h* – *Chlorococcum oleofaciens*; *i* – *Bracteacoccus* cf. *xerophilus*; *j* – *Interfilum paradoxum*; *k* – *Nannochloris* sp.; *l* – *Luticola nivalis*; *m-o* – *Achnanthes coarctata*. Scale 10 μ m

TABLE 2: Species composition of terrestrial algae of Cape Kazantip

Taxon	Lithophyton			Soil crusts	
	L1	L2	Q	1	2
CYANOPROKARYOTA					
CHROOCOCCALES					
<i>*Chondrocystis dermochroa</i> (Nägeli) Komárek et Anagnostidis	+	+			
<i>*Chroococcus lithophilus</i> Ercegovic		+			
<i>*Chroococcus minor</i> (Kütz.) Nägeli					+
<i>*Gloeocapsa atrata</i> Kütz.		+			
<i>*Gloeocapsa punctata</i> Nägeli		d			
<i>*Gloeocapsopsis crepidinum</i> (Thuret) Geitler ex Komárek		+			
<i>Gloeocapsopsis magma</i> (Brèbisson) Komárek et Anagnostidis	+	+			
SYNECHOCOCCALES					
<i>Leibleinia gracilis</i> (Rabenhorst ex Gomont) Anagnostidis et Komárek				+	
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>lagerheimii</i> (Gomont) Anagnostidis et Komárek					+
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>nostocorum</i> (Bornet ex Gomont) Anagnostidis et Komárek					+
<i>*Leptolyngbya foveolaria</i> (Gomont) Anagnostidis et Komárek				+	
<i>Leptolyngbya fragilis</i> (Gomont) Anagnostidis et Komárek		+			+
<i>Leptolyngbya henningsii</i> (Lemmermann) Anagnostidis		+			+
<i>Leptolyngbya hollerbachiana</i> (Elenkin) Anagnostidis et Komárek		+			
<i>Oculatella kazantipica</i> O.M. Vynogr. et Mikhailyuk					+
<i>Oculatella ucrainica</i> O.M. Vynogr. et Mikhailyuk			+	+	d
<i>Phormidesmis molle</i> (Gomont) Turicchia, Ventura, Komárková et Komárek			+	+	
<i>**Pseudophormidium" battersii</i> (Gomont) Anagnostidis	+	+			
<i>Timaviella edaphica</i> (Elenkin) O.M. Vynogr. et Mikhailyuk	+	+	+	+	d
OSCILLATORIALES					
<i>*Coleofasciculus chthonoplastes</i> (Thuret ex Gomont) Siegesmund, Johansen & Friedl					d
<i>Microcoleus vaginatus</i> Gomont ex Gomont	+	+		d	d
<i>Phormidium</i> cf. <i>corium</i> Gomont					+
NOSTOCALES					
<i>Calothrix</i> cf. <i>elenkinii</i> Kossinskaja		+			
<i>Calothrix parva</i> Erceg.		+			
<i>Desmonostoc muscorum</i> (C. Agardh ex Bornet et Flahault) Hrouzek et Ventura					+
<i>*Hassallia byssoidea</i> Hassall ex Bornet et Flahault				+	d
<i>Nostoc</i> cf. <i>calcicola</i> Brèbisson ex Bornet et Flahault		+			
<i>Nostoc</i> cf. <i>commune</i> Vaucher ex Bornet et Flahault					d
<i>Nostoc</i> cf. <i>microscopicum</i> Carmichael ex Bornet et Flahault		+			+
<i>Nostoc edaphicum</i> Kondratyeva	+		+		d
<i>Nostoc punctiforme</i> Hariot				+	+
<i>Nostoc</i> sp.		+			
<i>Roholtiella edaphica</i> Bohunická et Lukesová					+
<i>Scytonema ocellatum</i> Lyngbye ex Bornet et Flahault				+	d
<i>Tolypothrix</i> cf. <i>fasciculata</i> Gomont			+		+
CHLOROPHYTA					
CHLOROPHYCEAE					
<i>Bracteacoccus</i> cf. <i>minor</i> (Chodat) Petrová	+	+	+		+
<i>Bracteacoccus</i> cf. <i>xerophilus</i> Fuciková, Flechtner et Lewis	+			+	
<i>Chlorococcum oleofaciens</i> Trainor et Bold				+	+
<i>Chlorosarcinopsis arenicola</i> Groover et Bold					+
<i>Coelastrella terrestris</i> (Reisigl) Hegewald et Hanagata					+
<i>Coelastrella</i> sp.					+
<i>Lobochlamys</i> sp.				+	+
<i>Pseudomuriella</i> sp.		+		+	+

TREBOUXIOPHYCEAE					
<i>Chlorella vulgaris</i> Beij.					+
<i>Chloroidium ellipsoideum</i> (Gerneck) Darienko et al.		+			+
<i>Coccomyxa simplex</i> Mainx	+				+
<i>Desmococcus olivaceus</i> (Pers. ex Ach.) Laundon	d	+	+		+
<i>Diplosphaera cf. chodatii</i> Bial. emend. Vischer		+			+
<i>Elliptochloris subsphaerica</i> (Reisigl) Ettl et Gärtner		+	+	+	
<i>Gloeocystis</i> sp.			+		
<i>Leptosira erumpens</i> (Deason et Bold) Lukešová					+
<i>Nannochloris</i> sp.		+		+	+
<i>Neocystis</i> sp.					+
<i>Stichococcus</i> sp.	+	+		+	+
<i>Trebouxia</i> sp.		+			
ULVOPHYCEAE					
<i>Ctenocladus circinnatus</i> Borzi		d			
<i>Pseudendoclonium</i> sp.		+			
<i>Trentepohlia</i> sp.	d	+			
STREPTOPHYTA					
KLEBSORMIDIOPHYCEAE					
<i>Interfilum paradoxum</i> Chodat et Topali					+
<i>Klebsormidium cf. flaccidum</i> (Kütz.) P.C. Silva et al.	+			+	
<i>Klebsormidium mucosum</i> (Petersen) Lokhorst				d	
<i>Klebsormidium cf. nitens</i> (Kütz.) Lokhorst					+
<i>Klebsormidium cf. subtile</i> (Kütz.) Tracanna ex Tell				+	+
OCHROPHYTA					
XANTHOPHYCEAE					
<i>Heterococcus</i> sp.				+	
EUSTIGMATOPHYCEAE					
<i>Eustigmatos magnus</i> (Petersen) Hibberd					+
<i>Vischeria helvetica</i> (Vischer et Pascher) Hibberd					+
BACILLARIOPHYCEAE					
<i>Achnanthes coarctata</i> (Brèb.) Grunow					+
<i>Hantzschia amphioxys</i> (Ehrenb.) Grunow		+		+	+
<i>Luticola cohnii</i> (Hilse) D.G. Mann	+	+			
<i>Luticola nivalis</i> D.G. Mann		+		+	+
<i>Luticola ventricosa</i> (Kütz.) D.G. Mann				+	+
<i>Mayamaea atomus</i> (Kütz.) Lange-Bertalot				+	
<i>Orthoseira roeseana</i> (Rabenh.) O'Meara	+				
In total	15	32	9	24	45

Legends. Lithophyton: L – limestone; L1 – epiliths; L2 – chasmoendoliths; Q – quartz, hypoliths. Biological soil crusts: 1 – clay scree; 2 – coquina beach.

Note. Species whose original strains have been studied by molecular phylogenetic methods are marked in bold; d – species dominating in algal communities; * – species previously identified at Cape Kazantip (Sadogurskaya et al., 2006).

In general, the predominance of cyanobacteria and their leading role in biological soil crusts are characteristic for arid regions (Lange et al., 1992; Büdel et al., 2009), while the dominance of eukaryotic algae, in particular, representatives of the genus *Klebsormidium*, is more typical for the biological soil crusts of temperate regions with humid climate (Lukešová and Komárek, 1987; Hoppert et al., 2004; Glaser et al., 2018). *Klebsormidium*

was represented in the studied habitats rather diversely (4 species were found), but, with the only exception described above, they occurred always as separate filaments.

Filaments of cyanobacteria and eukaryotic algae, found often together with moss protonema, form a scab net inhabited by single-celled algae from different taxonomic groups. These algae, as a rule, do not dominate and thus sporadically occurred. A particularly high variety of such forms are characteristic for biological soil crusts on conquina, probably due to its porous structure, light color, and greater availability of nutrients. All this contributed to the active development of green algae from the genera *Chlorococcum* Meneghini, *Chlorosarcinopsis* Herndon, *Elliptochloris* Tschermak-Woess, *Leptosira* Borzì, *Stichococcus* Nägeli and some others. Several species of diatoms have also been identified; *Hantzschia amphioxys*, *Luticola nivalis* (Fig. 2, *l*), and *L. ventricosa* quite often occurred in the biological soil crusts both on conquina and clay.

A comparison of the original data on terrestrial cyanobacteria and algae of Kazantip Cape with the literature (Sadogurskaya *et al.*, 2006; Bondarenko, 2012a) showed that only 10 species of cyanobacteria (13.7% of our records) were previously identified in this area. Apparently, this is due to the fact that the studies cited above were focused on marine algae of Cape Kazantip coast, while we investigated terrestrial algae and cyanobacteria. Thus, only a limited number of species inhabiting the rocky coast of the cape were repeatedly found. Most of these species are represented of *Chroococcales* (85.7% of our records were cited by Sadogurskaya *et al.* (2006), as well as some typical halotolerant and terrestrial species. We also found an interesting representative of false-branching homocytic cyanobacteria, characteristic for saline terrestrial habitats: “*Pseudophormidium*” *battersii* (Fig. 2, *e, f*), the taxonomic identity of which is not yet clear (see below).

Twenty-six strains isolated from the Cape Kazantip terrestrial habitats were studied by molecular phylogenetic methods, which made it possible to clarify their taxonomic position and to conduct more accurate species identification (Figs 3–10). Among them, 14 strains of cyanobacteria entered the molecular clades formed by representatives of the genera *Microcoleus* Desmazières *ex* Gomont (*Oscillatoriales*), *Timaviella* Sciuto *et* Moro, *Oculatella* Zammit, Billi *et* Albertano, “*Phormidesmis*” Turicchia, Ventura, Komárková *et* Komárek (*Synechococcales*, Fig. 3), *Nostoc*, *Hassallia* Berkeley *ex* Bornet & Flahault/*Tolypothrix* Kützing *ex* É. Bornet & C. Flahault, and *Roholtiella* Bohunická, Pietrasiak *et* Johansen (*Nostocales*, Fig. 4). The most interesting floristic records are *Roholtiella edaphica* (Fig. 2, *g*), a new genus and species for the flora of Ukraine, as well as *Oculatella ucrainica* (Fig. 2, *c*) and *O. kazantipica*, new species for science, which we discussed in detail earlier (Mikhailyuk *et al.*, 2016; Vinogradova *et al.*, 2017). Another interesting record is the strain KZ-16-2 (Fig. 2, *e, f*), which joined the “*Phormidesmis*” clade. Based on the morphological features, we initially identified this strain as the marine cyanobacteria *Plectonema battersii* Gomont (Fig. 7); it was found earlier in the marine littoral of Cape Kazantip (Sadogurskaya *et al.*, 2006). As a result of the revision of the order *Oscillatoriales*

(Anagnostidis and Komárek, 1988), this taxon is attributed to the genus *Leptolyngbya*, and later (Anagnostidis, 2001) transferred to the genus *Pseudophormidium* (Forti) Anagnostidis & Komárek. On the phylogenetic tree (Fig. 3), strain KZ-16-2 was clearly of belonging to the order *Synechococcales* forming highly supported clades with Antarctic strains classified as “*Phormidesmis*” and “*Pseudophormidium*”. Despite some morphological similarity with mentioned genera, according to our observations and literature data (Sciuto et al., 2017), this clade represents a separate, not yet described cyanobacterial genus.

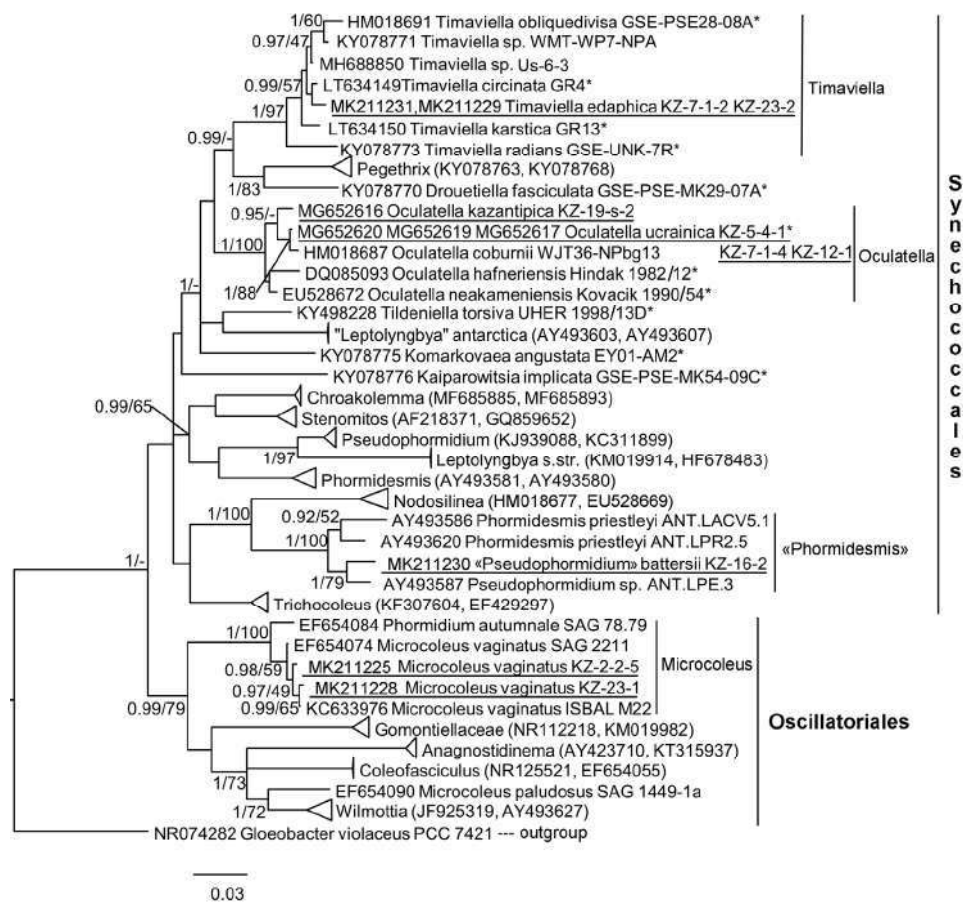


FIG. 3: Molecular phylogeny of *Synechococcales* and *Oscillatoriales* (cyanobacteria) based on comparison of the nucleotide sequences of the 16S *rRNA* gene. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP); bold branches are supported in both analyses (Bayesian values > 0.9 and bootstrap values > 60%). The original sequences of strains are underlined, strains marked with asterisk are authentic. Clades definition is according to Miscoe et al. (2016) and Sciuto et al. (2017)

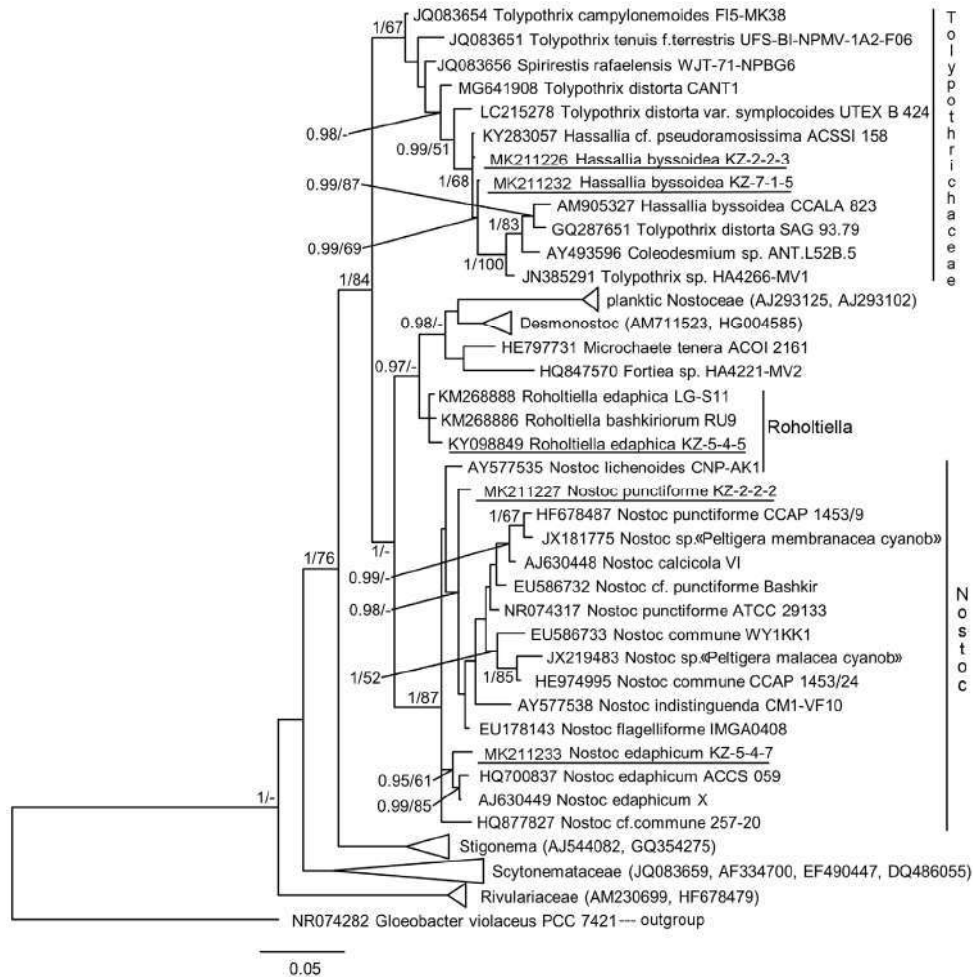


FIG. 4: Molecular phylogeny of *Nostocales* (cyanobacteria) based on the comparison of the nucleotide sequences of the 16S *rRNA* gene. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP); PP values lower than 0.8 and BP lower than 50% not shown. The original sequences of strains are underlined, strains marked with asterisk are authentic. Clades definition is according to Hauer et al. (2014)

Another member of the genus, *Plectonema* s. l., which is often found in terrestrial habitats, including Cape Kazantip, was preliminary identified by morphological features as *P. edaphicum* (Elenkin) Vaulina (Fig. 2, d). The taxonomic position of this species was recently discussed and clarified (Vinogradova and Mikhailyuk, 2018). Phylogenetic analysis based on the 16S *rRNA* gene sequence comparison (Fig. 3) showed that the *P. edaphicum* original strains form a well-supported clade with species of the genus

Timaviella (Sciuto et al., 2017); therefore, for *P. edaphicum*, a new nomenclature combination was proposed: *Timaviella edaphica* (Elenkin) O.M. Vynogr. et Mikhailyuk (Vinogradova and Mikhailyuk, 2018). In our next publication we will provide more detail of our findings of the representatives of the genus *Timaviella*.

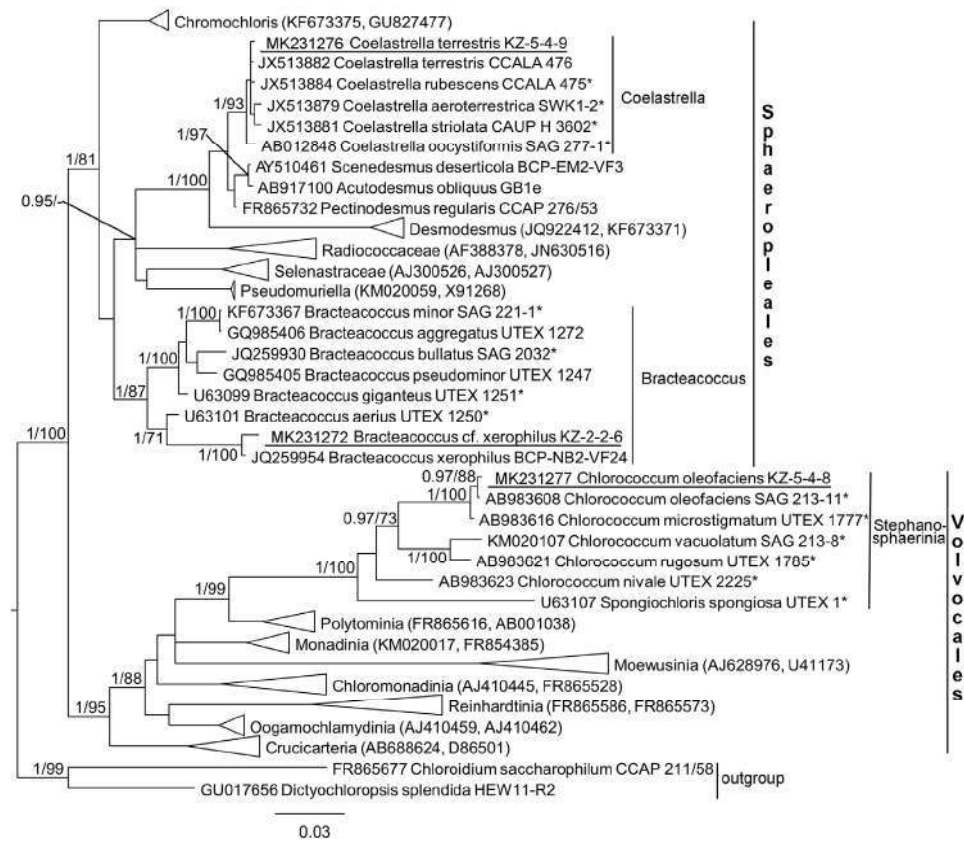


FIG. 5: Molecular phylogeny of *Chlorophyceae* (*Chlorophyta*) based on comparison of the nucleotide sequences of the 18S *rRNA* gene. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP); PP values lower than 0.8 and BP lower than 50% not shown. The original sequences of strains are underlined, strains marked with asterisk are authentic. Clades definition is according to Nakada et al. (2008)

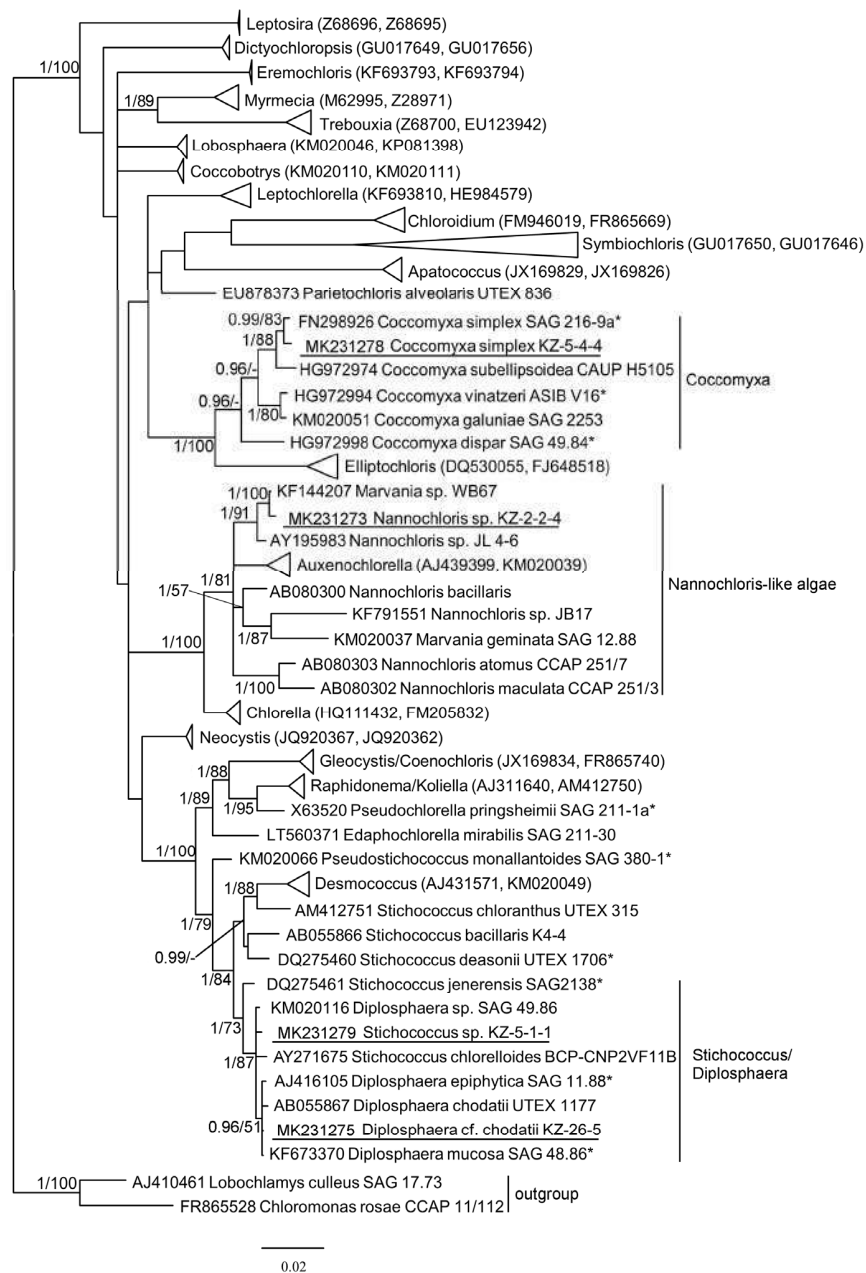


FIG. 6: Molecular phylogeny of *Trebouxiophyceae* (*Chlorophyta*) based on the comparison of the nucleotide sequences of the 18S rRNA gene. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP); PP values lower than 0.8 and BP lower than 50% not shown. The original sequences of strains are underlined, strains marked with asterisk are authentic. Clades definition is according to Hodač et al. (2016)

Two strains, morphologically corresponding to *Microcoleus vaginatus* (Fig. 1, a, b), entered the clade of *Microcoleus* (*Oscillatoriales*), but genetically they are not identical, including the sequence of the region 16S-23S ITS. As it was shown earlier, the clade *Microcoleus*, although it contains morphologically close strains, is probably a complex of species, the final revision of which has not yet been presented (Strunecký et al., 2013). The statement that it is impossible to accurately identify one or another species based on molecular data due to the lack of a final taxonomic revision is also true for the analyzed strains of the genera *Nostoc* (Miscoe et al., 2016; Singh et al., 2016) and *Hassallia* (Hauer et al., 2014; Hentschke et al., 2016).

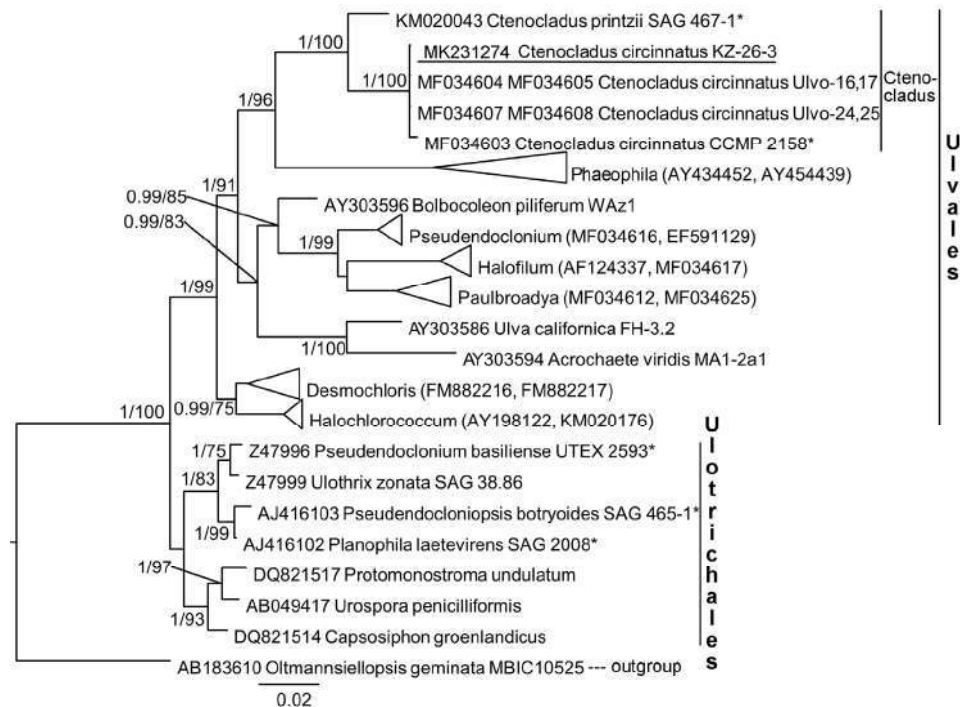


FIG. 7: Molecular phylogeny of *Ulvophyceae* (*Chlorophyta*) based on comparison of the nucleotide sequences of the 18S *r*RNA gene. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP); PP values lower than 0.8 and BP lower than 50% not shown. The original sequences of strains are underlined, strains marked with asterisk are authentic. Clades definition is according to Darienko et al. (2017)

The analyzed 8 strains of green algae entered clades of the genera *Chlorococcum*, *Bracteacoccus* Tereg, *Coelastrella* Chodat (*Chlorophyceae*, Fig. 5), *Coccomyxa* Schmidle, *Diplosphaera* Bialosuknia/*Stichococcus*, ‘*Nannochloris*-like’ algae (*Trebouxiophyceae*,

Fig. 6) and *Ctenocladus* Borzi (*Ulvophyceae*, Fig. 7). For representatives of the first four genera, additional phylogenetic analyses of the sequences ITS-1,2 or ITS-2 were carried out in order to clarify the species affiliation of the Kazantip strains. As a result, most of them represented common species: *Chlorococcum oleofaciens*, *Coelastrella terrestris*, and *Coccomyxa simplex* (Kaufnerová and Eliáš, 2013; Darienko et al., 2015; Kawasaki et al., 2015, Figs 9, 10).

Strain KZ-2-2-6, assigned to the genus *Bracteacoccus* (Fig. 2, *i*), combined in a subclade with a recently described noteworthy species, *B. xerophilus* (Fučíková et al., 2012). Morphologically, they are similar: both have small-sized cells reminding members of the genus *Pseudomuriella* Hanagata. However, genetically, although *B. xerophilus* and strain KZ-2-2-6 are close, they show differences, such as in the conservative part of the ITS-2. Apparently, both strains represent different species. Interestingly, *B. xerophilus* strains were isolated from biological soil crusts of North American deserts; the species forms a deep diverging line in the phylogeny of *Bracteacoccus*. Probably, the *Bracteacoccus* strain, isolated from Cape Kazantip, also represents the xerophilic species characteristic of arid soils.

The strains included in clades of ‘*Nannochloris*-like’ algae and representatives of *Diplosphaera/Stichococcus* are common terrestrial algae, which are not identified to species level, and often only to the generic level, because taxonomic revisions of these taxa based on molecular data have not yet been performed (Henley et al., 2004; Hodač et al., 2016). Interestingly, the strain KZ-2-2-4 (Fig. 2, *k*) was originally identified by morphological features as *Mychonastes homosphaera* (Skuja) Kalina & Puncochárová (= *Chlorella homosphaera* Skuja, *Chlorella minutissima* Fott et Nováková, *Chlorophyceae*, *Chlorophyta*). This species is common in the terrestrial habitats of Ukraine (Kostikov et al., 2001); we also repeatedly cited it in our publications (Mikhailyuk et al., 2011; Mikhailyuk, 2013). However, molecular data showed that the strain KZ-2-2-4 belongs to the group of ‘*Nannochloris*-like’ algae from the class *Trebouxiophyceae*.

The strain of ulvophycean alga turned to be representative of noteworthy species *Ctenocladus circinnatus* (*Ulvales*, Figs 1, *i-l*, 7). In the past, this species was found in Ukraine epilythically on a boulder in a damp spruce forest in the Carpathians (Massjuk, 1998), and, which however is doubtful, in the reservoirs of the Dnieper cascade (Kostikova et al., 1989). Molecular data showed that *C. circinnatus* is quite common in terrestrial saline habitats of southern Ukraine: the salt marshes of the Azov-Sivash National Nature Park (Kherson Region), and the coast of Kuyalyk Estuary. It also was reported on quartz crystals in Zmeiny Island (Odessa Region) (Darienko and Pröschold, 2017; Fig. 7, strains Ulvo-16, 17, 24, 25). Previously, all these findings were identified as the species of the genus *Dilabifilum* Tschermak-Woess (Vinogradova and Darienko, 2008a, b; Darienko, 2012).

Four strains of streptophytes, according to molecular data, are representatives of *Klebsormidiophyceae* (Fig. 8), both common (*Klebsormidium* cf. *nitens*), and noteworthy (*K. mucosum* and *Interfilum paradoxum*). *K. mucosum* (Fig. 1, *h*) is a rare species for Ukraine, mostly occurring in biological soil crusts of arid habitats: on sand and steppe soils (Kostikov et al., 2001; Borisova et al., 2016). Concerning *I. paradoxum* (Fig. 2, *j*), formally, our record is new for the flora of Ukraine (Borisova et al., 2016); however, it is likely that this species was often found here, but it was misidentified as *I. terricola* (J.B. Petersen) Mikhailyuk, Sluiman, Massalski, Mudimu, Demchenko, Friedl & Kondratyuk.

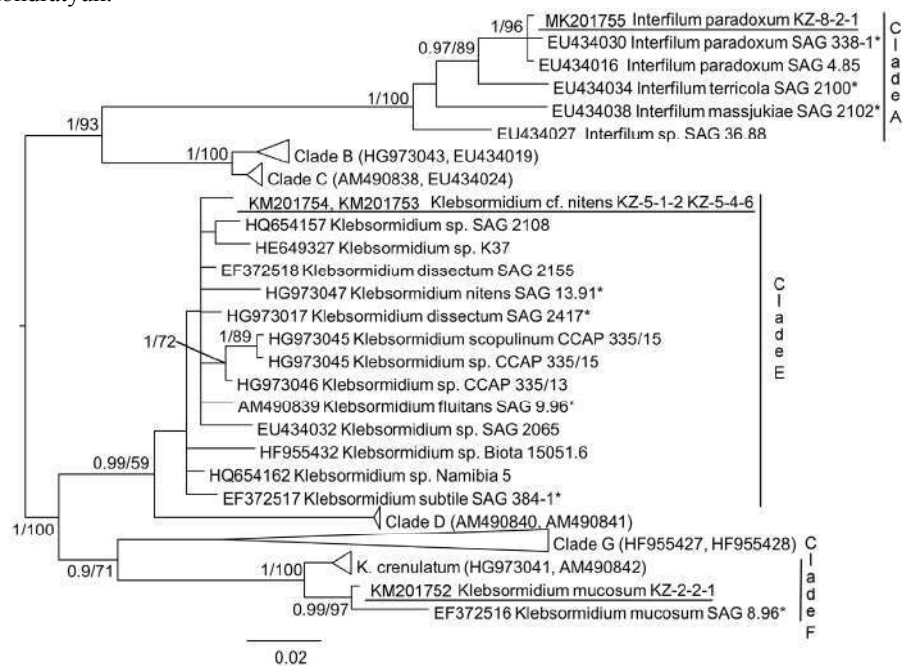


FIG. 8: Molecular phylogeny of *Klebsormidiophyceae* (*Streptophyta*) based on comparison of the nucleotide sequences of the ITS-1,2. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP); PP values lower than 0.8 and BP lower than 50% not shown. The original sequences of strains are underlined, strains marked with asterisk are authentic. Clades definition is according to Rindi et al. (2011)

A main descriptive feature of these taxa is the presence of dense remnants of the maternal envelopes in *I. paradoxum* and, conversely, their complete coverage by mucilage with the formation of a noticeable mucous envelope of the scattered structure in *I. terricola* (Mikhailyuk et al. 2008). The material from Cape Kazantip morphologically fully corresponded to *I. terricola*; however, the result of molecular analysis unambiguously identified it as *I. paradoxum*. Probably, the morphological features proposed to distinguish these two species should be revised in the future.

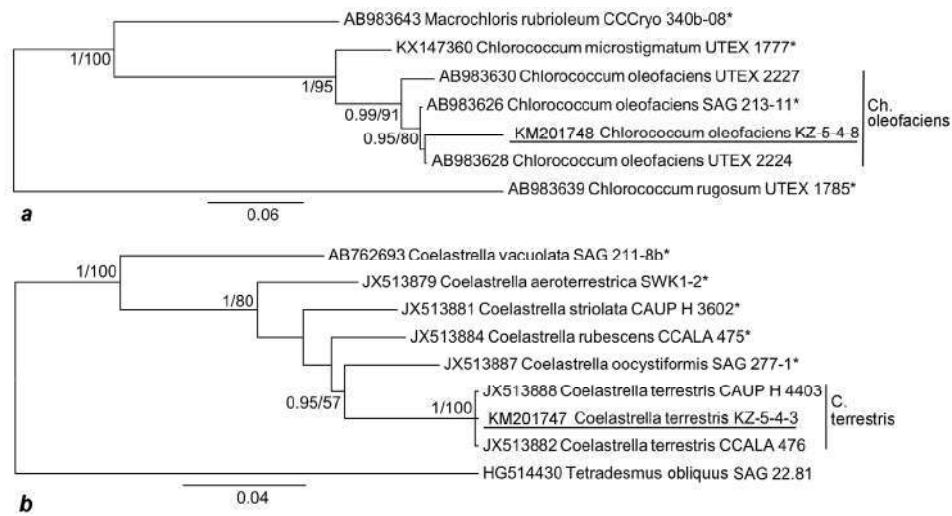


FIG. 9: Molecular phylogeny of *Chlorococcum* (a) and *Coelastrella* (b) (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) based on the comparison of the nucleotide sequences of the ITS-1,2. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP); PP values lower than 0.8 and BP lower than 50% not shown. The original sequences of strains of cyanobacteria are underlined, strains marked with asterisk are authentic

CONCLUSIONS

The study of terrestrial algae at Kazantip Cape (the Sea of Azov, Ukraine) using direct microscopy and culture methods provided the first information on the species composition, the dominant species, and the peculiarities of various algal communities. Molecular phylogenetic analysis helped to clarify the taxonomic position and to provide correct identification of 26 Kazantip strains. This information also helped to make a number of interesting floristic records, supplementing the flora of Ukraine with new taxa of the genera *Oculatella* Zammit, Billi et Albertano, *Timaviella* Sciuto et Moro, *Roholtiella* Bohunická, Pietrasiak et Johansen, *Bracteacoccus* Tereg, and *Interfilum* Chodat. Molecular data reveal new taxa among the strains previously identified through culture-dependent morphological methods.

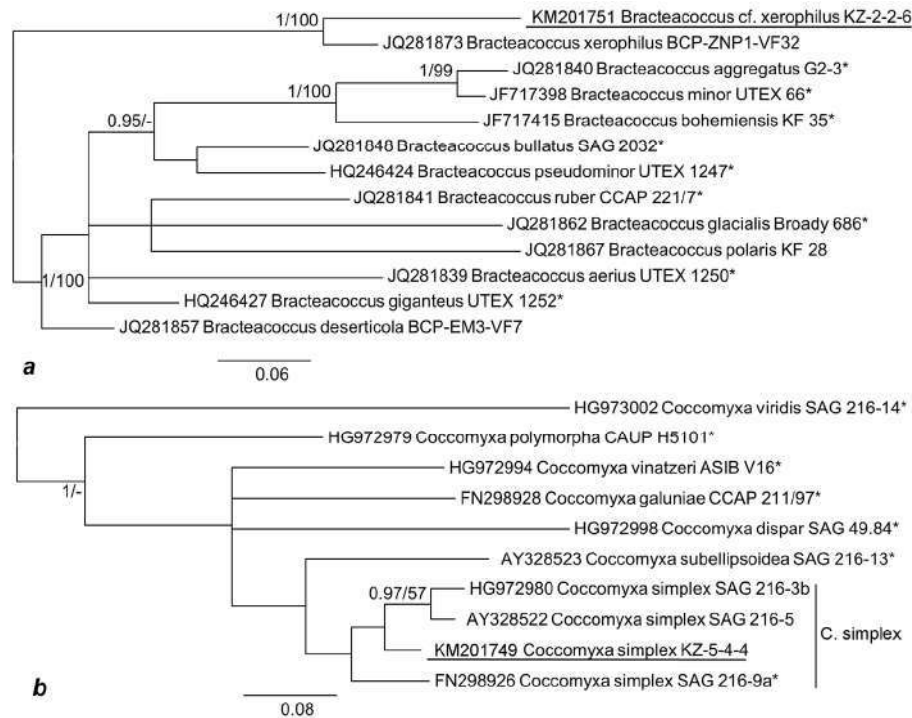


FIG. 10: Molecular phylogeny of *Bracteacoccus* (*Chlorophyceae*) (a) and *Coccomyxa* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) (b) based on the comparison of the nucleotide sequences of the ITS-2. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP); PP values lower than 0.8 and BP lower than 50% not shown. The original sequences of strains of cyanobacteria are underlined, strains marked with asterisk are authentic

Seventy-three species were identified from the divisions of *Cyanobacteria* (35), *Chlorophyta* (23), *Streptophyta* (5), and *Ochrophyta* (10). Lithophyton and biological soil crusts differed markedly in species diversity, taxonomic structure and the dominant algae complex. Only 30.1% of the identified species were found in both types of habitats. Only Forty-one (41) species were found in rock communities. In biological soil crusts on the conquina and clay, 54 species were identified. Cyanobacteria were leading both in the number of species (42.6% of the total diversity) and in quantitative development. Species of genera *Microcoleus* Desmazières ex Gomont, *Coleofasciculus* Siegesmund, Johansen et Friedl, *Hassallia* Berkeley ex Bornet et Flahault, *Nostoc* Vaucher ex Bornet et Flahault, *Scytonema* Agardh ex Bornet et Flahault, and some others dominated in the biological soil crusts studied. *Chlorophyta* (33.3%) was the second in species diversity, but their abundance was low. Among species discovered in the present study, only 13.7% were previously cited for this territory.

The combined approach in the study of terrestrial algal communities of Cape Kazantip significantly increased the value of the obtained floristic data, and discovered a number of new and noteworthy taxa of microalgae and cyanobacteria, which expanded our knowledge of terrestrial algae of the Ukraine.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the staff of the Kazantipsky Nature Reserve for their help in conducting the field study. The research was supported by a Georg-Forster Fellowship of the Alexander von Humboldt Foundation (Alexander von Humboldt Stiftung) to the first author. Our sincere thanks are extended to Dr. Thomas Pröschold (University of Innsbruck, Austria) for permission to use the algal specific primers he designed.

REFERENCES

- Algae*: Reference Book, Ed. S.P. Wasser, Naukova Dumka Press, Kiev, 1989. [Rus.]
- Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography*, Eds P.M. Tsarenko, S. Wasser, E. Nevo, A.R.G. Gantner Verlag K.-G., Rugell, Vol. 2, 2009; Vol. 3, 2011.
- Akaike H., A new look at the statistical model identification, *Automat. Control, IEEE Trans. on Automat. Control*, 19: 716–723, 1974.
- Anagnostidis K. and Komárek J., Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. *Oscillatoriales*, *Arch. Hydrobiol.*, Suppl. (Algol. Stud. 50–53), 80(1–4): 327–472, 1988.
- Anagnostidis K., Nomenclatural changes in cyanoprokaryotic order *Oscillatoriales*, *Preslia*, Praha, 73: 359–376, 2001.
- Arino X., Hernández Mariné M., and Saiz-Jimenez C., *Ctenocladus circinnatus* (Chlorophyta) in stuccos from archaeological sites of southern Spain, *Phycologia*, 35(3): 183–189, 1996. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-3183.1>
- Biological Soil Crusts: An Organizing Principle in Drylands*, Ecol. Stud. 226, Eds B. Weber, B. Büdel, J. Belnap, A. Cham., Springer Int. Publ., Switzerland, 2016.
- Biological soil crusts: structure, function, and management*, Ecol. Stud. 150, Eds J. Belnap, O.L. Lange, Springer, Berlin, 2003.
- Bischoff H.W. and Bold H.C., Phycol. Stud. IV, Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species, *Univ. Texas Publ.*, 6318: 1–95, 1963.
- Blinn D.W., Autecology of a filamentous alga, *Ctenocladus circinnatus* (Chlorophyceae), in saline environments, *Canad. J. Bot.*, 49: 735–743, 1971.
- Bondarenko A.V., Microalgae of benthos of the coastal waters of Cape Kazantip (the Sea of Azov), in: *Actual problems of modern algology*: Abstr. Int. Conf. Young Sci. (Scholkino, 18–22 June, 2013), Scholkino, pp. 31–32, 2013. [Rus.]
- Bondarenko A.V., *Benthic microalgae of the Crimean coast of the Sea of Azov*: Abstr. Ph.D. (Biol.) Thesis, Sevastopol, 2017. [Rus.]

- Bondarenko A.V., Microphytobenthos of three regions of the Ukrainian sector of the Azov Sea, *Mor. Ecol. J.*, 11(3): 25–32, 2012a.
- Bondarenko A.V., Microalgae of epiphyton of benthic vegetation of the Kazantip Natural Reserve coast (Sea of Azov, Ukraine), in: *Actual problems of modern algology: Abstr. IV Int. Conf.*, Kiev, pp. 35–37, 2012b. [Rus.]
- Borisova O.V., Palamar-Mordvintseva G.M., and Tsarenko P.M., *Flora of algae of Ukraine*. Vol. 12. *Charophyta*. Issue 2. Classes *Mesostigmatophyceae*, *Klebsormidiophyceae*, *Coleochaetophyceae*, *Charophyceae*, Kyiv, 2016. [Ukr.]
- Büdel B., Diversity and ecology of biological crusts, *Progr. Bot.*, 63: 386–404, 2002.
- Büdel B., Darienko T., Deutschewitz K., Dojani S., Friedl Th., Mohr K.I., Salisch M., Reisser W., and Weber B., Southern African biological soil crust are ubiquitous and highly diverse in dryland, being restricted by rainfall frequency, *Microbial Ecol.*, 57: 229–247, 2009.
- Chapin F.S. III, Walker B.H., Hobbs R.J., Hooper D.U., Lawton J.H., Sala O.E., and Tilman D., Biotic control over the functioning of ecosystems, *Science*, 277: 500–503, 1997.
- Darienko T.M., Soil algae of Nature Reserves from Mountain Crimea (Ukraine, Mountain Crimea), *Algologia*, 10(1): 54–62, 2000.
- Darienko T.M., General characteristics and features of the species composition of algae of out-of-water habitats of the Zmeiny Island (the Black Sea, Ukraine), *Ukr. Bot. J.*, 69(1): 111–124, 2012. [Ukr.]
- Darienko T.M., Mikhailiuk T.I., and Voytsekhovich A.A., Algae – biodestructors of culture monuments of Massandra and Livadia Castles (Crimea, Ukraine), in: *Urboecosystems: problems and perspectives of development*: Abstr. III Int. Conf., P.P. Ershova Press, Ishim, pp. 85–87, 2008. [Rus.]
- Darienko T., Gustavs L., Eggert A., Wolf W., and Pröschold T., Evaluating the species boundaries of green microalgae (*Coccomyxa*, *Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples, *PLoS ONE*, 10(6): e0127838, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127838>
- Darienko T., Gustavs L., and Pröschold T., Toward a monograph of non-marine *Ulvophyceae* using an integrative approach (Molecular phylogeny and systematics of terrestrial *Ulvophyceae* II), *Phytotaxa*, 324: 1–41, 2017.
- Elbert W., Weber B., Burrows S., Steinkamp J., Büdel B., Andreae M.O., and Pöschl U., Contribution of cryptogamic covers to the global cycles of carbon and nitrogen, *Nat. Geosci.*, 5(7): 459–462, 2012.
- Ettl H., *Xanthophyceae*, in: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Bd 3, Gustav Fischer, Stuttgart, 1978.
- Ettl H. and Gärtner G., *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*, Gustav Fischer, Stuttgart; Jena; New York, 1995.
- Fučíková K., Flechtner V.R., and Lewis L.A., Revision of the genus *Bracteacoccus* Tereg (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) based on a phylogenetic approach, *Nova Hedw.*, 96: 15–59, 2012.
- Glaser K., Baumann K., Leinweber P., Mikhailiuk T., and Karsten U., Algal richness in BSCs in forests under different management intensity with some implications for P cycling, *Biogeosciences*, 15(13): 4181–4192, 2018.
- Guiry M.D. and Guiry G.M., *AlgaeBase*. Worldwide electronic publication, Nat. Univ. Ireland, Galway, 2018. <http://www.algaebase.org>
- Hauer T., Bohunická M., Johansen J.R., Mares J., and Berrendero-Gomez E., Reassessment of the cyanobacterial family *Microchaetaceae* and establishment of new families *Tolypothrichaceae* and *Godleyaceae*, *J. Phycol.*, 50: 1089–110, 2014.

- Henley W.J., Hironaka J.L., Guillou L., Buchheim M.A., Buchheim J.A., Fawley M.W., and Fawley K.P., Phylogenetic analysis of the 'Nannochloris-like' algae and diagnoses of *Picochlorum oklahomensis* gen. et sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*), *Phycologia*, 43(6): 641–652, 2004.
- Hentschke G.S., Johansen J.R., Pietrasiak N., Fiore M.F., Rigonato J., Sant'Anna C.L., and Komárek J., Phylogenetic placement of *Dapisostemon* gen. nov. and *Streptostemon*, two tropical heterocytous genera (*Cyanobacteria*), *Phytotaxa*, 245: 129–143, 2016.
- Hodač L., Hallmann C., Spitzer K., Elster J., Faßhauer F., Brinkmann N., Lepka D., Diwan V., and Friedl T., Widespread green algae *Chlorella* and *Stichococcus* exhibit polar-temperate and tropical-temperate biogeography, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 92: fiw122, 2016.
- Hoffmann L., Algae of terrestrial habitats, *Bot. Rev.*, 55(2): 77–105, 1989.
- Hoppert M., Reimer R., Kemmling A., Schröder A., Günzl B., and Heinken T., Structure and reactivity of a biological soil crust from a xeric sandy soil in Central Europe, *Geomicrobiol. J.*, 21: 183–191, 2004.
- Katoh K. and Standley D.M., MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability, *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772–780, 2013.
- Kaufnerová V. and Eliáš M., The demise of the genus *Scotiellopsis* Vinatzer (*Chlorophyta*), *Nova Hedw.*, 97: 415–428, 2013.
- Kawasaki Y., Nakada T., and Tomita M., Taxonomic revision of oil-producing green algae, *Chlorococcum oleofaciens* (*Volvocales*, *Chlorophyceae*), and its relatives, *J. Phycol.*, 51: 1000–1016, 2015.
- Komárek J., *Cyanoprokaryota*, 3rd pt: *Heterocytous* Genera, in: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd 19/3, Elsevier, Berlin; Heidelberg, 2013.
- Komárek J. and Anagnostidis K., *Cyanoprokaryota*, 2. *Oscillatoriales*, in: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd 19/2, Elsevier Spectr., München, 2005.
- Komárek J. and Fott B., *Chlorophyceae* (Grünalgen). Ordnung: *Chlorococcales*, in: *Die Binnengewässer. Das Phytoplankton des Süßwassers*, Bd 16/7, Schweizerbart Verlag-Bueh, Stuttgart, 1983.
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., and Johansen J.R., Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014 using a polyphasic approach, *Preslia*, 86(4): 295–235, 2014.
- Kostikov I.Yu. and Darienko T.M., About soil algae composition of Mountain Crimea (Ukraine), *Algologia*, 6(3): 285–294, 1996.
- Kostikov I.Yu., Romanenko P.O., Demchenko E.M., Darienko T. M., and Mikhailyuk T.I., *Algae of the soils of Ukraine (history and methods of research, system, checklist of flora)*, Phytosociocenter, Kiev, 2001. [Ukr.]
- Kostikova L.E., Litvinova V.M., and Skoryk L.V., A systematic list of algae of the Dnieper and reservoirs of the Dnieper cascade, in: *Vegetation and bacterial population of the Dnieper and its reservoirs*, Naukova Dumka Press, Kiev, pp. 129–185, 1989. [Rus.]
- Kovalenko O.V., *Flora of algae of Ukraine*, Vol. 1, *Cyanoprokaryota*, Issue 1, Order *Chroococcales*, Aristey, Kiev, 2009. 387 p. [Ukr.]
- Lange O.L., Kidron G.J., Büdel B., Meyer A., Kilian E., and Abeliovich A., Taxonomic composition and photosynthetic characteristics of the “biological soil crusts” covering sand dunes in the western Negev Desert, *Functional Ecol.*, 6: 519–527, 1992.

- Liu B., Liu X., Hu Z., Zhu H., and Liu G., Phylogenetic position and morphological observation of the *Ctenocladus circinnatus* Borzi, a rare green alga from Changtang Plateau, China, *Phytotaxa*, 260(1): 75, 2016.
- Lukešová A. and Komárek J., Succession of soil algae on dumps from strip coal-mining in the Most region (Czechoslovakia), *Folia Geobot. et Phytotaxon.*, Praha, 22: 355–362, 1987.
- Marin B., Klingberg M., and Melkonian M., Phylogenetic relationships among the *Cryptophyta*: Analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences support the monophyly of extant plastid-containing lineages, *Protist*, 149: 265–276, 1998.
- Marin B., Palm A., Klingberg M., and Melkonian M., Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing Euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure, *Protist*, 154: 99–145, 2003.
- Marin B., Nowack E.C.M., and Melkonian M., A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis, *Protist*, 156: 425–432, 2005.
- Massjuk N.P., First record of the rare species *Ctenocladus circinnatus* Borzi (*Chlorophyta*) in Ukraine, *Algologia*, 8(1): 87–92, 1998. [Rus.]
- Mikhailiuk T.I., Algae terrestrial habitats of the Kazantip Natural Reserve and its environs (Crimea), *Algologia*, 24(3): 345–349, 2014. [Rus.]
- Mikhailiuk T.I., Kondratyuk S.Ya., Niporko S.O., Darienko T.M., Demchenko E.M., and Voitsekhovich A.O., *Lichens, mosses and terrestrial algae of granites of Ukraine*, Alterpress, Kiev, 2011. [Ukr.]
- Mikhailiuk T.I., Sluiman H., Massalski A., Mudimu O., Demchenko E., Kondratyuk S., and Friedl T., New streptophyte green algae from terrestrial habitats and an assessment of the genus *Interfilum* (*Klebsormidiophyceae*, *Streptophyta*), *J. Phycol.*, 44: 1586–1603, 2008.
- Mikhailiuk T.I., Terrestrial algae of granite outcrops of the valleys of the rivers of Ukraine, *Int. J. Algae*, 15(4): 311–330, 2013. <https://10.1615/InterJAlgae.v15.i4.20>
- Mikhailiuk T.I., Vinogradova ON, Glaser K., and Karsten U., New taxa for the flora of Ukraine in the context of modern approaches to the taxonomy *Cyanoprokaryota/Cyanobacteria*, *Int. J. Algae*, 18(4): 301–320, 2016. <https://10.1615/InterJAlgae.v18.i4.10>
- Miscoe L.H., Johansen J.R., Vaccarino M.A., Pietrasiak N., and Sherwood A.R., Novel cyanobacteria from caves on Kauai, Hawaii, *Bibliotheca, Phycologica*, 120: 75–152, 2016.
- Nakada T., Misawa K., and Nozaki H., Molecular systematics of *Volvocales* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses, *Mol. Phylogen. and Evol.*, 48: 281–291, 2008.
- Nienow J.A., Ecology of suberial algae, *Nova Hedw.*, 112: 537–552, 1996.
- Prikhodkova L.P., *Blue-green algae of soils from Steppe zone of Ukraine*, Naukova Dumka Press, Kiev, 1992. [Rus.]
- Pröschold T., Harris E.H., and Coleman A.W., Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Genetics*, 170: 1601–1610, 2005.
- Rindi F., Mikhailiuk T.I., Sluiman H.J., Friedl T., and López-Bautista J.M., Phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (*Klebsormidiophyceae*, *Streptophyta*), *Mol. Phylog. and Evol.*, 58: 218–231, 2011.
- Ronquist F. and Huelsenbeck J.P., MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models, *Bioinformatics*, 19: 1572–1574, 2003.

- Sadogurskaya S.A., Sadogursky S.E., and Belich T.V., Annotated list of phytobenthos of the Kazantip Nature Reserve, *Trudy Nikit. Bot. Sada*, 126: 190–208, 2006. [Rus.]
- Sciuto K., Moschin E., and Moro I., Cryptic cyanobacterial diversity in the Giant Cave (Trieste, Italy): a new genus *Timaviella* (*Leptolyngbyaceae*), *Cryptogam. Algal.*, 38(4): 285–323, 2017.
- Singh P., Shaikh Z.M., Gaysina L.A., Suradkar A., and Samanta U., New species of *Nostoc* (Cyanobacteria) isolated from Pune, India, using morphological, ecological and molecular attributes, *Plant System. and Evol.*, 302(10): 1381–1394, 2016.
- Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., and Cohen-Bazire G., Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*), *Bacteriol. Rev.*, 35: 171–205, 1971.
- Strunecký O., Komárek J., Johansen J., Lukešová A., and Elster J., Molecular and morphological criteria for revision of the genus *Microcoleus* (*Oscillatoriales*, *Cyanobacteria*), *J. Phycol.*, 49: 1167–1180, 2013.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., and Kumar S., MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. and Evol.*, 30: 2725–2729, 2013.
- Varshney P., Mikulic P., Vonshak A., Beardall J., and Wangikar P.P., Extremophilic micro-algae and their potential contribution in biotechnology, *Biores. Technol.*, 184: 363–372, 2015.
- Vinogradova O.M., Blue-green algae from soils of Karadag State Reserve, *Ukr. Bot. J.*, 46(1): 40–45, 1989.
- Vinogradova O.M., *Blue-green algae of Mountain Crimea*. Ph.D. (Biol.) Thesis, Kyiv, 1994. [Ukr.]
- Vinogradova O.M. and Darienko T.M., Terrestrial algae of hypersaline environments of the Central Syvash islands (Kherson Region, Ukraine), *Biologia*, 63(6): 809–819, 2008a.
- Vinogradova O.N. and Darienko T.M., Algae of Azovo-Syvashsky National Nature Park (Ukraine), *Int. J. Algae*, 10(2): 1–14, 2008b. <https://10.1615/InterJAlgae.v10.i2.50>
- Vinogradova O.N. and Mikhailyuk T.I., On the taxonomy and nomenclature of some terrestrial taxa of *Plectonema* s. l. 1. The case of *Plectonema edaphicum*, *Int. J. Algae*, 20(3): 211–224, 2018. <https://10.1615/InterJAlgae.v20.i3.10>
- Vinogradova O.N., Mikhailyuk T.I., Glaser K., Holzinger A., and Karsten U., New species of *Oculatella* (*Synechococcales*, *Cyanobacteria*) from terrestrial habitats of Ukraine, *Ukr. Bot. J.*, 74(4): 451–465, 2017.
- Voytsekhovich A.A., Photobionts and algae–epiphyts of lithophilic lichens from Coastal Ridge of Karadag Nature Reserve (Crimea, Ukraine), *Actual problems of Botany and Ecology*: Coll. articles. Vol. 2, Phytosociocentr Press, Kyiv, pp. 46–51, 2008. [Ukr.]
- Voytsekhovich A.A., Mikhailyuk T.I., and Darienko T.M., Algae of terrestrial habitats of Karagach Ridge (Karadag Nature Reserve (Ukraine)), *Coll. articles 95 years of Karadag Sci. Station.*, ECOSI-Gidrophysica Press, Sevastopol, pp. 50–60, 2009. [Ukr.]
- Voytsekhovich A. and Beck A., Lichen photobionts of the rocky outcrops of Karadag massif (Crimean peninsula), *Symbiosis*, 68(1–3): 9–24, 2016.
- Wilmotte A., Van der Auwera G., and De Wachter R., Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC75 18, and phylogenetic analysis, *FEBS Lett.*, 317: 96–100, 1993.

**1.2.2. Водорості і ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок приморських
піщаних дюн Дунайського біосферного заповідника (Одеська область,
Україна)**

Водорості біологічних ґрунтових кірочок приморських дюн Дунайського біосферного заповідника (Одеська область, Україна)

Михайлюк Т.І.¹, Виноградова О.М.¹, Глазер К.², Рибалка Н.А.³,
Демченко Е.М.¹, Карстен У.²

¹Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,
вул. Терещенківська, 2, Київ 01601, Україна

²Університет м. Росток, Інститут біологічних наук, відділ прикладної екології та фікології, Альберт Ейнштейн штрассе, 3, Росток D-18057, Німеччина

³Георг Август Університет м. Геттінген, Альбрехт-фон-Галлер Інститут наук про рослини, відділ експериментальної фікології і колекції культур водоростей (SAG), Ніколаусбергер веґ, 18, Геттінген 37073, Німеччина

t-mikhailyuk@ukr.net

Надійшла до редакції 18.08.2020. Після доопрацювання 13.11. 2020. Підписана до друку 14.12.2020.
Опублікована 22.03.2021

Реферат. Вивчено видове різноманіття водоростей, що утворюють ґрунтові кірочки на поверхні піщаних дюн, на березі Чорного моря в околицях с. Приморське Кілійського р-ну Одеської обл. (Україна). Зразки відбирали на трьох ділянках узбережжя: Катранівській косі, Жебріяньській бухті та Жебріяньському пасмі. Дві останні ділянки належать до території Дунайського біосферного заповідника. Зразки досліджено методом прямого мікроскопіювання з наступною постановкою культур. Всього ідентифіковано 60 видів з відділів *Chlorophyta* (32 види), *Cyanoprokaryota* (16), *Streptophyta* (7) та *Ochrophyta* (5). У досліджених кірочках домінували ціанобактерії і стрептофітові водорості родів *Microcoleus* Desmazières ex Gomont, *Coleofasciculus* M.Siegesmund et al., *Nostoc* Vaucher ex Bornet & Flahault, *Hassallia* Berkeley ex Bornet & Flahault, *Klebsormidium* P.C.Silva et al. та ін. Для низки штамів ціанобактерій і евкаріотичних водоростей був проведений філогенетичний аналіз за ділянкою нуклеотидної послідовності гена 16S/18S рРНК, а також регіону 16S-23S ITS/ITS-1,2. Це дозволило уточнити їх видову приналежність і систематичне положення, а також здійснити низку цікавих таксономічних та флористичних знахідок. У результаті описано нові для науки рід і види (*Streptosarcina arenaria* Mikhailyuk & Lukešová та *Tetrademus arenicola* Mikhailyuk & P.Tsarenko; 2 роди (*Nodosilinea* R.B.Perkerson & D.A.Casamatta і *Pleurastrasarcina* H.J.Sluiman & P.C.J.Blommers), 4 види відмічені як нові для флори України (*Nodosilinea epilithica* Perkerson & Casamatta, *Pseudomuriella aurantiaca*

© Михайлюк Т.І., Виноградова О.М., Глазер К., Рибалка Н.А.,
Демченко Е.М., Карстен У., 2021

(W.Vischer) N.Hanagata, *Pleurochloris meiringensis* Vischer і *Pleuraestrosarcina terriformae* Darienko et al.). Порівняння результатів цього дослідження з отриманими щодо ґрунтових кірочок приморських піщаних дюн мису Казантип (Азовське море) і двох островів Балтійського моря (Німеччина) показало, що основними факторами, які визначають видовий склад водоростей, є склад і текстура піску, а також кліматичні особливості регіону дослідження.

Ключові слова: ціанобактерії, водорості, біологічні ґрунтові кірочки, піщані дюни, Чорне море, Україна, 16S/18S рРНК, регіон 16S-23S ITS/ITS-1,2

Вступ

Біологічні ґрунтові кірочки (БГК) відіграють важливу роль в екосистемах, де водний дефіцит лімітує розвиток вищих рослин, а основними продуцентами виступають ціанобактерії та водорості. БГК сприяють утриманню вологи у ґрунті, зменшують її ерозію і забезпечують надходження вуглецю та азоту (Belnap et al., 2016). В аридних областях БГК займають значні площі і характеризуються якісною і кількісною перевагою ціанобактерій. Відомо, що в пустелях і напівпустелях вони формують до 70% рослинного покриву (Büdel et al., 2016). У помірних широтах БГК не настільки поширені, вони трапляються у місцезростаннях, де в них є конкурентна перевага перед судинними рослинами. Прикладом таких місцезростань є піщані дюни. Показано, що характер і структура водоростевих кірочок на поверхні піску та піщаних ґрунтів дуже близькі до БГК аридних регіонів, проте домінантами в них поряд з ціанобактеріями часто виступають евкаріотичні водорості (Hoppert et al., 2004; Schulz et al., 2016).

Піщані дюни – специфічні місцезростання рослин. Вони характеризуються суттєвим дефіцитом вологи, органічних речовин, мікро- та макроелементів (особливо лімітовані азот, фосфор і калій), нагадуючи цим екосистему пустель (Maun, 2009). Пісок, як субстрат, характеризується високою пористістю, що призводить до його низької вологоутримуючої здатності і значної варіабельності температури поверхні протягом доби та в різні сезони року. Прибережні піщані дюни є відкритими місцезростаннями, які зазнають активного впливу сонця, вітру, а також моря, тому їхня поверхня характеризується високою інсоляцією, температурою, сухістю та певним ступенем засолення субстрату (Maun, 2009). Сукупність цих факторів призводить до формування специфічної розрідженої рослинності піщаних дюн, одним з невід’ємних компонентів якої є БГК.

Дослідження водоростей та ціанобактерій БГК прибережних піщаних дюн є досить спорадичними і висвітлені в низці робіт (Boyko et al., 1984; Van den Acker, Jungerius, 1985; De Winder, 1990; Kostikov, Rybchinskiy, 1995; Pluis, 1990; Smith et al., 2004; Andreyeva, 2005). Нами вони вивчалися на приморських дюнах Балтійського (Німеччина) та Азовського (Україна) морів (Mikhailyuk et al., 2016, 2018a, b, 2019b, c, 2020;

Schulz et al., 2016; Vinogradova et al., 2017; Mikhailyuk et al., 2019a; Rybalka et al., 2020).

Дунайський біосферний заповідник (ДБЗ) в Одеській обл. України був створений з метою збереження унікальних природних комплексів дельти Дунаю, яким властиве високе біорізноманіття. Характерною ознакою території заповідника є процес безперервного дельтоутворення, який супроводжується появою нових ділянок суходолу – кіс, островів і т.ін. (Khromov, Likhosha, 2003). Їхній вік коливається від кількох тисячоліть до кількох десятиліть. На сході заповідник частково охоплює узбережжя Жебріянської бухти, яка являє собою затоку Чорного моря. Над бухтою розташоване піщане Жебріянське пасмо – залишок древньої смуги морських дюн. У минулому тут були напівпустельні ландшафти; наразі пасмо переважно вкрите штучними насадженнями сосни з розрідженим трав'яним покривом. У північно-східній частині бухти-затоки знаходиться Катранівська коса – вузька піщана смуга, що простягається в море на кілька кілометрів. Ця територія не є заповідною.

Альгофлористичне вивчення дельти Дунаю продовжується вже кілька десятиліть, але його ціллю завжди були водні об'єкти (Algae..., 2006, 2009, 2011, 2014). Відомості про наземні водорості Одеської обл. дуже обмежені (Prihodkova, 1992; Kostikov et al., 2001; Vinogradova, 2016). У ДБЗ та його околицях фікологічні дослідження наземних екосистем не проводили.

Метою нашої роботи було вивчення різноманіття водоростей БГК, що розвиваються в приморських екотопх Кілійської дельти Дунаю, з особливою увагою до їхньої систематики та екології.

Матеріали та методи

Місця дослідження, відбір проб. Матеріалом для дослідження були зразки БГК, які розвивалися на поверхні піщаних дюн приморських ділянок ДБЗ і його околиць (Кілійський р-н, Одеська обл.). Зразки відбирали в районі с. Приморське на Катранівській косі, Жебріянському пасмі та по берегу Жебріянської бухти. Схема відбору проб на території ДБЗ та його околиць представлена на рис. 1. Ґрунтовий покрив вивчених ділянок утворений на алювіальних наносах кварцитовим піском з незначною домішкою ракушняка. Завдяки періодичному впливу моря на ґрунті виникають плями локального засолення. Рослинний покрив розріджений, на підвищених ділянках утворений переважно псамофітними ценозами; трапляються злаково-полинові асоціації, іноді – мохові дернини на піску. В депресіях, де періодично застоюється вода, формуються ценози засолено-лучної рослинності. На Жебріянському пасмі, завдяки штучним насадженням *Pinus pallasiana* D.Don., також є елементи лісової рослинності (Danube..., 2003).



Рис. 1. Карта-схема дельти Дунаю з місцями відбору зразків БГК

Фрагменти БГК відбирали скальпелем, по можливості, у непошкоджену стані вміщували в паперові коробочки або чашки Петрі. В лабораторії зразки висушували та зберігали в темряві. Одночасно з відбором альгологічного матеріалу були відібрані проби піску для фізико-хімічного аналізу. Визначали структуру (процент крупно-, середньо-, дрібнозернистого піску, глини й мулу) та клас ґрунту за гранулометричним складом, рН, електропровідність, а також процентний вміст CaCO_3 . Процедура аналізу ґрунтових зразків детально описана раніше (Schulz et al., 2016).

Умови культивування, виділення штамів, світлова мікроскопія. Подальшу обробку відібраних зразків проводили в лабораторії прикладної екології та фікології університету м. Росток (Німеччина). Для отримання накопичувальних культур фрагменти БГК висівали на поверхню агаризованого середовища Болда (1N BBM) (Bischoff, Bold, 1963). Культури вирощували в стандартних лабораторних умовах: з 12-годинним чергуванням світлової та темної фаз при освітленні $25 \text{ мкмоль фотонів} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ і температурі $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$. Дослідження накопичувальних культур починали на третій тиждень культивування. Альгологічно чисті культури виділяли, використовуючи стереомікроскоп Olympus ZS40 (Токіо, Японія), з подальшим очищенням від інших організмів шляхом багаторазових пересівів. Очищені штами ціанобактерій культивували на середовищі BG-11 (Stanier et al., 1971), евкаріотичних водоростей – на середовищі 3N BBM (Bischoff, Bold, 1963) за вказаних вище умов. Ідентифікацію та морфологічне вивчення виділених культур здійснювали за допомогою світлових мікроскопів Olympus IX70 і BX51 з диференційною інтерференційною оптикою Номарського (DIC). Мікрофотографії були отримані з використанням приєднаних до мікроскопів камер ColorView II і Olympus UC30 і опрацьовані за допомогою програмного забезпечення analySIS і cellSens Entry.

Молекулярні дослідження. Для низки штамів ціанобактерій і зелених водоростей був проведений філогенетичний аналіз за ділянкою нуклеотидної послідовності гена 16S/18S рРНК, а також регіону 16S-23S ITS ціанобактерій або ITS-1,2 зелених водоростей. Геномна ДНК екстрагована за допомогою спеціального набору DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) з використанням інструкцій його виробника. Нуклеотидні послідовності гена 16S/18S рРНК разом з регіоном 16S-23S ITS/ITS-1,2 ампліфіковані за допомогою набору Taq PCR Mastermix Kit (Qiagen GmbH) у термоциклері T gradient Thermoblock (Biometra, Germany) в умовах, описаних нами раніше (Mikhailyuk et al., 2016). Для ціанобактерій використовували праймери SSU-4-forw і ptLSU C-D-rev (Marin et al., 2005), для зелених водоростей – комбінацію праймерів EAF3 і ITS055R (Marin et al., 1998, 2003) та альгоспецифічних праймерів G800R і G500F (Darienko et al., 2019). Продукти ПЛР були очищені з використанням набору Qiagen PCR purification kit (Qiagen GmbH) згідно до інструкцій його виробника. Очищені продукти ПЛР секвеновані на комерційній основі компанією Qiagen з використанням праймерів SSU-4-forw, Wil 6, Wil 12, Wil 14, Wil 5, Wil 9, Wil 16 і ptLSU C-D-rev (Wilmotte et al., 1993; Marin et al., 2005) для ціанобактерій; G800R, 536R, 920F, 920R, 1400R, 1400F, GF, GR і ITS2F (White et al., 1990; Lane, 1991; Goff, Moon, 1993; Hoef-Emden, Melkonian, 2003; Marin et al., 2003; Darienko et al., 2019) для зелених водоростей. Отримані послідовності зібрані та відредаговані за допомогою програмного забезпечення Geneious (версія 8.1.8; Biomatters) і депоновані в GenBank під інвентарними номерами MT885329, MT887222, MT887223, MT885332–MT885334, MT901369–MT901381.

Для кількох штамів жовтозелених водоростей, виділених з БГК дельти Дунаю та узбережжя Балтійського моря (Німеччина), проаналізовані послідовності гена *rbcL* на базі університету м. Геттінген. Робота з цими штамми детально описана в статті, присвяченій жовтозеленим водоростям приморських піщаних місцезростань (Rybalka et al., 2020). Інформація про використані праймери та умови секвенування наведена в більш ранній роботі (Rybalka et al., 2009).

Для порівняння з оригінальними штамми були використані нуклеотидні послідовності ціанобактерій та евкаріотичних водоростей з бази даних GenBank, а також програма BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) для пошуку близьких послідовностей. Множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей здійснено за допомогою веб-сервера MAFFT (версія 7, Katoh, Standley, 2013) з наступним редагуванням вручну в програмі BioEdit (версія 7.2). Вирівнювання для філогенії по ділянці 16S-23S ITS/ ITS-1,2 виконано вручну в BioEdit, з урахуванням вторинної структури РНК даного регіону (див. нижче). Еволюційна модель, яка найбільше підходить до наявних сукупностей даних, була обрана за найменшим індексом АІС (Akaike, 1974), вирахованим у програмі MEGA (версія 6, Tamura et al., 2013). Філогенетичні дерева побудовані в програмі MrBayes 3.2.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003) з використанням

еволюційної моделі GTR+G+I з 5,000,000 генерацій. Два прогони з чотирьох марківських ланцюгів за методом Монте-Карло виконані одночасно з деревами, що відбиралися кожні 500 генерацій. Розділення частот між прогонами в кінці обчислення становило менше 0,01. Древа, відібрані до того, як показник правдоподібності досяг насичення, були пізніше відбраковані. Надійність топології дерев підтверджена аналізом максимальної правдоподібності (ML), виконаним у програмі GARLI 2.1.

Для моделювання та візуалізації вторинної структури ділянки 16S-23S ITS ціанобактерій або деяких спіралей 18S рРНК і ITS-2 зелених водоростей використані онлайн сервіси mfold (Zuker, 2003) та Pseudoviewer (Byun, Han, 2009).

Ідентифікація видів, систематичне положення, статистичний аналіз. Види ідентифікували з використанням визначників і монографій (Tsarenko, 1990; Komárek, Anagnostidis, 2005; Kovalenko, 2009; Komárek, 2013; Ettl, Gärtner, 2014), а також статей, присвячених питанням філогенії деяких проблемних груп (Fučíková et al., 2011, 2012, 2014; Darienko et al., 2019; Varcytė et al., 2018; Pröschold, Darienko, 2020; та ін.).

Систематичне положення виявлених видів ціанопрокаріот наведено за Komárek et al. (2014), з урахуванням пізніших таксономічних перетворень (Guiry, Guiry, 2020). Евкаріотичні водорості подані за системою, прийнятою у зведеннях «Водорості ґрунтів України» (Kostikov et al., 2001) та «Algae of Ukraine» (2006, 2009, 2011, 2014) з урахуванням змін у сучасному трактуванні *Chlorophyta* s.l. (Guiry, Guiry, 2020).

Домінуючі види виявляли за результатами прямого мікроскопіювання, відносну рясність виду оцінювали за шкалою Стармаха (Algae..., 1989). Частоту трапляння (F) визначали як відношення кількості зразків, у яких був виявлений вид, до загальної кількості вивчених зразків. Порівняння видового складу водоростей БГК досліджених піщаних дюн з іншими локалітетами проводили з використанням коефіцієнта флористичної спільності Сьоренсена-Чекановського (Shmidt, 1980). Для з'ясування кореляції видового складу водоростей і параметрів ґрунту проведено статистичний аналіз PerManova. Його виконано в програмі R Version 3.6.1, з командою Adonis з пакету Vegan, із використанням індексу відмінності Брая-Куртиса та залученням тест пермутації з 1000 пермутацій.

Результати та обговорення

За результатами прямого мікроскопіювання та культурального вивчення БГК приморських дюн ДБЗ і його околиць було ідентифіковано 60 видів з 4 відділів і 8 класів водоростей (табл. 1). Представники відділу *Chlorophyta* становлять більше половини (53,3%) видового складу, на другому місці ціанобактерії – 26,7%. Відділи *Streptophyta* (11,7%) і *Ochrophyta* (8,3%) представлені менш різноманітно у вивчених місцезростаннях. На рівні класів водоростей переважали *Сyanophyceae* (26,7%), *Trebouxiophyceae* (28,3%) та *Chlorophyceae* (25,0%).

Таблиця 1. Видовий склад водоростей біологічних ґрунтових кірочок приморських дюн Дунайського біосферного заповідника (ДБЗ) та його околиць (1 – Катранівська коса, 2 – Жебріянське пасмо, 3 – Жебріянська бухта), Казантипського природного заповідника (КПЗ) та островів Балтійського моря (Рюген: 4 – Глове, 5 – Прора, 6 – Баабе; Уздом: 7 – Карлсхаген, 8 – Цемпін)

Таксон*	ДБЗ			КПЗ	Балтійські острови					
	1	2	3		Рюген			Уздом		
					4	5	6	7	8	
CYANOBACTERIA										
CHROOCOCCALES										
<i>Chroococcus helveticus</i> Nägeli	+		+							+
<i>Chroococcus minor</i> (Kützing) Nägeli				+						
SYNECHOCOCCALES										
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>boryana</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek							+			+
<i>Leptolyngbya fragilis</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek				+						
<i>Leptolyngbya henningsii</i> (Lemmermann) Anagnostidis				+						
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>lagerheimii</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek				+						
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>nostocorum</i> (Bornet ex Gomont) Anagnostidis & Komárek				+						
<i>Nodosilinea epilithica</i> Perkerson & Casamatta	+	+	+		+	+	+	+	+	+
<i>Oculatella kazantipica</i> O.Vinogradova & Mikhailyuk				+						
<i>Oculatella ucrainica</i> O.Vinogradova & Mikhailyuk				Д						
<i>Phormidesmis</i> sp.	+	+					Д	+	+	
<i>Stenomitos</i> sp.	+	+					Д	Д	Д	
<i>Timaviella edaphica</i> (Elenkin) O.Vinogradova & Mikhailyuk	+	+		Д						
<i>Timaviella</i> sp.					+	+	+	+	Д	
OSCILLATORIALES										
<i>Coleofasciculus chthonoplastes</i> (Thuret ex Gomont) M.Siegesmund et al.	Д			Д						
<i>Coleofasciculus</i> sp.					+	Д				
<i>Hormosilla pringsheimii</i> Anagnostidis & Komárek										+
<i>Lyngbya</i> cf. <i>aestuarii</i> Liebman ex Gomont	+	+	+							
<i>Lyngbya</i> sp.					Д	Д				
<i>Microcoleus autumnalis</i> (Gomont) Strunecky et al.		+	Д							
<i>Microcoleus vaginatus</i> Gomont ex Gomont	Д	Д	Д	Д	+	Д	+	Д	+	
<i>Microcoleus</i> sp.						+	+	+	+	
<i>Phormidium</i> cf. <i>corium</i> Gomont				+			+			
<i>Phormidium</i> cf. <i>paulsenianum</i> J.B.Petersen		+								
NOSTOCALES										
<i>Calothrix</i> cf. <i>elenkinii</i> Kossinskaja							+	+		

<i>Desmonostoc muscorum</i> (C.Agardh ex Bornet et Flahault) Hrouzek et Ventura				+					
<i>Hassallia byssoidea</i> Hassall ex Bornet & Flahault	+	+		Д					
<i>Hassallia</i> sp.								+	+
<i>Nostoc</i> cf. <i>commune</i> Vaucher ex Bornet & Flahault	+	+	Д	Д				Д	Д
<i>Nostoc edaphicum</i> Kondrateva	+	Д	Д	Д	+	+	+	Д	Д
<i>Nostoc</i> cf. <i>linckia</i> Bornet ex Bornet & Flahault	+	+	+		+		+	+	+
<i>Nostoc</i> cf. <i>microscopicum</i> Carmichael ex Bornet et Flahault				+					
<i>Nostoc punctiforme</i> Hariot	+	+	+	+					
<i>Nostoc</i> sp.								+	+
<i>Roholtiella edaphica</i> Bohunická et Lukesová				+					
<i>Scytonema ocellatum</i> Lyngbye ex Bornet & Flahault		+		Д					
<i>Tolypothrix</i> cf. <i>fasciculata</i> Gomont				+					
<i>Tolypothrix</i> sp.								+	
<i>Wollea</i> sp.								Д	Д
CHLOROPHYTA									
CHLOROPHYCEAE									
<i>Actinochloris sphaerica</i> Korschikov		+				+			
<i>Bracteacoccus aggregatus</i> Tereg					+	+			
<i>Bracteacoccus bullatus</i> Fuciková, Flechtner & L.A.Lewis			+						
<i>Bracteacoccus</i> cf. <i>minor</i> (Schmidle ex Chodat) Petrová		+	+	+					
<i>Carteria</i> cf. <i>crucifera</i> Korshikov ex Pascher						+		+	
“ <i>Chlamydomonas</i> ” cf. <i>hydra</i> H.Ettl		+	+						
<i>Chlamydomonas</i> cf. <i>moewusii</i> Gerloff								+	
<i>Chlamydomonas</i> cf. <i>reisigii</i> H.Ettl						+			
<i>Chlorococcum oleofaciens</i> Trainor & Bold				+		+	+		
<i>Chlorobion lumulatum</i> Hindák	+				+	+		+	+
<i>Chlorobion</i> sp.						+			
<i>Chloromonas actinochloris</i> T.Pröschold et al.			+			+			+
<i>Chloromonas</i> cf. <i>augustae</i> (Skuja) Pröschold et al.						+			
<i>Chloromonas</i> sp.					+	+			
<i>Chlorosarcinopsis arenicola</i> Groover & Bold				+					
<i>Coelastrella aeroterrestica</i> Tchaikner et al.							+		
<i>Coelastrella terrestris</i> (Reisigl) Hegewald et Hanagata				+					
<i>Coelastrella</i> sp.	+			+					
<i>Heterochlamydomonas callunae</i> (Ettl) Mikhailyuk & Demchenko								+	
<i>Heterotetracystis</i> sp.	+		+						
<i>Lobochlamys</i> cf. <i>culleus</i> (Ettl) Pröschold et al.							+		+
<i>Lobochlamys</i> sp.		+		+	Д	Д	+		

<i>Monoraphidium</i> cf. <i>pusillum</i> (Printz) Komárková-Legnorová			+		+		+	+	+
<i>Pseudomuriella aurantiaca</i> (W.Vischer) N.Hanagata	+	+	+		+	+	+	+	+
<i>Pseudomuriella</i> sp.				+					
<i>Radiosphaera</i> sp.			+						
<i>Spongiochloris</i> cf. <i>incrassata</i> S.Chantanachat & Bold			+				+		+
<i>Spongiochloris spongiosa</i> (Vischer) R.C.Starr							+		
<i>Spongiochloris</i> sp.							+	+	
<i>Tetracystis pampae</i> R.M.Brown & Bold	+								
<i>Tetracystis</i> cf. <i>sarcinalis</i> R.M.Brown & Bold							+	+	+
<i>Tetracystis</i> sp.								+	
<i>Tetrademus arenicola</i> Mikhailiuk & P. Tsarenko	+		+		+	Д	+	+	+
<i>Tetrademus</i> sp.							+	+	+
TREBOUXIOPHYCEAE									
<i>Chlorella vulgaris</i> Beyerinck			+	+	+	+	+	+	+
<i>Chloroidium ellipsoideum</i> (Gerneck) Darienko et al.			+	+				+	
<i>Chloroidium</i> sp.							+		
<i>Coccomyxa simplex</i> Mainx				+			+	+	+
<i>Desmococcus olivaceus</i> (Persoon ex Acharius) J.R.Laundon				+					
<i>Diplosphaera chodatii</i> Bialosuknia		+	+	+	+				+
<i>Diplosphaera</i> sp.		+					+		
<i>Elliptochloris subsphaerica</i> (Reisigl) H.Ettl & G.Gärtner	+	+	+		+	+			+
<i>Eremochloris sphaerica</i> Fucíková et al.								+	
<i>Geminella interrupta</i> Turpin									+
<i>Gloeocystis</i> cf. <i>vesiculosa</i> Nageli		+							
<i>Koliella</i> sp.							+		
<i>Leptosira</i> cf. <i>erumpens</i> (Deason & Bold) Lukešová		+		+				+	
<i>Myrmecia</i> cf. <i>biatorellae</i> J.B.Petersen		+	+						+
<i>Myrmecia</i> sp.			+				+		
<i>Nannochloris</i> sp.		+		+					
<i>Neocystis</i> cf. <i>curvata</i> (P.A.Broadly) I.Kostikov et al.		+							
<i>Neocystis</i> sp.				+					
<i>"Parietochloris" cf. cohaerens</i> (R.D.Groover & Bold) Watanabe & G.L.Floyd			+						
<i>"Parietochloris" cf. ovoidea</i> Mikhailiuk & Demchenko		+	+						
<i>Pleurastrorarcina terriformae</i> Darienko et al.		+							
<i>Podohedra bicaudata</i> Geitler								+	
<i>Pseudostichococcus</i> cf. <i>monallantoides</i> L.Moewus							+		

<i>Stichococcus</i> cf. <i>bacillaris</i> Nageli			+		+	+		+	+
<i>Stichococcus</i> sp.				+					
<i>Trebouxia</i> cf. <i>aggregata</i> (Archibald) G.Gärtner			+						
<i>Xerochlorella dichotoma</i> (H.P.Ling & R.D.Seppelt) Mikhailyuk & P.M.Tsarenko								+	
<i>Xerochlorella minuta</i> (J.B.Petersen) Mikhailyuk & P.M.Tsarenko		+	+		+				+
ULVOPHYCEAE									
<i>Desmochloris</i> cf. <i>halophila</i> (Guillard, Bold & McEntee) Watanabe et al.					+				
STREPTOPHYTA									
CHLOROKYBOPHYCEAE									
<i>Chlorokybus atmophyticus</i> Geitler			+						+
KLEBSORMIDIOPHYCEAE									
<i>Interfilum paradoxum</i> Chodat & Topali	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsormidium crenulatum</i> (Kützing) Lokhorst	+	Д	Д		+				Д
<i>Klebsormidium flaccidum</i> (Kützing) P.C.Silva et al.	Д	+	Д		Д	Д	Д	+	+
<i>Klebsormidium fluitans</i> (F.Gay) Lokhorst					+				
<i>Klebsormidium mucosum</i> (J.B.Petersen) Lokhorst									Д
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>nitens</i> (Kützing) Lokhorst				+	+	+	+		
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>subtile</i> (Kützing) Mikhailyuk et al.	+		+	+		+		+	
<i>Klebsormidium</i> sp.					+				
<i>Streptosarcina arenaria</i> Mikhailyuk & Lukešová	+								
ZYGNEMATOPHYCEAE									
"<i>Cylindrocystis</i>" cf. <i>brebissonii</i> (Ralfs) De Bary	+	+	+						
<i>Cylindrocystis crassa</i> De Bary					+	+			+
OCHROPHYTA									
EUSTIGMATOPHYCEAE									
<i>Vischeria helvetica</i> (Vischer & Pascher) D.J.Hibberd				+				+	+
<i>Vischeria magna</i> (J.B.Petersen) Kryvenda et al.				+				+	+
XANTHOPHYCEAE									
<i>Bumilleriopsis</i> cf. <i>peterseniana</i> Vischer & Pascher									+
<i>Heterococcus</i> sp. 1			+						
<i>Heterococcus</i> sp. 2		+							
<i>Pleurochloris meiringensis</i> Vischer			+			+		+	
<i>Xanthonema</i> cf. <i>bristolianum</i> (Pascher) P.C.Silva					+	+	+	+	+
<i>Xanthonema exile</i> (Klebs) P.C.Silva					+			+	

BACILLARIOPHYCEAE									
<i>Achnanthes coarctata</i> (Brébisson ex W.Smith) Grunow	+		+	+	+	+	+	+	+
<i>Hantzschia abundans</i> Lange-Bertalot					+		+		
<i>Hantzschia amphioxys</i> (Ehrenberg) Grunow	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Luticola cohnii</i> (Hilse) D.G.Mann					+	+	+	+	+
<i>Luticola nivalis</i> (Ehrenberg) D.G.Mann				+					
<i>Luticola ventricosa</i> (Kützing) D.G.Mann				+					
<i>Pinnularia intermedia</i> (Lagerstedt) Cleve					+	+	+	+	+
<i>Pinnularia</i> cf. <i>intermedia</i> (Lagerstedt) Cleve							+	+	+
<i>Staurophora</i> sp.						+	+		+
* Напівжирним шрифтом відмічені види, оригінальні штами яких були вивчені молекулярно-філогенетичними методами. Д – види, домінуючі в альгоутгрупованнях. ¹ Список видів островів Балтики складено за нашими попередніми публікаціями (Schulz et al., 2016; Mikhailuyuk et al., 2019a, c). Із діатомових включено лише невелику частину видів із наведених у Schulz et al., 2016. Це види, які найбільш ясно розвивалися у кірочках (за даними мікроскопічного вивчення зразків та накопичувальних культур).									

Родовий спектр альгофлори приморських дюн складала 49 родів, з яких переважна більшість (83,7%) була представлена одним видом. Сім родів (*Microcoleus* Desmazières ex Gomont, *Bracteacoccus* Tereg, *Diplosphaera* Bialosuknia, *Myrmecia* Printz, *Parietochloris* Watanabe & G.L.Floyd та *Heterococcus* Chodat) мали по 2 види кожний. Найбагатшими родами у досліджених місцезростаннях були *Nostoc* Vaucher ex Bornet & Flahault (4 види) і *Klebsormidium* P.C.Silva, Mattox & W.H.Blackwell (3 види).

Показники трапляння виявлених видів коливалися в значних межах. Двадцять два види (36,7%) були виявлені тільки в одному зразку, причому їхня частка була неоднаковою в різних відділах: найрідкіснішими були жовтозелені водорості, усі вони знайдені лише раз. Найпоширенішими у досліджених місцезростаннях виявилися представники роду *Klebsormidium*: *K. flaccidum* (F = 90%) і *K. crenulatum* (F = 80%). Ці види, а також *Microcoleus vaginatus* (F = 60%) входили в домінуючий комплекс БГК на всіх вивчених ділянках. Також субдомінантами в деяких пробах виступали види *Nostoc* – *N. cf. commune* і *N. edaphicum*, а також *Microcoleus autumnalis* і *Coleofasciculus chthonoplastes*. Часто траплялися *Lyngbya* cf. *aestuarii* (F = 80%), *Nodosilinea epilithica*, *Nostoc edaphicum* (F = 70% для кожного), *Diplosphaera chodatii* та *Hantzschia amphioxys* (F = 60,0% для кожного).

Вивчені ділянки мали деякі відмінності щодо видового багатства і систематичної структури альгофлори піщаних дюн (табл. 1). Якщо співставити загальну кількість видів, виявлених на кожній з ділянок, із середньою кількістю видів на зразок, то виходить наступний розподіл: Катранівська коса – 28/18, Жебріанське пасмо – 37/15 та Жебріанська

бухта – 38/16,5. Таким чином, БГК з Катранівської коси відрізнялися найбільшим видовим різноманіттям на зразок. Вірогідно, це пов'язано з тим, що тільки на цій ділянці їх відбирали не лише серед розрідженої псамофітної рослинності, але й у пониженнях з ознаками засолення. В систематичній структурі альгофлори коси ціанобактерії відігравали провідну роль (46,4%), частки зелених (25%) і стрептофітових (21,4%) водоростей були суттєво нижчими. Серед *Chlorophyta* переважали види класу *Chlorophyceae* (85,7%). Відділ *Ochrophyta* (7,1%) був представлений лише діатомеями; жовтозелені водорості в зразках БГК із цієї ділянки не виявлені. Домінантом приморських БГК на косі була матоутворююча ґрунтова ціанобактерія *Microcoleus vaginatus* і широко поширений у наземних місцезростаннях *Klebsormidium flaccidum*, до яких у місцях із плямами засолення в якості субдомінанту приєднувався галофіл *Coleofasciculus chthonoplastes*. Решта видів розвивалася в незначних кількостях. Згадані особливості пов'язані з більш суворими умовами, порівняно з іншими вивченими ділянками. Вузька смуга піску, оточена морем, з пологим ландшафтом і вкрита лише розрідженою трав'яною рослинністю, в більшій мірі, ніж континентальні ділянки, зазнає впливу прямої сонячної радіації, температурних коливань, водного дефіциту й повітряно-крапельного та хвильового засолення. Як відомо, переважання ціанобактерій у систематичній структурі кірочок і їхня домінуюча роль у БГК характерні для аридних місцезростань, які відчувають дефіцит вологи (Büdel, 2002).

На підвищеному Жебріянському пасмі ціанобактерії, залишаючись досить різноманітними (37,8%), поступилися першим місцем у систематичній структурі альгофлори зеленим водоростям (43,2%). *Streptophyta* (13,5%) та *Ochrophyta* (5,4%) відігравали супутню роль. Цікаво, що, на відміну від попередньої ділянки, значну частку відділу зелених водоростей (68,8%) представники класу *Trebouxiophyceae*. Домінантом БГК на піску під соснами, де трав'яна рослинність була відсутньою і спостерігалися лише слабкі ознаки розвитку мохів, у деяких випадках був також *Microcoleus vaginatus*, проте часто в цій ролі виступала стрептофітова водорість *Klebsormidium crenulatum*. Відмічено досить рясний розвиток ціанобактерії *Nostoc edaphicum*; також незначні скупчення ниток *Microcoleus autumnalis* і *Hassallia byssoidea*. Решта видів траплялися в БГК у незначних кількостях.

На дюнах Жебріянської бухти БГК формували переважно зелені водорості (53,8%), частка ціанобактерій була вдвічі меншою (23,1%), а *Streptophyta* (12,8%) і *Ochrophyta* (10,3%) представлені майже однаково. Цікаво, що на цій ділянці внесок класів *Chlorophyceae* (47,6%) і *Trebouxiophyceae* (52,4%) у систематичну структуру був близьким. У домінуючий комплекс прибережних БГК входили ціанобактерії *Microcoleus vaginatus*, *M. autumnalis*, *Nostoc edaphicum*, *N. cf. commune* та види *Klebsormidium* (*K. flaccidum* і *K. crenulatum*). Присутність у складі домінантів стрептофітових водоростей свідчить про менш напружені екологічні умови порівняно з піщаною косою.

Спільними для всіх трьох ділянок були 14 видів, з яких 50% склали ціанобактерії. Якщо оцінювати специфіку видового складу БГК кожної з ділянок за часткою видів, які були відмічені тільки на одній з них, то їхній відсоток є найменшим на Катранівській косі: з 28 видів тільки 5 (17,8%) не знайдені на інших досліджених ділянках (див. табл. 1). Серед загальної кількості видів, виявлених на кожній з двох інших ділянок (Жебріяньському пасмі та узбережжі Жебріяньської бухти), приблизно рівні частки (32,4 і 33,3% відповідно) склали види, знайдені тільки на одній з них. У переважній більшості це зелені водорості, деякі *Streptophyta*, а також види *Xanthophyceae*. Серед них є рідкісні та нові таксони, про які детальніше буде сказано нижче.

Двадцять три штами, виділені з БГК приморських дюн ДБЗ, були вивчені молекулярно-філогенетичними методами, що дозволило уточнити їхнє систематичне положення та провести точнішу видову ідентифікацію.

Так, три штами ціанобактерій увійшли до молекулярних клад, сформованих представниками родів *Microcoleus* (*Oscillatoriales*), *Nodosilinea* R.B.Perkerson & D.A.Casamatta (*Synechococcales*) та *Nostoc* (*Nostocales*, рис. 2).

Найбільший флористичний інтерес являє знахідка представника нового для України роду *Nodosilinea* (рис. 4, а). Морфологічний опис виділеного штаму та результати філогенетичного аналізу за нуклеотидною послідовністю гена 16S рРНК опубліковані раніше (Mikhailyuk et al., 2016). Додаткові дослідження нуклеотидного складу ділянки 16S-23S ITS показали, що наш штам має високу схожість з референтним штамом виду *N. epilithica* Kováčik 1998/7 (рис. 5, а).

Порівняння вторинної структури інформативних геліксів цієї ділянки (не наведено) нашого та референтного штаму показало лише незначні відмінності. *Nodosilinea epilithica* було описано за матеріалами, виділеними з біологічних плівок, виявлених на стіні будинку в Італії, а також з обростання вологої кам'яної стіни фонтанчика для пиття в Греції, тому спочатку його вважали субаерофітним епілітом (Perkerson et al., 2011).

Пізніше з'явилися дані, що суттєво розширили екологічні і, особливо, географічні рамки цього виду. *Nodosilinea epilithica* виявили в Арктиці (Центральний Свалбард, Норвегія) на субстратах антропогенного походження (Raabova et al., 2016), а також у культурах, виділених із каштанового ґрунту сухих степів Волгоградської обл. Росії (Temraleeva, Dronova, 2016).

Близькі за молекулярною структурою штами знайдені в БГК високогірних холодних пустель Західних Гімалаїв (Čarková et al., 2016). Нами цей вид був також виділений з БГК дюн Балтійського узбережжя Німеччини (Mikhailyuk et al., 2019b). Як видно з рис. 2 і 3, німецькі штами (Ru-6-11 і Us-2-1) та український штам *N. epilithica* мають високий ступінь подібності за послідовністю 16S рРНК і ділянкою 16S-23S ITS.

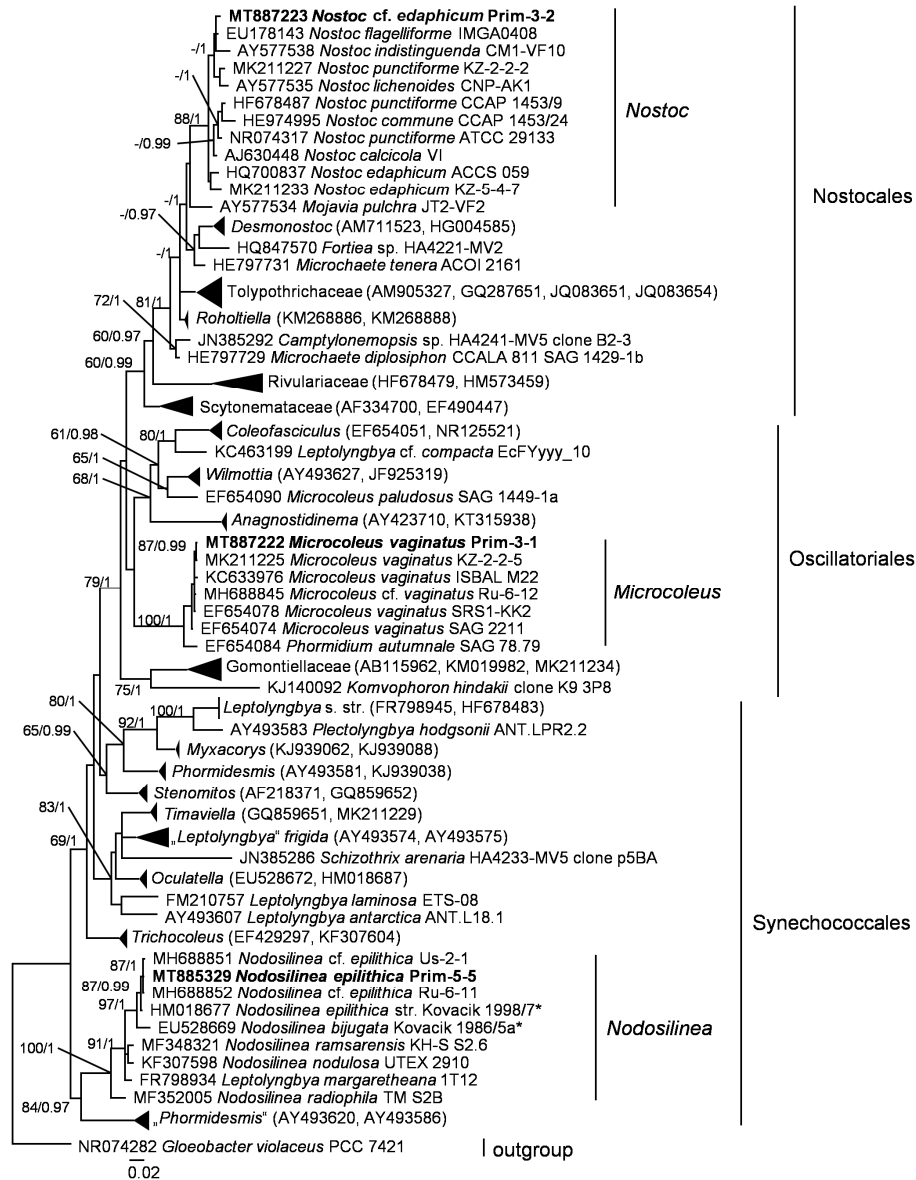


Рис. 2. Молекулярна філогенія *Суанопрокаріота* (*Synechococcales*, *Oscillatoriales* і *Nostocales*) на основі порівняння нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК. Філогенетичні дерева на рис. 2–8 побудовані Байєсівським методом зі значеннями Байєсівської ймовірності (Bayesian Posterior Probabilities (PP), справа) та підтримки бутстрепа при аналізі максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood bootstrap support (BP), зліва). Вказані тільки значення PP вище 0,8 і BP вище 50%. Послідовності штамів, що належать до даного дослідження, відмічені напівжирним шрифтом, автентичні штами – зірочкою

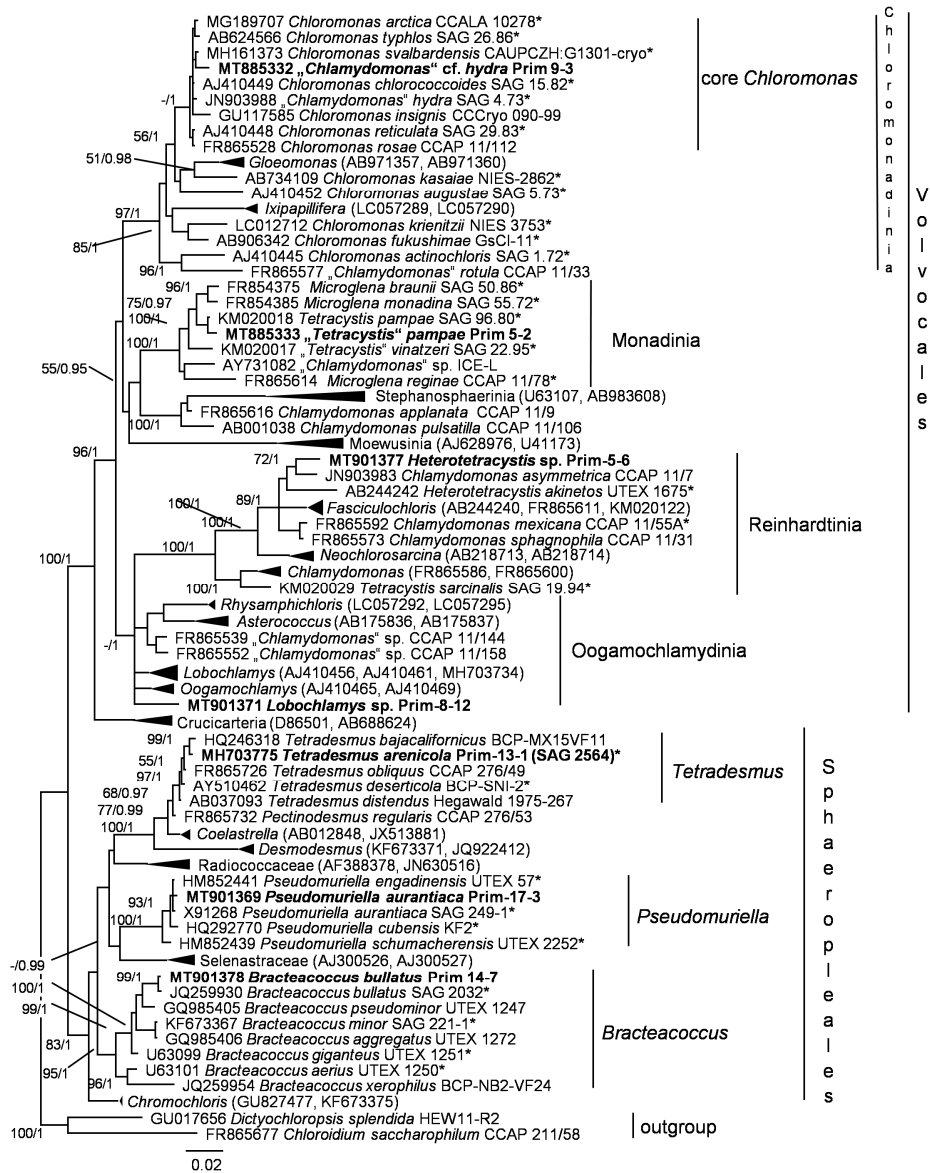


Рис. 3. Молекулярна філогенія *Chlorophyceae* (*Chlorophyta*) на основі порівняння нуклеотидних послідовностей гена 18S рРНК

Що стосується еваріютичних водоростей, то вивчені проби з ДБЗ та його околиць дозволили описати нові для науки таксони і зробити низку цікавих флористичних знахідок. Штами зелених водоростей класу *Chlorophyceae* увійшли до молекулярних клад *Chloromonadinia*, *Reinhardtinia*, *Oogamochlamydia*, *Monadinia* (*Volvocales*), а також *Bracteacoccus*, *Pseudomuriella* N.Hanagata і *Tetradesmus* G.M.Smith (*Sphaeropleales*, рис. 3).

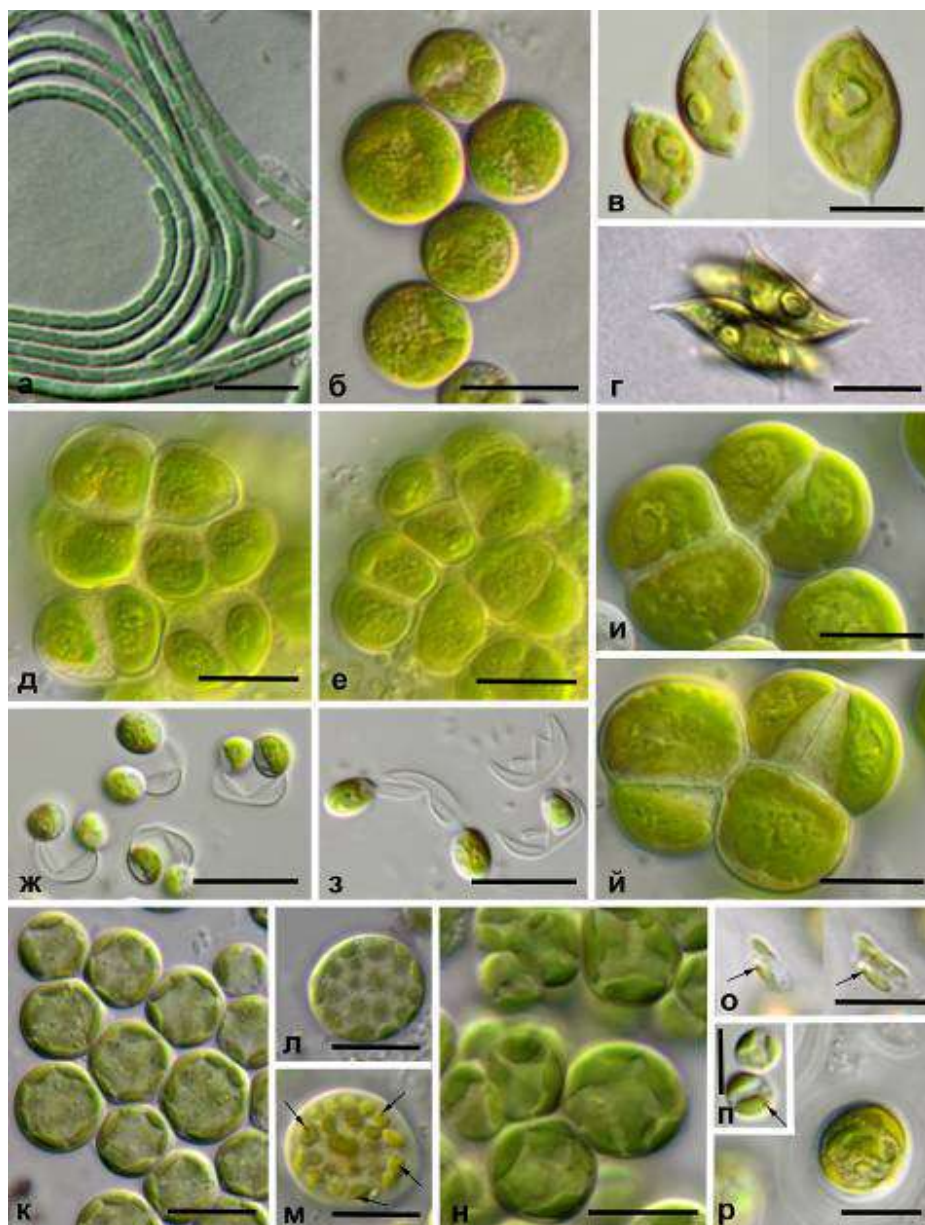


Рис. 4. Нові для флори України та рідкісні види ціанобактерій і водоростей з біологічних ґрунтових кірочок Дунайського біосферного заповідника: *a* – *Nodosilinea epilithica*; *б* – *Pseudomuriella aurantiaca*; *в, г* – *Tetradismus arenicola* (одноклітинна стадія у культурі (*в*) та об'ємні скручені 4-клітинні ценобії в природних пробах (*г*); *д, е* – *Pleurostrosarcina terriformae*; *ж, з* – *Xerochlorella minuta*; *и, й* – *Streptosarcina arenaria*; *к-р* – *Pleurochloris meiringensis* (український штаб (*н*) у порівнянні зі штабом з піщаних дюн Балтійського моря (Ru-s-4-1, *к-м, о-р*), вегетативні клітини (*к, л, н*), зооспорангій (*м*), зооспори (*о*), гемізооспори (*п*), стара вегетативна клітина з шаруватим слизом (*р*). Стрілки вказують стигму. Масштаб: 10 мкм (*а-н, р*), 5 мкм (*о, п*)

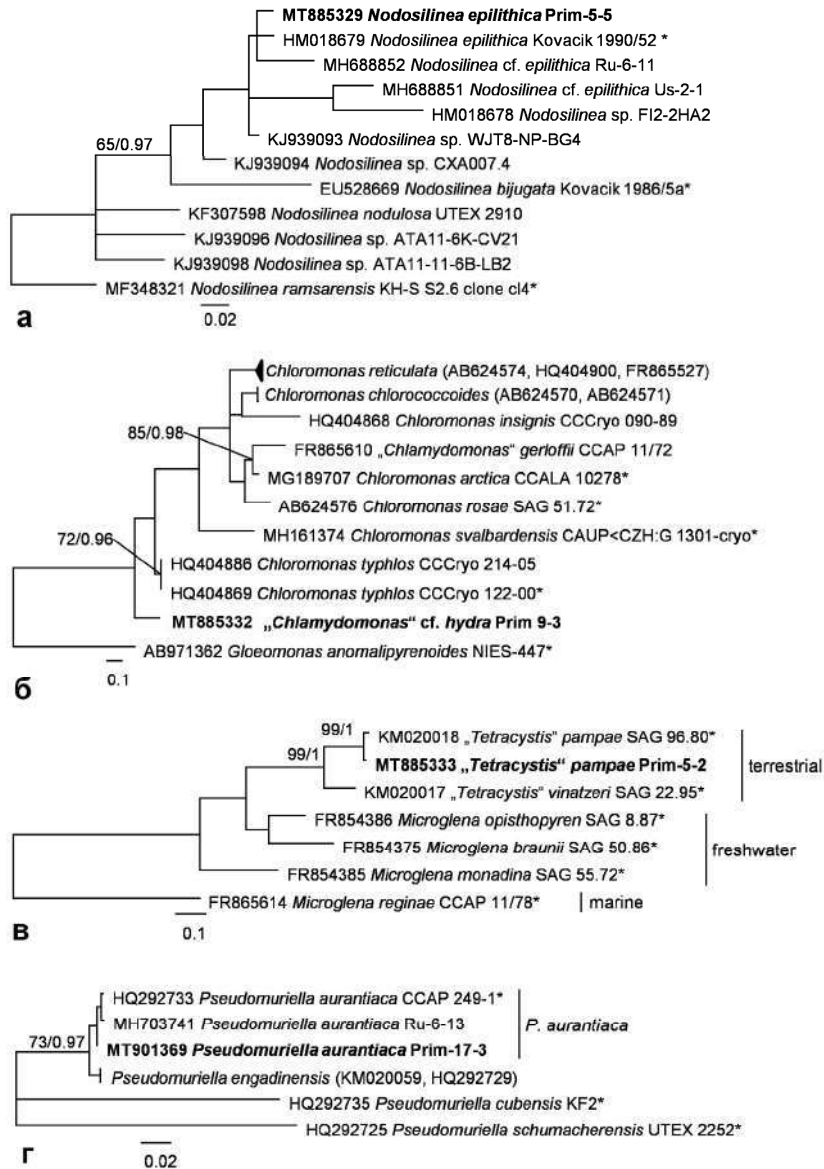


Рис. 5. Молекулярна філогенія на основі порівняння нуклеотидних послідовностей ділянок, що містять регіон ITS: *Nodosilinea*, 16S-23S ITS (а), *Chloromonas*, ITS-2 (б), *Microglena*, ITS-1-5.8S рРНК-ITS-2 (в) та *Pseudomuriella*, ITS-1-5.8S рРНК-ITS-2 (г)

Дослідження нуклеотидної послідовності ділянки ITS деяких із цих штамів дозволило визначити їх до виду: "*Chlamydomonas*" cf. *hydra*, "*Tetracystis*" *pampae* і *Pseudomuriella aurantiaca* (рис. 5, б–г), а також описати новий вид *Tetrademus arenicola* (Mikhailyuk et al., 2019b).

Штам *Chloromonas Gobi* має філогенетичну подібність (18S рРНК філогенія) із кількома видами цього роду, які входять до групи власне

Chloromonas (core *Chloromonas* згідно з роботою Barcytè et al. (2018), у т.ч. з типовим штамом морфологічно близького виду "*Chlamydomonas*" *hydra* (рис. 3 та 6, з). Філогенія за ділянкою ITS-2 показала, що цей штам утворює окрему лінію (рис. 5, б). На жаль, порівняння з послідовністю ITS-2 "*Chlamydomonas*" *hydra* неможливе через відсутність цих даних, тому ми визначили даний штам як "*Chlamydomonas*" cf. *hydra*. Він є рідкісним, в Україні був знайдений у лісовому ґрунті Канівського природного заповідника (Костіков та ін., 2001) та в забрудненій калюжі в Києві (Lilitskaya, 2004).

"*Tetracystis*" *ramphae* досить часто трапляється в ґрунтах України (Kostikov et al., 2001, рис. 6, u). Він зареєстрований у Поліссі, Лісостепу, рідше – у Карпатах і Криму. Крім факту молекулярного визначення даного представника, цікаво, що він, ймовірно, належить до нещодавно перевідкритого роду *Microglena* Ehrenberg (Demchenko et al., 2012). Хоча на даний момент до цього роду відносяться прісноводні та солонуватоводні види з монадною організацією клітини, його різноманіття, ймовірно, ширше. Він може включати кріофільні *Chlamydomonas*-подібні представники (Liu et al., 2006; Eddie et al., 2008) і деякі наземні види, що традиційно відносять до роду *Tetracystis* R.M.Brown & Bold (Fulnečková et al., 2012; Demchenko et al., 2013).

Pseudomuriella aurantiaca ймовірно є широко поширеним видом з неявною *Bracteacoccus*-подібною морфологією (рис. 9, б), був описаний як *Muriella aurantiaca* Vischer і пізніше перенесений у *Pseudomuriella* N.Hanagata на основі молекулярних даних (Fučíková et al., 2011).

Формально є новим для України видом і родом, хоча, на нашу думку, траплявся й раніше в ґрунтах та наземних місцезростаннях і частково визначався як морфологічний вид *Muriella terrestris* J.B. Petersen (Kostikov et al., 2001; Mikhailyuk et al., 2011; Darienko, 2012).

Представник *Tetradesmus* попередньо був визначений (Tsarenko, 1990) як широко поширений вид *T. obliquus* (Turpin) M.J.Wynne (= *Acutodesmus obliquus* (Turpin) Hegewald & Hanagata). Подальше вивчення цього штаму і кількох штамів з приморських дюн Балтійського моря (Німеччина) з використанням комплексного підходу дозволило описати новий для науки вид – *Tetradesmus arenicola* Mikhailyuk & P.Tsarenko (Mikhailyuk et al., 2019b, рис. 4 в, з).

У накопичувальній культурі водорість утворювала скручені 4-клітинні ценобії (рис. 4, з), які при подальшому культивуванні часто розпадалися на окремі клітини (рис. 4, в). Вже після опису нового таксону нами було знайдено повідомлення про знахідку морфологічно подібної водорості в ґрунтах Данії (Petersen, 1932), Знахідка була визначена як сумнівний вид *Scenedesmus tetradesmiformis* (Wolosz.) Chodat із приміткою, що згаданий вид є мешканцем планктону, тоді як виявлена нами водорість розвивалася за наземних умов. Тепер ми цілком можемо припустити, що вона належить до описаного нами виду з роду *Tetradesmus*, який є характерним для ґрунтів Європи.



Рис. 6. Рідкісні та цікаві флористичні знахідки ціанобактерій та водоростей з біологічних ґрунтових кірочок Дунайського біосферного заповідника: а, б – *Chroococcus helveticus* (фарбування слизової обгортки метиленовим синім (б)); в – *Timaviella edaphica*; з – *Phormidium* cf. *paulsenianum*; д – *Hassallia byssoidea*; е, ж – *Heterotetracystis* sp. (покраска слизу метиленовим синім (ж)); з – “*Chlamydomonas*” cf. *hydra*; и – “*Tetracystis*” *rarpae* (поодинокі клітини (вгорі) та тетради (знизу)); й – *Bracteacoccus bullatus*; к – *Leptosira* cf. *erumpens*; л – *Trebouxia* cf. *aggregata*. Стрілки вказують стигму. Масштаб: 10 мкм (а, б, е-л), 5 мкм (в, з)

Цікавою також є знахідка представника роду *Bracteacoccus*. Хоча нам не вдалося отримати послідовність ITS для оригінального штаму, наведене молекулярне дерево на основі 18S рРНК (рис. 3) дозволяє визначити його як *Bracteacoccus bullatus*. Автентичний штам цього виду був виділений з ґрунтів Німеччини, інші досліджені штами свідчать про його широке поширення в наземних місцезростаннях Євразії, Північної Америки та полярних регіонів (Свалбард і Антарктида) (Fučíková et al., 2012). В Україні вид був виявлений двічі – у ґрунтах під насадженнями *Robinia pseudoacacia* L. в Дніпропетровській і Запорізькій областях (Mamaeva et al., 2018; Maltsev et al., 2020). Цей вид є криптичним, тобто мало відрізняється морфологічно від інших представників *Bracteacoccus* із середніми розмірами клітин (рис. 10, *й*), тому точна його ідентифікація можлива лише з використанням молекулярних методів.

Точне визначення штамів, що увійшли до клад *Reinhardtinia* і *Oogamochlamydia* (згідно до роботи Nakada et al., 2008), на даний момент неможливе. Перший з них, ймовірно, являє собою один з видів роду *Heterotetracystis* E.R.Cox & T.R.Deason (рис. 3; 6, *е, ж*), таксономічна ревізія якого на основі комплексного підходу поки що не здійснена. Види цього роду є рідкісними знахідками в ґрунтах України, переважно з гірських регіонів (Kostikov et al., 2001). Штам із клади *Oogamochlamydia*, попередньо визначений нами як *Lobochlamys* sp. (рис. 3), очевидно, є новим для науки родом, для опису якого необхідні поглиблені дослідження. Згадана класа *Chlorophyceae* з прісноводно-наземною екологією на сьогодні включає 6 чітко окреслених родів (Watanabe, Nakada, 2018) і наявність нових, ще не описаних ліній, вказує на те, що її різноманіття ще не вичерпане.

Досліджені штами зелених водоростей класу *Trebouxiophyceae* віднесені до родів *Diplosphaera*, *Nannochloris* Naumann, "*Parietochloris*", *Leptosira* Borzi, *Trebouxia* Puymaly, *Xerochlorella* Fučíková, P.O.Lewis & L.A.Lewis та *Pleuraestrosarcina* H.J.Sluijman & P.C.J.Blommers (рис. 7).

Представники перших двох родів є звичайними широко поширеними наземними водоростями. Завдяки нещодавній таксономічній ревізії *Stichococcus*-подібних водоростей (Pröschold, Darienko, 2020) один зі штамів *Diplosphaera* вдалося визначити до виду *Diplosphaera chodatii* (рис. 8, *й*), тоді як для другого поки що точне визначення неможливе – *Diplosphaera* sp. Визначення іншого широко поширеного представника, *Nannochloris* sp., є проблематичним через відсутність відповідної таксономічної ревізії на основі молекулярних даних (рис. 7).

Цікавою є також знахідка *Leptosira* (рис. 6, *к*) і "*Parietochloris*" (рис. 8, *д-ж*). Ці водорості не є тривіальними, представники "*Parietochloris*" мають бути віднесені до роду *Lobosphaera* Reisingl (Neustupa et al., 2011). Проте відповідні ревізії цих таксонів поки що не проведені, тому точне визначення до виду на основі молекулярних даних неможливе. Цікавою є знахідка "*Parietochloris*" cf. *ovoidea*, оскільки цей вид був описаний нами з гранітних відслонень півдня України відносно нещодавно

(Mikhailyuk et al., 2003) і вважається рідкісним. Однак відсутність даних щодо послідовності ITS автентичного штаму не дозволяє бути впевненим у його визначенні.

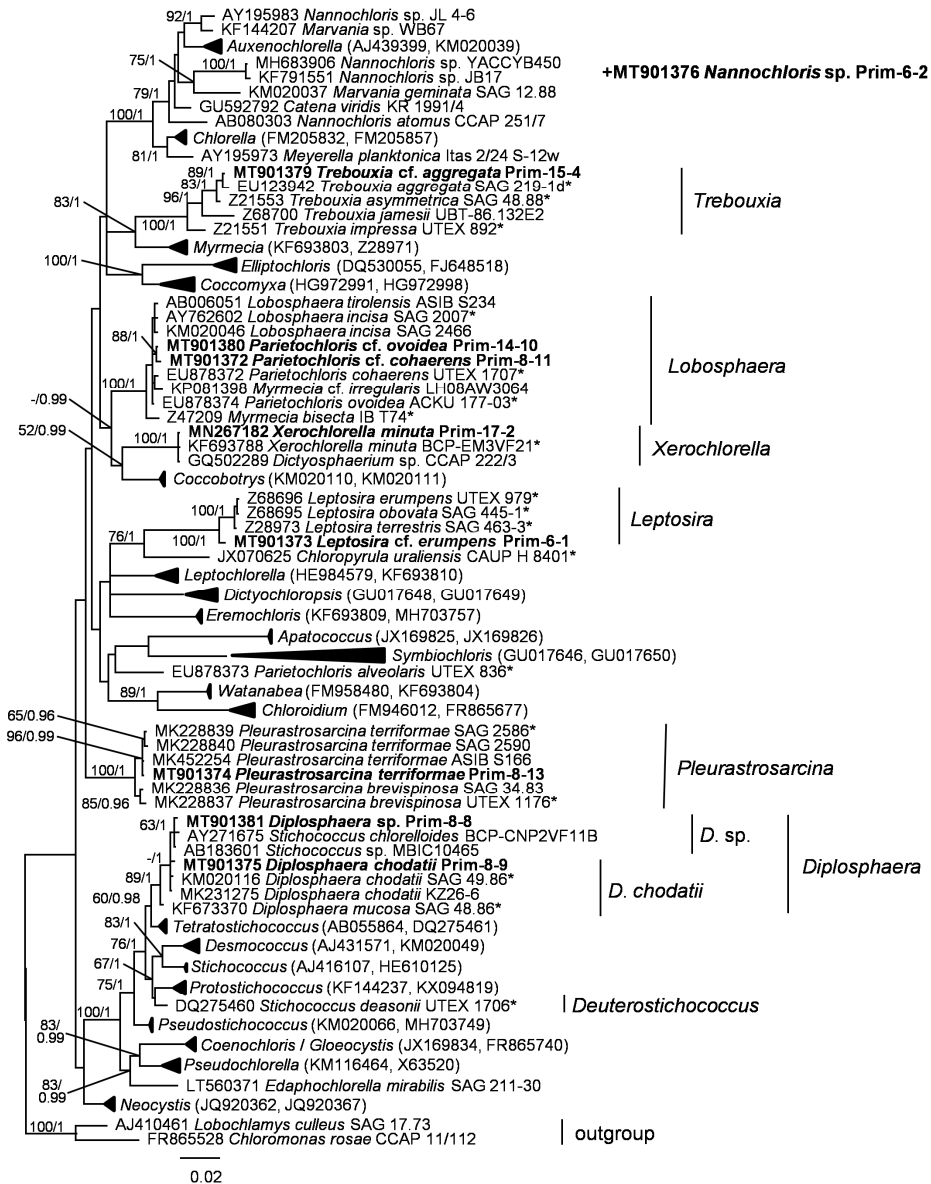


Рис. 7. Молекулярна філогенія *Trebouxiophyceae* (Chlorophyta) на основі порівняння нуклеотидних послідовностей гена 18S рРНК

Trebouxia cf. *aggregata* (рис. 6, л) була ідентифікована за послідовністю 18S рРНК, оскільки у нашому сиквенсі ділянка ITS відсутня. Цей вид є цікавою флористичною знахідкою. Більшість видів *Trebouxia* – типові фотобіонти лишайників, деякі види також зрідка трапляються у вільноживучому стані (Voitsekhovich et al., 2011). *Trebouxia aggregata* на території України була виявлена у степовій зоні: в ґрунтах та тріщинах мармурових колон античного м. Ольвія (Kostikov et al., 2001) і на гранітних відслоненнях, де розвивалася як хазмоендоліт та епіфіт слані лишайника (Mikhailyuk et al., 2011).

Штам, визначений нами як *Xerochlorella minuta* (рис. 4, ж, з), також є цікавою знахідкою. Фактично він є широко поширеним наземним видом *Dictyosphaerium minutum* J.B.Petersen (= *D. chlorelloides* (Nauman) Komárek & Perman), виявленим раніше в українській флорі. Детальне вивчення нещодавно описаного монотипного роду *Xerochlorella* (Fučíková et al., 2014) засвідчило, що він є раніше описаним ґрунтовим видом *Dictyosphaerium minutum* (Mikhailyuk et al., 2020).

Також було встановлено, що *D. minutum* не є генетично спорідненим з морфологічно подібним прісноводним видом *D. chlorelloides*, з яким його раніше об'єднали (Komárek, Perman, 1978) і перевели до роду *Chlorella* Beyerinck на основі вивчення лише одного прісноводного штаму (Bock et al., 2011). Цей вид був неодноразово виявлений в наземних місцезростаннях України (як *D. chlorelloides*): на кам'янистих відслоненнях Національного природного заповідника «Кам'яні Могили» (Darienکو, Hoffmann, 2003) і Національного природного парку «Подільські Товтри» (Darienکو, 2008), а також на гранітних відслоненнях долин річок Південний Буг, Тетерев та Рось (Mikhailyuk et al., 2011; Mikhailyuk, 2013).

Найцікавішою знахідкою серед требуксієфіцієвих водоростей є *Pleurostrosarcina terriformae* – новий рід і вид для флори України. Водорість має пакетоподібну морфологію і попередньо була визначена як вид роду *Apatococcus* F.Brand (рис. 4, д, е).

Молекулярно-філогенетичний аналіз за геном 18S рРНК показав близьку спорідненість штаму з рідкісним родом *Pleurostrosarcina*, а нещодавня таксономічна ревізія цих водоростей дозволила провести ідентифікацію до виду (Darienکو et al., 2019). Нам не вдалося отримати якісну послідовність ITS для оригінального штаму, проте філогенія на основі 18S рРНК (рис. 5) дозволяє визначити його як *P. terriformae*.

Вторинна структура гелікса V9, рекомендованого як одна з консервативних ділянок 18S рРНК (Darienکو et al., 2019), нашого штаму та автентичного *P. terriformae* – ідентичні. Ці водорості є рідкісними представниками, типовими для аридних наземних місцезростань. *Pleurostrosarcina terriformae* було знайдено в БГК пустель Чилі (Південна Америка), а також у ґрунті прибережної зони в Хорватії (Darienکو et al., 2019). Наша знахідка цього виду в БГК піщаних дюн також підтверджує аридний характер цього місцезростання.

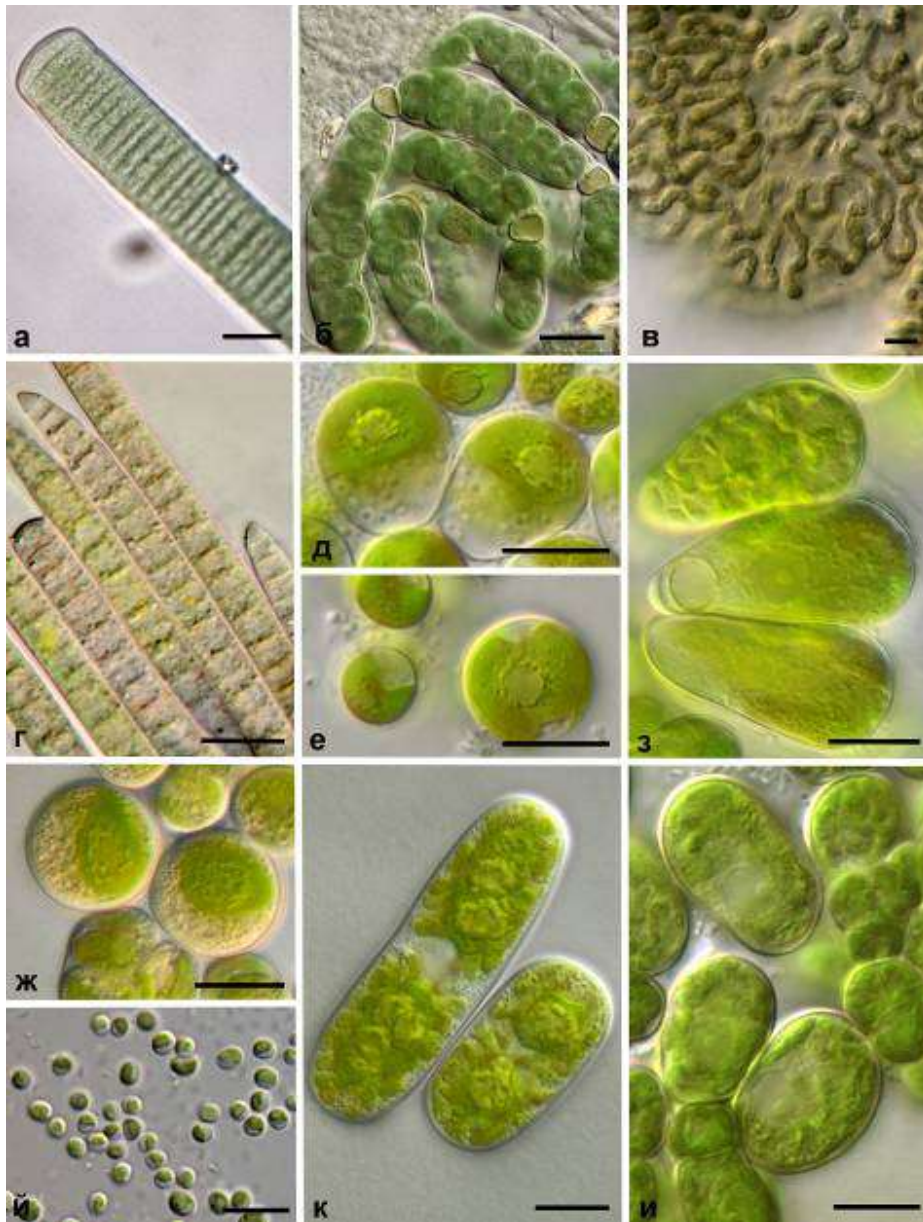


Рис. 8. Домінуючі та з високою частотою трапляння ціанобактерії і водорості в ґрунтових біологічних кірочках Дунайського біосферного заповідника: а – *Lyngbya* cf. *aestuarii*; б – *Nostoc* cf. *edaphicum*; в – *Nostoc* cf. *commune*; г – *Microcoleus vaginatus*; д, е – *Parietochloris* cf. *ovoidea* (вигляд з вузького полюсу клітини, видно дволопате́вий хлоропласт (е)); ж – *Parietochloris* cf. *cohaerens*; з – *Myrmecia* cf. *biatorellae*; и – *Myrmecia* sp.; й – *Diplosphaera chodatii*; к – “*Cylindrocystis*” cf. *brebissonii*. Масштаб 10 мкм

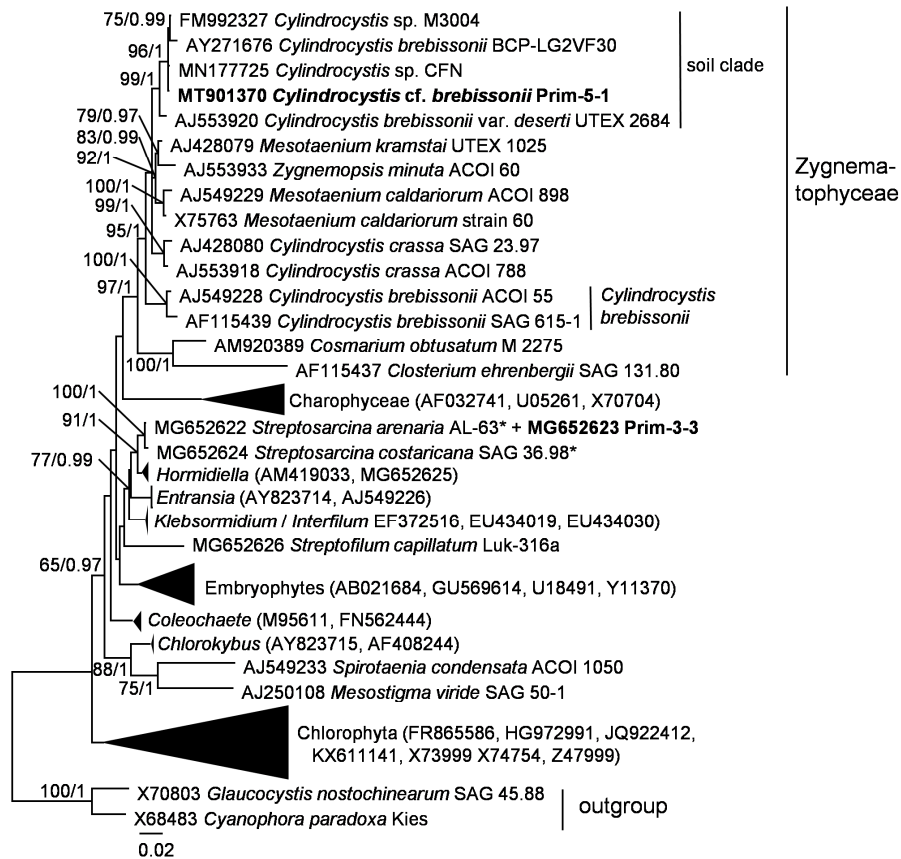


Рис. 9. Молекулярна філогенія *Streptophyta* на основі порівняння нуклеотидних послідовностей гена 18S рРНК

Вивчені штами стрептофітових водоростей віднесені до родів “*Cylandrocystis*” Meneghini ex De Bary та *Klebsormidium*, один із штамів описаний як новий рід *Streptosarcina* Mikhailiuk & Lukešová. Згідно з ITS філогенії, штам *Klebsormidium* виявився представником найчисленнішої класи E (Mikhailiuk et al., 2015) та, ймовірно, є широко поширеним видом *Klebsormidium* cf. *subtile* (рис. 10).

Штам кон'югуючої водорості морфологічно дуже близький до *Cylandrocystis brebissonii* (рис. 11, κ). Проте молекулярне дослідження кон'югуючих водоростей, а також робота щодо арктичних представників роду *Cylandrocystis* (Gontcharov, Melkonian, 2010; Varcutė et al., 2018) показали, що даний вид – це прісноводна водорість, характерна також для льодовиків. Ґрунтові представники, морфологічно близькі до *C. brebissonii*, утворюють монофілетичну лінію, що є окремим, поки не описаним родом (рис. 9).

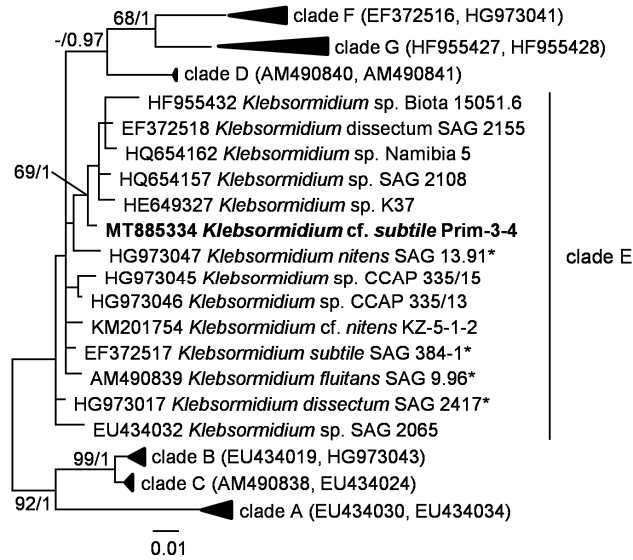


Рис. 10. Молекулярна філогенія *Klebsormidiales* на основі порівняння нуклеотидних послідовностей регіону ITS-1-5.8S рPHK-ITS-2

Водорість, морфологічно близька до *Interfilum* Chodat, що утворювала міцні пакети (рис. 4, *u, ÿ*), виявилася незалежною лінією всередині класу *Klebsormidiophyceae* (рис. 10). Поглиблене дослідження цього та кількох інших штамів дозволило описати новий рід *Streptosarcina* з двома видами – *S. arenaria* і *S. costaricana* Mikhailyuk & Lukešová (Mikhailyuk et al., 2018b). У ДБЗ був виявлений перший згаданий вид, крім цього місцезростання він також знайдений у піщаному ґрунті Словаччини.

Штам кокоїдної жовтозеленої водорості виявився ідентичним двом іншим штамам з БГК піщаних дюн узбережжя Балтійського моря (Німеччина) за послідовністю гена *rbcL* (рис. 11). Морфологічно ці штами також виглядали досить однотипно. Український штам вирізнявся тим, що вегетативні клітини водорості утворювали нещільні пакетоподібні скупчення (рис. 4, *n*), тоді як клітини німецьких штамів розташовувалися поодиночці (рис. 4, *k, l*). Філогенія на основі гена *rbcL* показала, що ці штами є цікавим видом – *Pleurochloris meiringensis* (рис. 11), новим для флори України.

Морфологічні ознаки вегетативних клітин досліджених штамів і будова зооспор цілком відповідають його діагнозу (Ettl, Gärtner, 2014). Зооспори були індуковані в культурі одного з досліджених штамів (Ru-s-4-1) шляхом вирощування на безазотному середовищі та витримування культури в темряві протягом кількох днів. Вони мали два нерівних субапикальних джгутики, *Cryptomonas*-подібну морфологію, два пластинчастих хлоропласти, один з яких зі стигмою (рис. 4, *m, o*).

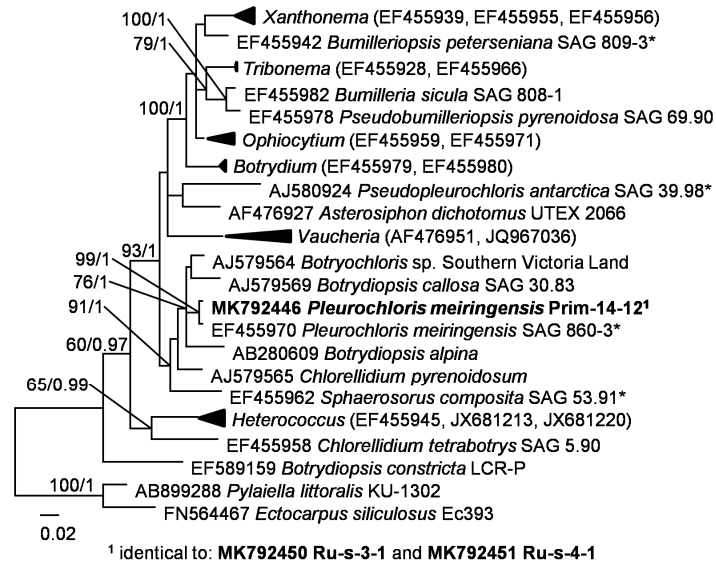


Рис. 11. Молекулярна філогенія *Xanthophyceae* на основі порівняння нуклеотидних послідовностей гена *rbcL*

Ці ознаки зооспор, а також агрегації вегетативних клітин українського штаму є типовими для *P. meiringensis* (Ettl, Gärtner, 2014). Іноді в культурі утворювалися гемізооспори – дрібні нерухомі клітини зі стигмами (рис. 4, *n*). Єдина відмінність досліджених штамів від видового діагнозу – це наявність шаруватого слизу в старій культурі (рис. 4, *p*). Проте, ймовірно, присутність/відсутність слизу не є філогенетично важливою ознакою при розділенні родів і видів, що було показано та обговорено раніше на прикладі зелених водоростей (Darienko et al., 2015). Описано цей вид зі Швейцарії (плівка у розщелині скелі), пізніше виявлений у ґрунтах Швейцарії, Хорватії, Італії (Ettl, Gärtner, 2014). Очевидно, він є досить поширеним видом, а обмежена кількість знахідок, можливо, пояснюється неправильним визначенням як *Botrydiopsis* Borzì, *Gloeobotrys* Pascher або окремих стадій у життєвому циклі *Mischococcus* Nägeli (Vinogradova, Mikhailiuk, 2009; Mikhailiuk et al., 2011). Попередні відомості щодо українського та німецького штамів цього виду були опубліковані в іншій нашій роботі (Rybalka et al., 2020).

Цікаво порівняти результати даного дослідження з матеріалами, отриманими при вивченні БГК приморських дюн мису Казантип в Азовському морі (Mikhailiuk et al., 2018a) та двох островів Балтійського моря (Schulz et al., 2016; Mikhailiuk et al., 2019a, b). Важливо, що в усіх трьох випадках дослідження були методично уніфіковані та проведені з використанням комплексного підходу. Мис Казантип і ДБЗ розташовані на півдні України, в степовій зоні, клімат тут помірно континентальний,

засушливий, із середньорічною кількістю опадів 400 і 350 мм відповідно, а найменшою в літній період. Острови Уздом та Рюген у Балтійському морі біля берегів Німеччини характеризуються більш вологими і прохолодними умовами: клімат океанічний континентальний перехідний, середньорічна кількість опадів 500–600 мм, найменша – в лютому. В усіх трьох випадках БГК розвивалися на приморських дюнах, але структура та хімічний склад піску мали деякі відмінності (табл. 2).

Таблиця 2. Деякі фізико-хімічні параметри піску з приморських дюн вивчених ділянок ДБЗ (1 – Катранівська коса, 2 – Жебріянське пасмо, 3 – Жебріянська бухта), мису Казантип (пересип Акташського озера) та островів Балтійського моря, Німеччина (Рюген: 4 – Глове, 5 – Прора, 6 – Баабе; Уздом: 7 – Цемпін, 8 – Карлсхаген)

Показник	ДБЗ			Мис Казантип	о-в Рюген			о-в Уздом	
	1	2	3		4	5	6	7	8
pH	6,9	6,3	6,5	6,4	7,2	7,2	7,3	7,1	7,5
Електропровідність (мкСм см ⁻¹)	41,1	61,9	37,3	188,3	41,5	32,5	21	15,5	17
СаСО ₃ (%)	3,2	5,3	2,4	83,5	11,1	5,6	1,5	0,7	0,8
Крупнозернистий пісок (%)	0,1	0,2	0	59,1	0,5	5,2	0,3	0	0
Середньозернистий пісок (%)	89,5	90,4	89,6	33,4	83,2	89	75	79,7	7,8
Дрібнозернистий пісок (%)	9,8	9,1	9,9	3,6	12,8	2,5	22,6	16,7	89,2
Мул і глина (%)	0,6	0,3	0,5	3,9	3,5	3,4	2	3,6	3
Клас за грануло- метричним складом	Середній пісок			Середній піщаний крупний пісок	Середній пісок		Дрібний піщаний середній пісок	Дріб- ний пісок	

На узбережжі Чорного та Балтійського морів субстратом для БГК слугував середньозернистий кварцевий морський пісок. На м. Казантип прибережні пляжі вкриті ракушняковим піском із часточками більшого розміру, що виникли в результаті руйнування древніх кальцитів і мушель моллюсків. Як видно з табл. 2, кислотність субстрату в усіх випадках була близькою до нейтральної, але pH піску українських ділянок зміщена у бік слабкокислої реакції. За електропровідністю, вмістом СаСО₃ та гранулометричним складом піски Казантипу різко відрізняються від двох інших територій: вони складаються з більших часточок, значно засоленіші та з високим вмістом карбонатів.

Характеристики піску ДБЗ (середні значення зернистості, електропровідності та вмісту карбонатів) найбільше схожі з такими о-ва Рюген (локалітети Глове і Прора). Пісок о-ва Уздом та одного з локалітетів

Рюгена (Баабе) дрібнозернистий, характеризується низькою електропровідністю та вмістом карбонатів. Ми проаналізували систематичну структуру і співставили списки знайдених видів БГК, щоб виявити можливий вплив згаданих відмінностей на їхній склад.

Систематична структура водоростей БГК узбереж, що порівнюються, представлена в табл. 3. У всіх випадках вона включає чотири відділи: *Cyanoprokaryota*, *Chlorophyta*, *Streptophyta* та *Ochrophyta*.

Таблиця 3. Систематична структура водоростей біологічних ґрунтових кірочок приморських дюн дельти Дунаю, мису Казантип та островів у Балтійському морі біля берегів Німеччини

Таксон	Кількість видів, %		
	Дельта Дунаю	Мис Казантип	Балтійські острови
CYANOPROKARYOTA	26,7	44,4	23,3
<i>Chroococcales</i>	1,7	2,2	1,2
<i>Synechococcales</i>	6,7	15,6	5,8
<i>Oscillatoriales</i>	8,3	6,7	7,0
<i>Nostocales</i>	10,0	20,0	9,3
CHLOROPHYTA	53,3	35,6	50,0
<i>Chlorophyceae</i>	25,0	15,6	27,9
<i>Trebouxiophyceae</i>	28,3	20,0	20,9
<i>Ulvophyceae</i>	0	0	1,2
STREPTOPHYTA	11,7	6,7	11,6
<i>Chlorokybophyceae</i>	1,7	0	1,2
<i>Klebsormidiophyceae</i>	8,3	6,7	9,3
<i>Zygnematoophyceae</i>	1,7	0	1,2
OCHROPHYTA	8,3	13,3	15,1
<i>Eustigmatophyceae</i>	0	4,4	3,3
<i>Xanthophyceae</i>	5,2	0	4,7
<i>Bacillariophyceae</i>	3,4	8,9	8,1
Усього видів, од. (%)	60(100)	45(100)	86/100

Незважаючи на те, що територіально та за кліматичними показниками ДБЗ і Казантип значно ближчі між собою, ніж з островами Балтійського моря, за систематичною структурою водоростей чорноморські БГК мають більше спільного з німецькими. Це стосується провідної ролі зелених водоростей (на м. Казантип перше рангове місце займали ціанобактерії), вищого різноманіття стрептофітових, присутності в спектрі жовтозелених водоростей (див. табл. 3), а також домінуючих в БГК видів водоростей.

Так, на м. Казантип це виключно ціанобактерії (види родів *Microcoleus*, *Coleofasciculus* M.Siegesmund et al., *Hassallia* Berkeley ex Bornet & Flahault, *Nostoc*, *Scytonema* C.Agardh ex Bornet & Flahault та ін.), тоді як на дюнах ДБЗ і Балтійських островів, крім ціанобактерій, домінантами були також стрептофітові (*Klebsormidium*) і деякі зелені (*Lobochlamys* T.Pröschold et al., *Tetradesmus*) водорості (див. табл. 1). Спільними для балтійських та чорноморських дюн виявилися також деякі види водоростей, ймовірно, типові для кварцевого піску – нещодавно описаний вид *Tetradesmus arenicola*, цікаві види – *Nodosilinea epilithica*, *Actinochloris sphaerica*, *Chlorolobion lunulatum*, *Monoraphidium* cf. *pusillum*, *Pseudomuriella aurantiaca*, *Xerochlorella minuta*, *Klebsormidium crenulatum* і *Pleurochloris meiringensis*.

Порівняння видового складу водоростей БГК піщаних дюн усіх досліджуваних локалітетів з використанням коефіцієнта флористичної спільності Сьоренсена-Чекановського показало, що всі вони згрупувалися за територіальною приналежністю (рис. 12).

Острови Балтійського моря та ДБЗ утворили окремі кластери, подібність яких проявляється на рівні 38,5%; м. Казантип виявився найсвоєріднішим.

Таким чином, склад водоростей БГК ДБЗ, згідно з даним аналізом, проявляє більшу подібність з віддаленими Балтійськими островами, ніж з територіально близьким мисом Казантип. Причиною цього, ймовірно, є особливості складу та структури піску. Цікаво, що видовий склад водоростей окремих локалітетів Балтійських островів також показав схожість за тим самим принципом: один з кластерів утворений Баабе (о-в Рюген), Карлсхаген і Цемпін (о-в Уздом) з дрібнозернистим піском, який характеризується низькою електропровідністю і вмістом карбонатів, другий – утворений Пророю та Глове (о-в Рюген) із середньозернистим піском і вищими значеннями електропровідності та вмісту карбонатів (див. рис. 12). Ця тенденція подібності видового складу водоростей БГК Балтійських дюн вже відмічалася раніше (Schulz et al., 2016).

Статистичний аналіз кореляції видового складу водоростей БГК і параметрів піску досліджених піщаних дюн показав, що статистично достовірною є кореляція між класом піску за гранулометричним аналізом і середньорічною кількістю опадів/середньорічною температурою регіону дослідження (табл. 4). Деяку кореляцію також проявляє рН піску, але статистична достовірність цього параметру в нашій вибірці низька.

Отже, за нашими даними, на розподіл водоростей у БГК приморських піщаних дюн впливають характеристики і склад піску, а також географічні особливості регіону дослідження.

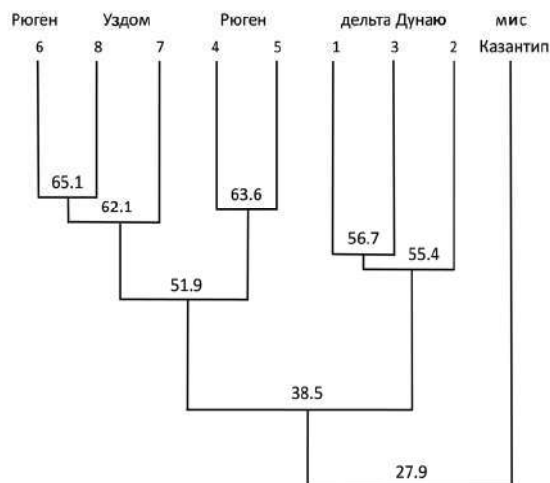


Рис. 12. Дендрит флористичної спільності видового складу біологічних ґрунтових кірочок приморських дюн Дунайського біосферного заповідника (1 – Катранівська коса; 2 – Жебріянське пасмо; 3 – Жебріянська бухта), мису Казантип та островів Балтійського моря (Рюген: 4 – Глове, 5 – Прора, 6 – Баабе; Уздом: 7 – Карлсхаген, 8 – Цемпін), побудований на основі коефіцієнта флористичної спільності Сьоренсена-Чекановського. Значення коефіцієнта (%) вказані біля гілок

Таблиця 4. Аналіз **PerManova** по виявленню кореляції видового складу водоростей і параметрів ґрунту досліджених регіонів

Показник	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr (> F)	КД
Клас піску за гранулометричним складом	3	0,6773	0,22577	4,53	0,51392	0,001	***
Середньорічна кількість опадів/ середньорічна температура	1	0,34071	0,34071	6,8365	0,25853	0,001	***
pH	1	0,10287	0,10287	2,064	0,07805	0,096	°
Електропровідність	1	0,09735	0,09735	1,9533	0,07387	0,14	
Інші параметри	2	0,09968	0,04984	0,07563			
Всього	8	1,3179	1				

Примітка. Коди достовірності (КД): *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ° $p < 0.1$.

Заключення

Вивчено видове різноманіття водоростей, що утворюють біологічні ґрунтові кірочки на поверхні піщаних дюн, на березі Чорного моря в околицях с. Приморське Кілійського р-ну Одеської обл. (Україна). Зразки відбирали на трьох ділянках узбережжя: Катранівській косі, Жебріянській

бухті та Жебріяньському пасмі, дві останні ділянки належать до території Дунайського біосферного заповідника. Всього було ідентифіковано 60 видів з відділів *Chlorophyta* (32), *Cyanoprokaryota* (16), *Streptophyta* (7) і *Ochrophyta* (5). У досліджених кірочках домінували ціанобактерії та стрептофітові водорості родів *Microcoleus*, *Coleofasciculus*, *Nostoc*, *Hassallia*, *Klebsormidium* та ін. Для низки штамів ціанобактерій та евкаріотичних водоростей був також проведений філогенетичний аналіз за ділянкою нуклеотидної послідовності гена 16S/18S рРНК, і регіону 16S-23S ITS/ITS-1,2. Це дозволило уточнити їхню видову приналежність і систематичне положення, а також здійснити низку цікавих таксономічних і флористичних знахідок, поповнивши альгофлору України новими таксонами. Зокрема, два з них описані як нові для науки рід і види (*Streptosarcina arenaria* та *Tetradesmus arenicola*), 2 роди (*Nodosilinea* і *Pleurastrosarcina*) та 4 види – нові для флори України (*Nodosilinea epilithica*, *Pseudomuriella aurantiaca*, *Pleurochloris meiringensis* і *Pleurastrosarcina terriformae*). Кілька таксонів є рідкісними та цікавими водоростями: *Heterotetracystis* sp., *Tetracystis pampae*, “*Chlamydomonas*” cf. *hydra*, *Bracteacoccus bullatus*, *Trebouxia* cf. *aggregata*, *Parietochloris* cf. *ovoideus* та *Xerochlorella olmiae*.

Порівняльний аналіз із залученням результатів вивчення БГК приморських піщаних дюн мису Казантип в Азовському морі та двох островів Балтійського моря (Німеччина) показав, що найбільш подібними за видовим складом водоростей виявилися локалітети, складені кварцевим піском – дюни Дунайської дельти та островів Балтики, тоді як дюни мису Казантип, складені ракушняковим піском, найсвоєрідніші. Основними факторами, які визначають видовий склад водоростей біологічних ґрунтових кірочок приморських дюн, є склад та текстура піску, а також кліматичні особливості регіону дослідження.

Робота підтримана фондом Олександра фон Гумбольдта, Німеччина (Alexander von Humboldt Stiftung, Deutschland) та Німецьким науковим фондом (DFG), пріоритетна програма 1991 'Taxon-OMICS' (Project RY 173/1-1).

Список літератури

- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *Automat. Control, IEEE Trans. Automat. Control.* 19: 716–723.
- Algae: Reference Book.* 1989. Ed. S.P. Wasser. Kyiv: Naukova Dumka Press. 608 p. [Водорості: Справочник. 1989. Под ред. С.П. Вассера. Киев: Наук. думка. 608 с.].
- Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography.* 2006, 2009, 2011, 2014. Vol. 1–4. Eds P.M. Tsarenko, S.P. Wasser, E. Nevo. Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag K.-G.

- Andreyeva V.M. 2005. *Novosti sistematiki nizshikh rastenii*. 38: 3–7. [Андреева В.М. 2005. Неподвижные зеленые водоросли (*Chlorophyta*) из почв правобережья р. Ортины (устье р. Печоры). *Новости систематики низших растений*. 38: 3–7].
- Barcytė D., Hodač L., Nedbalová L., Elster J. 2018. *Chloromonas svalbardensis* n. sp. with insights into the phylogroup *Chloromonadinia* (*Chlorophyceae*). *J. Eukar. Microbiol.* 65: 882–892.
- Belnap J., Weber B., Büdel B. 2016. Biological soil crusts as an organizing principle in drylands. *Ecol. Stud.* 226: 3–15.
- Bischoff H.W., Bold H.C. 1963. Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Univ. Texas Publ.* 6318: 1–95.
- Bock C., Krienitz L., Pröschold T. 2011. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (*Trebouxiophyceae*) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*. 11: 293–312.
- Boyko M.F., Voytyuk Yu.A., Kondratyuk S.Ya., Kostikov I.Yu. 1984. *Problems of general and molecular biology*. 3: 78–82. [Бойко М.Ф., Войтюк Ю.А., Кондратюк С.Я., Костиков И.Ю. 1984. Участие бессосудистых растений в демутации днепровских песков. *Проблемы общей и молекулярной биологии*. 3: 78–82].
- Büdel B. 2002. Diversity and ecology of biological crusts. *Progr. Bot.* 63: 386–404.
- Büdel B., Dulić T., Darienko T., Rybalka N., Friedl T. 2016. Cyanobacteria and algae of biological soil crusts. *Ecol. Stud.* 226: 55–81.
- Byun Y., Han K. 2009. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. *Bioinformatics*. 25: 1435–1437.
- Čapková K., Haufer T., Rehakova K., Doležal J. 2016. Some Like it High! Phylogenetic Diversity of High-Elevation Cyanobacterial Community from Biological Soil Crusts of Western Himalaya. *Microbial Ecol.* 71(1): 113–123.
- Danube Biosphere Reserve. Plant world*. 2003. Eds D.V. Dubyna, Yu.R. Shelyag-Sosonko, O.I. Zhmud. Kyiv: Phytosociocentr. 458 p. [Дунайський біосферний заповідник. Рослинний світ. Ред. Д.В. Дубина, Ю.Р. Шеляг-Сосонко, О.І. Жмуд. Київ: Фітосоціоцентр. 458 с.].
- Darienko T.M. 2008. In: *Actual problems of Botany and Ecology*: Coll. articles. Vol. 2. Kyiv: Phytosociocenter. Pp. 13–20. [Дарієнко Т.М. 2008. Перші відомості про наземні водорості національного природного парку «Подільські Товтри». В кн.: *Актуальні проблеми ботаніки та екології: Зб. наук. праць*. Вип. 2. Київ: Фітосоціоцентр. С. 13–20].
- Darienko T.M. 2012. *Ukr. Bot. J.* 69(1): 111–124. [Дарієнко Т.М. 2012. Загальна характеристика та особливості видового складу водоростей позаводних місцезростань острова Зміїний (Чорне море, Україна). *Укр. бот. журн.* 69(1): 111–124].
- Darienko T., Hoffmann L. 2003. Algal growth on cultural monuments in Ukraine. *Biologia* (Bratislava). 58: 575–587.
- Darienko T., Gustavs L., Eggert A., Wolf W., Pröschold T. 2015. Evaluating the species boundaries of green microalgae (*Coccomyxa*, *Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) using integrative taxonomy and dna barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. *PLoS ONE*. 10(6): e0127838.

- Darienko T., Kang W., Orzechowski A. K., Pröschold T. 2019. *Pleurastrorarcina terriformae*, a new species of a rare desert trebouxiophycean alga discovered by an integrative approach. *Extremophiles*. 23: 573–586.
- Demchenko E., Mikhailiuk T., Coleman A.W., Pröschold T. 2012. Generic and species concepts in *Microglena* (previously the *Chlamydomonas monadina* group) revised using an integrative approach. *Eur. J. Phycol.* 47: 264–290.
- Demchenko E., Leya T., Coleman A.W., Pröschold T. 2013. In: *BioSyst. EU 2013 Global systematics!*: Mat. V Int. conf. (Viena, 18–22 Feb., 2013). Viena. Pp. 46–47.
- De Winder B. 1990. *Ecophysiological strategies of droughttolerant phototrophic microorganisms in dune soils*. PhD. (Biol.) Abstract. Amsterdam.
- Eddie B., Krembs C., Neuer S. 2008. Characterization and growth response to temperature and salinity of psychrophilic, halotolerant *Chlamydomonas* sp. ARC isolated from Chukchi Sea ice. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 354: 107–117.
- Ettl H., Gärtner G. 2014. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*. 2nd ed. Munich: Spektrum Akad. Verlag. 773 p.
- Fučíková K., Rada J.C., Lewis L.A. 2011. The tangled taxonomic history of *Dictyococcus*, *Bracteacoccus* and *Pseudomuriella* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) and their distinction based on a phylogenetic perspective. *Phycologia*. 50(4): 422–429.
- Fučíková K., Flechtner V.R., Lewis L.A. 2012. Revision of the genus *Bracteacoccus* Tereg (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) based on a phylogenetic approach. *Nova Hedw.* 96: 15–59.
- Fučíková K., Lewis P.O., Lewis L.A. 2014. Widespread desert affiliation of Trebouxiophycean algae (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) including discovery of three new desert genera. *Phycol. Res.* 62(4): 294–305.
- Fulnečková J., Hasíková T., Fajkus J., Lukešová A., Eliáš M., Sýkorová E. 2012. Dynamic evolution of telomeric sequences in the green algal order *Chlamydomonadales*. *Genome Biol. Evol.* 4: 248–264.
- Goff L.J., Moon D.A. 1993. PCR amplification of nuclear and plastid genes from algal herbarium specimens and algal spores. *J. Phycol.* 29: 381–384.
- Gontcharov A.A., Melkonian M. 2010. Molecular phylogeny and revision of the genus *Netrium* (*Zygnematophyceae*, *Streptophyta*): *Nucleotaenium* gen. nov. *J. Phycol.* 46: 346–362.
- Guiry M.D., Guiry G.M. 2020. *AlgaeBase*. World. electron. publ., Nat. Univ. Ireland, Galway.
- Hoef-Emden K., Melkonian M. 2003. Revision of the genus *Cryptomonas* (*Cryptophyceae*): a combination of molecular phylogeny and morphology provides insights into a long-hidden dimorphism. *Protist.* 154: 371–409.
- Hoppert M., Reimer R., Kemmling A., Schröder A., Günzl B., Heinken T. 2004. Structure and reactivity of a biological soil crust from xeric sandy soil in Central Europe. *Geomicrobiology*. 21: 183–191.
- Katoh K., Standley D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30: 772–780.
- Khromov S.S., Likhosha L.V. 2003. *ONU Bull.* 8(11): 138–150. [Хромов С.С., Лихоша Л.В. 2003. Значення піщаних хвиленакатних пасом у сучасному стані Кілійської дельти Дунаю. *Вісн. ОНУ*. 8(11): 138–150].
- Komárek J., Perman J. 1978. Review of the genus *Dictyosphaerium* (*Chlorococcales*). *Algol. Stud.* 20: 233–297.

- Komárek J. 2013. In: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Bd 19/3. Berlin, Heidelberg: Elsevier. 1130 p.
- Komárek J., Anagnostidis K. 2005. In: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Bd 19/2. München: Elsevier Spectrum. 759 p.
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen J.R. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014 using a polyphasic approach. *Preslia*. 86(4): 295–235.
- Kostikov I.Yu., Rybchinskiy O.V. 1995. *Algologia*. 5(4): 363–374. [Костиков И.Ю., Рыбчинский О.В. 1995. Наземные альгогруппировки псамофитного сукцессионного ряда острова Шелестов (Каневский заповедник, Украина). *Альгология*. 5(4): 363–374].
- Kostikov I.Yu., Romanenko P.O., Demchenko E.M., Darienko T.M., Mikhailyuk T.I., Rybchinskiy O.V., Solonenko A.M. 2001. *The soil algae from Ukraine (history and methods of investigation, classification system, floristics)*. Kyiv: Phytosociocenter. 300 p. [Костиков И.Ю., Романенко П.О., Демченко Е.М., Дарієнко Т. М., Михайлюк Т.І., Рибчинський О.В., Солоненко А.М. 2001. *Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, конспект флори)*. Київ: Фітосоціоцентр. 300 с.].
- Kovalenko O.V. 2009. In: *Flora of algae of Ukraine*. Issue I, pt 2. Kyiv: Aristeu. 387 p. [Коваленко О.В. 2009. In: *Флора водоростей України. Синьозелені водорості*. Т. I, вип. 1. Kyiv: Арістей. 387 с.].
- Lane D.J. 1991. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. New York: John Wiley & Sons. Pp. 115–175.
- Lilitskaya G.G. 2004. *Algologia*. 14(3): 348–358. [Лилицкая Г.Г. 2004. Зеленые жгутиковые водоросли малых водоемов г. Киева и его окрестностей. 2. *Chlamydomonadaceae (Chlorophyceae)*. *Альгология*. 14(3): 348–358].
- Liu C., Huang X., Wang X., Zhang X., Li G. 2006. Phylogenetic studies on two strains of Antarctic ice algae based on morphological and molecular characteristics. *Phycologia*. 45: 190–198.
- Maltsev Y.I., Maltseva I.A., Maltseva S.Yu., Kulikovskiy M.S. 2020. Biotechnological potential of a new strain of *Bracteacoccus bullatus* (*Sphaeropleales, Chlorophyta*) as a promising producer of omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Rus. J. Plant Physiol.* 67(1): 185–193.
- Mamaeva A., Petrushkina M., Maltsev Y., Gusev E., Kulikovskiy M., Filimonova A., Sorokin B., Zotko N., Vinokurov V., Kopitsyn D., Petrova D., Novikov A., Namsaraev Z., Kuzmin D. 2018. Simultaneous increase in cellular content and volumetric concentration of lipids in *Bracteacoccus bullatus* cultivated at reduced nitrogen and phosphorus concentrations. *J. Appl. Phycol.* 30: 2237–2246.
- Marin B., Klingberg M., Melkonian M. 1998. Phylogenetic relationships among the *Cryptophyta*: analyses of nuclearencoded SSU rRNA sequences support the monophyly of extant plastid-containing lineages. *Protist*. 149: 265–276.
- Marin B., Palm A., Klingberg M., Melkonian M. 2003. Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing Euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist*. 154: 99–145.
- Marin B., Nowack E.C.M., Melkonian M. 2005. A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist*. 156: 425–432.
- Maun A.M. 2009. *The biology of coastal sand dunes*. New York: Oxford Univ. Press. 288 p.

- Mikhailyuk T. 2013. Terrestrial algae from the granite outcrops of river valleys of the Ukraine. *Int. J. Algae*. 15(4): 311–330. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v15.i4.20>
- Mikhailyuk T., Demchenko E.M., Kondratyuk S.Ya. 2003. *Parietochloris ovoideus* sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*), a new aerophyte alga from Ukraine. *Algol. Stud.* 110: 1–16.
- Mikhailyuk T.I., Kondratyuk S.Ya., Nyporko S.O., Darienko T.M., Demchenko E.M., Voitsekhovich A.O. 2011. *Lichens, mosses and terrestrial algae of granites of Ukraine*. Kyiv: Alterpress. 398 p. [Михайлюк Т.І., Кондратюк С.Я., Нипорко С.О., Дарієнко Т.М., Демченко Е.М., Войцехович А.О. 2011. *Лишайники, мохоподібні та наземні водорості гранітних каньйонів України*. Київ: Альтерпрес. 398 с.]
- Mikhailyuk T., Glaser K., Holzinger A., Karsten U. 2015. Biodiversity of *Klebsormidium* (*Streptophyta*) from alpine biological soil crusts (Alps, Tyrol, Austria, and Italy). *J. Phycol.* 51(4): 750–767.
- Mikhailyuk T.I., Vinogradova O.N., Glaser K., Karsten U. 2016. New Taxa for the Flora of Ukraine, in the Context of Modern Approaches to Taxonomy of *Cyanoprokaryota/Cyanobacteria*. *Int. J. Algae*. 18(4): 301–320. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v18.i4.10>
- Mikhailyuk T.I., Vinogradova O.N., Glaser K., Demchenko E., Karsten U. 2018a. Diversity of Terrestrial Algae of Cape Kazantip (the Sea of Azov, Ukraine) and Some Remarks on their Phylogeny and Ecology. *Int. J. Algae*. 20(4): 313–338. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v20.i4.10>
- Mikhailyuk T., Lukešová A., Glaser K., Holzinger A., Obwegeser S., Nyporko S., Friedl T., Karsten U. 2018b. New taxa of Streptophyte algae (*Streptophyta*) from terrestrial habitats revealed using an integrative approach. *Protist*. 169(3): 406–431.
- Mikhailyuk T.I., Glaser K., Karsten U. 2019a. In: *II International scientific conference «Cyanoprokaryota/Cyanobacteria: Systematic, Ecology, Distribution»*: Abstracts. (Syktyvkar, 16–21 Sept., 2019). Syktyvkar. Pp. 203–206. [Михайлюк Т.І., Глазер К., Карстен У. 2019а. Роль цианобактерій в формуванні біологічних ґрунтових кірочок приморських піщаних дюн (Балтійське море, Німеччина). В кн.: *II Міжнародна наукова школа-конференція «Цианопрокаріоти/цианобактерії: систематика, екологія, розповсюдження»*: Мат. докл. (Сыктывкар, 16–21 сент. 2019 г.). Сыктывкар. С. 203–206].
- Mikhailyuk T., Glaser K., Tsarenko P., Demchenko E., Karsten U. 2019b. Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast, in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria. *Eur. J. Phycol.* 54: 263–290.
- Mikhailyuk T., Vinogradova O., Holzinger A., Glaser K., Samolov E., Karsten U. 2019c. New record of the rare genus *Crinalium* Crow (*Oscillatoriales*, *Cyanobacteria*) from sand dunes of the Baltic Sea, Germany: epitypification and emendation of *Crinalium magnum* Fritsch et John based on an integrative approach. *Phytotaxa*. 400(3): 165–179.
- Mikhailyuk T., Holzinger A., Tsarenko P., Glaser K., Demchenko E., Karsten U. 2020. *Dictyosphaerium*-like morphotype in terrestrial algae: what is *Xerochlorella* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*)? *J. Phycol.* 56: 671–686.
- Nakada T., Misawa K., Nozaki H. 2008. Molecular systematics of *Volvocales* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses. *Mol. Phylog. Evol.* 48: 281–291.

- Neustupa J., Eliáš M., Škaloud P., Němcová Y., Šejnohová L. 2011. *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*), a novel subaerial coccoid green alga. *Phycologia*. 50: 57–66.
- Perkerson R.B. III, Johansen J.R., Kováčik L., Brand J., Kastovsky J., Casamatta D.A. 2011. An unique pseudanabaenalean (Cyanobacteria) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data. *J. Phycol.* 47: 1397–1412.
- Petersen J.B. 1932. The algal vegetation of Hammer Bakker. *Bot. Tidskr. (Lund)*. 42: 1–48.
- Pluis J.L.A., de Winder B. 1990. Natural stabilization. *Catena Suppl.* 18: 195–208.
- Prikhodkova L.P. 1992. *Blue-green algae of soils of Steppe zone of Ukraine*. Kyiv: Naukova Dumka. 299 p. [Приходькова Л.П. 1992. *Синезеленые водоросли почв степной зоны Украины*. Київ: Наук. думка. 299 с.].
- Pröschold T., Darienko T. 2020. The green puzzle *Stichococcus* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*): New generic and species concept among this widely distributed genus. *Phytotaxa*. 441 (2): 113–142.
- Raabová L., Elster J., Kováčik L. 2016. Phototrophic microflora colonizing substrates of man-made origin in Billefjorden Region, Central Svalbard. *Czech Polar Rep.* 6(1): 21–30.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19: 1572–1574.
- Rybalka N., Andersen R.A., Kostikov I., Mohr K.I., Massalski A., Olech M., Friedl T. 2009. Testing for endemism, genotypic diversity and species concepts in Antarctic terrestrial microalgae of the *Tribonemataceae* (*Stramenopiles*, *Xanthophyceae*). *Environ. Microbiol.* 11: 554–565.
- Rybalka N., Mikhailiuk T., Darienko T., Dultz S., Blanke M., Friedl T. 2020. Genotypic and phylogenetic diversity of new isolates of terrestrial *Xanthophyceae* (*Stramenopiles*) from maritime sandy habitats. *Phycologia*. 59(6): 506–514. <https://doi.org/10.1080/00318884.2020.1802950>
- Schulz K., Mikhailiuk T., Dreßler M., Leinweber P., Karsten U. 2016. Biological soil crusts from coastal dunes at the Baltic Sea: cyanobacterial and algal biodiversity and related soil properties. *Microbiol. Ecol.* 71: 178–193.
- Shmidt V.M. 1980. *Statistical methods in comparative floristics*. Leningrad: Leningr. Univ. Press. 176 p. [Шмидт В.М. 1980. *Статистические методы в сравнительной флористике*. Л.: Изд-во Ленинград. ун-та. 176 с.].
- Smith S.M., Abed R.M.M., Garcia-Pichel F. 2004. Biological soil crusts of sand dunes in Cape Cod National Seashore, Massachusetts, USA. *Microb. Ecol.* 48: 200–208.
- Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol. Rev.* 35: 171–205.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., FilipSKI A., Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.
- Temraleeva A.D., Dronova S.A. 2016. *Novosti sistematiki nizshikh rastenii*. 50: 125–141. [Темралеева А.Д., Дронова С.А. 2016. Первая находка почвенной цианобактерии *Nodosilinea epilithica* (*Synechococcales*, *Cyanobacteria*) в России. *Новости системат. низш. раст.* 50: 125–141].

- Tsarenko P.M. 1990. *Short identification manual of chlorococcal algae of Ukrainian SSR*. Kyiv: Naukova Dumka. 208 p. [Царенко П.М. 1990. *Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР*. Київ: Наук. думка. 208 с.]
- Van den Acker J.A.M., Jungerius P.D. 1985. The role of algae in the stabilization of coastal dune blowouts. *Earth Surf. Proc. Land*. 10: 189–192.
- Vinogradova O.M. 2016. *Chornomor. Bot. J.* 12(1): 85–94. [Виноградова О.М. 2016. Суанорокарыота прибережних солонців Куяльницького лиману. *Чорномор. бот. журн.* 12(1): 85–94].
- Vinogradova O.N., Mikhailyuk T.I. 2009. Algal flora of the caves and grottoes of the National Nature Park “Podilsky Tovtry” (Ukraine). *Int. J. Algae*. 11(3): 289–304. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v11.i3.80>
- Vinogradova O.N., Mikhailyuk T.I., Glaser K., Holzinger A., Karsten U. 2017. New species of *Oculatella* (*Synechococcales*, *Cyanobacteria*) from terrestrial habitats of Ukraine. *Ukr. Bot. J.* 74(6): 509–520.
- Voitsekhovich A.A., Mikhailyuk T.I., Darienko T.M. 2011. *Algologia*. 21(1): 3–26. [Войцехович А.А., Михайлюк Т.И., Дариенко Т.М. 2011. Фотобионты лишайников: разнообразие, экологические особенности, взаимоотношения и пути совместной эволюции с микобионтом. *Альгология*. 21(1): 3–26]. <http://algologia.co.ua/pdf/21/1/alg-2011-21-1-003.pdf>
- Watanabe S., Nakada T. 2018. *Gymnomonas nepalensis* gen. et sp. nov. for the naked flagellate strain ‘Nepal’, formerly identified as *Dunaliella lateralis* (*Volvocales*, *Chlorophyceae*). *Phycol. Res.* 66: 167–172.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Teylor J. 1990. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. London: Acad. Press. Pp. 315–322.
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl. Acids Res.* 31: 3406–3416.

Підписав до друку П.М. Царенко

Mikhailyuk T.I.¹, Vinogradova O.M.¹, Glaser K.², Rybalka N.³, Demchenko E.M.¹, Karsten U.² 2021. **Algae of biological soil crusts from sand dunes of the Danube Delta biosphere reserve (Odesa Region, Ukraine)**. *Algologia*. 31(1): 25–62.

¹ M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine,

2 Tereshchenkivska Str., Kyiv 01601, Ukraine

² University of Rostock, Institute of Biol. Sci., Department of Appl. Ecology and Phycology,

3 Albert-Einstein-Strasse, Rostock D-18057, Germany

³ Experimental Phycology and Culture Collection of Algae (SAG), Albrecht-von-Haller-

Institute for Plant Sci., Georg August University Göttingen, 18 Nikolausberger Weg,

Göttingen 37073, Germany

The species composition of algae from biological soil crusts (biocrusts) on the surface of sand dunes (Black Sea coast, Primorske, Izmail District, Odesa Region, Ukraine) was investigated. Samples were collected from three coastal localities: Katranivska Spit, Zhebryianska Bay and Zhebryianska Ridge. The latter two localities are in the territory of the Danube Delta Biosphere

Reserve. The samples were investigated by direct microscopy, followed by a culture approach. 60 species from *Chlorophyta* (32), *Cyanobacteria* (16), *Streptophyta* (7) and *Ochrophyta* (5) were identified. Representatives of the cyanobacterial genera *Microcoleus* Desmazières ex Gomont, *Coleofasciculus* M.Siegesmund, J.R.Johansen & T.Friedl, *Nostoc* Vaucher ex Bornet & Flahault, *Hassallia* Berkeley ex Bornet & Flahault, and streptophytes from the genus *Klebsormidium* P.C.Silva, Mattox & W.H.Blackwell dominated in the studied biocrusts. Phylogenetic analyses based on 16S/18S rRNA as well as 16S-23S ITS/ITS-1,2 regions were undertaken for some strains of cyanobacteria and eukaryotic algae. As a result, species identification and their position in respective phylogeny was refined, as well as aiding the discovery of some interesting and rare species. New genera and species were described (*Streptosarcina arenaria* Mikhailuyuk & Lukešová and *Tetrademus arenicola* Mikhailuyuk & P.Tsarenko); with two genera (*Nodosilinea* R.B.Perkerson & D.A.Casamatta and *Pleurastrasarcina* H.J.Sluiman & P.C.J.Blommers) and four species reported for the first time for the flora of Ukraine (*Nodosilinea epilithica* Perkerson & Casamatta, *Pseudomuriella aurantiaca* (W.Vischer) N.Hanagata, *Pleurochloris meiringensis* Vischer, *Pleurastrasarcina terriformae* Darienko, W.J.Kang, Orzechowski & Pröschold). Comparison of the results from this study with similar investigations at Cape Kazantip (Sea of Azov, Ukraine) and at two islands of the Baltic Sea (Rügen, Usedom, Germany) revealed that sand composition and texture, as well as climate type of the respective region, are the main factors determining species composition of algae and cyanobacteria in biocrusts of maritime dunes.

Key words: cyanobacteria, eukaryotic algae, biological soil crusts, sand dunes, species composition, taxonomy, ecology, 16S/18S rRNA, 16S-23S ITS/ITS-1,2, secondary structure, Danube Delta, Black Sea, Ukraine

1.3. Водорості і ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок лісових екосистем центральної Німеччини, що знаходяться під різним рівнем лісового упорядкування



Algal richness in BSCs in forests under different management intensity with some implications for P cycling

Karin Glaser¹, Karen Baumann², Peter Leinweber², Tatiana Mikhailyuk³, and Ulf Karsten¹

¹Institute for Biological Sciences, Applied Ecology and Phycology, University Rostock, Rostock, Germany

²Faculty for Agricultural and Environmental Sciences, Soil Science, University Rostock, Rostock, Germany

³M.H. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Science of Ukraine, Tereshchenkivska St. 2, UA-01004 Kyiv, Ukraine

Correspondence: Karin Glaser (karin.glaser@uni-rostock.de)

Received: 29 August 2017 – Discussion started: 27 September 2017

Revised: 3 June 2018 – Accepted: 7 June 2018 – Published: 11 July 2018

Abstract. Biological soil crusts (BSCs) are highly important communities in drylands and disturbed areas worldwide, where the higher vegetation is sparse, with a diverse microalgal community as the key component. They perform important ecological functions, such as stabilization of soil and nutrient enrichment. In temperate regions BSCs are also common, but generally less studied. Changes in land use and land use intensity strongly influence biodiversity per se and ecosystem processes, as can be seen particularly in densely populated regions like Europe. However, systematic studies on the effect of land use gradients, i.e., forest management intensity, on BSCs have been missing up to now. To close this knowledge gap and enhance the understanding of management effects on BSCs from pine and beech forests under different management regimes, key primary producers of these communities (eukaryotic microalgae and cyanobacteria) were studied. Phototrophic microorganisms were identified morphologically and categorized as either coccal taxa, which typically occur in high diversity, or filamentous taxa, which have the potential to initiate BSC formation. In total, 51 algal species were recorded, most of them from the phylum Chlorophyta, followed by Streptophyta and Stramenopiles, and only 1 cyanobacterial taxon. The most abundant crust-initiating filamentous algae were three species of *Klebsormidium* (Streptophyta), a ubiquitous genus regularly occurring in BSCs because of its broad ecophysiological tolerance. Increasing management intensity in the forests resulted in a higher number of algal species; especially the number of coccal taxa increased. Furthermore, the proportion of inorganic phosphorus showed tendencies towards a

negative correlation with the number of algal species. Thus, management of forests has an impact on the diversity of phototrophic organisms in BSCs, which might in turn affect their biogeochemical P cycling.

1 Introduction

Biological soil crusts (BSCs) occur as important vegetation on all continents on Earth, predominantly in arid and semi-arid habitats, but also in temperate regions (e.g., Belnap et al., 2001; Weber et al., 2016). In semiarid and arid environments, BSCs were studied, for example, in deserts of Israel and the USA but also in polar regions (Borchhardt et al., 2017; Flechtner et al., 1998; Kidron et al., 2010). In temperate regions, dunes with sparse vascular plant vegetation or disturbed areas in open sites (e.g., former mining sites) typically promote the development of BSCs (T. Fischer et al., 2010; Langhans et al., 2009; Lukešová, 2001; Schulz et al., 2016; Szyja et al., 2018).

Even though there is a rising interest in BSCs as global players in terrestrial nitrogen fixation (Elbert et al., 2012), reports on BSCs from forests are very rare (Seitz et al., 2017). Under mesic conditions, BSCs have to compete with highly competitive vascular plants, which strongly limit their development. In forests, light limitation and the occurrence of litter additionally restrict the development of BSCs on the forest ground. Therefore, any disturbance of the higher vegetation changes the competitive situation, allowing the development of BSCs. Disturbances occur frequently in temper-

ate forests. They include litter-free spots at hillslopes, tree falls, pits of wild boars, and molehill-like humps, as well as human-induced disturbances such as skid trails and clear-cut areas. An increase in tree falls after storm events is a growing problem in Europe, especially with a rise in the number and strength of storms potentially caused by the global climate change (Schwierz et al., 2010). In places where a substantial disturbance of intact forest ecosystems had occurred BSCs typically represent pioneer vegetation for the colonialization of bare soil. BSC organisms initiate the biological introduction of carbon and nutrients into soil, promoting the regrowth of vascular plants (Seitz et al., 2017) and erosion protection after heavy disturbance and destruction of intact forest ecosystems.

Destruction of BSC cover caused by land use has numerous negative effects such as an increase in soil erosion, changes in water regime, and C and N losses from the topsoil (Barger et al., 2006; Belnap, 2003). Studies dealing with the effect of land use on BSCs were mainly conducted in arid and semiarid regions. These studies showed strong negative effects of intensive livestock grazing on BSC cover due to trampling and reported a subsequent BSC recovery period of up to 27 years (Concostrina-Zubiri et al., 2014; Gomez et al., 2004; Williams et al., 2008). Also, ploughing in Australian sand plains reduced the BSC cover dramatically (Daryanto et al., 2013). In contrast to reports from arid areas there are no studies on the effect of land use in temperate regions, nor on the effect of land use activities other than grazing or human activities on BSCs. Further, reports on how disturbances in continuous vegetation might promote the development of BSCs are missing.

BSCs can be characterized as “ecosystem engineers” since they form water-stable aggregates, which have an important ecological role in primary production, nitrogen cycling, mineralization, water retention, and stabilization of soils (Castillo-Monroy et al., 2010; Evans and Johansen, 1999; Lewis, 2007). While the role of BSC in the C- and N-cycle is well documented, little is known about their role in P cycling. Recent studies indicated that the number of microalgal species in BSCs can be related to the soil P content (Baumann et al., 2017; Schulz et al., 2016). Nevertheless, the effect of environmental factors that shape BSC communities and in turn affect soil characteristics is still unstudied.

Together with the macroscopic lichens and bryophytes, cyanobacteria and eukaryotic microalgae represent the most important phototrophic components of BSCs (Belnap et al., 2001). Eukaryotic microalgae, essential components of biocrust communities as major contributors to C fixation (Büdel et al., 2016; Szyja et al., 2018), are still the least studied phototrophs in BSCs. BSC microalgae can be divided into two functional groups: (i) filamentous and (ii) single-celled, i.e., coccoid. Filamentous green algae are major BSC-forming taxa that stabilize soil particles by gluing them together due to the excretion of sticky mucilage. They usually occur in high biomass but low diversity. Coccoid algae are at-

tached to the soil particles or other algae and typically occur in high diversity but low biomass (Büdel et al., 2016).

Filamentous cyanobacteria, especially representatives from the genus *Microcoleus*, are often dominant phototrophic organisms in BSCs from drylands and dunes of temperate regions (Garcia-Pichel et al., 2001; Schulz et al., 2016). They are described as important members of BSC communities due to their ability to produce sticky mucilage sheaths and extracellular polymeric substances, thus forming a network between soil particles (Gundlapally and Garcia-Pichel, 2006). In temperate regions, this key function is often carried out by the filamentous eukaryotic algae, such as *Klebsormidium*, *Xanthonema*, or *Zygonium* (Fischer and Subbotina, 2014; Lukešová, 2001; Pluis, 1994).

In a previous study, we indicated that the BSC’s algal richness is related to P cycling (Baumann et al., 2017). The data implied that BSCs were involved in the transformation of inorganic P to organic P compounds, thus playing a key role in the biological P cycling in temperate soils. However, BSC algal species richness was only considered as a sum parameter; detailed information on species occurrence is still missing. Therefore, in the present study we focused on the identification of algal species and the effect of silvicultural management intensity on algal species richness in BSCs collected from the same plots as Baumann et al. (2017) and additional sampling sites. The correlation of BSC algal richness with C, N, and P content, and in particular different P fractions, was investigated in order to uncover the link between biogeochemical cycles and BSC alga species. The aim of the present study was to characterize for the first time algal community in the BSCs from disturbed sites in temperate forests of different silvicultural management intensities.

2 Material and methods

2.1 Study site

BSC samples were collected in June 2014 and 2015 from the plots of the “German Biodiversity Exploratories” project with natural protected forests and managed forest (age-class forest) (M. Fischer et al., 2010). Forest plots were located in the Schorfheide-Chorin Biosphere Reserve in northeastern Germany; the plots differed in the dominant tree species: Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) or European beech (*Fagus sylvatica* L.). Samples were taken from the disturbed areas where BSCs developed on the litter-free bare soil (for illustration, see Fig. 1). The top millimeters of soil, where BSC had been visually detected as a green cover, were collected on a spatula. After transportation to the lab the upper 2 mm of BSC were separated from the adhering soil underneath with a razor blade before being stored dry in paper bags. In total, 31 BSCs were collected from 13 pine and 18 beech plots, of which 23 were managed and 8 were natural forest plots (Table 1).

Table 1. General information on study sites: sample location, main tree species, management status, silvicultural management index (SMI), water content and pH from bulk soil analyses, and proportion of inorganic P as % of total P. n.d.: not determined; * Taken from Baumann et al. (2017).

plot	latitude	longitude	main tree species	managed	SMI	water content	pH	proportion of inorganic P (%)*
SW_01	52.900847	13.846367	pine	yes	0.351	12.08	3.64	20.8
SW_02	52.951729	13.778028	pine	yes	0.329	14.36	3.60	n.d.
SW_03	52.920707	13.643002	pine	yes	0.334	11.69	3.47	n.d.
SW_04	52.917347	13.847311	pine	yes	0.136	13.89	3.50	n.d.
SW_05	53.057034	13.885366	beech	yes	0.211	13.89	3.42	22.8
SW_06	53.057034	13.885366	beech	yes	0.211	13.89	3.42	18.6
SW_07	52.907443	13.841688	beech	yes	0.319	17.85	3.67	17.0
SW_08	52.907443	13.841688	beech	yes	0.319	17.85	3.67	14.9
SW_09	53.107348	13.694419	beech	no	0.082	18.61	3.73	20.3
SW_10	53.107348	13.694419	beech	no	0.082	18.61	3.73	18.5
SW_11	53.191797	13.930338	beech	no	0.059	20.67	3.38	13.7
SW_12	53.191797	13.930338	beech	no	0.059	20.67	3.38	n.d.
SW_13	53.044587	13.810103	beech	no	0.017	16.43	3.56	17.2
SW_14	53.044587	13.810103	beech	no	0.017	16.43	3.56	35.0
SW_15	53.091096	13.637843	pine	yes	0.381	9.91	3.70	9.2
SW_16	53.090294	13.633704	pine	yes	0.281	12.38	3.66	7.5
SW_17	52.917914	13.752174	pine	yes	0.276	15.81	3.38	16.7
SW_18	52.914542	13.737553	pine	yes	0.330	6.06	3.72	9.4
SW_19	53.076583	13.863986	pine	yes	0.335	8.40	3.57	n.d.
SW_20	53.088606	13.635384	pine	yes	0.357	8.99	3.66	12.8
SW_21	52.915588	13.740451	pine	yes	0.218	13.02	3.44	12.3
SW_22	52.895826	13.852147	pine	yes	0.217	13.30	3.47	n.d.
SW_23	52.895826	13.852147	pine	yes	0.217	13.30	3.47	n.d.
SW_24	52.940022	13.782612	beech	yes	0.161	16.82	3.62	n.d.
SW_25	52.940022	13.782612	beech	yes	0.161	16.82	3.62	n.d.
SW_26	52.914769	13.862365	beech	yes	0.250	15.66	3.68	25.2
SW_27	52.914769	13.862365	beech	yes	0.250	15.66	3.68	33.3
SW_28	52.900977	13.928326	beech	yes	0.229	18.85	3.72	14.8
SW_29	52.900977	13.928326	beech	yes	0.229	18.85	3.72	n.d.
SW_30	53.051266	13.844995	beech	no	0.070	14.08	3.71	n.d.
SW_31	53.051266	13.844995	beech	no	0.070	14.08	3.71	n.d.

2.2 Culturing, identification, and richness of algae

Solid 3N-Bolds Basal Medium (1.5% agar) with vitamins (Starr and Zeikus, 1993) was used for the establishment of enrichment cultures. Several 7–10 mm² BSC pieces were cleaned with forceps to remove all roots and leaves, in order to avoid the growth of fungi and bacteria, and were placed on the surface of an agar plate under sterile conditions. Plates were incubated at 20 °C, 30–35 μmol photons m⁻² s⁻¹ (Osram Lumilux Cool White lamps L36W/840) under a light/dark cycle of 16:8 h L:D. The plates were regularly inspected and colonies were identified after 4 to 6 weeks' incubation, using a light microscope (BX51, Olympus) with Nomarski differential interference optics and 1000 × magnification. Photomicrographs were taken with an Olympus UC30 camera attached to the microscope and processed with the cellSens Entry software (Olympus). For direct observation of

BSC samples, pieces of BSC were rewetted with tap water, put on a glass slide, and analyzed with the above-mentioned microscope at 400 × magnification. Mucilage of algae was stained with an aqueous solution of methylene blue.

Morphological identification of algae and cyanobacteria was based on the standard syllabus (Ettl and Gärtner, 1995) and more recent taxonomic publications on certain algal groups (Darienko et al., 2010; Kostikov et al., 2002; Mikhailuk et al., 2015). Phototrophic microorganisms were identified as Cyanobacteria, Chlorophyta, Streptophyta, and some Stramenopiles (Eustigmatophyceae). Diatoms were regularly found in direct observations but were excluded from the analyses as the mentioned enrichment cultivation was not suitable for this group of microalgae (e.g., Schulz et al., 2016).

Since the enrichment cultivation did not provide clear information on the abundance of each identified taxon, we used the total number of algae and cyanobacteria species per sam-



Figure 1. General overview of managed pine forest (a), natural beech forest (c) and close-up of the respective biological soil crusts (BSC): BSC on bare soil in a managed pine forest (b); BSC on a root plate of a fallen tree in a natural beech forest (d).

ple, also known as species richness, as the measure of alpha diversity. As a measure of beta diversity, the similarity between the plots was shown by presence/absence of individual species, combining the total number and the identity of all algal taxa observed. Furthermore, the identified algae and cyanobacteria were categorized based on their life form (filamentous or coccal), since different life forms differ in their ecological function. The proportion of filamentous algae in the total number of algae was used for statistical analyses.

2.3 Environmental variables

The natural and managed forest plots were characterized by different silvicultural management intensity. In natural forests, no management was conducted, meaning that fallen trees were left in place and no trees were cut. In managed age-class forests, the forest stands were regularly disturbed by tree cuts, removal of dead trees, and usage of skid trails. To evaluate the effect of management, the silvicultural management index (SMI) was used. This index takes into account the tree species, forest stand density and age, as well as the aboveground living and dead wood biomass (Schall and Ammer, 2013). High stand density is reflected by a high SMI; therefore, natural forests have a lower SMI than managed

forests, and a pine stand has a higher SMI than a beech stand (Schall and Ammer, 2013).

To assess potential links between BSC organisms and environmental parameters, the species' richness, presence/absence of individual algal species, and proportion of filamentous algae were related to the following environmental parameters: dominant tree species (pine or beech), silvicultural management intensity (SMI), pH, and water content of the bulk soil (Table 1, for all 31 samples). Additionally, for a subset of 19 BSC samples, data on total C, N and P content and organic and inorganic P compounds, for labile, moderately labile and stable P, were included. Element data were presented in detail by Baumann et al. (2017), and are thus not presented in this paper.

2.4 Statistical analyses

All statistical analyses were done using the R version 3.3.0 (R Development Core Team, 2009) statistical software. Analysis of variance (ANOVA) was conducted to reveal the effect of environmental parameters on algal and cyanobacteria richness, and proportion of filamentous species; the best predictors for their variance were selected by backward elimination stepwise regression analysis based on the BIC (Bayesian information criterion) using the “step” command in R. The correlation between environmental parameters was determined by Pearson correlation (“cor” and “cor.test” commands in R).

To reveal correlations of single environmental parameters with the presence or absence of individual algal species, PERMANOVA (with the “adonis” function in R, Anderson, 2001) was applied using the Bray–Curtis dissimilarity index (Bray and Curtis, 1957), including a permutation test with 1000 permutations. The adonis function allows application of non-Euclidean distance metrics and handles both categorical and continuous predictors. For analysis of co-correlation of environmental factors, Pearson correlation was used. To test significant differences of environmental factors between tree species, an unpaired two-tailed *t*-test was performed. Differences with a *p*-value below or equal to 0.05 were taken as significant.

3 Results

3.1 Algae identification

In total 51 different algae species and one cyanobacterium were detected in enrichment cultures of all 31 BSC samples. *Stichococcus bacillaris* was the most ubiquitous taxon, observed in 27 out of 31 samples, followed by *Coccomyxa simplex* and *Klebsormidium cf. subtile* in 26 and 23 out of 31 samples, respectively. All other algal species were detected in less than 50 % of the BSC samples; 22 algal species were observed exclusively in one sample (Fig. 2). The richness of algae (total species number) at each plot ranged from 3 to 14

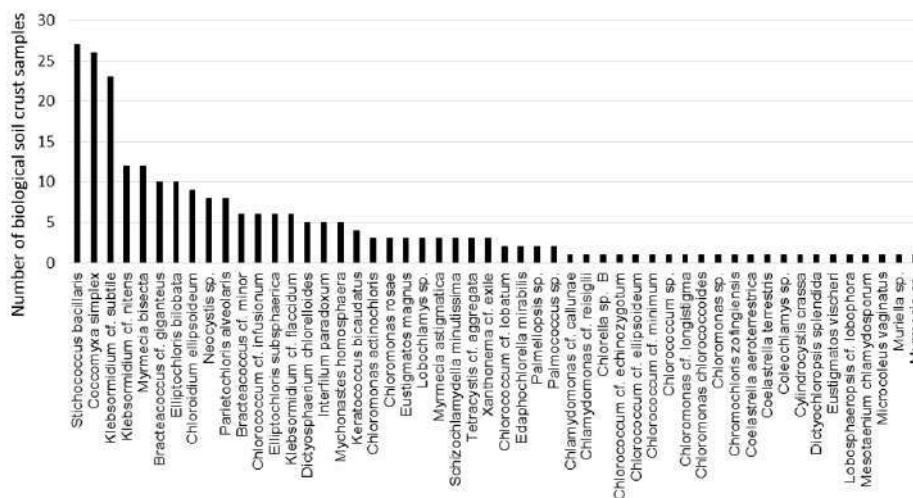


Figure 2. Occurrence of each algal species in biological soil crusts from forest sites ($n = 31$).

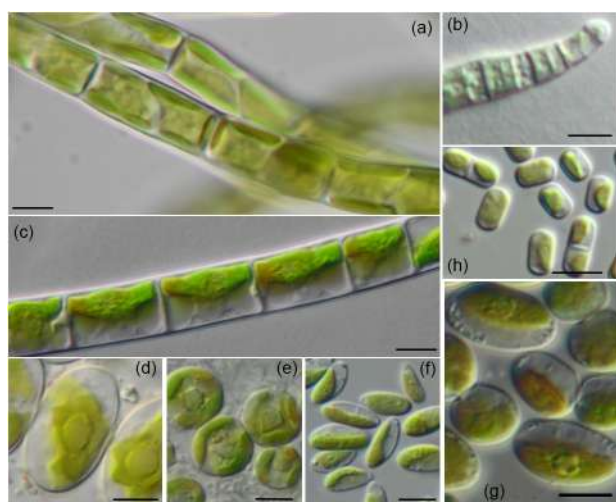


Figure 3. Filamentous and examples of coccoid algae from forest BSCs: algae with strong filaments: A-*Xanthonema cf. exile*, B-*Microcoleus vaginatus*, C-*Klebsormidium cf. flaccidum*; coccoid algae: D-*Chloridium ellipsoideum*, E-*Eustigmatos magnus*, F-*Coccomyxa simplex*; algae with short or easily disintegrated filaments: G-*Stichococcus bacillaris*, H-*Interfilum paradoxum*; scale bar = 5 μm .

species with a mean of 8 and a standard deviation of 2.6 (a complete species list is provided in Supplement Table S1).

The phylum Chlorophyta made up 81 % of all detected algal species, followed by Streptophyta (11 %) and Stramenopiles (6 %). Cyanobacteria were rare in these BSCs: only one species, *Microcoleus vaginatus*, was observed in only one sample.

The identified algal species were differentiated according to their life form (Fig. 3). Five species with strong fil-

aments (*Klebsormidium cf. flaccidum*, *K. cf. subtile*, *K. cf. nitens*, *Xanthonema cf. exile*, *Microcoleus vaginatus*) and two species with short or easily disintegrating filaments (*Interfilum paradoxum*, *Stichococcus bacillaris*) were found. In each BSC at least two different filamentous taxa were detected, indicating their importance for the BSC formation. Genus *Klebsormidium* seemed to be highly important for BSCs in forest since it was registered in every BSC sample (Table S1).

3.2 Correlation of algae richness with plot characteristics and nutrient content

The gravimetric water content of the bulk soil was negatively correlated with the SMI; the pH was neither correlated with the water content, nor with the SMI nor with the dominant tree species (Table 2). The N content was positively correlated with the C content, and N as well as C content were independent of the SMI and pH. Total P and the proportion of inorganic P were independent of the C and N content, as well as of pH and SMI (Table 2).

The richness of algal species and the proportion of filamentous algae in BSCs only correlated with SMI, water content and proportion of inorganic P (Table 3). The remaining tested parameters (C and N content, total P, proportion of organic P, pH, dominant tree species, and soil horizon) were excluded by stepwise model simplification based on the BIC. This means that these factors had no measurable effect on the algal species richness or on the proportion of filamentous algae. The SMI was positively correlated with the species richness, meaning that a higher SMI resulted in a higher species richness (Fig. 4); especially the proportion of coccoid algae was increased. BSCs with higher algal richness tended to have lower proportions of inorganic P.

Table 2. Significant Pearson correlation coefficients to reveal correlations between environmental factors, which might affect or be affected by the richness of algae. This co-correlation analysis should support the correct interpretation of potential important factors for the alga community. SMI – silvicultural management index; n.s. – not significant.

	main tree species	SMI	water content	pH	C _t content	N _t content	P _t content
SMI	−0.6						
water content	0.77	−0.59					
pH	n.s.	n.s.	n.s.				
C _t content	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			
N _t content	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.94		
P _t content	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
proportion of inorganic P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	−0.78	0.6

The presence/absence of individual algal species in BSCs significantly correlated with the dominant tree species (15 % explained variance) and with the soil water content (10 % explained variance). The SMI and proportion of inorganic P explained each 5 % of the variance, but this was not significant (Table 3). Therefore, we concluded that the dominant tree species and the soil water content affect the composition of algal species in BSCs.

4 Discussion

4.1 Species composition and abundance

In total, 51 microalgal species and one cyanobacterium were identified in all sampled BSCs (Fig. 2), which is a similar or slightly lower species richness compared to the other reports on BSCs from temperate regions at open sites (Langhans et al., 2009; Schulz et al., 2016), but similar or higher compared to the previous reports on algae from forest bulk soil (Khaybullina et al., 2010; Novakovskaya and Patova, 2008; Starks et al., 1981). Nevertheless, the given number most probably underestimates the real algal richness, since our results are based on the enrichment cultivation followed by morphological identification. Enrichment cultivation promotes the growth of only culturable algae, which represent only a small part of all phototrophic microorganisms in BSCs (Langhans et al., 2009). A recent paper, comparing metagenomic data of a polar BSC with data based on enrichment cultivation and morphological identification of the algae, showed that only about 10 % of the metagenomic data could be confirmed by morphological identification (Rippin et al., 2018). Furthermore, it is not always possible to distinguish dormant from currently active microalgae. However, direct observation of a BSC sample under the microscope gives at least a first hint of the dominant active organisms. With this approach we could confirm that all filamentous algae were abundant and vital in the BSC samples. The morphological identification of algae has known challenges: for example, sibling species have similar characteristics but are genetically distant (Potter et al.,

1997). To overcome these limitations, researchers proposed combining molecular and morphological methods of identification, since molecular techniques alone can also fail to detect some taxa, as a result of unsuccessful DNA extraction, inappropriate primers, etc. (Büdel et al., 2009; Garcia-Pichel et al., 2001).

All observed algal species are known to be terrestrial taxa; most of them were already reported from other BSCs (Büdel et al., 2016, and references therein; Ettl and Gärtner, 1995). Chlorophyceae were the most abundant phylum, which is typical for temperate regions (Büdel et al., 2016). Especially most of the unicellular taxa belong to the Chlorophyta (genera such as *Chlamydomonas*, *Chloromonas*, *Chlorococcum*, and *Tetracystis*). A high richness of Chlorophyta is characteristic of humid habitats and typical for forest soils (Hoffmann, 1989).

Cyanobacteria were represented by only one species. While they are often reported as predominant species in BSCs of arid regions such as Israel and drylands of the USA (Garcia-Pichel et al., 2001; Kidron et al., 2010), cyanobacteria are less abundant in temperate regions (Gypser et al., 2016; Langhans et al., 2009; Pluis, 1994) and even rare in acidic soils, which corresponds to the forest plots of our Schorfheide-Chorin study site (Hoffmann et al., 2007; Lukešová, 2001; Lukešová and Hoffmann, 1996). It seems that cyanobacteria play only a minor role in forest ecosystems, with consequences for the taxa's ecological traits. For example, the ability for nitrogen fixation in phototrophic organisms was only reported for cyanobacteria and never observed in eukaryotic algae. In forest ecosystems, litter and other decomposable biomass might have provided sufficient mineral nitrogen compounds, which could have led to the absence of nitrogen-fixing organisms in these systems in contrast to nitrogen-poor habitats such as dunes or deserts where cyanobacteria are dominant (Langhans et al., 2009; Schulz et al., 2016).

The filamentous alga *Klebsormidium* was found in nearly all BSCs of our study, whereas species with similar strong filaments (*Microcoleus* and *Xanthonema*) were only found occasionally. Filamentous algae can be regarded as key play-

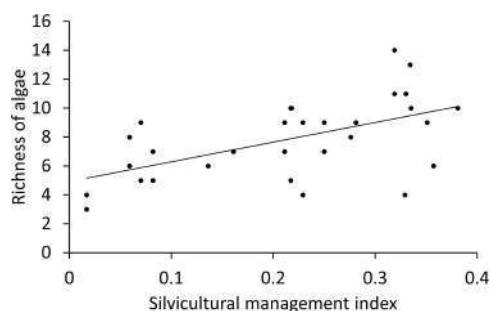


Figure 4. Plot of algae richness in BSCs from forests over the silvicultural management index (SMI). Natural forest has a low SMI, managed forests a high SMI; the line indicates the best linear fit (slope: 13.6, $p < 0.001$ (ANOVA)).

ers in BSC communities, because of their BSC-initiating potential by building tight networks among soil particles (Büdel et al., 2016). In some forest BSCs, moss protonema can exert a similar function, due to their filamentous nature (Weber et al., 2016). However, in the forest ecosystems of Schorfheide-Chorin the green algae *Klebsormidium* seems to be the most important BSC-initiating alga. This genus can tolerate a wide range of environmental factors and has a cosmopolitan distribution in numerous terrestrial habitats (Karsten et al., 2016; Rindi et al., 2011, and references therein). Its presence in other terrestrial habitats, such as natural rocks in lowlands and mountainous areas (Mikhailyuk et al., 2008), caves (Vinogradova and Mikhailyuk, 2009), sand dunes (Schulz et al., 2016), tree barks (Freystein et al., 2008), acidic post-mining sites (Lukešová, 2001), urban walls (Rindi and Guiry, 2004), and building facades (Barberousse et al., 2006), is well documented. As many other terrestrial algae, *Klebsormidium* is tolerant to light exposure during dehydration (Gray et al., 2007). This is a typical situation, which BSC algae have to cope with, since the increase in light intensity in the morning is often associated with dehydration (Raanan et al., 2016). A recent study in central Europe, however, observed that *Klebsormidium* is sensitive to increasing light during cellular water loss (Pierangelini et al., 2017). The distribution of *Klebsormidium* in nearly all BSC samples from Schorfheide-Chorin forest may be explained by a lower solar radiation and lower evaporation rates in forest ecosystems compared with the open habitats (e.g., inland dunes) where besides *Klebsormidium* other filamentous algae are dominant (Langhans et al., 2009; Pluis, 1994). Also, the forest soil is rather acidic (pH min: 3.23, pH max: 3.86; Table 1), which supports a dominance of *Klebsormidium* (Škaloud et al., 2014). Thus, the low light availability, low water evaporation, and acidic soil conditions plausibly explain the presence and the dominance of *Klebsormidium* as a potential BSC-initiating algal taxon in nearly all BSCs from Schorfheide-Chorin forest plots.

Three morphospecies of the genus *Klebsormidium* were identified in the investigated samples (Fig. 2). All three morphospecies were reported from other aeroterrestrial habitats in central Europe (Glaser et al., 2017; Mikhailyuk et al., 2015). *Klebsormidium* exhibits morphological features, which can be easily recognized. However, the identification down to species level is difficult due to the high morphological plasticity (Lokhorst, 1996). And still, in times of molecular identification, the debate on species definition in the genus *Klebsormidium* is ongoing (Mikhailyuk et al., 2015; Rindi et al., 2017). Therefore, the definition of clades within *Klebsormidium* was and still is a helpful tool to differentiate between morpho- or geno-types (Rindi et al., 2011). Studies comparing these *Klebsormidium* clades from different localities observed global ubiquity on the one hand, and local endemism on the other (Ryšánek et al., 2014). Clade composition seems to differ depending on the habitat: *Klebsormidium* cf. *flaccidum* (B/C clade) was abundant in both closed and open habitats, whereas *K.* cf. *nitens* and *K.* cf. *subtile* (E clade) were predominantly distributed in forest BSCs (Glaser et al., 2017; Mikhailyuk et al., 2015). In our study, however, BSCs from forests contained more often *Klebsormidium* cf. *subtile* and *K.* cf. *nitens* than *K.* cf. *flaccidum*. In desiccation experiments the recovery rates of these clades were similar (Donner et al., 2017a, b). It is still open which of the environmental factors cause the observed habitat preferences of the different clades. Additional ecophysiological experiments including potential environmental factors, such as light regimes, desiccation frequency, and duration, as well as soil parameters such as pH, in combination with transcriptomic approaches might explain these conspicuous habitat preferences of *Klebsormidium* clades.

4.2 Correlation with SMI

The silvicultural management index (SMI) was used to estimate the forest management intensity. It takes into account the tree species, forest stand age and density. However, intensively managed forest did not necessarily inherit more disturbed sites suitable for the BSC development. In contrast, BSC development is limited in forests with high density (typical for intensively managed forest stands). However, managed forests have a higher risk for complete stand loss, because of either regular clear-cut or strong storms; it is more likely to lose a large part of pine stands with high density compared to natural beech forest.

The richness of algal species as well as the proportion of coccal algae were positively correlated with the silvicultural management index (SMI; Fig. 4). This means that more algal species were discovered in BSCs from managed than from natural forest ecosystems. This finding agrees with conclusions of high algal richness on disturbed or cultivated soils (Gollerbakh and Shtina, 1969; Hoffmann, 1989). The SMI reflects the effect of management practice on the dominant tree species and the stand density. Most biodiversity

Table 3. Effect of environmental factors on algae richness, filamentous algae proportion (both estimated by ANOVA) and presence or absence of individual algal species (estimated by PerMANOVA) quantified by the percentage of explained variance. The significance level is indicated by ^a – $p < 0.001$, ^b – $p < 0.01$, ^c – $p < 0.05$, and ^d – $p < 0.1$. ns – not significant; (+) indicates positive correlation, (–) negative correlation.

	algae richness	proportion of filamentous algae	presence or absence of individual algal species
SMI	30.5 % ^b (+)	37.7 % ^a (–)	5.6 % n.s.
water content	15.7 % ^c (–)	14.0 % ^b (+)	9.6 % ^c
proportion inorganic P	11.0 % ^d (–)	29.1 % ^a (+)	5.8 % n.s.
main tree species	0.9 % n.s.	0.3 % n.s.	14.7 % ^a

exploratory studies on forest-soil microorganisms observed a stronger effect of the dominant tree species than of the SMI on the microbial community (Goldmann et al., 2015; Kaiser et al., 2016; Purahong et al., 2014); only one study on litter decaying fungi and bacteria indicated a significant difference between natural and managed beech forests (Purahong et al., 2015). Kaiser et al. (2016) discussed that the different tree species influence soil bacteria by shifting the pH in soil; hence, tree species was designated as the main predictor for bacterial community composition. However, the bulk soil pH did not differ significantly between beech and pine forest in Schorfheide-Chorin (Table 1); hence, the algae in BSCs were not affected by this abiotic parameter. Therefore, we rejected an effect of the SMI via the pH on the BSC algal species richness in Schorfheide-Chorin.

However, the SMI combines other potential factors, which could explain its positive correlation with the richness of algal species as well as the proportion of coccal algae. Water and light availability might have affected BSC microalgae due to forest stand density and tree species. Forest plots in Schorfheide-Chorin were dominated by either beech or pine trees, which affect the light regime differently: in beech forests the canopy shade changes over the year, with usually higher solar radiation on the ground in winter and spring than in summer, while in pine forests no such light fluctuations occur. Also, the stand density, another parameter of the SMI, could affect the light regime on the ground: higher density would result in less photosynthetic active radiation for photosynthetically active soil microorganisms. The radiation is often coupled with evaporation of soil moisture (Raanan et al., 2016); hence, the stand density could have an indirect effect on the BSC organisms via an altered water regime. Thus, the SMI was expected to affect the algal richness in BSCs via lower light availability and lower evaporation rates. This assumption is well supported by the two-way analysis of water content and SMI. Nevertheless, it should be noted that the water content was measured in the bulk soil, which might differ from the one of BSCs. For future studies on microalgae in BSCs it would be important to examine also the incident light on the ground as well as the BSC water content.

Although the SMI positively affected the algal richness, the presence or absence of individual algal taxa was not correlated with the SMI, but with the main tree species. Broadleaf litter has a higher quality in terms of a more favorable C : N and C : P ratio compared to coniferous litter (Cleveland and Liptzin, 2007; McGroddy et al., 2004). It might have been that the community in the pine forest promoted algal species which could cope with a suboptimal C : N : P ratio. But as mentioned above, both light regime and water availability differ between the two forest types and could also have contributed to the observed differences in the occurrence of algal species.

4.3 Correlation with C, N, and P

BSCs have different important ecological functions, such as the enhancement of the nutrient content in the top soil layer (Baumann et al., 2017; Evans and Johansen, 1999). To assess the relationship between BSC community and biogeochemical cycling in BSCs, the content of total C, N, and P and additionally the different P fractions (organic, inorganic, labile, and stable fractions) were correlated with algal richness. Although a correlation between the richness of algae and the total C, N, and P content was not observed, the presence of BSCs clearly led to an increased content of total C, N, and P and in particular a higher proportion of organic P (Baumann et al., 2017). These results indicate that algal species are functionally redundant, and that a BSC community with low species richness still has a functional role in increasing C, N, and P content. A more detailed analysis of the P fractions gave a slightly different picture: the proportion of inorganic P was positively correlated with the proportion of filamentous algae and showed a tendency to a negative correlation with the richness of BSC algae. Soluble inorganic phosphate can be assimilated by organisms, and it originates either from the weathering of P-containing minerals, desorption of mineral-bound phosphates, or the mineralization of organic matter (Mackey and Paytan, 2009). Thus, a low amount of inorganic P could indicate a high uptake rate of BSC organisms, and thus a more closed P cycle due to the higher algal richness (Baumann et al., 2017).

5 Conclusions

BSCs are able to coexist with continuous forests, because natural and human-induced disturbances regularly provide free space (e.g., tree fall, skid trails) for BSCs to develop. For the first time, algal richness in BSCs from such disturbed sites in temperate forests under different management intensities were described. The rather acidic forest soil supported a clear dominance of streptophycean *Klebsormidium* morphotypes as the main BSC-initiating filamentous algae, while cyanobacteria played a negligible role. Higher forest management intensity resulted in a higher richness of algae, especially in a higher proportion of coccal taxa. It is reasonable to assume that the silvicultural management intensity in forests affects the algal richness due to the higher forest stand density in managed forests, which changes the light and water regime. Increasing algal richness in BSCs was supposed to enhance biogeochemical cycling of nutrients, but this hypothesis could not be proven. Nevertheless, the fraction of inorganic P showed tendencies towards a negative correlation with BSC algae, especially with filamentous species. Consequently, the present study gives the first hint of a relation between the biogeochemical cycles in BSCs and algal species. This relation should be studied in more detail, e.g., by gene expression analyses to understand whether and how algae in BSCs influence the cycling of P. Also, forthcoming studies should include other BSC-associated organisms, such as fungi and bacteria, to identify key players and the ecological role of BSCs in the P cycle.

Data availability. Data are publicly available and stored in BEXIS (available at <https://www.bexis.uni-jena.de/PublicData/PublicData.aspx?DatasetId=20686>, last access: 6 July 2018; Koenig-Ries et al., 2011).

The Supplement related to this article is available online at <https://doi.org/10.5194/bg-15-4181-2018-supplement>.

Author contributions. KG, KB, PL, and UK designed the experiments and collected soil samples. KG, KB, and TM carried out the lab work. KG prepared the manuscript with contributions from all co-authors.

Competing interests. The authors declare that they have no conflict of interest.

Special issue statement. This article is part of the special issue “Biological soil crusts and their role in biogeochemical processes and cycling”. It is a result of the BIOCRUST3 conference, Moab, USA, 26 to 30 September 2016.

Acknowledgements. The authors would like to thank Nadine Borchhardt for her help during BSC sampling. Water content and pH data were provided by Ingo Schöning, Theresa Klötzing, and Marion Schruppf (Max Planck Institute for Biogeochemistry, Jena, Germany). Special thanks go to Elena Samolov for her contribution to English corrections.

We thank the managers of the three Exploratories, Martin Gorke, and all former managers for their work in maintaining the plot and project infrastructure, Christiane Fischer for giving support through the central office, Michael Owonibi for managing the central database, and Markus Fischer, Eduard Linsenmair, Dominik Hessenmöller, Daniel Prati, Ingo Schöning, François Buscot, Ernst-Detlef Schulze, Wolfgang W. Weisser, and the late Elisabeth Kalko for their role in setting up the Biodiversity Exploratories project. The work has been funded by DFG Priority Program 1374 “Infrastructure-Biodiversity-Exploratories” (subproject Crustfunction – KA899/28-1 and LE903/12-1). Fieldwork permits were issued by the responsible state environmental offices of Baden-Württemberg, Thuringia, and Brandenburg (according to §72 BbgNatSchG). Tatiana Mikhailyuk thanks the Alexander von Humboldt Foundation for financial support.

Edited by: Bettina Weber

Reviewed by: two anonymous referees

References

- Anderson, M. J.: A new method for non-parametric multivariate analysis of variance, *Austral. Ecol.*, 26, 32–46, <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>, 2001.
- Barberousse, H., Tell, G., Yéprémian, C., and Couté, A.: Diversity of algae and cyanobacteria growing on building facades in France, *Algol. Stud.*, 120, 81–105, 2006.
- Barger, N. N., Herrick, J. E., Van Zee, J., and Belnap, J.: Impacts of Biological Soil Crust Disturbance and Composition on C and N Loss from Water Erosion, *Biogeochem.*, 77, 247–263, <https://doi.org/10.1007/s10533-005-1424-7>, 2006.
- Baumann, K., Glaser, K., Mutz, J.-E., Karsten, U., MacLennan, A., Hu, Y., Michalik, D., Kruse, J., Eckhardt, K.-U., Schall, P., and Leinweber, P.: Biological soil crusts of temperate forests: Their role in P cycling, *Soil Biol. Biochem.*, 109, 156–166, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.02.011>, 2017.
- Belnap, J.: The world at your feet: desert biological soil crusts, *Front. Ecol. Environ.*, 1, 181–189, 2003.
- Belnap, J., Büdel, B., and Lange, O. L.: Biological soil crusts: characteristics and distribution, in: *Biological soil crusts: structure, function, and management*, Vol. 1, edited by: Belnap, J. and Lange, O. L., 3–30, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2001.
- Borchhardt, N., Schiefelbein, U., Abarca, N., Boy, J., Mikhailyuk, T., Sipman, H. J. M., and Karsten, U.: Diversity of algae and lichens in biological soil crusts of Ardley and King George islands, Antarctica, *Antarct. Sci.*, 29, 1–9, <https://doi.org/10.1017/S0954102016000638>, 2017.
- Bray, J. R. and Curtis, J. T.: An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin, *Ecol. Monogr.*, 27, 325–349, <https://doi.org/10.2307/1942268>, 1957.
- Büdel, B., Darienko, T., Deutschewitz, K., Dojani, S., Friedl, T., Mohr, K. I., Salisch, M., Reisser, W., and Weber, B.: Southern

- african biological soil crusts are ubiquitous and highly diverse in drylands, being restricted by rainfall frequency, *Microb. Ecol.*, 57, 229–247, <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9449-9>, 2009.
- Büdel, B., Dulić, T., Darienko, T., Rybalka, N., and Friedl, T.: Cyanobacteria and Algae of Biological Soil Crusts, in: *Biological Soil Crusts: An Organizing Principle in Drylands*, edited by: Weber, B., Büdel, B., and Belnap, J., 55–80, Springer International Publishing, Cham., 2016.
- Castillo-Monroy, A., Maestre, F., Delgado-Baquerizo, M., and Gallardo, A.: Biological soil crusts modulate nitrogen availability in semi-arid ecosystems: insights from a Mediterranean grassland, *Plant Soil*, 333, 21–34, <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0276-7>, 2010.
- Cleveland, C. C. and Liptzin, D.: C:N:P stoichiometry in soil: is there a “Redfield ratio” for the microbial biomass?, *Biogeochemistry*, 85, 235–252, <https://doi.org/10.1007/s10533-007-9132-0>, 2007.
- Concostrina-Zubiri, L., Huber-Sannwald, E., Martínez, I., Flores, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Escudero, A., and Belnap, J.: Biological soil crusts across disturbance–recovery scenarios: effect of grazing regime on community dynamics, *Ecol. Appl.*, 24, 1863–1877, 2014.
- Darienko, T., Gustavs, L., Mudimu, O., Menendez, C. R., Schumann, R., Karsten, U., Friedl, T., and Pröschold, T.: *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), *Eur. J. Phycol.*, 45, 79–95, <https://doi.org/10.1080/09670260903362820>, 2010.
- Daryanto, S., Eldridge, D. J., and Wang, L.: Ploughing and grazing alter the spatial patterning of surface soils in a shrub-encroached woodland, *Geoderma*, 200–201, 67–76, <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.02.006>, 2013.
- Donner, A., Glaser, K., Borchhardt, N., and Karsten, U.: Ecophysiological Response on Dehydration and Temperature in Terrestrial Klebsormidium (Streptophyta) Isolated from Biological Soil Crusts in Central European Grasslands and Forests, *Microb. Ecol.*, 73, 850–864, <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0917-3>, 2017a.
- Donner, A., Ryšánek, D., Mikhailuyuk, T., and Karsten, U.: Ecophysiological traits of various genotypes of a green key alga in biological soil crusts from the semi-arid Colorado Plateau, USA, *J. Appl. Phycol.*, 29, 2911–2923, <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1158-7>, 2017b.
- Elbert, W., Weber, B., Burrows, S., Steinkamp, J., Büdel, B., Andreae, M. O., and Pöschl, U.: Contribution of cryptogamic covers to the global cycles of carbon and nitrogen, *Nat. Geosci.*, 5, 459–462, <https://doi.org/10.1038/ngeo1486>, 2012.
- Ettl, H. and Gärtner, G.: *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*, Spektrum Akademischer Verlag, 1995.
- Evans, R. D. and Johansen, J. R.: Microbiotic crusts and ecosystem processes, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 18, 183–225, <https://doi.org/10.1080/07352689991309199>, 1999.
- Fischer, M., Bossdorf, O., Gockel, S., Hänsel, F., Hemp, A., Hesenmöller, D., Korte, G., Nieschulze, J., Pfeiffer, S., Prati, D., Renner, S., Schöning, I., Schumacher, U., Wells, K., Buscot, F., Kalko, E. K. V., Linsenmair, K. E., Schulze, E.-D., and Weisser, W. W.: Implementing large-scale and long-term functional biodiversity research: The Biodiversity Exploratories, *Basic Appl. Ecol.*, 11, 473–485, <https://doi.org/10.1016/j.baec.2010.07.009>, 2010.
- Fischer, T. and Subbotina, M.: Climatic and soil texture threshold values for cryptogamic cover development: a meta analysis, *Biologia (Bratisl.)*, 69, 1520–1530, <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0464-7>, 2014.
- Fischer, T., Veste, M., Wiehe, W., and Lange, P.: Water repellency and pore clogging at early successional stages of microbiotic crusts on inland dunes, Brandenburg, NE Germany, *CATENA*, 80, 47–52, <https://doi.org/10.1016/j.catena.2009.08.009>, 2010.
- Flehtner, V. R., Johansen, J. R., and William, H. C.: Algal composition of microbiotic crusts from the central desert of Baja California, Mexico, *Gt. Basin Nat.*, 58, 295–311, 1998.
- Freystein, K., Salisch, M., and Reisser, W.: Algal biofilms on tree bark to monitor airborne pollutants, *Biologia (Bratisl.)*, 63, 866–872, <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0114-z>, 2008.
- Garcia-Pichel, F., Lopez-Cortes, A., and Nubel, U.: Phylogenetic and Morphological Diversity of Cyanobacteria in Soil Desert Crusts from the Colorado Plateau, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1902–1910, <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1902-1910.2001>, 2001.
- Glaser, K., Donner, A., Albrecht, M., Mikhailuyuk, T., and Karsten, U.: Habitat-specific composition of morphotypes with low genetic diversity in the green algal genus *Klebsormidium* (Streptophyta) isolated from biological soil crusts in Central European grasslands and forests, *Eur. J. Phycol.*, 52, 188–199, <https://doi.org/10.1080/09670262.2016.1235730>, 2017.
- Goldmann, K., Schöning, I., Buscot, F., and Wubet, T.: Forest Management Type Influences Diversity and Community Composition of Soil Fungi across Temperate Forest Ecosystems, *Front. Microbiol.*, 6, 1300, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01300>, 2015.
- Gollerbakh, M. M. and Shtina, E. A.: *Soil Algae*, Nauka, Leningrad, 1969.
- Gomez, E. D., Garland, J. L., and Roberts, M. S.: Microbial structural diversity estimated by dilution-extinction of phenotypic traits and T-RFLP analysis along a land-use intensification gradient, *Fems Microbiol. Ecol.*, 49, 253–259, 2004.
- Gray, D. W., Lewis, L. A., and Cardon, Z. G.: Photosynthetic recovery following desiccation of desert green algae (Chlorophyta) and their aquatic relatives, *Plant Cell Environ.*, 30, 1240–1255, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01704.x>, 2007.
- Gundlapally, S. R. and Garcia-Pichel, F.: The Community and Phylogenetic Diversity of Biological Soil Crusts in the Colorado Plateau Studied by Molecular Fingerprinting and Intensive Cultivation, *Microb. Ecol.*, 52, 345–357, <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9011-6>, 2006.
- Gypser, S., Herppich, W. B., Fischer, T., Lange, P., and Veste, M.: Photosynthetic characteristics and their spatial variance on biological soil crusts covering initial soils of post-mining sites in Lower Lusatia, NE Germany, *Flora – Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants*, 220, 103–116, <https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.02.012>, 2016.
- Hoffmann, L.: Algae of terrestrial habitats, *Bot. Rev.*, 55, 77–105, 1989.
- Hoffmann, L., Ector, L., and Kostikov, I.: Algal Flora from Limed and Unlimed Forest Soils in the Ardenne (Belgium), *Syst. Geogr. Plants*, 77, 15–90, 2007.
- Kaiser, K., Wemheuer, B., Korolkow, V., Wemheuer, F., Nacke, H., Schöning, I., Schrupf, M., and Daniel, R.: Driving forces of soil bacterial community structure, diversity, and func-

- tion in temperate grasslands and forests, *Sci. Rep.*, 6, 33696, <https://doi.org/10.1038/srep33696>, 2016.
- Karsten, U., Herburger, K., and Holzinger, A.: Living in biological soil crust communities of African deserts—Physiological traits of green algal *Klebsormidium* species (Streptophyta) to cope with desiccation, light and temperature gradients, *J. Plant Physiol.*, 194, 2–12, <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.09.002>, 2016.
- Khaybullina, L. S., Gaysina, L. A., Johansen, J. R., and Krautová, M.: Examination of the terrestrial algae of the Great Smoky Mountains National Park, USA, *Fottea*, 10, 201–215, 2010.
- Kidron, G. J., Vonshak, A., Dor, I., Barinova, S., and Abeliovich, A.: Properties and spatial distribution of microbiotic crusts in the Negev Desert, Israel, *CATENA*, 82, 92–101, <https://doi.org/10.1016/j.catena.2010.05.006>, 2010.
- Koenig-Ries, B., Ostrowski, A., Petzold, E., and Nieschulze, J.: BExIS – Biodiversity Exploratories Information System, TDWG 2011 Annual Conference, available at: <https://www.bexis.uni-jena.de/PublicData/PublicData.aspx?DatasetId=20686> (last access: 6 July 2018), 2011.
- Kostikov, I., Darienko, T., Lukešová, A., and Hoffmann, L.: Revision of the classification system of Radiococcaceae Fott ex Komárek (except the Subfamily Dictyochlorelloideae) (Chlorophyta), *Algol. Stud.*, 104, 23–58, 2002.
- Langhans, T. M., Storm, C., and Schwabe, A.: Community Assembly of Biological Soil Crusts of Different Successional Stages in a Temperate Sand Ecosystem, as Assessed by Direct Determination and Enrichment Techniques, *Microb. Ecol.*, 58, 394–407, <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9532-x>, 2009.
- Lewis, L. A.: Chlorophyta on land: independent lineages of green eukaryotes from arid lands, in: *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, edited by: Seckbach, J., Springer Netherlands, Dordrecht., 2007.
- Lokhorst, G. M.: Comparative Taxonomic Studies on the Genus *Klebsormidium* (Charophyceae) in Europe, Gustav Fischer, Stuttgart., 1996.
- Lukešová, A.: Soil algae in brown coal and lignite post-mining areas in Central Europe (Czech Republic and Germany), *Restor. Ecol.*, 9, 341–350, <https://doi.org/10.1046/j.1526-100X.2001.94002.x>, 2001.
- Lukešová, A. and Hoffmann, L.: Soil algae from acid rain impacted forest areas of the Krušné hory Mts. 1. Algal communities, *Veg. etatio*, 125, 123–136, 1996.
- Mackey, K. R. M. and Paytan, A.: Phosphorus cycle, in: *Encyclopedia of Microbiology*, Vol. 3, edited by: Schaechter, M., 322–334., 2009.
- McGroddy, M. E., Daufresne, T., and Hedin, L. O.: Scaling of C: N: P stoichiometry in forests worldwide: Implications of terrestrial redfield-type ratios, *Ecology*, 85, 2390–2401, 2004.
- Mikhailyuk, T., Sluiman, H. J., Massalski, A., Mudimu, O., Demchenko, E. M., Kondratyuk, S. Y., and Friedl, T.: New streptophyte green algae from terrestrial habitats and an assessment of the genus *Interfilum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta), *J. Phycol.*, 44, 1586–1603, <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00606.x>, 2008.
- Mikhailyuk, T., Glaser, K., Holzinger, A., and Karsten, U.: Biodiversity of *Klebsormidium* (Streptophyta) from alpine biological soil crusts (Alps, Tyrol, Austria, and Italy), edited by: Gabrielson, P., *J. Phycol.*, 51, 750–767, <https://doi.org/10.1111/jpy.12316>, 2015.
- Novakovskaya, I. and Patova, E.: Green algae in spruce forests in the north-east of European Russia, *Biologia (Bratisl.)*, 63, 836–842, <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0109-9>, 2008.
- Pierangelini, M., Ryšánek, D., Lang, I., Adlassnig, W., and Holzinger, A.: Terrestrial adaptation of green algae *Klebsormidium* and *Zygnema* (Charophyta) involves diversity in photosynthetic traits but not in CO₂ acquisition, *Planta*, 256, 971–986, <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2741-5>, 2017.
- Pluis, J. L. A.: Algal crust formation in the inland dune area, Laarder Wasmear, the Netherlands, *Plant Ecol.*, 113, 41–51, 1994.
- Potter, D., Lajeunesse, T. C., Saunders, G. W., and Anderson, R. A.: Convergent evolution masks extensive biodiversity among marine coccoid picoplankton, *Biodivers. Conserv.*, 6, 99–107, 1997.
- Purahong, W., Hoppe, B., Kahl, T., Schloter, M., Schulze, E.-D., Bauhus, J., Buscot, F., and Krüger, D.: Changes within a single land-use category alter microbial diversity and community structure: molecular evidence from wood-inhabiting fungi in forest ecosystems, *J. Environ. Manage.*, 139, 109–119, 2014.
- Purahong, W., Kapturska, D., Pecyna, M. J., Jariyavidyanont, K., Kaunzner, J., Juncheed, K., Uengwetwanit, T., Rudloff, R., Schulz, E., Hofrichter, M., Schloter, M., Krüger, D., and Buscot, F.: Effects of Forest Management Practices in Temperate Beech Forests on Bacterial and Fungal Communities Involved in Leaf Litter Degradation, *Microb. Ecol.*, 69, 905–913, <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0585-8>, 2015.
- Raanan, H., Oren, N., Treves, H., Berkowicz, S. M., Hagemann, M., Pade, N., Keren, N., and Kaplan, A.: Simulated soil crust conditions in a chamber system provide new insights on cyanobacterial acclimation to desiccation: Simulation of BSC conditions and acclimation, *Environ. Microbiol.*, 18, 414–426, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12998>, 2016.
- R Development Core Team: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna Austria [online], 2009.
- Rindi, F. and Guiry, M. D.: Composition and spatial variability of terrestrial algal assemblages occurring at the bases of urban walls in Europe, *Phycologia*, 43, 225–235, 2004.
- Rindi, F., Mikhailyuk, T. I., Sluiman, H. J., Friedl, T., and López-Bautista, J. M.: Phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta), *Mol. Phylogenet. Evol.*, 58, 218–231, <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.11.030>, 2011.
- Rindi, F., Rysanek, D., and Skaloud, P.: Problems of epitypification in morphologically simple green microalgae: a case study of two widespread species of *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta), *Fottea*, 17, 78–88, <https://doi.org/10.5507/fot.2016.017>, 2017.
- Rippin, M., Borchhardt, N., Williams, L., Colesie, C., Jung, P., Büdel, B., Karsten, U., and Becker, B.: Genus richness of microalgae and Cyanobacteria in biological soil crusts from Svalbard and Livingston Island: morphological versus molecular approaches, *Polar Biol.*, 41, 909–923, <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2252-2>, 2018.
- Ryšánek, D., Hřčková, K., and Škaloud, P.: Global ubiquity and local endemism of free-living terrestrial protists: phylogeographic assessment of the streptophyte alga *Klebsormidium*: Global bio-

- geography of a terrestrial protist, *Environ. Microbiol.*, 17, 689–698, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12501>, 2014.
- Schall, P. and Ammer, C.: How to quantify forest management intensity in Central European forests, *Eur. J. For. Res.*, 132, 379–396, <https://doi.org/10.1007/s10342-013-0681-6>, 2013.
- Schulz, K., Mikhailyuk, T., Dreßler, M., Leinweber, P., and Karsten, U.: Biological Soil Crusts from coastal dunes at the Baltic Sea: cyanobacterial and algal biodiversity and related soil properties, *Microb. Ecol.*, 71, 178–193, <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0691-7>, 2016.
- Schwierz, C., Köllner-Heck, P., Zenklusen Mutter, E., Bresch, D. N., Vidale, P.-L., Wild, M., and Schär, C.: Modelling European winter wind storm losses in current and future climate, *Clim. Change*, 101, 485–514, <https://doi.org/10.1007/s10584-009-9712-1>, 2010.
- Seitz, S., Nebel, M., Goebes, P., Käppeler, K., Schmidt, K., Shi, X., Song, Z., Webber, C. L., Weber, B., and Scholten, T.: Bryophyte-dominated biological soil crusts mitigate soil erosion in an early successional Chinese subtropical forest, *Biogeosciences*, 14, 5775–5788, <https://doi.org/10.5194/bg-14-5775-2017>, 2017.
- Škaloud, P., Lukešova, A., Malavasi, V., Ryšánek, D., Hřčková, K., and Rindi, F.: Molecular evidence for the polyphyletic origin of low pH adaptation in the genus *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta), *Plant Ecol. Evol.*, 147, 333–345, <https://doi.org/10.5091/plecevo.2014.989>, 2014.
- Starks, T. L., Shubert, L. E., and Trainor, F. R.: Ecology of soil algae: a review, *Phycologia*, 20, 65–80, 1981.
- Starr, R. C. and Zeikus, J. A.: UTEX the culture collection of algae at the University of Texas at Austin, *J. Phycol.*, 29 (Suppl.), 1–106, 1993.
- Szyja, M., Büdel, B., and Colesie, C.: Ecophysiological characterization of early successional biological soil crusts in heavily human-impacted areas, *Biogeosciences*, 15, 1919–1931, <https://doi.org/10.5194/bg-15-1919-2018>, 2018.
- Vinogradova, O. N. and Mikhailyuk, T. I.: Algal flora of the caves and grottoes of the National Nature Park “Podilsky Tovtry” (Ukraine), *Int. J. Algae*, 11, 289–304, <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v11.i3.80>, 2009.
- Weber, B., Büdel, B., and Belnap, J.: Biological soil crusts: an organizing principle in drylands, Springer, Nature, Berlin, 2016.
- Williams, W. J., Eldridge, D. J., and Alchin, B. M.: Grazing and drought reduce cyanobacterial soil crusts in an Australian Acacia woodland, *J. Arid Environ.*, 72, 1064–1075, <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2007.11.017>, 2008.

1.4. Водорості і ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок гіпергалінних відвалів після видобутку поташу (Німеччина)



Article

Uncovering Unique Green Algae and Cyanobacteria Isolated from Biocrusts in Highly Saline Potash Tailing Pile Habitats, Using an Integrative Approach

Veronika Sommer^{1,2}, Tatiana Mikhailyuk³, Karin Glaser¹  and Ulf Karsten^{1,*} 

¹ Institute for Biological Sciences, Applied Ecology and Phycology, University of Rostock, 18059 Rostock, Germany; veronika.sommer@uni-rostock.de (V.S.); karin.glaser@uni-rostock.de (K.G.)

² upi UmweltProjekt Ingenieursgesellschaft mbH, 39576 Stendal, Germany

³ National Academy of Sciences of Ukraine, M.G. Kholodny Institute of Botany, 01601 Kyiv, Ukraine; t-mikhailyuk@ukr.net

* Correspondence: ulf.karsten@uni-rostock.de

Received: 4 September 2020; Accepted: 22 October 2020; Published: 27 October 2020



Abstract: Potash tailing piles caused by fertilizer production shape their surroundings because of the associated salt impact. A previous study in these environments addressed the functional community “biocrust” comprising various micro- and macro-organisms inhabiting the soil surface. In that previous study, biocrust microalgae and cyanobacteria were isolated and morphologically identified amongst an ecological discussion. However, morphological species identification maybe is difficult because of phenotypic plasticity, which might lead to misidentifications. The present study revisited the earlier species list using an integrative approach, including molecular methods. Seventy-six strains were sequenced using the markers small subunit (SSU) rRNA gene and internal transcribed spacer (ITS). Phylogenetic analyses confirmed some morphologically identified species. However, several other strains could only be identified at the genus level. This indicates a high proportion of possibly unknown taxa, underlined by the low congruence of the previous morphological identifications to our results. In general, the integrative approach resulted in more precise species identifications and should be considered as an extension of the previous morphological species list. The majority of taxa found were common in saline habitats, whereas some were more likely to occur in nonsaline environments. Consequently, biocrusts in saline environments of potash tailing piles contain unique microalgae and cyanobacteria that will possibly reveal several new taxa in more detailed future studies and, hence, provide new data on the biodiversity, as well as new candidates for applied research.

Keywords: biocrust; salinity; potash mining; microalgae; cyanobacteria; integrative approach

1. Introduction

Biological soil crusts (biocrusts) are multidimensional communities consisting of various micro- and macro-organisms, which inhabit the first millimeters of the soil [1]. They include microalgae and cyanobacteria, as well as protists, heterotrophic bacteria, and fungi, and in later successional stages, also lichens and mosses might grow [1]. As ecosystem engineers, biocrusts increase the soil stability; alter hydrological cycles; and provide nutrients via primary production, aerial N-fixation, dust trapping, and bio-weathering [2,3]. Biocrusts occur in all climate zones worldwide; they have their greatest impacts where vascular plant growth is limited due to extreme abiotic stressors [2]. In drylands, biocrusts cover large areas, thus creating biodiversity hot spots in these hostile environments [2], and can reach a stable climax state [4]. However, biocrusts are vulnerable against disturbances, such as trampling [5–8], and endangered by climate change [9]. This stresses the relevance of biocrust research,

along with the great interest on their multifunctional ecosystem services in the growing field of applied biocrust research [10–14].

Microalgae and cyanobacteria in biocrusts are well-adapted to their harsh, mainly arid environments [15]. Cyanobacteria and filamentous algae are key organisms in biocrusts and excrete sticky extracellular polysaccharides (EPS). EPS are important in promoting the cohesion of biocrust inhabitants and the connection to soil particles and act as water-holding biomolecules in drought tolerance [16]. Overall, desiccation stress in biocrusts has been intensively studied, with the focus on a variety of organisms such as green algae [17,18] and cyanobacteria [19,20] to address the large-scale ecological aspects [21,22], as well as the (eco-)physiological processes [23,24].

Similarly, the salt tolerance of cyanobacteria [25,26], as well as of algae, in marine habitats [27,28] is well-studied. Cells under saline conditions are exposed to water deprivation analogous to drought conditions but, also, show differences in some physiological processes [25,28]. In contrast to the total absence of water, salt-stressed cells can still be in contact with liquid water yet be subjected to a diminished water potential. The loss of intracellular water due to the high osmotic potential outside the cell can be hindered by inorganic and organic osmolytes. These compatible solutes increase the osmotic potential within the cell and thereby prevent water loss. In addition, the toxic Na^+ ions are exchanged for the nutrient K^+ to maintain the cellular ion balance. Due to their increased production of some commercially relevant secondary metabolites under salt stress, certain microalgae such as *Dunaliella salina* are of interest for large-scale biomass production [29,30]. Hypersaline wastewater from the potash industry can be used for this purpose [31].

Halophilic microbial communities have been addressed in a variety of studies, such as microbial mats in hypersaline lakes [32–34] and lagoonal mats [35,36], as well as benthic communities in solar saltern plants [37–39]. In these hypersaline aquatic habitats, photosynthetic organisms were found in salinities even higher than 30%, such as the green alga *Dunaliella* [40,41] and the cyanobacteria *Geitlerinema*, *Phormidium* and *Komvophoron* [42]. Further, several studies have described the biodiversity of algae and cyanobacteria in saline terrestrial habitats [35,42–53]. Most of them focused on natural saline habitats.

Anthropogenic salinization, however, is increasingly affecting aquatic [54], as well as terrestrial [55,56], ecosystems on a global scale. In Europe, one of the main drivers of anthropogenic salinization is the potash industry for fertilizer production [57]. The valuable components (KCl and MgSO_4) of the mined potash salt are separated from the residue NaCl . Potash tailing piles, as a consequence, consist of highly saline overburden (mostly of NaCl). In central Germany, in particular, potash tailing piles, reaching a height of 200 m, shape the landscape. Rainfall dissolves the deposited salt and washes out highly saline pile wastewaters, which, in one potash tailing pile in Germany, contained dissolved concentrations up to 320 g/L (very close to saturation; predominantly Na^+ and Cl^-) [58]. Without a base seal, this process leads to a salinization of the surrounding ecosystems.

As a result, unique salt-affected ecosystems emerge, inhabited by adapted costal flora and fauna, despite a distance of about 400 km inland from the coast. Halophyte plant communities, with members such as the sea aster (*Tripolium pannonicum*) and glasswort (*Salicornia* sp.), have been well-studied close to these tailing piles [59–61]. However, higher plants occur only in the surroundings of potash tailing piles and do not inhabit the pile body itself, due to the extreme salinity of the overburden. Little is known about biocrusts in the surroundings of such hypersaline potash tailing piles. Eilmus et al. [62] found a rich prokaryotic community directly on the bare material of a German potash tailing pile, whereas our previous study described diverse communities of both cyanobacteria and eukaryotic microalgae in biological soil crusts between the less-saline vegetation line and the hyper-saline bare pile bodies of several potash tailing piles across Germany [63]. In this previous study, we found species numbers comparable to those in less-saline regions, which underlined the significance of research on those specific terrestrial habitats. However, that study was based on morphological observations only. Investigations on biocrust algae in saline terrestrial inland habitats using modern molecular phylogenetic approaches are still rare.

Morphological methods based on light microscopy have a long tradition and continue to be essential for microalgal and cyanobacteria species identification. However, the phenotypic plasticity of unicellular algae due to culture conditions, age, and reproductive stages complicate identifications. In particular, salinity has an impact on the morphology of algal cells [64]. In addition, microalgal and cyanobacteria cells often lack distinct morphological traits, which limits the use of light microscopy for accurate species identification. This limitation often results in a high proportion of identifications only to the family or genus level [65]. Sommer et al. [63], for example, identified only 32% of their microalgal strains from saline potash tailing piles to the species level.

To accurately identify algal strains, an integrative approach should be considered. This approach combines classical morphological methods with modern molecular phylogenetic analyses. It was introduced by Komárek [66] for cyanobacteria, followed by Pröschold and Leliaert [67] for green algae, and has been increasingly used in microalgal [65,68–73], as well as cyanobacterial [35,74–77], research. Some recent reviews stressed the advantages and challenges of this approach [78–81]. Still, some limitations on microalgal and cyanobacteria identification remain, such as a lack of identified sequences in databases; nevertheless, the combination of the mentioned methods highly improves the quality of the species lists, thereby providing precise phylogenetic, and not biodiversity, information.

Revisiting morphologically identified strains with molecular methods can lead to the finding of new species or rare taxa that would have been overlooked by using only light microscopy [65,72,82]. Particularly in extreme habitats, the probability of finding yet undiscovered species is high [83] due to the unique ecological niches inhabited by adapted organisms. In the extreme habitats of potash tailing piles, there might well be a high potential of discovering previously unknown, highly specialized cyanobacteria and microalgae.

The aim of our study was to complement the information on biocrust microalgal and cyanobacterial cultures from the surroundings of saline potash tailing piles as a continuation of the previous morphological observations [63]. Therefore, common conserved markers for the small subunit ribosomal ribonucleic acid (SSU rRNA) gene, as well as the variable internal transcribed spacer (ITS), were used to elucidate the identity and phylogenetic classification of these green algae and cyanobacteria. Using the integrative approach, we assumed that we would be able to generate more detailed phylogenetic information compared to the morphological observations alone.

2. Materials and Methods

2.1. Algal and Cyanobacteria Isolates and Their Maintenance

In total, 76 original strains were analyzed in this study. A total of 66 strains, including 52 green algae and 14 cyanobacteria strains isolated from the surroundings of potash tailing piles in Germany, were published earlier. This paper included the respective site descriptions, samplings, and isolation procedures [63]. In addition, ten unpublished green algae strains isolated from two of the sampling sites (TT and NN) of the previous publication [63], as well as from another location at the Teutschenthal tailing piles (TTF, Figure 1), were included in this study. The latter site was situated in the nearest environment to the tailing piles in an abandoned lignite mine (Figure 1). Rainwater dissolves some salt from the tailing pile. These strongly saline brines frequently flood the former mining area. Thin biocrusts were found between the brine channels and the bordering vegetation (Figure 1c). The sampling procedure and isolation of the unialgal strains were performed as described previously [63].



Figure 1. The potash tailing pile in Teutschenthal, Germany. (a) The plain in front of the tailing pile represents an abandoned lignite mine, which is regularly flooded by highly saline tailing pile leachate. (b) Biocrusts close to the Teutschenthal tailing pile between the vegetation and tailing pile body and (c) between the vegetation and tailing pile leachate water channels.

Unialgal cultures were maintained on solidified 3N-BBM+V [84] and cyanobacteria cultures on BG-11 [85], both media enriched with 3% NaCl. Cultures were kept at 20 °C with a light/dark cycle of 16:8 h with 30- μm photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Osram Lumilux Cool White lamps L36W/840, Munich, Germany). Isolates were morphologically evaluated using an Olympus BX51 light microscope with Nomarski DIC optics (Olympus Ltd., Hamburg, Germany), and photomicrographs were taken with the digital camera Olympus UC30 attached to the microscope and processed with the cellSense Entry imaging software (v. 2.1, Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany). The morphological species list of green algae and cyanobacteria isolates from potash tailing pile areas was published by Sommer et al. [63].

2.2. DNA Extraction, PCR, and Sequencing

The SSU region, as well as the ITS1-5.8S-ITS2 region (hereafter, ITS-1,2 regions), and in particular groups, the ITS-2 region for green algae and the SSU-LSU rRNA (large subunit rRNA) intergenic spacer for cyanobacteria were used as molecular markers. The cells of green algae and cyanobacteria were disrupted by shaking with 1.25–1.55-mm glass beads in combination with a threefold freezing and thawing cycle (liquid N, heating block 65 °C). The DNA was extracted with the NucleoSpin Plant II mini kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) following the instructions. PCR was performed as described by Mikhailiyuk et al. [86] using the primers EAF3 and ITS055R for green algae [87,88] and SSU-4-forw and ptLSU C-D-rev for cyanobacteria [89]. Sanger sequencing was conducted by GATC Sequencing Services (Eurofins Genomics Germany, Ebersberg, Germany) using the primers EAF3 and 1400R [87], N920R [88], 536R [90], 920F and 1400F [91], and GF and GR [92] for green algae and SSU-4-forw, Wil 6, Wil 12, Wil 14, Wil 5, Wil 9, Wil 16, and ptLSU C-D-rev [89,93] for cyanobacteria.

2.3. Phylogenetic Analyses

Bioinformatics steps were performed using the software Geneious 8.1.9 (Biomatters Ltd., v. 8.1.9, Auckland, New Zealand), if not stated differently. The sequences of the isolates were compared to identified taxa in the Gene Bank database using BLASTn [94]. Top BLAST hits, as well as some additional sequences, were downloaded (Supplementary Table S1) and aligned with the original isolates. The MUSCLE algorithm [95] was used with a maximum of eight iterations. The alignments were cut and checked for errors manually. Bayesian phylogenetic trees were calculated with the MrBayes [96] add-in by using the GTR+G+I evolutionary model run for 5,000,000 generations and taking the trees every 500 generations. Of the four runs of the Markov chain Monte Carlo, two were run separately, with split frequencies at the end of the runs below 0.01. Maximum-likelihood (ML) analyses were performed to verify the Bayesian results, using GARLI [97] with 1000 bootstrap replicates. Phylogenetic consensus trees were edited in the MEGA-X 10.1 software [98] and finalized with PowerPoint (Microsoft Office, Standard 2013, Redmond, WA, USA).

Taxa were named after current taxonomically accepted species or genus names stated in AlgaeBase [99] using the respective references (Table 1). Subsequently, the original habitats of all strains were classified as follows: aquatic (frequent presence of water, e.g., marine, freshwater, brackish water, bog water; both planktonic and benthic, or in microbial mats); terrestrial (in the absence of permanent water, e.g., on soil, bark, leaves, stones, facades, in biocrusts, or other nonaquatic biofilms); and endophytic/phyco-biontic (e.g., phycobionts in lichens or endophytes in macrophytes, hereafter endophytic). The symbols are colored according to the salinity of the habitats (blue = nonsaline, e.g., freshwater and soil; orange = saline, e.g., marine, brackish and saline soil; black = other extreme conditions, e.g., acidity, heat, and radioactivity; and grey: unknown).

3. Results

3.1. SSU rRNA Gene Phylogeny

The 76 original strains were distributed among the Chlorophyta (62) and cyanobacteria (14). All green-algal strains belonged to the phylum Chlorophyta; the phylum Streptophyta was absent. Of the Chlorophyta, 32% (20 isolates) fell into the Chlorophyceae. The majority of these original strains (11 isolates) were placed in the order Chlamydomonadales (Figure 2). We found lineages in the Moewusinia (genus *Alvikia* and two separate lineages close to the genera *Spongiococcum/Actinochloris* and *Axilosphaera/Eubrownia*), Chlorogonia (separate lineage close to *Chlorogonium*), and Chloromonadina (*Chloromonas*), as well as an independent lineage formed by the genus *Borodinellopsis*. In the second order present, the Sphaeropleales (nine isolates, 14%; Figure 3), the strains clustered in the lineages formed by the genera *Bracteacoccus* and *Tetrademus*.

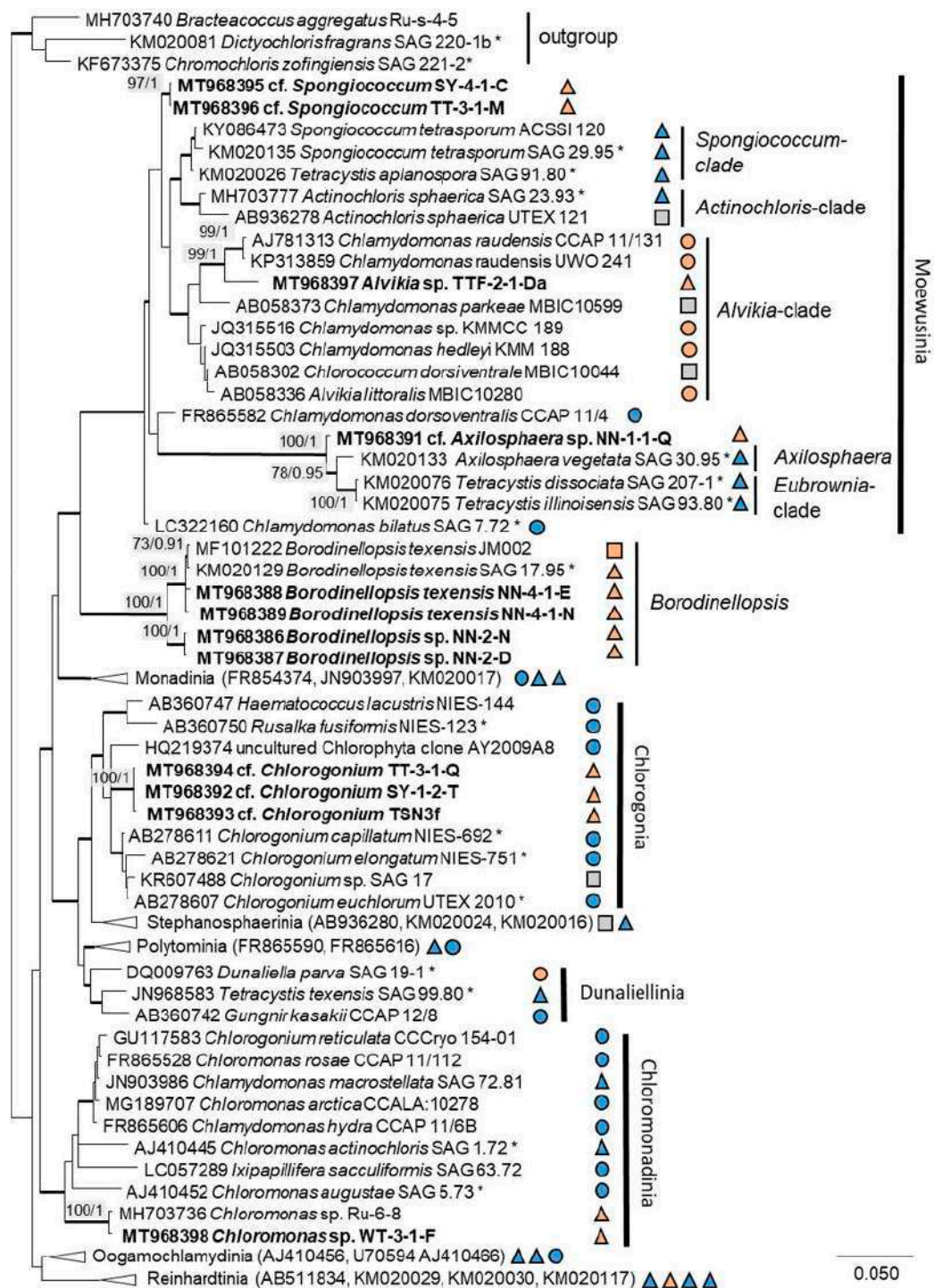


Figure 2. Molecular phylogeny of the Chlamydomonadales based on small subunit ribosomal ribonucleic acid (SSU rRNA) gene sequencing. The phylogenetic tree was calculated by the Bayesian method, including posterior probabilities (PP) with additional maximum likelihood bootstrap values (BP); branches are supported by both methods in bold (BP > 60% and PP > 0.9). Authentic strains were marked with an asterisk, original strains from this study in bold. Habitats of the strains were classified according to habitat type (Δ terrestrial = absence of permanent water, o aquatic = presence of water, and □ unknown) and saline (▲●■); nonsaline (▲●■); and unknown (□) habitats.

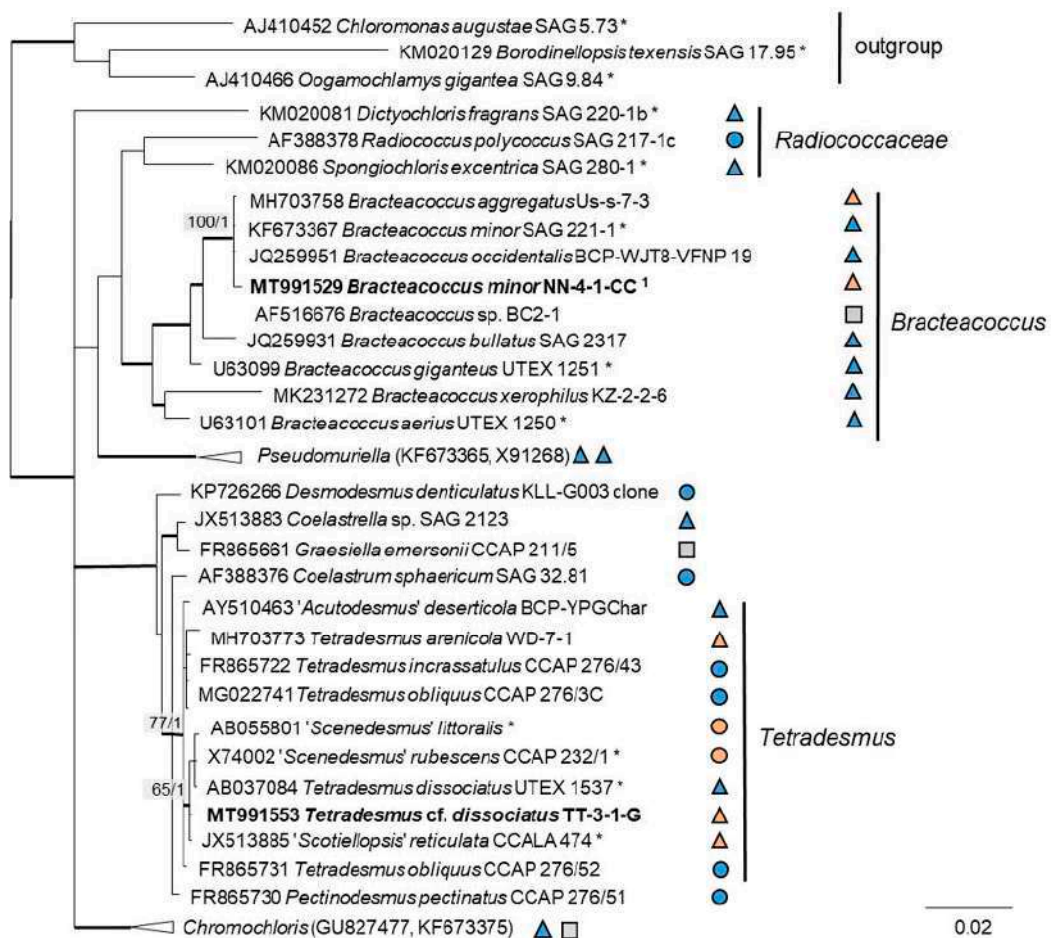


Figure 3. Molecular phylogeny of the Sphaeropleales based on SSU rRNA gene sequencing. The phylogenetic tree was calculated by the Bayesian method, including posterior probabilities (PP) with additional maximum likelihood bootstrap values (BP); branches are supported by both methods in bold (BP > 60% and PP > 0.9). Authentic strains were marked with an asterisk, original strains from this study in bold. Habitats of the strains were classified according to habitat type (Δ terrestrial = absence of permanent water, o aquatic = presence of water, and \square unknown) and saline (Δ \circ); nonsaline (Δ \bullet); and unknown (\square) habitats. ¹ Identical to *Bracteacoccus minor* NN-4-1-CC (MT991529), NN-4-1-H (MT991530), NN-4-1-D2 (MT968390), TTF-1-1-M (MT991533), TTF-2-1-A (MT991534), and TTF-2-1-J (MT991535).

Twenty-two percent (14 isolates) of the original strains belonging to Chlorophyta were distributed among the Ulvophyceae (Figure 4). They clustered in the order Ulvales, *Desmochloris*-clade (genera *Desmochloris* and *Halochlorococcum*), as well as in the order Ulotrichales, *Planophila*-clade (genus *Planophila*) and *Acrosiphonia*-clade (a separate lineage close to the clade with "*Ulothrix*" and *Chlorothrix* species). The majority of strains (45% of the Chlorophyta strains) fell in the Trebouxiophyceae (28 isolates, Figure 5) and were distributed among the genera *Chloroidium*, *Watanabea*, *Diplospira*, *Pseudostichococcus*, *Pseudochlorella*, *Chlorella*, and *Nannochloris*. Fourteen percent (two isolates) of the cyanobacteria isolates (Figure 6) clustered in the Nostocales (genus *Cyanocohniella*), and 86% (12 isolates) fell in the Synechococcales (genus *Nodosilinea* and an unresolved clade labeled "*Phormidesmis*").

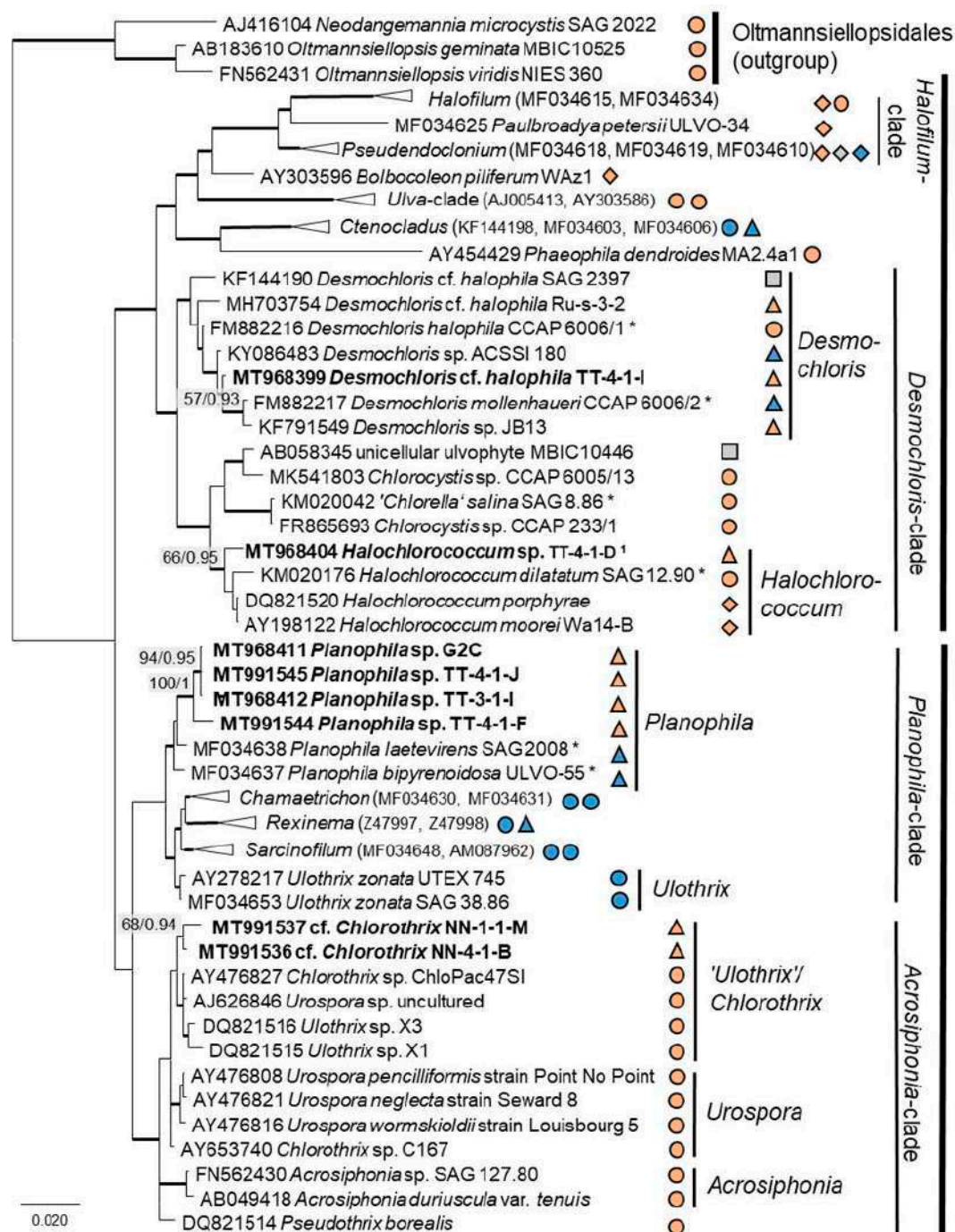


Figure 4. Molecular phylogeny of the Ulvophyceae based on SSU rRNA gene sequencing. The phylogenetic tree was calculated by the Bayesian method, including posterior probabilities (PP) with additional maximum likelihood bootstrap values (BP); branches are supported by both methods in bold (BP > 60% and PP > 0.9). Authentic strains were marked with an asterisk, original strains from this study in bold. Habitats of the strains were classified according to habitat type (Δ terrestrial = absence of permanent water, \circ aquatic = presence of water, \diamond phycobiontic or endophytic, and \square unknown) and saline (\triangle \circ \diamond); nonsaline (\triangle \bullet \diamond), and unknown (\square \diamond) habitats. ¹ Identical to *Halochlorococcum* sp. TT-4-1-M (MT968405), TT-4-1-O (MT968406), NN-4-1-Q (MT968401), NN-4-1-S (MT968402), and NN-4-1-T (MT968403).

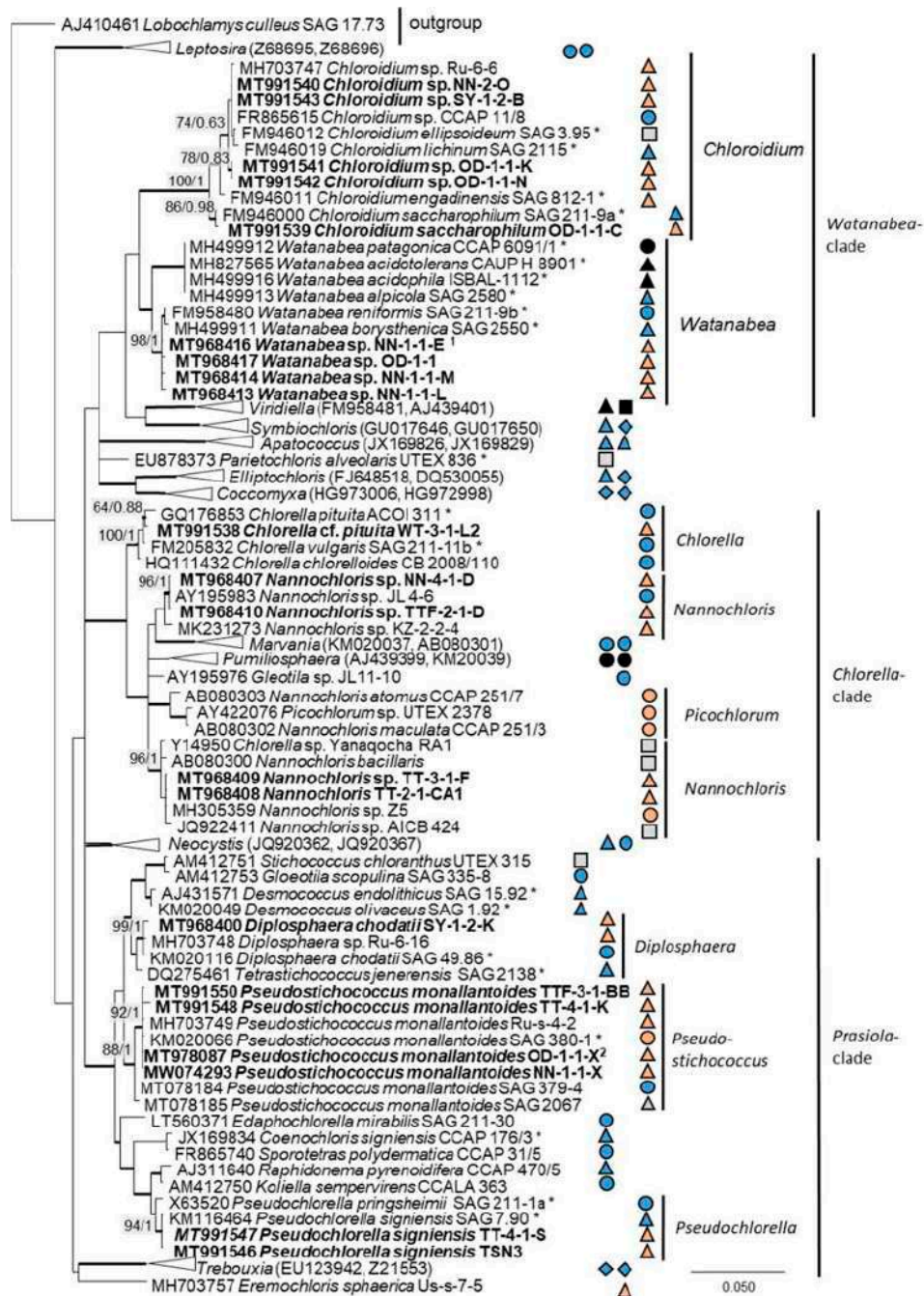


Figure 5. Molecular phylogeny of the Trebouxiophyceae based on SSU rRNA gene sequencing. The phylogenetic tree was calculated by the Bayesian method, including posterior probabilities (PP) with additional maximum likelihood bootstrap values (BP); branches are supported by both methods in bold (BP > 60% and PP > 0.9). Authentic strains were marked with an asterisk, original strains from this study in bold. Habitats of the strains were classified according to habitat type (Δ terrestrial = absence of permanent water, ○ aquatic = presence of water, ◇ phycobiontic or endophytic, and □ unknown) and saline (▲●); nonsaline (▲●◆); other extremes (▲●■ e.g., acidity); and unknown (□△) habitats. ¹ Identical to *Watanabea* sp. NN-1-2-X1B (MT968415) and ² identical to *Pseudostichococcus monallantoides* SY-1-2-P (MT991549), WT-3-1-A (MW074294), WT-3-1-H (MT991551), and WT-3-1-P1 (MT991552).

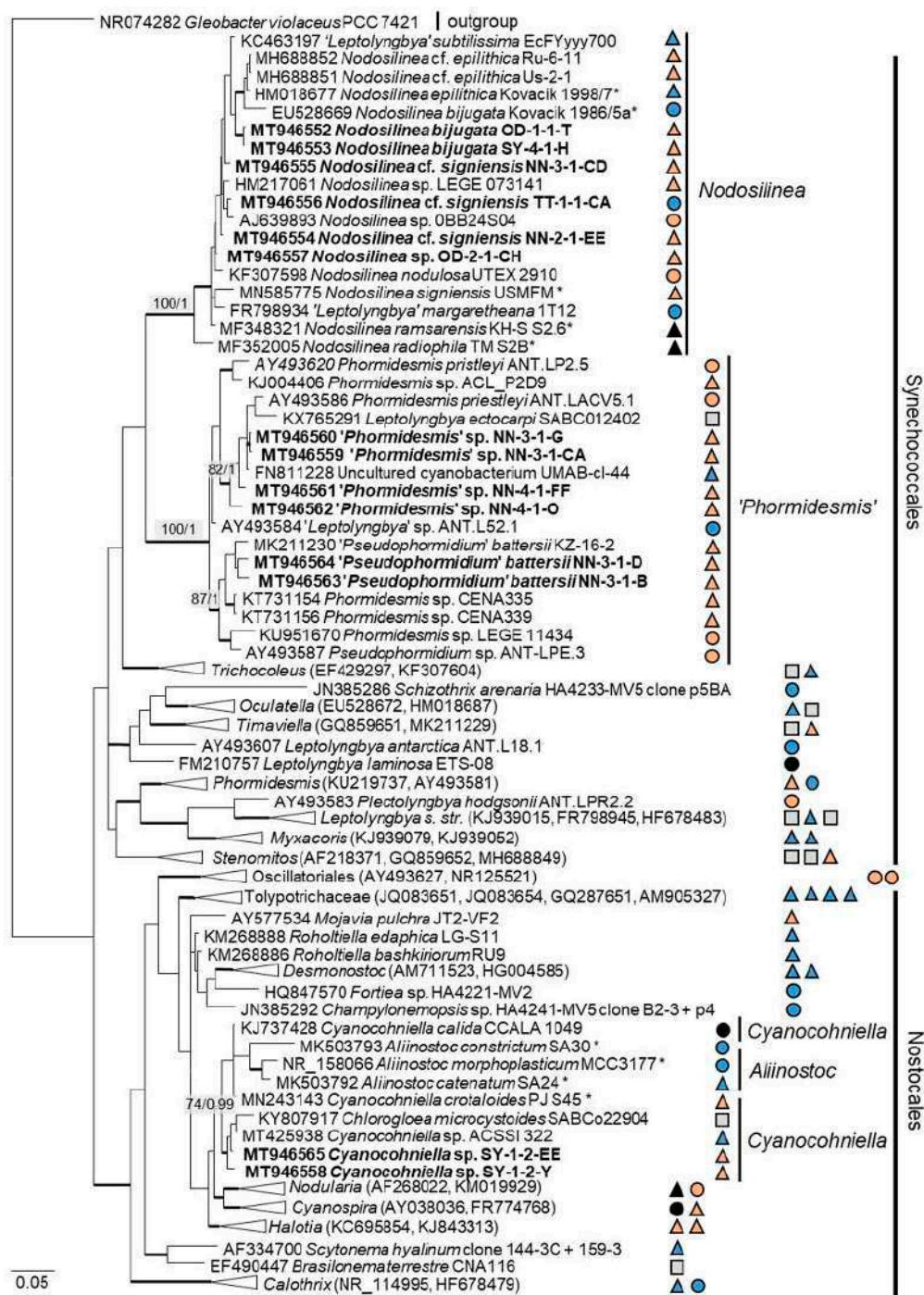


Figure 6. Molecular phylogeny of the cyanobacteria based on SSU rRNA gene sequencing. The phylogenetic tree was calculated by the Bayesian method, including posterior probabilities (PP) with additional maximum likelihood bootstrap values (BP); branches are supported by both methods in bold (BP > 60% and PP > 0.9). Authentic strains were marked with an asterisk, original strains from this study in bold. Habitats of the strains were classified according to habitat type (Δ terrestrial = absence of permanent water, \circ aquatic = presence of water, \diamond phycobiontic or endophytic, and \square unknown) and saline (Δ \circ); nonsaline (Δ \circ); other extremes (\blacktriangle \bullet \blacksquare e.g., radioactivity); and unknown (\square Δ) habitats.

3.2. ITS Phylogeny

In order to define the original strains more precisely (to the species level), ITS-1,2 phylogenies of several Chlorophyta and cyanobacteria genera were calculated. Some original strains of the Sphaeropleales, Chlorophyceae, and Trebouxiophyceae clearly clustered in clades formed by known species: *Bracteacoccus minor* (Figure 7a), *Pseudostichococcus monallantoides*, *Diplosphaera chodatii* (Figure 8a), *Chloroidium saccharophilum* (Figure 9a), and *Pseudochlorella signiensis* (Figure 9c). A *Tetradesmus* strain clustered within the strongly supported group formed by several species perhaps representing the same taxon ("*Scenedesmus*" *rubescens*, "*Scotiellopsis*" *reticulata*, and *Tetradesmus dissociatus* (Figure 7b).

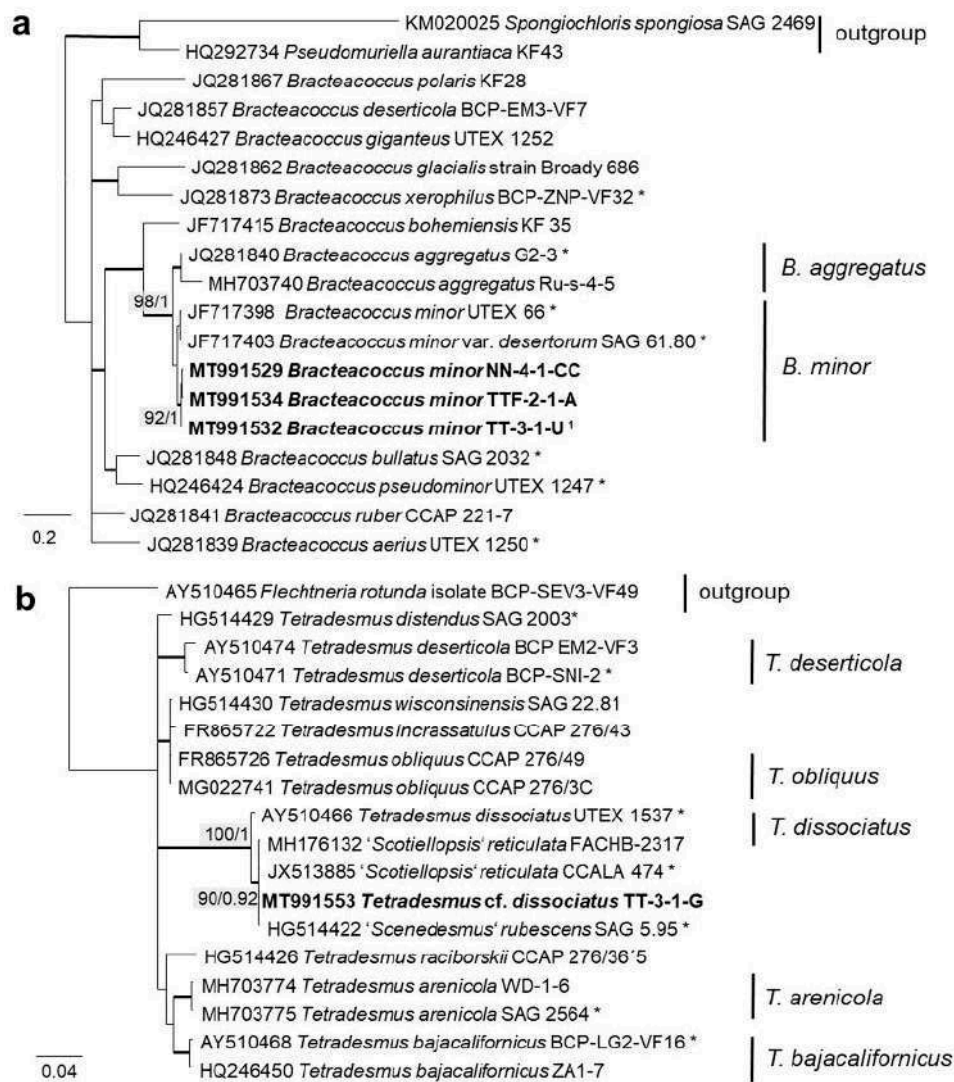


Figure 7. Molecular phylogeny of Sphaeropleales genera based on ITS-1,2 sequencing. (a) *Bracteacoccus* (only ITS-2) and (b) *Tetradesmus*. The phylogenetic tree was calculated by the Bayesian method, including posterior probabilities (PP) with additional maximum likelihood bootstrap values (BP); branches are supported by both methods in bold (BP > 60% and PP > 0.9). Authentic strains marked with an asterisk, original strains from this study in bold. ¹ Identical to *Bracteacoccus minor* TTF-1-1-M (MT991533), TTF-2-1-J (MT991535), TT-3-1-J (MT991531), NN-4-1-D2 (MT968390), and NN-4-1-H (MT991530).

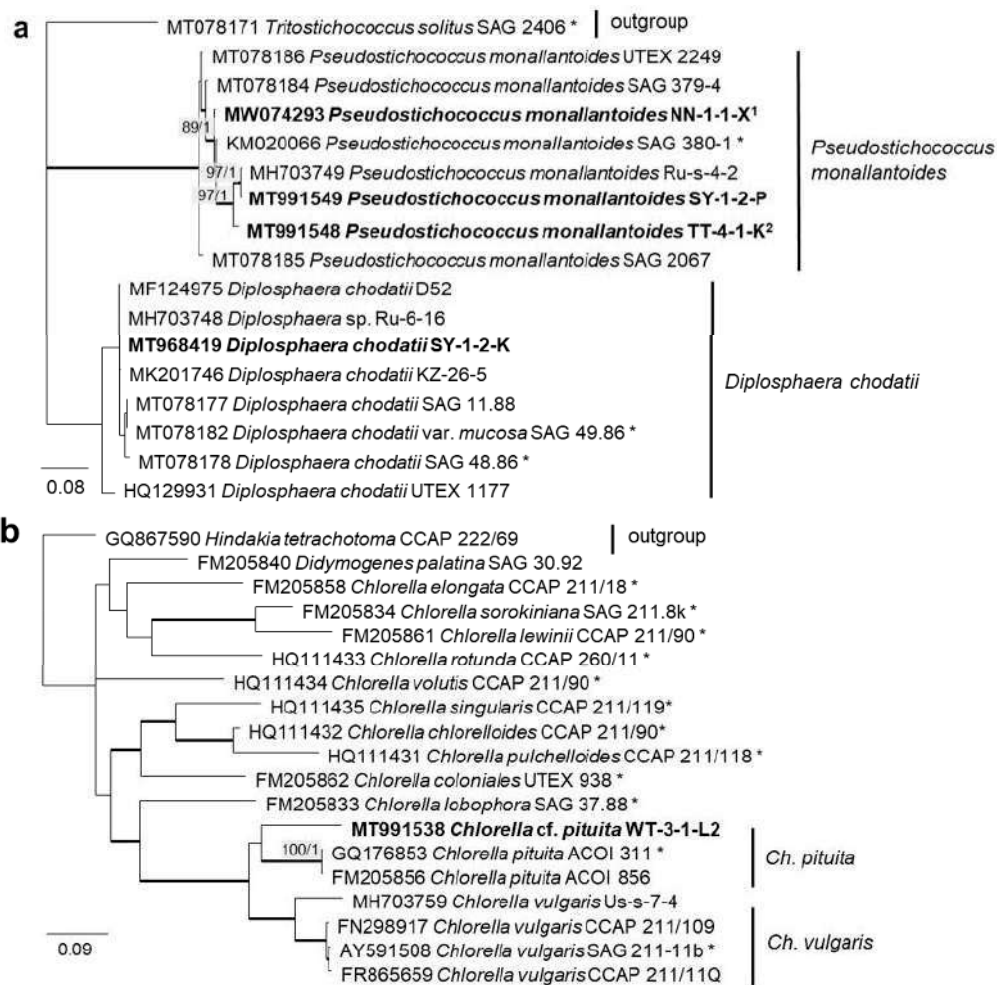


Figure 8. Molecular phylogeny of Trebouxiophyceae genera based on ITS-1,2 sequencing. (a) *Pseudostichococcus* and *Diplosphaera* and (b) *Chlorella*. The phylogenetic tree was calculated by the Bayesian method, including posterior probabilities (PP) with additional maximum likelihood bootstrap values (BP); branches are supported by both methods in bold (BP >60% and PP > 0.9). Authentic strains were marked with an asterisk, original strains from this study in bold. ¹ Identical to *Pseudostichococcus monallantoides* WT-3-1-H (MT991551) and WT-3-1-P1 (MT991552). ² Identical to *Pseudostichococcus monallantoides* TTF-2-1-BB (MT991550).

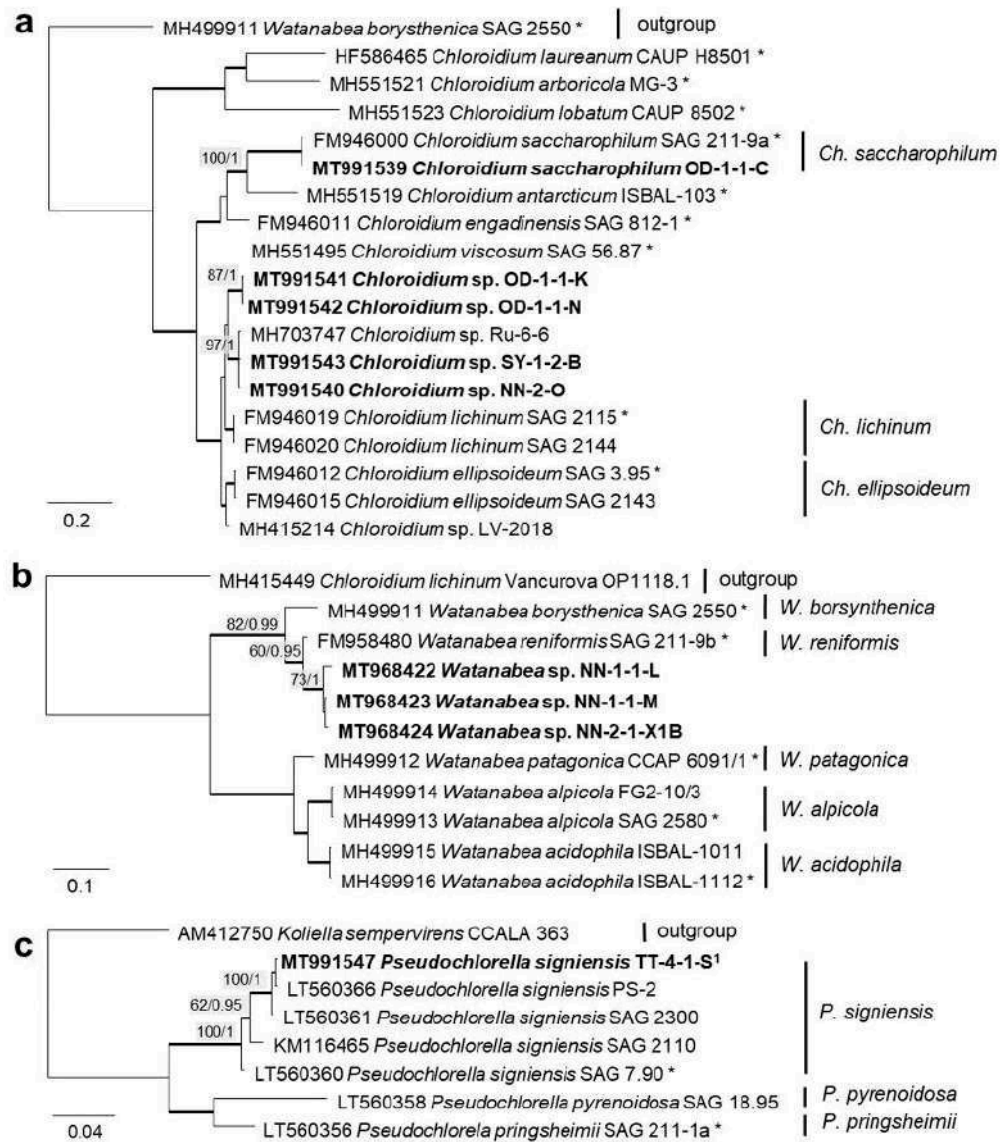


Figure 9. Molecular phylogeny of the Trebouxiophyceae genera based on ITS-1,2 sequencing (2). (a) *Chloroidium*, (b) *Watanabea*, and (c) *Pseudochlorella*. The phylogenetic tree was calculated by the Bayesian method, including posterior probabilities (PP) with additional maximum likelihood bootstrap values (BP); branches are supported by both methods in bold (BP > 60% and PP > 0.9). Authentic strains were marked with an asterisk, original strains from this study in bold. ¹ Identical to *Pseudochlorella signiensis* TSN1 (MT968421) and TSN3 (MT991546).

Some original strains clustered with strains of known species but formed distant sister lineages to the authentic strains possibly representing other taxa: *Chlorella* cf. *pituuta* (Figure 8b) and *Desmochloris* cf. *halophila* (Figure 10b). Many other original strains were placed in separate lineages from the reference strains of known species and may represent still unknown species. This was the case in the Trebouxiophyceae: *Chloroidium* (the closest species was *C. lichinum*, Figure 9a) and *Watanabea* (closest species *W. reniformis*, Figure 9b), as well as the Ulvophyceae: *Planophila* (the closest species was *P. laetevirens*, Figure 10a). In the *Acrosiphonia*-clade of the Ulvophyceae, two original strains (cf. *Chlorothrix*) formed a strongly distinct separate branch without closely related reference strains, which may represent a new genus (Figure 10c).

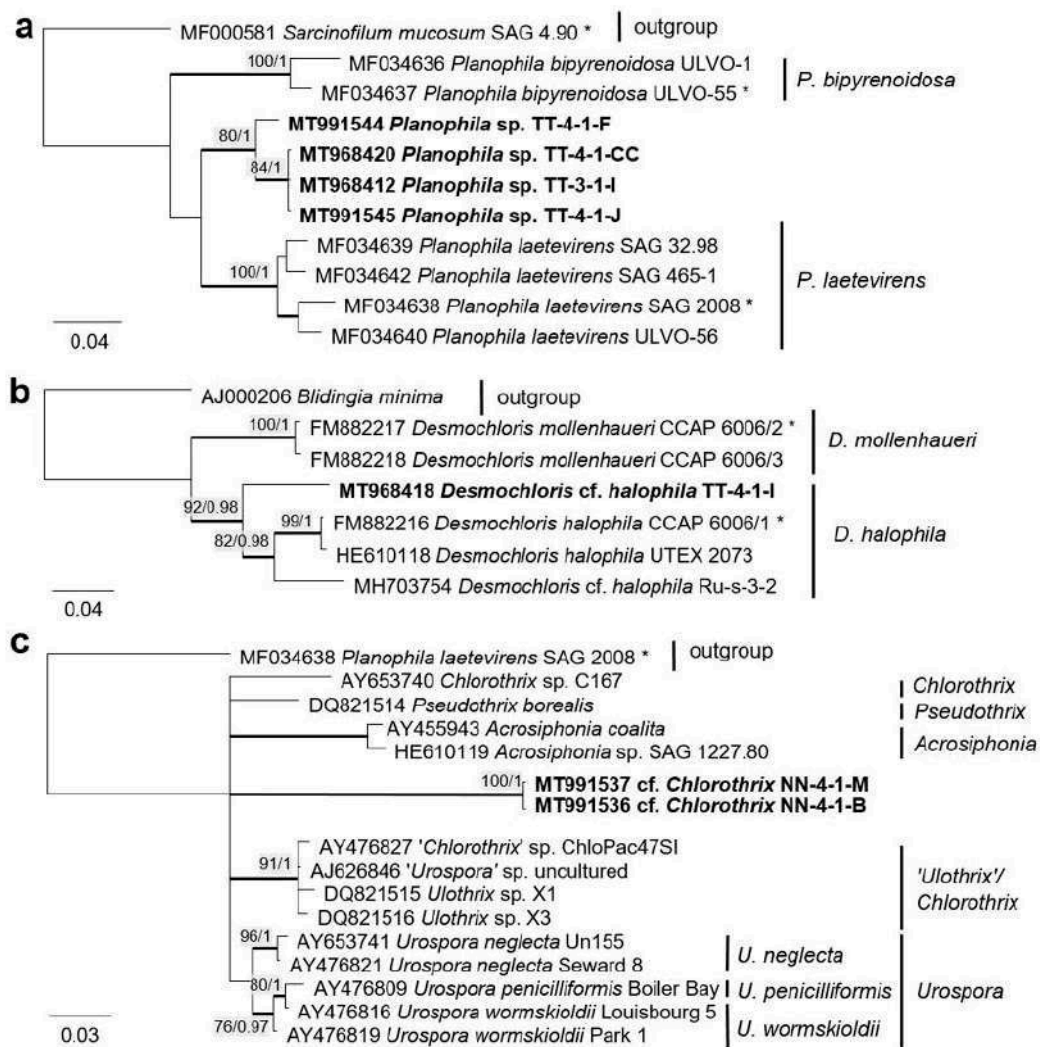


Figure 10. Molecular phylogeny of selected genera of the Ulvophyceae based on ITS-1,2 sequencing. (a) *Planophila*, (b) *Desmochloris*, and (c) *Acrosiphonia*-clade. The phylogenetic tree was calculated by the Bayesian method, including posterior probabilities (PP) with additional maximum likelihood bootstrap values (BP); branches are supported by both methods in bold (BP > 60% and PP > 0.9). Authentic strains marked with an asterisk, original strains from this study in bold.

The combined SSU rRNA and SSU-LSU ITS phylogeny of the genus *Nodosilinea* (Synechococcales, cyanobacteria, Figure 11b) showed that two original strains clearly clustered with the species *N. bijugata*; the other four strains formed lineages close to the species *Nodosilinea signiensis* and the unidentified strain *Nodosilinea* KIOST-1. The SSU-LSU ITS phylogeny of a Nostocales isolate showed closeness to the *Cyanocohniella* and *Aliinostoc* species, rendering a paraphyletic position of *Cyanocohniella* (Figure 11a).

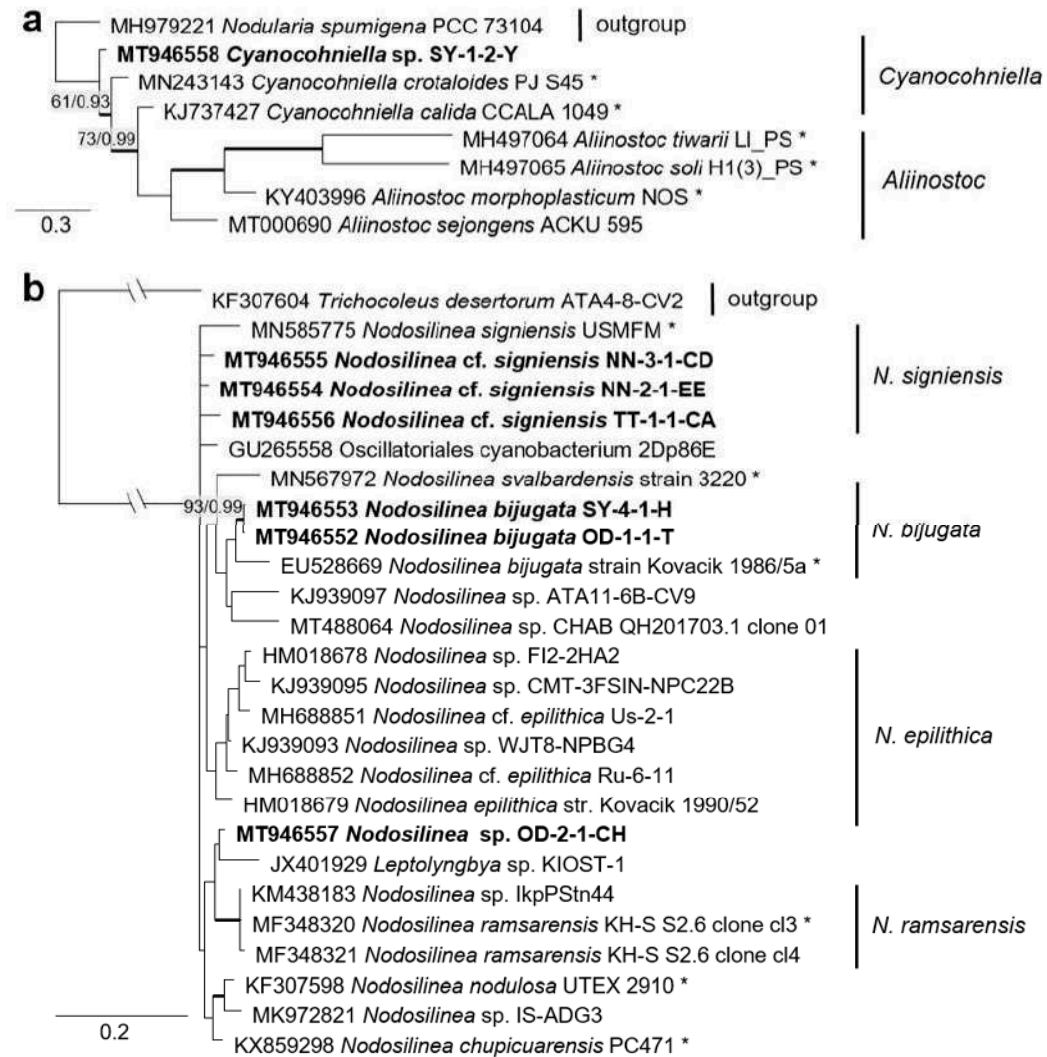


Figure 11. Molecular phylogeny of selected genera of the cyanobacteria. (a) *Cyanocohniella* based on SSU-LSU ITS sequencing and (b) *Nodosilinea* based on combined SSU and SSU-LSU ITS sequencing. The phylogenetic tree was calculated by the Bayesian method, including posterior probabilities (PP) with additional maximum likelihood bootstrap values (BP); branches are supported by both methods in bold (BP > 60% and PP > 0.9). Authentic strains marked with an asterisk, original strains of this study in bold.

3.3. Morphological Observations

The morphology of the original strains was examined and is presented on Figures 12–18. Forty strains were unambiguously identified to the species level using morphological characters solely. Five strains were tentatively identified because of unclear morphological characters or differences from morphological diagnoses of some species. Thirty-one strains were identified only to the genus level or higher because of morphological inconsistencies with known species or the absence of clear morphological characters. The list of these morphological species is included in Table 1 and has been published previously [63].

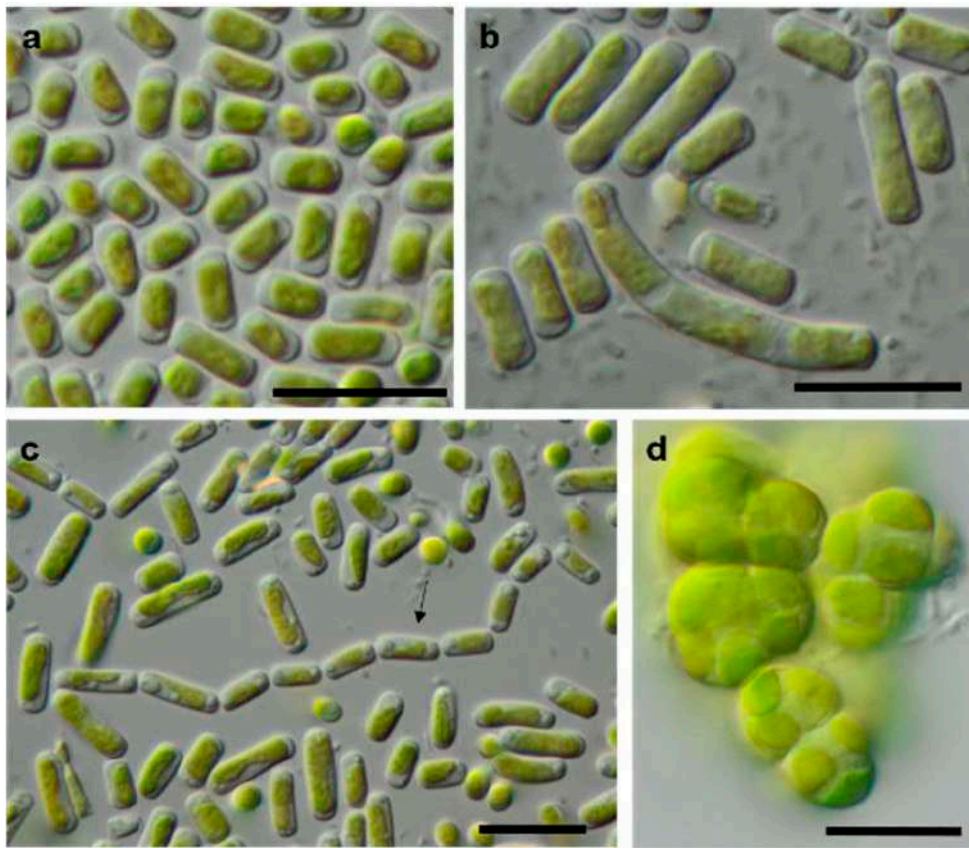


Figure 12. Photomicrographs of Trebouxiophyceae isolates. (a,c): *Pseudostichococcus monallantoides* WT-3-1-A (a) young cells and (c) mature cells forming a filament (arrow)), (b) *Pseudostichococcus monallantoides* SY-1-2-X, and (d) *Diplosphaera chodatii* SY-1-2-K with cubic cell packages. Scale bars: 10 μm .

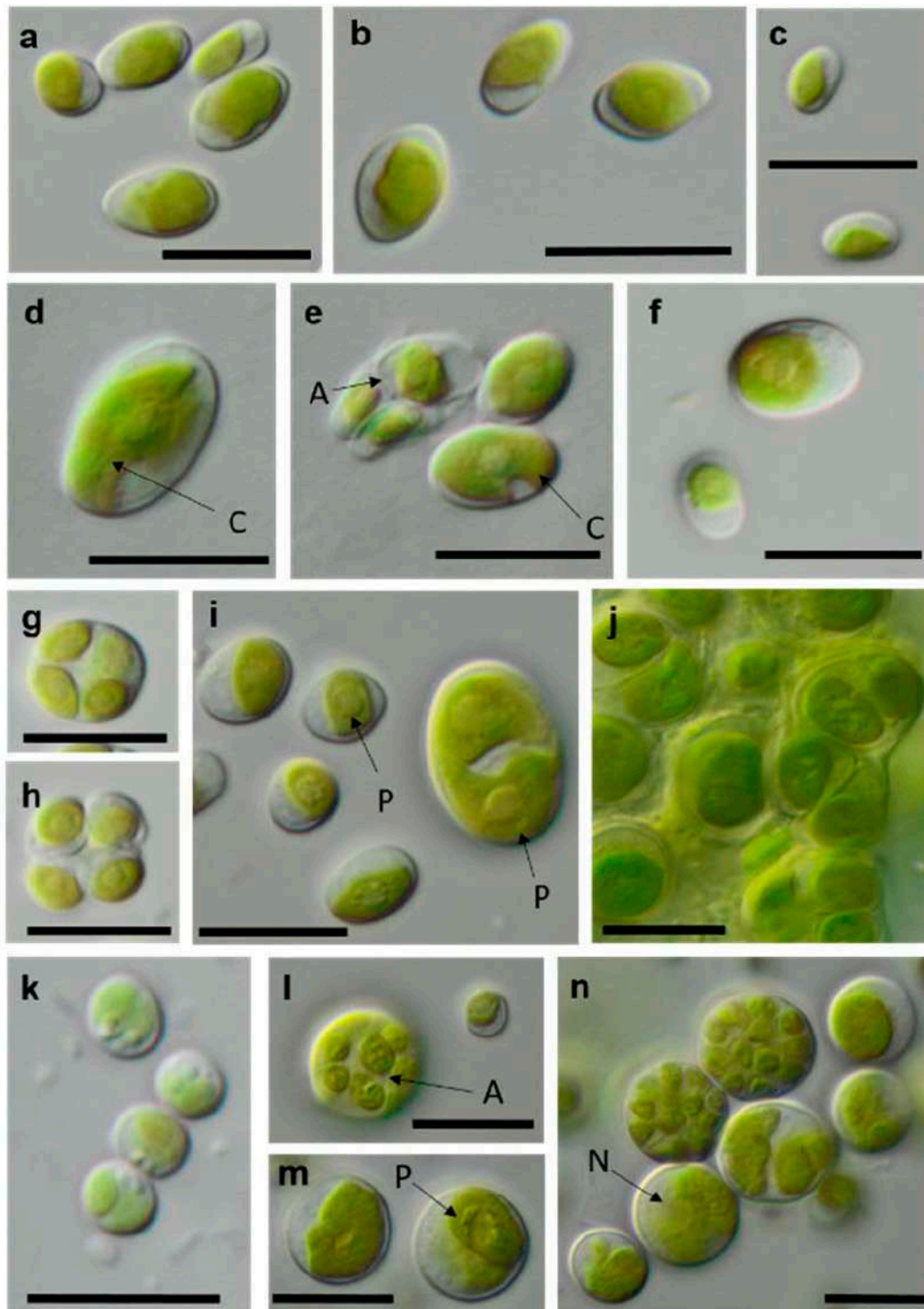


Figure 13. Photomicrographs of Trebouxiophyceae isolates (2). (a–c) *Chloroidium saccharophilum* OD-1-1-C with a smooth chloroplast; (d,e) *Chloroidium* sp. OD-1-1-K with lobed chloroplast (d) mature cell, (e) autospore, and mature cells; (f–j) *Pseudochlorella signiensis* TSN-1 (f) young cells, (g) autosporangium, (h) autospores, and (i) cells with sharp pyrenoids; (j) mature cells in cell aggregate; (k) *Nannochloris* sp. TT-3-1-F; and (l–n) *Watanabea* sp. NN-1-1-E (l) autosporangium, (m) mature cells with parietal chloroplast, and prominent pyrenoid. Arrow labels: A = autospore, N = nucleus, and P = pyrenoid. Scale bars: 10 μ m.

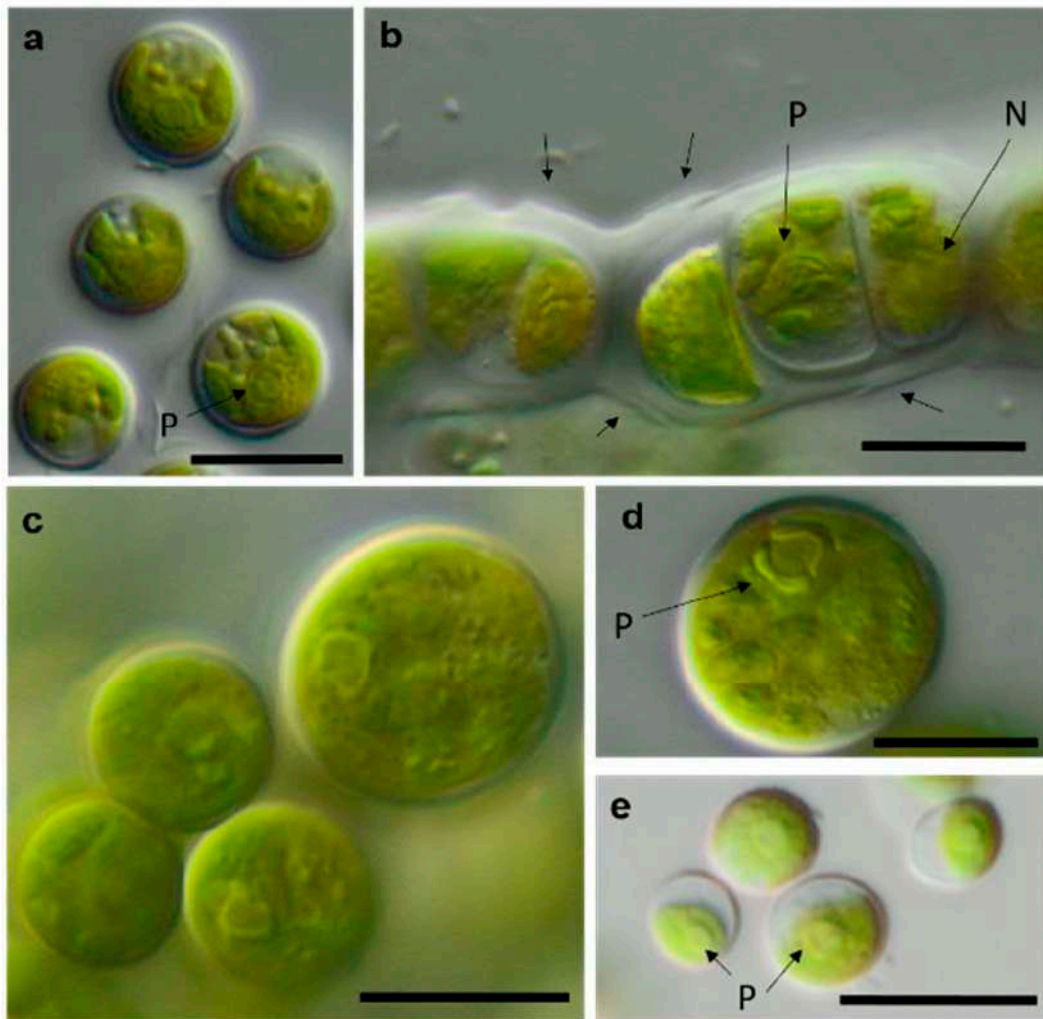


Figure 14. Photomicrographs of Ulvophyceae isolates. (a) *Desmochloris* cf. *halophila* TT-4-1-I, (b) cf. *Chlorothrix* NN-1-1-M a corrugated cell wall, (c,d) *Halochlorococcum* sp. TT-4-1-O (d) single cell with lateral pyrenoid surrounded by two starch grains, and (e): *Planophila* sp. G2C with an unlobed chloroplast and one pyrenoid. Arrow labels: N = nucleus and P = pyrenoid. Scale bars: 10 μm .

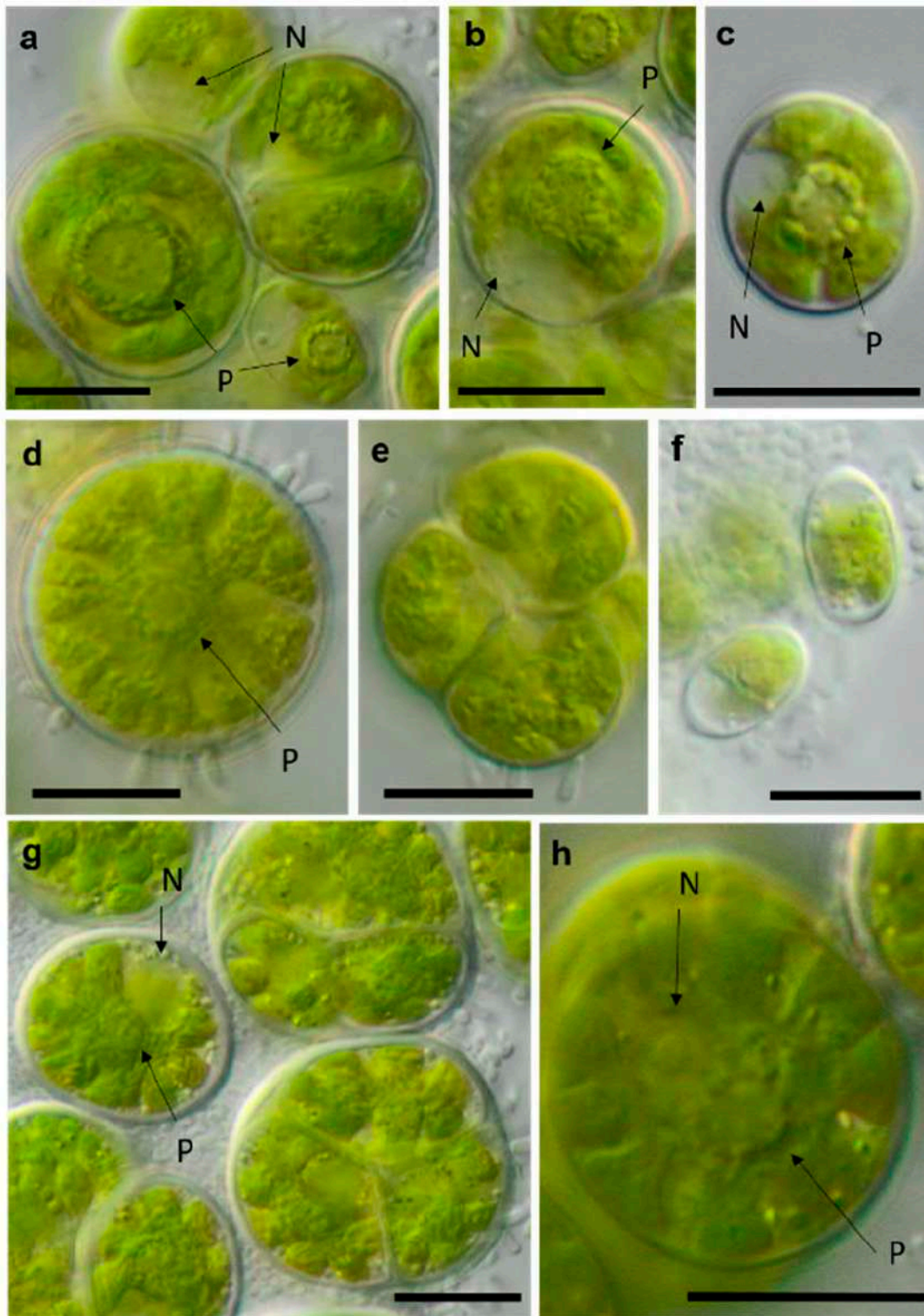


Figure 15. Photomicrographs of Chlamydomonadales isolates. (a,b) cf. *Spongiococcum* TT-3-1-M; (c–e) *Borodinellopsis* sp. NN-2-D (c) juvenile cell and (d) mature cell with lobed chloroplast; and (f–h) *Borodinellopsis texensis* NN-4-1-E (f) zoospores, (h) single cell with prominent nucleus, and one pyrenoid surrounded by several fine starch grains. Arrow labels: N = nucleus and P = pyrenoid. Scale bars: 10 μm.

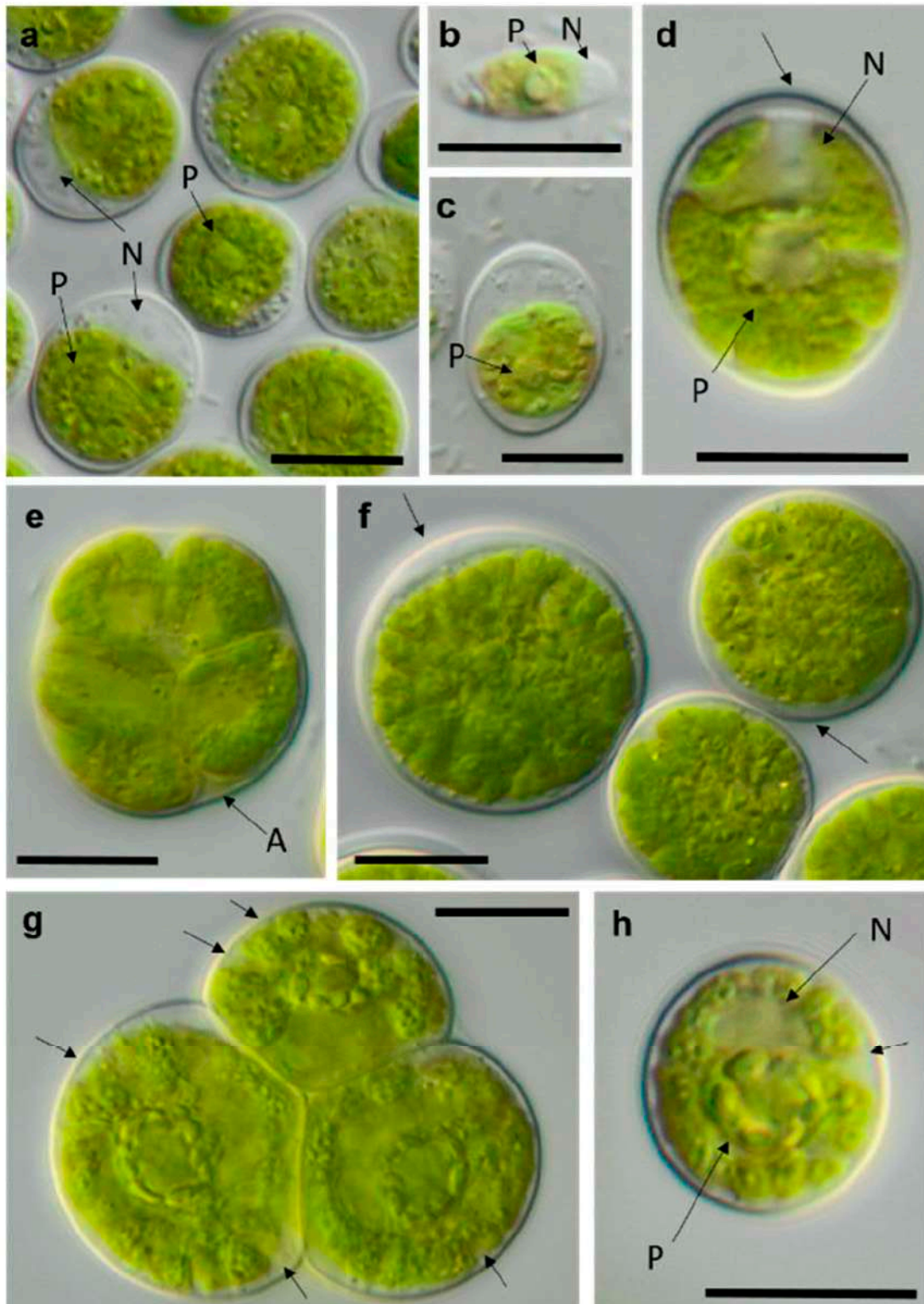


Figure 16. Photomicrographs of Chlamydomonadales isolates (2). (a–c) cf. *Chlorogonium* SY-1-2-T (a) mature cells and (b) zoospore; (d–f) *Chloromonas* sp. WT-3-1-F (d) young cell, (e) zoosporangium, and (f) mature cell with apical cell wall bulge (arrow); and (g,h) cf. *Axilosphaera* NN-1-1-Q, arrows indicating slightly open spaces between chloroplast lobes (g) adult cells in tetrad and (h) young cell. Arrow labels: N = nucleus and P = pyrenoid. Scale bars: 10 µm.

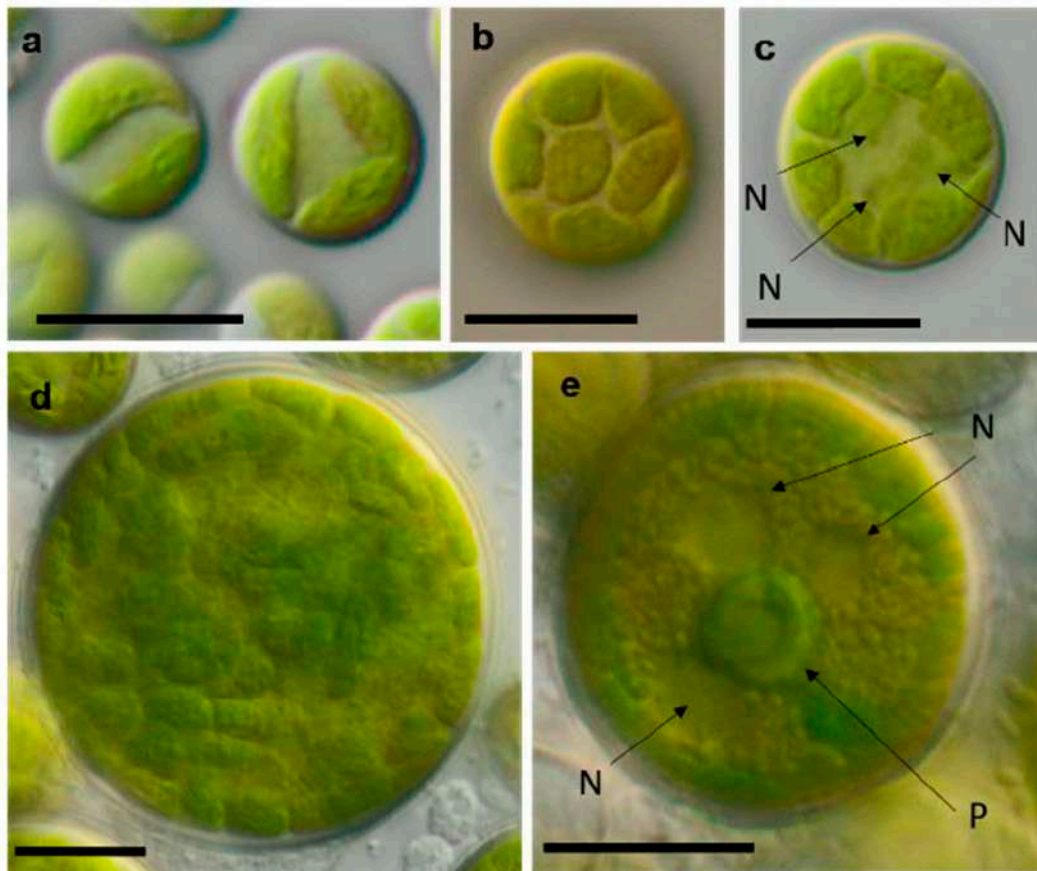


Figure 17. Photomicrographs of Sphaeropleales isolates. (a–d) *Bracteaococcus minor* (a) young cells, TTF-2-1-M and (b,c) TTF-2-1-A (b) surface view of disc-shaped chloroplasts; (c) several nuclei are visible in the cell; (d) mature cell with multiple chloroplasts, NN-4-1-CC, (e) and *Tetradesmus* cf. *dissociatus* TT-3-1-G, a large mature cell before division containing several nuclei and a central pyrenoid. Arrow labels: N = nucleus and P = pyrenoid. Scale bars: 10 μ m.

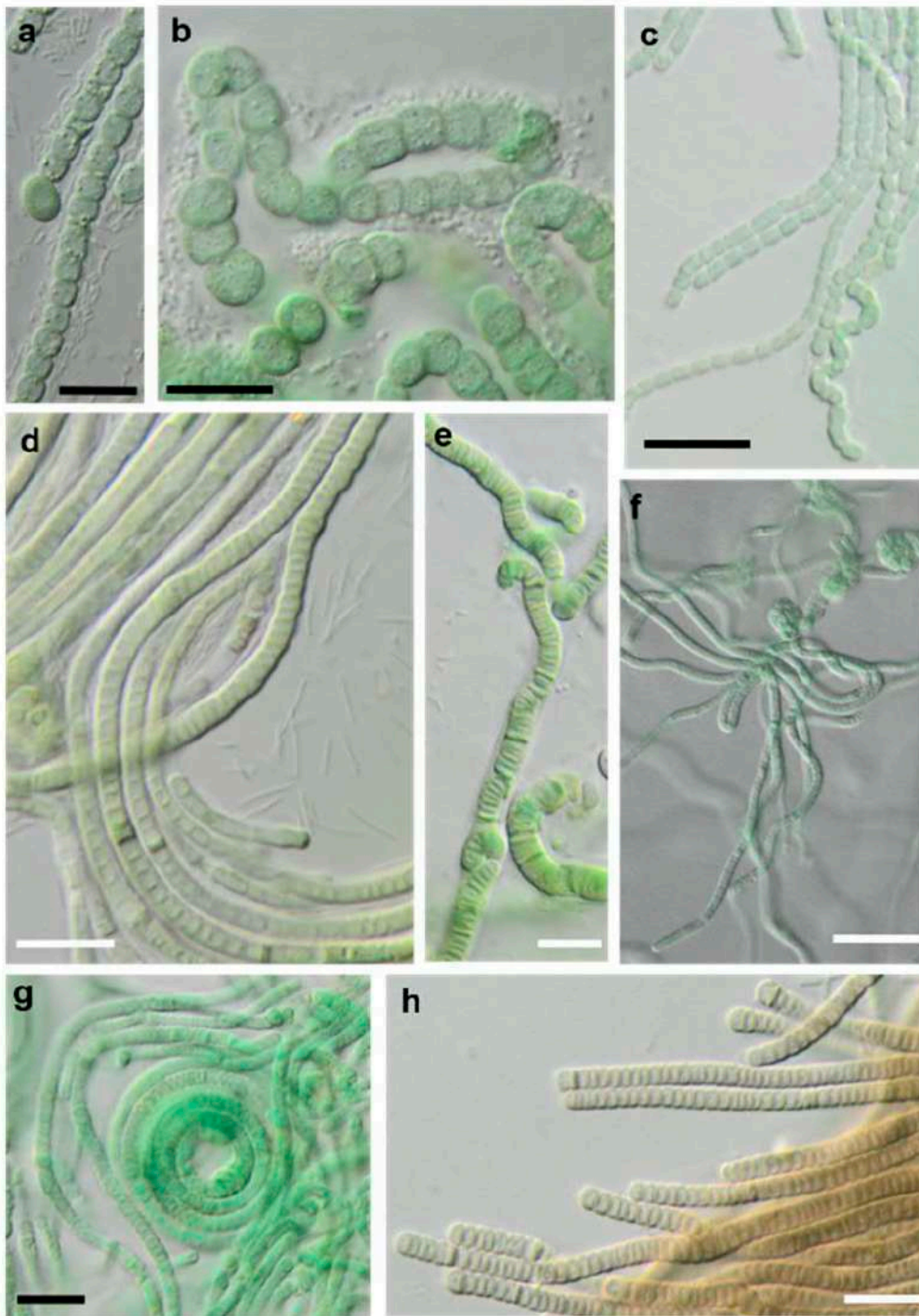


Figure 18. Photomicrographs of cyanobacteria isolates: (a,b) Nostocales and (c–h) Synecchococcales. (a,b) *Cyanocohniella* sp. SY-1-2-Y, (c) *Nodosilinea* cf. *signiensis* NN-3-1-CD, (d) “*Phormidesmis*” sp. NN-3-1-CA, (e) “*Pseudophormidium*” *battersii* NN-3-1-D, (f) *Nodosilinea* cf. *signiensis* NN-2-1-EE, (g) *Nodosilinea bijugata* OD-1-1-T, and (h) “*Pseudophormidium*” *battersii* NN-3-1-B. Black scale bars: 10 µm and white scale bars: 20 µm.

4. Discussion

4.1. Morphological vs. Molecular Species Determination

Table 1 shows a comparison of the results from our study to the previously published morphological species list [63]. Several of the original isolates were previously correctly identified to the species level based solely on morphology. Usually, these taxa have distinct morphological features that can be recognized quickly. As an example, *Borodinellopsis texensis* is characterized by a prominent asteroid chloroplast, central pyrenoid, and the formation of cell packages (Figure 15f–h), and *Diplosphaera chodatii* is identified by the characteristic cubic cell packages, cell diameter, and the absence of coated pyrenoids (Figure 12d) [100].

Some strains were correctly identified to the genus level or morphological species complexes. For example, several strains of the morphologically prominent genus *Chloroidium*, initially identified as *Ch. ellipsoideum*, were redefined as the morphologically close species *Ch. saccharophilum* and *Chloroidium* sp. The cells of this genus can be easily recognized by their ellipsoid shapes and characteristic chloroplast structures (Figure 13a–e) [68]. Previous identifications of the small-celled *Nannochloris* sp. were also confirmed by the integrative approach. However, the group of *Nannochloris*-like algae is problematic for identification in general and requires taxonomic revision, including strains from ecologically different environments [101,102].

Several strains with *Tetracystis/Chlorococcum*-like morphology finally fell in different but related lineages in the Moewusinia (Chlorophyceae; *Axilosphaera*, *Spongiococcum*, *Alvikia*, and *Chlorogonium*), confirming the general polyphyly of this morphotype [103]. The strain that was morphologically identified as *Radiosphaera negevensis* (Moewusinia) due to the presence of almost spherical mature cells and typical asteroid chloroplasts was redefined as the *Chloromonas* sp. (Chloromonadinia). This disagreement in identification may occur due to the high level of morphological parallelism between nonrelated lineages of Chlorophyceae, previously discussed by Mikhailyuk et al. [65]. Possibly, the same explanation can be applied to the strains cf. *Chlorothrix* (Acrosiphonia-clade, Ulotrichales, and Ulvophyceae), which were originally identified as *Ulothrix* species (Figure 4, *Planophila*-clade).

Table 1. Integrative species identifications compared to morphological identifications in a previous study [63]. Possibly undescribed taxa are marked (●). Additional strains that were not published and morphologically identified previously are placed in parentheses.

Original Strain	Integrated Approach	Morphological Approach [63]	Comments	Reference
Chlamydomonadales				
NN-4-1-N N-4-1-E	<i>Borodiniellopsis texensis</i>	<i>Borodiniellopsis texensis</i>	SSU rRNA sequences of the original strains were close to the authentic strain (SAG 17.95).	[104,105]
NN-2-N NN-2-D	<i>Borodiniellopsis</i> sp. ●	<i>Borodiniellopsis</i> sp.	SSU rRNA sequences of the original strains formed a separate sister branch to the authentic strain of <i>B. texensis</i> (SAG 17.95).	[104,105]
WT-3-1-F	<i>Chloromonas</i> sp. ●	<i>Radiosphaera negevensis</i>	SSU rRNA sequence of the original strain formed a separate lineage within <i>Chloromonas</i> together with the strain Ru-6-8.	[65,106–108]
NN-1-1-Q	cf. <i>Axiosphaera</i> ●	<i>Tetracystis</i> sp.	SSU rRNA sequence of the original strain formed a separate clade close to <i>Axiosphaera</i> and <i>Eubrownia</i> .	[105]
SY-1-2-T TT-3-1-Q (TSN3f)	cf. <i>Chlorogonium</i> ●	<i>Chlorococcum</i> sp. 1	SSU rRNA sequences of the original strains formed a separate lineage to <i>Chlorogonium</i> .	[105]
SY-4-1-C TT-3-1-M	cf. <i>Spongtozocum</i> ●	<i>Tetracystis</i> sp.	SSU rRNA sequences of the original strains formed a separate lineage within the Moewusinia.	[105]
(TTF-2-1-Da)	<i>Alvikia</i> sp. ●		SSU rRNA sequences of the original strains formed a separate lineage within the <i>Alvikia</i> -clade.	[105]
Sphaeropleales				
TT-3-1-J TT-3-1-U NN-4-1-D2 NN-4-1-CC NN-4-1-H (TTF-1-1-M) (TTF-2-1-A) (TTF-2-1-J)	<i>Bractatococcus minor</i>	<i>Bractatococcus minor</i> <i>Bractatococcus colhaerens</i> <i>Pseudomuriella aurantiaca</i>	SSU rRNA and ITS2 sequences of the original strains were close to the authentic strain (UTEX 66).	[109]
TT-3-1-G	<i>Tetradesmus dissocitatus</i>	<i>Spongiochloris excentrica</i>	SSU rRNA and ITS sequences of the original strain were close to the authentic strain of <i>Tetradesmus dissocitatus</i> .	[110,111]

Table 1. Cont.

Original Strain	Integrated Approach	Morphological Approach [63]	Comments	Reference
Ulvophyceae				
TT-4-1-I	<i>Desmochloris</i> cf. <i>halophila</i> •	<i>Spongiochloris excentrica</i>	SSU rRNA and ITS sequences of the original strain were in an intermediate position between the authentic strain of <i>D. halophila</i> (CCAP 6006/1) and <i>D. moltenhaueri</i> (CCAP 6006/2), forming a separate branch.	[69,112,113]
TT-4-1-D		<i>Spongiochloris excentrica</i>		
TT-4-1-M		<i>Spongiochloris</i> sp.		
TT-4-1-O		<i>Chlorella</i> sp. 1		
NN-4-1-Q	<i>Halochlorococcum</i> sp. •	<i>Chlorococcum macropyrenoidosum</i>	SSU rRNA sequences of the original strains clustered in the clade formed by <i>Halochlorococcum</i> species, but the absence of a taxonomic revision of the genus did not allow identification of the strains to species level.	[114,115]
NN-4-1-S				
NN-4-1-T				
TT-3-1-I		<i>Chlorella</i> sp. 2		
TT-4-1-J		<i>Chlorella</i> sp. 3		
TT-4-1-CC	<i>Planophila</i> sp. •	<i>Chlorella vulgaris</i>	SSU rRNA and ITS sequences of the original strains formed a separate lineage within <i>Planophila</i> , distant from known species.	[69]
TT-4-1-F (G2C)		<i>Planophila</i> sp. 1		
NN-4-1-B	cf. <i>Chlorothrix</i> •	<i>Ulothrix aequalis</i>	SSU rRNA and ITS sequences of the original strains formed a new lineage in the <i>Acrosiphonia</i> -clade of the Ulotrichales.	[113,116,117]
NN-4-1-M				
Trebouxiophyceae				
WT-3-1-L2	<i>Chlorella</i> cf. <i>pituuita</i>	<i>Chlorella</i> sp. 2	SSU rRNA and ITS sequences of the original strain formed a separate branch from the authentic strain of <i>C. pituuita</i> (ACOI 311).	[97]
OD-1-1-C	<i>Chloroidium saccharophilum</i>	<i>Chloroidium ellipsoideum</i>	SSU rRNA and ITS sequences of the original strain were close to the authentic strain (SAG 211-9a).	[68,118]
OD-1-2-N				
OD-1-1-K	<i>Chloroidium</i> sp. •	<i>Chloroidium ellipsoideum</i>	SSU rRNA and ITS sequences of the original strains fell on separate branches from <i>C. lichitium</i> and <i>C. ellipsoideum</i> .	[68,118]
SY-1-2-B				
NN-2-O				
SY-1-2-K	<i>Diplosphaera chodatii</i>	<i>Diplosphaera chodatii</i>	SSU rRNA and ITS sequences of the original strain were close to the authentic strain (SAG 48.86).	[119]
TT-2-1-CA1				
TT-3-1-F	<i>Nannochloris</i> sp.	<i>Nannochloris</i> sp.	SSU rRNA sequences of the original strains fell in two separate lineages within <i>Nannochloris</i> -like algae. No revision has addressed the polyphyletic positions of <i>Nannochloris</i> .	[101,120]
NN-4-1-D (TTF-2-1-D)				
TT-4-1-S (TSN1) (TSN3)	<i>Pseudochlorella signiensis</i>	<i>Parietochloris</i> cf. <i>coltaerensis</i>	SSU rRNA and ITS sequences of the original strains were close to the authentic strain of <i>P. signiensis</i> (SAG 7.90).	[121]

Table 1. Cont.

Original Strain	Integrated Approach	Morphological Approach [63]	Comments	Reference
TT-4-1-K OD-1-1-X WT-3-1-P1 WT-3-1-A SY-1-2-P WT-3-1-H NN-1-1-X (TTF-3-1-BB)	<i>Pseudostichococcus monallantoides</i>	<i>Stichococcus bacillaris</i> <i>Stichococcus exiguus</i> <i>Stichococcus allas</i>	SSU rRNA and ITS sequences of the original strains were close to the authentic strain of <i>P. monallantoides</i> (SAG 380-1).	[119]
NN-2-1-X1B OD-1-1 NN-1-1-E NN-1-1-M NN-1-1-L	<i>Watanabea</i> sp.	<i>Parietochloris colhaerens</i> <i>Parietochloris</i> cf. <i>ovoides</i>	SSU rRNA and ITS sequences of the original strains formed a separate lineage within <i>Watanabea</i> .	[70]
SY-1-2-EE SY-1-2-Y	<i>Cyanocohniella</i> sp.	<i>Nostoc</i> sp.	SSU rRNA and ITS sequences of the original strains formed separate lineages close to <i>Cyanocohniella</i> .	[75,76]
OD-1-1-T SY-4-1-H	<i>Nodosilinea bijugata</i>	<i>Leptolyngbya</i> sp.	SSU rRNA and ITS sequences of the original strains were close to the authentic strain of <i>N. bijugata</i> (Kovacic 1986/5a).	[122]
NN-2-1-EE NN-3-1-CD TT-1-1-CA	<i>Nodosilinea</i> cf. <i>signiensis</i>	<i>Leptolyngbya</i> sp.	SSU rRNA and ITS sequences of the original strains were close to the authentic strain of <i>N. signiensis</i> (USMFM), but the clade thus formed was not statistically supported.	[123]
OD-2-1-CH	<i>Nodosilinea</i> sp. •	<i>Leptolyngbya</i> sp.	SSU rRNA and ITS sequences of the original strain formed a separate lineage with the unidentified strain KIOST-1.	[122]
NN-4-1-FF NN-3-1-CA NN-3-1-G NN-4-1-O	“ <i>Phormidesmis</i> ” sp. •	<i>Pseudophormidium edaphicum</i> Cyanobacteria 2 Cyanobacteria 5	Unclear genus: no revision for the clade “ <i>Phormidesmis</i> ” present	[72]
NN-3-1-B NN-3-1-D	“ <i>Pseudophormidium</i> ” <i>battersii</i> •	Cyanobacteria 5 Cyanobacteria 2	Unclear genus: SSU rRNA sequences of the original strains formed a separate clade together with the strain KZ-16-2 previously identified as “ <i>Pseudophormidium</i> ” <i>battersii</i> . The group requires revision.	[72]

Further, the identification of some cryptic taxa characterized by simple morphology was corrected based on the integrative approach. Several strains that were initially identified as morphologically different *Stichococcus* species were unambiguously identified as a single species in the newly revised genus *Pseudostichococcus* [119] (Figure 8a), namely *P. monallantoides*. Likewise, some strains of *Bracteacoccus minor* were initially morphologically identified as several small-celled *Bracteacoccus* (including *B. minor*) and *Pseudomuriella* species (Figure 7a).

The *Parietochloris* strains that were morphologically identified due to their specific structure of the pyrenoid envelope, chloroplast morphology, and general appearance of young and mature cells [100], however, were redefined as the recently revised genera *Pseudochlorella* and *Watanabea* [70,121]. Members of the same class (Trebouxiophyceae), these genera are related and, consequently, have similar morphology.

The strains morphologically identified as *Spongiochloris excentrica* (Chlorophyceae) mostly clustered in a completely different class (Ulvophyceae) in clades corresponding to the genera *Desmochloris* and *Halochlorococcum*. This may have occurred due to morphological similarities between the two classes: a high similarity of the spongiomorph chloroplast and the pyrenoid morphology, as well as the multinucleosis of vegetative cells in some stages of their life cycles. These morphological parallelisms have been discussed in a recent publication [65]. *Halochlorococcum* is poorly investigated [114] and absent from widely used identification books and guides [100], which underlines the difficulty of identifying this genus morphologically.

The strain TT-3-1-G was also identified as *Spongiochloris excentrica* on the basis of morphological features [100]; however, following the phylogenetic analysis, it clustered in another chlorophycean genus. This genus, *Tetradismus*, is morphologically completely different from *Spongiochloris*. Our strain formed large multinucleate cells (see Figure 17e) that actually resemble *Spongiochloris*. These cells may represent a specific stage in the life cycle of *Tetradismus* (before division and autospore formation) rather than a general phenotype.

The strains morphologically identified as *Nostoc sensu lato* and *Leptolyngbya sensu lato*, to give an example for cyanobacteria, were redetermined to be species of the newly described genera *Cyanocohniella* [76] and *Nodosilinea* [122], which still belong to the same orders (Nostocales and Synechococcales, respectively). Altogether, the molecular approach resulted in more precise identification and should be considered as an extension of the previous morphological species list.

As explained above, some of these misidentifications resulted in the splitting of one taxon into several morphologically identified taxa. This can be explained by two factors: age of cultures and phenotypic plasticity. Cultures of different ages may have shown differences in cell morphology. Young cells may be smaller and, for example, in the case of *Halochlorococcum* sp., are more likely to resemble *Chlorella*. Older cells may have been larger and potentially showed more morphological traits that were attributed to another taxon. Likewise, young cells of *Planophila* sp. did not form characteristic cell packets but showed a *Chlorella*-like morphology (Figure 14e), leading to the mismatch between the morphological approach and the molecular results.

Differences in morphology also appear with different culture conditions, such as temperature, light, and salinity. This effect is termed phenotypic plasticity. Some recent studies have revealed that phenotypic plasticity of several terrestrial green algae can be caused by different levels of salinity [119,124].

Some morphologically identified species from the potash tailing pile sites [63] could not be addressed with the methods used here. One example is the genus *Pseudendoclonium*, a filamentous branched green alga in the Ulvophyceae, which was frequently found in biocrusts of the tailing pile environments [63]. This genus is a widely distributed halotolerant alga and has also been identified as *Dilabifilum* in some studies [43,51,125]. In the previous study, the genus *Planophila* was represented by five morphologically identified species [63], e.g., characterized by dense cell aggregates. However, the present study identified only one species, which was single-celled (Figure 14e). Sequencing other

morphotypes of this genus was not successful. Thus, our approach was not feasible for these isolates. For these reasons, the taxa identified in this study do not comprise a complete species list.

In sum, the integrative approach confirmed some of the morphological taxa, redefined others more precisely, and excluded a few strains due to methodological issues. Consequently, the results should be considered as an extension and revision of the species list published previously [63], underlining the general advantages of an integrative approach.

4.2. Taxa with Unclear Phylogenetic Positions

In the Chlamydomonadales, the genus *Borodinellopsis* was isolated quite often from our samples (four isolates, Figure 15c–h). Two original strains were clearly identified as *Borodinellopsis texensis*. Another two original strains formed a sister branch to this species (Figure 2). This lineage may represent another species of *Borodinellopsis*, either *B. oleifera*, which is morphologically characterized by the presence of oil drops [126], or a new taxon. However, no reference sequence of *B. oleifera* was available. Thus, more detailed morphological observation is necessary to reach a definitive conclusion.

Several strains were found among the *Tetracystis/Chlorococcum*-like isolates in the Moewusinia-clade, identified as cf. *Axilosphaera*, cf. *Spongiococcus*, and *Alvikia* sp. The isolate NN-1-1-Q (cf. *Axilosphaera*, Figure 16g,h) clustered with *Eubrownia* and *Axilosphaera vegetata*. Even though the latter represents the closest relative, the isolate analyzed in this study differed from these reference strains regarding the SSU rRNA gene sequence, indicating a possibly new taxon. Ettl and Gärtner [100] described *Axilosphaera vegetata* as morphologically similar to *Borodinellopsis* but distinguished by the absence of the larger cell complexes in *Axilosphaera*, which, in turn, are common for *Borodinellopsis*. We observed the isolate NN-1-1-Q in dyads or tetrads only (Figure 16g), which showed parietal cup-shaped and richly dissected chloroplasts (Figure 16g,h). The chloroplast of *Axilosphaera* is described as parietal cup-shaped and dissected, becoming almost asteroid in mature cells, which is similar to the cup-shaped and dissected chloroplasts of the sister lineage *Eubrownia* [105]. Two other Moewusinia isolates fell in new lineages (Figure 2). The isolates cf. *Spongiococcus* (SY-4-1-C and TT-3-1-M), which showed a *Tetracystis*-like morphology and a spongiomorph chloroplast with a prominent pyrenoid (Figure 15a,b), as well as the isolate *Alvikia* sp. (TTF-2-1-Da), which showed a *Chlorococcum*-like morphology, possibly representing new taxa. For final clarification, more thorough investigations are required.

The original isolates TT-3-1-Q, SY-1-2-T and TSN3f, placed in the Chlorogonia, were unique, since they were clearly separated from the closest *Chlorogonium* species. The genus *Chlorogonium* is flagellated, spindle-shaped, or ovoid and characterized by the presence of two or more pyrenoids [103]. Young cells of our isolates had *Chlorogonium*-like morphology (Figure 16b) and had one pyrenoid and a posterior nucleus; however, mature cells became ovoid to nearly spherical, never a spindle shape (Figure 16a,c). Consequently, our isolates may represent a new taxon.

Several strains belonged to the Ulvophyceae. In the order Ulvales, the isolate T-4-I-1 fell in the genus *Desmochloris* (Figures 4 and 14a), which includes two species: *D. mollenhauerii* and *D. halophila* [112]. The original strain of this study was clearly separated from *D. mollenhauerii* and was placed in an intermediate position to the type of species of *D. halophila*. Thus, we identified our strains as *Desmochloris* cf. *halophila*, which may represent a new species for the genus.

Several other isolates within the *Desmochloris*-clade were placed in the interesting and insufficiently described genus *Halochlorococcum* (according to the SSU rRNA gene phylogeny, Figure 4). Seven species are known in this genus [114]. Even though the genus was recently re-established after having an invalid status for a long time [114], only the SSU rRNA gene sequences of three species (*H. dilatatum*, *H. porphyrae*, and *H. moorei*) were available in the database, which did not allow specification of the original isolates to the species level. This stresses the need for a general revision of the genus *Halochlorococcum*.

Four original strains of another ulvophyte fell in the genus *Planophila*, forming a distinct separate lineage between the two known species *P. bipyrenoidosa* and *P. laetevirens* (according to the ITS-1,2 phylogeny, Figure 10a). This result strongly indicates that these strains represent a new species.

A unique case consists of two original strains from the Ulotrichales. According to the ITS-1,2 phylogeny, these strains were placed in the *Acrosiphonia*-clade (Figure 4), forming a significant new branch close to the genera *Pseudothrix*, *Chlorothrix*, *Urospora*, and “*Ulothrix*” (Figure 10c). *Urospora* is a filamentous, uniseriate marine algae and has a multinucleate gametophyte [116], whereas the gametophyte thallus of *Pseudothrix* is initially uniseriate and develops into multiseriate filaments [117]. Mature cells of *Ulothrix* and *Chlorothrix* are uniseriate and uninucleate [127]. Thus, our isolates showing uniseriate and uninucleate filaments (Figure 14b) were morphologically most similar to *Ulothrix* and *Chlorothrix*. The genus *Ulothrix*, however, is placed in the *Planophila*-clade of the Ulotrichales [69] (Figure 4), represented by strains identified as *Ulothrix zonata* (SAG 38.86, UTEX 745). Thus, we tentatively named our isolates (NN-4-1-M and NN-4-1-B) cf. *Chlorothrix*.

Several different cultures were found in the Trebouxiophyceae. Five original isolates clustered within the genus *Chloroidium* (Figure 5). One of them (OD-1-1-C) was clearly identified as *Ch. saccharophilum*, since its ITS-1,2 sequence was identical to the authentic strain of this species (SAG 211-9a, Figure 9a). The other isolates formed two separate lineages together with the unidentified strain, originating from sand dunes of the Baltic Sea coast (Ru-6-6). These lineages are close to *Ch. lichinum*, as well as to *Ch. ellipsoideum*, and may represent new species.

Three other trebouxiophycean isolates clustered with *Watanabea* and formed a separate lineage closely related to the type strain of *W. reniformis* (SAG 211-9b). The chloroplast of *W. reniformis* does not show a pyrenoid [70], whereas the isolates of this study clearly did (Figure 13m). Another species in this clade, *W. borsynthenica*, in turn, has a pyrenoid [70]. However, the latter is clearly different from our isolates regarding the ITS-1,2 phylogeny, which leads to an unclear status of the original isolates.

In the Sphaeropleales, the original strain TT-3-1-G clustered in the genus *Tetradasmus*. It was close to the authentic strains of four species: “*Scenedesmus*” *rubescens*, “*Scotiellopsis*” *reticulata*, *Tetradasmus dissociatus*, and “*Scenedesmus*” *littoralis*, forming a highly supported cluster in the SSU rRNA gene and ITS-1,2 phylogenies (Figures 3 and 7b). Indeed, the SSU rRNA gene and the ITS sequences were very similar (differing in only one nucleotide) and, also, in their ITS-2 region, which is used for species delimitation within the genus [128]. Thus, it is obvious that this cluster, including our original strain, most likely represents one distinct species. The findings of another study confirm the genetic similarity here [111]. However, there are some nomenclatural uncertainties, since the status of the oldest species name in that clade (*Halochlorella rubescens*) was recently declared as invalid [129]. Despite the genetic identity and a generally similar morphology of these four strains, they showed some minor, though characteristic, morphological differences: *Scenedesmus rubescens* forms cell packets [130], and *Tetradasmus dissociatus* shows characteristic thread-like remnants of the sporangial walls. We also observed some specific multinucleate stages in our original strain TT-3-1-G (Figure 17e), which may have caused its previous misidentification (see above). Therefore, further investigations are required for the final decision concerning this clade. Accordingly, we named the original isolate as *Tetradasmus dissociatus*, since it is the only valid species name available in this group.

The two cyanobacteria isolates in the Nostocales clustered with the rare and recently described and revised genus *Cyanocohniella* [75,76]. However, both the SSU and SSU-LSU intergenic spacer phylogeny showed a paraphyly of *Cyanocohniella* and the genetically close genus *Aliinostoc* (Figures 6 and 11a). Therefore, the identification remains unclear. Moreover, both genera may require further revision.

Several original isolates from the Synechococcales with unclear *Leptolyngbya*-like morphology (Figure 18c,f,g) clustered within the genus *Nodosilinea*, which was defined recently [122], followed by the description of several new *Nodosilinea* species [123,131,132]. Some of our isolates fell in clades formed by known species (Figure 11b) and identified as *N. bijugata* and *N. cf. signiensis*. The original isolate OD-2-1-H, however, was placed in a distinct clade with an unidentified reference strain (KIOST-1), indicating its unclear status.

Six other original isolates belonging to Synechococcales and characterized by prominent, deeply constricted green, pale-green, and brown trichomes, as well as narrow cells (Figure 18d–h), were ordered into another clade containing sequences labeled as *Phormidesmis* and *Pseudophormidium*. However,

a recent review addressed the genus *Phormidesmis* [133], which clearly represents another lineage. Previous studies that found strains of the same clade termed it “*Phormidesmis*” [65,72], which stresses its unclear status and, as discussed above, may represent an undescribed genus [72]. Clearly, identification of our strains is not possible.

Overall, our study showed a high proportion of unclear and possibly new taxa. For 24% of the taxa found in this study (16 isolates), identification even to genus level was doubtful or not possible from the integrative approach. This is twice as high as in a similar study on biocrusts in Baltic Sea coastal dunes, where the authors found unclear genera in 11% of their isolates [65]. Another recent study on microbial mats in hypersaline wind-tidal flats found that even 35% of the isolated cyanobacteria could not be assigned to the genus/family level [35]. This underlines the lack of knowledge in hypersaline environments, which is in congruence with our findings on biocrusts in the highly saline potash tailing pile environments.

The methods used in our study were not sufficient to formally describe the new taxa. Therefore, deeper analyses are needed. One crucial molecular method is the comparison of ITS secondary structures that clearly delimit the borders between species of both green algae and cyanobacteria. In addition, the morphology should be analyzed in detail. The original strains of this study were cultured on a solidified saline medium, which could result in changes in morphology. Phenotypic plasticity under saline conditions is known for several species [134]. To overcome this possible limitation, several growth media with or without added salt should be used, both solidified and liquid. In addition, the morphology of all reproductive stages, such as zoospores, gametes, or resting stages in green algae, as well as hormogonia or necridia in cyanobacteria, should be investigated in detail.

4.3. Congruence and Divergence of Phylogeny and Habitat Characteristics Regarding Salinity

Several species or genera identified in this study are already known to live in salt-affected habitats and, thus, are most probably adapted to saline conditions. It is not surprising that we identified many strains of Ulvophyceae, since this class mostly contains salt-tolerant marine species, such as the eponymous macrophyte genus *Ulva*. However, in terrestrial habitats, members of this class are mostly less common than the predominant Chlorophyceae and Trebouxiophyceae. Only a few studies have treated nonmarine Ulvophyceae, which were recently rearranged in the broad revision of Darienko and Pröschold [69].

The Ulvophyceae *Desmochloris halophila* was originally found in mixohaline water [113]. Other strains assigned to that genus/species also originated from salt-affected habitats [65,135]. Another Ulvophyceae, a close relative to the original strains of *Halochlorococcum* sp., was *Halochlorococcum dilatatum* (SAG 12.90), which was originally isolated from a rock pool in Helgoland, Germany. Rock pools have fluctuating salinities, which may strongly increase due to evaporation and reach hypersaline concentrations. The two other reference strains, *H. porphyrae* and *H. moorei*, were also found in marine environments [115,117]. Mettlig [136] classified the group as a genus, including soil algae; however, no record from a terrestrial environment was published thereafter. Thus, the findings of our study indicate the first record of *Halochlorococcum* in a biocrust.

The clade *Tetrademus*, including “*Scotiellopsis*” *reticulata*, “*Scenedesmus*” *rubescens*, “*S.*” *littoralis*, and *T. dissociates*, is an interesting case in the Sphaeropleales concerning salinity. The reference strain “*Scotiellopsis*” *reticulata* (CCALA 474) was found in the sand on the coast of the Black Sea [137], and the type strain of “*Scenedesmus*” *littoralis* originated from coastal waters and tolerates up to 2% NaCl [138]. “*Scenedesmus*” *rubescens* was described based on a strain isolated from a culture of marine brown algae [130]. The reference strain *Tetrademus dissociatus* is the only exception, since it was isolated from cornfield soil [139].

The order Chlamydomonadales also contains salt-tolerant species such as *Borodinellopsis texensis*, which was found in a sea salt farm (strain JM002, Figure 2) and in a hypersaline ecosystem [43]. The isolate *Alvikia* sp. (TTF-2-1-Da), interestingly, clustered with species found in saline environments [105] but not in terrestrial habitats. In contrast, the sister clade with *Spongiococcum*

and *Actinochloris* included terrestrial isolates from nonsaline environments. Thus, our isolate may somehow represent a linkage between these clades as the first record from a salt-affected terrestrial site.

In the cyanobacteria, the closest reference to the two original strains, *Cyanocohniella* sp., was originally isolated from beach mats of the North Sea, The Netherlands [75]. In the sister genus *Aliinostoc*, some strains are known from other saline habitats, such as saline-alkaline lakes or mangroves [140]. In the “*Phormidesmis*” cluster, almost all of the respective reference strains were originally isolated from salt-affected habitats but of different types. These references originated from microbial mats in saline lakes [141,142] and from the coast of the brackish Sea of Azov [72]. Two strains of “*Pseudophormidium*” were isolated from the unusual habitat of salt-excreting leaves of the mangrove *Avicennia schaueriana* [143]. In sum, the original isolates belonging to the taxa discussed above match the saline habitat preferences of their closest phylogenetic relatives.

In contrast, several genera were identified that are more common in nonsaline environments. The Trebouxiophyceae comprises a wide variety of microalgae, including marine and freshwater, as well as numerous terrestrial taxa. In the genus *Watanabea*, most species were described from either aquatic, e.g., *Watanabea reniformis* (SAG 211-9b), or terrestrial habitats; there is no record from saline terrestrial environments yet known. Interestingly, several strains have been isolated from highly acidic environments [70,144]. Thus, the original isolates of this study underline the presence of extremophiles within the genus *Watanabea* and represent a unique finding in a saline biocrust.

A study focusing on *Nannochloris*-like algae described a new genus of marine/saline *Nannochloris*-like strains, namely *Picochlorum*, whereas freshwater *Nannochloris*-like strains formed a second cluster [101]. The respective strains of our study did not fall into the marine *Picochlorum* but, rather, in the freshwater *Nannochloris*.

The Trebouxiophyceae genus *Chlorella* is among one of the best-known genera of microalgae, but its phylogenetic status has long remained unresolved. A recent study addressed the question of the existence of true marine *Chlorella* species and, indeed, found three marine isolates belonging to this genus, namely *Chlorella vulgaris* [145]. The original isolate of this study, however, clustered with *Chlorella pituita*. The epitype strain of *Chlorella pituita*, though, was isolated from freshwater [97].

Consequently, we found several isolates that represent taxa that are typically found in saline habitats or that have some close relatives that inhabit such environments. Other taxa were more typical for nonsaline habitats. To withstand the harmful saline environment, salt-tolerant microalgae evolved protective mechanisms such as the excretion of extracellular polysaccharides (EPS) and the production of intracellular organic osmolytes. However, the biocrust as a multidimensional layer potentially provides shelter for less salt-tolerant organisms. Species adapted to salty conditions may form a barrier layer for sensitive species by EPS excretion. Thus, both tolerant as well as nontolerant taxa may appear in salt-affected biocrusts, although intolerant taxa may not survive outside the shelter of the biocrust community. Further, we cannot state whether the species lived under their optimum conditions or at the edge of their salt tolerance. Competitive pressure in less saline soils in these environments may lead to a migration of taxa to more saline soils on the edge of their tolerance. Future eco-physiological studies on the isolated microalgae and cyanobacteria strains should address their plasticity towards salinity by thoroughly identifying the tolerance range, as well as the optimum salinity.

Moreover, the mechanisms of salt tolerance are closely linked to drought tolerance, a trait that is generally necessary for microalgae outside the aquatic environment, such as in a biocrust. Though there are some differences in the effect, as well as the protective mechanisms of these two stressors, common terrestrial microalgae that are already adapted to water deprivation have a good potential to withstand saline conditions as well. This is in congruence with our findings of several common terrestrial algae and cyanobacteria, such as *Pseudostichococcus* [119], *Bracteacoccus*, *Chloroidium* [68], and *Nodosilinea* [122], in biocrusts of potash tailing pile environments.

5. Conclusions

Many taxa of already known salt-tolerant green algae and cyanobacteria were found in biocrusts of extremely saline potash tailing pile habitats using an integrative approach. Several strains were the first record of that taxon in a biocrust. However, there was a high proportion of original isolates with unclear taxonomic positions, indicating new species or genera. Thus, biocrusts in potash tailing pile areas revealed unique communities of microalgae and cyanobacteria. Studies in other saline terrestrial habitats were often based on morphology, and new species could have been overlooked in these cases. Comparing our results to the previous morphological observations on the original isolates, our findings should be considered as an extension and improvement of the morphologically based species list. However, more detailed research is needed for deeper analyses of the newly found lineages. Consequently, our findings illustrated the benefits of an integrative approach but also underlined the limits of the molecular methods used in this study for describing new species.

The original stains examined in this study reflected a highly diverse and unique community of biocrust algae and cyanobacteria from potash tailing pile environments, which may be specialized for these extreme habitats. Their phylogenetic identification is an important but very first step in the ongoing research and will be crucial for the interpretation of subsequent eco-physiological experiments. Assessing the salt tolerance of the isolates is a necessary next step in understanding the ecology of microalgae and cyanobacteria in these specialized biocrusts. In the future, they may be of interest for the young field of applied biocrust research. Since biocrusts are multifunctional communities that are involved in several ecological processes, such as soil formation and surface stabilization, they could potentially be used to cover potash tailing piles [146]. The microalgae and cyanobacteria identified in this study represent candidates for artificial biocrust formation due to their origin in unique habitats close to the tailing piles and the high proportion of possibly new taxa.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/11/1667/s1>: Table S1: Gene Bank Accession Number and origin/habitat description of the reference strains used for phylogenetic tree construction.

Author Contributions: Conceptualization, V.S., K.G., and U.K.; methodology, V.S., T.M., and K.G.; software, V.S., T.M., and K.G.; validation, T.M. and K.G.; writing—original draft preparation, V.S.; writing—review and editing, K.G., T.M., and U.K.; and supervision, U.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by a fellowship of Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU) to VS, a Max-Buchner-Forschungsstipendium (MBFSt 3583) from the Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie (DECHEMA), as well as a DFG Grant GL 909/1-1, to KG, and a Georg-Forster research fellowship from the Alexander von Humboldt Foundation to TM. Further funding was provided by upi UmweltProjekt Ingenieurgesellschaft mbH and K+S Minerals and Agriculture GmbH.

Acknowledgments: We thank the state environmental offices of the Peine and Lüchow-Dannenberg Districts, the Wietze community, the GESA (Gesellschaft zur Entwicklung und Sanierung von Altstandorten MBH), and Albrecht Palm, as well as the K+S Minerals and Agriculture GmbH, for fieldwork permits and/or access to the sites. Furthermore, we thank Alexandra Wölk, Ramona Kern, Matthias Kockx, and Christopher Lubs for their assistance during sampling. Special thanks are extended to Laura Fuchs for her strong support in the laboratory work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Belnap, J.; Büdel, B.; Weber, B. Biological soil crusts as an organizing principle in drylands. In *Biological Soil Crusts: An Organizing Principle in Drylands*; Weber, B., Büdel, B., Belnap, J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; ISBN 978-3-319-30212-6.
2. Weber, B.; Büdel, B.; Belnap, J. *Biological Soil Crusts: An Organizing Principle in Drylands*; Weber, B., Büdel, B., Belnap, J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; ISBN 978-3-319-30212-6.
3. Evans, R.D.; Johansen, J.R. Microbiotic Crusts and Ecosystem Processes. *Crit. Rev. Plant Sci.* **1999**, *18*, 183–225. [[CrossRef](#)]
4. Chen, N.; Yu, K.; Jia, R.; Teng, J.; Zhao, C. Biocrust as one of multiple stable states in global drylands. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaay3763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Pietrasiak, N.; Johansen, J.R.; Ladoux, T.; Graham, R.C. Comparison of Disturbance Impacts to and Spatial Distribution of Biological Soil Crusts in the Little San Bernardino Mountains of Joshua Tree National Park, California. *West. North Am. Nat.* **2011**, *71*, 539–552. [[CrossRef](#)]
6. Eldridge, D.J.; Woodhouse, J.N.; Curlevski, N.J.A.; Hayward, M.; Brown, M.V.; Neilan, B.A. Soil-foraging animals alter the composition and co-occurrence of microbial communities in a desert shrubland. *ISME J.* **2015**, *9*, 2671–2681. [[CrossRef](#)]
7. Rao, B.; Liu, Y.; Lan, S.; Wu, P.; Wang, W.; Li, D. Effects of sand burial stress on the early developments of cyanobacterial crusts in the field. *Eur. J. Soil Biol.* **2012**, *48*, 48–55. [[CrossRef](#)]
8. Cantón, Y.; Chamizo, S.; Rodriguez-Caballero, E.; Lázaro, R.; Roncero-Ramos, B.; Román, J.R.; Solé-Benet, A. Water Regulation in Cyanobacterial Biocrusts from Drylands: Negative Impacts of Anthropogenic Disturbance. *Water* **2020**, *12*, 720. [[CrossRef](#)]
9. Rodriguez-Caballero, E.; Belnap, J.; Büdel, B.; Crutzen, P.J.; Andreae, M.O.; Pöschl, U.; Weber, B. Dryland photoautotrophic soil surface communities endangered by global change. *Nat. Geosci.* **2018**, *11*, 185–189. [[CrossRef](#)]
10. Antoninka, A.; Faist, A.; Rodriguez-Caballero, E.; Young, K.E.; Chaudhary, V.B.; Condon, L.A.; Pyke, D.A. Biological soil crusts in ecological restoration: Emerging research and perspectives. *Restor. Ecol.* **2020**, *28*, S3–S8. [[CrossRef](#)]
11. Antoninka, A.; Bowker, M.A.; Chuckran, P.; Barger, N.N.; Reed, S.; Belnap, J. Maximizing establishment and survivorship of field-collected and greenhouse-cultivated biocrusts in a semi-cold desert. *Plant Soil* **2017**, *429*, 213–225. [[CrossRef](#)]
12. Muñoz-Rojas, M.; Chilton, A.; Liyanage, G.S.; Erickson, T.E.; Merritt, D.J.; Neilan, B.A.; Ooi, M.K.J. Effects of indigenous soil cyanobacteria on seed germination and seedling growth of arid species used in restoration. *Plant Soil* **2018**, *429*, 91–100. [[CrossRef](#)]
13. Xiao, B.; Zhao, Y.; Wang, Q.; Li, C. Development of artificial moss-dominated biological soil crusts and their effects on runoff and soil water content in a semi-arid environment. *J. Arid. Environ.* **2015**, *117*, 75–83. [[CrossRef](#)]
14. Chen, L.; Xie, Z.; Hu, C.; Li, D.; Wang, G.; Liu, Y. Man-made desert algal crusts as affected by environmental factors in Inner Mongolia, China. *J. Arid. Environ.* **2006**, *67*, 521–527. [[CrossRef](#)]
15. Green, T.G.A.; Proctor, M.C.F. Physiology of Photosynthetic Organisms within Biological Soil Crusts: Their Adaptation, Flexibility, and Plasticity. In *Biological Soil Crusts: An Organizing Principle in Drylands*; Weber, B., Büdel, B., Belnap, J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; pp. 347–381.
16. Rossi, F.; Mugnai, G.; De Philippis, R. Complex role of the polymeric matrix in biological soil crusts. *Plant Soil* **2017**, *429*, 19–34. [[CrossRef](#)]
17. Karsten, U.; Holzinger, A. Green algae in alpine biological soil crust communities: Acclimation strategies against ultraviolet radiation and dehydration. *Biodivers. Conserv.* **2014**, *23*, 1845–1858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Pfaff, S.; Borchhardt, N.; Boy, J.; Karsten, U.; Gustavs, L. Desiccation tolerance and growth-temperature requirements of *Coccomyxa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) strains from Antarctic biological soil crusts. *Algological Stud.* **2016**, *151*, 3–19. [[CrossRef](#)]
19. Couradeau, E.; Felde, V.J.M.N.L.; Parkinson, D.; Uteau, D.; Rochet, A.; Cuellar, C.; Winegar, G.; Peth, S.; Northen, T.R.; Garcia-Pichel, F. In Situ X-ray Tomography Imaging of Soil Water and Cyanobacteria from Biological Soil Crusts Undergoing Desiccation. *Front. Environ. Sci.* **2018**, *6*, 65. [[CrossRef](#)]
20. Abed, R.M.M.; Polerecky, L.; Al-Habsi, A.; Oetjen, J.; Strous, M.; De Beer, D. Rapid Recovery of Cyanobacterial Pigments in Desiccated Biological Soil Crusts following Addition of Water. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e112372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Whitney, K.M.; Vivoni, E.R.; Duniway, M.C.; Bradford, J.B.; Reed, S.C.; Belnap, J. Ecohydrological role of biological soil crusts across a gradient in levels of development. *Ecohydrology* **2017**, *10*, e1875. [[CrossRef](#)]
22. Lafuente, A.; Berdugo, M.; De Guevara, M.L.; Gozalo, B.; Maestre, F.T. Simulated climate change affects how biocrusts modulate water gains and desiccation dynamics after rainfall events. *Ecohydrology* **2018**, *11*, e1935. [[CrossRef](#)]
23. Holzinger, A.; Lütz, C.; Karsten, U. Desiccation stress causes structural and ultrastructural alterations in the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) isolated from an alpine soil crust. *J. Phycol.* **2011**, *47*, 591–602. [[CrossRef](#)]

24. Karsten, U.; Herburger, K.; Holzinger, A. Dehydration, temperature, and light tolerance in members of the aeroterrestrial green algal genus *Interfilum* (Streptophyta) from biogeographically different temperate soils. *J. Phycol.* **2014**, *50*, 804–816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hagemann, M. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35*, 87–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Pade, N.; Hagemann, M. Salt Acclimation of Cyanobacteria and Their Application in Biotechnology. *Life* **2014**, *5*, 25–49. [[CrossRef](#)]
27. Kirst, G.O. Salinity Tolerance of Eukaryotic Marine Algae. *Annu. Rev. Plant Biol.* **1990**, *41*, 21–53. [[CrossRef](#)]
28. Karsten, U. Seaweed acclimation to salinity and desiccation stress. In *Seaweed Biology: Novel Insights into Ecophysiology, Ecology and Utilization. Ecological Studies 219*; Wiencke, C., Bischof, K., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2012; pp. 87–107, ISBN 978-3-642-28451-9.
29. Church, J.; Hwang, J.-H.; Kim, K.-T.; McLean, R.; Oh, Y.-K.; Nam, B.; Joo, J.C.; Lee, W.H. Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* in synthetic saline wastewater for biofuel production. *Bioresour. Technol.* **2017**, *243*, 147–153. [[CrossRef](#)]
30. Ishika, T.; Bahri, P.A.; Laird, D.W.; Moheimani, N.R. The effect of gradual increase in salinity on the biomass productivity and biochemical composition of several marine, halotolerant, and halophilic microalgae. *J. Appl. Phycol.* **2018**, *30*, 1453–1464. [[CrossRef](#)]
31. Menke, S.; Sennhenn, A.; Sachse, J.-H.; Majewski, E.; Huchzermeyer, B.; Rath, T. Screening of Microalgae for Feasible Mass Production in Industrial Hypersaline Wastewater Using Disposable Bioreactors. *CLEAN Soil Air Water* **2012**, *40*, 1401–1407. [[CrossRef](#)]
32. Sabbe, K.; Hodgson, D.A.; Verleyen, E.; Taton, A.; Wilmotte, A.; Vanhoutte, K.; Vyverman, W. Salinity, depth and the structure and composition of microbial mats in continental Antarctic lakes. *Freshw. Biol.* **2004**, *49*, 296–319. [[CrossRef](#)]
33. Krumbein, W.E.; Gorbushina, A.A.; Holtkamp-Tacke, E. Hypersaline Microbial Systems of Sabkhas: Examples of Life's Survival in "Extreme" Conditions. *Astrobiology* **2004**, *4*, 450–459. [[CrossRef](#)]
34. John, J.; Hay, M.; Paton, J. Cyanobacteria in benthic microbial communities in coastal salt lakes in Western Australia. *Algological Stud.* **2009**, *130*, 125–135. [[CrossRef](#)]
35. Huang, I.-S.; Pinnell, L.J.; Turner, J.W.; Abdulla, H.; Boyd, L.; Linton, E.W.; Zimba, P.V. Preliminary Assessment of Microbial Community Structure of Wind-Tidal Flats in the Laguna Madre, Texas, USA. *Biology* **2020**, *9*, 183. [[CrossRef](#)]
36. Ramos, V.M.C.; Castelo-Branco, R.; Leão, P.N.; Martins, J.; Carvalhal-Gomes, S.; Da Silva, F.S.; Filho, J.G.M.; Vasconcelos, V.M. Cyanobacterial Diversity in Microbial Mats from the Hypersaline Lagoon System of Araruama, Brazil: An in-depth Polyphasic Study. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Santhanakrishnan, T.; Lakshmanan, C.; Radhakrishnan, V. Mineralogical composition and microalgae communities of solar salt tumuli from Tuticorin, Southeast coast of India. *Indian J. Geo-Marine Sci.* **2018**, *47*, 498–502.
38. Chatchawan, T.; Peerapornpisal, Y.; Komarek, J. Diversity of cyanobacteria in man-made solar saltern, Petchaburi Province, Thailand—A pilot study. *Fottea* **2011**, *11*, 203–214. [[CrossRef](#)]
39. Sørensen, K.B.; Canfield, D.E.; Oren, A. Salinity Responses of Benthic Microbial Communities in a Solar Saltern (Eilat, Israel). *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 1608–1616. [[CrossRef](#)]
40. Brock, T.D. Salinity and the Ecology of *Dunaliella* from Great Salt Lake. *J. Gen. Microbiol.* **1975**, *89*, 285–292. [[CrossRef](#)]
41. Conner, A.J.; Benison, K.C. Acidophilic Halophilic Microorganisms in Fluid Inclusions in Halite from Lake Magic, Western Australia. *Astrobiology* **2013**, *13*, 850–860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kirkwood, A.E.; Buchheim, J.A.; Buchheim, M.A.; Henley, W.J. Cyanobacterial Diversity and Halotolerance in a Variable Hypersaline Environment. *Microb. Ecol.* **2007**, *55*, 453–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Vinogradova, O.N.; Darienko, T.M. Algae of Azovo-Syvashsky National Nature Park (Ukraine). *Int. J. Algae* **2008**, *10*, 163–178. [[CrossRef](#)]
44. Canfora, L.; Vendramin, E.; Antisari, L.V.; Papa, G.L.; Dazzi, C.; Benedetti, A.; Iavazzo, P.; Adamo, P.; Jungblut, A.D.; Pinzari, F. Compartmentalization of gypsum and halite associated with cyanobacteria in saline soil crusts. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2016**, *92*, 1–13. [[CrossRef](#)]
45. Tsujimura, S.; Nakahara, H.; Kosaki, T.; Ishida, N.; Iskakov, A.R. Distribution of soil algae in salinized irrigation land in the arid region of Central Asia. *Soil Sci. Plant Nutr.* **1998**, *44*, 67–76. [[CrossRef](#)]

46. Kirkwood, A.E.; Henley, W.J. Algal community dynamics and halotolerance in a terrestrial, hypersaline environment. *J. Phycol.* **2006**, *42*, 537–547. [[CrossRef](#)]
47. Buchheim, M.A.; Kirkwood, A.E.; Buchheim, J.A.; Verghese, B.; Henley, W.J. Hypersaline soil supports a diverse community of *Dunaliella* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* **2010**, *46*, 1038–1047. [[CrossRef](#)]
48. Arabadzhy-Tipenko, L.I.; Solonenko, A.N.; Bren, A.G. Cyanoprokaryota of the Salt Marshes at the Pryazov National Natural Park, Ukraine. *Int. J. Algae* **2019**, *21*, 299–310. [[CrossRef](#)]
49. Novichkova-Ivanova, L.N. *Soil Algae in Phytocenosis of the Sachara-Gobi Desert Region*; Nauka: Leningrad, Russia, 1980. (In Russian)
50. Prikhodkova, L.P. *Blue-Green Algae of Soils of the Steppe Zone of Ukraine*; Naukova Dumka Press: Kiev, Ukraine, 1992. (In Russian)
51. Vinogradova, O.M.; Darienko, T.M. Terrestrial algae of hypersaline environments of the Central Syvash islands (Kherson Region, Ukraine). *Biologia* **2008**, *63*, 813–823. [[CrossRef](#)]
52. Vinogradova, O.M. *Cyanoprokaryota of Hypersaline Ecosystems of Ukraine*; Alterpress: Kiev, Ukraine, 2012. (In Ukrainian)
53. Patzelt, D.J.; Hodač, L.; Friedl, T.; Pietrasiak, N.; Johansen, J.R. Biodiversity of soil cyanobacteria in the hyper-arid Atacama Desert, Chile. *J. Phycol.* **2014**, *50*, 698–710. [[CrossRef](#)]
54. Kaushal, S.S.; Likens, G.E.; Pace, M.L.; Utz, R.M.; Haq, S.; Gorman, J.; Grese, M. Freshwater salinization syndrome on a continental scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E574–E583. [[CrossRef](#)]
55. Wang, H.; Jia, G. Satellite-based monitoring of decadal soil salinization and climate effects in a semi-arid region of China. *Adv. Atmos. Sci.* **2012**, *29*, 1089–1099. [[CrossRef](#)]
56. Litalien, A.; Zeeb, B. Curing the earth: A review of anthropogenic soil salinization and plant-based strategies for sustainable mitigation. *Sci. Total Environ.* **2020**, *698*, 134235. [[CrossRef](#)]
57. Cañedo-Argüelles, M.; Brucet, S.; Carrasco, S.; Flor-Arnau, N.; Ordeix, M.; Ponsá, S.; Coring, E. Effects of potash mining on river ecosystems: An experimental study. *Environ. Pollut.* **2017**, *224*, 759–770. [[CrossRef](#)]
58. Siefert, B.; Büchel, G.; Lebküchner-Neugebauer, J. Potash mining waste pile Sollstedt (Thuringia): Investigations of the spreading of waste solutes in the Roethian Karst. *Grundwasser* **2006**, *11*, 99–110. [[CrossRef](#)]
59. John, H. Zur Ausbreitung von Halophyten und salztoleranten Pflanzen in der Umgebung von Kali-Rückstandshalden am Beispiel des FND “Salzstelle bei Teutschenthal-Bahnhof” (Saalkreis). *Mitt. Florist. Kart. Sachsen-Anhalt* **2000**, *5*, 175–197.
60. Garve, E.; Garve, V. Halophyten an Kalihalden in Deutschland und Frankreich (Eisass). *Tuexenia* **2000**, *20*, 375–417.
61. Guder, C. Kalihalden als Modellobjekte der kleinräumigen Florendynamik dargestellt an Untersuchungen im nördlichen Harzvorland. *Braunsch. Nat. Schr.* **1998**, *5*, 641–665.
62. Eilmus, S.; Rösch, C.; Bothe, H. Prokaryotic life in a potash-polluted marsh with emphasis on N-metabolizing microorganisms. *Environ. Pollut.* **2007**, *146*, 478–491. [[CrossRef](#)]
63. Sommer, V.; Karsten, U.; Glaser, K. Halophilic Algal Communities in Biological Soil Crusts Isolated from Potash Tailings Pile Areas. *Front. Ecol. Evol.* **2020**, *8*, 46. [[CrossRef](#)]
64. Gustavs, L.; Eggert, A.; Michalik, D.; Karsten, U. Physiological and biochemical responses of green microalgae from different habitats to osmotic and matric stress. *Protoplasma* **2010**, *243*, 3–14. [[CrossRef](#)]
65. Mikhailyuk, T.; Glaser, K.; Tsarenko, P.; Demchenko, E.; Karsten, U. Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria. *Eur. J. Phycol.* **2019**, *54*, 263–290. [[CrossRef](#)]
66. Komarek, J. Cyanobacterial Taxonomy: Current Problems and Prospects for the Integration of Traditional and Molecular Approaches. *ALGAE* **2006**, *21*, 349–375. [[CrossRef](#)]
67. Pröschold, T.; Leliaert, F. Systematics of the green algae: Conflict of classic and modern approaches. In *Unravelling the Algae: The Past, Present, and Future of Algal Systematics*; Brodie, J., Lewis, J., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2007; pp. 123–154.
68. Darienko, T.; Gustavs, L.; Mudimu, O.; Menendez, C.R.; Schumann, R.; Karsten, U.; Friedl, T.; Pröschold, T. *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.* **2010**, *45*, 79–95. [[CrossRef](#)]
69. Darienko, T.; Pröschold, T. Toward a monograph of non-marine Ulvophyceae using an integrative approach (Molecular phylogeny and systematics of terrestrial Ulvophyceae II.). *Phytotaxa* **2017**, *324*, 1–41. [[CrossRef](#)]

70. Darienko, T.; Pröschold, T. Reevaluation and discovery of new species of the rare genus *Watanabea* and establishment of *Massjukichlorella* gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using an integrative approach. *J. Phycol.* **2019**, *55*, 493–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Jung, P.; Briegel-Williams, L.; Schermer, M.; Büdel, B. Strong in combination: Polyphasic approach enhances arguments for cold-assigned cyanobacterial endemism. *Microbiol. Open* **2018**, *8*, e00729. [[CrossRef](#)]
72. Mikhailiyuk, T.I.; Vinogradova, O.M.; Glaser, K.; Demchenko, E.; Karsten, U. Diversity of Terrestrial Algae of Cape Kazantip (the Sea of Azov, Ukraine) and Some Remarks on their Phylogeny and Ecology. *Int. J. Algae* **2018**, *20*, 313–338. [[CrossRef](#)]
73. Williams, L.; Loewen-Schneider, K.; Maier, S.; Büdel, B. Cyanobacterial diversity of western European biological soil crusts along a latitudinal gradient. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2016**, *92*, 157. [[CrossRef](#)]
74. Kabirnatay, S.; Nematzadeh, G.A.; Talebi, A.F.; Saraf, A.; Suradkar, A.; Tabatabaei, M.; Singh, P. Description of novel species of *Aliinostoc*, *Desikacharya* and *Desmonostoc* using a polyphasic approach. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 3413–3426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Jung, P.; Mikhailiyuk, T.; Emrich, D.; Baumann, K.; Dultz, S.; Büdel, B. Shifting Boundaries: Ecological and Geographical Range extension Based on Three New Species in the Cyanobacterial Genera *Cyanocohniella*, *Oculatella*, and *Aliterella*. *J. Phycol.* **2020**, *56*, 1216–1231. [[CrossRef](#)]
76. Kaštovský, J.; Gomez, E.B.; Hladil, J.; Johansen, J.R. *Cyanocohniella calida* gen. et sp. nov. (Cyanobacteria: Aphanizomenonaceae) a new cyanobacterium from the thermal springs from Karlovy Vary, Czech Republic. *Phytotaxa* **2014**, *181*, 279–292. [[CrossRef](#)]
77. Pietrasiak, N.; Osorio-Santos, K.; Shalygin, S.; Martin, M.P.; Johansen, J.R. When Is A Lineage A Species? A Case Study in *Myxocorys* gen. nov. (Synechococcales: Cyanobacteria) with the Description of Two New Species from the Americas. *J. Phycol.* **2019**, *55*, 976–996. [[CrossRef](#)]
78. Komárek, J. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: Principles and applications. *Eur. J. Phycol.* **2016**, *51*, 346–353. [[CrossRef](#)]
79. Komárek, J.; Kaštovský, J.; Mareš, J.; Johansen, J.R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* **2014**, *86*, 295–335.
80. Komárek, J. Quo vadis, taxonomy of cyanobacteria (2019). *Fottea* **2020**, *20*, 104–110. [[CrossRef](#)]
81. Fawley, M.W.; Fawley, K.P. Identification of eukaryotic microalgal strains. *J. Appl. Phycol.* **2020**, *32*, 2699–2709. [[CrossRef](#)]
82. Mikhailiyuk, T.; Vinogradova, O.M.; Holzinger, A.; Glaser, K.; Samolov, E.; Karsten, U. New record of the rare genus *Crinalium* Crow (Oscillatoriales, Cyanobacteria) from sand dunes of the Baltic Sea, Germany: Epitypification and emendation of *Crinalium magnum* Fritsch et John based on an integrative approach. *Phytotaxa* **2019**, *400*, 165–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Samolov, E.; Mikhailiyuk, T.; Lukešová, A.; Glaser, K.; Büdel, B.; Karsten, U. Usual alga from unusual habitats: Biodiversity of Klebsormidium (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) from the phylogenetic superclade G isolated from biological soil crusts. *Mol. Phylogenetics Evol.* **2019**, *133*, 236–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Starr, R.C.; Zeiskus, J.A. UTEX—The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* **1993**, *29*, 1–106. [[CrossRef](#)]
85. Stanier, R.Y.; Kunisawa, R.; Mandel, M.; Cohen-Bazire, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* **1971**, *35*, 171–205. [[CrossRef](#)]
86. Mikhailiyuk, T.; Lukešová, A.; Glaser, K.; Holzinger, A.; Obwegeser, S.; Nyporko, S.; Friedl, T.; Karsten, U. New Taxa of Streptophyte Algae (Streptophyta) from Terrestrial Habitats Revealed Using an Integrative Approach. *Protist* **2018**, *169*, 406–431. [[CrossRef](#)]
87. Marin, B.; Palm, A.; Klingberg, M.; Melkonian, M. Phylogeny and Taxonomic Revision of Plastid-Containing Euglenophytes based on SSU rDNA Sequence Comparisons and Synapomorphic Signatures in the SSU rRNA Secondary Structure. *Protist* **2003**, *154*, 99–145. [[CrossRef](#)]
88. Marin, B.; Klingberg, M.; Melkonian, M. Phylogenetic Relationships among the Cryptophyta: Analyses of Nuclear-Encoded SSU rRNA Sequences Support the Monophyly of Extant Plastid-Containing Lineages. *Protist* **1998**, *149*, 265–276. [[CrossRef](#)]
89. Wilmotte, A.; Van Der Auwera, G.; De Wachter, R. Structure of the 16 S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis HTF* ('*mastigocladus laminosus* HTF') strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Lett.* **1993**, *317*, 96–100. [[CrossRef](#)]

90. Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*; Stackebrandt, E., Goodfellow, M., Eds.; John Wiley and Sons: Hoboken, NJ, USA, 1991; pp. 115–175.
91. Hoef-Emden, K.; Melkonian, M. Revision of the Genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae): A Combination of Molecular Phylogeny and Morphology Provides Insights into a Long-Hidden Dimorphism. *Protist* **2003**, *154*, 371–409. [[CrossRef](#)]
92. Goff, L.J.; Moon, D.A. PCR amplification of nuclear and plastid genes from algal herbarium specimens and algal spores. *J. Phycol.* **1993**, *29*, 381–384. [[CrossRef](#)]
93. Marin, B.; Nowack, E.C.M.; Melkonian, M. A Plastid in the Making: Evidence for a Second Primary Endosymbiosis. *Protist* **2005**, *156*, 425–432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
95. Edgar, R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1792–1797. [[CrossRef](#)]
96. Ronquist, F.; Teslenko, M.; Van Der Mark, P.; Ayres, D.L.; Darling, A.; Höhna, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M.A.; Huelsenbeck, J.P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. *Syst. Biol.* **2012**, *61*, 539–542. [[CrossRef](#)]
97. Bock, C.; Krienitz, L.; Pröschold, T. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea* **2011**, *11*, 293–312. [[CrossRef](#)]
98. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)]
99. Guiry, M.D.; Guiry, G.M. *AlgaeBase*; World-Wide Electronic Publication. National University of Ireland: Galway, Ireland, 2020. Available online: <https://www.algaebase.org> (accessed on 4 September 2020).
100. Ettl, H.; Gärtner, G. *Syllabus der Boden- Luft- und Flechtenalgen*, 2nd ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; ISBN 978-3-642-39461-4.
101. Henley, W.J.; Hironaka, J.L.; Guillou, L.; Buchheim, M.A.; Buchheim, J.A.; Fawley, M.W.; Fawley, K.P. Phylogenetic analysis of the ‘Nannochloris-like’ algae and diagnoses of *Picochlorum oklahomensis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycologia* **2004**, *43*, 641–652. [[CrossRef](#)]
102. Hodač, L.; Hallmann, C.; Spitzer, K.; Elster, J.; Faßhauer, F.; Brinkmann, N.; Lepka, D.; Diwan, V.; Friedl, T. Widespread green algae *Chlorella* and *Stichococcus* exhibit polar-temperate and tropical-temperate biogeography. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2016**, *92*, fiw122. [[CrossRef](#)]
103. Nakada, T.; Nozaki, H.; Pröschold, T. Molecular phylogeny, ultrastructure, and taxonomic revision of *Ofchlorogonium* (Chlorophyta): Emendation of *Ofchlorogonium* and description of *Gungnir* gen. nov. and *Rusalka* gen. nov. *J. Phycol.* **2008**, *44*, 751–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Dykstra, R.F. *Borodinellopsis texensis*: Gen. et sp. nov. A new alga from the Texas Gulf coast. In *Contributions in Phycology*; Parker, B., Brown, R.M.J., Eds.; Phycological Society of America: Lawrence, KS, USA, 1971; pp. 1–8.
105. Watanabe, S.; Lewis, L.A. Phylogenetic interpretation of light and electron microscopic features of selected members of the phylogroup Moewusinia (Chlorophyceae), with new generic taxonomy. *Phycologia* **2017**, *56*, 329–353. [[CrossRef](#)]
106. Matsuzaki, R.; Nakada, T.; Hara, Y.; Nozaki, H. Description of *Chloromonas kasaiae* sp. nov. (Volvocales, Chlorophyceae), based on comparative electron microscopy and molecular data. *Phycologia* **2013**, *52*, 239–245. [[CrossRef](#)]
107. Matsuzaki, R.; Hara, Y.; Nozaki, H. A taxonomic revision of *Chloromonas reticulata* (Volvocales, Chlorophyceae), the type species of the genus *Chloromonas*, based on multigene phylogeny and comparative light and electron microscopy. *Phycologia* **2012**, *51*, 74–85. [[CrossRef](#)]
108. Pröschold, T.; Marin, B.; Schlösser, U.G.; Melkonian, M. Molecular Phylogeny and Taxonomic Revision of (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas ehrenberg* and *Chloromonas gobi*, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist* **2001**, *152*, 265–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Fuíková, K.; Flechtner, V.R.; Lewis, L.A. Revision of the genus *Bracteacoccus* Tereg (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on a phylogenetic approach. *Nova Hedwigia* **2013**, *96*, 15–59. [[CrossRef](#)]
110. Wynne, M.J.; Hallan, J.K. Reinstatement of *Tetrademus* G. M. Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Feddes Repert.* **2015**, *126*, 83–86. [[CrossRef](#)]

111. Kaufnerová, V.; Eliáš, M. The demise of the genus *Scotiellopsis* Vinatzer (Chlorophyta). *Nova Hedwigia* **2013**, *97*, 415–428. [[CrossRef](#)]
112. Darienko, T.; Friedl, T.; Pröschold, T. *Desmochloris mollenhaueri* a new terrestrial ulvophycean alga from south-west African soils. (Molecular phylogeny and systematics of terrestrial Ulvophyceae I.). *Algol. Stud.* **2009**, *129*, 25–40. [[CrossRef](#)]
113. Watanabe, S.; Kuroda, N.; Maiwa, F. Phylogenetic status of *Helicodictyon planctonicum* and *Desmochloris halophila* gen. et comb. nov. and the definition of the class Ulvophyceae (Chlorophyta). *Phycologia* **2001**, *40*, 421–434. [[CrossRef](#)]
114. Dangeard, P.J.L.; Guiry, M.D. Validation of some invalid names for green algae introduced by P.J.L. Dangeard. *Not. Algarum* **2017**, *42*, 1–2.
115. O'Kelly, C.J.; Wysor, B.; Bellows, W.K. Collinsella (Ulvophyceae, Chlorophyta) and other ulotrichalean taxa with shell-boring sporophytes form a monophyletic clade. *Phycologia* **2004**, *43*, 41–49. [[CrossRef](#)]
116. Lindstrom, S.C.; Hanic, L.A. The phylogeny of North American Urospora (Ulotrichales, Chlorophyta) based on sequence analysis of nuclear ribosomal genes, introns and spacers. *Phycologia* **2005**, *44*, 194–201. [[CrossRef](#)]
117. Hanic, L.A.; Lindstrom, S.C. Life History and Systematic Studies of *Pseudothrix borealis* gen. et sp. nov. (=North Pacific Capsosiphon groenlandicus, Ulotrichaceae, Chlorophyta). *ALGAE* **2008**, *23*, 119–133. [[CrossRef](#)]
118. Darienko, T.; Lukešová, A.; Pröschold, T. The polyphasic approach revealed new species of Chloroidium (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phytotaxa* **2018**, *372*, 51–66. [[CrossRef](#)]
119. Pröschold, T.; Darienko, T. The green puzzle *Stichococcus* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta): New generic and species concept among this widely distributed genus. *Phytotaxa* **2020**, *441*, 113–142. [[CrossRef](#)]
120. Fawley, M.W.; Fawley, K.P.; Buchheim, M.A. Molecular Diversity among Communities of Freshwater Microchlorophytes. *Microb. Ecol.* **2004**, *48*, 489–499. [[CrossRef](#)]
121. Darienko, T.; Gustavs, L.; Pröschold, T. Species concept and nomenclatural changes within the genera *Elliptochloris* and *Pseudochlorella* (Trebouxiophyceae) based on an integrative approach. *J. Phycol.* **2016**, *52*, 1125–1145. [[CrossRef](#)]
122. Perkeron, R.B.I.; Johansen, J.R.; Kováčik, L.; Brand, J.; Kaštovský, J.; Casamatta, D.A. A unique pseudanabaenalean (Cyanobacteria) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data. *J. Phycol.* **2011**, *47*, 1397–1412. [[CrossRef](#)]
123. Radzi, R.; Muangmai, N.; Broady, P.; Omar, W.M.W.; Lavoue, S.; Convey, P.; Merican, F.M.M.S. *Nodosilinea signiensis* sp. nov. (Leptolyngbyaceae, Synechococcales), a new terrestrial cyanobacterium isolated from mats collected on Signy Island, South Orkney Islands, Antarctica. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0224395. [[CrossRef](#)]
124. Darienko, T.; Gustavs, L.; Eggert, A.; Wolf, W.; Pröschold, T. Evaluating the Species Boundaries of Green Microalgae (Coccomyxa, Trebouxiophyceae, Chlorophyta) Using Integrative Taxonomy and DNA Barcoding with Further Implications for the Species Identification in Environmental Samples. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0127838. [[CrossRef](#)]
125. Mikhailuyuk, T.I. Terrestrial Algae from the Granite Outcrops of River Valleys of the Ukraine. *Int. J. Algae* **2013**, *15*, 311–330. [[CrossRef](#)]
126. Schwarz, K. Neue Bodenalgen aus Dalmatien. *Plant Syst. Evol.* **1979**, *131*, 193–209. [[CrossRef](#)]
127. Jónsson, S. The status of the Acrosiphoniales (Chlorophyta). *Rit Fiskid.* **1999**, *16*, 187–196.
128. Sciuto, K.; Lewis, L.A.; Verleyen, E.; Moro, I.; La Rocca, N. *Chodatodesmus australis* sp. nov. (Scenedesmaceae, Chlorophyta) from Antarctica, with the emended description of the genus *Chodatodesmus*, and circumscription of *Flechtneria rotunda* gen. et sp. nov. *J. Phycol.* **2015**, *51*, 1172–1188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Wynne, M.J.; Furnari, G. A census of J.P.L. Dangeard's invalid taxa with proposals to resolve the nomenclatural problems of some of them. *Nova Hedwigia* **2014**, *98*, 515–527. [[CrossRef](#)]
130. Dangeard, P. Sur quelques algues vertes marines nouvelles observées en culture. *Botaniste* **1966**, *49*, 5–45.
131. Davydov, D.; Shalygin, S.; Vilnet, A.A. New cyanobacterium *Nodosilinea svalbardensis* sp. nov. (Prochlorotrichaceae, Synechococcales) isolated from alluvium in Mimer river valley of the Svalbard archipelago. *Phytotaxa* **2020**, *442*, 61–79. [[CrossRef](#)]
132. Vázquez-Martínez, J.; Gutierrez-Villagomez, J.M.; Fonseca-García, C.; Ramirez-Chavez, E.; Mondragón-Sánchez, M.L.; Partida-Martínez, L.; Johansen, J.R.; Molina-Torres, J. *Nodosilinea chupicuarensis* sp. nov. (Leptolyngbyaceae, Synechococcales) a subaerial cyanobacterium isolated from a stone monument in central Mexico. *Phytotaxa* **2018**, *334*, 167–182. [[CrossRef](#)]

133. Raabová, L.; Kovacik, L.; Elster, J.; Strunecký, O. Review of the genus *Phormidesmis* (Cyanobacteria) based on environmental, morphological, and molecular data with description of a new genus *Leptodesmis*. *Phytotaxa* **2019**, *395*, 1–16. [[CrossRef](#)]
134. Pocock, T.; Vetterli, A.; Falk, S. Evidence for phenotypic plasticity in the Antarctic extremophile *Chlamydomonas raudensis* Ettl. UWO 241. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 1169–1177. [[CrossRef](#)]
135. Qiao, K.; Takano, T.; Liu, S. Discovery of two novel highly tolerant NaHCO₃ Trebouxiophytes: Identification and characterization of microalgae from extreme saline-alkali soil. *Algal Res.* **2015**, *9*, 245–253. [[CrossRef](#)]
136. Metting, B. The systematics and ecology of soil algae. *Bot. Rev.* **1981**, *47*, 195–312. [[CrossRef](#)]
137. Punčochářová, M.; Kalina, T. Taxonomy of the genus *Scotiellopsis* Vinatzer (Chlorococcales, Chlorophyta). *Arch. Hydrobiol.* **1981**, *27*, 119–147. [[CrossRef](#)]
138. Hanagata, N. New species of *Coelastrella* and *Scenedesmus* (Chlorophyceae, Chlorophyta). *J. Jpn. Bot.* **2001**, *76*, 129–136.
139. Verses, P.A.; Trainor, F.R. *Dactylococcus dissociatus*, a New Species from a Connecticut Cornfield Soil. *Phycologia* **1966**, *6*, 79–82. [[CrossRef](#)]
140. Bagchi, S.N.; Dubey, N.; Singh, P. Phylogenetically distant clade of Nostoc-like taxa with the description of *Aliinostoc* gen. nov. and *Aliinostoc morphoplasticum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, 3329–3338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Taton, A.; Grubisic, S.; Ertz, D.; Hodgson, D.A.; Piccardi, R.; Biondi, N.; Tredici, M.R.; Mainini, M.; Losi, D.; Marinelli, F.; et al. Polyphasic study of antarctic cyanobacterial strains. *J. Phycol.* **2006**, *42*, 1257–1270. [[CrossRef](#)]
142. Cole, J.K.; Hutchison, J.R.; Renslow, R.S.; Kim, Y.-M.; Chrisler, W.B.; Engelmann, H.E.; Dohnalkova, A.; Hu, D.; Metz, T.O.; Fredrickson, J.K.; et al. Phototrophic biofilm assembly in microbial-mat-derived unicyanobacterial consortia: Model systems for the study of autotroph-heterotroph interactions. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 109. [[CrossRef](#)]
143. Alvarenga, D.O.; Rigonato, J.; Branco, L.H.Z.; Melo, I.S.; Fiore, M.F. *Phyllonema avicenniicola* gen. nov., sp. nov. and *Foliisarcina bertioagensis* gen. nov., sp. nov., epiphyllic cyanobacteria associated with *Avicennia schaueriana* leaves. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2016**, *66*, 689–700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Barcytė, D.; Hodač, L. *Watanabea acidotolerans*: A new trebouxiophyte lineage (Chlorophyta) inhabiting low pH environments from Europe to South America. *Phycol. Res.* **2018**, *67*, 120–127. [[CrossRef](#)]
145. Darienko, T.; Rad-Menéndez, C.; Campbell, C.; Pröschold, T. Are there any true marine *Chlorella* species? Molecular phylogenetic assessment and ecology of marine *Chlorella*-like organisms, including a description of *Droopiella* gen. nov. *Syst. Biodivers.* **2019**, *17*, 811–829. [[CrossRef](#)]
146. Sommer, V.; Kockx, M.; Wölk, A.; Glaser, K. Von Vogelkot zu grünen Teppichen. *Biol. Unserer Zeit* **2019**, *49*, 122–130. [[CrossRef](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1.5. Водорості і ціанобактерії біологічних ґрунтових кірочок різних рослинно-кліматичних зон Чилі (Південна Америка) в контексті інтегративного підходу щодо оцінки їхнього різноманіття



Article

Biodiversity of Algae and Cyanobacteria in Biological Soil Crusts Collected Along a Climatic Gradient in Chile Using an Integrative Approach

Elena Samolov ^{1,*}, Karen Baumann ², Burkhard Büdel ³ , Patrick Jung ⁴ , Peter Leinweber ², Tatiana Mikhailyuk ⁵, Ulf Karsten ¹ and Karin Glaser ^{1,*}

¹ Applied Ecology and Phycology, Institute of Biological Sciences, University of Rostock, Albert-Einstein-Straße 3, 18059 Rostock, Germany; ulf.karsten@uni-rostock.de

² Faculty of Agricultural and Environmental Science, Soil Science, University of Rostock, Justus-von-Liebig-Weg 6, 18051 Rostock, Germany; karen.baumann@uni-rostock.de (K.B.); peter.leinweber@uni-rostock.de (P.L.)

³ Plant Ecology and Systematics, University of Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Straße 13, 67663 Kaiserslautern, Germany; buedel@bio.uni-kl.de

⁴ Applied Logistics and Polymer Sciences, University of Applied Sciences Kaiserslautern, Carl-Schurz Straße 10-16, 66953 Pirmasens, Germany; patrick_jung90@web.de

⁵ M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereshchenkivska Str. 2, Kyiv 01004, Ukraine; t-mikhailyuk@ukr.net

* Correspondence: elena.samolov@uni-rostock.de (E.S.); karin.glaser@uni-rostock.de (K.G.)

Received: 19 May 2020; Accepted: 26 June 2020; Published: 14 July 2020



Abstract: Biocrusts are associations of various prokaryotic and eukaryotic microorganisms in the top millimeters of soil, which can be found in every climate zone on Earth. They stabilize soils and introduce carbon and nitrogen into this compartment. The worldwide occurrence of biocrusts was proven by numerous studies in Europe, Africa, Asia and North America, leaving South America understudied. Using an integrative approach, which combines morphological and molecular characters (small subunit rRNA and ITS region), we examined the diversity of key biocrust photosynthetic organisms at four sites along the latitudinal climate gradient in Chile. The most northern study site was located in the Atacama Desert (arid climate), followed by open shrubland (semiarid climate), a dry forest region (Mediterranean climate) and a mixed broad leaved-coniferous forest (temperate climate) in the south. The lowest species richness was recorded in the desert (18 species), whereas the highest species richness was observed in the Mediterranean zone (40 species). Desert biocrusts were composed exclusively of single-celled Chlorophyta algae, followed by cyanobacteria. Chlorophyta, Streptophyta and cyanobacteria dominated semiarid biocrusts, whereas Mediterranean and temperate Chilean biocrusts were composed mostly of Chlorophyta, Streptophyta and Ochrophyta. Our investigation of Chilean biocrust suggests high biodiversity of South American biocrust phototrophs.

Keywords: biocrust; Chile; eukaryotic algae; cyanobacteria; integrative approach; climate gradient

1. Introduction

Biological soil crusts (biocrusts) are top-soil communities composed of many groups of organisms: bacteria, cyanobacteria, microalgae, microfungi, mosses, lichens, liverworts, protists and invertebrates [1]. Closely connected to soil particles these communities provide vital ecological functions in soil ecosystems—they promote nutrient cycling, increase soil stability, reduce evaporation and increase soil moisture [2]. On a global scale, biocrusts contribute between 40% and 85% to biological

N fixation by terrestrial organisms and with 15% to the global net terrestrial primary production [3]. Biocrusts are often pioneer communities in ecosystems degraded by natural or manmade activities (e.g., habitats affected by fire events or glacier retreat, mining areas, etc.), where they induce soil formation and facilitate the restoration of native vegetation [4,5].

One of the crucial factors for the ecosystem's stability and productivity is the variety of taxa in a natural community. Since phototrophic microorganisms have different, species-specific ecophysiological requirements, i.e., different tolerances against environmental factors, with higher biodiversity the community will have broader tolerance to various abiotic conditions. In addition, a higher number of species can simultaneously provide multiple functions in a biocrust, which will result in the more productive community [6,7]. Hu et al. [8] found that artificial single-species biocrusts were not as effective in soil aggregation as the multispecies crusts. Higher diversity of organisms promotes the resilience of biocrusts to environmental changes without losing the potential to recover to an initial state, which in turn increases the ecosystem's resilience and recovery potential [9].

Biogeographical distribution of species depends on several factors: population size, the efficiency of distribution mechanisms and the availability of suitable habitats. Microalgae and cyanobacteria can be transported to varying distances by air or by moving animals (birds, insects, etc.), yet an efficient dispersal in aero-terrestrial conditions also depends on the resistance of species to survive unfavorable conditions during transport (e.g., desiccation and intensive UV radiation [10]). Aero-terrestrial cyanobacteria and algae have numerous water-holding mechanisms, such as the production of intracellularly accumulated desiccation-protective metabolites (e.g., polyols) or extracellular, thick gelatinous layers and mucilaginous extracellular polymeric substances (EPS), which guarantee more efficient dispersal compared to their aquatic counterparts [10,11]. The availability of favorable habitat conditions is another crucial factor for the occurrence and future role of a taxon in a community. The life-history causes specialists to be niche- and habitat-limited, while generalists are mainly limited by the efficiency of dispersion [12]. Once established in the favorable habitat well-adapted taxa will be the most abundant and mostly predated in the biocrust community, thus these key taxa become the major contributors to nutrient and energy flows in this (micro) ecosystem. On the other hand, rare taxa, which are most of the time in a dormant state or growing extremely slowly, will be present in a lower number and will be exposed to reduced predation pressure [13].

Biocrusts are present in every climate zone on Earth [14]. They are the dominant vegetation type in regions where higher plants are limited by low water contents and/or nutrient supply, such as semiarid and arid areas. Distribution of biocrusts on a global scale depends mainly on water availability and the topography of a habitat. While biocrusts represent typical vegetation of dryland areas, which occupy 41.3% of the Earth's surface [15], these communities can also be found in other regions such as temperate sand dunes and disturbed habitats [14,16–18].

Even though biocrusts are present in every climate zone, these communities are unequally studied on a global level. Most information on biocrust organisms comes from Europe, North America, Asia and Australia. However, biodiversity hotspots, such as Africa and South America, are only little, or not investigated at all. Büdel et al. [19] showed a strong discrepancy between continental size and research focused on biocrust algae. Studies focused on selected geographical areas made Europe and Antarctica have higher species' richness than South America. Biocrust-forming prokaryotic and eukaryotic algae are almost unstudied in South America. According to Büdel et al. [19], only one algal and 40 cyanobacterial species were reported from South American biocrust communities, compared to 43 algal and 65 cyanobacterial species reported from polar biocrusts of Antarctica.

First records of "cryptogamic vegetation" in Chile were studies by Schwabe [20] and Forest & Weston [21], which focused exclusively on the diversity of cyanobacteria and were limited to the arid locations in northern Chile. The first report of eukaryotic algae in Chilean soil was a study by Patzelt et al. [22]. The authors investigated the hyperarid core of the Atacama Desert and the semiarid areas in the vicinity of the Nature Reserve Santa Gracia. This study presented detailed molecular identification of cyanobacteria but did not provide any information on the eukaryotic algae that were

found. Several new cyanobacteria were recently described from the Atacama Desert: *Kastovskya*, *Symplocastrum*, *Myxacorys*, *Trichocoleus* and *Oculatella* species [23–27]. The most recent is a study by Jung et al. [28] which investigated the diversity of hypolithic and edaphic cyanobacteria in two study areas, hyperarid Pan de Azúcar and the semiarid area of the Nature Reserve Santa Gracia; the authors reported 21 cyanobacterial species and the new species *Aliterella chasmolithica* [29].

To which extent the biocrust flora of South America is understudied was shown by the comprehensive publication of Büdel et al. [19] who reviewed 39 scientific papers on a diversity of biocrust algae found globally. Out of reported 360 species of eukaryotic algae, the only taxon found in South America was *Zygogonium ericetorum*. A new species and new varieties of rare green alga *Pleurostrosarcina* were described recently from a biocrust of National Park Pan de Azúcar and Nature Reserve Santa Gracia [30]. The first insight into the diversity of biocrust cyanobacteria and algae along the climatic gradient in Chile was provided by Baumann et al. [4]. This study, however, was based on the identification of organisms on morphological traits only. In a more recent study by Samolov et al. [31] four new species and two varieties of the filamentous genus *Klebsormidium* (Streptophyta) were described based on 19 strains isolated from the Chilean biocrusts. *Klebsormidium* is one of the key taxa in biocrusts worldwide [19,32].

Since all previous studies of terrestrial cyanobacteria and eukaryotic algae were focused exclusively on the arid area of the Atacama Desert, the objective of present study was to document in detail the diversity of key biocrust photosynthetic microorganisms in study areas which follow the precipitation gradient along the Pacific coast of Chile. We hypothesized that the precipitation gradient shaped the biocrust photosynthetic microorganism communities, i.e., the drier the habitat the lower the species richness. For the first time, Chilean biocrust cyanobacteria and eukaryotic algae were analyzed and identified based on both morphological and molecular characters.

2. Materials and Methods

2.1. Study Site

Biocrust samples were collected from all four study areas of the EarthShape priority program funded by the German Research Council (DFG) [4]. The sampling locations were situated within a north–south precipitation gradient, with National Park Pan de Azúcar (PA) in the arid north at 651 m above sea level (ASL), Nature Reserve Santa Gracia (SG) in the semiarid zone at 706 m ASL, National Park La Campana (LC) in the Mediterranean climate zone at 726 m ASL and National Park Nahuelbuta (NB) at 770 m ASL in the temperate-humid zone of Chile (Figure 1).

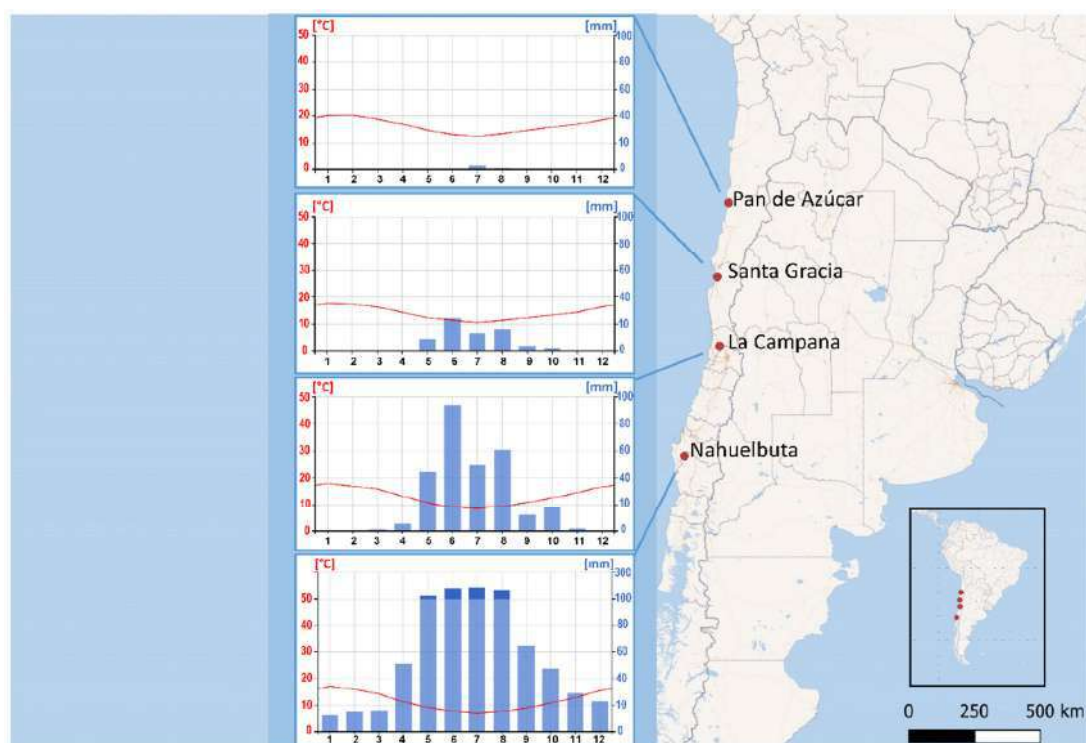


Figure 1. Map of the study locations in Chile with climate graph for each location. Shown are the monthly average values of diurnal temperature (°C) represented with red line, and precipitation (mm) represented with blue bars; months are represented numerically. Source: climatecharts.net, EarthShape weather data collection.

Prominent latitudinal precipitation gradient along the Pacific coast of Chile caused distinct climate and vegetation zones. From the cold coastal Atacama Desert in the North with $14.7 \text{ mm}\cdot\text{y}^{-1}$ in Pan de Azúcar (PA) mean annual precipitation gradually increases towards the south, reaching $934.3 \text{ mm}\cdot\text{y}^{-1}$ in Nahuelbuta (NB). Located in the semiarid area Santa Gracia (SG) receives $83.4 \text{ mm}\cdot\text{y}^{-1}$, while Mediterranean La Campana (LC) receives $314.5 \text{ mm}\cdot\text{y}^{-1}$ [4]. The aridity in PA and SG is alleviated by the coastal fog which stretches inland via fluvial channels [33] and increases water deposition by $1.4 \text{ L m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ in PA and $3.0 \text{ L m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ in SG [34].

Higher vegetation reflects the precipitation gradient along the Chilean coast. Vegetation in desert PA is scarce, limited by a strong water deficit. The landscape is dominated by biocrusts, which cover up to 40% of soil and by sporadic small bush vegetation. In semiarid SG, vegetation is composed of drought-deciduous shrubs, cacti and biocrusts. Biocrusts, which cover up to 15% of the soil surface, were under strong mechanical disturbance by livestock grazing and trampling. As the mean annual precipitation increases, it promotes the development of higher plants, which in turn has a negative effect on the areal coverage of biocrusts. In both Mediterranean LC and temperate, forested NB, biocrust covered only up to 5% of soil surface. In these areas, biocrusts are limited to locations where the dominant plant cover is disrupted by natural or manmade disturbances (data presented in Bernhard et al. [35]).

Desert biocrusts of PA were composed of predominantly chlorolichens and green algae, with cyanobacteria being present sporadically, and bryophyte being absent from the community. Biocrust communities in semiarid SG were showing a prevalence of chlorolichens compared to bryophyta. Cyanobacteria were the dominant component in these communities when compared to eukaryotic algae. Compared to other biocrusts along the precipitation gradient, Mediterranean LC communities were predominantly composed of eukaryotic algae, followed by cyanobacteria and bryophyta; chlorolichens represented a very low portion of the community. In the temperate region

of Nahuelbuta higher plants dominate the landscape, biocrusts are dominated by bryophyta and eukaryotic algae, while the species' richness of *N*-fixing cyanobacteria decreases. In these communities no chlorolichens were present (data are shown in Bernhard et al. [35]).

Biocrust material was collected during sampling campaigns in January and March 2016. Samples were collected according to the sampling procedure described in detail in Schulz et al. [36]. In short, two biocrust samples from each study site were taken from the upper, topsoil layer (<5 mm) by pushing a spatula gently below the biocrust. The spatula with the biocrust was then lifted, and the sample was carefully transferred into a small paper box. These samples had a surface area of approximately 6 × 6 cm and a thickness of <5 mm. The collected material was air-dried for the transport, then kept in the laboratory at room temperature in the dark. Biocrust material was used for the establishment of enrichment cultures within three weeks after the sampling.

2.2. Cultivation of Strains and Morphological Identification

In order to identify biocrust-forming photosynthetic organisms, an integrative approach was applied. Small amounts of biocrust material (approximately 1 × 1 cm) were inoculated on solid 3N Bold's Basal Medium (3 N BBM) with 1.5% Difco agar (Fisher Scientific, Schwerte, Germany) [37] to promote the growth of eukaryotic algae. The same inoculation method was applied for the establishment of enrichment cultures on the solid BG11 agar plates, to promote the development of cyanobacteria from the biocrust community. Diatoms were not investigated in the present study since the applied methods of cultivation and identification (light microscopy) were not appropriate for this algal group (e.g., Schulz et al. [36]).

Enrichment cultures were incubated at room temperature, under a photon fluence rate of approximately 30- $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (light source: Osram Daylight Lumilux Cool White lamps (L36 W/840); Osram, Munich, Germany) and a 16:8 h light–dark cycle [36]. After 4-week cultivation single colonies of algae or cyanobacteria could be observed, which were then transferred to new 3-N BBM or BG11 [38] agar plates to establish pure clonal cultures; the unialgal or unicyanobacterial cultures were cultivated under the same conditions.

Morphological characters of every isolated biocrust alga or cyanobacterium were examined with a stereoscopic microscope Olympus SZX16 and Olympus BX51 light microscope with Nomarski DIC optics (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) at 1000-fold magnification (oil immersion). Photomicrographs were taken with digital camera Olympus UC30 (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany) attached to the microscope and processed with the Olympus cellSens Entry software (v. 2.1, Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany). Morphological identification of eukaryotic algae was based on Ettl & Gärtner [39] and the latest scientific literature on specific taxa; morphological identification of cyanobacteria was based on Komárek & Anagnostidis [40] and Komárek [41] as well as latest scientific literature on specific cyanobacterial taxa.

2.3. DNA Extraction, PCR

DNA of selected algal strains was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences of small subunit (SSU) rRNA gene together with ITS-1-5.8S-ITS-2 region of Chlorophyta and Streptophyta were amplified using a set of Taq PCR Mastermix Kit (Qiagen, Hilden, Germany), a complex of EAF3, ITS055R [42,43] and algal-specific primers G500 F and G800R [30]. The PCR was conducted according to Mikhailiuk et al. [44]. The PCR products were cleaned with the SureClean Plus purification kit (Bioline, Luckenwalde, Germany) according to the manufacturer's instructions. Cleaned PCR products were sequenced commercially by Qiagen Company (Hilden, Germany) using primers EAF3, 536R, 920F, 1400R, GR and GF [43,45–47]. The resulting sequences were assembled and edited using Geneious software (v. 8.1.8; Biomatters). They were deposited at GenBank under the accession numbers MT735190-MT735212 and MT738691-MT738694.

Total genomic DNA of cyanobacterial isolates was extracted by the cetrimonium bromide (CTAB) method followed by phenol-chloroform-isoamyl alcohol purification adapted for biocrusts [48]. A nested PCR approach was chosen for a first PCR with the primer set 27F1 and 1494Rc followed by a subsequent second PCR with the primer set CYA361f and CYA785r for cyanobacteria [49], with an annealing temperature of 61 °C. The obtained PCR products were cleaned by using the NucleSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany). Cleaned PCR products were sequenced by Seq-It GmbH & Co. KG (Kaiserslautern, Germany), and the sequences were submitted to GenBank (Accession No. MT702999-MT703004).

2.4. Phylogenetic Analyses

Sequences of the algal and cyanobacterial isolates were compared to those from reference strains in NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using BLASTn queries [50] to find the closest relatives; the NCBI database was searched for algae on 22 January and for cyanobacteria on 17 February 2020. When possible we used sequences of authentic algal and cyanobacterial strains, on which the formal taxonomic description of a specific species was based. We included also edaphic cyanobacteria from SG and PA described by Jung et al. [51] for our analysis. Multiple alignments of nucleotide sequences of the SSU rRNA were made with the Mafft web server (v. 7 [49]), followed by manual editing in the program BioEdit (v. 7.2). Alignments for the phylogeny of the ITS-1,2 were performed manually in BioEdit, taking into account the secondary structure of the RNA in the region. The evolutionary model that was best suited to the database used was selected based on the lowest AIC value [52] and calculated in MEGA (version 6 [53]). Phylogenetic trees were constructed in the program MrBayes 3.2.2 [54], using an evolutionary model GTR + G + I, with 5,000,000 generations. Two of the four runs of the Markov chain Monte Carlo were made simultaneously, with the trees, taken every 500 generations. Split frequencies between runs at the end of the calculations were below 0.01. The trees selected before the likelihood rate reached saturation were subsequently rejected. The reliability of tree topology was verified by maximum-likelihood analysis (ML), using the program GARLI 2.0 [55], and the bootstrap support was calculated with 1000 replicates.

3. Results

3.1. Diversity of Algae—Identification Based on Morphology and Molecular Phylogeny

The total species list of algae includes 63 taxa belonging to infrakingdom Chlorophyta, phylum Chlorophyta (45 species among classes Chlorophyceae (23) and Trebouxiophyceae (22)), Streptophyta (13 species, classes Klebsormidiophyceae (11) and Zygnematophyceae (2)) and Ochrophyta (5 species, classes Xanthophyceae (3) and Eustigmatophyceae (2)). This list was obtained based on the culture-dependent approach in combination with morphological traits (Table 1). Some of these strains were additionally analyzed using molecular markers.

Table 1. Species composition of eukaryotic algae from biological soil crusts of Chile.

Species	Localities			
	NB	LC	SG	PA
Chlorophyta—45 species				
Chlorophyceae—23 species				
<i>Bracteacoccus bullatus</i>	–	1	–	–
<i>Bracteacoccus medionucleatus</i>	–	1	–	–
<i>Bracteacoccus</i> sp.	1	1	–	–
<i>Chlamydomonas</i> cf. <i>pseudoelegans</i>	–	1	–	–
<i>Chlamydomonas</i> sp.1	1	–	–	–
<i>Chlamydomonas</i> sp.2	–	1	–	–
<i>Chlorococcum</i> cf. <i>minimum</i>	–	1	–	–
<i>Chlorococcum</i> cf. <i>minutum</i>	–	1	–	–
<i>Chlorococcum</i> cf. <i>oleofaciens</i>	–	1	–	–
<i>Chlorococcum echinozygotum</i>	–	1	–	–
<i>Chlorococcum</i> sp.1	–	–	1	1
<i>Chlorococcum</i> sp.2	1	–	–	–
<i>Chlorosarcinopsis</i> cf. <i>gelatinosa</i>	–	–	1	–
<i>Fasciculochloris</i> sp.	–	1	1	–
<i>Heterochlamydomonas</i> cf. <i>inaequalis</i>	–	1	–	–
<i>Heterochlamydomonas</i> sp.	–	–	1	–
<i>Ixipapillifera</i> sp.	–	1	–	–
<i>Lobochlamys</i> <i>segnis</i>	1	1	–	–
<i>Macrochloris</i> sp.	1	–	–	–
<i>Neospongiococcum</i> cf. <i>excentricum</i>	1	–	–	–
<i>Oogamochlamydia</i> gen. sp.	–	1	–	–
<i>Pseudomuriella aurantiaca</i>	1	–	–	–
<i>Tetracystis intermedia</i>	–	–	1	–
	7	14	5	1
Trebouxiophyceae—22 species				
<i>Chlorella</i> sp.	1	1	–	–
<i>Chloroidium</i> sp.	–	–	–	1
<i>Coccomyxa simplex</i>	1	–	–	–
<i>Desmococcus</i> sp.	–	–	1	–
<i>Diplosphaera chodatii</i>	1	1	1	1
<i>Edaphochlorella mirabilis</i>	–	–	1	–
<i>Elliptochloris perforata</i>	–	–	–	1
<i>Elliptochloris subsphaerica</i>	1	1	1	–
<i>Gloeocystis</i> cf. <i>vesiculosa</i>	1	1	–	–
<i>Gloeocystis</i> sp.	–	–	–	1
<i>Keratococcus raphidioides</i>	–	1	–	–
<i>Leptosira</i> cf. <i>erumpens</i>	–	1	–	–
<i>Lobosphaera incisa</i>	1	1	–	1
<i>Myrmecia</i> cf. <i>astigmatica</i>	–	–	–	1
<i>Myrmecia</i> cf. <i>bisecta</i>	1	1	–	–
<i>Myrmecia</i> sp.	1	–	–	1
<i>Neocystis</i> cf. <i>brevis</i>	1	–	–	–
<i>Parietochloris</i> cf. <i>pseudoalveolaris</i>	1	–	–	–
<i>Stichococcus</i> sp.	–	–	–	1

Table 1. Cont.

Species	Localities			
	NB	LC	SG	PA
<i>Trebouxia</i> sp.	–	–	–	1
<i>Watanabea borystenica</i>	–	1	–	–
<i>Xerochlorella minuta</i>	–	1	–	–
	10	10	4	9
Streptophyta—12 species				
Klebsormidiophyceae—10 species				
<i>Interfilum massjukiae</i>	1	–	–	1
<i>Interfilum</i> sp. 1	1	–	–	–
<i>Interfilum</i> sp. 2	–	1	–	–
<i>Klebsormidium chilense</i>	–	1	–	–
<i>Klebsormidium delicatum</i> var. <i>americanum</i>	1	–	–	–
<i>Klebsormidium delicatum</i> var. <i>deserticum</i>	–	–	1	–
<i>Klebsormidium deserticola</i>	–	–	1	–
<i>Klebsormidium fluitans</i>	1	–	–	–
<i>Klebsormidium nitens</i>	–	1	–	–
<i>Klebsormidium</i> sp.	1	–	–	–
<i>Klebsormidium sylvaticum</i>	1	–	–	–
	6	3	2	1
Zygnematophyceae—2 species				
<i>Cylindrocystis brebissonii</i>	–	1	–	–
<i>Cylindrocystis crassa</i>	–	1	–	–
	–	2	–	–
Ochrophyta—5 species				
Xanthophyceae—3 species				
<i>Botrydiopsis</i> cf. <i>constricta</i>	–	1	–	–
<i>Botrydiopsis</i> cf. <i>intercedens</i>	–	1	1	–
<i>Xantonema exile</i>	–	1	–	–
	–	3	1	–
Eustigmatophyceae—2 species				
<i>Vischeria magna</i>	1	–	1	–
<i>Vischeria vischeri</i>	–	1	1	–
	1	1	2	–

Species whose original strains were studied by molecular phylogenetic methods are marked in bold. Abbreviations: sp.—species, cf.—(lat. confere) compare with.

Phylogenetic analysis of SSU rRNA included 21 strains of algae from classes Chlorophyceae and Trebouxiophyceae.

Chlorophyceae strains were distributed between the two main groups: Chlamydomonadales: genera *Lobochlamys* (Oogamochlamydia), *Fasciculochloris* and *Heterochlamydomonas* (*Reinhardtina*), *Ixipapillifera* (*Chloromonadinia*), *Tetracystis* (*Dunaliellinia*); and Spaheropleales (genus *Bracteacoccus*).

Lobochlamys strains corresponded to *L. segnis* and formed a separate lineage inside Oogamochlamydia which was impossible to identify as known genus or species. Strain 4SG-4 could represent a species of *Fasciculochloris*, but it was distant from the authentic strain *F. boldii*. One of the *Heterochlamydomonas* strains was close to *H. inaequalis*, another one formed a separate lineage inside this genus. A *Tetracystis* strain from *Dunaliellinia* was close to the authentic strains of *T. intermedia* and *T. pulchra*. *Bracteacoccus* strains corresponded to *B. bullatus* and formed a separate unidentified lineage inside the genus (Figure 2).

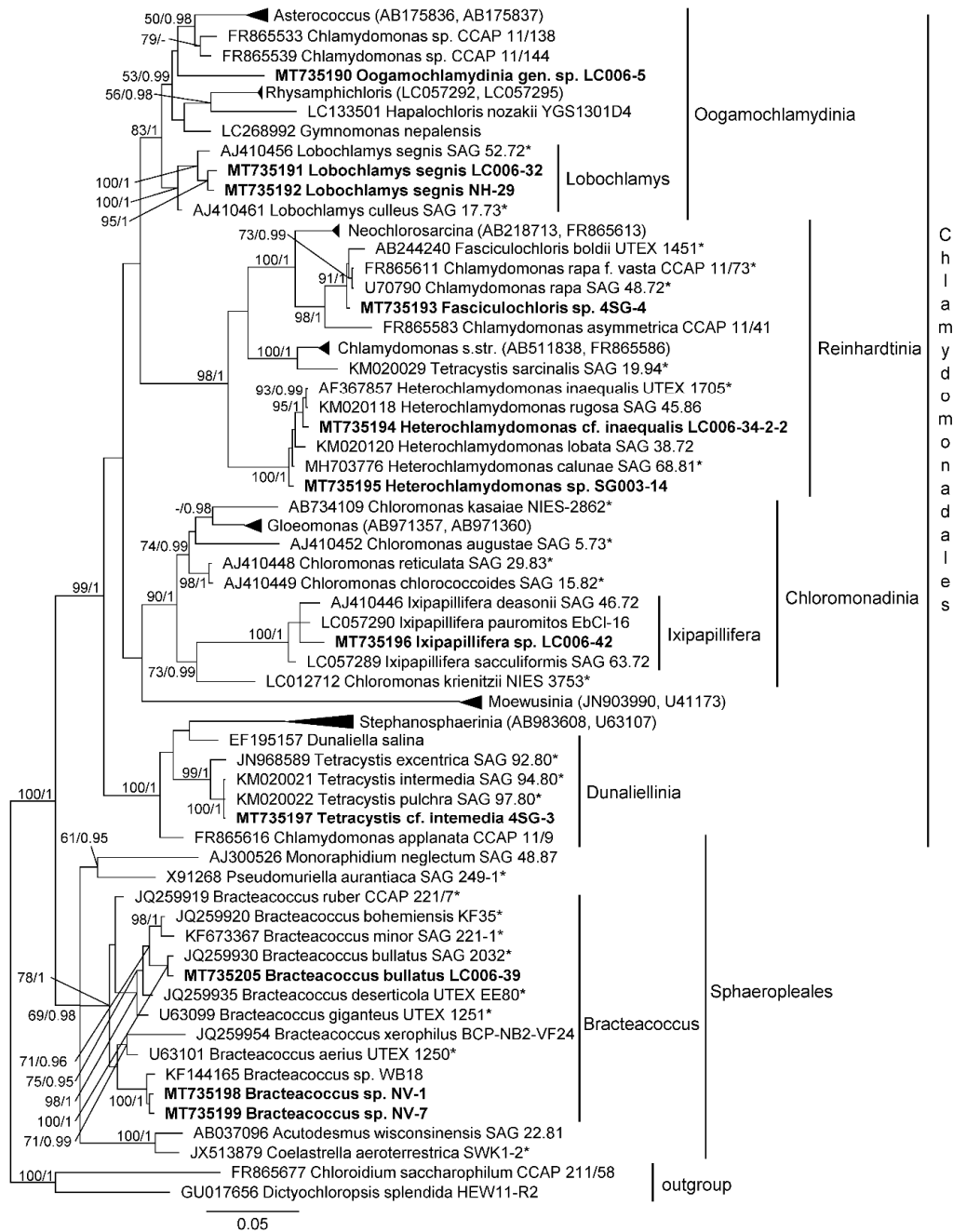


Figure 2. Molecular phylogeny of Chlorophyceae based on SSU rRNA sequence analysis. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian posterior probabilities (PP) and maximum likelihood bootstrap support (BP); branches supported in both analyses (Bayesian values > 0.9 and bootstrap values > 60%) are labeled. Strains marked with an asterisk are authentic strains; strains in bold represent newly sequenced algae.

Trebouxiophyceae strains were distributed among the genera *Watanabea*, *Coccomyxa*, *Elliptochloris*, *Parietochloris*, *Myrmecia*, *Stichococcus*, *Gloeocystis* and *Edaphochlorella* (Figure 3). *Watanabea*, *Coccomyxa*, *Elliptochloris* and *Edaphochlorella* strains were close to the authentic strains of *W. borystenica*, *C. simplex*, *E. perforata* and *E. mirabilis*. Barcoding region of SSU sequence of *Elliptochloris* strain (PA-1–3) was identical to authentic strains of *E. perforata* [56], and hence it was identified as respective species. *Parietochloris*, *Myrmecia*, *Stichococcus*, and *Gloeocystis* strains showed unresolved positions inside respective genera, and indicated taxonomic revisions which were not proposed so far.

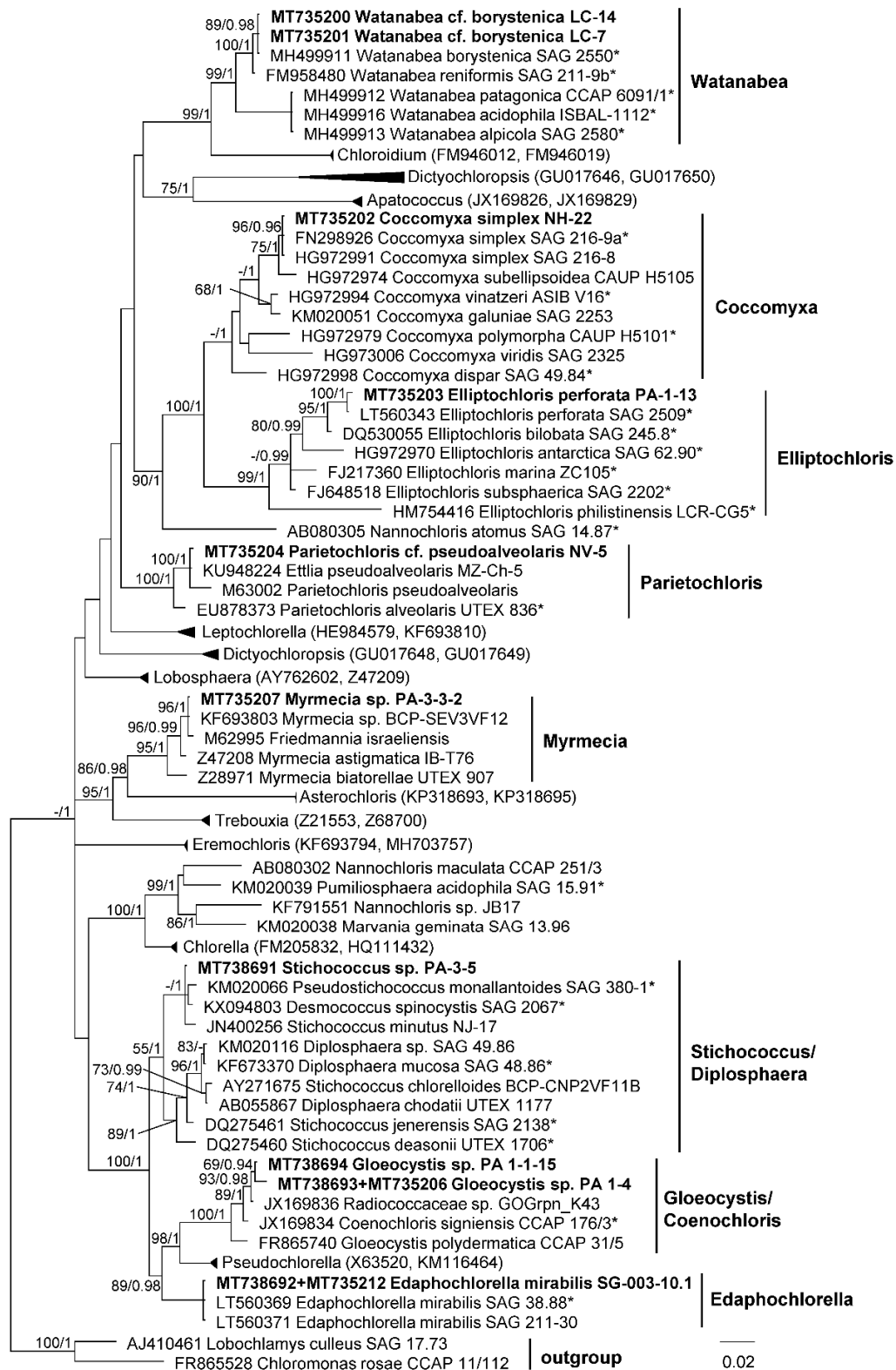


Figure 3. Molecular phylogeny of Trebouxiophyceae based on SSU rRNA sequence analysis. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian posterior probabilities (PP) and maximum likelihood bootstrap support (BP); branches supported in both analyses (Bayesian values > 0.9 and bootstrap values > 60%) are labeled. Strains marked with an asterisk are authentic strains; strains in bold represent newly sequenced algae.

Phylogenetic analyses of ITS region were performed for the genera *Bracteacoccus*, *Coccomyxa* and *Watanabea* (Figure 4), for which respective taxonomic revisions based on ITS phylogeny were proposed. These deeper analyses allowed us to identify strains to species level as *B. bullatus*, *C. simplex* and *W. borystenica*. ITS region of *Tetracystis* strain was the most similar to *T. intermedia* with few nucleotide differences (3 nucleotide differences in ITS1 and 2 nucleotide differences in ITS2), therefore it was possible to identify the strain as the respective species. Comparison of ITS sequence of *Edaphochlorella* strain with the authentic strain of *E. mirabilis* showed a few nucleotide differences in ITS2, which was located outside of the barcoding region [56]. Therefore, the identification of this strain as *E. mirabilis* was confirmed.

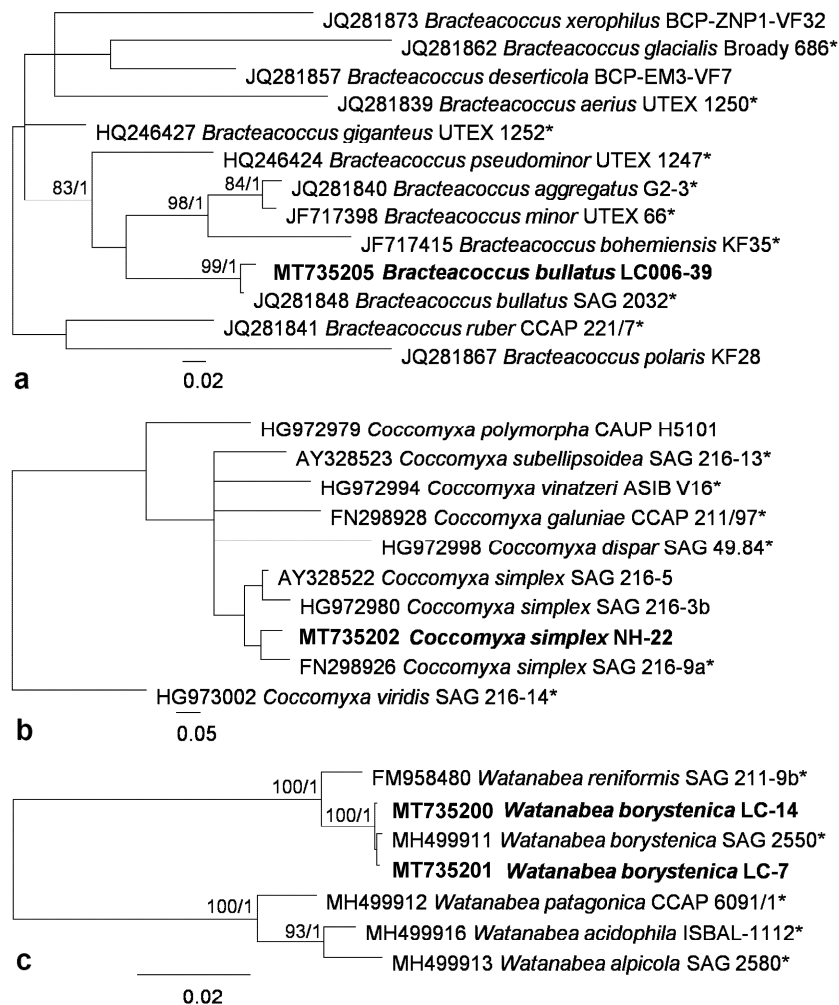


Figure 4. Molecular phylogeny based on ITS region: (a) *Bracteacoccus* (ITS 2), (b) *Coccomyxa* (ITS 2) and (c) *Watanabea* (SSU–ITS 1, 2). Phylogenetic trees were inferred by the Bayesian method with Bayesian posterior probabilities (PP) and maximum likelihood bootstrap support (BP); branches supported in both analyses (Bayesian values > 0.9 and bootstrap values > 60%) are labeled. Strains marked with an asterisk are authentic strains; strains in bold represent newly sequenced algae.

Representatives of class Klebsormidiophyceae were analyzed based on ITS 1, 2 phylogeny together with the sequences of Chilean strains presented in Samolov et al. [31]. Twenty-three Klebsormidiophyceae strains included 4 representatives of the genus *Interfilum* and 19 strains of the genus *Klebsormidium* (Figure 5). Eight strains, which belong to clade E, were identified as *Klebsormidium* sp., *K. fluitans* and *K. nitens*. Eleven strains were representatives of clade G. They were described as new species and varieties: *K. deserticola*, *K. chilense*, *K. sylvaticum*, *K. delicatum* var.

americanum and *K. delicatum* var. *deserticum* [31]. Interfilum strains were clustered with isolates of *I. massjukiae* as well as formed two separate lineages, which did not correspond to any known species.

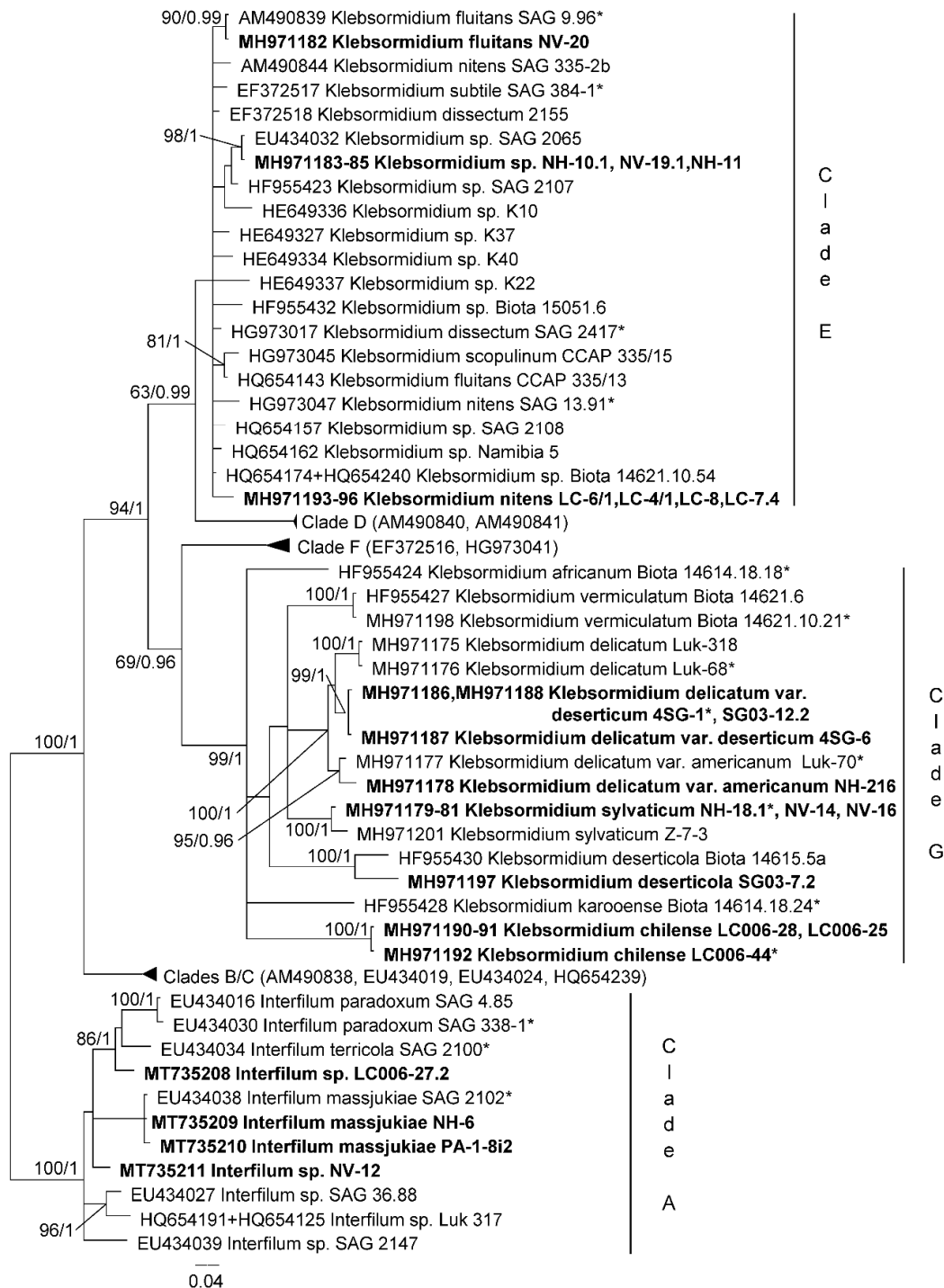


Figure 5. Molecular phylogeny of Klebsormidiophyceae based on ITS-1,2 sequence analysis. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian posterior probabilities (PP) and maximum likelihood bootstrap support (BP); branches supported in both analyses (Bayesian values > 0.9 and bootstrap values > 60%) are labeled. Strains marked with an asterisk are authentic strains; strains in bold represent newly sequenced algae.

The analysis of only morphological characters of Chilean biocrust algae enabled the determination of 12 taxa to the species level: *Bracteacoccus medionucleatus*, *Chlorococcum echinozygotum*, *Pseudomuriella aurantiaca*, etc. Since morphological characters of certain strains were insufficient for precise identification, 15 strains were tentatively identified: *Chlamydomonas* cf. *pseudoelegans*, *Chlorococcum* cf. *minimum*, *Chlorococcum* cf. *minutum*, *Chlorococcum* cf. *oleofaciens*, etc. Identification of some of these taxa was confirmed by molecular phylogenetic method.

Strains, which lacked distinctive morphological characters for the identification to the species level, were identified to genus level only: *Chlamydomonas* sp.1, *Chlamydomonas* sp.2, *Chlorococcum* sp.1, *Chlorococcum* sp.2, *Fasciculochloris* sp., Taxonomic revisions based on molecular phylogeny for these taxa are still missing. Morphological characters of isolated algae from investigated localities are presented in Figures 6–9.

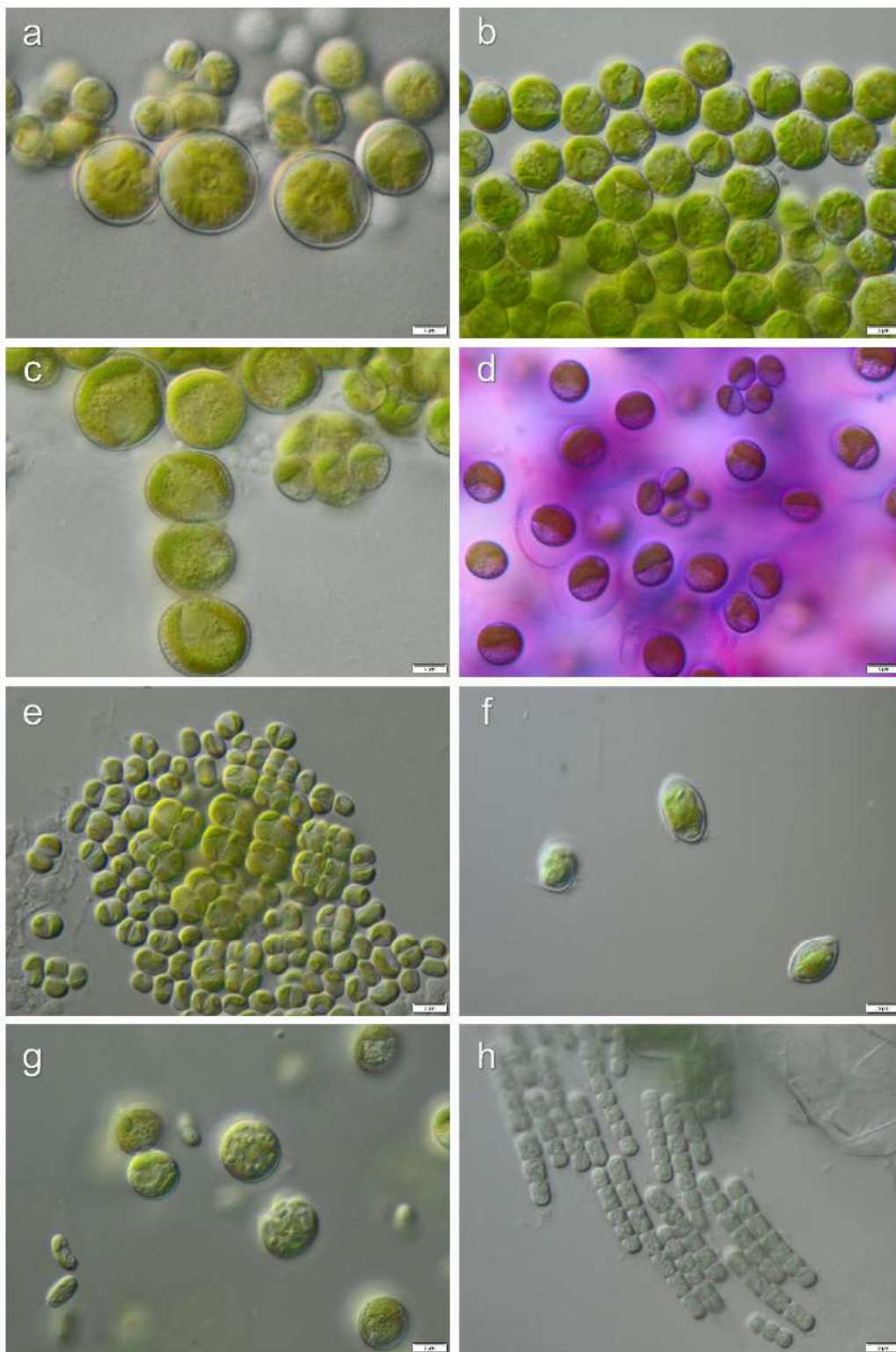


Figure 6. Micrographs of selected algae and cyanobacteria forming Pan de Azúcar biocrusts: (a) *Trebouxia* sp., (b) *Lobosphaera incisa*, (c) *Myrmecia astigmatica*, (d) *Gloeocystis* sp., (e) *Diplosphaera chodatii*, (f) *Chloroidium* sp., (g) *Elliptochloris perforata*, (h) *Phormidesmis* sp. Scale bars: 5 μ m.

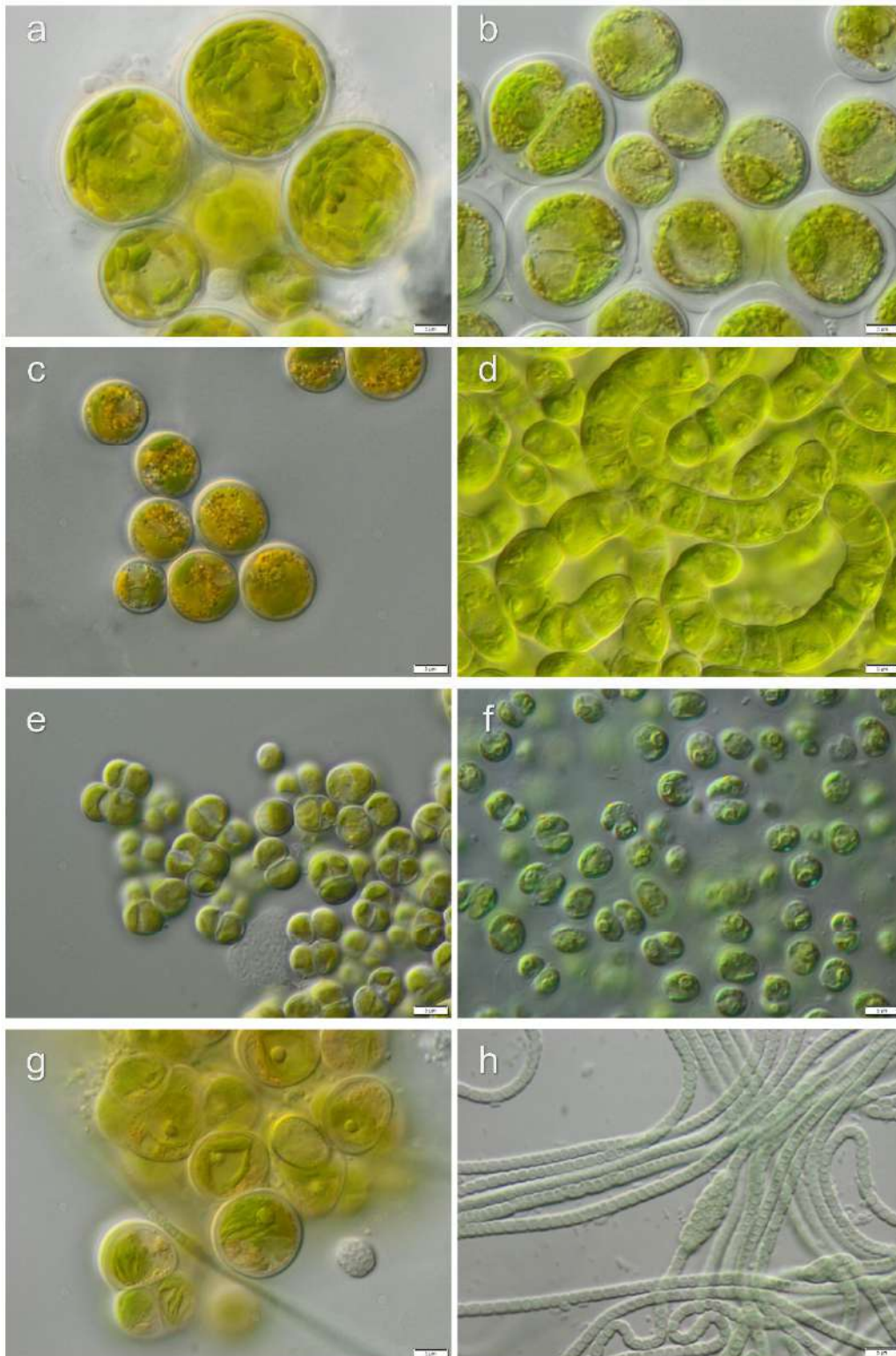


Figure 7. Micrographs of selected algae and cyanobacteria forming Santa Gracia biocrusts: (a) *Botrydiopsis* cf. *intercedens*, (b) *Chlorococcum* sp.1, (c) *Vischeria magna*, (d) *Klebsormidium delicatum* var. *deserticum*, (e) *Diplosphaera chodatii*, (f) *Heterochlamydomonas* sp., (g) *Tetracystis* sp., (h) *Nodosilinea epilithica*. Scale bars: 5 μ m.

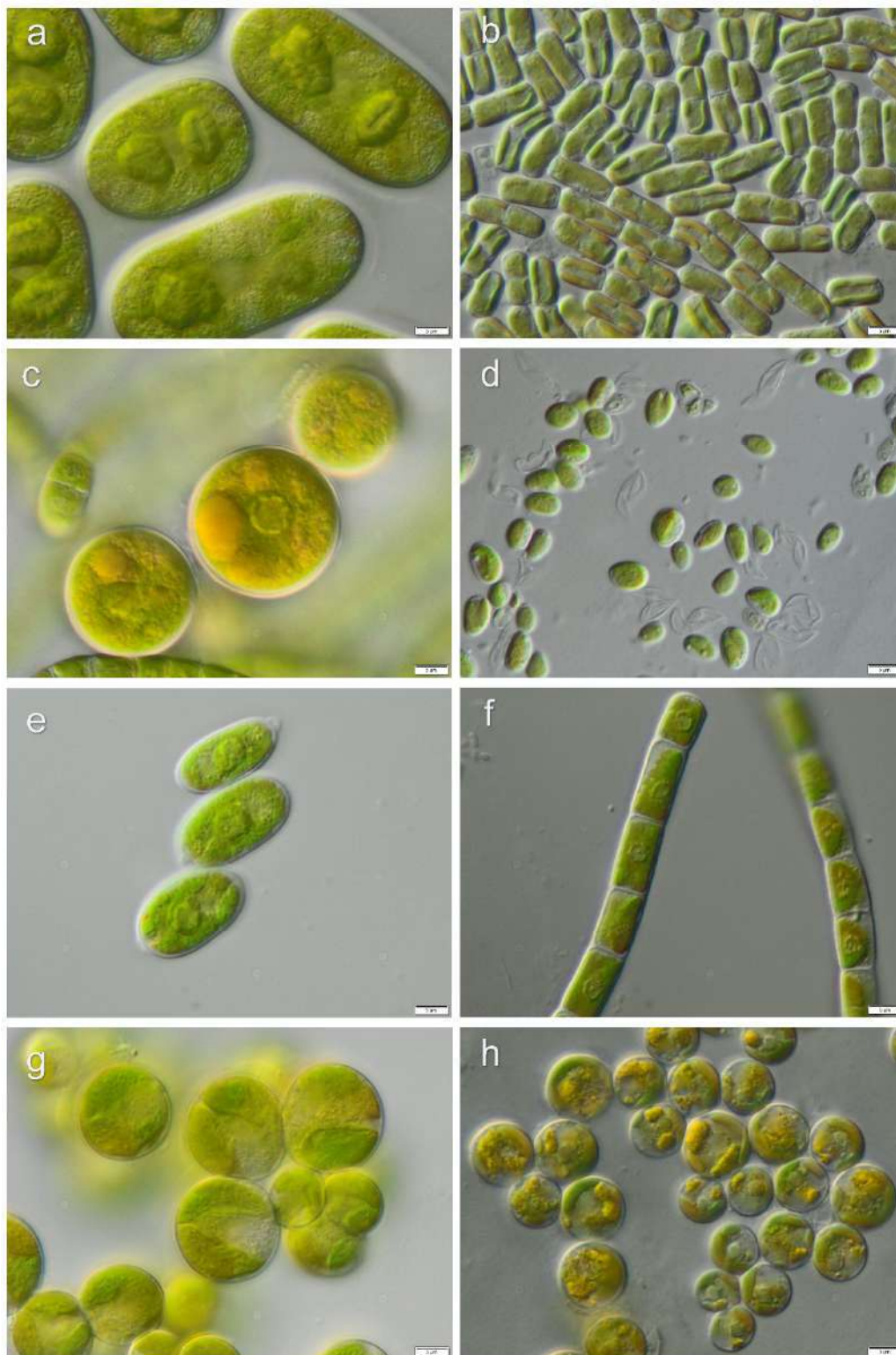


Figure 8. Micrographs of selected algae forming La Campana biocrusts: (a) *Cylindrocystis crassa*, (b) *Xantonema exile*, (c) *Chlorococcum* cf. *oleofaciens*, (d) *Xerochlorella minuta*, (e) *Loboclamys culleus*, (f) *Klebsormidium nitens*, (g) *Myrmecia* cf. *bisecta*, (h) *Vischeria vischeri*. Scale bars: 5 µm.

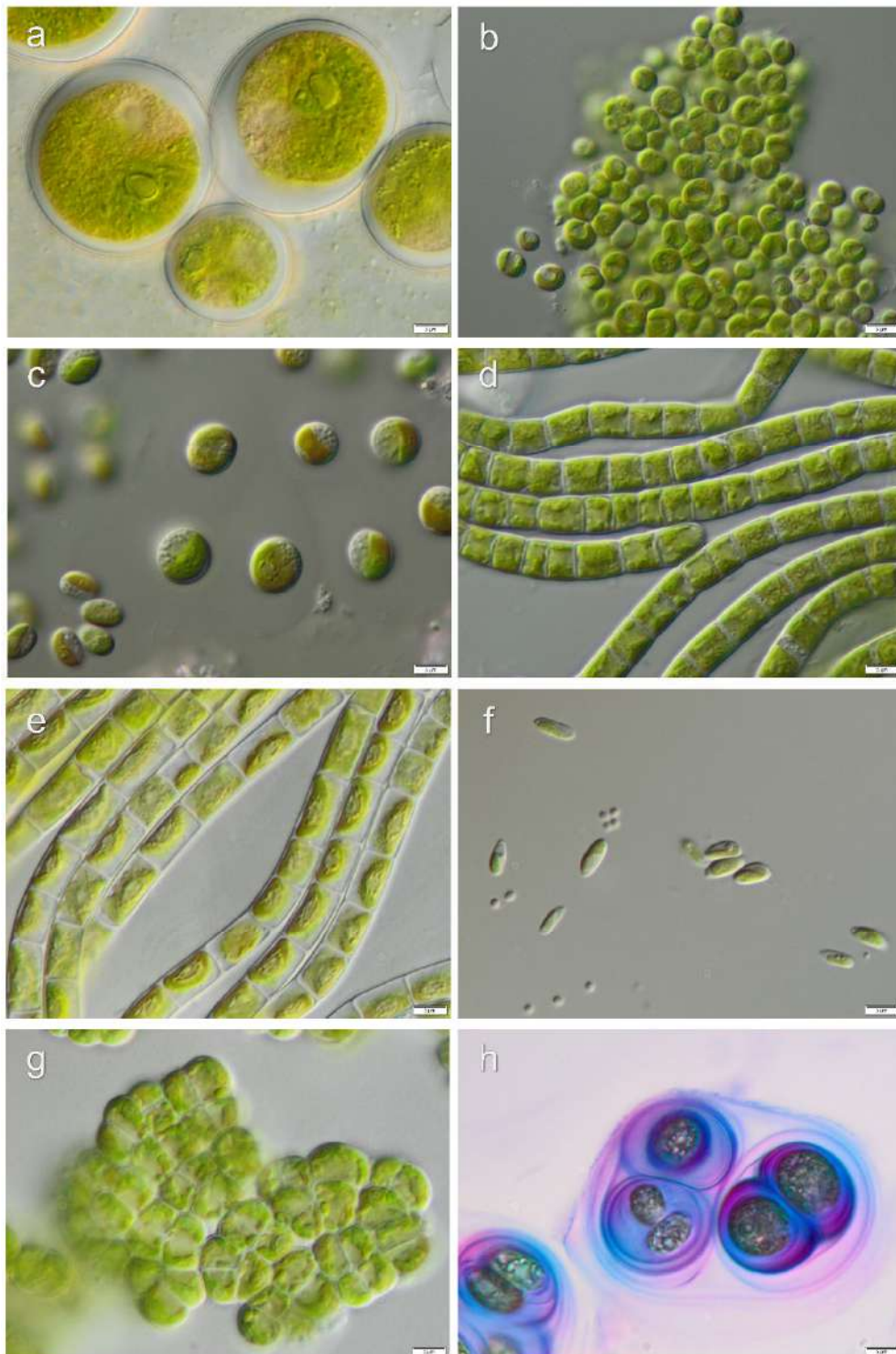


Figure 9. Micrographs of selected algae forming Nahuelbuta biocrusts: (a) *Chlorococcum* sp.2, (b) *Neocystis* cf. *brevis*, (c) *Gloeocystis* cf. *vesiculosa*, (d) *Klebsormidium* *sylvaticum*, (e) *Klebsormidium* *fluitans*, (f) *Coccomyxa* *simplex*, (g) *Interfilum* sp., (h) *Chlamydomonas* sp.1. Scale bars: 5 μ m.

Preliminary list of green algae from investigated biocrusts identified using morphological methods was published in Baumann et al. [4]. Using molecular methods as well as more detailed morphological investigation allowed us to redefine some taxa: *Gloeocystis* sp. (preliminary determined as *Coenochloris signiensis*), *Elliptochloris perforata* (*E. bilobata*), *Bracteacoccus* sp. (*Nannochloris* sp.), *Neocystis* cf. *brevis*

(*Neocystis* sp.), *Parietochloris pseudoalveolaris* (*P. alveolaris*), *Tetracystis intermedia* (*T. compacta*), several new taxa of clade G *Klebsormidium* described and published in Samolov et al. [31] (*Klebsormidium* sp.).

3.2. Diversity of Cyanobacteria—Identification Based on Morphology and Molecular Phylogeny

Species list of cyanobacteria includes 24 species which belonged to orders Chroococciopsidales (1 species), Nostocales (5), Oscillatoriales (8), Pleurocapsales (1) and Synechococcales (9). This list was obtained by the culture-dependent method and integrative approach for identification of cyanobacteria (Table 2).

Table 2. Species composition of cyanobacteria from biological soil crusts of Chile.

Species	Localities			
	NB	LC	SG	PA
Chroococciopsidales—1 species				
<i>Chroococciopsis</i> sp.	–	–	–	1
	–	–	–	1
Nostocales—5 species				
<i>Nostoc</i> cf. <i>edaphicum</i>	–	–	1	–
<i>Nostoc</i> cf. <i>punctiforme</i>	–	1	1	–
<i>Nostoc</i> sp. 1	1	–	–	–
<i>Nostoc</i> sp. 2	–	1	–	–
<i>Nostoc</i> sp. 3	–	–	1	1
	1	2	3	1
Oscillatoriales—8 species				
<i>Microcoleus</i> sp.	–	–	1	–
<i>Microcoleus vaginatus</i>	1	–	1	1
<i>Oscillatoria</i> cf. <i>tenuis</i>	–	–	1	–
<i>Phormidium</i> sp.	–	–	1	–
<i>Pseudophormidium</i> cf. <i>hollerbachianum</i>	–	–	–	1
<i>Myxacorys</i> sp.1	1	–	–	–
<i>Myxacorys</i> sp.2	–	–	1	–
"<i>Trichocoleus</i>" sociatus	–	1	1	–
	2	1	6	2
Pleurocapsales—1 species				
<i>Pleurocapsa minor</i>	–	–	–	1
	–	–	–	1
Synechococcales—9 species				
<i>Leptolyngbya henningsii</i>	–	1	–	–
<i>Leptolyngbya</i> sp.	–	–	1	–
<i>Leptolyngbya tenuis</i>	–	1	–	–
<i>Nodosilinea epilithica</i>	–	–	1	–
<i>Phormidesmis</i> sp.	–	–	–	1
<i>Stenomitos</i> sp. 1	–	1	–	–
<i>Stenomitos</i> sp. 2	–	1	–	–
<i>Stenomitos</i> sp. 3	–	–	1	–
<i>Trichocoleus</i> cf. <i>badius</i>	–	–	1	1
	–	4	4	2

Species whose original strains were studied by molecular phylogenetic methods are marked in Bold.

Some strains were additionally analyzed with molecular markers. Phylogenetic analysis of SSU region included 16 strains of cyanobacteria from the orders Nostocales, Oscillatoriales, Pleurocapsales and Synechococcales (Figure 10).

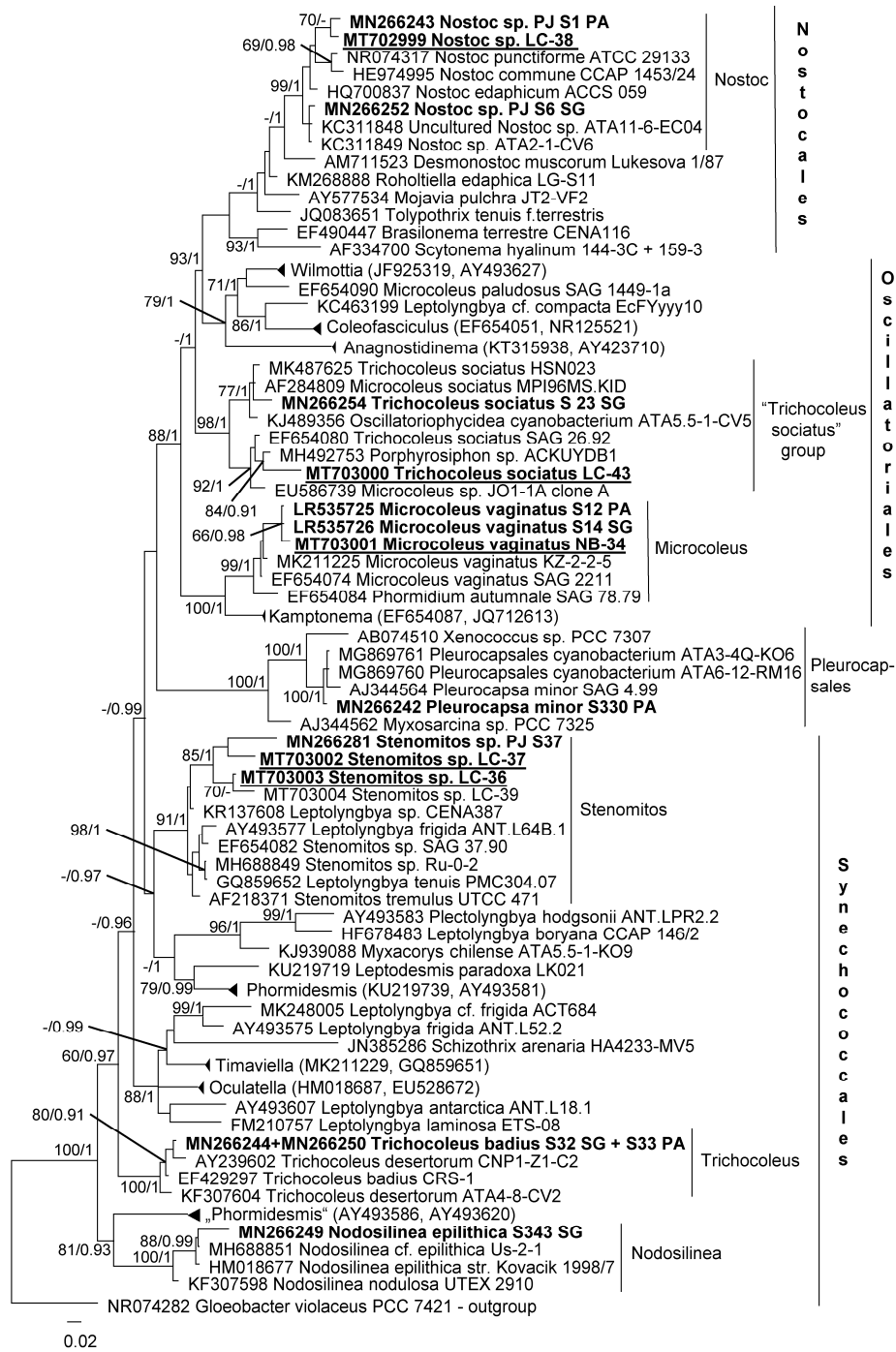


Figure 10. Molecular phylogeny of Cyanobacteria based on SSU rRNA sequence analysis. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian posterior probabilities (PP) and maximum likelihood bootstrap support (BP); branches supported in both analyses (Bayesian values > 0.9 and bootstrap values > 60%) are labeled. Strains in bold represent newly sequenced cyanobacteria; underlined strains represent Chilean strains together with strains of edaphic cyanobacteria described by Jung et al. [51].

Some strains were already mentioned in Jung et al. [51]. Nostocales strains were clustered with species of *Nostoc*, Oscillatoriales strains fell in the clade formed by isolates identified as *Trichocoleus sociatus* and *Microcoleus vaginatus*. Pleurocapsales strain was clustered close to the isolate of *Pleurocapsa minor*. Synechococcales strains fell in clades of *Nodosilinea* and *Stenomitosis*. *Nodosilinea* and

Trichocoleus strains were close to authentic strains of *N. epilithica* and *T. badius*, therefore they were identified as respective species. Two strains identified by us as *T. sociatus* were clustered together with a group of Oscillatorialean strains ("*Trichocoleus sociatus*" group). The group potentially corresponds to *Microcoleus* sensu lato because it was situated outside of the Synechococcales to which *Trichocoleus* belongs (see Mühlsteinová et al. [24]). Strains of *Nostoc* and *Stenomitos* had unresolved positions since taxonomic revisions of these genera is still in progress, therefore, it is impossible to assign these strains to known species.

Based on morphological characters we identified 4 cyanobacterial strains to the species level as *Leptolyngbya henningsii*, *Leptolyngbya tenuis*, *Microcoleus vaginatus* and *Nodosilinea epilithica*. In cases where the identification to species level was not possible based on morphology we identified 5 strains tentatively as *Nostoc* cf. *edaphicum*, *Nostoc* cf. *punctiforme*, *Oscillatoria* cf. *tenuis*, etc. Thirteen strains were identified to the genus level: *Chroococciopsis* sp., *Nostoc* sp., *Microcoleus* sp., *Phormidium* sp., *Myxocorys* sp., etc.

Preliminary list of cyanobacteria from investigated biocrusts identified using morphological methods was published in Baumann et al. [4]. Using molecular methods as well as more detailed morphological investigation allowed to redefine some taxa: *Nostoc* sp. 1 and sp. 2 (preliminary determined as *Nostoc commune*) and *Trichocoleus badius* (*T. desertorum*).

3.3. Biocrust Community Composition and Species Richness

With regard to the culture-based community composition and species richness assessment, desert biocrusts from Pan de Azúcar (PA) were composed exclusively of Chlorophyta representatives, with a clear dominance of Trebouxiophyceae (9 species) over Chlorophyceae (1 species). In semiarid Santa Gracia (SG) and Mediterranean La Campana (LC) communities were dominated by representatives of Chlorophyta (9 species in SG and 24 species in LC) and Streptophyta (2 species in SG and 5 species in LC), followed by Ochrophyta (3 species in SG and 4 species in LC) (Figure 11).

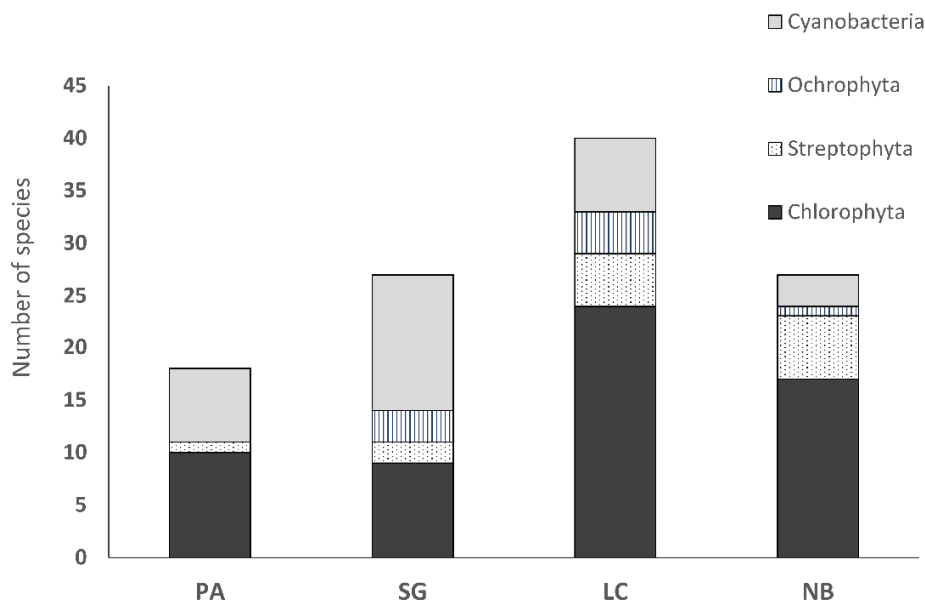


Figure 11. Species richness diagram of biocrusts collected at the 4 sampling locations: PA (Pan de Azúcar), SG (Santa Gracia), LC (La Campana) and NB (Nahuelbuta).

In both SG and LC biocrusts Chlorophyceae (5 species in SG versus 14 species in LC) outnumbered Trebouxiophyceae (4 species in SG versus 10 species in LC). While LC biocrusts had a higher diversity of Xanthophyceae (3 species), SG had a slightly higher diversity of Eustigmatophyceae (2 species). Nahuelbuta (NB) biocrusts were composed of Chlorophyta, Streptophyta and Ochrophyta

representatives. In this biocrust community, 17 Chlorophyta species were members of classes Trebouxiophyceae (10 species) and Chlorophyceae (7 species). Temperate NB biocrusts had the highest diversity of Streptophyta representatives (6 species) when compared to other biocrusts we analyzed.

Cyanobacterial representatives in PA biocrusts were members of Chroococciopsidales (1 species), Nostocales (1), Oscillatoriales (2), Pleurocapsales (1) and Synechococcales (2). SG biocrusts were composed of Nostocales, Oscillatoriales and Synechococcales. The highest diversity was observed in Oscillatoriales (6 species), followed by Synechococcales (4) and Nostocales (3). LC communities had a high diversity of Synechococcales (4 species), followed by Nostocales (2) and 1 species from Oscillatoriales. Biocrusts from NB were formed by Oscillatoriales (2 species) and one Nostocales representative.

The total number of algal species was lowest in Pan de Azúcar biocrusts (11 species) and highest in the biocrusts from La Campana (33 species). A higher number of algal species was found in the Nahuelbuta biocrusts compared to Santa Gracia (24 and 14 species).

The total number of cyanobacterial species was lowest in NB (3), followed by LC and PA biocrusts (7). The highest number of cyanobacterial species was observed in SG (12) biocrusts.

Single-celled or packet-like (cocoid) eukaryotic algae (Table 1) dominated all Chilean biocrusts. The only filamentous algae were representatives of genera Klebsormidium (Streptophyta) and Xanthonema (Ochrophyta). Klebsormidium representatives were found in all biocrust communities, except in the desert ones (PA); *Xanthonema exile* was present in LC biocrusts only.

Filamentous cyanobacterial species dominated biocrust communities from LC, SG and NB, representatives of genera Microcoleus, Myxocorys, Leptolyngbya and Stenomitos. Only arid PA communities were dominated by thallus-forming, colonial cyanobacteria such as representatives of genus Nostoc and Chroococciopsis (Table 2). A species, which was present in all investigated biocrusts, was *Diplosphaera chodatii*.

4. Discussion

In the present study, we are showing for the first time a comprehensive analysis on the biodiversity of biocrust-forming microalgae and cyanobacteria in four climate zones in Chile, identified by an integrative approach, which takes into account both morphological and molecular traits. It should be taken into account that in our study community composition and species richness assessment is based on the culture-dependent approach, which can underestimate algal and cyanobacterial diversity in natural communities. The culture-dependent approach can potentially lead to the overestimation of algal and cyanobacterial species, which can grow fast in culture. It can also lead to underestimation or even failing to detect uncultivable species, which could be dominant elements in natural biocrusts [19,36].

Biocrust communities we analyzed were predominately composed of algae from the classes Chlorophyceae and Trebouxiophyceae, followed by Klebsormidiophyceae, which corresponds to previous studies on biocrusts from Europe, Asia, Africa, North America, Australia and Polar Regions of Russia presented by Büdel et al. [19]. Algal species richness in Chilean biocrusts (45), when compared to Australia (3) or Antarctica (44) as presented in Büdel et al. [19], reflects the general lack of information on the diversity of biocrust algal globally.

Depending on their morphology and functional traits, biocrust algae can be divided into biocrust-forming, filamentous and biocrust-associated, coccal taxa. Chilean biocrust algae are phylogenetically diverse, the majority were unicellular or strains which form colonies with densely packed cells. The coccal biocrust algae can be attached to filamentous forms, soil particles or they can live epiphytically on the thallus of biocrust lichens or mosses [19,36]. Chilean unicellular algae were present in lower biomass in biocrusts, but their diversity exceeded the diversity of filamentous representatives. This observation was consistent with the previous analysis of biocrust communities worldwide [19].

We found several algal species, which were new to South America and even represented completely new species. The data set shown thus proves our presumption that algal species described from South

America are strongly underestimated compared to Europe or North America due to less sampling activities. For example, all filamentous algae in Chilean biocrusts belonged to the genus *Klebsormidium* and they were present in all biocrust samples, except the desert PA communities. Most isolated *Klebsormidium* strains were representatives of clade G, which was originally designated as desert clade [57]. With the newly isolated *Klebsormidium* clade G strains, it was possible to describe four new species, including representatives from the Mediterranean and temperate areas of Chile [31]. The discovery of South American strains from *Klebsormidium* clade G broadened the ecological distribution of this clade to semiarid, Mediterranean and temperate climate zone. This example shows that studies in South America have the potential to discover new microalgal species even in a well-known genus such as *Klebsormidium*.

Another interesting finding was a microalga (strain LC006-5), which could represent a new lineage inside Oogamochlamydia (confirmed by molecular methods). This isolate should be investigated taxonomically much deeper to clarify if it represents a new species or even a new genus. This example emphasizes the necessity for additional thorough taxonomic studies to reliably describe the biodiversity of microalgae in South America.

Several species in the Chilean biocrust belong to just recently described or revisited taxa. For example, *Ixipapillifera* is a newly erected genus of flagellated algae with specific X-shaped papilla. Members of this genus are typically found in soil (*I. deasonii*) or freshwater habitats [58].

Another interesting finding is the widely distributed *Xerochlorella minuta* recently revised in Mikhailyuk et al. (2020) [59]. This alga, usually known as *Dictyosphaerium minutum*, is a typical component of biocrusts; it prefers xerophytic habitats, which vary from Polar Regions to maritime sand dunes and hot deserts.

Two strains isolated from biocrusts of LC were identified as *Watanabea borystenica*, a rare and interesting genus [60]. The authentic strain of this terrestrial algal species was just recently described and isolated from acidic soil deposited after coal mining in Sokolov mining district, Czech Republic [60]. According to the type locality, *W. borystenica* can inhabit open habitats with intensive solar radiation and unfavorable water regime. Chilean strains are the first record of *Watanabea* genus being part of a Mediterranean biocrust community. This finding indicates that in South America it is possible to find species, which are rare in Europe and were found so far in ecologically disturbed habitats like extremely acidic soils.

4.1. Differences in Community Composition of Biocrust Algae and Cyanobacteria along the Precipitation Gradient

We expected the effect of the precipitation gradient to be reflected in the algal and cyanobacterial species composition of Chilean biocrusts. Indeed, we observed clear differences between the four regions. In the arid PA, biocrusts dominate the landscape since they can cover up to 40% of soil surface [35]. The other sampling regions are dominated by higher vegetation, limiting the area covered by biocrusts to up to 15% in SG and 5% in LC and NB.

Comparing the biocrust communities from the four regions, from the arid north to mesic south, the following pattern was observed: all algae in PA were either single-celled or colony-forming, whereas non-filamentous cyanobacteria were only detected in PA. Since PA is a desert area with nearly no rain, where fog or dew act as the only regular water sources, biocrust communities of this very specific region were separately discussed. However, scarce water input of this site enabled the development of early to climax biocrusts dominated by chlorolichens and algae, over cyanobacteria.

In the other three regions along the precipitation gradient, rain events occur, thus biocrusts could develop well. Therefore, filamentous algae and filamentous cyanobacteria were present in biocrusts in all other regions.

In semiarid SG, filamentous cyanobacteria were prevailing over algae, contrary to Mediterranean LC biocrusts, which were predominantly composed of eukaryotic algae, followed by filamentous

and colonial cyanobacteria. The dominance of algae over cyanobacteria in the temperate forest NB biocrusts was observed in European communities [18,61] as well.

While filamentous cyanobacteria dominated biocrusts in the semiarid region, eukaryotic filamentous algae had the highest richness in the temperate region. Low amount of cyanobacteria in NB biocrusts is common for forest ecosystems and can be attributed to unfavorable soil pH and limited light conditions [18,62]. The dominance of better adapted filamentous algae from the genus *Klebsormidium* over filamentous cyanobacteria in NB and partly also in LC communities is in accordance with reports of Glaser et al. [18], where *Klebsormidium* was reported to “replace” cyanobacteria as a biocrust-forming alga.

4.2. Pan de Azúcar Biocrusts as an Example for an Extreme Biocrust Habitat

PA biocrusts corresponded to the communities observed in the Namibian fog desert. Just like in Africa, the Chilean biocrusts were devoid of cyanolichens [35], with cyanobacterial members confined to hypolithic habitats [51,63]. Jung et al. [28] described “grit crust”, a transitional form between rock cover and soil crust in a classical sense. Grit crusts are communities consisting of fungi, cyanobacteria and algae, formed on top of singular grit-sized quartz and granitoid stones, which cover and connect the grit-sized rocks. Hypolithic habitats increase the possibility of fog and dew-water condensation and shield the organisms from damaging solar radiation [64]. Lange et al. [65] concluded that cyanobacterial presence in a habitat is restricted by the liquid water availability, whereas algae can use high air humidity (i.e., fog) to be metabolically active.

Single-celled species formed loose aggregates (*Myrmecia* sp.) or the cells were protected by thick gelatinous structures (*Gloeocystis* sp.) from water loss. Like all algae from the former Radiococcaceae group, *Gloeocystis* sp. is characterized by well-developed mucilaginous layers, which protect single cells from desiccation. These layers can absorb water from scarce rain events or even high air humidity caused by the coastal fog in PA. Colony- or packet-forming algae, like *Interfilum massjukiae*, create layered structures where upper layers, usually exposed to harsh environmental conditions, protect underlying cells [66]. *I. massjukiae* was originally described from Crimea Mountains as an epilith [67] and later found as a phycobiont of lichens [68]. Colony- or packet-like morphotype is considered as an adaptation of algal cells to retain cellular water under dry conditions [69], which corresponds to the desert habitat of PA.

Cyanobacteria found in PA biocrusts include coccoid *Chroococidiopsis* sp., which was reported as a constituent of biocrust communities worldwide [55] as well as a member of hypolithic communities in Chile [70–72]. Jung et al. [51] reported representatives of genus *Chroococidiopsis* in both edaphic and hypolithic PA communities. Cyanobacteria from this genus synthesize extracellular polymeric substances, which provide an effective defense mechanism against desiccation [19]. In addition, *Chroococidiopsis* representatives are known to accumulate scytonemin, a UV-sun-screening compound extracellularly [73]. Although not studied in detail, other biocrust algae and cyanobacteria are expected to synthesize and accumulate high concentrations of UV-sunscreens to cope with the extremely high radiation conditions of the Atacama Desert [74]. *Pleurocapsa minor* is a coccoid, packet-like cyanobacteria, which was found in both edaphic and hypolithic PA communities [51]. Representatives of genus *Pleurocapsa*, were present in biocrusts of Namib [75] and dominating the biocrust communities in semiarid areas of Spain [76]—both with low precipitation similar to PA.

Filamentous cyanobacterial representatives *Microcoleus vaginatus*, *Pseudophormidium* cf. *hollerbachianum*, *Phormidesmis* sp. and *Trichocoleus badius* contribute to the physical stability of PA biocrusts. *Trichocoleus badius* is an interesting and poorly studied cyanobacterium which genus is typical for desert habitats [24]. The filaments are acting as supporting structures in the desert soil, which reduce the mobility of loose soil particles and promote colonization of non-motile, single-celled or colonial algae and cyanobacteria, such as *Nostoc*. Heterocystous *Nostoc* contributes to nitrogen fixation and priming of soil [76].

5. Conclusions

The present study is one of the few studies in South America, which provides comprehensive information on the biodiversity of microalgae and cyanobacteria isolated from biocrusts along a longitudinal climate gradient in Chile. It should be taken into account that our study is based on the culture-dependent approach, which can underestimate the algal and cyanobacterial diversity present in natural communities. The data indicate that some rather cosmopolitan biocrust key taxa such as *Microcoleus vaginatus* occur in South American biocrusts as well. On the other hand, newly identified taxa like new Klebsormidium-species suggest potentially much higher biodiversity in the Chilean biocrusts than documented in this study. Taxonomic revision for some of the new isolates is needed for an accurate biodiversity estimation. This study pointed out that biocrusts in South America represent micro-ecosystems with the potential to discover new and ecologically interesting microalgal species.

Author Contributions: Conceptualization E.S., K.G., U.K.; investigation, E.S., T.M., K.G., P.J.; project administration, B.B., P.L., U.K.; resources, E.S., K.B., P.L.; software, K.G., T.M.; validation, T.M., K.G., P.J., B.B.; writing—original draft preparation, E.S.; writing—review and editing, T.M., K.G., P.J., K.B., P.L., B.B., U.K.; supervision, U.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the German Science Foundation (DFG) priority research program SPP 1803 “EarthShape: Earth Surface Shaping by Biota” (project CRUSTWEATHERING: KA899/32- 1, BU666/19-1, LE903/14-1), as well as by the SPP 1991 “Taxonomics” (GL 909/1-1).

Acknowledgments: We are grateful to the Chilean National Park Service (CONAF) for providing access to the sampling locations and on-site support of our research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript or in the decision to publish the results.

References

1. Belnap, J.; Eldridge, D. *Disturbance and Recovery of Biological Soil Crusts*; Springer International Publishing: Berlin, Germany, 2001; Volume 150, pp. 363–383.
2. Chamizo, S.; Cantón, Y.; Rodríguez-Caballero, E.; Domingo, F. Biocrusts positively affect the soil water balance in semiarid ecosystems. *Ecohydrology* **2016**, *9*, 1208–1221. [[CrossRef](#)]
3. Rodríguez-Caballero, E.; Belnap, J.; Büdel, B.; Crutzen, P.J.; Andreae, M.O.; Poschl, U.; Weber, B. Dryland photoautotrophic soil surface communities endangered by global change. *Nat. Geosci.* **2018**, *11*, 185–189. [[CrossRef](#)]
4. Baumann, K.; Jung, P.; Samolov, E.; Lehnert, L.W.; Büdel, B.; Karsten, U.; Bendix, J.; Achilles, S.; Schermer, M.; Matus, F.; et al. Biological soil crusts along a climatic gradient in Chile: Richness and imprints of phototrophic microorganisms in phosphorus biogeochemical cycling. *Soil Biol. Biochem.* **2018**, *127*, 286–300. [[CrossRef](#)]
5. Tucker, C.L.; Antoninka, A.; Day, N.K.; Poff, B.; Reed, S. Biological soil crust salvage for dryland restoration: An opportunity for natural resource restoration. *Restor. Ecol.* **2020**, 13115. [[CrossRef](#)]
6. Maestre, F.T.; Bowker, M.A.; Castillo-Monroy, A.P.; Ochoa-Hueso, R. Species richness effects on ecosystem multifunctionality depend on evenness, composition and spatial pattern. *J. Ecol.* **2011**, *100*, 317–330. [[CrossRef](#)]
7. Bowker, M.A.; Maestre, F.T.; Mau, R.L. Diversity and patch-size distributions of biological soil crusts regulate dryland ecosystem multifunctionality. *Ecosystems* **2013**, *16*, 923–933. [[CrossRef](#)]
8. Hu, C.; Liu, Y.; Song, L.; Zhang, D. Effect of desert soil algae on the stabilization of fine sands. *Environ. Biol. Fishes* **2002**, *14*, 281–292. [[CrossRef](#)]
9. Miller, M.E.; Belote, R.T.; Bowker, M.A.; Garman, S.L. Alternative states of a semiarid grassland ecosystem: Implications for ecosystem services. *Ecosphere* **2011**, *2*. [[CrossRef](#)]
10. Kristiansen, J. 16. Dispersal of freshwater algae—a review. *Hydrobiol.* **1996**, *336*, 151–157. [[CrossRef](#)]
11. Sharma, N.K.; Rai, A.; Singh, S.; Brown, R.M. Airborne algae: Their present status and relevance. *J. Phycol.* **2007**, *43*, 615–627. [[CrossRef](#)]
12. Moore, K.A.; Elmendorf, S.C. Propagule vs. niche limitation: Untangling the mechanisms behind plant species’ distributions. *Ecol. Lett.* **2006**, *9*, 797–804. [[CrossRef](#)]

13. Pedrós-Alió, C. Marine microbial diversity: Can it be determined? *Trends Microbiol.* **2006**, *14*, 257–263. [[CrossRef](#)]
14. Colesie, C.; Felde, V.J.M.N.L.; Büdel, B. Composition and macrostructure of biological soil crusts. In *Photosynthetic Adaptation*; Weber, B., Büdel, B., Belnap, J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Germany, 2016; Volume 226, pp. 159–172.
15. Safriel, U.; Adeel, Z.; Niemeijer, D.; Puigdefabregas, J.; White, R.; Lal, R.; Winslow, M.; Ziedler, J.; Prince, S.; Archer, E.; et al. Dryland Systems. In *Ecosystems and Human Well-being: Current State and Trends: Findings of the Condition and Trends Working Group*; Hassan, R., Scholes, R., Ash, N., Eds.; Island Press: Washington, DC, USA, 2005; pp. 623–662.
16. Fischer, T.; Gypser, S.; Subbotina, M.; Veste, M. Synergic hydraulic and nutritional feedback mechanisms control surface patchiness of biological soil crusts on tertiary sands at a post-mining site. *J. Hydrol. Hydromechanics* **2014**, *62*, 293–302. [[CrossRef](#)]
17. Baumann, K.; Glaser, K.; Mutz, J.-E.; Karsten, U.; MacLennan, A.; Hu, Y.; Michalik, D.; Kruse, J.; Eckhardt, K.-U.; Schall, P.; et al. Biological soil crusts of temperate forests: Their role in P cycling. *Soil Biol. Biochem.* **2017**, *109*, 156–166. [[CrossRef](#)]
18. Glaser, K.; Baumann, K.; Leinweber, P.; Mikhailuyuk, T.; Karsten, U. Algal richness in BSCs in forests under different management intensity with some implications for P cycling. *Biogeosciences* **2018**, *15*, 4181–4192. [[CrossRef](#)]
19. Büdel, B.; Dulić, T.; Darienko, T.; Rybalka, N.; Friedl, T. Cyanobacteria and Algae of Biological Soil Crusts. In *Photosynthetic Adaptation*; Weber, B., Büdel, B., Belnap, J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Germany, 2016; Volume 226, pp. 55–80.
20. Schwabe, G.H. Zur Autotrophen Vegetation in Ariden Böden. Blaualgen Und Lebensraum IV. *Österreichische Bot. Z.* **1960**, *107*, 281–309. [[CrossRef](#)]
21. Forest, H.S.; Weston, C.R. Blue-green algae from the Atacama Desert of Northern Chile. *J. Phycol.* **1966**, *2*, 163–164. [[CrossRef](#)]
22. Patzelt, D.J.; Hodač, L.; Friedl, T.; Pietrasiak, N.; Johansen, J.R. Biodiversity of soil cyanobacteria in the hyper-arid Atacama Desert, Chile. *J. Phycol.* **2014**, *50*, 698–710. [[CrossRef](#)]
23. Mühlsteinová, R.; Johansen, J.R.; Pietrasiak, N.; Martin, M.P. Polyphasic characterization of *Kastovskya adunca* gen. nov. et comb. nov. (Cyanobacteria: Oscillatoriales), from desert soils of the Atacama Desert, Chile. *Phytotaxa* **2014**, *163*, 216. [[CrossRef](#)]
24. Mühlsteinová, R.; Johansen, J.R.; Pietrasiak, N.; Martin, M.P.; Osorio-Santos, K.; Warren, S.D. Polyphasic characterization of *Trichocoleus desertorum* sp. nov. (Pseudanabaenales, Cyanobacteria) from desert soils and phylogenetic placement of the genus *Trichocoleus*. *Phytotaxa* **2014**, *163*, 241. [[CrossRef](#)]
25. Osorio-Santos, K.; Pietrasiak, N.; Bohunická, M.; Miscoe, L.H.; Kováčik, L.; Martin, M.P.; Johansen, J.R. Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): Taxonomically recognizing cryptic diversification. *Eur. J. Phycol.* **2014**, *49*, 450–470. [[CrossRef](#)]
26. Pietrasiak, N.; Mühlsteinová, R.; Siegesmund, M.A.; Johansen, J.R. Phylogenetic placement of *Symplocastrum* (Phormidiaceae, Cyanophyceae) with a new combination *S. californicum* and two new species: *S. flechnerae* and *S. torsivum*. *Phycol.* **2014**, *53*, 529–541. [[CrossRef](#)]
27. Pietrasiak, N.; Osorio-Santos, K.; Shalygin, S.; Martin, M.P.; Johansen, J.R. When is a lineage a species? A case study in *Myxocorys* gen. nov. (Synechococcales: Cyanobacteria) with the description of two new species from the Americas. *J. Phycol.* **2019**, *55*, 976–996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Jung, P.; Baumann, K.; Lehnert, L.W.; Samolov, E.; Achilles, S.; Schermer, M.; Wraase, L.M.; Eckhardt, K.; Bader, M.; Leinweber, P.; et al. Desert breath—How fog promotes a novel type of soil biocenosis, forming the coastal Atacama Desert’s living skin. *Geobiology* **2019**, *18*, 113–124. [[CrossRef](#)]
29. Jung, P.; Mikhailuyuk, T.; Emrich, D.; Baumann, K.; Dultz, S.; Büdel, B. Shifting boundaries: Ecological and geographical range extension based on three new species in the cyanobacterial genera *Cyanocohniella*, *Oculatella*, and *Aliterella*. *J. Phycol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Darienko, T.; Kang, W.; Orzechowski, A.K.; Pröschold, T. *Pleurastrorarcina terriformae*, a new species of a rare desert trebouxiophycean alga discovered by an integrative approach. *Extremophiles* **2019**, *23*, 573–586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

31. Samolov, E.; Mikhailyuk, T.; Lukešová, A.; Glaser, K.; Büdel, B.; Karsten, U. Usual alga from unusual habitats: Biodiversity of Klebsormidium (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) from the phylogenetic superclade G isolated from biological soil crusts. *Mol. Phylogenetics Evol.* **2019**, *133*, 236–255. [[CrossRef](#)]
32. Rindi, F.; Mikhailyuk, T.; Sluiman, H.J.; Friedl, T.; Lopez-Bautista, J.M. Phylogenetic relationships in Interfilum and Klebsormidium (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Mol. Phylogenetics Evol.* **2011**, *58*, 218–231. [[CrossRef](#)]
33. Lehnert, L.; Thies, B.; Trachte, K.; Achilles, S.; Osses, P.; Baumann, K.; Bendix, J.; Schmidt, J.; Samolov, E.; Jung, P.; et al. A Case Study on Fog/Low Stratus Occurrence at Las Lomitas, Atacama Desert (Chile) as a Water Source for Biological Soil Crusts. *Aerosol Air Qual. Res.* **2018**, *18*, 254–269. [[CrossRef](#)]
34. Larrain, H.; Velásquez, F.; Cereceda, P.; Espejo, R.; Pinto, R.; Osses, P.; Schemenauer, R. Fog measurements at the site “Falda Verde” north of Chañaral compared with other fog stations of Chile. *Atmospheric Res.* **2002**, *64*, 273–284. [[CrossRef](#)]
35. Bernhard, N.; Moskwa, L.-M.; Schmidt, K.; Oeser, R.; Aburto, F.; Bader, M.; Baumann, K.; Von Blanckenburg, F.; Boy, J.; Brink, L.V.D.; et al. Pedogenic and microbial interrelations to regional climate and local topography: New insights from a climate gradient (arid to humid) along the Coastal Cordillera of Chile. *Catena* **2018**, *170*, 335–355. [[CrossRef](#)]
36. Schulz, K.; Mikhailyuk, T.; Dreßler, M.; Leinweber, P.; Karsten, U. Biological Soil Crusts from Coastal Dunes at the Baltic Sea: Cyanobacterial and Algal Biodiversity and Related Soil Properties. *Microb. Ecol.* **2015**, *71*, 178–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Starr, R.C.; Zeikus, J.A. UTEX—The culture collection of algae at the university of Texas at Austin 1 2 3. *J. Phycol.* **1993**, *29*, 1–106. [[CrossRef](#)]
38. Rippka, R. Pasteur culture collection of cyanobacterial strains in axenic culture. *Cat. Taxon. Handb. Cat. Strains 1992/1993* **1992**, *1*, 1–103.
39. Ettl, H.; Gartner, G. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*, 2nd ed.; Springer: Berlin, Germany, 2013.
40. Komárek, J.; Anagnostidis, K. *Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/2: Cyanoprocaryota: Bd. 2/Part 2: Oscillatoriales*, German ed.; Springer Spektrum: Berlin, Germany, 2007.
41. Komárek, J. *Bd. 19/3: Cyanoprocaryota: 3. Teil/3rd Part: Heterocytous Genera*; Springer Spektrum: Berlin, Germany, 2013.
42. Marin, B.; Klingberg, M.; Melkonian, M. Phylogenetic relationships among the Cryptophyta: Analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences support the monophyly of extant plastid-containing lineages. *Protist* **1998**, *149*, 265–276. [[CrossRef](#)]
43. Marin, B.; Palm, A.; Klingberg, M.; Melkonian, M. Phylogeny and Taxonomic Revision of Plastid-Containing Euglenophytes based on SSU rDNA Sequence Comparisons and Synapomorphic Signatures in the SSU rRNA Secondary Structure. *Protist* **2003**, *154*, 99–145. [[CrossRef](#)]
44. Mikhailyuk, T.; Lukešová, A.; Glaser, K.; Holzinger, A.; Obwegeser, S.; Nyporko, S.; Friedl, T.; Karsten, U. New taxa of streptophyte algae (Streptophyta) from terrestrial habitats revealed using an integrative approach. *Protist* **2018**, *169*, 406–431. [[CrossRef](#)]
45. Lane, D.J. 16S/23S rRNA Sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*; Stackebrandt, E., Goodfellow, M., Eds.; John Wiley and Sons: New York, NY, USA, 1991.
46. Goff, L.J.; Moon, D.A. PCR amplification of nuclear and plastid genes from algal herbarium specimens and algal spores1. *J. Phycol.* **1993**, *29*, 381–384. [[CrossRef](#)]
47. Hoef-Emden, K.; Melkonian, M. Revision of the genus Cryptomonas (Cryptophyceae): A combination of molecular phylogeny and morphology provides insights into a long-hidden dimorphism. *Protist* **2003**, *154*, 371–409. [[CrossRef](#)]
48. Williams, L.; Jung, P.; Zheng, L.-J.; Maier, S.; Peer, T.; Grube, M.; Weber, B.; Büdel, B. Assessing recovery of biological soil crusts across a latitudinal gradient in Western Europe. *Restor. Ecol.* **2017**, *26*, 543–554. [[CrossRef](#)]
49. Mühling, M.; Woolven-Allen, J.; Murrell, J.C.; Joint, I. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J.* **2008**, *2*, 379–392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Altschul, S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

51. Jung, P.; Schermer, M.; Briegel-Williams, L.; Baumann, K.; Leinweber, P.; Karsten, U.; Lehnert, L.; Achilles, S.; Bendix, J.; Büdel, B. Water availability shapes edaphic and lithic cyanobacterial communities in the Atacama Desert. *J. Phycol.* **2019**, *55*, 1306–1318. [[CrossRef](#)]
52. Akaike, H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control.* **1974**, *19*, 716–723. [[CrossRef](#)]
53. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipinski, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Boil. Evol.* **2013**, *30*, 2725–2729. [[CrossRef](#)]
54. Ronquist, F.; Huelsenbeck, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinform.* **2003**, *19*, 1572–1574. [[CrossRef](#)]
55. Zwickl, D.J. Genetic Algorithm Approaches for the Phylogenetic Analysis of Large Biological Sequence Datasets Under the Maximum Likelihood Criterion. Ph.D. Thesis, The University of Texas at Austin, Austin, TX, USA, May 2006.
56. Darienko, T.; Gustavs, L.; Pröschold, T.; Verbruggen, H. Species concept and nomenclatural changes within the genera *Elliptochloris* and *Pseudochlorella* (Trebouxiophyceae) based on an integrative approach. *J. Phycol.* **2016**, *52*, 1125–1145. [[CrossRef](#)]
57. Rindi, F.; Guiry, M.D.; López-Bautista, J.M. Distribution, Morphology, and Phylogeny of Klebsormidium (Klebsormidiales, Charophyceae) in Urban Environments in Europe 1. *J. Phycol.* **2008**, *44*, 1529–1540. [[CrossRef](#)]
58. Nakada, T.; Tomita, M.; Wu, J.; Nozaki, H. Taxonomic revision of *Chlamydomonas* subg. *Amphichloris* (Volvocales, Chlorophyceae), with resurrection of the genus *Dangeardinia* and descriptions of *Ixipapillifera* gen. nov. and *Rhysamphichloris* gen. nov. *J. Phycol.* **2016**, *52*, 283–304. [[CrossRef](#)]
59. Mikhailyuk, T.; Holzinger, A.; Tsarenko, P.; Glaser, K.; Demchenko, E.; Karsten, U. Dictyosphaerium-like morphotype in terrestrial algae: What is *Xerochlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)? *J. Phycol.* **2020**, *56*, 671–686. [[CrossRef](#)]
60. Darienko, T.; Pröschold, T. Reevaluation and discovery of new species of the rare genus *Watanabea* and establishment of *Massjukichlorella* gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using an integrative approach. *J. Phycol.* **2019**, *55*, 493–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Hoffmann, L. Algae of terrestrial habitats. *Bot. Rev.* **1989**, *55*, 77–105. [[CrossRef](#)]
62. Bowker, M.A.; Belnap, J.; Büdel, B.; Sannier, C.; Pietrasiak, N.; Eldridge, D.J.; Rivera-Aguilar, V. Controls on Distribution Patterns of Biological Soil Crusts at Micro- to Global Scales. In *Photosynthetic Adaptation*; Weber, B., Büdel, B., Belnap, J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Germany, 2016; Volume 226, pp. 173–197.
63. Ullmann, I.; Büdel, B. Biological Soil Crusts of Africa. In *Photosynthetic Adaptation*; Weber, B., Büdel, B., Belnap, J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Germany, 2001; Volume 150, pp. 107–118.
64. Warren-Rhodes, K.A.; Rhodes, K.L.; Pointing, S.B.; Ewing, S.A.; Lacap, D.C.; Gómez-Silva, B.; Amundson, R.; Friedmann, E.I.; McKay, C.P. Hypolithic cyanobacteria, dry limit of photosynthesis, and microbial ecology in the hyperarid Atacama Desert. *Microb. Ecol.* **2006**, *52*, 389–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Lange, O.L.; Kilian, E.; Ziegler, H. Water vapor uptake and photosynthesis of lichens: Performance differences in species with green and blue-green algae as phycobionts. *Oecologia* **1986**, *71*, 104–110. [[CrossRef](#)]
66. Nienow, J.A. Ecology of Subaerial Algae. *Nova Hedwig. Beih.* **1996**, *112*, 537–552.
67. Mikhailyuk, T.I.; Sluiman, H.J.; Massalski, A.; Mudimu, O.; Demchenko, E.M.; Kondratyuk, S.Y.; Friedl, T. New Streptophyte Green Algae from Terrestrial Habitats and an Assessment of the Genus *Interfilum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) 1. *J. Phycol.* **2008**, *44*, 1586–1603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Voytsekhovich, A.; Dymytrova, L.; Nadyeina, O. Photobiont composition of some taxa of the genera *Micarea* and *Placynthiella* (Lecanoromycetes, lichenized Ascomycota) from Ukraine. *Folia Cryptogam. Est.* **2011**, *48*, 135–148.
69. Karsten, U.; Herburger, K.; Holzinger, A. Dehydration, temperature, and light tolerance in members of the aeroterrestrial green algal genus *Interfilum* (Streptophyta) from biogeographically different temperate soils. *J. Phycol.* **2014**, *50*, 804–816. [[CrossRef](#)]
70. Dong, H.; Rech, J.A.; Jiang, H.; Sun, H.; Buck, B.J. Endolithic cyanobacteria in soil gypsum: Occurrences in Atacama (Chile), Mojave (United States), and Al-Jafr Basin (Jordan) Deserts. *J. Geophys. Res. Space Phys.* **2007**, *112*, 112. [[CrossRef](#)]

71. Gallego, B.C.; Suzuki, S.; Nealson, K.H.; Wierzchos, J.; Ascaso, C.; Artieda, O.; Ríos, A.D.L. Ignimbrite textural properties as determinants of endolithic colonization patterns from hyper-arid Atacama Desert. *Int. Microbiol.* **2014**, *17*.
72. Wierzchos, J.; Casero, M.C.; Artieda, O.; Ascaso, C. Endolithic microbial habitats as refuges for life in polyextreme environment of the Atacama Desert. *Curr. Opin. Microbiol.* **2018**, *43*, 124–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Dillon, J.G.; Tatsumi, C.M.; Tandingan, P.G.; Castenholz, R.W. Effect of environmental factors on the synthesis of scytonemin, a UV-screening pigment, in a cyanobacterium (*Chroococciopsis* sp.). *Arch. Microbiol.* **2002**, *177*, 322–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Rondanelli, R.; Molina, A.; Falvey, M. The Atacama surface solar maximum. *Bull. Am. Meteorol. Soc.* **2015**, *96*, 405–418. [[CrossRef](#)]
75. Dojani, S.; Kauff, F.; Weber, B.; Büdel, B. Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria in biological soil crusts of the Succulent Karoo and Nama Karoo of southern Africa. *Microb. Ecol.* **2013**, *67*, 286–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Muñoz-Martín, M.Á.; Absalón, I.B.; Perona, E.; Fernández-Valbuena, L.; Garcia-Pichel, F.; Mateo, P. Cyanobacterial biocrust diversity in Mediterranean ecosystems along a latitudinal and climatic gradient. *New Phytol.* **2018**, *221*, 123–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1.6. Водорості біологічних ґрунтових кірочок полярних регіонів

1.6.1. Водорості біологічних ґрунтових кірочок арктичного острова Свальбард (Норвегія)



Biological Soil Crusts of Arctic Svalbard—Water Availability as Potential Controlling Factor for Microalgal Biodiversity

Nadine Borchhardt^{1*}, Christel Baum², Tatiana Mikhailyuk^{1,3} and Ulf Karsten¹

¹ Applied Ecology and Phycology, Institute of Biological Sciences, University of Rostock, Rostock, Germany, ² Soil Science, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, University of Rostock, Rostock, Germany, ³ Department of Phycology, Lichenology and Bryology, M.H. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

OPEN ACCESS

Edited by:

Jeanette M. Norton,
Utah State University, United States

Reviewed by:

David Anthony Pearce,
Northumbria University,
United Kingdom
Jialiang Kuang,
University of Oklahoma, United States

*Correspondence:

Nadine Borchhardt
nadine.borchhardt@uni-rostock.de

Specialty section:

This article was submitted to
Terrestrial Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 25 April 2017

Accepted: 24 July 2017

Published: 08 August 2017

Citation:

Borchhardt N, Baum C, Mikhailyuk T
and Karsten U (2017) Biological Soil
Crusts of Arctic Svalbard—Water
Availability as Potential Controlling
Factor for Microalgal Biodiversity.
Front. Microbiol. 8:1485.
doi: 10.3389/fmicb.2017.01485

In the present study the biodiversity of biological soil crusts (BSCs) formed by phototrophic organisms were investigated on Arctic Svalbard (Norway). These communities exert several important ecological functions and constitute a significant part of vegetation at high latitudes. Non-diatom eukaryotic microalgal species of BSCs from 20 sampling stations around Ny-Ålesund and Longyearbyen were identified by morphology using light microscopy, and the results revealed a high species richness with 102 species in total. 67 taxa belonged to Chlorophyta (31 Chlorophyceae and 36 Trebouxiophyceae), 13 species were Streptophyta (11 Klebsormidiophyceae and two Zygnematomphyceae) and 22 species were Ochrophyta (two Eustigmatophyceae and 20 Xanthophyceae). Surprisingly, *Klebsormidium* strains belonging to clade G (Streptophyta), which were so far described from Southern Africa, could be determined at 5 sampling stations. Furthermore, comparative analyses of Arctic and Antarctic BSCs were undertaken to outline differences in species composition. In addition, a pedological analysis of BSC samples included C, N, S, TP (total phosphorus), and pH measurements to investigate the influence of soil properties on species composition. No significant correlation with these chemical soil parameters was confirmed but the results indicated that pH might affect the BSCs. In addition, a statistically significant influence of precipitation on species composition was determined. Consequently, water availability was identified as one key driver for BSC biodiversity in Arctic regions.

Keywords: chlorophyta, streptophyta, ochrophyta, precipitation, pH-value, soil properties, Spitsbergen

INTRODUCTION

Biological soil crusts (BSCs) represent a community of various organisms associated with soil particles within and on top of the upper few millimeters of the soil. Algae, cyanobacteria, lichens, bacteria, microfungi, and bryophytes in different proportions form a thin layer on the soil surface, where filamentous algae, and cyanobacteria stick together with soil particles by their mucilaginous sheaths and excreted extracellular polymeric substances (EPS) (Belnap et al., 2001). These EPS consist of sticky polysaccharides and proteins, and are typically released by abundant BSC green algae, such as members of the genera *Coccomyxa* and *Klebsormidium*, which leads to adhesion

to soil particles (Barberousse et al., 2006). Some of the EPS adhesives exhibit strong intrinsic mechanical properties (Mostaert et al., 2009), and their producers were frequently observed in BSCs of Antarctica (Pfaff et al., 2016).

The composition and development of BSCs can be very different and hence, various types are distinguished by macroscopic as well as microscopic characteristics (Belnap et al., 2001; Büdel et al., 2009; Williams et al., 2016). BSC types of Arctic Svalbard and Livingston Island, Antarctica were recently described based on visible features, such as the presence/absence of functional groups, their dominance and topography (Williams et al., 2016). The establishment and development of these cryptogamic communities is influenced by several biotic as well as abiotic parameters like pedological properties, climatic factors, and intervention by animals and humans (Elster et al., 1999; Büdel et al., 2009; Langhans et al., 2009; Pushkareva et al., 2016). BSCs are pioneer communities and have important ecological functions in soil stabilization against water and wind erosion (Van Den Ancker and Jungerius, 1985; Eldridge and Greene, 1994; Belnap and Gillette, 1998), change in hydrology as water retention (reviewed in Belnap, 2006; Breen and Lévesque, 2008), primary production and nitrogen fixation (Evans and Lange, 2001; Belnap, 2002; Bhatnagar et al., 2008; Zhang et al., 2009), biogeochemistry as well as geomorphology (Evans and Belnap, 1999) and in nutrient cycles (Wu et al., 2013; Baumann et al., 2017). Furthermore, BSCs have positive influence on the seed germination and plant growth because they enrich nutrients in the soil (Belnap et al., 2001; Evans and Lange, 2001; Harper and Belnap, 2001; Belnap, 2003; Breen and Lévesque, 2008; Ghiloufi et al., 2016).

BSCs are distributed worldwide in all climatic zones and occur mostly in extreme and nutrient-poor habitats, such as hot and cold, semiarid and arid areas, and can be the only vegetation in these landscapes (Belnap and Lange, 2003). Colesie et al. (2014) reported BSCs in continental Antarctica and Borchhardt et al. (2017) in maritime Antarctica. The latter authors also provided for the first time a comprehensive species list of microalgae and lichens of BSCs. Furthermore, a comparative geo-ecological study described various BSC types of Antarctic Livingston Island and Arctic Svalbard, but without any information on biodiversity (Williams et al., 2016). BSCs are generally poorly studied in the Polar Regions until now (Green and Broady, 2001), and a recent review by Pushkareva et al. (2016) summarized all information on Arctic BSCs and concluded that much more studies on the biodiversity of BSCs at high latitudes are needed because of ongoing climate change. In addition, a considerable high areal coverage of BSCs (up to 90%) on Svalbard was recently reported by Williams et al. (2016) which indicated that BSCs might be the prevailing vegetation type at such high latitudes. It is assumed that the BSC composition as well as their distribution will shift or BSCs will even be displaced by invasive species due to climate change in the Polar Regions (Frenot et al., 2005; Pushkareva et al., 2016). Consequently, deeper investigations on the biodiversity of Polar BSCs are urgently required and will enable better prediction of future vegetation development at high latitudes.

Therefore, in the present study two major scientific questions were addressed. Firstly, the microalgal diversity of Arctic

BSCs was investigated. Secondly, local habitat differences were analyzed with a major focus on soil characteristics and precipitation, as these factors might have a strong effect on microalgal species composition in BSCs.

MATERIALS AND METHODS

Study Sites

Svalbard is an archipelago located in the North Atlantic sector of the Arctic Ocean which ranges from 74° to 81° north latitude and from 10° to 35° east longitude, and the capital Longyearbyen is administered by Norway. This group of islands has a mild climate compared to regions at the same latitudes because the West Spitsbergen Current (WSC) transports warm Atlantic water masses into the Arctic Ocean along the West coast of Svalbard. The expedition took place in August 2014 and BSC samples were collected at 20 sampling stations around the two research areas Ny-Ålesund (78°55′26.33″N, 11°55′23.84″E) and Longyearbyen (78°13′10.18″N, 15°39′7.19″E) (**Figure 1, Table 1**). The mean temperature in summer is 8°C for Ny-Ålesund and 5°C for Longyearbyen and −14°C (maximum −35°C) for both localities in winter. The annual precipitation differs between both sampling areas, with an average of 471 mm in Ny-Ålesund and a frequency of 198 precipitation days, while Longyearbyen with 205 mm rain and snow fall at 199 days is much drier. About 70% of precipitation typically falls between October and May, when these areas are usually completely covered by snow (Norwegian Meteorological Institute)¹.

Svalbard's bedrock consists mainly of carbonate rock (Tedrow, 1977) with sandy-textured surface soil in the upper 5 cm (A-horizon). The values of soil pH range from slightly acidic to alkaline and the electrical conductivity was generally low with <100 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (Mann et al., 1986).

BSC Algal Isolation and Culture Conditions

Samples were taken using the lower part of a Petri dish with a diameter of 6 cm, which was manually pushed about 1.5 cm into the BSC. Using a spatula the Petri dish with the sample inside was removed from the remaining BSC, closed with the lid and sealed with a stripe of Parafilm. From these BSC samples, enrichment cultures, subcultures and later algal isolates were all established on solid 1.5% Difco™ Agar (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) made with Bold's Basal Medium and vitamins modified by tripled nitrate concentration (3N-BBM+V) (Starr and Zeikus, 1993). All cultures were kept at 15°C, 30 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ under a 16:8 h light:dark cycle (Osram Daylight Lumilux Cool White lamps L36W/840) because these parameters guaranteed suitable growth conditions which was ascertained in previous investigations. This can be explained by the assumption that most marine and terrestrial algae in the Arctic are rather migrated from the North Atlantic and hence, have relatively high temperature requirements (10–20°C) for growth and photosynthesis. In addition, a study on vegetation mats of Svalbard revealed an increase by about 5°C during summertime within the communities (Coulson

¹<https://www.met.no>

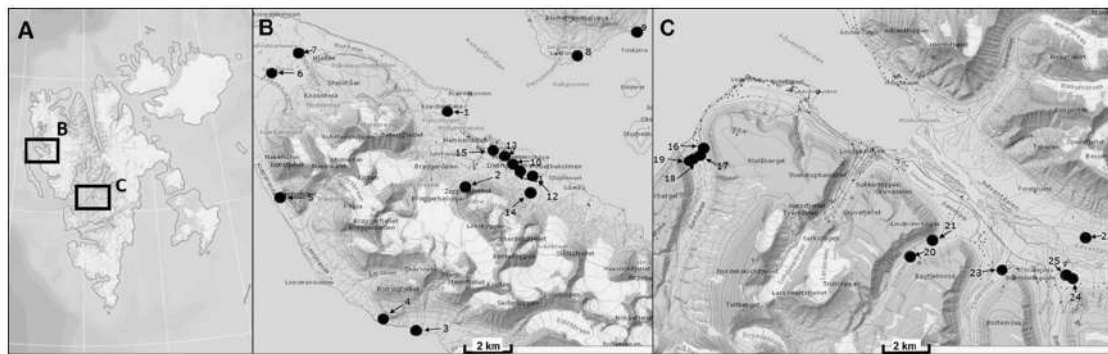


FIGURE 1 | Map of sampling areas for collecting biological soil crusts. **(A)** The two investigated sampling localities on Svalbard, **(B)** sampling area around Ny-Ålesund, **(C)** sampling area around Longyearbyen. Numbers of sampling stations are explained in **Table 1**.

et al., 1993) which shows that the culture conditions were comparable to the environmental conditions. The Agar plates were regularly inspected (twice a week) for the appearance of vital non-diatom eukaryotic algae, and positive colonies were transferred with a metal needle to a new agar plate using a stereo microscope (ZS40, Olympus, Tokyo, Japan) with a magnification of 400x. The growth of the colonies was frequently monitored and several subcultures were generated by further serial transfers under sterile conditions for purification, until no contamination with other algae or fungi was verified and unialgal cultures could be established. Using this time-consuming approach, finally 74 unialgal strains were isolated and are now kept in the Culture Collection at the University of Rostock. The isolated strains were identified to the species or at least the genus level using a light microscope (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) with a magnification of 1,000x. The identification was mainly based on the identification key of Ettl and Gärtner (2014), and species as well as generic names were checked with Guiry and Guiry (2016)² with regard to the current taxonomy. In addition, further identification literature is mentioned in **Table S1**. Mucilage as one identification feature was visualized with one drop of an aqueous solution of methylene blue (1.5%), and light micrographs were taken with an Olympus UC30 camera attached to the BX51 microscope and processed with the software cellSens Entry (Olympus, Tokyo, Japan). Moreover, hand drawings were made on morphological features for some algal species (**Table S1**).

β-Diversity

According to Whittaker (1960) β-diversity reflects the ratio between regional and local species diversity, and hence is a measure of change in species composition between habitats or variations of environmental conditions, such as moisture gradients or temperature. For this purpose, the species number was compared individually for each habitat. β-diversity is high if the species number common to both habitats is low and vice versa. Consequently, β-diversity maximum is reached if no single

species common to both habitats exists, and β-diversity is at minimum if species composition of both habitats is identical. The following formula (Whittaker, 1972) was used for β-diversity calculation using the presence-absence data of species:

$$\beta = (S_1 - c) + (S_2 - c)$$

S_1 is the total number of species recorded in the first habitat, S_2 is the total number of species recorded in the second habitat and c is the number of species common to both communities.

Jaccard Index and Sørensen Index

Both the Jaccard index (Jaccard, 1902) and Sørensen index (Sørensen, 1948) are a similarity coefficient, which measures the similarity of species composition sets. In order to calculate the Jaccard index the size of the intersection is divided by the size of the union of the sample set. The indices scales are defined from 0 to 1. The similarity is higher if the value is closer to 1. The Jaccard index (SI_J) and the Sørensen index (SI_S) were calculated with the following formulas:

$$SI_J = a(a + b + c)^{-1}$$

$$SI_S = 2a(2a + b + c)^{-1}$$

a is the number of species common to both communities, b is the total number of species recorded in the first habitat and c is the total number of species recorded in the second habitat.

Analyses of Soil Properties

The pedological variables were analyzed using the soil underneath the sampled BSCs. Determination of soil pH was performed electrometrically using a glass electrode in 0.01 M CaCl_2 with a soil: solution ratio of 1:2.5. Total carbon (C), total nitrogen (N), and total sulphur (S) contents of the soils were determined with a Vario EL elemental analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany). The total phosphorus (P) content was extracted from 0.5 g dry soil material by microwave-assisted digestion with aqua regia solution (3:1 hydrochloric acid—nitric acid) (Chen and Ma,

²<http://algaebase.org>

TABLE 1 | Sampling stations on Arctic Svalbard.

Station number	Station name	Abbreviation	Coordinates
1	Brandal foreland	BV	78°56.285''N 11°49.769''E
3	Daerten	Dae	78°51.009''N 11°47.532''E
4	between Daerten and Stenahytten	D-S	78°51.240''N 11°43.571''E
5	between Stenahytten and Kjsvika	SH-Kj	78°54.009''N 11°30.550''E
6	Geopol	Geo	78°56.973''N 11°28.594''E
7	between Geopol and Kongsfjorden coast	Geo-Ko	78°57.485''N 11°31.651''E
8	London, Blomstrand Island	Lon	78°57.769''N 12°04.871''E
9	Gorilla, Blomstrand Island	Gor	78°58.401''N 12°11.857''E
10	past Zeppelin 1	Zepp1	78°55.099''N 11°57.865''E
11	past Zeppelin 2	nZepp2	78°54.933''N 11°58.780''E
13	Zeppelin tower	Zepp	78°55.280''N 11°56.872''E
14	beneath outback plateau	Hintpl	78°54.434''N 12°00.156''E
15	station Ny-Ålesund	NA	78°55.399''N 11°55.475''E
18	Bjørndalen	BD	78°13.167''N 15°18.777''E
20	Eindalen	Ei	78°10.784''N 15°43.099''E
21	Eindalen entrance	EIE	78°11.180''N 15°45.662''E
22	Mountain, observatory, pit 7	Berg	78°08.910''N 16°02.889''E
23	Tordalen	TD	78°10.433''N 15°53.413''E
24	Adventsdalen	AD	78°10.205''N 16°01.336''E
25	Adventsdalen, camp	ADC	78°10.292''N 16°00.574''E

Station numbers 1–15, sampling area around Ny-Ålesund; Station numbers 18–25, sampling area around Longyearbyen. For comparison see also the map of **Figure 1**.

2001). Water-extractable P was determined at a solid:solution ratio of 1:50 for 1 h at 20°C. The P concentrations in both extracts (aqua regia and water) were measured by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) (Optima 8300 PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau, Germany).

Multivariate Statistics

The multivariate analysis of the BSC data were conducted using the statistical programs PRIMER 6 and 7. Non-metric multi-dimensional scaling (MDS, Kruskal and Wish, 1978) was based on square root transformed data and Bray-Curtis similarity and the significance of similarity was tested by using ANOSIM permutation test (Clarke and Green, 1988; Clarke, 1993). This test calculates a global measure R which ranges between 0 and 1 and constitutes some degree of discrimination between treatments. $R = 0$ means no differences between the BSC sampling stations based on the respective species composition. $R = 1$ means that the sampling stations differ from each other. The stress value represents the quality of the graph (0 = perfect, 0.05 = good, 0.2 = poor). The MDS plot is dimensionless and visualizes the relationship of each data point to another. Distances between points represent the similarity

and the difference, respectively, of all identified taxa. Principle component analysis (PCA, Kent and Coker, 1992) was based on square root transformed, normalized data and Euclidean distance matrix, and visualized comparison of the two sampling localities by chemical soil properties and precipitation data. BEST test showed environmental factor which correlated with species composition. MARGINAL test as well as SEQUENTIAL test resulted from distance-based linear models (DistLM) were done to test relationships between BSC species composition and each soil parameter.

RESULTS

Species Composition, Diversity and Localities

In total, 102 algal species were identified in the BSCs of Arctic Svalbard, with 67 species belonging to the Chlorophyta, of which 31 species were Chlorophyceae, and 36 species Trebouxiophyceae. Thirteen species were identified as Streptophyta, with 11 members of the Klebsormidiophyceae and 2 of the Zygnematophyceae, while 22 species were determined as Ochrophyta, 2 Eustigmatophyceae, and 20 Xantophyceae (**Figure 2**, **Table 2**). Species names, light micrographs, hand drawings and further information are summarized in an algae catalog (**Table S1**).

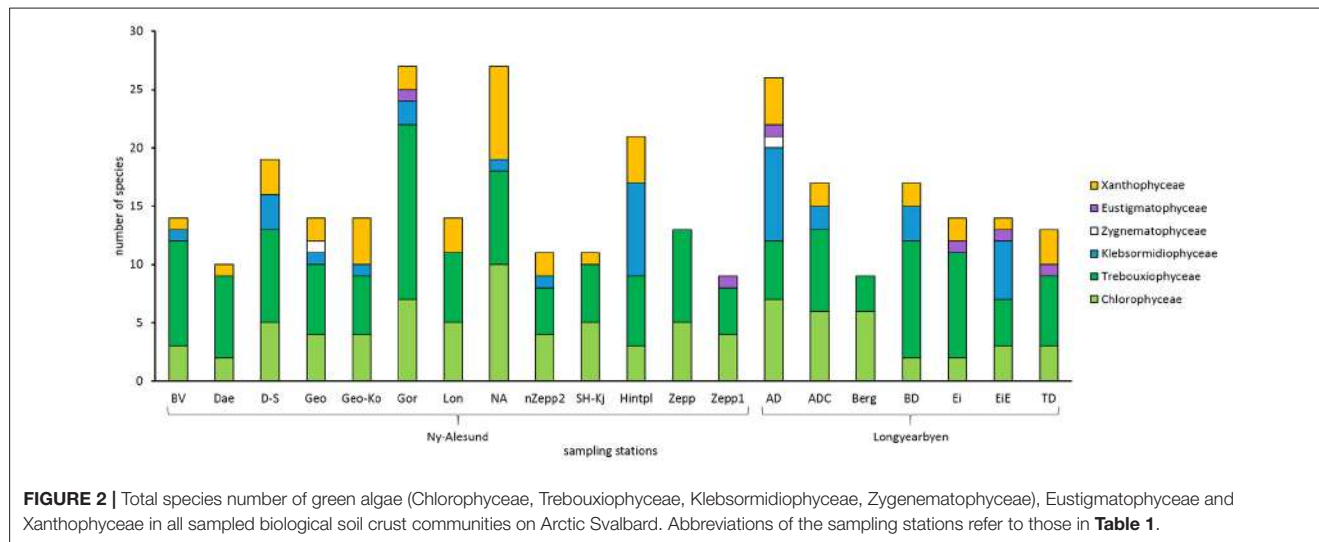
BSC algal species numbers varied between 9 and 27 taxa per sampling station (**Figure 2**). At most sampling stations species number ranged between 9 and 14 taxa. Species richness of five sampling stations around Ny-Ålesund (D-S, Gor, NA, Hinter, AD) was about double as high.

In addition, the proportion of taxonomic groups was also variable. All investigated BSCs contained Chlorophyceae as well as Trebouxiophyceae while Zygnematophyceae were confined to only 2 sampling stations and Eustigmatophyceae to 3 stations. Moreover, Xantophyceae were determined in all BSCs except 3 sampling stations. Interestingly, BSCs from “Zepp” and “Berg” hosted exclusively Chlorophyceae and Trebouxiophyceae.

However, the composition differed and 3 common taxa were found. The most abundant algal species, which were found in at least 10 sampling stations, were *Coccomyxa simplex* Mainx, *Coccomyxa* sp., *Mychonastes homosphaera* Fott and Novákova, and *Stichococcus bacillaris* Grintzesco and Péterfi. It should be pointed out that none of the more common species could be identified in all sampled BSCs.

Surprisingly, *Klebsormidium* strains belonging to clade G (Streptophyta) were for the first time determined in the Arctic at 5 sampling stations which were mainly located around Longyearbyen (**Figure 2**, **Table S1**). Species of *Klebsormidium* usually are very difficult to distinguish by morphology and hence genetic analysis are necessary. However, members of clade G exhibit unique morphological features (Rindi et al., 2011), for example, they form thin filaments (4.5–8 μm wide) with short but compact cells and small pyrenoid.

For the Ny-Ålesund and Longyearbyen data set a β-diversity value of 64 was calculated and the Jaccard index as well as Sørensen index were lower than 0.4 (**Table 3**) pointing to



differences in species numbers between both sampling areas which was additionally visualized by a frequency histogram (**Figure S1**).

The MDS analysis showed significantly no grouping by sampling localities regarding the species compositions (**Figure 3**). ANOSIM test resulted in global R -value of 0.267 with a significance of $p = 0.008$ which confirmed that significantly no differentiation between the BSC species composition from sampling stations around Ny-Ålesund and Longyearbyen existed.

Soil Properties

The pH value ranged from extremely acidic (4.2) to slightly alkaline (7.4), with predominance of neutral to slightly alkaline in the tested areas. The soil organic matter content ranged from the level of mineral soils in BSCs from “NA” (calculated soil organic matter content: <3%) to the level of peaty soils (>50% soil organic matter) in “BV” (calculated soil organic matter content: 70%). BSCs from “Zepp1” had the highest S content (about 1%) whereby the median value of the S content was 0.1%. The TP ranged between low contents of 112.8 mg kg⁻¹ in samples from “Geo” and high contents of 782.8 mg kg⁻¹ in samples from “BV.” In “BV” nearly half of the TP (381.3 mg kg⁻¹) was water-extractable and thereby easily plant-available (**Table 4**).

Additionally, the soil properties of BSCs-free topsoil in “NA” were analyzed in order to compare bare soil and sediment underneath BSCs and thus, to investigate influences of these communities. These BSCs-free soil was characterized as reference by soil organic matter accumulation already (calculated soil organic matter content about 17 vs. 3% in the BSC covered soil) and an increased P content (**Table 4**).

Species Composition and Soil Properties

The relationship between species composition of each sampling station and the respective soil properties were analyzed statistically. PCA showed no clear clusters (**Figure 4**) and ANOSIM permutation test calculated a global R -value of 0.299

and a p -value of 0.019. The direction of the vectors in the plot visualized at which sampling station the parameter had a greater influence. The BEST test ascertained the environmental parameter which had an influence on the species composition and revealed correlation with precipitation. Both MARGINAL test and SEQUENTIAL test confirmed this result by a significant p -value of 0.011. No further correlations with the other analyzed factors could be determined but a p -value of 0.061 indicated that a relationship between pH value and species composition might exist.

Comparison between Arctic and Antarctic Species Composition and Diversity

Data sets of Antarctic BSC algal species reported by Borchhardt et al. (2017) were used for statistical analyses in order to compare species composition of both Polar Regions. The authors identified 106 taxa in maritime Antarctica and calculated β -diversity value of 61–67. These results showed very similar algal species richness and diversity of BSC to data presented in the present study. A comparison of both species lists revealed 40 common taxa in overall 112 species. The MDS analysis including datasets of Arctic as well as Antarctic BSCs visualized no significant grouping by Polar Regions (**Figure 5**). ANOSIM test calculated global R -value of 0.092 which indicated that no differentiation between the BSC species composition from Svalbard and maritime Antarctica existed. However, lack of significance could be confirmed because the significance level of sample statistic was $p = 0.283$.

DISCUSSION

BSCs host a variety of different organisms (reviewed in Belnap et al., 2003; Weber et al., 2016). Compared to former literature, the data presented in this study point to a surprisingly high species richness of microalgae in BSCs of Arctic Svalbard (102 species). Studies on terrestrial microflora are rare in

TABLE 2 | Species list of all identified algae associated with sampled biological soil crusts on Arctic Svalbard.

Species	“Ny-Alesund”	“Longyearbyen”
CHLOROPHYCEAE		
<i>Bracteacoccus aggregatus</i>	x	
<i>Bracteacoccus</i> sp.	x	
<i>Chlamydomonas</i> sp.	x	x
<i>Chlorococcum lobatum</i>		x
<i>Chlorococcum</i> cf. <i>minutum</i>	x	
<i>Chlorococcum</i> sp.	x	
<i>Chloromonas</i> sp.	x	x
<i>Chromochloris zofingiensis</i>	x	
<i>Coelastrella aroterrestrica</i>	x	x
<i>Coelastrella rubescens</i>	x	x
<i>Coelastrella</i> cf. <i>rubescens</i>	x	x
<i>Coelastrella</i> sp.		x
<i>Coenobotrys</i> cf. <i>gloeobotrydiformis</i>		x
<i>Coenochloris</i> sp.	x	
<i>Coenocystis oleifera</i> var. <i>antarctica</i>	x	x
<i>Desmodesmus abundans</i>	x	x
<i>Fasciculochloris</i> cf. <i>boldii</i>	x	
<i>Gloeocystis</i> sp.	x	x
<i>Gungnir mantoniae</i>	x	
<i>Heterotetracystis akinetos</i>		x
<i>Heterotetracystis intermedia</i>	x	
<i>Hormotilopsis</i> sp.		x
<i>Lobochlamys</i> cf. <i>culleus</i>	x	x
<i>Lobochlamys</i> sp.		x
<i>Macrochloris cohaerens</i>	x	
<i>Mychonastes homosphaera</i>	x	x
<i>Pseudodictyochloris multinucleata</i>	x	x
<i>Sporotetras polydermatica</i>	x	x
<i>Tetracystis</i> cf. <i>fissurata</i>	x	
<i>Tetracystis</i> sp.	x	x
<i>Uvulifera</i> sp.	x	
TREBOUXIOPHYCEAE		
<i>Chlorella chlorelloides</i>		x
<i>Chlorella vulgaris</i>	x	x
<i>Chlorella</i> cf. <i>vulgaris</i>	x	x
<i>Chlorella</i> sp.	x	x
<i>Chloridium ellipsoideum</i>	x	x
<i>Chloridium</i> sp.	x	
<i>Coccomyxa simplex</i>	x	x
<i>Coccomyxa subglobosa</i>	x	
<i>Coccomyxa</i> sp.	x	x
<i>Desmococcus olivaceus</i>	x	x
<i>Desmococcus</i> sp.	x	
<i>Dictyosphaerium dichotomum</i>		x
<i>Elliptochloris bilobata</i>	x	x
<i>Elliptochloris subsphaerica</i>	x	
<i>Elliptochloris</i> sp.	x	
<i>Gloeotila scopulina</i>	x	
<i>Heterochlorella luteoviridis</i>	x	

(Continued)

TABLE 2 | Continued

Species	“Ny-Alesund”	“Longyearbyen”
<i>Koliella sempervirens</i>	x	
<i>Muriella terrestris</i>	x	
<i>Muriella</i> sp.	x	
<i>Muriella</i> sp. 1 (Broady)	x	
<i>Myrmecia bisecta</i>	x	
<i>Myrmecia</i> sp.	x	
<i>Neocytis</i> cf. <i>brevis</i>	x	x
<i>Neocytis</i> sp.	x	
<i>Parachlorella</i> cf. <i>kessleri</i>		x
<i>Pseudochlorella</i> cf. <i>signiensis</i>		x
<i>Stichococcus allas</i>	x	x
<i>Stichococcus</i> cf. <i>allas</i>	x	x
<i>Stichococcus bacillaris</i>	x	x
<i>Stichococcus chlorelloides</i>	x	x
<i>Stichococcus exiguus</i>	x	
<i>Stichococcus</i> cf. <i>exiguus</i>	x	
<i>Stichococcus minutus</i>	x	x
<i>Stichococcus</i> cf. <i>minutus</i>	x	
<i>Stichococcus</i> sp.	x	x
KLEBSORMIDIOPHYCEAE		
<i>Interfilum</i> cf. <i>massjukiae</i>		x
<i>Interfilum</i> sp.	x	x
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>crenulatum</i>	x	
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>dissectum</i>	x	x
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>flaccidum</i>	x	x
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>klebsii</i>	x	
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>montanum</i>	x	x
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>nitens</i>	x	x
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>subtile</i>		x
<i>Klebsormidium</i> sp.	x	x
<i>Klebsormidium</i> sp. (G-Clade)	x	x
ZYGNEMATOPHYCEAE		
<i>Actinotaenium</i> sp.		x
<i>Cylindrocystis crassa</i>	x	
Eustigmatophyceae		
<i>Eustigmatos vischeri</i>	x	x
<i>Eustigmatos</i> cf. <i>vischeri</i>		x
XANTHOPHYCEAE		
<i>Botrydiopsis intercedens</i>	x	
<i>Botrydiopsis arhiza</i>	x	
<i>Botrydiopsis</i> cf. <i>constricta</i>	x	
<i>Chlorellidium</i> cf. <i>tetrapotrys</i>		x
<i>Chloridella</i> sp.	x	
<i>Heterococcus</i> sp.	x	x
<i>Monallantus brevicylindrus</i>	x	
<i>Nephrodiella</i> cf. <i>phaseolus</i>	x	
<i>Pleurochloris meiringensis</i>	x	x
<i>Pleurochloris pseudopolychloris</i>	x	x
<i>Pleurochloris polychloris</i>	x	
<i>Pleurogaster lunaris</i>	x	x
<i>Tribonema viride</i>	x	

(Continued)

TABLE 2 | Continued

Species	"Ny-Alesund"	"Longyearbyen"
<i>Tribonema vulgare</i>	x	
<i>Tribonema</i> sp.	x	
<i>Xanthonema cf. debile</i>	x	x
<i>Xanthonema solidum</i>	x	x
<i>Xanthonema cf. solidum</i>	x	
<i>Xanthonema exile</i>	x	
<i>Xanthonema</i> sp.	x	x

Information about the two sampling areas refers to those in Table 1. x: Presence of the respective algae species.

TABLE 3 | Diversity indices.

	"Ny-Alesund"–"Longyearbyen"
β -diversity	64
Jaccard index	0.22
Sørensen index	0.36

The scales of Jaccard index and Sørensen index are defined from 0 to 1 (0 = no similarity, 1 = highest similarity).

comparison to aquatic investigations (Elster et al., 1999) and also BSCs are generally poorly studied in the Polar Regions (Green and Broady, 2001). Previous studies reported different species numbers of microalgae in BSCs which ranged from only few to about 100 taxa depending on habitat. A study about the algal species composition of continental Antarctica reported only 10 chlorophytes in soil samples (Broady and Weinstein, 1998) although they were not associated with a BSC community. In contrast, 78 eukaryotic algal species in soil (Zidarova, 2008) and 106 species in BSCs (Borchhardt et al., 2017) of maritime Antarctica were reported. Kim et al. (2008) identified 23 eukaryotic algal species and (Kaštovská et al., 2005) 33 taxa in soil samples from Arctic Svalbard partly covered by vascular plants and mosses which point to a rather low diversity. In addition, Elster et al. (1999) found 84 eukaryotic soil algae in the Arctic desert of central Ellesmere Island, Canada which is similar to the data presented in this study. However, a comparison of both species lists revealed less matches, only 33 taxa (29 green algae, 4 xanthophytes) were determined in both study sites.

The proportion of xanthophyte species was 5 fold higher (20 species) in the present study compared to the reported number in BSCs from coastal dunes at the Baltic Sea (Schulz et al., 2016, 4 species). This conspicuous biogeographic pattern for xanthophytes was already indicated by Büdel et al. (2016), who assumed that the species richness of xanthophytes increases with cooler habitats. These authors mentioned members of *Botrydiopsis*, *Tribonema*, *Xanthonema*, and *Heterococcus* as most common species which all occurred in the Arctic BSCs of the present study. Lower species numbers of xanthophytes were determined in the Arctic desert of Canada (4 species, Elster et al., 1999) and Maritime Antarctica (7 species, Borchhardt et al., 2017).

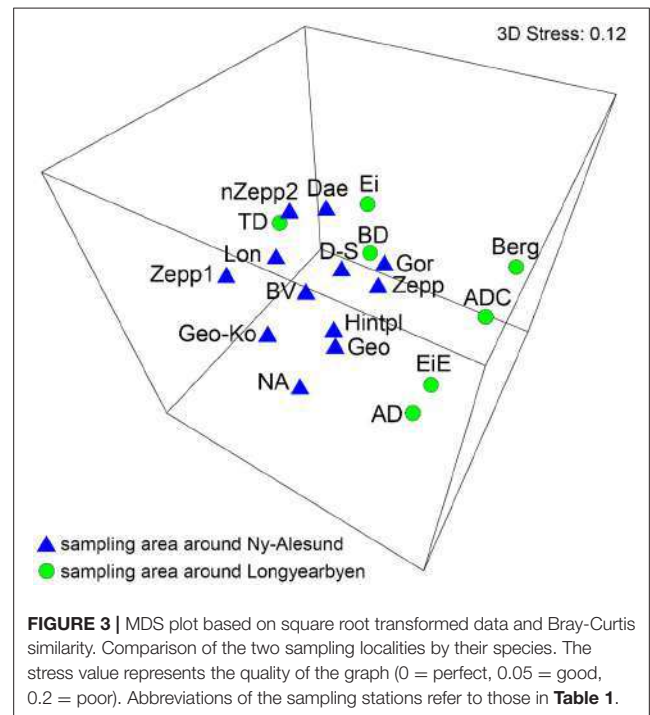


FIGURE 3 | MDS plot based on square root transformed data and Bray-Curtis similarity. Comparison of the two sampling localities by their species. The stress value represents the quality of the graph (0 = perfect, 0.05 = good, 0.2 = poor). Abbreviations of the sampling stations refer to those in Table 1.

Unfortunately, some aspects are impeding detailed comparison with previous studies. On one hand more investigations on the biodiversity of BSCs at high latitudes are needed and on the other hand sometimes only species numbers without taxonomic information were provided and thus verification was not possible. Furthermore, identification by morphology is often difficult and depends on experience, methods, equipment and taxonomic state of the organisms, or cryptic species. Therefore, we suggest to use an integrative approach including several methods such as direct microscopy and cultivation with different media and additionally genetic analyses. Metagenomic approaches for Arctic BSCs were not conducted yet, because of still unsolved problems with optimum primers and available sequences in database. On the other hand comprehensive data based on morphology exist in the literature which enabled a comparison with our results.

Fortunately, a direct comparison of species richness and biodiversity of Arctic as well as Antarctic BSCs could be performed because the identifications were done by the same authors using exactly the same methods. These analyses revealed approximately equal β -diversity based on very similar species numbers (Arctic: 102, Antarctic: 106) and therefore, we conclude that the species richness of BSCs in the Polar Regions are congruent. Moreover, MDS as well as ANOSIM analysis showed no significant grouping by Polar Regions which indicated that many BSC taxa (40 species) are bipolar distributed. Some of these bipolar taxa are also known as cosmopolitans, for example, member of *Chlamydomonas*, *Coccomyxa*, and *Klebsormidium* (Ettl and Gärtner, 2014).

Surprisingly, *Klebsormidium* sp. (Streptophyta) belonging to G clade (according to Rindi et al., 2011) was found at 5

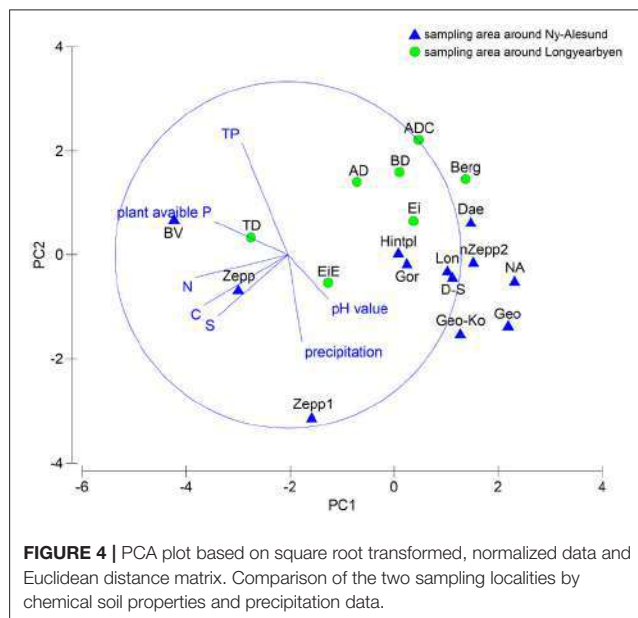
TABLE 4 | Chemical properties of sampled soil underneath biological soil crusts on Arctic Svalbard.

Sampling station	Precipitation [mm a ⁻¹] ^a	pH value	C [g kg ⁻¹]	N [g kg ⁻¹]	S [g kg ⁻¹]	TP [mg kg ⁻¹]	Water-extractable P [mg kg ⁻¹]
AD	205	4.9	98.8	6.6	2.5	581.3	20.4
ADC	205	7.0	38.2	2.5	0.7	753.0	87.3
Berg	205	6.1	26.0	1.9	0.8	461.9	4.5
BD	471	5.9	111.6	3.6	0.6	543.2	48.6
BV	205	4.7	403.6	19.9	3.0	782.8	381.3
Dae	471	4.9	20.7	1.5	0.6	365.7	10.6
D-S	471	6.9	108.5	3.4	0.6	334.2	8.4
Ei	205	4.2	74.9	2.9	2.9	281.6	0.1
EiE	205	6.8	331.6	9.6	4.9	395.0	4.4
Geo	471	7.2	88.6	1.5	0.6	112.8	2.4
Geo-Ko	471	7.4	101.4	3.6	1.7	155.3	7.7
Gor	471	5.0	90.5	5.0	1.4	315.3	17.7
Lon	471	7.2	104.7	3.2	0.6	359.8	24.8
NA	471	6.3	17.0	1.4	0.5	169.1	5.5
NA without BSCs	471	6.5	101.4	3.6	1.7	173.4	7.0
nZepp2	471	6.0	27.2	1.8	1.2	286.5	12.1
SH-Kj	471	7.2	183.1	11.0	3.3	1418.7	21.2
TD	205	5.5	296.2	12.1	6.4	515.9	108.1
Hintpl	471	7.2	109.4	5.1	1.4	522.1	58.6
Zepp	471	5.2	385.4	14.3	4.5	438.5	174.4
Zepp1	471	6.2	346.9	10.6	10.8	101.1	12.6

Precipitation data for the sampling regions are also given. Abbreviations of the sampling stations refer to those in **Table 1**.

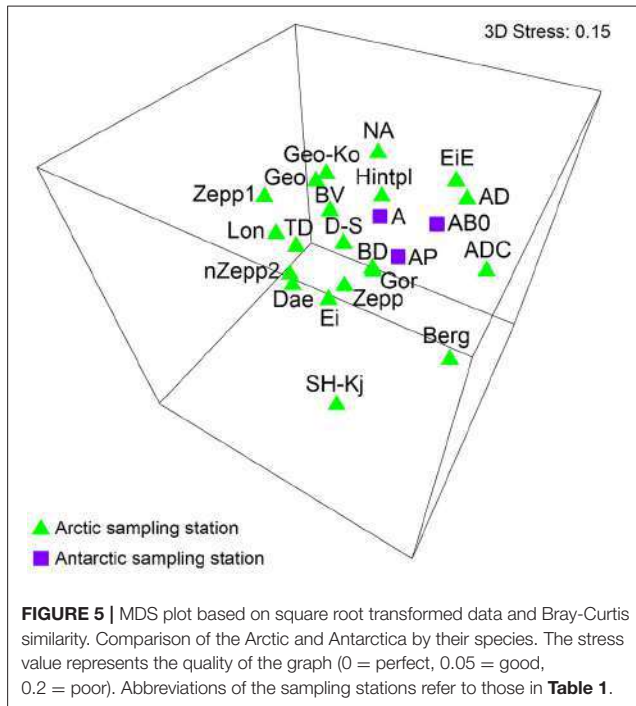
^aInformation from Norwegian Meteorological Institute.

C, carbon; N, nitrogen; S, sulfur; TP, total Phosphorus.



sampling stations on Arctic Svalbard. In general, the genus *Klebsormidium* is distributed worldwide as a typical member of BSC communities, and exhibits a high level of morphological plasticity which is shown as differences in ultrastructure and cell

wall texture (Mikhailyuk et al., 2014). Due to this peculiarity, the delimitation of species by morphology usually is very difficult and therefore, genetic analysis are necessary. In contrast, the G lineage is genetically relatively isolated from all other *Klebsormidium* species and additionally, also distinguished from the other lineages by a unique morphology. Therefore, it is possible to unambiguously identify members of G clade using light microscopy only. Most interesting, species belonging to G clade were so far mainly found in BSCs of hot dryland regions of South Africa (Rindi et al., 2011; Karsten et al., 2015; Mikhailyuk et al., 2015). All these authors characterized members of clade G as African group and Ryšánek et al. (2015) confirmed that an investigation of 200 *Klebsormidium* strains from Europe, Asia and North America revealed no single species belonging to clade G. South Africa, where the strains of clade G were isolated for the first time, constitutes a xerophytic habitat which is characterized by very low annual precipitation of 56 mm with only 0–14 monthly rainfall days and hence by the occurrence of desiccation-tolerant microalgae such as *Klebsormidium* clade G members (Karsten et al., 2015). Statistical analysis of the biogeography of several *Klebsormidium* species from different regions showed clear separation of the African from the remaining groups and hence very high dissimilarity (Mikhailyuk et al., 2015). For the first time in the present study 5 clade G *Klebsormidium* strains could be identified in samples mainly collected around Longyearbyen which has also low annual precipitation (205 mm), and hence can be characterized as dry Tundra climate ET



according to the climate classification by Köppen and Geiger (1930–1939). A study on the biodiversity of *Klebsormidium* taxa along elevational gradients of the Alps demonstrated that members of all known lineages (B, C, D, E, and F) could be morphologically and genetically verified except members of clade G (Mikhailyuk et al., 2015). Data of this investigation indicated that the key driver for the occurrence of *Klebsormidium* clade G is rather water availability than the temperature which coincides with our results.

Although the species composition of all sampled BSCs from Svalbard highly varied, our results showed no significant differences between the two investigated localities Ny-Ålesund and Longyearbyen. Therefore the biodiversity data might be representative for a larger area of Arctic Svalbard.

No correlations between BSC species composition and analyzed chemical soil properties could be outlined, although Schulz et al. (2016) reported the TP content as the main driver for the BSC microalgal species composition collected at coastal dunes of the Baltic Sea. This might be explained by generally higher P contents and dominant optimal soil pH for high bioavailability of P (Table 4) in these Arctic soils, which suggest a sufficient P supply instead of P limited growth. A comparison with the soil TP concentrations measured by Schulz et al. (2016) showed noticeable lower values, with TP contents ranging between 90 and 310 mg kg⁻¹ soil with a median value of 110 mg kg⁻¹. In contrast, our analysis resulted in about 3 fold higher TP contents (median of 366 mg kg⁻¹) with a remarkable maximum value of 753 mg kg⁻¹. Mann et al. (1986) analyzed soils from different locations around Kongsfjorden which corresponded to the sampling stations “Geo” and “London” located near Ny-Ålesund. The TP contents of the soil directly underneath the

BSCs in the present study revealed about 10-fold increased P amounts compared to the bulk topsoil data presented by Mann et al. (1986). Our TP concentrations are confirmed by results of Beraldi-Campesi et al. (2009), who also described increased P contents under BSCs of the Colorado Plateau highlands and the Sonoran Desert lowlands (USA) compared to the bulk soil without BSCs, as well as by increased P concentrations with BSC growth (Wu et al., 2013). Chemical data of soil underneath BSCs presented in this study revealed noticeable higher contents of organic matter, which might be promoted by decreased decomposition activity of soil organic matter in Arctic climate conditions, which is confirmed by observations in Arctic and Antarctic BSCs (Williams et al., 2016).

The determined pH values varied between 4.2 and 7.4 but significant correlation with BSC algal species composition was not confirmed statistically. However, Kaštovská et al. (2007) reported that the abundance of microalgae increased with lower pH, and data of statistical analysis presented in our study showed a *p*-value very close to significance threshold which might indeed reflect such a relationship between pH and species composition. It should be pointed out that our results were based on presence-absence data, and that pH might affect more the abundance of organisms than species richness.

Only precipitation could be identified as one key factor which controlled BSC species composition and it is known that the availability of water is an important environmental factor for the occurrence of soil algae (Hoffmann, 1989; Ohtani et al., 1991; reviewed in Broady, 1996; Adams et al., 2006). Borchhardt et al. (2017) also showed that soil moisture content of various Antarctic microhabitats affected the specific species composition in BSCs.

Another abiotic factor, which controls BSC composition, might be substrate and soil texture. Results by Kaštovská et al. (2005) and Schulz et al. (2016) indicated that the soil particle size influenced the abundance as well as diversity of BSC organisms.

The discrepancy of missing correlation between species compositions and environmental factors (except water availability) can be explained by the heterogeneity of the studied habitats. Both microclimatic (e.g., diurnal variations) and macroclimatic factors (e.g., precipitation and temperature) might affect species diversity. However, more studies are needed to evaluate which environmental factors control species composition and biodiversity in Arctic BSCs. These results in combination with the provided species lists would offer a basis for understanding the functions of BSCs which constitute the main vegetation of Arctic Svalbard.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

UK conceived and designed the study. UK and NB collected the samples. NB cultivated as well as isolated all microalgae, took light micrographs, made hand drawings, created figures and tables, calculated biodiversity indices, did statistical analyses and wrote the first draft of the manuscript. NB and TM identified species. CB did all soil analyses and wrote part of the section

Material and Methods. All authors edited and revised the manuscript and approved the publication.

FUNDING

This study was funded by the DFG project “Polarcrust” (KA899/23-1) in the frame of the Priority Program 1158 “Antarctic Research” (DFG: Deutsche Forschungsgemeinschaft).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Soil Science group of the University of Rostock for technical support and chemical analysis. TM thanks

the Alexander von Humboldt Foundation for financial support in the frame of a Georg-Forster-Fellowship.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01485/full#supplementary-material>

Table S1 | Algae catalog. Species list of algae and summary of several information about every identified species. x: Presence of the species, black arrow: nucleus, white arrow: pyrenoid, gray arrow: stigma, bar: 10 μ m.

Figure S1 | Frequency histogram. Number of species which were found in different numbers of sampling stations on Svalbard.

REFERENCES

- Adams, B. J., Bardgett, R. D., Ayres, E., Wall, D. H., Aislabie, J., Bamforth, S., et al. (2006). Diversity and distribution of Victoria Land biota. *Soil Biol. Biochem.* 38, 3003–3018. doi: 10.1016/j.soilbio.2006.04.030
- Barberousse, H., Ruiz, G., Gloaguen, V., Lombardo, R. J., Djediat, C., Mascarell, G., et al. (2006). Capsular polysaccharides secreted by building façade colonisers: characterisation and adsorption to surfaces. *Biofouling* 22, 361–370. doi: 10.1080/08927010601035803
- Baumann, K., Glaser, K., Mutz, J.-E., Karsten, U., MacLennan, A., Hu, Y., et al. (2017). Biological soil crusts of temperate forests: their role in P cycling. *Soil Biol. Biochem.* 109, 156–166. doi: 10.1016/j.soilbio.2017.02.011
- Belnap, J. (2002). Nitrogen fixation in biological soil crusts from southeast Utah, U. S. A. *Biol. Fertil. Soils* 35, 128–135. doi: 10.1007/s00374-002-0452-x
- Belnap, J. (2003). “Factors influencing nitrogen fixation and nitrogen release in biological soil crusts,” in *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*, eds J. Belnap and O. L. Lange (Berlin; Heidelberg: Springer), 241–261.
- Belnap, J. (2006). The potential roles of biological soil crusts in dryland hydrologic cycles. *Hydrol. Process.* 20, 3159–3178. doi: 10.1002/hyp.6325
- Belnap, J., and Gillette, D. A. (1998). Vulnerability of desert biological soil crusts to wind erosion: the influences of crust development, soil texture, and disturbance. *J. Arid Environ.* 39, 133–142. doi: 10.1006/jare.1998.0388
- Belnap, J., Büdel, B., and Lange, O. L. (2001). *Biological Soil Crusts: Characteristics and Distribution*. Berlin; Heidelberg: Springer.
- Belnap, J., and Lange, O. (2003). *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. Berlin; Heidelberg: Springer.
- Belnap, J., Prasse, R., and Harper, K. T. (2003). “Influence of biological soil crusts on soil environments and vascular plants,” in *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*, eds J. Belnap and O. L. Lange (Berlin; Heidelberg: Springer), 281–300.
- Beraldi-Campesi, H., Hartnett, H. E., Anbar, A., Gordon, G. W., and Garcia-Pichel, F. (2009). Effect of biological soil crusts on soil elemental concentrations: implications for biogeochemistry and as traceable biosignatures of ancient life on land. *Geobiology* 7, 348–359. doi: 10.1111/j.1472-4669.2009.00204.x
- Bhatnagar, A., Makandar, M. B., Garg, M. K., and Bhatnagar, M. (2008). Community structure and diversity of cyanobacteria and green algae in the soils of Thar Desert (India). *J. Arid Environ.* 72, 73–83. doi: 10.1016/j.jaridenv.2007.05.007
- Bock, C., Krienitz, L., and Pröschold, T. (2011). Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea* 2, 293–312. doi: 10.5507/fot.2011.028
- Borchhardt, N., Schiefelbein, U., Abarca, N., Boy, J., Mikhailyuk, T., Sipman, H. J. M., et al. (2017). Diversity of algae and lichens in biological soil crusts of Ardley and King George islands, Antarctica. *Antarct. Sci.* 9, 1–9. doi: 10.1017/S0954102016000638
- Breen, K., and Lévesque, E. (2008). The influence of biological soil crusts on soil characteristics along a high Arctic Glacier Foreland, Nunavut, Canada. *Arctic Antarct. Alp. Res.* 40, 287–297. doi: 10.1657/1523-0430(06-098)[BREEN]2.0.CO;2
- Broady, P. A. (1996). Diversity, distribution and dispersal of Antarctic terrestrial algae. *Biodivers. Conserv.* 5, 1307–1335. doi: 10.1007/BF00051981
- Broady, P. A., and Weinstein, R. N. (1998). Algae, lichens and fungi in La Gorce Mountains, Antarctica. *Antarct. Sci.* 10, 376–385. doi: 10.1017/S0954102098000467
- Büdel, B., Darienko, T., Deutschewitz, K., Dojani, S., Friedl, T., Mohr, K. I., et al. (2009). Southern African biological soil crusts are ubiquitous and highly diverse in drylands, being restricted by rainfall frequency. *Microb. Ecol.* 57, 229–247. doi: 10.1007/s00248-008-9449-9
- Büdel, B., Dulić, T., Darienko, T., Rybalka, N., and Friedl, T. (2016). “Cyanobacteria and algae of biological soil crusts,” in *Biological Soil Crusts: An Organizing Principle in Drylands*, eds B. Weber, B. Büdel, and J. Belnap (Berlin: Springer International Publishing), 55–80.
- Chen, M., and Ma, L. Q. (2001). Comparison of three aqua regia digestion methods for twenty Florida soils. *Soil Sci. Am. J.* 65, 491–499. doi: 10.2136/sssaj2001.652491x
- Clarke, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 18, 117–143. doi: 10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x
- Clarke, K. R., and Green, R. H. (1988). Statistical design and analysis for a ‘Biological Effect’ study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46, 213–226. doi: 10.3354/meps046213
- Colesie, C., Gommeaux, M., Green, T. G. A., and Buedel, B. (2014). Biological soil crusts in continental Antarctica: Garwood Valley, southern Victoria Land, and Diamond Hill, Darwin Mountains region. *Antarct. Sci.* 26, 115–123. doi: 10.1017/S0954102013000291
- Coulson, S., Hodkinson, I. D., Strathdee, A., Bale, J. S., Block, W., Worland, M. R., et al. (1993). Simulated climate change: the interaction between vegetation type and microhabitat temperatures at NyÅlesund, Svalbard. *Polar Biol.* 13, 67–70.
- Darienko, T., Gustavs, L., and Pröschold, T. (2016). Species concept and nomenclatural changes within the genera *Elliptochloris* and *Pseudochlorella* (Trebouxiophyceae) based on an integrative approach. *J. Phycol.* 52, 1125–1145. doi: 10.1111/jpy.12481
- Darienko, T., Gustavs, L., Eggert, A., Wolf, W., and Pröschold, T. (2015). Evaluating the species boundaries of green microalgae (*Coccomyxa*, *Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. *PLoS ONE* 10:e0127838. doi: 10.1371/journal.pone.0127838
- Darienko, T., Gustavs, L., Mudimu, O., Menendez, C. R., Schumann, R., Karsten, U., et al. (2010). *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, *Chlorophyta*). *Eur. J. Phycol.* 45, 79–95. doi: 10.1080/0967026090362820
- Eldridge, D., and Greene, R. (1994). Microbiotic soil crusts - a review of their roles in soil and ecological processes in the rangelands of Australia. *Aust. J. Soil Res.* 32:389. doi: 10.1071/SR9940389

- Elster, J., Lukesová, A., Svoboda, J., Kopecky, J., and Kanda, H. (1999). Diversity and abundance of soil algae in the polar desert, Sverdrup Pass, central Ellesmere Island. *Polar Rec.* 35, 231. doi: 10.1017/S0032247400015515
- Ettl, H., and Gärtner, G. (2014). *Syllabus der BODEN-, Luft- und Flechtenalgen*. Berlin; Heidelberg: Springer.
- Evans, R. D., and Belnap, J. (1999). Long-term consequences of disturbance on nitrogen dynamics in an arid ecosystem. *Ecology* 80, 150–160. doi: 10.1890/0012-9658(1999)080[0150:LTCODO]2.0.CO;2
- Evans, R. D., and Lange, O. L. (2001). Biological soil crusts and ecosystem nitrogen and carbon dynamics. *Ecol. Stud.* 150, 263–279. doi: 10.1007/978-3-642-56475-8_20
- Frenot, Y., Chown, S. L., Whinam, J., Selkirk, P. M., Convey, P., Skotnicki, M., et al. (2005). Biological invasions in the Antarctic: extent, impacts and implications. *Biol. Rev.* 80, 45–72. doi: 10.1017/S1464793104006542
- Fucikova, K., and Lewis, L. A. (2012). Intersection of *Chlorella*, *Muriella* and *Bracteacoccus*: resurrecting the genus *Chromochloris* Kol et Chodat (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Fottea* 12, 83–93. doi: 10.5507/fof.2012.007
- Fucikova, K., Flechtner, V. R., and Lewis, L. A. (2012). Revision of the genus *Bracteacoccus* Tereg (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on a phylogenetic approach. *Nov. Hedwigia* 96, 15–59. doi: 10.1127/0029-5035/2012/0067
- Ghiloufi, W., Büdel, B., and Chaieb, M. (2016). Effects of biological soil crusts on a Mediterranean perennial grass (*Stipatanacissima*, L.). *Plant Biosyst.* 151, 158–167. doi: 10.1080/11263504.2015.1118165
- Green, T. G. A., and Broady, P. A. (2001). Biological soil crusts of Antarctica. *Ecol. Stud.* 150, 133–139. doi: 10.1007/978-3-642-56475-8_11
- Guiry, M. D., and Guiry, G. M. (2016). *Algaebase*. Galway: World-wide electronic publication, National University of Ireland. Available online at: <http://www.algaebase.org>
- Harper, K. T., and Belnap, J. (2001). The influence of biological soil crusts on mineral uptake by associated vascular plants. *J. Arid Environ.* 47, 347–357. doi: 10.1006/jare.2000.0713
- Hoffmann, L. (1989). Algae of terrestrial habitats. *Bot. Rev.* 55, 77–105. doi: 10.1007/BF02858529
- Huss, V. A. R., Frank, C., Hartmann, E. C., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B. M., et al. (1999). Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *J. Phycol.* 35, 587–598. doi: 10.1046/j.1529-8817.1999.3530587.x
- Jaccard, P. (1902). Lois de distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 38, 69–130.
- Karsten, U., Herburger, K., and Holzinger, A. (2014). Dehydration, temperature, and light tolerance in members of the aeroterrestrial green algal genus *Interfilum* (Streptophyta) from biogeographically different temperate soils. *J. Phycol.* 50, 804–816. doi: 10.1111/jpy.12210
- Karsten, U., Herburger, K., and Holzinger, A. (2015). Living in biological soil crust communities of African deserts – physiological traits of green algal *Klebsormidium* species (Streptophyta) to cope with desiccation, light and temperature gradients. *J. Plant Physiol.* 194, 2–12. doi: 10.1016/j.jplph.2015.09.002
- Kaštovská, K., Elster, J., Stibal, M., and Santrucková, H. (2005). Microbial assemblages in soil microbial succession after glacial retreat in Svalbard (high arctic). *Microb. Ecol.* 50, 396–407. doi: 10.1007/s00248-005-0246-4
- Kaštovská, K., Stibal, M., Šabacká, M., Černá, B., Šantrčková, H., and Elster, J. (2007). Microbial community structure and ecology of subglacial sediments in two polythermal Svalbard glaciers characterized by epifluorescence microscopy and PLFA. *Polar Biol.* 30, 277–287. doi: 10.1007/s00300-006-0181-y
- Kaufnerová, V., and Eliáš, M. (2013). The demise of the genus *Scotiellopsis* Vinatzer (Chlorophyta). *Nov. Hedwigia* 97, 415–428. doi: 10.1127/0029-5035/2013/0116
- Kent, M., and Coker, P. (1992). *Vegetation Description and Analysis: A Practical Approach*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Kessler, E., Schäfer, M., Hümmer, C., Kloboucek, A., and Huss, V. A. R. (1997). Physiological, biochemical, and molecular characters for the taxonomy of the subgenus of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta). *Bot. Acta* 110, 244–250. doi: 10.1111/j.1438-8677.1997.tb00636.x
- Kim, G. H., Klochkova, T. A., and Kang, S. H. (2008). Notes on freshwater and terrestrial algae from Ny-Ålesund, Svalbard (high Arctic sea area). *J. Environ. Biol.* 29, 485–491.
- Köppen, W., and Geiger, G. (1930–1939). *Handbuch der Klimatologie*. Berlin: Gebrüder Borntraeger.
- Kostikov, I., Darienko, T., Lukešová, A., and Hoffmann, L. (2002). Revision of the classification system of Radiococcales Fott ex Komárek (except the subfamily Dictyochloroideae) (Chlorophyta). *Algol. Stud.* 104, 23–58.
- Krienitz, L., Hegewald, E. H., Hepperle, D., Huss, V. A. R., Rohr, T., and Wolf, M. (2004). Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia* 43, 529–542. doi: 10.2216/i0031-8884-43-5-529.1
- Kruskal, J. B., and Wish, M. (1978). Multidimensional scaling. *Soc. Sci.* 11, 19–34. doi: 10.4135/9781412985130
- Langhans, T. M., Storm, C., and Schwabe, A. (2009). Community assembly of biological soil crusts of different successional stages in a temperate sand ecosystem, as assessed by direct determination and enrichment techniques. *Microb. Ecol.* 58, 394–407. doi: 10.1007/s00248-009-9532-x
- Mann, D. H., Sletten, R. S., and Ugolini, F. C. (1986). Soil development at Kongsfjorden, Spitsbergen. *Polar Res.* 4, 1–16. doi: 10.3402/polar.v4.i1.6914
- Mikhailiuk, T. I., Sluiman, H. J., Massalski, A., Mudimu, O., Demchenko, E. M., Kondratyuk, S. Y., et al. (2008). New streptophyte green algae from terrestrial habitats and an assessment of the genus *Interfilum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *J. Phycol.* 44, 1586–1603. doi: 10.1111/j.1529-8817.2008.00606.x
- Mikhailiuk, T., Glaser, K., Holzinger, A., and Karsten, U. (2015). Biodiversity of *Klebsormidium* (Streptophyta) from alpine biological soil crusts (Alps, Tyrol, Austria, and Italy). *J. Phycol.* 51, 750–767. doi: 10.1111/jpy.12316
- Mikhailiuk, T., Holzinger, A., Massalski, A., and Karsten, U. (2014). Morphology and ultrastructure of *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Streptophyta) with special reference to cell division and thallus formation. *Eur. J. Phycol.* 49, 395–412. doi: 10.1080/09670262.2014.949308
- Molinari-Novoa, E. A. (2016). *Uvulifera*, a new generic name for *Coccobotrys* (*Chaetophoraceae*). *Notulae Algarum* 5, 1–3.
- Mostaert, A. S., Giordani, C., Crockett, R., Karsten, U., Schumann, R., and Jarvis, S. P. (2009). Characterisation of amyloid nanostructures in the natural adhesive of unicellular subaerial algae. *J. Adhes.* 85, 465–483. doi: 10.1080/00218460902996366
- Nakada, T., Nozaki, H., and Pröschold, T. (2008). Molecular phylogeny, ultrastructure, and taxonomic revision of *Chlorogonium* (Chlorophyta): emendation of *Chlorogonium* and description of *Gungnir* gen. nov. and *Rusalka* gen. nov. *J. Phycol.* 44, 751–760. doi: 10.1111/j.1529-8817.2008.00525.x
- Neustupa, J., Němcová, Y., Eliáš, M., and Škaloud, P. (2009). *Kalinella bambusicola* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid *Chlorella*-like subaerial alga from Southeast Asia. *Phycol. Res.* 57, 159–169. doi: 10.1111/j.1440-1835.2009.00534.x
- Ohtani, S., Akiyama, M., and Kanda, H. (1991). Analysis of Antarctic soil algae by the direct observation using the contact slide method. *Antarct. Rec.* 35, 285–295.
- Pfaff, S., Borchhardt, N., Boy, J., Karsten, U., and Gustavs, L. (2016). Desiccation tolerance and growth-temperature requirements of *Coccomyxa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) strains from Antarctic biological soil crusts. *Algol. Stud.* 151–152, 3–19. doi: 10.1127/algol_stud/2016/0245
- Pröschold, T. (2001). Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. emendation of *Chlamydomonas ehrenberg* and *Chlamydomonas gobi*, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *lobochlamys* gen. nov. *Protist* 152, 265–300. doi: 10.1078/1434-4610-00068
- Pushkareva, E., Johansen, J. R., and Elster, J. (2016). A review of the ecology, ecophysiology and biodiversity of microalgae in Arctic soil crusts. *Polar Biol.* 39, 2227–2240. doi: 10.1007/s00300-016-1902-5
- Rindi, F., Mikhailiuk, T. I., Sluiman, H. J., Friedl, T., and López-Bautista, J. M. (2011). Phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Mol. Phylogenet. Evol.* 58, 218–231. doi: 10.1016/j.ympev.2010.11.030
- Ryšánek, D., Hrkčková, K., and Škaloud, P. (2015). Global ubiquity and local endemism of free-living terrestrial protists: phylogeographic assessment of the streptophyte alga *Klebsormidium*. *Environ. Microbiol.* 17, 689–698. doi: 10.1111/1462-2920.12501

- Schulz, K., Mikhailyuk, T., Dreßler, M., Leinweber, P., and Karsten, U. (2016). Biological soil crusts from coastal dunes at the Baltic Sea: cyanobacterial and algal biodiversity and related soil properties. *Microb. Ecol.* 71, 178–193. doi: 10.1007/s00248-015-0691-7
- Sørensen, T. (1948). A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. *Biol. Skr. K. Danske Vidensk. Selsk.* 5, 1–34.
- Starr, R. C., and Zeikus, J. A. (1993). UTEX – the culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures. *J. Phycol.* 29, 1–106. doi: 10.1111/j.0022-3646.1993.00001.x
- Tedrow, J. C. (1977). *Soils of the Polar Landscapes*. New Brunswick: Rutgers University Press.
- Tschaikner, A., Gärtner, G., and Kofler, W. (2008). *Coelastrella aeroterrestica* sp. nov. (Chlorophyta, Scenedesmoideae) – a new, obviously often overlooked aeroterrestrial species. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algal. Stud.* 128, 11–20. doi: 10.1127/1864-1318/2008/0128-0011
- Van Den Ancker, J. A. M., and Jungerius, P. D. (1985). Short Communications: The role of algae in the stabilization of coastal dune blowouts. *Earth Surf. Process. Landforms* 10, 189–192. doi: 10.1002/esp.3290100210
- Weber, B., Büdel, B., and Belnap, J. (2016). *Biological Soil Crusts: An Organizing Principle in Drylands*. Cham: Springer International Publishing.
- Whittaker, R. H. (1960). Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecol. Mono.* 30, 279–338. doi: 10.2307/1943563
- Whittaker, R. H. (1972). Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21, 213–251. doi: 10.2307/1218190
- Williams, L., Borchhardt, N., Colesie, C., Baum, C., Komsic-Buchmann, K., Rippin, M., et al. (2016). Biological soil crusts of Arctic Svalbard and of Livingston Island, Antarctica. *Polar Biol.* 40, 399–411. doi: 10.1007/s00300-016-1967-1
- Wu, Y., Rao, B., Wu, P., Liu, Y., Li, G., and Li, D. (2013). Development of artificially induced biological soil crusts in fields and their effects on top soil. *Plant Soil.* 370, 115–124. doi: 10.1007/s11104-013-1611-6
- Zhang, B., Zhang, Y., Zhao, J., Wu, N., Chen, R., and Zhang, J. (2009). Microalgal species variation at different successional stages in biological soil crusts of the Gurbantunggut Desert, Northwestern China. *Biol. Fertil. Soils* 45, 539–547. doi: 10.1007/s00374-009-0364-0
- Zidarova, R. (2008). Algae from Livingston Island (S Shetland Islands): a checklist. *Phytolog. Balc.* 14, 19–35.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Borchhardt, Baum, Mikhailyuk and Karsten. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**1.6.2. Водорості біологічних ґрунтових кірочок островів Ардлі
та Короля Георга (Антарктида)**

Diversity of algae and lichens in biological soil crusts of Ardley and King George islands, Antarctica

NADINE BORCHHARDT¹, ULF SCHIEFELBEIN², NELIDA ABARCA³, JENS BOY⁴,
TATIANA MIKHAILYUK^{1,5}, HARRIE J.M. SIPMAN³ and ULF KARSTEN¹

¹University of Rostock, Institute of Biological Sciences, Applied Ecology & Phycology, Albert-Einstein-Straße 3,
D-18059 Rostock, Germany

²Blücherstraße 71, D-18055 Rostock, Germany

³Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, Freie Universität Berlin, Königin-Luise-Straße 6-8, D-14195 Berlin, Germany

⁴Leibniz Universität Hannover, Institute of Soil Sciences, Herrenhäuser Straße 2, D-30419 Hannover, Germany

⁵M.H. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereshchenkivska St. 2, Kyiv UA-01001, Ukraine
nadine.borchhardt@uni-rostock.de

Abstract: In the present study the biodiversity of the most abundant phototrophic organisms forming biological soil crust communities were determined, which included green algae, diatoms, yellow-green algae and lichens in samples collected on Ardley and King George islands, Maritime Antarctic. The species were identified by their morphology using light microscopy, and for lichen identification thin layer chromatography as also used to separate specific secondary metabolites. Several sources of information were summarized in an algae catalogue. The results revealed a high species-richness in Antarctic soil crust communities with 127 species in total. Of which, 106 taxa belonged to algae (41 Chlorophyta, nine Streptophyta, 56 Heterokontophyta) and 21 to lichens in 13 genera. Moreover, soil crust communities with different species compositions were determined for the various sampling locations, which might reflect microclimatic and pedological gradients.

Received 10 August 2016, accepted 9 November 2016

Key words: cryptogams, diatoms, green algae, South Shetland Islands, species composition, yellow-green algae

Introduction

Biological soil crusts (BSCs) represent an association of diverse organisms and soil particles that vary in size as well as composition. They are formed by cyanobacteria, algae, lichens, bacteria, microfungi and bryophytes in different proportions. These organisms live within the upper few centimetres of the soil and also form a thin layer on the soil surface, where the mucilaginous sheaths and excreted extracellular polymeric substances (EPS) produced by filamentous cyanobacteria and algae stick the soil particles together (Büdel & Colesie 2014, Weber *et al.* 2016). However, coccoid microorganisms are also important in the development of BSCs and are mainly represented by high species numbers of green algae (Belnap *et al.* 2001). Members of the green algal genus *Coccomyxa* Schmidle are frequently observed in BSCs of Antarctica (Pfaff *et al.* 2016) and diatoms and Xanthophyceae are also present in BSCs (Flechtner *et al.* 2008).

Biological soil crusts represent pioneer communities that have important ecological functions in soil stabilization to reduce wind and water erosion (Belnap & Gillette 1998), in hydrological processes for water retention (Belnap 2006), in primary production and nitrogen fixation (Evans & Lange 2001), in biogeochemistry, in geomorphology (Evans & Belnap 1999), and in nutrient cycles (Wu *et al.* 2013,

reviewed in Büdel & Colesie 2014). These cryptogamic communities also have a positive influence on the establishment and growth of vascular plants (Harper & Belnap 2001).

These communities are heterogeneous and vary in their species compositions. Different types exist, which can be macroscopically distinguished by colour and morphology as well as microscopically by both the taxa occurring and species numbers (Weber *et al.* 2016, Williams *et al.* 2016). The establishment and development of BSCs is based on the substrate and controlled by climatic factors (Elster *et al.* 1999). These cryptogamic communities are distributed worldwide in all climate zones and occur mostly in nutrient-poor and extreme habitats, such as hot and cold semiarid or arid areas (Büdel & Colesie 2014). They are found both in Arctic Svalbard (Williams *et al.* 2016) and Continental Antarctica (Colesie *et al.* 2014). However, BSCs have been generally poorly studied in the Polar Regions, particularly in Antarctica, until now (Green & Broady 2001).

Studies on Antarctic terrestrial vegetation have been, thus far, mainly focused on bryophytes and lichens (Peat *et al.* 2007), although the ice-free soil also contains different taxa of algae (Broady 1996). The soil algae of Antarctic edaphic communities were reviewed in Broady (1996), but those associated with BSCs in Maritime

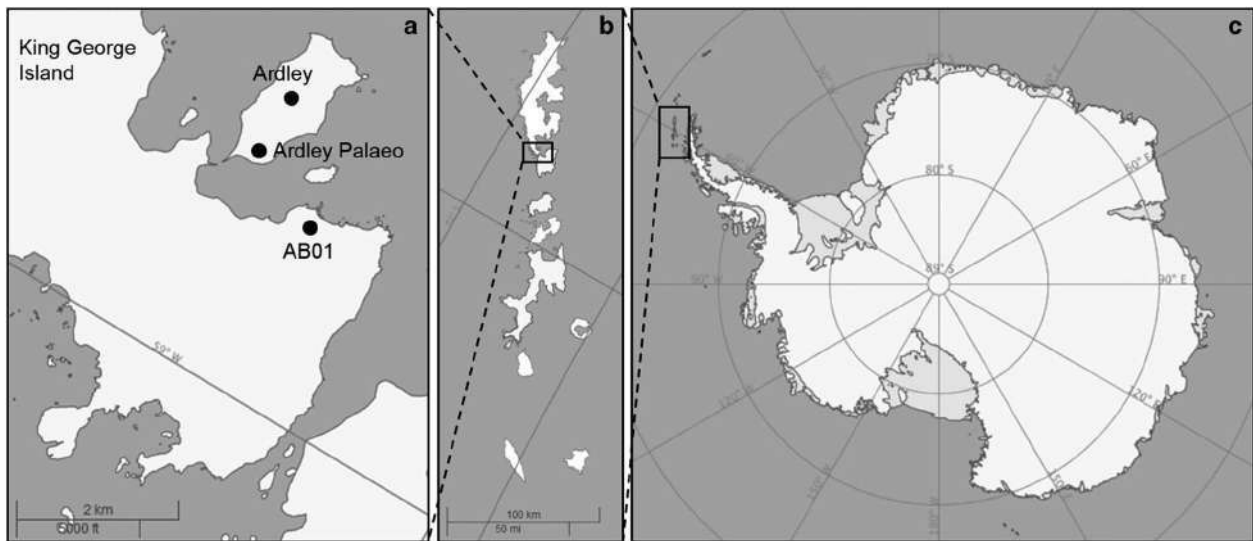


Fig. 1. Maps of the biological soil crust sample sites. **a.** The three sample sites on Ardley Island and King George Island, **b.** the South Shetland Islands, **c.** Antarctica.

Antarctic are almost unstudied (Green & Broady 2001). Colesie *et al.* (2014) recently investigated BSCs in the Darwin Mountains region, Continental Antarctica, and found low BSC coverage of the soil surface (0.8–3.3%) with species-poor crusts composed of few green algal lichens, cyanobacteria and several species of green algae. However, there remains a lack of knowledge on the algal component of BSCs in Antarctica.

Here, we present the results of a study that investigated the biodiversity of algae and lichens of BSCs collected on King George Island and Ardley Island, Maritime Antarctic, revealing the composition and proportion of green algae, diatoms, xanthophytes and lichens found in these BSCs.

Materials and methods

Study sites

Ardley Island and King George Island belong to the South Shetland archipelago in the Southern Ocean (Fig. 1). The South Shetland archipelago (61°–63°S, 54°–63°W) is separated from the Antarctic Peninsula by the Bransfield Strait and from South America by the Drake Passage. This area has the mildest climate of the Antarctic region because it constitutes the most northerly part of the continent and it is strongly influenced by the Antarctic Circumpolar Current. The meteorological data from the Russian Bellingshausen Station at Collins Harbour, King George Island, indicate an annual mean air temperature of -2.5°C and mean precipitation of 701.3 mm yr^{-1} (measurement period: 1948–2011, Kejna *et al.* 2013).

In February 2014, BSCs were collected at three different sampling sites. Two were located on Ardley

Island ('Ardley' $62^{\circ}12'45.91''\text{S}$, $58^{\circ}55'53.31''\text{W}$ to $62^{\circ}12'49.02''\text{S}$, $58^{\circ}56'13.32''\text{W}$ and 'Ardley Palaeo' $62^{\circ}12'46.55''\text{S}$, $58^{\circ}56'48.98''\text{W}$) and one on the Fildes Peninsula, King George Island ('AB01' $62^{\circ}13'18.93''\text{S}$, $58^{\circ}57'17.37''\text{W}$), which has the largest ice-free areas in the Maritime Antarctic (Fig. 1). These three sampling stations roughly follow an age gradient. 'Ardley' forms part of the slopes at Ardley Island itself, believed to have never been glaciated throughout the Holocene (Mäusbacher 1991). 'AB01' is well dated due to its direct vicinity to the Yanou and Gaoshan lakes (6000–7000 yr BP, Watcham *et al.* 2011). 'Ardley Palaeo' lies on a raised storm beach built up by isostatic uplift and is dated to 4400–2300 yr BP (Boy *et al.* 2016). 'Ardley' is a BSC that grows along a tributary to Ardley Lake, which meanders on the partially frozen soils, leading to temporary bogs and by this to saturated water conditions. In contrast, 'Ardley Palaeo' BSC developed on a raised storm beach, which typically has larger pebbles as precursors of soil development, exhibits a well-drained soil with low water retention capacity and hence is relatively dry. In both cases, BSCs were found as 'cushions' with little connection to the soil itself. On 'AB01' the substratum is glacier till, and soil development is clearly visible as are connections of biota to the soil, especially by bryophytes. This site, due to an almost top-slope position, has to rely on precipitation, but water retention potential is far better than in the storm beach site. The logged temperature regime in 5 cm soil depth at 'Ardley Palaeo' and 'AB01' (February 2012 to February 2014) revealed comparable conditions between the two sites, while 'AB01' was slightly more extreme (T_{min} : -15°C , T_{max} : 8°C , yearly average: -2.35°C) than 'Ardley Palaeo'

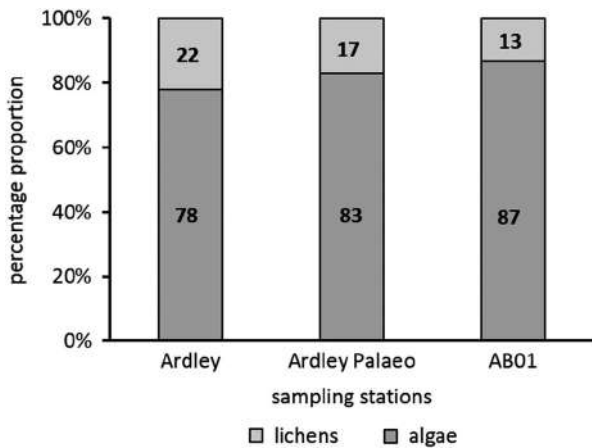


Fig. 2. Percentage proportion of microalgae and lichens in the three biological soil crust samples from the Maritime Antarctic.

(T_{\min} : -13°C , T_{\max} : 6.5°C , yearly average: -2.25°C) and had a roughly two weeks shorter period of temperatures $> 0^{\circ}\text{C}$ in the soil between the end of November and late March (early April for ‘Ardley’).

Strain isolation and culture conditions

The collected BSCs were used for a comprehensive screening of all occurring eukaryotic algae and lichens. Subsamples of the BSCs were incubated in defined media to establish enrichment cultures. All cultures and later algal isolates were grown on solid 1.5% Difco Agar (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) made with Bold’s Basal Media and vitamins (Starr & Zeikus 1993) modified by tripled nitrate concentration (3N-BBM+V). They were kept at 15°C , $30 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ under a 16:8 h light:dark cycle (Osram Daylight Lumilux Cool White lamps L36W/840). The enrichment cultures were regularly screened for algal growth and colonies

Table I. Diversity indices. Jaccard index and Sørensen index are defined from 0 to 1 (0 = no similarity, 1 = highest similarity).

	‘Ardley’-‘Ardley Palaeo’	‘Ardley’-‘AB01’	‘Ardley Palaeo’-‘AB01’
Algae			
β -diversity	67	62	61
Jaccard index	0.134	0.155	0.136
Sørensen index	0.236	0.269	0.239
Lichens			
β -diversity	14	12	12
Jaccard index	0.171	0.185	0.111
Sørensen index	0.294	0.313	0.200
Total			
β -diversity	81	74	73
Jaccard index	0.142	0.161	0.132
Sørensen index	0.248	0.277	0.234

transferred with a metal needle to a new agar plate using a stereo microscope (ZS40, Olympus, Tokyo, Japan) with a magnification of 400x. For further purification the growth of the colonies was frequently monitored and several subcultures were generated under sterile conditions. After the purification step no contamination with other algae or fungi was detected. Sixty-six strains were isolated and are held in the culture collection at the University of Rostock. Using a light microscope (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) with a magnification of 1000x the isolated strains were identified to the species or at least the genus level. Identification was mainly based on the identification key of Ettl & Gärtner (2014). Other identification literature is presented in Table S1 found at <http://dx.doi.org/10.1017/S0954102016000638>. Mucilage, as one identification feature, was visualized with an aqueous solution of methylene blue. Furthermore, light micrographs were taken with an Olympus UC30 camera attached to the microscope and processed with the software cellSens Entry (Olympus, Tokyo, Japan). Additionally, hand drawings were made of the morphological features for some algal species (Table S1).

Identification of diatoms

In addition to the light microscopy, combusted permanent slides were prepared and used for the identification of diatoms. Based on their siliceous cell walls, identification is also possible after the cell death, as species-specific features, such as cell shape, pores,

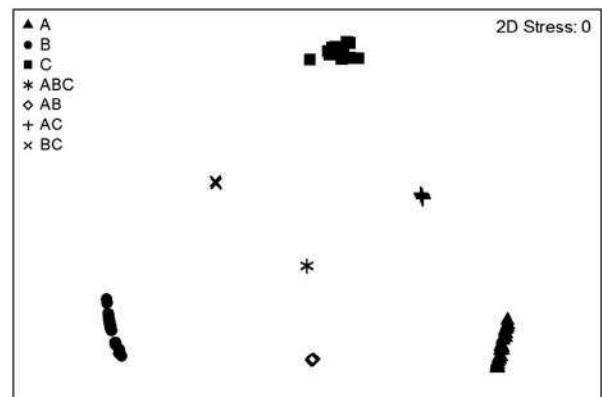


Fig. 3. MDS plot based on square root transformed data and Bray-Curtis similarity. Comparison of all three sample sites by species composition (microalgae and lichens). An MDS plot is dimensionless and visualizes the relationship of each datapoint to another. Distances between points represent the similarity/difference between all identified taxa. The stress value represents the quality of the graph (0 = perfect, 0.05 = good, 0.2 = poor). A: ‘Ardley’, B: ‘Ardley Palaeo’, C: ‘AB01’, ABC: all species from all sample sites, AB: species from ‘Ardley’ and ‘Ardley Palaeo’, AC: species from ‘Ardley’ and ‘AB01’, BC: species from ‘Ardley Palaeo’ and ‘AB01’.

Table II. List of all identified algae species associated with biological soil crust samples from the Maritime Antarctic. x = presence of the respective algae species. Species authorities can be found in Table S1.

Species	'Ardley'	'Ardley Palaeo'	'AB01'
Chlorophyceae			
<i>Chlamydomonas</i> sp.	x		
<i>Chlorococcum</i> sp.		x	
<i>Chloromonas</i> sp.		x	
<i>Chlorosarcina</i> sp.	x	x	x
<i>Chlorococcum lobatum</i>		x	
<i>Chlorococcum</i> cf. <i>infusionum</i>		x	
<i>Chlorococcum</i> sp.	x	x	x
<i>Desmodesmus abundans</i> (<i>Chlorella fusca</i>)		x	
<i>Gloeoecystis</i> sp.		x	
<i>Lobochlamys</i> cf. <i>culleus</i> (<i>Chlamydomonas culleus</i>)		x	
<i>Mychonastes homosphaera</i> (<i>Chlorella homosphaera</i> , <i>C. minutissima</i>)	x	x	
<i>Mychonastes</i> cf. <i>homosphaera</i> (<i>C. homosphaera</i> , <i>C. minutissima</i>)		x	
<i>Neocytis</i> cf. <i>brevis</i> (<i>Nephrodiella</i> cf. <i>brevis</i>)	x	x	x
<i>Neocystis</i> sp.1		x	
<i>Neocytis</i> sp.2	x	x	x
<i>Neocystis</i> sp.3		x	
<i>Poloidion</i> sp.	x	x	
<i>Pseudodictyochloris</i> <i>multinucleata</i>	x	x	
<i>Radiococcaceae</i> gen. sp.			x
<i>Radiococcus</i> cf. <i>signiensis</i>	x		
<i>Radiococcus</i> sp.		x	
Trebouxiophyceae			
<i>Chlorella chlorelloides</i> (<i>Dictyosphaerium</i> <i>chlorelloides</i>)			x
<i>Chlorella vulgaris</i>			x
<i>Chlorella</i> sp.			x
<i>Coccomyxa simplex</i>	x		
<i>Coccomyxa</i> sp.	x	x	x
<i>Desmococcus olivaceus</i>			x
<i>Desmococcus</i> sp.			x
<i>Diplosphaera chodatii</i>			x
<i>Diplosphaera</i> cf. <i>mucosa</i>			x
<i>Elliptochloris bilobata</i>	x		x
<i>Muriella</i> sp.	x		
<i>Myrmecia bisecta</i>			x
<i>Myrmecia macronucleata</i>	x		x
<i>Parietochloris</i> cf. <i>alveolaris</i> (<i>Ettlia</i> cf. <i>alveolaris</i>)		x	
<i>Stichococcus allas</i>		x	
<i>Stichococcus</i> cf. <i>allas</i>			x
<i>Stichococcus bacillaris</i>		x	
<i>Stichococcus chlorelloides</i>	x		x
<i>Stichococcus</i> sp.			x
<i>Trochiscia granulata</i>	x		
Klebsormidiophyceae			
<i>Interfilum</i> sp.			x
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>bilatium</i>	x		
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>dissectum</i>		x	x
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>flaccidum</i>	x	x	x
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>subtile</i>			x
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>montanum</i>	x		x
<i>Klebsormidium</i> cf. <i>nitens</i>	x		
<i>Klebsormidium</i> sp.1			x
<i>Klebsormidium</i> sp.2			x
Xanthophyceae			
<i>Chlorellidium</i> sp.			x
<i>Chlorocloster</i> cf. <i>inaequalis</i>			x
<i>Chlorellidium</i> cf. <i>tetrabotrys</i>			x
<i>Heterococcus</i> sp.			x
<i>Pleurochloris</i>			x
<i>pseudopolychloris</i>			x
<i>Xanthonema</i> sp.			x
Eustigmatophyceae			
<i>Eustigmatos</i> cf. <i>vischeri</i>			x
Bacillariophyceae			
<i>Aulacoseira</i> sp.			x
<i>Cocconeis californica</i> var. <i>kerguelensis</i>			x
<i>Cocconeis fasciolata</i>			x
<i>Cocconeis melchioroides</i>			x
<i>Cocconeis pinnata</i> var. <i>mattsii</i>	x		x
<i>Diadesmis</i> cf. <i>vidalii</i>	x		x
<i>Eunotia ralitsae</i>			x
<i>Eunotia</i> sp.1			x
<i>Eunotia</i> sp.2			x
<i>Gomphonema olivaceum</i>	x		
<i>Gomphonema</i> sp.	x		
<i>Gomphonemopsis</i> sp.	x		
<i>Hantzschia</i> sp.			x
<i>Luticola caubergsii</i>	x		
<i>Luticola nivalis</i>			x
<i>Luticola</i> cf. <i>nivalis</i>			x
<i>Melosira dickiei</i>			x
<i>Navicula</i> cf. <i>perminuta</i>			x
<i>Navicula</i> sp.	x		
<i>Nitzschia</i> sp.			x
<i>Orthoseira roeseana</i>			x
<i>Pinnularia</i> cf. <i>acidophila</i>	x	x	x
<i>Pinnularia borealis</i>	x	x	x
<i>Pinnularia borealis</i> var. <i>scalaris</i>	x	x	x
<i>Pinnularia divergentissima</i>	x		
<i>Pinnularia</i> cf. <i>divergentissima</i>			x
<i>Pinnularia microstauron</i>	x		
<i>Pinnularia</i> cf. <i>microstauron</i>			x
<i>Pinnularia obscura</i>			x
<i>Pinnularia</i> cf. <i>obscura</i>	x		x
<i>Pinnularia</i> cf. <i>subantarctica</i> var. <i>elongata</i>	x		
<i>Pinnularia</i> sp.			x
<i>Planothidium linkei</i>	x		
<i>Psammothidium germanii</i>			x
<i>Psammothidium manguinii</i>	x		x
<i>Psammothidium</i> cf. <i>oblongellum</i>	x		x
<i>Pseudogomphonema</i> <i>kamtschaticum</i>			x
<i>Pseudogomphonema</i> cf. <i>kamtschaticum</i>	x		
<i>Stauroforma exiguiformis</i>	x		
<i>Stauroforma</i> cf. <i>exiguiformis</i>	x		
<i>Thalassiosira gracilis</i> var. <i>expecta</i>			x
<i>Thalassiosira gracilis</i>	x		
Diatom sp.1	x		
Diatom sp.2	x		
Diatom sp.3	x		
Diatom sp.4			x
Diatom sp.5			x
Diatom sp.6	x		
Diatom sp.7	x		

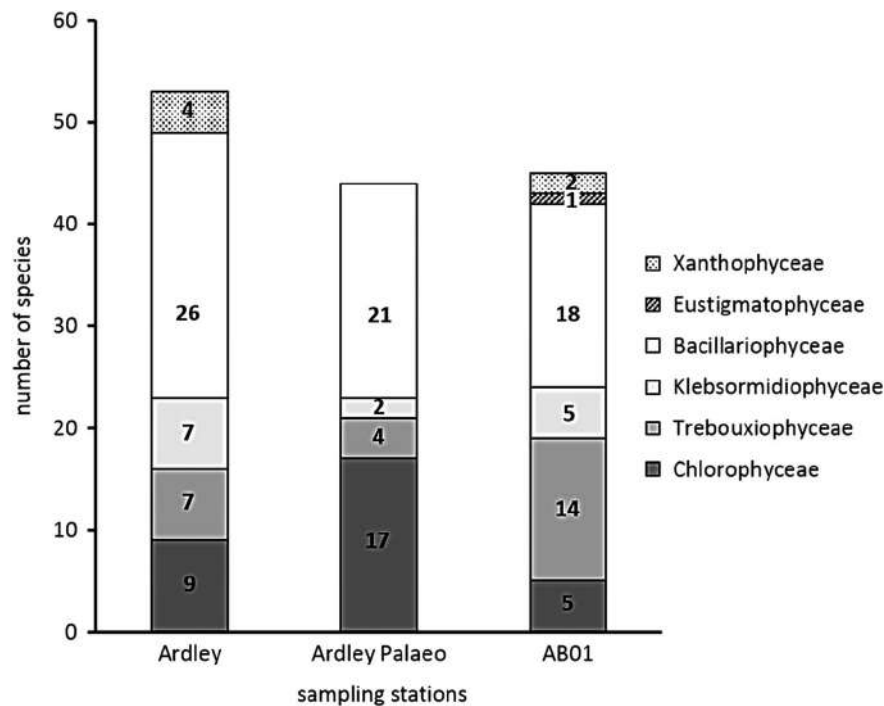


Fig. 4. Total number of green algae species (Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, Klebsormidiophyceae, Bacillariophyceae, Eustigmatophyceae and Xanthophyceae) in the three biological soil crust communities from the Maritime Antarctic samples.

ribs, spines and marginal ridges, are still visible. Approximately 0.5 g of crust material was mixed with *c.* 4 ml distilled water and strongly shaken for 10 min. Subsequently 100 μ l of the overlaying water was transferred onto glass cover slips using an Eppendorf pipette and air dried. This step was repeated a second time. Afterwards, the cover slips were combusted in a muffle oven (Elektra M26) at 550°C for 35 min, cooled down and put onto slides with Naphrax as a mounting medium. Light micrographs were taken at a magnification of 1000x using a light microscope (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) with an Olympus UC30 camera attached and the cellSens Entry program (Olympus, Tokyo, Japan). Additional light micrographs were acquired with a Zeiss Axio Imager. M2 with an implemented AxioCam HRc (Zeiss, Oberkochen, Germany). The literature used for diatom identification is detailed in Table S1.

Identification of lichens

For identification of lichens, morphology and anatomy were studied using a stereomicroscope and compound microscope. The nomenclature of Antarctic lichen species followed the identification key of Øvstedal & Lewis Smith (2001). Herbar specimens of lichen species are held in the private herbarium of U. Schiefelbein. Characteristic lichen

substances were used as chemotaxonomical markers and analysed by thin layer chromatography (TLC) in solvent system A according to the standard approach of Orange *et al.* (2001).

β -diversity

The β -diversity is a measure of change in species composition between habitats or variations of environmental conditions, such as temperature or moisture gradients. For this purpose, the number of species is considered unique to each habitat. The β -diversity is high if the number of species common to both habitats is low and vice versa. The following formula (Whittaker 1970) can be used for the calculation using the presence-absence data:

$$\beta = (S_1 - c) + (S_2 - c), \quad (1)$$

where S_1 is the total number of species recorded in the first habitat, S_2 is the total number of species recorded in the second habitat and c is the number of species common to both communities.

Jaccard index and Sørensen index

The Jaccard index (1902; SI_J) and Sørensen index (1948; SI_S) are similarity coefficients that measure the similarity

Table III. List of all identified lichen species associated with biological soil crust samples from the Maritime Antarctic. x = presence of the respective lichen species.

Species	'Ardley'	'Ardley Palaeo'	'AB01'
<i>Cladonia borealis</i> S. Stenroos	x		x
<i>Cladonia chlorophaea</i> (Flörke ex Sommerf.) Spreng.	x		
<i>Cladonia gracilis</i> (L.) Willd.	x	x	
<i>Cladonia squamosa</i> (Scop.) Hoffm.		x	
<i>Himantormia lugubris</i> (Hue) I. M. Lamb	x	x	
<i>Lecidea</i> sp.1	x		
<i>Lecidea</i> sp.2	x		
<i>Lepraria alpina</i> (B. de Lesd.) Tretiach & Baruffo	x	x	
<i>Lepraria straminea</i> Vain.	x		x
<i>Melanotopelia</i> sp. (new species)	x		
<i>Ochrolechia frigida</i> (Sw.) Lynge	x	x	x
<i>Pertusaria pseudoculata</i> Øvstedal		x	
<i>Placopsis parallina</i> (Nyl.) I.M. Lamb			x
<i>Psoroma hypnorum</i> (Vahl) Gray	x	x	x
<i>Rinodina olivaceobrunnea</i> (C.W. Dodge) G.E. Baker	x		x
<i>Sphaerophorus globosus</i> (Huds.) Vain.		x	
<i>Stereocaulon alpinum</i> Laurer	x		
<i>Stereocaulon glabrum</i> (Müll. Arg.) Vain.			x
<i>Usnea antarctica</i> Du Rietz	x		
<i>Usnea aurantiaco-atra</i> (Jacq.) Bory	x		
<i>Usnea sphacelata</i> R. Br.		x	

of sets. In order to calculate the SI_J , the size of the intersection is divided by the size of the union of the sample set. The indices scales are defined from 0 to 1, where the closer to 1, the higher the similarity. The SI_J and SI_S are calculated using the following formulae:

$$SI_J = a / (a + b + c)^{-1}, \quad (2)$$

$$SI_S = 2a / (2a + b + c)^{-1}, \quad (3)$$

where a is the number of species common to both communities, b is the total number of species recorded in the first habitat and c is the total number of species recorded in the second habitat.

Multivariate statistics

The species composition found at the different localities was compared using the multivariate analysis of the statistical program PRIMER 6. Non-metric multi-dimensional scaling (MDS; Kruskal & Wish 1978) was based on square root transformed data and Bray–Curtis similarity. An MDS plot is dimensionless and visualizes the relationship of each datapoint to another. The significance of similarity was tested by using the ANOSIM permutation test (Clarke & Green 1988, Clarke 1993). This test calculates a global measure R, which ranges between 0 and 1 and constitutes some degree of

discrimination between treatments. If $R = 0$ there are no differences between the sample stations based on their species composition. If $R = 1$ the sample stations differ from each other. The stress value represents the quality of the graph (0 = perfect, 0.05 = good, 0.2 = poor).

Results

Total species composition, diversity and localities

The BSCs of the King George and Ardley islands were exclusively composed of both various microalgal groups and lichens, although they were dominated by the species-richness of algae (78–87%) (Fig. 2).

The total community β -diversity for all BSC samples ranged from 73–81, and similarity was very low ($SI_J < 0.2$, $SI_S < 0.3$). It should be emphasized that the total biodiversity indices values for 'Ardley'–'AB01' were noticeable higher relative to the other comparisons (Table I).

The MDS analysis resulted in three clearly separated clusters that showed conspicuous grouping by sample site (Fig. 3). The BSC species composition of the three sample sites were significantly different as confirmed by the ANOSIM test with a global R of 1, $p = 0.001$ and a stress value of 0.

Species composition and diversity of algae

Overall, 106 algal species were found in the BSC communities of the Ardley and King George islands. Of these, 41 species belonged to Chlorophyta (21 species were Chlorophyceae, 20 species were Trebouxiophyceae). Nine species were identified as Streptophyta and 56 species were determined as Heterokontophyta; it should be noted that 49 of these species were diatoms (Table II, Fig. 4). Species names, light micrographs, drawings and further information are summarized in an algae catalogue (Table S1 found at <http://dx.doi.org/10.1017/S0954102016000638>).

Nine species from six genera were found in all of the BSC samples: *Chlorosarcina* sp., *Chlorococcum* sp., *Coccomyxa* sp., *Klebsormidium* cf. *flaccidum* (Kützing) Silva, Mattox & Blackwell, *Neocytis* cf. *brevis* (Vischer) Kostikov & Hoffmann, *Neocytis* sp., *Pinnularia* cf. *acidophila* Hofmann & Krammer, *Pinnularia borealis* Ehrenberg, *Pinnularia borealis* var. *scalaris* (Ehrenberg) Rabenhorst.

'Ardley' contained 53 species including 30 taxa that were only found at this sampling station. The species composition was dominated by diatoms (26 species).

There were 44 species identified in the BSC samples from 'Ardley Palaeo' of which 25 taxa were only found at this site. The most abundant species belong to diatoms (21 taxa) and Chlorophyceae (17 taxa).

There were 45 species, including 25 habitat-specific species, identified from 'AB01'. Diatoms (16 species) and Trebouxiophyceae (14 species) were the most abundant in these BSCs.

A comparison of the total species numbers for each sample site showed no distinct differences. However, 'Ardley' had the highest number of species, *c.* nine species more than both of the other sites. There were high numbers of microalgal species that were unique to each sample site. Therefore, a comparison of the common species gave very low values (5–9 species per two sampling sites). All of the BSC communities were dominated by diatoms, with very similar species numbers but differing in the proportion of green algae taxa.

The β -diversity of the algal composition for the three sample sites varied between 61 and 67 (Table I). Again the similarity between the BSCs was low ($SI_J < 0.2$, $SI_S < 0.3$; Table I). However, the similarity between 'Ardley'–'AB01' was higher than the others (Table I).

Species composition and diversity of lichens

There were 21 lichen species from 13 genera identified from all BCSs (Table III). Interestingly, only *Ochrolechia frigida* and *Psoroma hypnorum* were found at all sample sites.

The BSCs from 'Ardley' contained 15 lichen taxa; of which, seven species were only determined at this site. Nine lichen species, including four habitat-specific species, were identified from 'Ardley Palaeo'. Five species were present in 'AB01'; of which, only two species were exclusively found at this site.

The incidence of common lichen species was very low, especially in the samples from 'AB01' and 'Ardley Palaeo' (two common species).

The β -diversity ranged between 12 and 14; however, it should be noted that only two common lichen species existed in the BSC samples from 'Ardley Palaeo'–'AB01' (Table I). The similarity indexes were very low ($SI_J < 0.2$, $SI_S \leq 0.3$). Moreover, both values for 'Ardley Palaeo'–'AB01' were noticeable lower than the others (Table I).

Discussion

This study revealed a remarkably high biodiversity of microalgae and lichens in BSC communities collected on the King George and Ardley islands (127 species). Studies have reported wide ranging species numbers for algae in BSCs, ranging from only a few to *c.* 100 taxa, depending on the habitat. Büdel *et al.* (2009) identified 30 eukaryotic algal species in the Namib Desert, while Schulz *et al.* (2016) determined 106 species from coastal sand dunes at the Baltic Sea. Similar studies on algae associated with

BSCs in the Polar Regions are missing. Nevertheless, there are some data from surveys on terrestrial or soil algae at high latitudes. Soil samples from Arctic Svalbard partly covered by vascular plants and mosses contained 33 (Kaštovská *et al.* 2007) or 23 (Kim *et al.* 2008) eukaryotic algal species, pointing to a rather low diversity. Elster *et al.* (1999) identified 84 eukaryotic soil algae in the polar desert of central Ellesmere Island, Canada. In soil samples from Continental Antarctica, only ten chlorophytes and one diatom taxon were found (Broady & Weinstein 1998), and these species were not associated with a BSC community. Zidarova (2008) reported 286 algal species in samples from Livingston Island, Maritime Antarctic. However, this species-richness can be explained by sampling from all available habitats, including soil, lakes, ponds and rocks. In the soil samples alone, 78 eukaryotic algal species were identified; of which, 66 taxa were diatoms (Zidarova 2008). When compared with all the available literature, the data found during this study point to a surprisingly high species-richness of terrestrial eukaryotic algae (106 species) associated with BSCs in the Maritime Antarctic.

The proportion of diatom species in the BSCs was very high (49 species) in comparison to the number of the other algal taxa. Diatoms are not always systematically studied in BSC samples, depending on the expertise and interests of the investigators, and hence making comparisons with published data can be difficult. In Continental Antarctica only one (Broady & Weinstein 1998) to two diatom species were found (Souffreau *et al.* 2013), while ten species occurred in the soil of the Arctic desert of central Ellesmere Island (Elster *et al.* 1999). Flechtner *et al.* (2008) demonstrated notably few diatom species ($n = 8$) in a study of BSCs in western North America, while Schulz *et al.* (2016) prepared specific diatom slides for their identification, a quality approach which seems to be neglected in many investigations of BSCs, and reported 55 diatom species in BSCs from sand dunes along the Baltic Sea coast. These data confirm those of the present study. Whether all the recorded diatom species associated with the Antarctic BSCs represent actual components of BSC communities is unknown. Diatoms and other microalgae are known to be transported through the air over hundreds of kilometres in the Arctic region (Darby *et al.* 1974). This is especially apparent near beaches, where marine and brackish water diatoms can be wind-blown during stormy conditions (Lee & Eggleston 1989). Therefore, it cannot be excluded that some of the identified diatom taxa were transported by wind (sea-spray) or waves and therefore only temporary visitors in the Antarctic BSCs. However, in the current study, material from the whole BSC was used and thus lower parts of BSC were included.

The lichen diversity (21 species) of the King George and Ardley islands represent a subset of the 110 species

reported by Sancho *et al.* (1999) in their survey of all habitats on Livingston Island. Floristic studies from Victoria Land also revealed a high lichen diversity of 29 (Seppelt *et al.* 2010), 54 (Cannone & Seppelt 2008) and even 59 species (Green *et al.* 2015). There are indications that the species-richness of lichens varies based on latitudes, and hence it was suggested to subdivide Maritime and Continental Antarctica into different phytogeographical regions (Peat *et al.* 2007).

In summary, the data presented show a high species diversity of microalgae and lichens associated with BSCs, which differed between the sample sites. The sites could therefore be distinguished by a specific species composition. Interestingly, 'Ardley' revealed a higher similarity to 'AB01' (King George Island) for algae diversity. However, the similarity of 'Ardley Palaeo' to 'AB01' was lower for lichen diversity. This striking difference can be explained by (micro)habitat-specific conditions. It is known that algae and lichens found in soil prefer different substrates and that the availability of water is an important environmental factor for their occurrence. The habitats investigated in this study differed by substrate, topography and moisture. Consequently, the data presented indicate that the species composition of BSC communities in Maritime Antarctic is controlled by micro-environmental conditions. Moreover, it provides the first overview of BSC-associated algal and lichen taxa in the southern Polar Regions.

Acknowledgements

This study was funded by the DFG project 'Polarcrust' (KA899/23-1) of the Priority Program 1158 'Antarctic Research' (DFG: Deutsche Forschungsgemeinschaft). We are grateful to the Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem for technical support for the lichen and diatom identification. Special thanks to Dr Lydia Gustavs for initiating co-operation with lichenologists. The authors also thank Karoline Schulz for preparation of diatom slides and taking several light micrographs of these diatoms. Many thanks to the reviewers for the constructive criticism and suggestions. TM thanks the Alexander von Humboldt Foundation for financial support. We also thank the Instituto Antártico Chileno for their logistic support.

Author contribution

NB cultivated and isolated green and yellow-green algae, identified these species, took light micrographs, made hand drawings, created figures and tables, calculated biodiversity indices, performed the statistical analyses and wrote the manuscript. US identified lichens by microscopy and TLC. NA identified diatoms and took light micrographs. JB collected samples, measured soil temperatures and wrote part of the 'Materials and methods' section. TM identified

green and yellow-green algae species. HJMS identified lichens, performed TLC and provided technical support for the lichen identification. UK wrote some parts of the manuscript and provided technical support.

Supplemental material

A supplemental table presenting the algae catalogue will be found at <http://dx.doi.org/10.1017/S0954102016000638>.

References

- BELNAP, J. 2006. The potential roles of biological soil crusts in dryland hydrologic cycles. *Hydrological Processes*, **20**, 10.1002/hyp.6325.
- BELNAP, J. & GILLETTE, D.A. 1998. Vulnerability of desert biological soil crusts to wind erosion: the influences of crust development, soil texture, and disturbance. *Journal of Arid Environments*, **39**, 10.1006/jare.1998.0388.
- BELNAP, J., BÜDEL, B. & LANGE, O.L. 2001. Biological soil crusts: characteristics and distribution. In BELNAP, J. & LANGE, O.L., eds. *Biological soil crusts: structure, function, and management*. Berlin Heidelberg: Springer, 3–30.
- BOY, J., GODOY, R., SHIBISTOVA, O., BOY, D., MCCULLOCH, R., DE LA FUENTE, A.A., MORALES, M.A., MIKUTTA, R. & GUGGENBERGER, G. 2016. Successional patterns along soil development gradients formed by glacier retreat in the Maritime Antarctic, King George Island. *Revista Chilena de Historia Natural*, **89**, 10.1186/s40693-016-0056-8.
- BROADY, P.A. 1996. Diversity, distribution and dispersal of Antarctic terrestrial algae. *Biodiversity and Conservation*, **5**, 10.1007/BF00051981.
- BROADY, P.A. & WEINSTEIN, R.N. 1998. Algae, lichens and fungi in La Gorce Mountains, Antarctica. *Antarctic Science*, **10**, 10.1017/S0954102098000467.
- BÜDEL, B. & COLESIE, C. 2014. Biological soil crusts. In COWAN, D., ed. *Antarctic terrestrial microbiology*. Berlin Heidelberg: Springer, 131–161.
- BÜDEL, B., DARIENKO, T., DEUSCHEWITZ, K., DOJANI, S., FRIEDL, T., MOHR, K.I., SALISCH, M., REISSER, W. & WEBER, B. 2009. Southern African biological soil crusts are ubiquitous and highly diverse in drylands, being restricted by rainfall frequency. *Microbial Ecology*, **57**, 10.1007/s00248-008-9449-9.
- CANNONE, N. & SEPELT, R. 2008. A preliminary floristic classification of southern and northern Victoria Land vegetation, Continental Antarctica. *Antarctic Science*, **20**, 10.1017/S0954102008001454.
- CLARKE, K.R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, **18**, 117–143.
- CLARKE, K.R. & GREEN, R.H. 1988. Statistical design and analysis for a 'biological effect' study. *Marine Ecology Progress Series*, **46**, 213–226.
- COLESIE, C., GOMMEAUX, M., GREEN, T.G.A. & BÜDEL, B. 2014. Biological soil crusts in Continental Antarctica: Garwood Valley, southern Victoria Land, and Diamond Hill, Darwin Mountains region. *Antarctic Science*, **26**, 10.1017/S0954102013000291.
- DARBY, D.A., BURCKLE, L.H. & CLARK, D.L. 1974. Airborne dust on the Arctic ice pack, its composition and fallout rate. *Earth and Planetary Science Letters*, **24**, 166–172.
- ELSTER, J., LUKESOVÁ, A., SVOBODA, J., KOPECKY, J. & KANDA, H. 1999. Diversity and abundance of soil algae in the polar desert, Sverdrup Pass, central Ellesmere Island. *Polar Record*, **35**, 10.1017/S0032247400015515.
- ETTL, H. & GÄRTNER, G. 2014. *Syllabus der boden-, luft- und flechtenalgen*. Berlin Heidelberg: Springer, 773 pp.
- EVANS, R.D. & BELNAP, J. 1999. Long-term consequences of disturbance on nitrogen dynamics in an arid ecosystem. *Ecology*, **80**, 150–160.
- EVANS, R.D. & LANGE, O.L. 2001. Biological soil crusts and ecosystem nitrogen and carbon dynamics. In BELNAP, J. & LANGE, O.L., eds. *Biological soil crusts: structure, function, and management*. Berlin Heidelberg: Springer, 263–279.

- FLECHTNER, V.R., JOHANSEN, J.R. & BELNAP, J. 2008. The biological soil crusts of the San Nicolas Island: enigmatic algae from a geographically isolated ecosystem. *Western North American Naturalist*, **68**, 10.3398/1527-0904-68.4.405.
- GREEN, T.G.A. & BROADY, P.A. 2001. Biological soil crusts of Antarctica. In BELNAP, J. & LANGE, O.L., eds. *Biological soil crusts: structure, function, and management*. Berlin Heidelberg: Springer, 133–139.
- GREEN, T.G.A., SEPPELT, R.D., BRABYN, L.R., BEARD, C., TÜRK, R. & LANGE, O.L. 2015. Flora and vegetation of Cape Hallett and vicinity, northern Victoria Land, Antarctica. *Polar Biology*, **38**, 10.1007/s00300-015-1744-6.
- HARPER, K.T. & BELNAP, J. 2001. The influence of biological soil crusts on mineral uptake by associated vascular plants. *Journal of Arid Environments*, **47**, 10.1006/jare.2000.0713.
- KÁŠTOVSKÁ, K., STIBAL, M., ŠABACKÁ, M., ČERNÁ, B., ŠANTRŮČKOVÁ, H. & ELSTER, J. 2007. Microbial community structure and ecology of subglacial sediments in two polythermal Svalbard glaciers characterized by epifluorescence microscopy and PLFA. *Polar Biology*, **30**, 10.1007/s00300-006-0181-y.
- KEJNA, M., ARAZNY, A. & SOBOTA, I. 2013. Climatic change on King George Island in the years 1948–2011. *Polish Polar Research*, **34**, 10.2478/popore-2013-0004.
- KIM, G.H., KLOCHKOVA, T.A. & KANG, S.H. 2008. Notes on freshwater and terrestrial algae from Ny-Ålesund, Svalbard (high Arctic sea area). *Journal of Environmental Biology*, **29**, 485–491.
- KRUSKAL, J.B. & WISH, M. 1978. *Multidimensional scaling*. A Sage University Paper series on Quantitative Applications in the Social Sciences, 07-001. Newbury Park, CA: Sage Publications, 96 pp.
- LEE, T.F. & EGGLESTON, P.M. 1989. Airborne algae and cyanobacteria. *Grana*, **28**, 10.1080/00173138909431014.
- MÄUSBACHER, R. 1991. *Die jungquartäre Relief- und Klimageschichte im Bereich der Fildeshalbinsel Süd-Shetland-Inseln*. Heidelberg: Heidelberger Geographische Arbeiten, 205 pp.
- ORANGE, A., JAMES, P.W. & WHITE, F.J. 2001. *Microchemical methods for the identification of lichens*. London: British Lichen Society, 101 pp.
- ØVSTEDAL, D.O. & LEWIS SMITH, R.I. 2001. *Lichens of Antarctica and South Georgia: a guide to their identification and ecology*. Cambridge: Cambridge University Press, 424 pp.
- PEAT, H.J., CLARKE, A. & CONVEY, P. 2007. Diversity and biogeography of the Antarctic flora. *Journal of Biogeography*, **34**, 10.1111/j.1365-2699.2006.01565.x.
- PFÄFF, S., BORCHHARDT, N., BOY, J., KARSTEN, U. & GUSTAVS, L. 2016. Desiccation tolerance and growth-temperature requirements of *Coccomyxa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) strains from Antarctic biological soil crusts. *Algological Studies*, **151/152**, 10.1127/algo_stud/2016/0245.
- SANCHO, L.G., SCHULZ, F., SCHROETER, B. & KAPPEN, L. 1999. Bryophyte and lichen flora of South Bay (Livingston Island: South Shetland Islands, Antarctica). *Nova Hedwigia*, **68**, 301–337.
- SCHULZ, K., MIKHAILYUK, T., DRESSLER, M., LEINWEBER, P. & KARSTEN, U. 2016. Biological soil crusts from coastal dunes at the Baltic Sea: cyanobacterial and algal biodiversity and related soil properties. *Microbial Ecology*, **71**, 10.1007/s00248-015-0691-7.
- SEPPELT, R.D., TÜRK, R., GREEN, T.G.A., MOSER, G., PANNEWITZ, S., SANCHO, L.G. & SCHROETER, B. 2010. Lichen and moss communities of Botany Bay, Granite Harbour, Ross Sea, Antarctica. *Antarctic Science*, **22**, 10.1017/S0954102010000568.
- SOUFFREAU, C., VANORMELINGEN, P., VAN DE VIJVER, B., ISHEVA, T., VERLEYEN, E., SABBE, K. & VYVERMAN, W. 2013. Molecular evidence for distinct Antarctic lineages in the cosmopolitan terrestrial diatoms *Pinnularia borealis* and *Hantzschia amphioxys*. *Protist*, **164**, 10.1016/j.protis.2012.04.001.
- STARR, R.C. & ZEIKUS, J.A. 1993. UTEX – the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. 1993 list of cultures. *Journal of Phycology*, **29**(Sup.), 1–106.
- WATCHAM, E.P., BENTLEY, M.J., HODGSON, D.A., ROBERTS, S.J., FRETWELL, P.T., LLOYD, J.M., LARTER, R.D., WHITEHOUSE, P.L., LENG, M.J., MONIEN, P. & MORETON, S.G. 2011. A new Holocene relative sea level curve for the South Shetland Islands, Antarctica. *Quaternary Science Reviews*, **30**, 10.1016/j.quascirev.2011.07.021.
- WEBER, B., BÜDEL, B. & BELNAP, B. 2016. *Biological soil crusts: an organizing principle in drylands*. Berlin Heidelberg: Springer, 539 pp.
- WHITTAKER, R.H. 1972. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, **21**, 213–251.
- WILLIAMS, L., BORCHHARDT, N., COLESIE, C., BAUM, C., KOMSIC-BUCHMANN, K., RIPPIN, M., BECKER, B., KARSTEN, U. & BÜDEL, B. 2016. Biological soil crusts of Arctic Svalbard and of Livingston Island, Antarctica. *Polar Biology*, 10.1007/s00300-016-1967-1.
- WU, Y.M., RAO, B.Q., WU, P.P., LIU, Y.D., LI, G.B. & LI, D.H. 2013. Development of artificially induced biological soil crusts in fields and their effects on top soil. *Plant and Soil*, **370**, 10.1007/s11104-013-1611-6.
- ZIDAROVA, R.P. 2008. Algae from Livingston Island (S Shetland Islands): a checklist. *Phytologia Balcanica*, **14**, 19–35.

**РОЗДІЛ 2. KLEBSORMIDIOPHYCEAE (STREPTOPHYTA) ЯК
ДОМІНУЮЧА ГРУПА У БІОКІРОЧКАХ ПОМІРНОЇ ЗОНИ**

2.1. Молекулярна філогенія, морфологія, таксономія, різноманіття

Klebsormidiophyceae (Streptophyta)

**2.1.1. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей
класу Klebsormidiophyceae (Streptophyta)**

**МОЛЕКУЛЯРНА
ФІЛОГЕНІЯ
І СУЧАСНА ТАКСОНОМІЯ
НАЗЕМНИХ СПОРОВИХ
РОСЛИН**

*ПРОЕКТ
«НАУКОВА КНИГА»*

КИЇВ НАУКОВА ДУМКА 2013

УДК 582.2/.3:581.961:575.86

А в т о р и:

*С.Я. Кондратюк, Т.І. Михайлюк, Т.М. Дарієнко, О.В. Надєїна, А.О. Войцехович,
Н.М. Федоренко, А. Лукєшова, А. Массальський, Т. Фрідл, М.-Х. Джеонг, С. Стенруш,
І. Чарнефельт, Дж.А. Ілікс, А. Тель, Т.О. Кондратюк, Д.-С. Хо*

Вперше в Україні наведено результати молекулярно-філогенетичного аналізу за ядерною (18S велика субодиниця, ділянка ITS1/ITS2), мітохондріальною (12S та 23S малі субодиниці) та хлоропластною ДНК, які порівнено із сучасними відомостями щодо морфолого-анатомічних й біохімічних особливостей лишайників, симбіотичних і наземних зелених водоростей, а також мікроскопічних міцеліальних грибів. Уточнено описи морфологічних, анатомічних і біохімічних особливостей таксонів лишайників, симбіотичних і наземних водоростей, статус яких зазнав суттєвої ревізії у зв'язку з отриманням результатів молекулярно-філогенетичного аналізу досліджених груп наземних спорових рослин. Вперше подано таблиці для визначення опрацьованих таксонів лишайників, симбіотичних і наземних водоростей, статус і обсяг яких уточнено за традиційними морфолого-анатомічними ознаками.

Для ботаніків, мікологів, фікологів, екологів, викладачів і студентів біологічних, аграрних і лісівничих факультетів вищих навчальних закладів, а також для працівників управлінь охорони природи.

Results of molecular phylogenetic analysis after nuclear (18S LSU, ITS1/ITS2), mitochondrial (12S and 23S SSU) and chloroplast DNA of lichen-forming fungi, symbiotic and terrestrial algae as well as microscopic filamentous fungi obtained for the first time in Ukraine are compared with recent data on morphology, anatomy and biochemical characters. Taxonomical treatment of several groups of lichen-forming fungi, i.e. families Teloschistaceae and Physciaceae as well as symbiotic algae of the Trebouxiophyceae and terrestrial algae of the Myrmeciacae and Klebsormidiaceae as well as original keys for identification of spore plants mentioned are provided.

For botanists, mycologists, phycologists, ecologists, tutors and students of biological, agricultural and forestry faculties of universities.

В і д п о в і д а л ь н и й р е д а к т о р *С.Я. Кондратюк*

Р е ц е н з е н т и

д-р біол. наук, проф. *П.М. Царенко*, д-р біол. наук, проф. *О.Є. Ходосовцев*

*Рекомендовано до друку вченою радою
Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
(протокол № 13 від 21.06.2011 р.)*

**Видання здійснено за державним замовленням
на випуск видавничої продукції**

Науково-видавничий відділ медико-біологічної, хімічної та геологічної літератури

Редактор *О.І. Калашикова*

© С.Я. Кондратюк, Т.І. Михайлюк, Т.М. Дарієнко, О.В. Надєїна, А.О. Войцехович, Н.М. Федоренко, А. Лукєшова, А. Массальський, Т. Фрідл, М.-Х. Джеонг, С. Стенруш, І. Чарнефельт, Дж.А. Ілікс, А. Тель, Т.О. Кондратюк, Д.-С. Хо, 2013

© НВП «Видавництво “Наукова думка” НАН України», дизайн, 2013

ISBN 978-966-00-1332-2

ЧАСТИНА 2

МОЛЕКУЛЯРНА ФІЛОГЕНІЯ І СУЧАСНА ТАКСОНОМІЯ НАЗЕМНИХ ВОДОРОСТЕЙ

РОЗДІЛ 4

МОЛЕКУЛЯРНА ФІЛОГЕНІЯ, ТАКСОНОМІЯ І БІОЛОГІЯ НАЗЕМНИХ ВОДОРОСТЕЙ ПОРЯДКУ KLEBSORMIDIALES (KLEBSORMIDIOPHYCEAE, STREPTOPHYTA)

Порядок Klebsormidiales є центральним серед наземних стрептофітових водоростей і охоплює 4 роди — *Klebsormidium* P.S. Silva, Mattox et Blackwell, *Interfilum* Chodat et Topali emend. Mikhailiuk, Sluiman, A. Massalski, Mudimu, Demchenko, T. Friedl et S.Y. Kondr., *Hormidiella* M.O.P. Iyengar et Khantamma та *Entransia* E.O. Hughes, у цілому до складу яких входять 28 видів (Mikhailiuk et al., 2008; Rindi et al., 2008, 2011; Guiry, Guiry, 2012). Ці представники відіграють значну роль у наземних екосистемах, оскільки в більшості є широко поширеними наземними водоростями, що колонізують різноманітні субстрати — ґрунт, скелі, кору дерев, мертву деревину, стіни будівель, паркани, штучні субстрати тощо (Starmach, 1972; Мошкова, 1979; Ettl, Gärtner, 1995; Hindák, 1996; Lokhorst, 1996; Костіков та ін., 2001; Mikhailiuk et al., 2003; Mikhailiuk et al., 2008; Rindi et al., 2008, 2011). Деякі види здатні розмножуватися у масі та утворювати повстисті аерофітні макроскопічні розростання або відігравати одну з провідних ролей у формуванні наґрунтових кірок (Голлербах, Штина, 1969; Мошкова, 1979; Костіков, Рыбчинский, 1995; Lokhorst, 1996; Biological ..., 2001; Mikhailiuk et al., 2003; Rindi, Guiry, 2004; Büdel et al., 2009, 2010; Karsten et al., 2010 та ін.), таким чином створюючи асоціації, в які входять багато інших видів одноклітинних водоростей.

Деякі види клебсормідіальних водоростей визнані космополітними таксонами з широким географічним поширенням, здатні існувати в різноманітних умовах, включаючи екстремально холодне та жарке середовище (Hoffmann, 1989; Lokhorst, 1996; Biological ..., 2001; Rindi et al., 2011), проте частина видів мешкає у амфібіальних і водних біотопах, деякі — рідкісні представники (Chodat, Topali, 1922; Starmach, 1972; Мошкова, 1979; Hindák, 1996; Lokhorst, 1996; Cook, 2004; Novis, 2006). Клебсормідіальні водорості є одними з піонерів заростання безплідних субстратів (Голлербах, Штина, 1969; Бойко и др., 1984; Hoffmann, 1989; Lukešová, 2001), вони відомі як агенти біологічного вивітрювання кам'янистих порід, біодеструкції культурних пам'яток (John, 1988; Darienko, Hoffmann, 2003; Mikhailiuk et al., 2003; Uher et al., 2005; Rindi, Guiry, 2004; Mikhailiuk, 2008; Uher, 2008; Войцехович та ін., 2009; Macedo et al., 2009 та ін.) та індикатори навколишнього середовища (Rindi, Guiry, 2004).

Стрептофітові водорості (або Charophyceae s. l.) — одна з найцікавіших груп, оскільки вони є ймовірними предками вищих рослин (Graham et al.,

1991; Kranz et al., 1995; Van den Hoek et al., 1995; Bhattacharya, Medlin, 1998; Костіков та ін., 2001; Lewis, McCourt, 2004; Becker, Marin, 2009; Wodniok et al., 2011). Порядок Klebsormidiales, що являє собою одну з гілок при основі дерева Streptophyta, надзвичайно цікавий в еволюційному відношенні. Адже дослідження цих організмів, імовірно, дасть можливість пролити світло на еволюцію базальних ліній Streptophyta в цілому, а тому і краще зрозуміти перехід від водоростей до наземних рослин.

4.1. ІСТОРІЯ ВИВЧЕННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ KLEBSORMIDIALES

Зелені нитчасті водорості, що належать до порядку Klebsormidiales, відомі ще з середини XIX ст. Так, у 1843 р. Ф.Т. Кютцінг описав рід *Hormidium* Kütz., який, проте, автор розумів у широкому сенсі, включаючи до нього нитчасті водорості різноманітних груп, зокрема, також види сучасних родів *Prasiola* C. Agardh та *Ulothrix* Kütz. (Kützing, 1843). У пізніших роботах автор додав значну кількість нових видів до цього роду, хоча рід продовжує існувати як збірний таксон (Kützing, 1845), а надалі в іншій публікації (Kützing, 1849) зведений у секцію роду *Ulothrix*, що об'єднує наземні види. Наприкінці XIX ст. деякі вчені під наземними представниками роду *Hormidium* розуміли виключно види прازیолових водоростей (Gay, 1888; Hansgirg, 1888, 1892), що характеризуються зірчастим хлоропластом з центральним піреноїдом. Утім у 1896 р. Г. Клебс описав цей рід як нитчасті водорості, що мають пристінний хлоропласт і розмножуються фрагментацією ниток і дводжгутиковими зооспорами. Таким чином, Г. Клебс запропонував нове розуміння роду *Hormidium*, яке широко використовували альгологи протягом XX ст. (Klebs, 1896).

У 1968 р. К.Р. Меттокс запропонував зберегти цю назву в розумінні Г. Клебса (*Hormidium* G.A. Klebs 1896) як таку, що відповідає сучасному розумінню обсягу цього роду (Mattox, 1968). У той же час Б. Фотт показав неправомірність використання зазначеного імені для водоростей, оскільки в 1840 р. під ним був описаний рід орхідей (Fott, 1960), що, згідно з принципом пріоритету, потребувало заміни та упорядкування відповідної номенклатури. Кілька запропонованих імен (*Chlorhormidium* Fott, *Hormococcus* Chodat, *Pseudulothrix* Pascher) було відкинуто як незаконні або непридатні (оскільки заміняли *Hormidium* sensu Kützing) і запропоновано нове — *Klebsormidium* P.S. Silva, Mattox et Blackwell, яке визнано найадекватнішими для узаконення *Hormidium* sensu G.A. Klebs (Silva et al., 1972).

Klebsormidium морфологічно найближчий до родів *Ulothrix* і *Stichococcus* Nägeli, тому в морфологічних системах завжди його розглядали серед зелених нитчастих водоростей, в межах порядку Ulothrichales (Chlorophyceae, Chlorophyta) (Starmach 1972; Мошкова, 1979; Hindák, 1996). Дослідження ультраструктури та молекулярної філогенії видів цього роду показали, попри значні морфологічні відмінності, близькість їх до харових водоростей (Floyd et al., 1972; Pickett-Heaps, 1972; Stewart, Mattox, 1975; Lokhorst, Starr, 1985; Kranz et al., 1995; Turmel et al., 2002 та ін.). Так, *Klebsormidium* став представником класу Charophyceae (Chlorophyta) у складі порядку Klebsormidiales (Mattox, Stewart, 1984; Bold, Wynne, 1985; Ettl, Gärtner, 1995; Kranz et al., 1995; Lokhorst,

4.1. Історія вивчення представників Klebsormidiales

1996; Костіков та ін., 2001) або окремого класу Klebsormidiophyceae в межах Chlorophyta (Van den Hoek et al., 1995) чи Charophyta (Lewis, McCourt, 2004) та лінії Streptophyta, що об'єднує харофіцієві водорості та вищі рослини (Marin, Melkonian, 1999; Sluiman et al., 2008; Becker, Marin, 2009).

Поряд з *Klebsormidium* традиційно розміщували також деякі морфологічно та екологічно подібні нитчасті водорості — *Stichococcus*, *Koliella* Hindák, *Raphidonema* Lagerh. (Ettl, Gärtner, 1995; Van den Hoek et al., 1995; Костіков та ін., 2001²), що мають спільні з Klebsormidiales ультраструктурні ознаки (Pickett-Heaps, 1974, 1976; Lokhorst, Star, 1998). Проте подальші молекулярні дослідження цього не підтвердили, натомість показали, що згадані водорості слід розглядати в межах класу Trebouxiophyceae (Chlorophyta) (Handa et al., 2003; Lewis, McCourt, 2004; Neustupa et al., 2007; Sluiman et al., 2008).

Молекулярно-філогенетичними дослідженнями показано, що 2 роди інших нитчастих водоростей — *Hormidiella* та *Entransia*, також є представниками Klebsormidiales. Рід *Hormidiella* (Iyengar, Kanthamma, 1940, цит. за: Lokhorst et al., 2000) описаний в 1940 р. з ґрунтів Індії. Морфологічно подібний до улотрикскових водоростей, традиційно його розглядали у порядку Ulothrichales (Chlorophyceae, Chlorophyta) (Starmach, 1972; Мошкова, 1979; Hindák, 1996). Пізніше, вслід за *Klebsormidium*, цей рід був перенесений до Klebsormidiales (Charophyceae) (Ettl, Gärtner, 1995), де його положення було підтверджено у зв'язку з детальним цитологічним і молекулярно-філогенетичним вивченням одного з його видів — *H. attenuata* Lokhorst (Lokhorst et al., 2000; Sluiman et al., 2008). Рід *Entransia* описаний у 1948 р. з водойми (Hughes, 1948). Завдяки хлоропласту оригінальної будови та розвитку ниток серед жабуринь, утворених зигнемовими водоростями, вказаний рід вважали представником Zygnemataceae (Conjugatophyceae, Chlorophyta) (Transeau, 1951, цит. за: Cook, 2004). Подальші молекулярно-філогенетичні, цитологічні та морфологічні дослідження типового виду цього роду — *E. fimbriata* E.O. Hughes, чітко визначили його місце за межами кон'югуючих водоростей, у спорідненості до *Klebsormidium* (Mccourt et al., 2000; Karol et al., 2001; Turmel et al., 2002; Cook, 2004; Sluiman et al., 2008).

На цей час до порядку Klebsormidiales приєднано ще одну наземну водорість — рід *Interfilum*, який описано зі стоячої водойми в 1922 р. як хлорококову водорість (Chlorococcales, Chlorophyta) (Chodat, Topali, 1922). Тривалий час його розглядали як монотипний рід широко поширених наземних водоростей і відносили до порядків Ulothrichales (Starmach, 1972; Мошкова, 1979; Hindák, 1996) та Gloeotilales (Chlorophyceae) (Ettl, Gärtner, 1995). Дослідження морфології, ультраструктури та молекулярної філогенії цього роду дали змогу включити до його складу іншу широко поширену нитчасту наземну водорість (*Geminella terricola* J.V. Petersen (Petersen, 1932)), описати новий вид роду (*Interfilum massjukiae* Mikhailyuk, Sluiman, A. Massalski, Mudimu, Demchenko, T. Friedl et S.Y. Kondr.) та визначити його місце у порядку Klebsormidiales як найближчого таксона до роду *Klebsormidium* (Mikhailyuk et al., 2007, 2008).

Таким чином, до порядку Klebsormidiales на цей час належать 4 роди водоростей, кожен з яких характеризується багатою історією вивчення. Представників порядку у морфологічних системах розглядали у складі різних по-

² Припущено, що деякі види роду *Stichococcus* є спорідненими з *Klebsormidium*.

рядків і класів водоростей. Приводом до перенесення цих родів до стрептофітових водоростей слугували переважно дослідження ультраструктури джгутикових стадій, вегетативних клітин, ультратонких механізмів ділення клітин тощо (Stewart, Mattox, 1975; Lokhorst, Starr, 1985; Van den Hoek et al., 1995; Lokhorst, 1996; Lokhorst et al., 2000; Mikhailyuk et al., 2005 та ін.). Пізніше ці висновки, отримані на основі вивчення ультраструктури, були підтверджені даними молекулярної філогенетики (Kranz et al., 1995; Karol et al., 2001; Turmel et al., 2002; Mikhailyuk et al., 2008; Sluiman et al., 2008).

4.2. ПРОБЛЕМИ ТАКСОНОМІЇ KLEBSORMIDIALES

Однією з проблем таксономії групи є те, що її представники були описані в складі інших таксономічних груп. За морфологічними ознаками, які використовують у класичних системах, ці водорості дуже різні і не формують відокремленої групи. Хоча більшість видів Klebsormidiales — нитчасті водорості, включення роду *Interfilum* до цього порядку урізноманітнює його морфологію, оскільки частина видів має кокоїдний тип слані (з погляду класичної морфології), деякі види формують сарциноїдні пакети та утворюють так звану плеврококоїдну слань. Крім того, у оригінальному описі *Interfilum paradoxum* (Chodat, Topali, 1922) вказано, що його клітини мають двостулкову оболонку, через що цей представник певний час перебував у складі роду *Radiophilum* Schmidle (Мошкова, 1979). Нижче показано, що клітинна оболонка *Interfilum* суцільна і лише виглядає двостулковою через залишок материнської оболонки, що не відокремлюється від дочірньої. Нижче також наведені морфологічні та цитологічні ознаки, що об'єднують всіх представників Klebsormidiales і репрезентують їх як єдину природну групу.

Водночас такий «збірний» характер порядку вказує на те, що, ймовірно, донині частина його представників перебуває у складі інших груп водоростей, а можливо, й просто ще не відкрита. Зокрема, наземні місцезростання, в яких мешкають переважна більшість видів Klebsormidiales, вважають ще недостатньо вивченими в альгологічному відношенні, особливо у тропічних та екваторіальних регіонах (López-Bautista et al., 2008; Rindi et al., 2009 та посилення в них). Цей факт утруднює вивчення філогенії та родинних зв'язків у межах Klebsormidiales. Зокрема, якщо роди *Klebsormidium* та *Interfilum* дуже близько споріднені і навіть постає питання про те, чи не є вони представниками одного роду (Mikhailyuk et al., 2008; Rindi et al., 2011), то *Hormidiella* та *Entransia* — досить віддалені таксони як від вище зазначених, так і між собою (Sluiman et al., 2008). Це може бути пов'язане або з тим, що близько споріднені до них роди є «викопними», або їх ще не знайдено у природі. Як показано нижче, останнє припущення є цілком імовірним.

Нарешті, суттєва проблема в розробці таксономії представників порядку — відносна простота та однотипність їх морфології, що є стандартною проблемою багатьох таксонів нитчастих водоростей. Слід зазначити, що для деяких нитчастих водоростей, наприклад едогонієвих або зигнемових, надійні таксономічні ознаки на рівні видів забезпечували стадії, пов'язані зі статевим процесом, — морфологія зигот, особливості життєвих циклів тощо (Рундіна, 1988; Юнгер, Мошкова, 1993), тоді як у клебсормідіальних водоростей статевий процес виявлено лише у кількох представників і достовірно не підтверджено

4.3. Матеріали і методи дослідження

(Lokhorst, 1996; Lokhorst et al., 2000). Натомість, ознаки, пов'язані з вегетативною сланню Klebsormidiales, у більшості відзначаються широкою мінливістю, що не сприяє чіткому розмежуванню окремих видів і побудові ґрунтової морфологічної системи порядку (Lokhorst, 1996; Škaloud, 2006; Rindi et al., 2011).

4.3. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріал нашого дослідження склали штами водоростей з громадських колекцій культур — SAG (Sammlung von Algenkulturen Göttingen University, Німеччина), CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Великобританія), АСКУ (Algal Collection of Kyiv University, Україна), деяких приватних колекцій та наші власні ізоляти (табл. 4.1). Усього було вивчено 97 штамів водоростей родів *Interfilum*, *Klebsormidium*, *Stichococcus*, *Gloeotila* Kütz., *Geminella* Turpin, *Ulothrix*, *Pseudopleurococcus* J. Snow em. Vischer, *Hormidiella*. Крім морфологічного опрацювання отримано 89 повних послідовностей ділянки ITS рДНК та 20 часткових і повних послідовностей гена 18S рДНК.

Культури водоростей вирощували переважно на агаризованому та іноді рідкому поживному середовищі Болда з потрібною кількістю азоту та вітамінами (3N BBVM + vitamins) (Starr, Zeikus, 1987), за стандартних лабораторних умов (температура +18 °С, світловий режим — світло : темрява — 14 : 10, інтенсивність освітлення (білі флуоресцентні лампи) — близько 25 мкмоль фотонів · м⁻² · с⁻¹). Мікроскопічні дослідження проведені переважно на базі університету м. Геттінген, Німеччина (відділ експериментальної фікології та колекції культур водоростей — EP SAG), на світловому мікроскопі Olympus BX60 (Токіо, Японія) з інтерференційною оптикою (Nomarski DIC optics). Культури водоростей досліджені в молодому (2—3 тижні), середньому (1—1,5 міс) та старому стані (3—4 міс). Мікрофотографії виготовлені на вказаному мікроскопі з приєднаною камерою ColorView III camera (Soft Imaging System GmbH, Мюнстер, Німеччина) та опрацьовані за програмою Cell[^]D (Soft Imaging System GmbH). Слиз водоростей фарбували метиленовим синім.

Форму та розташування мітохондрій у клітинах досліджували (з люб'язного дозволу проф. У. Карстена) на базі університету м. Росток, Німеччина (відділ прикладної екології (Applied Ecology) і центр мікроскопії (Cell Imagine Centre)), за допомогою прижиттєвого фарбування клітин Mitotrekker Green. Фарбовані клітини досліджували на мікроскопі Olympus IX70 (Токіо, Японія) з люмінесцентною лампою та лазерному сканувальному конфокальному мікроскопі Leica TCS SP2 AOBS.

Дослідження ультраструктури клітин проведено на базі університету гуманітарних і природничих наук, Кельце, Польща (кафедра ботаніки), з використанням трансмісійного електронного мікроскопа Tesla BS 500. Для TEM водорості з молодих агарових культур фіксували протягом 1 год у 3%-му розчині глютаральдегіду в 0,1 М фосфатному буфері при рН 7,1 і кімнатній температурі. В подальшому слідували протоколу, детально описаному в попередніх роботах (Massalski et al., 1995).

Розділ 4. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей ...

Таблиця 4.1. Коротка характеристика досліджених штамів водоростей

Номер штаму в колекції		Походження штаму	Назва таксона, примітка
громадській	особистій		
SAG 2102	LUK314	Чеська Республіка, вугільні відвали, ґрунт Карадазький ПЗ, Україна, пірокластичні відслонення	<i>Interfilum</i> sp. <i>I. massjukiae</i> ; тип (Mikhailyuk et al., 2008)
SAG 338-1		Лондон (околиці), Велика Британія, ґрунт букового лісу	<i>I. paradoxum</i> , епітип (Mikhailyuk et al., 2008)
SAG 4.85		Тироль, Бриксен, Італія, ґрунт	<i>I. paradoxum</i>
SAG 2100		Високі Ардени, Бельгія, ґрунт дубового лісу	<i>I. terricola</i> , епітип (Mikhailyuk et al., 2008)
SAG2101		РЛП «Гранітно-степове Побужжя», Україна, гранітні відслонення	<i>Interfilum</i> sp.
	LUK304	Словацьчина, вугільні відвали, з повітря	<i>I. terricola</i>
	LUK305	Антарктида, район, вільний від льодового покриву, ґрунт	<i>I. terricola</i>
	LUK306	Чеська Республіка, ґрунт	<i>I. terricola</i>
	LUK308	Швеція, район із заморозками, ґрунт	<i>I. terricola</i>
	TR 17 ²	ПЗ «Хомутівський степ», Україна, гранітні статуї	<i>Interfilum</i> sp.
SAG 36.88		Текоа, Нова Зеландія, ґрунт	<i>Interfilum</i> sp.
	LUK313	Словацьчина, піщані ґрунти	<i>Interfilum</i> sp.
SAG 2147	LUK317	Чеська Республіка, піщані ґрунти	<i>Interfilum</i> sp.
		Чеське Стредогорі, вершина Борек Хілл, Чеська Республіка, ґрунт	<i>Interfilum</i> sp.
	Biof 4 ¹	Масандрівський палац, Крим, Україна, кам'янистий субстрат	<i>Klebsormidium</i> cf. <i>flaccidum</i>
	Lira 7 ³	Росія, з дощової води	<i>K. cf. flaccidum</i>
ACKU 800	TR 26 ¹	Богуславський р-н Київської обл., Україна, гранітні відслонення	<i>K. cf. flaccidum</i>
	TR 44 ¹	Там само	<i>K. cf. flaccidum</i>
SAG 7.91		Колишній СРСР, прісна водойма (?)	<i>K. cf. flaccidum</i>
ACKU 450	TR 34 ¹	м. Житомир, Україна, гранітні відслонення	<i>Klebsormidium</i> sp.
ACKU 801	TR 42 ¹	Богуславський р-н Київської обл., Україна, гранітні відслонення	<i>Klebsormidium</i> sp.
	Vacota ¹	НПП «Подільські Товтри», Україна, відслонення вапняку	<i>Klebsormidium</i> sp.
ACKU 451	TR 22 ¹	м. Житомир, Україна, гранітні відслонення	<i>Klebsormidium</i> sp.
ACKU 379	TR 24 ¹	РЛП «Гранітно-степове Побужжя», Україна, гранітні відслонення	<i>Klebsormidium</i> sp.
	TR 35 ¹	м. Житомир, Україна, гранітні відслонення	<i>Klebsormidium</i> sp.
SAG 2307	KL 1	Німеччина, глинистий ґрунт поля під буряком	<i>K. flaccidum</i>
SAG 335-5		Невідоме, прісна водойма (?)	<i>K. flaccidum</i>
SAG 335-7		Смеленд, Швеція, прісна водойма (?)	<i>K. flaccidum</i>
SAG 12.91		Заповідник Сойовіце, Чеська Республіка, водойма(?)	<i>K. flaccidum</i>
SAG 5.96	KL 44	Поппель (околиці), Бельгія, берег струмка	<i>K. bilatum</i>
SAG 7.96	KL 24	Стеверден (околиці), Нідерланди, кора дуба	<i>K. elegans</i> , тип (Lokhorst, 1996)
	TR 13 ¹	РЛП «Гранітно-степове Побужжя», Україна, гранітні відслонення	<i>K. cf. bilatum</i>

4.3. Матеріали і методи дослідження

Продовження табл. 4.1

Номер штаму в колекції		Походження штаму	Назва таксона, примітка
громадській	особистій		
SAG 2155	KL 2	Кол ду Буссенг, Восгес, Франція, вологий піщаний ґрунт лісової дороги	<i>K. dissectum</i> , неотип (Lokhorst, 1996), не відповідає діагнозу
SAG 335-1a		Барлоу, Медісон, США, у прісній воді	<i>K. nitens</i>
SAG 335-1b		Там само	<i>K. nitens</i>
SAG335-2a		» »	<i>K. nitens</i>
SAG335-2b		» »	<i>K. nitens</i>
SAG 13.91		Текоа, Нова Зеландія, ґрунт	<i>K. nitens</i>
SAG 37.91		околиці Пуно, Перу, оз. Тітікака	<i>K. flaccidum</i>
	Biota-14621.10.54	ПЗ Рочерпан, Південна Африка, ґрунтові кірки	<i>Klebsormidium</i> sp.
	TR 2 ¹	Карадазький ПЗ, Україна, епіфіт на лишайниках	<i>Klebsormidium</i> sp.
ACKU 447	TR 38	Хмельницька обл., Україна, ґрунт у со-сновому лісі	<i>Klebsormidium</i> sp.
ACKU 799	TR 41 ¹	Богуславський р-н Київської обл., Україна, гранітні відслонення	<i>Klebsormidium</i> sp.
	TR 31 ²	Австралія, ґрунт	<i>Klebsormidium</i> sp.
SAG 2116		Невідоме	<i>Klebsormidium</i> sp.
SAG121.80		Нойгаус (околиці), Німеччина, кора бука	<i>K. flaccidum</i>
SAG 38.91		Вітзенхаузен, Німеччина	<i>K. flaccidum</i>
SAG 52.91		острів Морс, Данія, плантація	<i>K. nitens</i>
SAG 2065		Роскілд, Данія, плантація ялинок	<i>Klebsormidium</i> sp.
SAG 2107		Зінгст, Німеччина	<i>Klebsormidium</i> sp.
SAG 2109		Там само	<i>Klebsormidium</i> sp.
	TR 18 ²	Австралія, ґрунт	<i>Klebsormidium</i> sp.
SAG 2108		Зінгст, Німеччина	<i>Klebsormidium</i> sp.
SAG 2112		Геттінген, Німеччина, черепиця з даху	<i>Klebsormidium</i> sp.
SAG106.80		Франція, прісна водойма(?)	<i>K. flaccidum</i>
	Biota-15051.6	Неудамм, Південна Африка, ґрунтові кірки	<i>Klebsormidium</i> sp.
	TR 11 ¹	НПП «Подільські Товтри», Україна, відслонення вапняку	<i>Klebsormidium</i> sp.
SAG 9.96	Namibia 5 ⁴ KL22	Намібія, стіни будівель	<i>Klebsormidium</i> sp.
		Рійсенхоут, Нідерланди, шпунтова стінка, зона заплеску, озеро з лужним рН води	<i>K. fluitans</i> , неотип (Lokhorst, 1996)
SAG 33.91		Корнвол, Велика Британія, р. Ганнел	<i>K. flaccidum</i>
CCAP335/17		Там само	<i>K. subtile</i>
SAG 335-4		Колишня Чехословаччина, водойма(?)	<i>K. flaccidum</i>
CCAP335/18		Корнвол, Велика Британія, р. Хайле	<i>K. subtile</i>
SAG 31.91		Корнвол, Велика Британія, р. Ганнел	<i>K. nitens</i>
CCAP335/15		Там само	<i>K. scopulinum</i>
CCAP335/16		» »	<i>K. scopulinum</i>
CCAP335/13		Корнвол, Велика Британія, р. Хайле	<i>K. fluitans</i>
CCAP335/12		Корнвол, Велика Британія, р. Ганнел	<i>K. fluitans</i>
SAG 32.91		Там само	<i>K. nitens</i>
CCAP335/14		Корнвол, Велика Британія, р. Хайле	<i>K. fluitans</i>
SAG 384-1		Порт Барроу, Аляска, США, зі снігу	<i>K. subtilissimum</i>
SAG 6.92		Франтішкові Лазні, Чеська Республіка	<i>K. nitens</i>

Розділ 4. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей ...

Закінчення табл. 4.1

Номер штаму в колекції		Походження штаму	Назва таксона, примітка
громадській	особистій		
SAG 37.86	Crimea ¹	Карадазький ПЗ, Україна, пірокластичні відслонення	<i>K. cf. crenulatum</i>
SAG 8.96	KL63	Південний Тироль, Бріксен, Італія, ґрунт	<i>K. crenulatum</i> , попередньо був визначений як <i>Ulothrix tenuissima</i>
	Biota-14613.5e	Валкенсваард, Нідерланди, ґрунт біля рівня води р. Доммел	<i>K. mucosum</i>
	Biota-14614.7	Південна Африка, Кебес, ґрунтові кірки	<i>Klebsormidium</i> sp.
	Biota-14615.5a	Південна Африка, Грут Дерм, Намакваленд, ґрунтові кірки	<i>Klebsormidium</i> sp.
	Biota-14614.18.24	Південна Африка, Керегеп Влакте, Намакваленд, ґрунтові кірки	<i>Klebsormidium</i> sp.
	Biota-14614.18.18	Південна Африка, Грут Дерм, Намакваленд, ґрунтові кірки	<i>Klebsormidium</i> sp.
	LUK318	Чеська Республіка, вугільні відвали, ґрунт	<i>Klebsormidium</i> sp.
	Biota-14621.10.47	ПЗ Рочерпан, Південна Африка, ґрунтові кірки	<i>Klebsormidium</i> sp.
	Biota-14621.6	Там само	<i>Klebsormidium</i> sp.
	Biota-14621.10.44	» »	<i>Klebsormidium</i> sp.
	Kleb_pseudomy ¹	Богуславський р-н Київської обл., Україна, гранітні відслонення	cf. <i>Gloeotila</i>
SAG 36.98	Kleb_pseudop ⁴	Німеччина, Геттінген, штучний кам'янистий субстрат	cf. <i>Gloeotila</i>
CCAP 329.1		Коста-Рика, кофейна плантація, ґрунт	<i>Pseudopleurococcus speciosus</i>
		Бразилія, ксероморфний ліс, ґрунт	<i>Hormidiella attenuata</i> , тип (Lokhorst et al., 2000)
	TR 4 ¹	Богуславський р-н Київської обл., Україна, гранітні відслонення	<i>Klebsormidium</i> sp.
	LUK 70	Ґілетте, Вайомінг, США, рекультивовані шахтні відвали	<i>Klebsormidium</i> sp.
SAG 8.91		Високі Татри, Словаччина, планктон оз. Стрбске Плесо	<i>Geminella interrupta</i>
SAG 20.91		С. Естрела, Португалія, водойма	<i>G. terricola</i> , не відповідає діагнозу
SAG 9.97		Там само	<i>G. interrupta</i>
SAG 9.91		Требон, Чеська Республіка, ставок Грачовісте, літораль	<i>G. interrupta</i>
SAG 20.84		Велика Британія, оз. Віндермер	<i>Geminella</i> sp.
SAG 379-3a		Невідоме	<i>Stichococcus mirabilis</i> , не відповідає діагнозу

Примітка: Особисті колекції: KL — Г.М. Локхорста; LUK — А. Лукешової (Чехія); індекс «1» — Т. Михайлюк (Україна); індекс «2» — Т. Дарієнко (Україна); індекс «3» — Л. Гайсіної (Росія); індекс «4» — О. Мудіму (Німеччина); Biota — проекту «BIOTA Southern Africa» (Büdel et al., 2010). Скорочення: ПЗ — природний заповідник; РЛП — регіональний ландшафтний парк.

4.4. Місце Klebsormidiales у системі водоростей

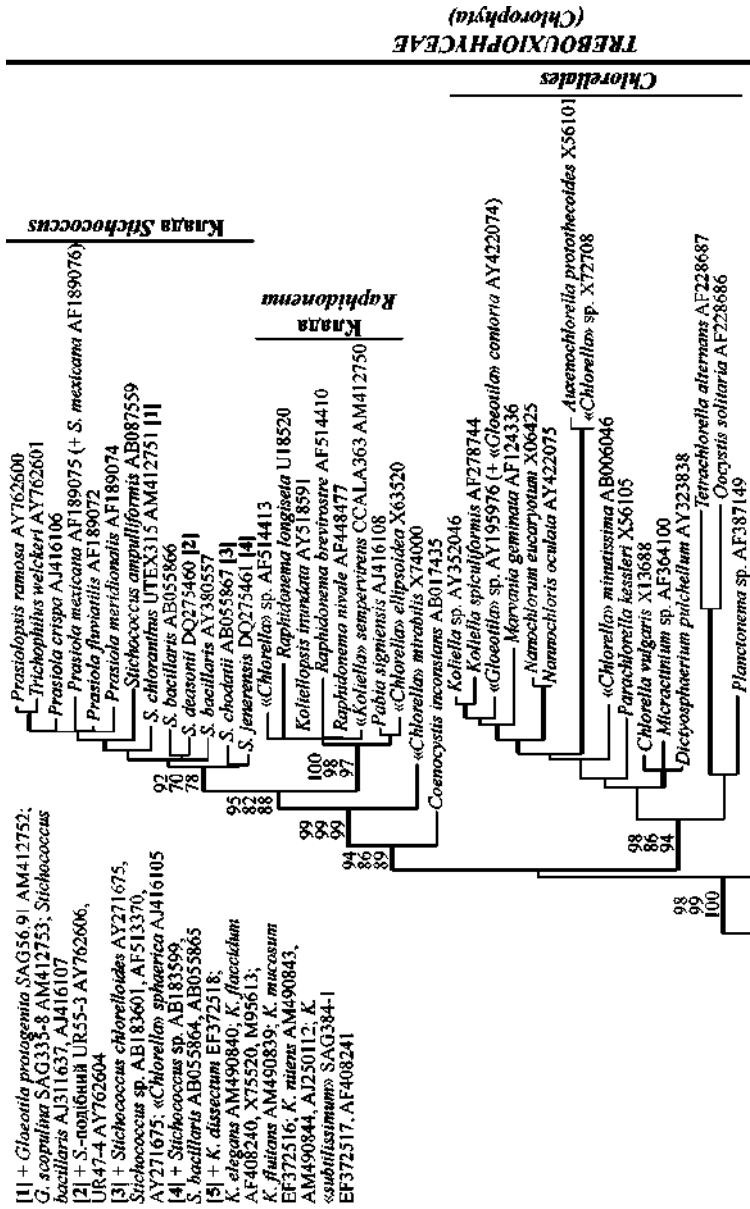
Молекулярно-філогенетичні дослідження проведені на базі університету м. Геттінген, Німеччина (відділ експериментальної фікології та колекції культур водоростей — EP SAG). Для ампліфікації 18S рДНК використані праймери NS1 та 18L, для ITS-1-5.8S-ITS-2 регіону — AL1500af і LR1850. Секвенування виконано з праймерами для 18S рДНК — 895R, 1122F, 370R, 34F та 1263R, для ITS-1-5.8S-ITS-2 регіону — 1800F, 5.8SbF, 5.8SbR і ITS4m. Процедури ізоляції ДНК, ампліфікування, секвенування, елайнмент та філогенетичний аналіз подібні до описаних процедур у попередніх розділах, а також детально розглянуті у наших публікаціях (Mikhailyuk et al., 2008; Rindi et al., 2011).

4.4. МІСЦЕ KLEBSORMIDIALES У СИСТЕМІ ВОДОРОСТЕЙ

Сучасні молекулярно-філогенетичні дані чітко підтверджують розташування порядку Klebsormidiales серед стрептофітових водоростей, тобто в близькій спорідненості з порядками Zygnematales, Charales, Coleochaetales, Chaetosphaeridiales, Chlorokybales, Mesostigmatophyceae та вищими рослинами (рис. 4.1). Види родів *Stichococcus*, *Koliella*, *Raphidonema*, *Gloeotila*, що мають спільні з Klebsormidiales ультраструктурні ознаки, пов'язані переважно з діленням вегетативних клітин (відкритий мітоз, персистентне телофазне веретено, цитокінез через утворення кільцевої борозни та формування поперечної клітинної перегородки, позбавленої пор) (Pickett-Heaps, 1974; 1976; Lokhorst, Star, 1998; Van den Hoek et al., 1995), увійшли до різних клад класу Trebouxiophyceae (Chlorophyta).

Особливо цікавою виявилася ситуація зі *Stichococcus chloranthus* Raths, що має голий піреноїд, не характерний для представників роду (Pickett-Heaps, 1974). Певний час цей вид вважали реальним кандидатом для включення до Klebsormidiales (Костіков та ін., 2001). Як показав філогенетичний аналіз, цей представник потрапив до Trebouxiophyceae та приєднався до інших видів цього роду (рис. 4.1). Подальше молекулярно-філогенетичне вивчення деяких тонконитчастих *Stichococcus*-подібних представників роду *Klebsormidium* (*K. marinum* (Deason) P.S. Silva, Mattox et Blackwell) та морфологічно близьких до них штамів показало їх чітку приналежність до роду *Stichococcus* (Neustupa et al., 2007), незважаючи на наявність піреноїдів *Klebsormidium*-подібної будови.

Нами також проаналізовані водорості, що поєднували морфологічні ознаки *Stichococcus* і *Klebsormidium*. Два штами, виділені з гранітних відслонень по берегах р. Рось (Україна) та антропогенних субстратів м. Геттінген (Німеччина) (табл. 4.1), мали клітини близько 3 мкм завтовшки, але при цьому утворювали досить довгі нитки, здатні до дезінтеграції, та містили чіткий піреноїд, облямований крохмальною обгорткою, за своєю будовою близькою до *Klebsormidium* (рис. 4.2, 1, див. вклейку). Попередньо ці водорості були ідентифіковані як cf. *Klebsormidium pseudostichococcus* (Heering) H. Ettl et G. Gärtner. Проте за нуклеотидною послідовністю гена, що кодує 18S рДНК, вказані ізоляти виявилися близько спорідненими з видами *Stichococcus* та *Gloeotila* (Trebouxiophyceae) (99 % подібності (99 % покриття), зі *S. bacillaris* Nägeli та *G. cf. protogenita* Kütz., згідно з пошуками за програ-



4.4. Місце Klebsormidiales у системі водоростей

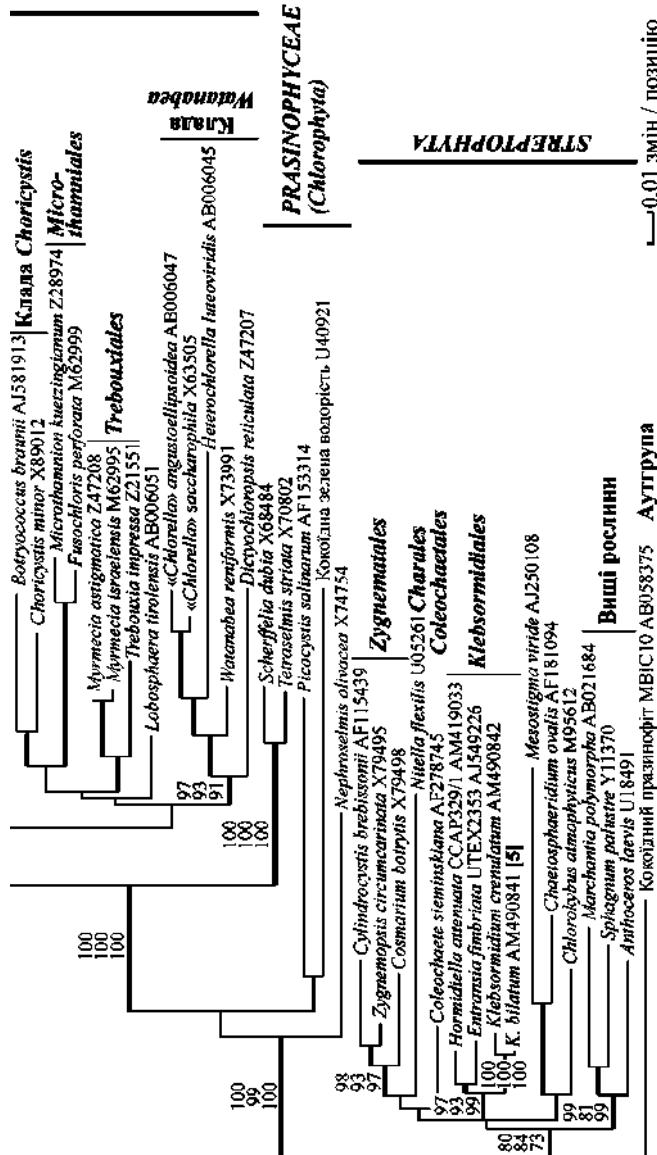


Рис. 4.1. Розширений філогенетичний аналіз за ядерним геном, що кодує 18S рДНК (аналіз максимальної правдоподібності (Maximum-likelihood)) представників різних класів зелених і стрептофітових водоростей (Sluiman et al., 2008).

Товсті лінії вказують на підтримку 70 % і більше; значення підтримки вузлових точок дерева: зверху — максимальна правдоподібність, посередині — неважена максимальна економія (maximum parsimony), знизу — зважена максимальна економія. Нумери нуклеотидних послідовностей у генобанку (accession numbers) наведені після назви таксона та номера штаму. Деякі з послідовностей (позначені [1], [2], [3], [4], [5]) майже подібні до таксонів, поряд з якими вказані, і тому не включені до філогенетичного аналізу (назви цих таксонів, штамів і номери послідовностей у генобанку показано у верхньому лівому куті)

Розділ 4. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей ...

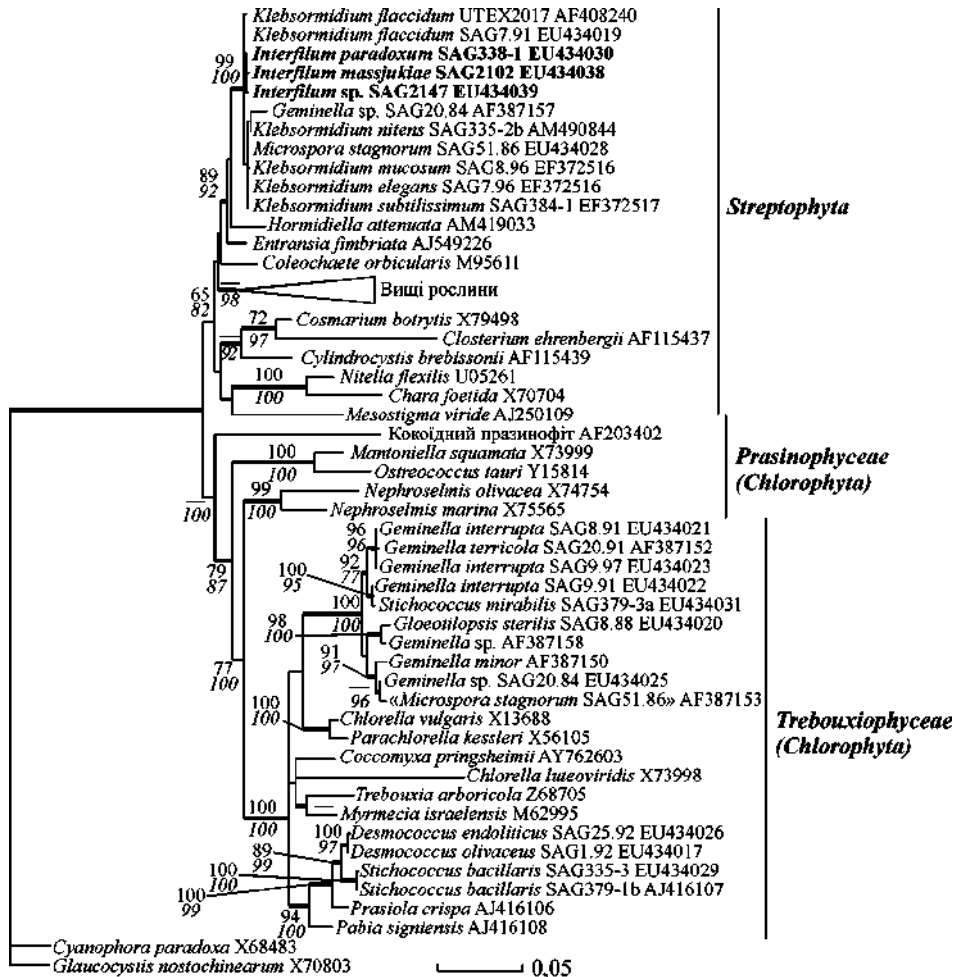


Рис. 4.3. Філогенетичний аналіз за ядерним геном, що кодує 18S рДНК (аналіз максимальної правдоподібності (Maximum-likelihood)) видів *Interfilum* (назви наведено жирними літерами) та інших представників стрептофітових і зелених водоростей, деяких вищих рослин (Mikhailyuk et al., 2008).

Товсті лінії — внутрішні гілки, що підтримані байєсівським аналізом (Bayesian analysis) з імовірністю >0,95. Цифри над і під гілками — значення підтримки (>70 %) за дистанції «найближчого сусіда» (neighbor-joining distance) та аналізу максимальної економії (maximum parsimony). Номери послідовностей у генобанку (accession numbers) наведено після назви таксона та номера штаму

мою BLAST). Таким чином, очевидно, нитчасті водорості з діаметром клітин менше 4 мкм не є представниками *Klebsormidiales*, незважаючи на близькі морфологічні ознаки.

Включення роду *Interfilum* до *Klebsormidiales* показало його надзвичайно близьку спорідненість з *Klebsormidium* та парафілетичність останнього. Як видно з рис. 4.3, філогенія за геном, що кодує 18S рДНК, не має достатньої роздільної здатності для розмежування різних видів *Interfilum* і *Klebsor-*

4.5. Klebsormidiales — відокремлена група водоростей ...

midium. При цьому види родів *Hormidiella* та *Entransia* досить віддалені як між собою, так і від попередніх двох родів. Цікавою знахідкою є наше попереднє дослідження одного зі штамів колекції SAG, виділеного з ґрунтів Коста-Ріка (Центральна Америка). За послідовністю гена, що кодує 18S рДНК (частковий секвенс), штам виявився близько спорідненим з *Hormidiella attenuata* Lokhorst, проте не ідентичний цьому виду (96 % подібності (99 % покриття), згідно з пошуком за програмою BLAST). Ця водорість має будову протопласта, подібну до такої інших представників Klebsormidiales (характерна морфологія піреноїда, хлоропласта, позиція ядра), проте характеризується загальною морфологічною будовою ниток, досить віддаленою від роду *Hormidiella*: нитки легко розпадаються до поодиноких клітин і мають ознаки галуження і утворення плеврококоїдної слані (рис. 4.2, 2, 3, див. вклейку). Цей штам очевидно є новим таксоном водоростей, який за детального дослідження поповнить порядок Klebsormidiales і скоротить генетичну відстань між *Entransia*, *Hormidiella* та *Interfilum/Klebsormidium*-групами.

Дуже цікавими є еволюційні питання стосовно Klebsormidiales: наскільки його представники родинно пов'язані з вищими рослинами і яка група серед стрептофітових водоростей є їх безпосередньою предковою формою. Питання дуже непрості, і дискусії на цю тему точаться вже не перший десяток років. Певний час вважали, що рід *Coleochaete* Gréb. через близькі цитологічні ознаки (зокрема утворення фрагмопласта під час ділення клітин) є найімовірнішим предком мохоподібних (Graham et al., 1991), філогенетичні дані також підтвердили це припущення (Kranz et al., 1995). Інші ж дані показали, що *Coleochaete* і *Klebsormidium* генетично рівновіддалені від вищих рослин (Lokhorst, 1996). Є роботи, які вказують на найбільшу генетичну близькість Charales, тобто справжніх харофітів, до вищих рослин (Bhattacharya, Medlin, 1998; Karol et al., 2001; Lewis, McCourt, 2004; Becker, Marin, 2009). А нещодавно з'явилася думка, що Zygnematales, як і Coleochaetales, можна розглядати як імовірних предків вищих рослин (Wodniok et al., 2011). Тож ясності з цього питання немає, але біологія стрептофітових водоростей в будь-якому разі є цікавим і важливим етапом у розумінні еволюції вищих рослин та виходу їх на суходіл.

4.5. KLEBSORMIDIALES — ВІДОКРЕМЛЕНА ГРУПА ВОДРОСТЕЙ ЗІ СПІЛЬНИМИ МОРФОЛОГІЧНИМИ, УЛЬТРАТОНКИМИ ТА БІОХІМІЧНИМИ ОЗНАКАМИ

Спільними ознаками, що поєднують усіх представників Klebsormidiales, насамперед є ознаки, характерні також для інших стрептофітових водоростей. Це унікальна будова джгутикових клітин, які представлені зооспорами. Вони голі, асиметричні, позбавлені стигм, мають 2 субапикальні джгутики, формуються по одній у клітині та відрізняються унікальним асиметричним цитоскелетом з базальними тілами, що зв'язані з багат шаровою структурою (MLS) (Mattox, Stewart, 1984; Van den Hoek et al., 1995; Lokhorst et al., 2000). До спільних цитологічних ознак цих представників слід віднести також подібний процес цитокінезу: відкритий мітоз, персистентне телофазне вер-

Розділ 4. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей ...

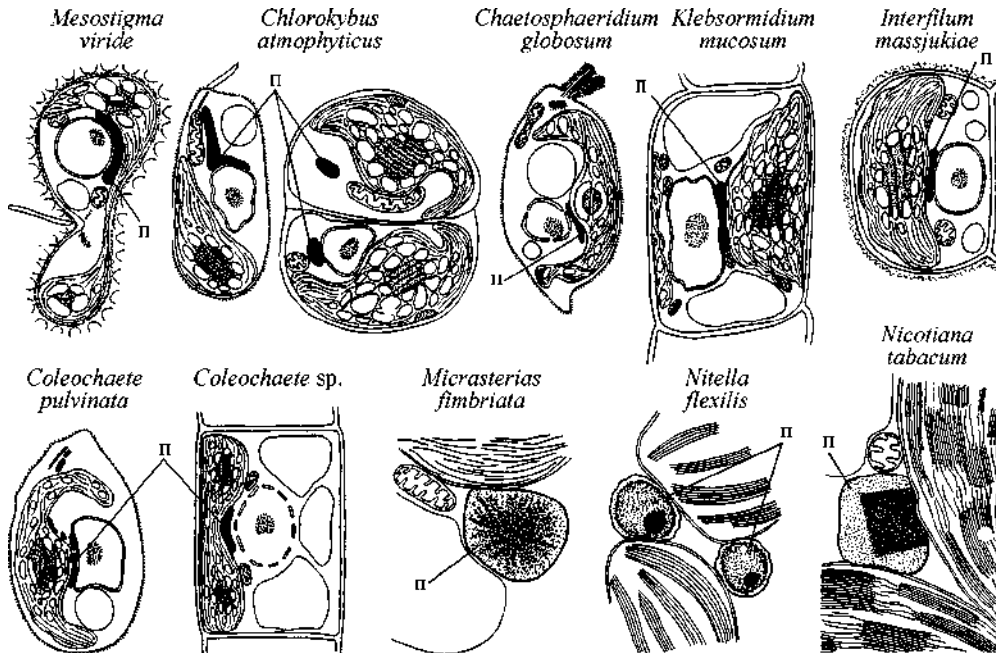


Рис. 4.4. Ультраструктура клітин різноманітних представників стрептофітових водоростей та вищих рослин.

Рисунки виконані на основі ТЕМ мікрофотографій та інтерпретаційних діаграм із наших спостережень (вегетативна клітина *Interfilum* sp.) і різних публікацій: вегетативна клітина *Mesostigma viride* Lauterborn (Melkonian, 1989, figs 2–4, 9, 14), зооспора та вегетативна клітина *Chlorokybus atmophyticus* Geitler (Rogers et al., 1980, figs 7, 8, 13), зооспора *Chaetosphaeridium globosum* (Nordst.) Kleb. (Van den Hoek et al., 1995, fig 19, 15), вегетативна клітина *Klebsormidium mucosum* (Lokhorst, Starr, 1985, fig. 1), зооспора *Coleochaete pulvinata* A. Braun (Sluiman, 1985, figs 4, 5), вегетативна клітина *Coleochaete* sp. (Van den Hoek et al., 1995, fig. 19.23, II), частина вегетативної клітини *Micrasterias fimbriata* Ralfs (Tourte, 1972, fig. 4), частина вегетативної клітини *Nitella flexilis* (L.) C. Agardh (Silverberg, Sawa, 1973, fig. 11); частина клітини мезофіла листка *Nicotiana tabacum* L. (Альбертс і др., 1994, с. 36); П — пероксисома

тено, утворення кільцевої борозни та формування поперечної клітинної перегородки, позбавленої пор (Pickett-Heaps, 1974, 1976; Van den Hoek et al., 1995; Lokhorst, Star, 1998), хоча ці ознаки, як уже зазначалося вище, не є унікальними і властиві також іншим класам зелених водоростей, зокрема нитчастим представникам *Trebouxiophyceae* (Sluiman et al., 2008). Суттєвою відмінною *Klebsormidiales* на ультратонкому рівні від більш просунутих стрептофітових (*Zygnematales*, *Charales*, *Coleochaetales*) є ділення клітин без участі фрагмопласта та формування поперечних клітинних перегородок без пор (Van den Hoek et al., 1995).

Типовою ультратонкою ознакою *Klebsormidiales*, інших стрептофітових, а також представників вищих рослин є великого розміру пероксисоми (мікротіла), що розташовані поблизу ядра, мітохондрій та хлоропластів і формують хлоропластно-мітохондріально-ядерно-пероксисомний структурний комплекс (рис. 4.2, 4–7, див. вклейку; 4.4; 4.9, 5; 4.11) (Костіков та ін., 2001; Массальський, 2002а; Massalski, Kostikov, 2005). Подібні комплекси виявлені у вегетативних клітинах *Klebsormidium* (Stewart et al., 1972; Silver-

4.5. Klebsormidiales — відокремлена група водоростей ...

berg, 1975; Lokhorst, Starr, 1985; Morison, Sheath, 1985; Honda, Hashimoto, 2007), *Interfilum* (Mikhailyuk et al., 2008), *Hormidiella* (Lokhorst et al., 2000), *Mesostigma* Lauterborn (Melkonian, 1989), *Chlorokybus* Geitler (Rogers et al., 1980), *Coleochaete* (Stewart et al., 1972; Sluiman, 1985, Van den Hoek et al., 1995), *Nitella* C. Agardh (Silverberg, Sawa, 1973), *Micrasterias* C. Agardh (Tourte, 1972) і фотосинтезуючих клітинах вищих рослин (Raven et al., 2005; Proctor et al., 2007). Вважають, що таке розташування пероксисом у клітинах є еволюційно прогресивною ознакою і забезпечує швидкі процеси обміну між органелами комплексу в процесі фотодихання (Raven et al., 2005). Цікаво зазначити, що навіть склад ферментів пероксисом стрептофітових водоростей та вищих рослин досить подібний (містять гліколатдегідрогеназу та гліколатоксидазу), тоді як склад ферментів інших зелених водоростей відрізняється від складу ферментів вищих рослин (містять лише гліколатдегідрогеназу) (Gross, 1993). Вказані біохімічні ознаки є також підтвердженням генетичної близькості стрептофітових водоростей та вищих рослин.

Питання щодо кількості та конкретного розташування мітохондрій в клітинах Klebsormidiales остаточно не з'ясовано. Так, значна кількість опублікованих мікрофотографій показує розташування мітохондріальних профілів на поодиноких зрізах, що утруднює інтерпретацію їх об'ємного розміщення. Спроба створення об'ємної моделі вегетативної клітини *Klebsormidium* (Массальський, 2002а,б) на основі опублікованих ТЕМ-мікрофотографій вказує на наявність двох і більше мітохондрій, які розміщуються уздовж внутрішньої поверхні хлоропласта і прилягають до нього. Наші попередні дослідження мітохондрій *Klebsormidium* та *Interfilum* за допомогою приліплення матеріалу під лазерним конфокальним і люмінесцентним мікроскопами вказують на дійсне розташування мітохондрій у безпосередній близькості до хлоропласта. При цьому у клітинах *Interfilum* мітохондрії щільно огортають край хлоропласта, повторюючи його лопаті (рис. 4.2, 5, див. вклейку). У більш видовжених клітинах *Klebsormidium* мітохондрії облямовують ядро і подовжуються далі, щільно прилягаючи до країв хлоропласта (див. рис. 4.2, 4, 6, 7). Цікаво, що виготовлена нами на основі ТЕМ-мікрофотографій реконструкція вегетативної клітини *Interfilum* sp. (див. рис. 4.9, 5) практично повторює ту саму картину розташування мітохондрій. Отже, можна з упевненістю стверджувати, що мітохондрії дійсно є частиною окремого структурного комплексу, що включає також хлоропласт, ядро та пероксисому. Кількість мітохондрій у клітинах цих водоростей визначити складно. Швидше за все є кілька червоподібних мітохондрій, що розміщуються впорядковано — навколо ядра та вздовж лопатей хлоропласта.

Морфологічна будова протопласта представників Klebsormidiales досить подібна, особливо у родів *Klebsormidium* та *Interfilum*. Вони мають пластинчастий пристінний хлоропласт, що, як правило, займає від половини клітини до 70—80 % її об'єму, має гладенький або лопатевий край, в якому лежить поодинокий піреноїд. Тіло піреноїда облямовано одним-кількома (до багатьох) рядами дрібних крохмальних гранул, розташованих паралельно повздовжній осі клітини. Така структура крохмальної обгортки піреноїда забезпечується тим, що його тіло пронизане кількома (до багатьох)

поодинокими, паралельно розташованими тилакоїдами (які іноді утворюють петлі). Подібна структура піреноїда характерна також для *Entransia*, хоча у останньої кілька піреноїдів містяться у хлоропласті, що має глибоко розсічений, з видовженими лопатями, край (Cook, 2004). Цікаво, що крохмальна обгортка *Hormidiella attenuata* має подібну будову, проте забезпечену проходженням паралельних тилакоїдів лише на рівні самої обгортки, де вони завертаються і далі у тіло піреноїда не проходять (Lokhorst et al., 2000).

Подібна структура крохмальної обгортки піреноїда характерна також для інших стрептофітових водоростей — *Chlorokybus* (Rogers et al., 1980), *Coleochaete* (Sluiman, 1985), деяких кон'югуючих водоростей (див. рис. 4.4) та навіть антоцеротових мохів (Cook, 2004). Положення ядра у представників Klebsormidiales також подібне, посередині клітини, напроти піреноїда. У видовжених клітинах ядро лежить у цитоплазматичному містку, розміщеному між двома термінальними вакуолями (більшість видів *Klebsormidium*) або межує з однією великою вакуолею (*Entransia*). Якщо клітини короткі (більшість видів *Interfilum*, *Hormidiella*, деякі *Klebsormidium*), то великі вакуолі не утворюються.

4.6. МОРФОЛОГІЯ KLEBSORMIDIALES: ЄДНІСТЬ ПРОЦЕСІВ ДІЛЕННЯ КЛІТИН І ФОРМУВАННЯ СЛАНІ У РІЗНИХ ПРЕДСТАВНИКІВ

Попри всі перелічені подібні риси будови протопласта клітин Klebsormidiales на ультратонкому та морфологічному рівнях, загальна морфологія цих представників досить різноманітна, що і слугувало причиною для віднесення їх до різних таксономічних груп. Особливо різниться загальна морфологія двох близьких родів — *Interfilum* (кокоїдна слань, двостулкові клітинні оболонки (Chodat, Torali, 1922), утворення сарциноїдних пакетів (Mikhailyuk et al., 2008)) та *Klebsormidium* (типова нитчаста слань, що у деяких видів здатна до дезінтеграції, суцільна клітинна оболонка (Starmach, 1972; Мошкова, 1979; Hindák, 1996; Lokhorst, 1996)). Наші детальні спостереження кількох штамів *Interfilum* дійсно підтвердили неоднорідність оболонки цих водоростей та деякі ознаки, подібні до двостулковості (рис. 4.6, 5, 7, 8; 4.10, 7, 8, див. вклейку; 4.9, 1, 4). Проте за такої будови клітинна оболонка не є справді двостулковою, а лише виглядає як така. Цей вигляд пов'язаний з особливістю ділення клітин водоростей, наведений ще у першоописі *I. paradoxum* Chodat et Torali (Chodat, Torali, 1922). Під час ділення клітини протопласт її розколюється на два дочірні, кожен з яких формує власну клітинну оболонку всередині старої материнської оболонки (рис. 4.5, 1б). Під час росту молодих клітин материнська оболонка розривається, розширюється чи ослизнюється. Такий тип поділу клітин, коли материнська оболонка не бере участі в утворенні оболонок дочірніх клітин, а перетворюється на оболонку спорангія, характерний для споруляції (Sluimann et al., 1989; Масюк, 1993, 1997; Масюк, Демченко, 2001; Massjuk, Demchenko, 2001; Yamamoto et al., 2007), через що *Interfilum* спочатку і був віднесений до хлорококових водоростей.

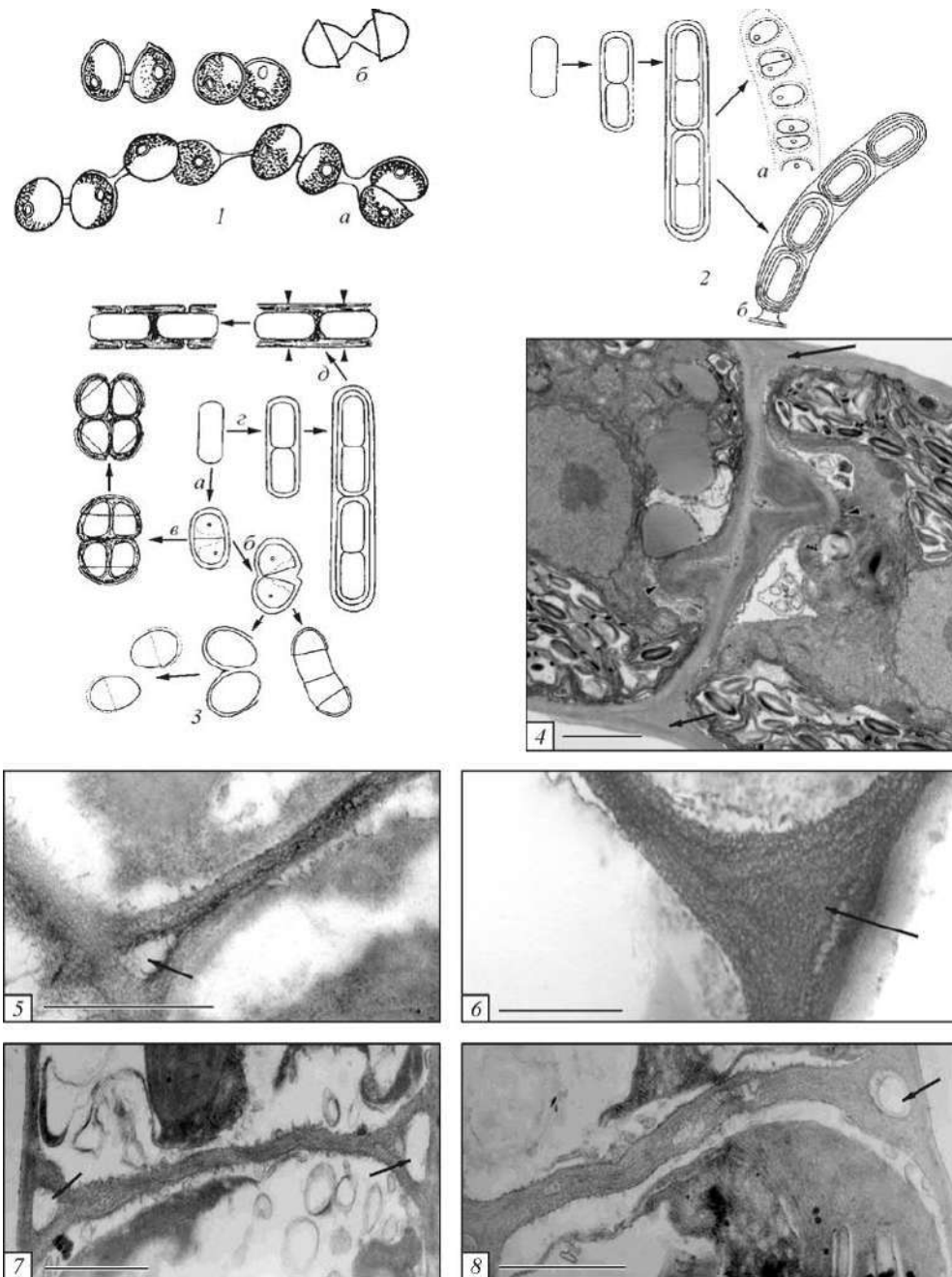


Рис. 4.5. Морфологія клітинного поділу у Klebsormidiales:

1 — ділення клітин у *I. paradoxum* (Chodat, Torali, 1922); а — загальний вигляд клітин і ниток, б — схема поділу клітини; 2 — схема поділу клітин у зелених нитчастих водоростей з псевдонитками: *Geminella* (а) і *Cyllindrocapsa* (б) (Масюк, 1993); 3 — схема поділу клітини у Klebsormidiales, що пропонується нами (Mikhailyuk et al., 2008): а-в — поділ клітин у *Interfilum* (б — утворення поодиноких клітин, в — утворення клітинних пакетів і кубічних агрегатів клітин), г, д — поділ клітин у *Klebsormidium* (д — утворення Н-фрагментів оболонки, головки стрілок вказують місця розриву материнської оболонки); 4–8 — TEM-мікрофотографії поперечних перегородок у нитках *Entansia* (4) (Cook, 2004) і *Klebsormidium* (5–8), що підтверджують такий поділ (5 — 31TR, 6 — 34TR, 7, 8 — SAG 5.96). Стрілки вказують на трикутні проміжки між оболонками клітин. Лінійка — 2 мкм

 Розділ 4. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей ...

Дослідження процесу ділення клітин водоростей різної морфологічної структури, однак, показало, що подібна схема поділу характерна не лише для водоростей з кокоїдним типом слані, а й для деяких нитчастих (Ettl, 1988a, b; Масюк, 1993). Ключові відміни полягають у такому: материнська оболонка не скидається (як під час споруляції), певним чином трансформується і продовжує слугувати опорою для дочірніх клітин; протопласт ділиться не в різних площинах (як у кокоїдних водоростей), переважно, в одній, утворюючи ланцюжок клітин; результатом поділу є не репродуктивні клітини (спори чи гамети), а молоді вегетативні клітини (Масюк, 1993).

За цією схемою утворюються нитки у зелених водоростей родів *Geminella*, *Cylindrocapsa* Reinsch, *Binuclearia* Wittg. та ін. (рис. 4.5, 2). Нитка такої будови суттєво відрізняється від нитки, утвореної в результаті класичного вегетативного ділення (процес ділення протопласта лише за рахунок утворення поперечної перегородки, материнська оболонка при цьому розтягується та є частиною оболонок дочірніх клітин (Sluimann et al., 1989; Масюк, 1993)), зветься «гаплоневою» (Масюк, 1993) і по суті є не нитчастою сланню багатоклітинної водорості, а ниткоподібною колонією одноклітинних організмів (Sluimann et al., 1989). «Поведінка» материнської оболонки за такого поділу може бути різною, від цього і залежить загальний вигляд слані. Так, у *Geminella* материнські оболонки ослизнюються, формуючи слизисту піхву, в якій лежать дочірні клітини, а у *Cylindrocapsa* зберігаються, розширюються, їх наступні генерації формують систему товстих шаруватих оболонок навколо клітин та чіткі Н-подібні фрагменти оболонок (рис. 4.5, 2).

Interfilum має описаний вище тип клітинного ділення, результатом якого є формування ниткоподібною слані. Материнська оболонка розривається, але часто не відділяється від дочірньої клітини, формуючи на ній шапінку, через що і складається враження двостулкової оболонки. «Поведінка» материнської оболонки в межах роду *Interfilum* може бути різною. Так, у *I. paradoxum* вона розривається, частково ослизнюється та відділяється від дочірніх клітин, формуючи так звані ниточки між клітинами, що розходяться, утворюючи ланцюжок (звідси назва роду: «inter» з лат. — «між», «filum» — «нитка»). У *I. terricola* (B. Petersen) Mikhailyuk, Sluiman, A. Massalski, Mudimu, Demchenko, T. Friedl et S.Y. Kondr. (= *Geminella terricola*) материнська оболонка ослизнюється, утворюючи слизисту піхву навколо клітин, що формують короткі нитки чи діади. Клітини *Interfilum*, крім того, здатні ділитися в кількох площинах, у деяких видів (*I. massjukiae*) ця ознака генетично закріплена. Якщо такий поділ супроводжується частковим зберіганням материнських оболонок навколо клітин, то утворюються сарциноїдні пакети, кубічні агрегати клітин, а також розгалужена плеврококоїдна слань (рис. 4.5, 3a, в).

Що ж пов'язує *Interfilum*, клітини якого формують несправжню нитку, з *Klebsormidium*, у якого вони діляться класичним вегетативним діленням? Наші спостереження за значною кількістю штамів *Klebsormidium*, а також дані літератури вказують на деякі ознаки, що дає змогу стверджувати наявність клітинного ділення за типом *Interfilum* у межах роду *Klebsormidium*. Так, наші електронно-мікроскопічні фотографії деяких штамів чітко показують

4.6. Морфологія Klebsormidiales: єдність процесів ділення клітин і формування слані ...

наявність трикутних проміжків між оболонками вегетативних клітин (рис. 4.5, 5—8, стрілка). Це наводить на думку про те, що кожна клітина має власну оболонку, але облямовує їх додатково якась спільна оболонка, що можливо походить від багатьох генерацій материнських оболонок, подібно, наприклад, до *Cylindrocapsa*. У товстостінчастих видів *Klebsormidium* (наприклад, *K. crenulatum* (Kütz.) Lokhorst) такі трикутні проміжки помітні навіть на світлооптичному рівні (рис. 4.12, 2, див. вклейку). Доказом також слугують Н-подібні фрагменти оболонок, що часто спостерігаються у культурах *Klebsormidium* (Lokhorst, 1996 та посилання в ній). Їх наявність якраз свідчить про дисконтинуальність оболонки цих водоростей, що неможливо за вегетативного ділення, за якого утворюється суцільна оболонка всієї нитки.

Таким чином, на наш погляд, нитка *Klebsormidium* являє собою утворення типу гаплонеми, тобто ланцюжок клітин, облямований багатьма генераціями щільно стиснутих материнських оболонок. До речі, на електронно-мікроскопічному рівні оболонка деяких видів *Klebsormidium* виглядає дуже шаруватою (Lokhorst, 1996, figs 251—253), що може свідчити на користь цього припущення. Цікаво зазначити, що подібна шаруватість оболонок також нами виявлена у *I. massjukiae*, у якого материнська оболонка не ослизнюється, а зберігається, утримуючи пакети клітин (див. рис. 4.11, 3). У зв'язку з цим ми пропонуємо схему формування нитки у *Klebsormidium*, зображену на рис. 4.5, 3 г, д. Згідно з цією схемою, формування Н-фрагментів оболонок також виглядає цілком закономірним: дві суміжні клітини ростуть, тиснучи на поперечну стінку між ними, що дуже її ущільнює (на електронних фотографіях поперечних клітинних перегородок *K. mucosum* (J.B. Petersen) Lokhorst видно дуже ущільнений шаруватий тяж (Lokhorst, 1996, figs 251—253)), натомість розтягують повздовжні стінки, що приводить до їх потоншення і розриву. Так утворюється Н-подібний фрагмент оболонок і відбувається типова дезінтеграція ниток *Klebsormidium* до коротких ниточок чи поодиноких клітин, які мають власні оболонки, тому продовжують своє існування.

Отже, шапінкоподібний залишок материнської оболонки *Interfilum* є гомологічним Н-подібному фрагменту оболонок *Klebsormidium*. Останній являє собою два шапінкоподібні залишки материнської оболонки сусідніх клітин, зв'язані між собою за переважного поділу клітин *Klebsormidium* в одній площині та формування ланцюжка клітин. Іноді Н-подібні фрагменти оболонок можна спостерігати в культурах *Interfilum* (рис. 4.6, 10, див. вклейку), тоді як деякі штами *Klebsormidium* з легкою дезінтеграцією клітин формують шапінкоподібні фрагменти (рис. 4.2, 11, див. вклейку).

На користь наведеної вище схеми поділу клітин у межах *Klebsormidium/Interfilum* свідчить також нещодавне дослідження японських учених стосовно механізмів клітинного поділу у водоростей, нитки яких легко дезінтегрують до коротких фрагментів — *Nannochloris* Naumann і *Marvania* Hindák (Yamamoto et al., 2007). За допомогою електронно-мікроскопічних і цитохімічних методів показано, що в основі поділу клітин цих водоростей лежить тип, близький до споруючої, тобто побудова власної оболонки кожним дочірнім протопластом. При цьому під час поділу клітин у *Nannochloris* материнська оболонка ослизнюється, а за брунькування у *Marvania* частко-

 Р о з д і л 4. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей ...

во розривається та зберігається, створюючи багат шарові оболонки навколо клітин. Зроблено висновок, що саме такий механізм поділу сприяє легкому відділенню клітин від нитки та утворенню одноклітинного стану. Висловлено припущення, що таким самим способом відбувається поділ у інших водоростей з легко дезінтегруючими нитками, наприклад у *Stichococcus* (Yamamoto et al., 2007).

Водночас можливо відшукати і контраргументи стосовно зазначеного припущення. Так, у класичній літературі вказується на факт формування Н-фрагментів оболонок у *Klebsormidium* та описаного вище способу поділу клітин. Проте ці факти пояснюються існуванням іншого типу розмноження у *Klebsormidium* — апланоспороутворення (Мошкова, 1979; Morison, Sheath, 1985; Lokhorst, 1996). При цьому наголошено і на існуванні класичного вегетативного ділення клітин у цих водоростей. Так, зокрема, зауважується, що Н-фрагменти оболонок часто трапляються у видів *Klebsormidium* з товстими грубими оболонками (*K. mucosum*, *K. crenulatum*, *K. bilatum* Lokhorst), тоді як у видів з тонкими ніжними оболонками їх немає (*K. flaccidum* (Kütz.) Silva, Mattox et Blackwell, *K. nitens* (Menegh.) Lokhorst). Це нібито свідчить на користь того, що різні види *Klebsormidium* переважно розмножуються одним з цих способів — апланоспороутворенням чи вегетативним діленням (Lokhorst, 1996). На наш погляд, подібну диференціацію в межах *Klebsormidium* можна пояснити інакше: у частини видів материнська оболонка переважно зберігається навколо дочірніх клітин, формуючи товсту шарувату спільну оболонку, наслідком розриву якої є Н-подібні фрагменти. У інших видів материнські оболонки здебільшого ослизнюються, тому, як результат, спільна оболонка тонка, ослизнена і помітних Н-фрагментів не формує. Доказом цього є наявність слизу навколо легко дезінтегруючих ниток штамів *Klebsormidium*, близьких до *K. nitens* і *K. flaccidum*, що спостерігалось нами (рис. 4.2, 8—10, див. вклейку) та відомо з літератури (Lokhorst, 1996). Цікаво, що зміна умов існування може змінювати і цю ситуацію. Так, у *K. flaccidum* відсутні Н-фрагменти оболонок, якщо водорість росте на рідкому поживному середовищі (Lokhorst, 1996). Проте вони утворюються, якщо культура зростає на агаризованому середовищі (рис. 4.13, 11, 13, див. вклейку). Згадане середовище імітує жорсткіші наземні умови, оболонки водоростей при цьому потовщуються, що і сприяє утворенню Н-фрагментів.

Загалом, на наш погляд, доказом того, що нитка *Klebsormidium* імовірно є колонією одноклітинних водоростей, ніж багатоклітинним організмом, слугує не лише факт її легкої дезінтеграції, а й відсутність пор у поперечних перегородках (Lokhorst, Starr, 1985; Van den Hoek et al., 1995), тобто відсутність зв'язку між окремими клітинами. Разом з тим, хоча наші спостереження виявили лише такі тенденції ділення клітин і формування нитки, не можна повністю заперечувати і ймовірність наявності вегетативного ділення у межах роду *Klebsormidium*.

Іншими, спільними у *Klebsormidium* та *Interfilum* ознаками, пов'язаними з клітинними оболонками, є наявність слизу волокнистої структури. Ця ознака характерна для більшості видів *Interfilum* і деяких видів *Klebsormidium* (рис. 4.2, 8—10; 4.6, 7, 8; 4.10, 7, 8, див. вклейку; 4.11, 5, 6). Спільною ознакою є також здатність клітин до ділення у кількох площинах і до утво-

4.7. Рід *Hormidiella*: морфологічні та екологічні особливості, різноманіття

рення пакетів клітин та гілок. Ця ознака розвинена у *Interfilum* (див. рис. 4.6, 9; 4.9, 2, 3; 4.10, 1–4, 10–12), а для *Klebsormidium* хоча і є нетиповою, проте і в літературі (Lokhorst, 1996), і за нашими спостереженнями (рис. 4.15, 5–7, 9, див. вклейку), проявляється у деяких представників. Цікаво зазначити, що в літературі цей феномен у межах *Klebsormidium* також пов'язували з проростанням апланоспор, що залишилися у апланоспорангії, у нову нитку (Lokhorst, 1996).

Перелічені ознаки, зумовлені структурою оболонки та діленням клітин, можуть спостерігатися також у *Entransia* та *Hormidiella*. Так, ці представники здатні до дезінтеграції ниток і формування Н-фрагментів оболонок (Cook, 2004; наші спостереження (рис. 4.2, 14, див. вклейку)). На електронно-мікроскопічних фотографіях *E. fimbriata* E.O. Hughes чітко видно трикутні проміжки між оболонками вегетативних клітин: це свідчить на користь того, що навколо протопласта кожної дочірньої клітини формується власна оболонка (Cook, 2004; figs 6, b, c; 7, g, h; див. рис. 4.5, 4). Поперечні перегородки в нитках *Entransia* та *Hormidiella* також позбавлені пор, отже, на наш погляд, всі представники порядку Klebsormidiales мають подібну схему поділу клітин, яка у кожного окремого роду розрізняється деталями, що і спричиняє різний морфологічний вигляд цих представників.

4.7. РІД *HORMIDIELLA*: МОРФОЛОГІЧНІ ТА ЕКОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ, РІЗНОМАНІТТЯ

Hormidiella (рис. 4.2, 12–14, див. вклейку) — типово ґрунтова водорість, що мешкає виключно в тропічних регіонах. Характеризується простими однорядними нитками, що прикріплюються до субстрату за допомогою добре вираженої стопи. Верхівкова клітина подібна до інших клітин слані або відрізняється від них. Морфологічна будова вегетативних клітин у цілому подібна до такої *Klebsormidium*, хоча є деякі особливості: клітини, як правило, глибоко перетягнуті біля поперечних перегородок, у дорослих нитках — короткі, джжкоподібні, хлоропласт пояскоподібний, виповнює весь клітинний об'єм, великі вакуолі в клітинах відсутні. Розмноження відбувається фрагментацією ниток, апланоспорами та дорзівентральними зооспорами із субапикальними джгутіками. Останні формуються в клітинах (крім базальної та у деяких видів — верхівкової) по одній, позбавлені стигм, виходять через отвір у зооспорангії; після зупинки зооспори формують підошву з боку розташування джгутіків (Мошкова, 1979; Ettl, Gärtner, 1995; Hindák, 1996; Lokhorst et al., 2000). У одного з видів — *H. bharatiansis* Subrahmanyam, виявлений статевий процес типу гетерогамії (Subrahmanyam, 1976).

Ультратонкі ознаки роду вивчені на прикладі *H. attenuata*. Вони в цілому узгоджуються з такими для інших стрептофітових водоростей: наявні великі пероксисоми, що межують з мітохондріями³ та ядром; джгутиковий

³ У статті Г.М. Локхорста та співавт. (Lokhorst et al., 2000) як у тексті, так і в підписах до рисунків (figs 20, 21, 23) указано на контакт пероксисоми з диктіосомами, хоча, на наш погляд, останні структури слід було визначити як мітохондрії, про що свідчать чіткі пластинчасті кристи, які виповнюють ці структури (figs 13, 15).

 Р о з д і л 4. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей ...

апарат характерної ультратонкої будови — базальні тіла зв'язані багатощаровою структурою (MLS); два джгутикові корінці, один з них містить велику кількість мікротрубочок, тобто цитоскелет асиметричної будови, ділення клітин відбувається кільцевою борозною (Lokhorst et al., 2000). Крохмальна обгортка піреноїда складається з кількох крохмальних гранул, розміщених в один шар, компактно, при цьому її ультратонка будова відрізняється від такої більшості стрептофітових водоростей — поодинокі тилакоїди, пронизуючи обгортку піреноїда, завертаються, тому його матрикс залишається гомогенним.

Вважають, що Н-фрагменти оболонки відсутні у представників цього роду (Мошкова, 1979; Hindák, 1996; Lokhorst et al., 2000), проте наші спостереження над автентичним штамом *H. attenuata* показали, що іноді Н-фрагменти трапляються (рис. 4.2, 14, див. вклейку). Очевидно походження цих утворів і характер ділення клітин цих представників такий самий, як у *Klebsormidium* та *Interfilum* (див. розд. 4.6), на користь цього свідчить твердження про те, що клітини *H. attenuata* згруповані по 2—4 (Lokhorst et al., 2000). У цитованій публікації з описом цього виду вказано, що його вирощували на рідкому живильному середовищі, а наші спостереження проведені на твердому середовищі. Це спричинило потовщення та огрубіння клітинних оболонок водорості, що сприяло утворенню Н-фрагментів оболонки.

Всього даний рід налічує 3 види — *H. parvula* М.О.Р. Iyengar et Khantamma (тип роду), *H. bharatiansis* і *H. attenuata*, які відрізняються шириною нитки, кількістю піреноїдів, будовою кінцевих клітин. *H. bharatiansis* — найсвоєрідніший як за будовою, так і за наявністю статевого процесу, тому існує думка, що цей вид не є представником ні роду *Hormidiella*, ні порядку *Klebsormidiales* (Lokhorst et al., 2000). Особливо своєрідна ознака виду — наявність нерівних джгутиків у зооспор і гамет, що ймовірно свідчить про приналежність цього представника до іншої групи водоростей (Subrahmanyan, 1976). Молекулярно-філогенетичні та детальні цитологічні дослідження проведені лише з *H. attenuata*, вони чітко підтвердили її положення в межах *Klebsormidiales*. Автентичних штамів двох інших видів, у тому числі типового, не існує, що унеможлиблює остаточний висновок про об'єм цього роду на сьогодні.

Детальні дослідження штаму SAG 36.98, виділеного з ґрунтів Коста-Рика (див. розд. 4.4), очевидно додасть нового представника, близького до цього роду. Цікаво зазначити, що всі вище згадані види роду *Hormidiella* і новий таксон є мешканцями тропічних регіонів, отже ймовірно географічне поширення цих представників пов'язане з теплим кліматом. До речі, морфологічні ознаки вегетативних клітин *Hormidiella* (клітини короткі, неначе стиснуті, нитки перетягнуті біля поперечних перегородок) є ознаками ксерофітності (див. розд. 4.11, 4.12).

4.8. РІД *ENTRANSIA*: МОРФОЛОГІЧНІ ТА ЕКОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ, РІЗНОМАНІТТЯ

Entransia (рис. 4.6, 1–4, див. вклейку) — рідкісна прісноводна водорість, поки відома лише з Північної та Центральної Америки. Характеризується простими однорядними нитками, циліндричними клітинами, кожна з яких має пристінний хлоропласт. Раніше її вважали представником *Zygnematales* через хлоропласт своєї будови (глибоко розсічений на довгі пальцеподібні лопаті) та зростання серед жабуринь інших прісноводних нитчастих водоростей. У хлоропластах *Entransia* міститься завжди кілька піреноїдів, крохмальна обгортка яких складається з багатьох гранул, що є типовим для всіх *Klebsormidiales* (Cook, 2004). Ядро *Entransia* міститься під хлоропластом, на цитоплазматичних тяжках, посередині великої вакуолі. Розмноження відбувається фрагментацією ниток, апланоспорами та зооспорами. Зооспори подібної до *Klebsormidium* будови формуються по одній у клітині, виходять через пору в оболонці спорангія. Зооспори проростають у молоді нитки, які прикріплюються до субстрату за допомогою липкої субстанції, за своїми обрисами чіткішою, ніж подібна структура у *Klebsormidium*, верхівкова клітина молоді нитки, як правило, має шип (Cook, 2004).

Ультратонкі ознаки роду, в цілому, подібні до таких інших *Klebsormidiales*. Зокрема ультратонка будова піреноїда цих водоростей подібна до будови піреноїда *Klebsormidium*, відоме також часте формування Н-подібних фрагментів оболонок у *Entransia* (Cook, 2004). Цікавою особливістю є формування серед нитки клітин, значно коротших, ніж типові. Ці клітини швидко відмирають, перетворюючись на свого роду некриди. По цих мертвих клітинах відбувається фрагментація нитки, що вважається пристосуванням водоростей до швидкого розмноження (Cook, 2004). Цікавим спостереженням також слід вважати утворення великих отворів у поперечних клітинних стінках деяких клітин. Ці отвори сполучають дві сусідні клітини між собою, як помічено, через них можуть мігрувати ядра із однієї клітини в іншу (Cook, 2004). Це унікальне явище потребує спеціальних досліджень, особливо процесу ділення клітин у *Entransia*. Водночас характер будови оболонки цієї водорості та наявність Н-фрагментів оболонок вказує на те, що, ймовірно, ділення клітин *Entransia* відбувається за тим самим механізмом, що у *Interfilum* та *Klebsormidium*.

Рід представлений всього 2 видами — *E. fimbriata* (тип роду) та *E. dichloroplastes* Prescott (Guiry, Guiry, 2012). Обидва види — рідкісні водорості. *E. fimbriata* була знайдена кілька разів після її опису; отримання культур цього виду дало змогу вивчити детально її морфологічні та ультратонкі ознаки (Cook, 2004). Разом з тим інший вид — *E. dichloroplastes* — не був знайдений після опису (Prescott, 1966), його приналежність до згаданого роду потребує підтвердження. Молекулярно-філогенетичні дослідження, проведені з культурою *E. fimbriata*, показали самостійність роду та його приналежність до *Klebsormidiales* (Karol et al., 2001; Turmel et al., 2002). *Entransia* можна вважати найсвоєріднішим представником *Klebsormidiales* як за морфологічною, так і екологічною характеристикою.

4.9. ФІЛОГЕНІЯ ДВОХ БЛИЗЬКИХ РОДІВ — *INTERFILUM* І *KLEBSORMIDIUM*: ПРОБЛЕМИ РОЗДІЛЕННЯ, МОРФОЛОГІЧНІ ОЗНАКИ, ЩО МАЮТЬ ФІЛОГЕНЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ, ЕВОЛЮЦІЙНІ ТЕНДЕНЦІЇ В МЕЖАХ ГРУПИ

Філогенетичний аналіз нуклеотидної послідовності ділянки ITS рДНК (рис. 4.7), аналіз за геном *rbcL* (не наведений), а також об'єднаний аналіз за обома цими частинами ДНК (рис. 4.8) показали результати, що добре узгоджуються між собою та виявляють близьку топологію (Rindi et al., 2011). Основною різницею між ними є досить висока роздільна здатність у межах роду *Interfilum* під час аналізу за ITS і значно нижча за *rbcL*, тоді як у межах роду *Klebsormidium* ситуація протилежна — висока роздільна здатність за *rbcL* і значно нижча — за ITS, що особливо проявляється в межах клади E (рис. 4.7, 4.8). Об'єднане молекулярне дерево за ITS рДНК та *rbcL* показало переважно топологію в межах клади E, характерну для дерева за *rbcL*, і при цьому зберегло основну топологію за ITS, що стосується клади A (*Interfilum*) (рис. 4.7, 4.8).

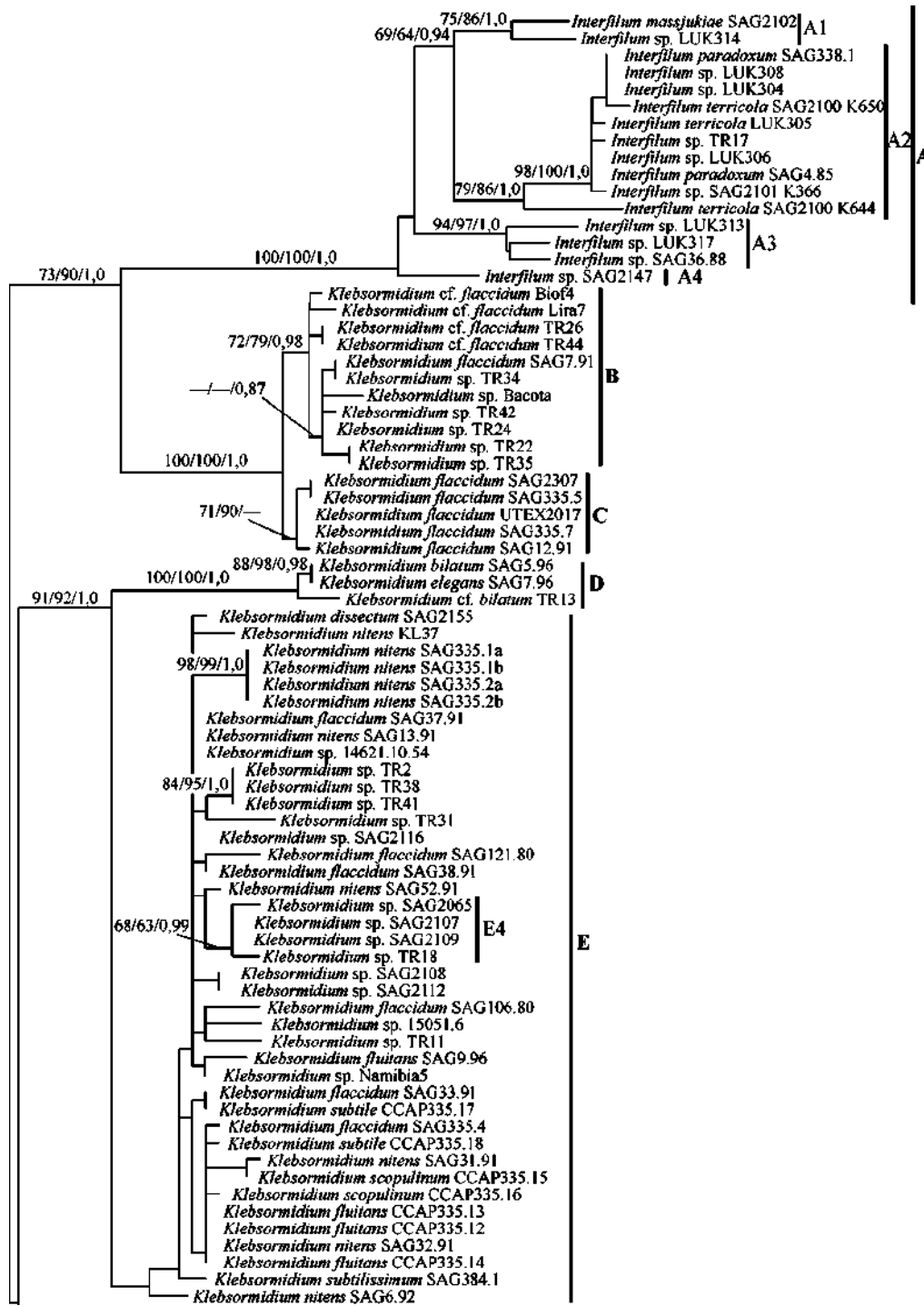
Як видно з наведених молекулярних дерев, включення *Interfilum* показало, що рід *Klebsormidium* є парафілетичним (Mikhailyuk et al., 2008; Rindi et al., 2011). Тому закономірно постає питання про необхідність номенклатурних змін стосовно цих 2 родів. Інакше кажучи, враховуючи те, що *Interfilum* — це окремий рід, імовірно слід розділяти *Klebsormidium* на кілька родів і описувати кожен виділену кладу як окремий рід. Однак з огляду на морфолого-генетичну близькість усіх досліджених штамів, можливо, слід об'єднати *Interfilum* і *Klebsormidium* в один рід (Rindi et al., 2011)⁴.

Існує також третя думка стосовно викладеного. Якщо взяти до уваги, що одна з груп парафілетичного таксона є предковою формою, яка дала початок другому таксону (що і спричиняє цю парафілію), і реально існує у природі окремо, у такому разі парафілетичний таксон слід вважати цілком природним (Zander, 2008, 2010; Hörandl, Stuessy, 2010). Отже, слід припустити, що група видів, споріднена з *Klebsormidium flaccidum* (клади B і C), очевидно, і є предковою щодо *Interfilum* (рис. 4.7, 4.8). При цьому *Interfilum* слід вважати більш спеціалізованим до наземних умов родом, у межах якого закріплюється здатність до формування сарциноїдної та плеврокоїдної слані. Такий тип слані поширений серед багатьох неспоріднених груп наземних водоростей і пов'язаний із пристосуванням їх до посушливих умов наземного середовища (Nienow, 1996).

Цікаво, що *Interfilum*-подібна морфологія (поодинокі клітини та пари клітин еліпсоїдної або яйцеподібної форми, з хлоропластом, розсіченим на 5—8 лопатей) трапляється у кількох незалежних групах *Klebsormidium*: як у ймовірно предковій до *Interfilum* кладі B (рис. 4.13, 8, див. вклейку), так само незалежно виникає у кладі E — підкладі E4 (рис. 4.15, 1, 2, 4, див. вклейку). Слід зазначити, що ці групи об'єднують види, схильні до дезінтеграції слані.

⁴ Цікаво, що в разі об'єднання цих 2 родів буде збережено назву «*Interfilum*» як ранішу (Chodat, Topali, 1922; Silva et al., 1972).

4.9. Філогенія двох близьких родів — *Interfilum* і *Klebsormidium* ...



Розділ 4. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей ...

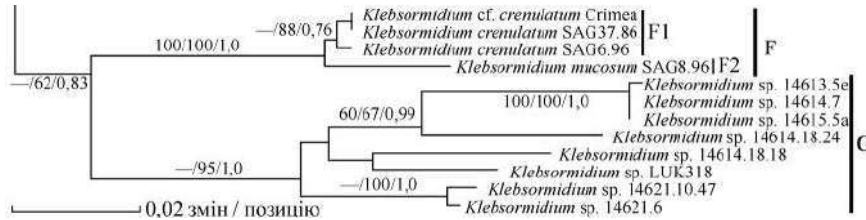


Рис. 4.7. Філогенетичний аналіз за ділянкою ITS 1, 2 рДНК (аналіз максимальної правдоподібності (Maximum-likelihood)) штамів *Interfilum* і *Klebsormidium* (Rindi et al., 2011). Цифри біля гілок — значення підтримки (>60 %, або 0,8) за дистанції «найближчого сусіда» (neighbor-joining distance), аналізу максимальної економії (maximum parsimony) та байєсівської ймовірності (Bayesian Posterior Probabilities). A—G — окремі кластери

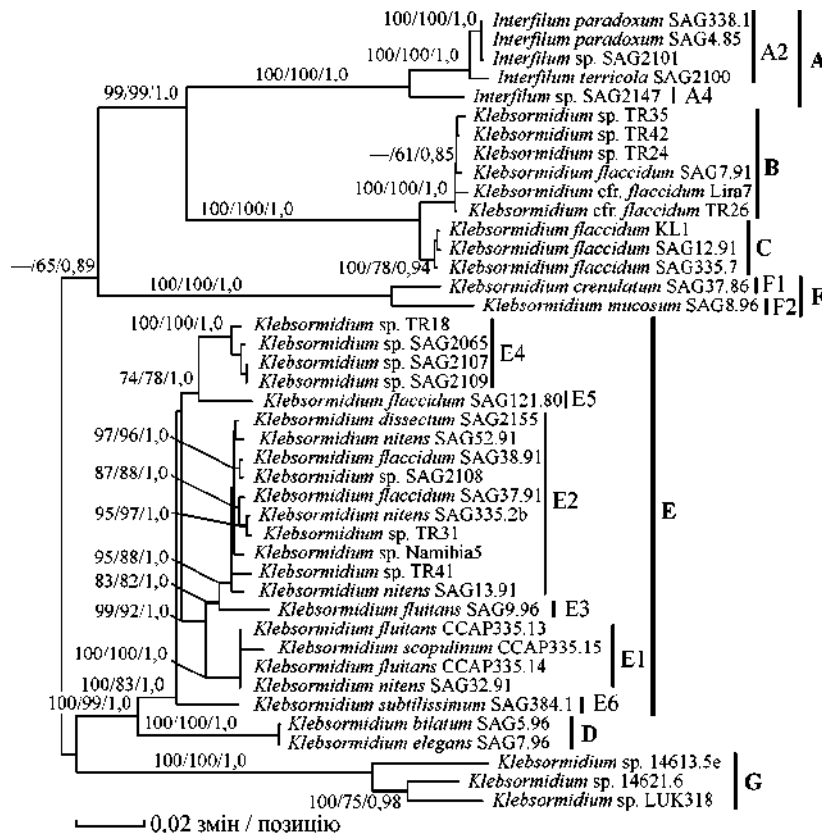


Рис. 4.8. Філогенетичний аналіз (аналіз максимальної правдоподібності (Maximum-likelihood)) штамів *Interfilum* та *Klebsormidium* за ділянками ITS 1, 2 рДНК і геном *rbcL* (Rindi et al., 2011).

Умовні позначення див. на рис. 4.7

4.9. Філогенія двох близьких родів — *Interfilum* і *Klebsormidium* ...

Крім того, такий стан у першому випадку є нетиповим і трапляється зрідка за сильного старіння культури, у другому випадку — цілком закономірний і характерний для дорослих культур водоростей. Проте у молодому віці згадані представники *Klebsormidium* мають морфологію, типову для цього роду (рис. 4.15, 3, див. вклейку).

Питання про те, які морфологічні ознаки вказаних родів уважати за ті, що мають філогенетичне значення, є непростим. Традиційно використовують такі морфологічні ознаки: ширину та довжину нитки, форму клітини, текстуру клітинної оболонки, наявність/відсутність слизової обгортки, наявність/відсутність дворядних фрагментів нитки та несправжнього гілкування, тенденцію до фрагментації нитки, формування Н-фрагментів оболонки, будову хлоропласта та піреноїда (Starmach, 1972; Мошкова, 1979; Ettl, Gärtner, 1995; Hindák, 1996; Lokhorst, 1996; Novis, 2006). Деякі автори додали більше морфологічних ознак, переважно тих, які спостерігаються під час росту водоростей у культурі: формування поверхневого водовідштовхувального шару ниток на рідкому середовищі, тип розмноження, що переважає (зооспори чи апланоспори), форма пори в спорангіальній стінці, через яку звільняються зооспори, тип проростання зооспор та ін. Утім цими самими авторами доведено високу пластичність більшості з перелічених ознак і неможливість використання у таксономії (Lokhorst, 1996; Škaloud, 2006; Rindi et al., 2008).

Застосування молекулярно-філогенетичних методів до вивчення *Klebsormidium* та *Interfilum* дало змогу встановити, що філогенетичне значення має лише кілька ознак, переважно пов'язаних зі здатністю до утворення сарциноїдної слані, будовою хлоропласта та еколого-географічними особливостями видів. Детально ця інформація наведена у табл. 4.2. Водночас філогенетичне значення деяких із запропонованих ознак можна піддати критиці. Так, зокрема, лопатевий край хлоропласта характерний для представників кількох клад, залежно від віку культури та умов культивування — В, D, E3, E4. Ознаки, пов'язані з географічним поширенням та екологією видів, недостатньо досліджені на цей час, і ситуація з ними може змінитися у разі вивчення більшої кількості зразків із ще не досліджених регіонів й біотопів.

У цілому, основною проблемою розділення таксонів у межах 2 родів є надзвичайно високий ступінь морфологічного паралелізму. В межах кожної молекулярної клади відбувається незалежне видоутворення, за якого повторюються близькі морфотипи водоростей. При цьому є клади, що мають однотипну морфологію, зокрема F, G, D, тоді як у кладах В, С, Е наявні кілька морфологічно подібних ліній (рис. 4.13—4.15, див. вклейку). Особливо проблемною є клада Е, в якій генетична відстань між окремими підкладами низька, проте наявне певне морфологічне різноманіття. Очевидно, еволюційні процеси в межах цієї клади досить активні на цей час і, можливо, нині ми спостерігаємо етапи видоутворення (Rindi et al., 2011). Генетична ж відстань між окремими підкладами низька також унаслідок того, що в межах *Klebsormidium* та *Interfilum* достовірно не виявлений статевий процес, який значно збільшує генетичне різноманіття популяції через рекомбінацію генів.

Розділ 4. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей ...

Таблиця 4.2. Морфологічні ознаки *Klebsormidium* та *Interfilum*, асоційовані з молекулярно-філогенетичними кладами та підкладами (Rindi et al., 2011)

Ознака	Молекулярна клада/підклада	Вид водорості
Клітини поодинокі або формують малоклітинні ниточки, з тенденцією до утворення більш-менш складних клітинних комплексів	A	Усі види роду <i>Interfilum</i>
Поштрихована слизиста обгортка, шапінко- або ниткоподібні залишки материнських клітинних оболонок	A	<i>Interfilum</i> spp. (з деякими виключеннями)
Пакетоподібні клітинні агрегати та дворядні розгалужені нитки, які іноді дезінтегрують	A1	<i>Interfilum massjukiae</i>
Міцні, пакетоподібні клітинні агрегати, що, як правило, не дезінтегрують	A4	<i>Interfilum</i> sp.
Нитки товсті (від 10 до 20–23 мкм), з товстою бородавчастою клітинною оболонкою	F	<i>Klebsormidium crenulatum</i> , <i>Klebsormidium mucosum</i>
Хлоропласт розсічений на 5–8 (іноді більше) чітких лопатей	A	Усі види роду <i>Interfilum</i>
Хлоропласт з кренульованим або неправильно розсіченим краєм	B	<i>Klebsormidium</i> sp.
Хлоропласт із серединною розсічкою, розділений на чотири або кілька лопатей	D	<i>Klebsormidium bilatum</i> , <i>Klebsormidium elegans</i>
Хлоропласт напівкільцеподібний (<i>Ulothrix</i> -подібний), вистилає більшу частину клітинної периферії	F	<i>Klebsormidium crenulatum</i> , <i>Klebsormidium mucosum</i>
Хлоропласт чотирилопатевої	G	<i>Klebsormidium</i> sp.
Піреноїд маленький, облямований кількома крохмальними гранулами	G	<i>Klebsormidium</i> sp.
Поширені переважно у прісноводних місцезростаннях, включно з тими, що мають кислу реакцію води	E1	<i>Klebsormidium acidophilum</i>
Поширені переважно в біологічних кірках жарких пустельних регіонів	G	<i>Klebsormidium</i> sp.
Поширені переважно в місцезростаннях Східної Європи	B	<i>Klebsormidium</i> sp.
Поширені переважно в місцезростаннях Західної Європи	C	<i>Klebsormidium flaccidum</i>

Уже після написання цього розділу автори отримали додаткову інформацію стосовно філогенії в межах групи *Klebsormidium/Interfilum*. Тестування наявної філогенетичної інформації з використанням молекулярних сигнатур (баркоду — найконсервативнішої ділянки ITS2 рДНК) за методикою, запропонованою у кількох роботах (Coleman, 2009; Moniz, Kaczmarzka, 2009; Vock et al., 2011), показало, що варіабельною є ділянка ITS1, яка і спричиняє наведений вище розподіл за кладами (див. рис. 4.7, 4.8), тоді як мінливість консервативної ділянки ITS2 є на диво низькою (Т. Pröschold, персон. повідомл.). Згідно із застосованою методикою баркодування, отримана топологія філогенетичних дерев (рис. 4.7, 4.8) відображає швидше за все відмінності на популяційному рівні, ніж на видовому. Що ж стосується видового рівня, то, відповідно до отриманих попередніх даних, *Interfilum* та *Klebsormidium* напевно є представниками одного роду, а кількість видів у цій групі значно нижча, ніж вважали раніше і ніж указують наведені молекулярні дерева (рис. 4.7, 4.8), особливо серед представників з по-

4.10. Рід *Interfilum*: морфологічні та екологічні особливості, різноманіття, філогенетичні зв'язки

ширенням у межах Європи (Т. Pröschold, персон. повідомл.). Цікаво, що генетично різноманітнішими виявилися представники з ґрунтових кірок Південної Африки (клада G, рис. 4.7, 4.8). Це може свідчити на користь того, що зазначені водорості, можливо, походять із зон з жарким кліматом, де їх видове різноманіття вище за таке помірних зон, куди ці водорості потрапили не так давно. Тому можна припустити, що низьке генетичне та вище морфологічне різноманіття представників із помірних зон пояснюється активними еволюційними процесами в межах групи внаслідок освоєння нових територій. Цікаво, що цей висновок певною мірою узгоджується з деякими попередніми відомостями стосовно поширення видів *Klebsormidium* у різних містах Європи (Rindi, Guiry, 2004), які вказують на те, що ці водорості тяжіють до зростання у теплих і сухих регіонах. На користь цього свідчать і екофізіологічні дослідження штамів *Klebsormidium* з Альпійських високогір'їв, які показали, що вони починають нарощувати біомасу лише від температури +5 °С (U. Karsten, персон. повідомл.).

Однак нещодавно в літературі з'явилася протилежна думка стосовно поняття виду в межах *Klebsormidium*. Так, за даними детального дослідження штамів цього роду з молекулярної класифікації Е (рис. 4.7, 4.8) (застосовано об'єднаний ITS/*rbcL*-аналіз), в її межах існує велика кількість (не менше 10) прихованих видів, що мають подібну морфологію, проте чітко (за думкою авторів) відрізняються генетично (Škaloud, Rindi, 2011). Порівняння даних молекулярної філогенії з морфологією та екологією досліджених штамів показало філогенетичну значущість кількох ознак, за якими можливо відрізнити приховані види: наявність водовідштовхувального шару ниток на поверхні рідкого середовища, будова апертури зооспориангії та екологічна причетність (зростання наземно, у природних умовах (ґрунтах чи на кам'янистих відслоненнях) чи на штучно створених поверхнях (переважно цементі) або у прісних водоймах).

Таким чином, єдності думок стосовно поняття виду та еволюції в межах групи *Klebsormidium/Interfilum* на цей час немає. Хоча в цілому філогенетична картина їх проявляється чітко і особливих суперечностей не викликає, інтерпретація цієї інформації досить різна, тому існують думки як про високе генетичне та видове різноманіття в межах групи (Škaloud, Rindi, 2011), так і про загальну генетичну однотипність і, як наслідок, досить низьке видове різноманіття, особливо серед представників із помірних зон (Т. Pröschold, персон. повідомл.; Rindi et al., 2011 (частково)).

4.10. РІД *INTERFILUM*: МОРФОЛОГІЧНІ ТА ЕКОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ, РІЗНОМАНІТТЯ, ФІЛОГЕНЕТИЧНІ ЗВ'ЯЗКИ

Interfilum — чітко окреслена монофілетична група, близько споріднена з *Klebsormidium*, особливо з морфолого-генетичною групою «Flaccidum» (рис. 4.7, 4.8, клада А). Представники роду мають також значну кількість спільних морфологічних і цитологічних ознак (див. розд. 4.5, 4.6), проте характеризуються і певними унікальними особливостями.

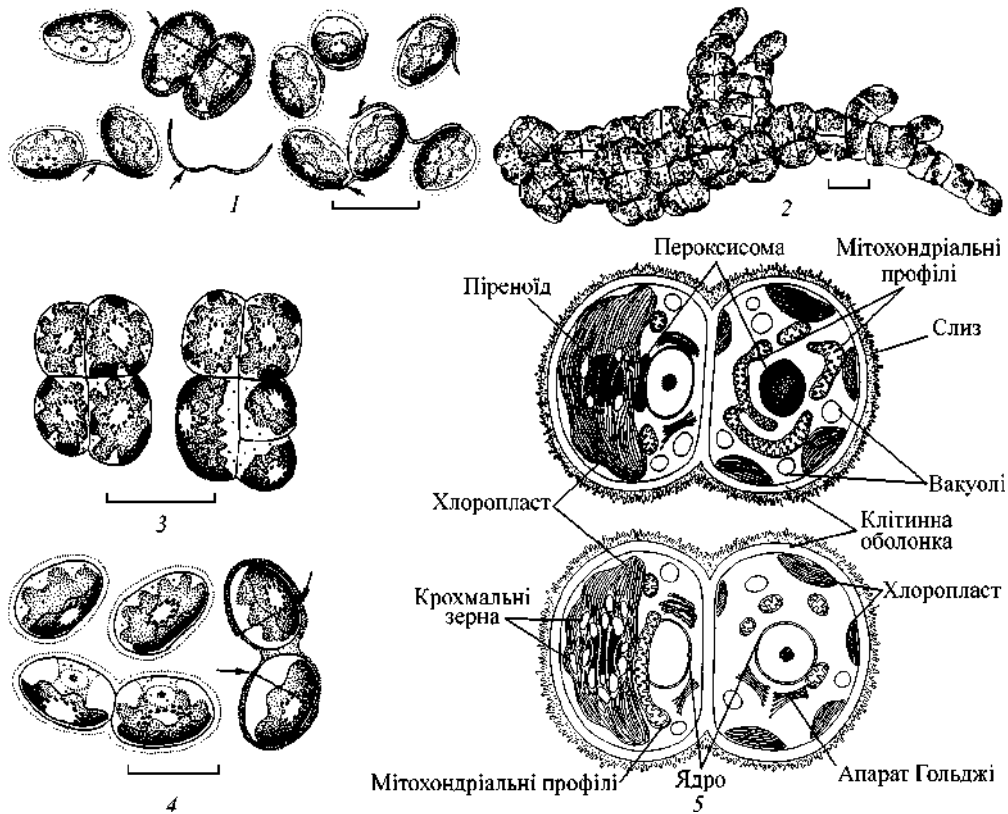


Рис. 4.9. Особливості будови видів роду *Interfilum*:

1 — *I. paradoxum*, штаб SAG 338. 1; 2, 3 — *I. massjukiae*, штаб SAG 2102; 4 — *I. terricola*, штаб SAG 2100; 5 — реконструкція TEM-мікрофотографії *Interfilum* sp., штаб SAG 2102. Показані ниточко- та шапінкоподібні (стрілки) залишки материнських оболонок. Лінійка — 10 мкм

Основною характерною ознакою *Interfilum* є те, що він ніколи не формує ниток у класичному розумінні, для нього типовими є поодинокі клітини, діади, пакети, у деяких видів — багатоклітинні кубічні агрегати та розгалужена плеврококоїдна слань (рис. 4.6, 5–9; 4.10, див. вклейку; рис. 4.9). Короткі ниточки, що складаються з кількох клітин, трапляються лише як виняток, іноді також можна спостерігати ланцюжки клітин, з'єднані спільним слизом або залишками клітинних оболонок («ниточками») (рис. 4.6, 5; 4.9, 1). У зв'язку з цим, як правило, клітини *Interfilum* не циліндричні, а еліпсоїдні, яйцеподібні, сферичні та напівсферичні. На відміну від більшості видів *Klebsormidium*, представники *Interfilum* мають розвинені слизові обгортки з характерного для стрептофітових водоростей волокнистого слизу (рис. 4.6, 7, 8; 4.10, 7, 8; 4.11, 5). Як правило, ці види формують поодинокі клітини та діади, іноді пакети клітин, що легко дезінтегрують при ослизненні клітинних оболонок. Проте частина видів роду слизу не має, їх клітинні оболонки товсті, шаруваті (рис. 4.11, 3). Для таких видів характерно

4.10. Рід *Interfilum*: морфологічні та екологічні особливості, різноманіття, філогенетичні зв'язки

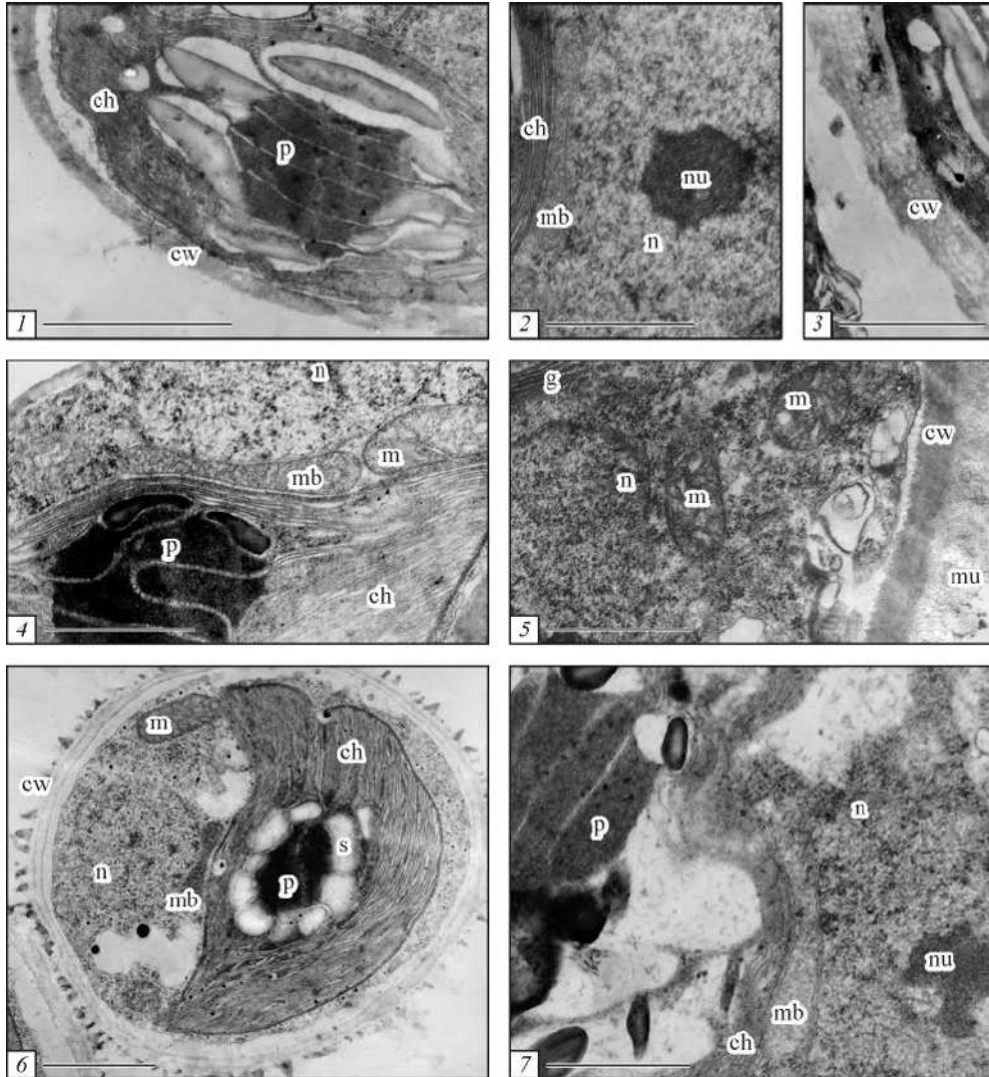


Рис. 4.11. Особливості ультраструктури представників *Interfilum*: 1–3 — *I. massjukiae* (SAG 2102); 4, 5 — *Interfilum* sp. (SAG 2101); 6 — *I. paradoxum* (SAG 338-1); 7 — *I. terricola* (SAG 2100). Скорочення: ch — хлоропласт; cw — клітинна оболонка; p — піреноїд; s — крохмальні зерна; n — ядро; nu — ядерце; mb — пероксисома; g — комплекс Гольджі; mu — слиз. Лінійка — 1 мкм (2–5, 7), 2 мкм (1, 6)

утворення міцних пакетів, агрегатів клітин і плеврококоїдної слані (див. рис. 4.9, 2, 3; 4.10, 1–4, 10–12). Залишки материнських оболонок у *Interfilum* представлені шапінко- або кільцеподібними структурами, Н-подібні залишки формуються дуже рідко (див. рис. 4.6, 7, 8, 10; 4.9, 1, 4; 4.10, 7, 8).

Відомі також характерні ознаки *Interfilum* стосовно будови протопласта. Так, усі види роду мають пластинчастий хлоропласт, що займає половину

Розділ 4. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей ...

клітинного об'єму і прилягає до одного із боків клітини. Хлоропласт розсічений на кілька (5—8) великих лопатей або має дрібнолопатеви край, у старих клітинах, проте, край хлоропласта може згладжуватися (рис. 4.6, 6, 9; 4.9, 1, 3, 4; 4.10, 3, 5, 6, див. вклейку). Піреноїд *Interfilum* характерної для порядку Klebsormidiales будови, досить компактний, облямований 1—2 рядами дрібних крохмальних гранул (рис. 4.6, 5, 6, 9; 4.9, 1, 3, 4; 4.10, 3, 5, 6). На твердому живильному середовищі представники роду утворюють гомогенні гладенькі колонії (у одноклітинних видів) або кластерподібні (у видів, що формують пакети та агрегати клітин).

Розмножується *Interfilum* лише діленням вегетативних клітин на дві за схемою, дуже подібною до схеми споруляції (Chodat, Topali, 1922; Fritsch, John, 1942) (див. рис. 4.5, 3). Зооспори у цього представника не виявлені. Дослідження ультраструктури вегетативних клітин *Interfilum* показало типovu для Klebsormidiales будову — великі пероксисоми, що межують з хлоропластом, ядром і мітохондріями; піреноїд перетинається кількома паралельними тилакоїдами (іноді формують петлі) та облямований дрібними крохмальними гранулами; клітинна оболонка позбавлена пор (див. рис. 4.4; 4.11).

Філогенетичний аналіз за нуклеотидною послідовністю ділянок ITS 1, 2 рДНК показав досить значну роздільну здатність у межах роду *Interfilum*. Як видно з рис. 4.7, всередині клади А чітко розрізняються основні підклади А1—А4. Підклада А2 включає види, що характеризуються одноклітинним станом і формують чіткі слизисті обгортки; вона містить епітипові штами 2 відомих видів *Interfilum* — *I. paradoxum* (тип роду) та *I. terricola*. Ці два представники досить подібні, розрізняються тим, що клітинна оболонка *I. terricola* інтенсивно ослизнюється, внаслідок чого ця водорість здатна формувати слизисті піхви навколо клітин і чіткі слизисті шапинки, що походять від материнської клітинної оболонки (див. рис. 4.6, 7, 8; 4.9, 4). Клітинні оболонки *I. paradoxum* не здатні до такого інтенсивного ослизнення, вони частково розриваються, але не завжди повністю відшаровуються від клітини, формуючи характерні «ниточки» між окремими клітинами водорості (рис. 4.6, 5; 4.9, 1). *I. terricola*, що був описаний як *Geminella terricola* (Petersen, 1932), ми перенесли до роду *Interfilum* через генетичну та морфолого-цитологічну подібність до представників цього роду (Mikhailyuk et al., 2008). Два види характеризуються досить близькими морфологічними ознаками, вони близькі також генетично, тому цілком імовірно, що є різновидами одного виду. Кілька інших штамів *Interfilum*, що також входять до вказаної підклади, певно, є різновидами вищеозначених видів. Зауважимо, що штам SAG 2101, виділений нами з гранітних відслонень півдня України (Миколаївська обл.), здатен тимчасово формувати пакети клітин у культурі (рис. 4.6, 9), які, проте, через ослизнення клітинної оболонки цієї водорості, легко дезінтегрують до одноклітинного стану. Інакше кажучи, здатність до ділення клітин у кількох площинах характерна і для одноклітинних видів, що було помічено раніше (Chodat, Topali, 1922). Слід також зазначити, що через істотну інтергеномну варіабельність різні клони епітипового штаму *I. terricola* — SAG 2100 (K650 та K644), виявилися генетично досить розрізненими (див. рис. 4.7) (Mikhailyuk et al., 2008).

4.10. Рід *Interfilum*: морфологічні та екологічні особливості, різноманіття, філогенетичні зв'язки

Підклада А3 також об'єднує представників з одноклітинною морфологією та значним ослизненням клітинних оболонок. На відміну від попередніх видів *Interfilum* клітини цих представників значно довші — 10–12(17) мкм (у штамів попередньої класифікації — 6–9(11) мкм). Через видовжені клітини залишки материнської клітинної оболонки у цих водоростей часто мають вигляд кільця, а не шапинки, кількість лопатей хлоропласта збільшується до формування кренульованого краю (рис. 4.10, 5, 6, див. вклейку). Вказаний представник імовірно є новим видом чи різновидом відомих видів *Interfilum*.

Підклади А1 та А4 включають штамми водоростей, оболонки яких інтенсивно не ослизнюються, вони досить міцні, шаруваті; клітини цих представників діляться в кількох площинах, формуючи пакети та кубічні агрегати. Клада А1 містить епітипний штам описаного нами виду — *I. massjukiae*, який утворює пакети та розгалужену плеврококоїдну слань, що іноді дезінтегрує до окремих клітин (див. рис. 4.9, 2, 3; 4.10, 1–4). Штам SAG 2147 є окремою лінією всередині *Interfilum*, він являє собою ще невідомий вид чи різновид, характерними ознаками якого є формування дуже міцних пакетів та агрегатів клітин, без жодних ознак дезінтеграції навіть після загибелі протопласта водорості (рис. 4.10, 10–12, див. вклейку).

У літературі є також відомості про кілька різновидів *I. paradoxum*, клітини яких діляться у кількох площинах і, поєднуючись ниткоподібними структурами, формують сітчасті утворення (Fritsch, John, 1942; Eherenhaus, Vigna, 2008). Щодо *I. paradoxum* var. *reticulatum* F.E. Fritsch et R.P. John, виділеного із ґрунтів Великої Британії, особливих сумнівів у його таксономічній приналежності не виникає завдяки детальним дослідженням і вичерпним ілюстраціям. Враховуючи здатність видів *Interfilum* ділитися у кількох площинах, утворення подібних об'ємних сітчастих структур цілком імовірно, хоча ми їх і не спостерігали. Разом з тим інше повідомлення про новий різновид *Interfilum* (*I. paradoxum* var. *regulare* Eherenhaus et Vigna) з планктону озера в Аргентині досить сумнівне, особливо якщо враховувати біотоп, в якому ця водорість була виявлена, та наведені авторами ілюстрації (Eherenhaus, Vigna, 2008, fig. 2).

Види роду *Interfilum* — широко поширені наземні водорості, виявлені з ґрунтів, кам'янистих відслонень, кори дерев тощо (Ettl, Gärtner, 1995; Михайлюк, 1999; Костіков та ін., 2001; Darienko, Hoffmann, 2003; Михайлюк et al., 2003 та ін.), можлива їх знахідка також із амфібіальних біотопів (Chodat, Torali, 1922). Вони нещодавно виявлені і як фотобіонти лишайників роду *Micarea* Fr. (Voytsekhovich et al., 2011), що є досить унікальним явищем, оскільки стрептофітові водорості серед фотобіонтів представлені поодинокими знахідками (Войцехович и др., 2011а, б). Уже із наведеного матеріалу видно, що генетичне та морфологічне різноманіття *Interfilum* є вищим, ніж зазначається в літературі. Подальше дослідження цього роду, особливо наземних місцезростань тропічних регіонів, імовірно, ще збільшить його.

4.11. РІД *KLEBSORMIDIUM*: МОРФОЛОГІЧНІ, ГЕНЕТИЧНІ, ЕКОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ, РІЗНОМАНІТТЯ

Klebsormidium — парафілетичний таксон, проте досить чітко окреслений з морфологічного погляду. Об'єднує нитчасті водорості (нитки неполярні), хоча частина представників здатна до легкої дезінтеграції ниток і переходу в одноклітинний стан, однак у молодому віці всі культури видів роду формують нитки (рис. 4.12—4.15, див. вклейку). Водночас, як показано вище (див. розд. 4.6), нитки *Klebsormidium*, на наш погляд, не є справжніми, а швидше за все являють собою колонію одноклітинних організмів, скріплені залишками материнських клітинних оболонок. Як результат формування нитчастої слані клітини *Klebsormidium* мають, як правило, циліндричну форму (рис. 4.12—4.15, див. вклейку), хоча і в цьому випадку є винятки (рис. 4.13, 8; 4.15, 1, 4). Для *Klebsormidium* характерно ділення клітин в одній площині, але випадки утворення дворядних ниток і псевдогілкування відомі з літератури (Lokhorst, 1996) і були знайдені також нами (рис. 4.15, 5—7, 9). Представники цього роду не формують потужних слизових обгорт, хоча легке ослизнення оболонок спостерігалось у певних, переважно, тонконитчастих та легко дезінтегруючих видів (Lokhorst, 1996), виявлене і серед досліджених нами штамів (рис. 4.2, 8—10, див. вклейку). Залишки материнських клітинних оболонок у *Klebsormidium* представлені Н-фрагментами (рис. 4.12, 3, 6, 10, 11; 4.13, 4, 9, 11, 13; 4.14, 3, 8), втім у представників з *Interfilum*-подібною морфологією можна спостерігати і шапінкоподібні структури (рис. 4.2, 11).

Хлоропласт у межах роду *Klebsormidium*, зазвичай, однотипний — пристінний, прилягає до одного з боків клітини, містить один піреноїд. Однак у різних групах така будова доповнюється деякими особливостями: різний ступінь розвиненості (заповнює від 30 (рис. 4.13, 12) до 80 % (рис. 4.12, 1, 2) периферії клітини), розсіченості (від гладенького краю (рис. 4.13, 11—13) до дрібнокренульованого (рис. 4.13, 6, 7) і лопатевого (рис. 4.12, 7, 8; 4.13, 1—5)). Так само варіює і тип піреноїда — від округлого компактного, облямованого одним шаром дрібних крохмальних гранул (рис. 4.14, 5, 6; 10—12) або кількома зернами (рис. 4.12, 5—7) до великого, еліпсоїдного, оточеного багатьма паралельними рядами гранул (рис. 4.12, 1, 2; 4.13, 3, 12; 4.14, 7, 9).

На твердому живильному середовищі представники зазначеного роду утворюють різноманітні колонії — переважно хвилясті та горбкуваті (у видів з більш-менш міцними нитками), гладенькі (у легкодезінтегруючих видів), кластерподібні (у видів, що мають дуже покручені нитки або характеризуються частим утворенням дворядних ниток та псевдогілкуванням). На рідкому живильному середовищі спостерігається подібна картина — конгломерати міцних ниток у рідині, пластівчасті конгломерати або гомогенний порошкоподібний наліт. У останньому випадку часто формується також водовідштовхувальний шар ниток на поверхні середовища (Lokhorst, 1996).

Розмножується *Klebsormidium* діленням вегетативних клітин на дві, на наш погляд, за схемою, подібною до ділення *Interfilum* (Mikhailyuk et al.,

4.11. Рід *Klebsormidium*: морфологічні, генетичні, екологічні особливості, різноманіття

2008; див. розд. 4.6), проте в літературі панує класична думка про справжнє вегетативне ділення у цього роду (Масюк, 1993; Van den Hoek, 1995; Lokhorst, 1996; Костіков та ін., 2006). Наявне також безстатеве розмноження зооспорами (відоме не для всіх видів, для певних представників важко викинути в культурі), що мають характерну будову для *Klebsormidiales* (голі, дорзівентральні, з двома субапикальними джгутиками, без стигм), та іноді апланоспорами, що проростають у межах спорангія, утворюючи псевдогілку (Lokhorst, 1996).

Статевий процес у цього роду спостерігався один раз на прикладі *K. flaccidum* (Wille, 1912; цит. за: Lokhorst, 1996). Проте зазначене повідомлення є певною мірою сумнівним і потребує підтвердження, оскільки автор спостерігав симетричні гамети зі стигмою — абсолютно не подібні за будовою до джгутикових клітин *Klebsormidiales*. На думку Г.М. Локхорста, досліджено не *Klebsormidium*, а один з видів *Ulothrix* (Lokhorst, 1996). Повідомлення про наявність акінет у *Klebsormidium* (Morison, Sheath, 1985) також є сумнівним. Хоча у старих культурах спостерігаються клітини з товстостінними оболонками, виповненими продуктами асиміляції, але морфологічно та цитологічно вони не відрізняються від вегетативних клітин, тому їх не можна вважати акінетами у класичному розумінні (Lokhorst, 1996). Ультраструктура вегетативних і репродуктивних клітин *Klebsormidium* типова для даного порядку та описана нами вище (див. розд. 4.5) (Stewart, Mattox, 1975; Lokhorst, Starr, 1985; Van den Hoek et al., 1995).

Філогенетичні аналізи за нуклеотидною послідовністю ділянки ITS рДНК та об'єднаний аналіз ITS — *rbcL* (див. рис. 4.7, 4.8) показали 5 чітко відокремлених молекулярних клад у межах роду *Klebsormidium* (B-C, D, E, F та G). Нижче наведено морфологічний опис представників цих груп, екологічні особливості та відповідність їх відомим на цей час видам указанного роду.

Морфолого-генетична група «*Crenulatum/Mucosum*» (клада F) (рис. 4.12, 1—6, див. вклейку) об'єднує лише 4 досліджені штами і характеризується найчіткішими морфологічними ознаками серед усіх груп *Klebsormidium*: довгими, міцними (як правило, без тенденції до дезінтеграції), товстими нитками (найтовщими серед видів роду, понад 15—20 мкм) і товстими горбкуватими, шаруватими оболонками. Вегетативні клітини цих видів в молодому віці циліндричні (індекс форми⁵ 1—1,5), але під час старіння культури набувають характерної для цієї групи форми — короткоциліндричні до вузьких (індекс форми 0,5—1), сильно перетягнуті біля поперечних клітинних перегородок, нитки при цьому можуть набувати чоткоподібної форми, часто переплітаються, формуючи коси. Хлоропласт видів групи потужний, займає 70—80 % периферії клітини, майже кільцеподібний, *Ulothrix*-подібний, з делікатно розсіченим (кренульованим) краєм, особливо в молодих культурах⁶. Піреноїд дуже великий, облямований багатьма рядами дрібних

⁵ Індекс форми — відношення довжини клітини до її ширини.

⁶ Саме через подібність хлоропласта до такого видів *Ulothrix K. mucosum* певний час перебував у складі цього роду (як *U. verrucosa* Lokhorst (Ettl, Gärtner, 1995)); пізніше, на основі вивчення його ультраструктури, було доведено, що це *Klebsormidium* (Lokhorst, Starr, 1985).

Розділ 4. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей ...

крохмальних гранул. Слиз у цих представників відсутній або іноді трапляється місцево, біля кінців ниток, формуються дуже чіткі шаруваті Н-фрагменти оболонки. На рідкому живильному середовищі водорості формують міцні конгломерати довгих ниток, на твердому — чіткі дрібнохвилясті, горбкуваті колонії.

Два відомі види *Klebsormidium* належать до зазначеної групи — *K. crenulatum* і *K. mucosum*, які відрізняються переважно різною товщиною ниток (18–20 мкм у першого і понад 20 мкм у другого виду). Філогенетичні аналізи за обома ділянками ДНК (ITS та *rbcL*) показали певну відстань між штамми, ідентифікованими як ці види (рис. 4.7, 4.8), проте як генетично, так і морфологічно вказані таксони дуже близькі (рис. 4.12, 1–6). Штами водоростей, використані у нашому дослідженні (SAG 6.96 і SAG 8.96) були виділені Г. Локхорстом, і їх морфологія відповідає описам цих видів та їх сучасному розумінню (Starmach, 1972; Мошкова, 1979; Ettl, Gärtner, 1995; Hindák, 1996; Lokhorst, 1996). На жаль, штам SAG 6.96 було втрачено (Т. Friedl, персон. повідомл.), але інший колекційний штам — SAG 37.86 (раніше ідентифікований як *Ulothrix tenuissima* Kütz.) морфологічно та генетично цілком відповідає *K. crenulatum* (рис. 4.12, 1–4). У майбутньому можливе збільшення видового різноманіття групи за рахунок інших видів даного роду, що морфологічно відповідають цим представникам — *Klebsormidium flaccidum* f. *aquatica* (Heering) Nizam. et Gerloff, *Klebsormidium lamellosum* Y.X. Wei et Hu, *Klebsormidium montanum* (Skuja) Shin Watan. (Starmach, 1972; Мошкова, 1979; Watanabe, 1983; Ettl, Gärtner, 1995; Hindák, 1996; Wei, 1984; Hu, Wei, 2006), але штамми вказаних видів поки що відсутні в колекціях.

Безумовно, види цієї групи є ксерофітною лінією в межах роду *Klebsormidium*. Це помітно навіть із зовнішнього вигляду представників — товсті шаруваті клітинні оболонки і скручування ниток у коси, тобто формування конгломератів клітин. Не лише ці ознаки, а також проведені екофізіологічні експерименти із штамом *K. crenulatum*, виділеним із альпійських нагрунтових кірок, показали його високу фотофізіологічну пластичність і толерантність до висушування (Karsten et al., 2010). Дослідження змін ультраструктури цього штаму під час висушування показало, що такі особливості досягаються через еластичність поперечних клітинних стінок і збереження неушкодженими основних клітинних органел у повністю висушених клітинах, що сприяє швидкому відновленню у вологих умовах (Holzinger et al., 2011). Взагалі вважають, що види групи «Crenulatum/Mucosum» у межах *Klebsormidium* мають життєву стратегію конкурентів (віолентів) (Karsten, Holzinger, 2012). З цим можна цілком погодитися, враховуючи домінування представників групи на кам'янистих відслоненнях (Войцехович и др., 2009; Mikhailyuk et al., 2003; Mikhailyuk, 2008) і в ґрунтових кірках різних природних зон України (Костіков та ін., 2001).

Морфолого-генетична група «Desertus» (клада G) (рис. 4.12, 6, 7) також має досить чіткі морфологічні ознаки, які певною мірою нагадують представників попередньої групи. Група «Desertus» — найцікавіша серед *Klebsormidium*, оскільки являє собою нову лінію цього роду і включає ще не описані таксони (Rindi et al., 2011). Вказані водорості характеризуються такими ознаками: нитки довгі, проте схильні до дезінтеграції або фрагментовані до

4.11. Рід *Klebsormidium*: морфологічні, генетичні, екологічні особливості, різноманіття

коротких ниточок, тонкі чи середньої товщини (4)5,5—8 мкм, дуже викривлені і покручені та сильно перетягнуті біля поперечних перегородок, через що здаються чоткоподібними, клітинні оболонки середньої товщини.

Клітини цих водоростей у молодому віці, як правило, короткоциліндричні до вузьких (індекс форми — 0,5—1,3(1,7)), клітини виглядають неначе стиснутими з боку поперечних перегородок (рис. 4.12, 13, 15). Утім у старих культурах вони витягнуті, циліндричні до еліпсоїдних (індекс форми 1,2—2(2,9)) (рис. 4.12, 9). Така зміна форми клітин є нетиповою для *Klebsormidium*, оскільки, як правило, у процесі старіння клітини або не змінюють своєї форми, або стають коротшими, у цьому ж випадку — навпаки, вони подовжуються. На наш погляд, така тенденція пов'язана з переважанням певних фізіологічних процесів у клітинах різного віку. Видовжені клітини в молодих культурах *Klebsormidium* переважної більшості груп засвідчують активні ростові процеси в цей період та їх певне пригасання у дорослих і старих культурах. У представників даної групи, очевидно, надзвичайно активні процеси ділення клітин у молодому віці, тому вони дуже короткі, тоді як в старих культурах ці процеси уповільнюються, через що клітини мають час для росту розтягуванням, набуваючи циліндричної форми.

На наш погляд, така тенденція зміни форми клітин протягом онтогенезу є пристосуванням цієї групи *Klebsormidium* до аридних умов існування — у ґрунтових кірках пустель і напівпустель з вологими та посушливими періодами, що чергуються. Так, з настанням вологого періоду клітини водоростей надзвичайно активно діляться, нарощуючи максимальну кількість біомаси за короткий період. За поступового зменшення вологи цей інтенсивний поділ уповільнюється і клітини «мають час» на ріст у довжину. З настанням посушливих умов, очевидно, клітинний поділ припиняється, клітини лише поступово подовжуються.

На користь цього припущення може слугувати також своєрідна форма хлоропластів водоростей. Зазвичай вони коритоподібні, з гладеньким краєм, заповнюють 50—70 % периферії клітини, але досить часто в молодих культурах чітко розділені на 4 лопаті (про що вже повідомлялося як про характерну ознаку представників групи, див. табл. 4.2). Поява чотирилопатевого хлоропласта у *Klebsormidium* вказує на підготовку клітини до поділу (Lokhorst, Starr, 1985), тому наявність хлоропластів такої будови у молодих культурах може свідчити про активність процесів ділення клітин. Оскільки для представників цієї групи подібні процеси надзвичайно характерні в молодому віці, чотирилопатевою будову хлоропласта можна також вважати однією з типових ознак зазначених водоростей. Піреноїд видів групи «*Desertus*» маленький, компактний, облямований лише кількома крохмальними гранулами. Слиз у цих представників відсутній, Н-фрагменти оболонок чіткі у певних штамів або неявні в інших. На рідкому живильному середовищі водорості формують пластівчасті скупчення ниток, на твердому — дуже незвичайні для *Klebsormidium*, кластерподібні або вузлуваті колонії, які набувають такої форми через значну викривленість ниток. Колонії легкокодезінтегруючих видів, як правило, гомогенні.

Представники вказаної групи, на наш погляд, є досі не відомими видами *Klebsormidium*. Як видно з рис. 4.7, у межах клади G, імовірно, можна

розрізнити кілька видів. Особливо чітку групу формують штами 14613.5e, 14614.7 і 14615.5a, які характеризуються легкою дезінтеграцією ниток і формуванням коротких їх фрагментів. Досить відмінним є штам LUK 318, який дезінтегрує до окремих клітин і має найменші в групі розміри — 5,3—5,5 мкм завтовшки. Інші кілька штамів мають доволі довгі, сильно покручені нитки і є також кількома окремими видами, характерні ознаки яких потрібно ще відшукати.

Група надзвичайно цікава за екологічною характеристикою, оскільки переважна більшість штамів, що її репрезентують, виділені із ґрунтових кірок пустель Південної Африки (Büdel et al., 2009; 2010). Цікаво, що із значених кірок, зазвичай, було виділено понад 10 штамів роду *Klebsormidium* і лише 2 з них (14621.10.54 і 15051.6) увійшли до кладу E, більшість же потрапила до кладу G. Проте один із штамів кладу — LUK 318, був виділений із ґрунтів вугільних відвалів Чехії. Ми також знаходили *Klebsormidium*, морфологічно подібний до цієї групи, з гранітних відслонень по берегах р. Рось (Богуславський р-н Київської обл.). Наявні також знахідки морфологічно подібних *Klebsormidium* із ґрунтів США (штам LUK 70, див. табл. 4.1).

Отже, ці водорості безперечно характерні для аридних регіонів, проте іноді трапляються і в помірній зоні. На наш погляд, ця лінія також є ксерофітною, про що свідчить і місцезростання, з якого виділені водорості, і їх морфологія. Короткі, неначе стиснуті клітини та дуже перетягнуті нитки біля поперечних перегородок, чоткоподібний їх характер нагадують представників групи «Crenulatum/Mucosum», але у значно зменшеному розмірі, без товстих клітинних оболонок. Їстотна викривленість ниток цих видів і схильність до формування конгломератів ниток також є пристосуванням до несприятливих посушливих умов (Karsten, Holzinger, 2012). На філогенетичному дереві, побудованому за послідовностями ділянки ITS рДНК, групи «Crenulatum/Mucosum» та «Desertus» також є сестринськими, хоча і без належної підтримки (див. рис. 4.7). Проте філогенетичний аналіз за послідовністю *rbcL* і комбінований аналіз ITS/*rbcL* цього не підтвердили, натомість показали значну віддаленість кладу G від інших груп (див. рис. 4.8) та ймовірність того, що вона репрезентує інший рід *Klebsormidiales* (F. Rindi, персон. повідомл.).

Морфолого-генетична група «Bilatam/Elegans» (клада D) (рис. 4.13, 1—5, див. вклейку) представлена лише 3 штамами у нашому дослідженні. Дані водорості репрезентують досить чітко окреслену групу з подібною морфологією: нитки міцні, довгі, досить товсті (завтовшки до 9—10 мкм), дещо перетягнуті біля поперечних перегородок, іноді чоткоподібні й сплетені в коси; оболонки міцні, клітини в молодому віці циліндричні до здутих, бочкоподібних (індекс форми — 1,5—1,7(2,6)), у старих культурах — коротші, короткоциліндричні та короткобочкоподібні (індекс форми — 1—1,5(1,7)); слиз відсутній або іноді спостерігається місцево, біля кінців ниток, Н-фрагменти трапляються часто, чітко виражені. Хлоропласт цих представників середньої величини займає 60—70 % периферії клітини, як правило, розсічений на кілька великих лопатей — від 4 до 7—10; піреноїд дуже великий, облямований кількома рядами дрібних крохмальних гранул. На рід-

4.11. Рід *Klebsormidium*: морфологічні, генетичні, екологічні особливості, різноманіття

кому живильному середовищі водорості формують міцні конгломерати довгих ниток, на твердому — чіткі, дрібнохвилясті, горбкуваті колонії.

До цієї групи належать 2 відомі види *Klebsormidium* — *K. bilatum* і *K. elegans* Lokhorst, які розрізняються переважно за будовою хлоропласта, а саме ступенем його розсічення. Так, хлоропласт *K. bilatum* розсічений на 4 великі лопаті (рис. 4.13, 3—5, див. вклейку), *K. elegans* — на кілька, 7—10, лопатей (рис. 4.13, 1, 2). Проте морфологія хлоропласта може варіювати у цих видів і лопаті спостерігаються не завжди. Філогенетичні аналізи за обома дослідженими ділянками ДНК також показали значну подібність 2 штамів, що репрезентують ці види (SAG 5.96 і SAG 7.96) (рис. 4.8). Слід зазначити, що SAG 7.96 є автентичним штамом *K. elegans*, а SAG 5.96 — ізольований автором цього виду (*K. bilatum*) з дуже близького місцезростання, що і типове (автентичний штам, на жаль, не зберігся) (Lokhorst, 1996). Інший ізолят, TR 13, виділений нами з гранітних відслонень півдня України (див. табл. 4.1) в цілому має подібну до цих штамів морфологію, характеризується 4-лопатеvim хлоропластом. Згідно з даними філогенетичного аналізу за ITS рДНК, цей штам відрізняється від інших без суттєвої підтримки, в межах варіабельності одного виду (див. рис. 4.7). Таким чином, імовірно, цяклада представлена лише одним видом.

За екологічною характеристикою представники групи «*Bilatum/Elegans*» мешкають у ґрунті та наземних біотопах, особливо поширені в Західній Європі, звідкіля і описані (Lokhorst, 1996). Виявлений нами представник даної групи (штам TR 13) є першою знахідкою цих водоростей в Україні. Відповідно до наших спостережень за штамом TR 13, досліджувані водорості здатні розвиватися в масі і утворювати повстисті наліти в наземних місцезростаннях. Однак лише за загальним виглядом представників групи «*Bilatum/Elegans*» відрізнити не просто, оскільки вони досить подібні до деяких видів з інших груп, «*Flaccidum*» та «*Nitens*».

Морфолого-генетична група «*Flaccidum*» (клади В і С) (рис. 4.13, 6—13, див. вклейку). Представники групи чітко окреслені з генетичної позиції, проте мають морфологію, досить подібну до морфології видів інших груп. Група об'єднує штами із середньою товщиною ниток 6—8(12) мкм. Нитки довгі, у деяких штамів міцні, у певних легко дезінтегрують до одноклітинного стану; в старих культурах в усіх штамів дезінтегрують до коротких ниточок. Нитки не перетягнуті або перетяжки незначні, клітини, як правило, циліндричні, іноді дещо здуті, більш-менш однакові протягом життєвого циклу (індекс форми 1—1,7(2,5)). Слиз відсутній або формує тонкий шар навколо ниток легкодезінтегруючих видів. Н-фрагменти оболонки чіткі у одних штамів і нечіткі або відсутні в інших. Хлоропласт вкриває 50—70 % клітинної периферії, з гладеньким, іррегулярно-лопатеvim або дрібно- і багаторозсіченим краєм. Піреноїд в усіх штамів великий, облямований багатьма рядами крохмальних гранул. На агаризованому середовищі ці представники формують хвилясті колонії, у легкодезінтегруючих штамів — колонії з гомогенним краєм; у рідкому середовищі — гомогенний або пластівчастий наліт.

Найбільш морфологічно подібною групою до описаної є досить проблематична група серед *Klebsormidium* — «*Nitens*». Табл. 4.3 ілюструє загальні

Розділ 4. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей ...

Таблиця 4.3. Порівняння морфологічних ознак *Klebsormidium* груп «Flaccidum» та «Nitens»

Ознака	Ознаки в межах морфолого-генетичних груп	
	«Flaccidum»	«Nitens»
Форма ниток	Міцні, довгі, не перетягнуті (або незначно) біля поперечних перегородок, легко дезінтегруючі у деяких штамів	Як правило, легкодезінтегруючі (особливо в старих культурах), але довгі і міцні у деяких штамів (частіше тільки в молодих культурах), переважно перетягнуті біля поперечних перегородок
Ширина ниток	Середня (6–8 мкм), іноді до 12 мкм	Як правило, тонкі до середніх (4,5–5,5(7,8)) мкм, але досить товсті у деяких штамів (до 8,8–10 мкм)
Форма молодих клітин	Циліндричні, нездуті	Циліндричні і витягнуто-циліндричні, нездуті
Форма старих клітин	Циліндричні, іноді дещо здуті	Переважно короткоциліндричні та ізодіаметричні, іноді циліндричні, еліпсоїдні, як правило, здуті
Н-подібні фрагменти оболонки	Чітко виражені або нечіткі, іноді відсутні	Відсутні або нечіткі, іноді яскраво виражені
Слизиста обгортка	Відсутня або утворює тонкий шар навколо деяких клітин	Наявна як тонкий шар уздовж нитки, іноді навколо лише деяких клітин або повністю відсутня
Піреноїд	Великий, облямований багатьма шарами дрібних крохмальних гранул	Маленький, компактний, облямований одним-двома шарами дрібних крохмальних гранул, іноді середній, з кількома шарами
Розростання на агаризованому середовищі	Чіткі хвилясті або хвилясті з гомогенними краями	Гладенькі колонії, хвилясті з гомогенними краями, іноді чітко хвилясті
Розростання на рідкому середовищі	Гомогенні, з пластівцями	Гомогенні, з пластівцями і поверхневим шаром на середовищі, рідко — у вигляді міцних придонних туфів
Екологічні особливості	Наземні, але деякі штамми — прісноводні	Наземні, характерні для вологих місцевостей, та прісноводні

характерні ознаки обох цих груп. Як видно з табл. 4.3, групи мають доволі різні, іноді навіть протилежні морфологічні ознаки, але, як правило, з деякими виключеннями. Так, представники групи «Flaccidum» — наземні водорості, мають довші, товщі і міцніші нитки, без явних перетяжок біля поперечних перегородок, з циліндричними клітинами, вираженими Н-фрагментами оболонки, відсутнім слизом і великим піреноїдом. Види з групи «Nitens» — прісноводні та наземні водорості, схильні до розвитку у вологих умовах. Вони мають тонші, коротші, слабші нитки, часто схильні до дезінтеграції, як правило, з перетяжками біля поперечних клітинних перегородок, їх клітини циліндричні у молодому віці, але у багатьох штамів стають ізодіаметричними або короткими в дорослих і старих культурах, Н-фрагменти оболонки частіше відсутні або мають шапінкоподібний вигляд, клітини частини штамів, що легко дезінтегрують, облямовані тонким шаром слизу; ці водорості переважно мають дуже компактний, чітко окреслений піреноїд, облямований одним-кількома рядами дрібних крохмальних гранул.

Отже, представники зазначених груп досить чітко розрізняються в цілому, але при цьому наявні виключення із загальних правил, тому, як ре-

4.11. Рід *Klebsormidium*: морфологічні, генетичні, екологічні особливості, різноманіття

зультат, часто досить важко ідентифікувати конкретний штам, особливо якщо він репрезентує нечіткі або перехідні морфологічні ознаки. Єдиний спосіб отримання додаткової інформації — ретельне спостереження культури у різному віці або, звичайно, проведення молекулярного аналізу.

У межах групи «*Flaccidum*» чітко розрізняють дві підгрупи, представлені двома окремими кладами (В та С) у філогенетичних аналізах за нуклеотидними послідовностями ITS рДНК та *rbcL* (див. рис. 4.8). Цікаво, що ці підгрупи виділяються переважно за географічним принципом — клада В містить штам, виділений із наземних місцезростань Східної Європи (Україна, Росія), клада С — Західної Європи (Німеччина, Швеція, Чехія)⁷. Виявлені певні незначні морфологічні відмінності цих груп. Так, західноєвропейські штамми (клада С) характеризуються здебільшого, гладеньким краєм хлоропласта та досить довгими нитками (ширина 6–7,6(8) мкм, індекс форми 1,0–1,4(2,4)), Н-фрагменти їх оболонки часто перебувають не на кінцях нитки, а в її середині, між двома сусідніми клітинами. Характерною ознакою східноєвропейських штамів (клада В) є досить багаторозсічений хлоропласт. У межах цієї підгрупи виділяють ще 2 невеликі групи, які досить чітко (правда, без належної підтримки) показані на ITS-дереві (див. рис. 4.7). Одна з них (штами Biof 4, Lira 7, TR 26, TR 44) включає легкодезінтегруючі штамми (ширина нитки 6,6–8 мкм, індекс форми 1–1,5(1,8)), інша (решта штамів клади В) містить представників з міцними нитками (ширина 6,8–8,6(12) мкм, індекс форми 1–1,4(2,2)), які дезінтегрують лише у старих культурах, з вираженими Н-фрагментами оболонки та багаторозсіченим хлоропластом.

Цікавим питанням є місце розташування на філогенетичних деревах типового виду роду *Klebsormidium* — *K. flaccidum*. З рис. 4.7 і 4.8 помітно, що штам, попередньо ідентифікований як цей вид, можна знайти в кількох місцях груп «*Flaccidum*» та «*Nitens*». З приводу визначення дійсного його положення є кілька думок. Як показала практика, порівняння матеріалу з типовим діагнозом цього виду мало що проясняє, оскільки він дуже короткий, нечіткий і неповний (Kützing, 1849), що часто характерно для альгологічних робіт середини XIX ст. Так само марними є спроби порівняння з типовим матеріалом даного виду («*Strassburg Febr 1846*» leg. A. Braun (L sheet 939.67-905), Lokhorst, 1996), який складається всього з кількох ниток водорості, оформлених як гербарний зразок. Такий матеріал неможливо використати ні для молекулярного аналізу, ні для морфологічного дослідження, що ґрунтується на вивченні живого матеріалу (Rindi et al., 2011). Є пропозиція відібрати матеріал з типового місцезростання (з якого він був описаний в 1849 р. — вулиці м. Страсбург (Франція)). Втім цього місцезростання може вже не існувати або воно трансформоване і неможливо отримати гарантію, що виявлений представник буде саме тим видом, який описував у свій час Ф.Т. Кютцінг.

Тому нам здається адекватнішим інший шлях: на основі робіт попередників, а саме Г.М. Локхорста (Lokhorst, 1996), який зробив повне і сучасне

⁷ Проте дослідження низки штамів *Klebsormidium* з альпійських ґрунтових кірок (Австрія) показало наявність штамів, генетично та морфологічно подібних до представників клади В (Mikhailyuk et al., 2012). Отже, ця географічна диференціація також не є чіткою.

 Р о з д і л 4. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей ...

таксономічне опрацювання європейських видів роду *Klebsormidium*, слід прийняти саме його розуміння багатьох видів указанного роду, зокрема і типового виду *K. flaccidum*. Оскільки зберігся один із штамів *K. flaccidum*, виділений Г.М. Локхорстом, KL1 (SAG 2307), його можна використати як епітиповий матеріал цього виду. Місце штаму — у кладі С, яка і репрезентує, на наш погляд, типовий *K. flaccidum*.

Якщо вважати, що поширення *K. flaccidum* обмежується територією Західної Європи, то в межах України він має бути відсутній. Однак флористичні дані засвідчують інше: вони репрезентують *K. flaccidum* як найтипівішого представника української наземної алгофлори (Мошкова, 1979; Разнообразие ..., 2000; Костіков та ін., 2001). Можливо, види цього роду не є настільки космополітичними, як вважали раніше, і, попри морфологічну подібність, імовірно, різні, географічно та екологічно віддалені групи являють собою різні таксони. Крім того, досліджені нами штами виділені переважно з кам'янистих відслонень (див. табл. 4.1), тому певно «справжній» *K. flaccidum* на території України трапляється у ґрунті. Для з'ясування цього питання необхідні додаткові дослідження українських штамів *Klebsormidium*.

Східноєвропейські штами з легкодезінтегруючими нитками (Biof 4, Lira 7, TR 26, TR 44) мають морфологічну характеристику, близьку до характеристики *K. dissectum* (Gay) Lokhorst⁸ (Starmach, 1972; Мошкова, 1979; Ettl, Gärtner, 1995; Lokhorst, 1996; Hindák, 1996) (рис. 4.13, 10, див. вклейку). Можливо, саме цього, також широко поширеного представника ототожнювали раніше з *K. flaccidum*. Так, серед перелічених вище штамів, що належать до цієї підгрупи, Biof 4 і Lira 7 мають досить міцні нитки, що розпадаються лише в старих культурах. Решта штамів групи В (SAG 7.91, Vacota, TR 34, TR 42, TR 24, TR 22, TR 35) з багаторозсіченим краєм хлоропласта та досить міцними нитками, імовірно, є новим видом чи різновидом (рис. 4.13, 6—9), оскільки генетична відстань між цими підгрупами в межах кладі В, попри морфологічні відмінності, досить незначна (див. рис. 4.7, 4.8).

З огляду на незначну генетичну відстань між обомакладами (В і С) групи «Flaccidum» і досвід попереднього баркодування (див. розд. 4.9), імовірно, дві виділені групи є популяціями одного виду, розділеними територіально — у межах Західної та Східної Європи (Т. Pröschold, персон. повідомл.).

За екологічною характеристикою, представники групи «Flaccidum» мешкають переважно в наземних біотопах, хоча наявна інформація і щодо кількох штамів, ізольованих із місцезростань поблизу водойм (див. табл. 4.1). Ми вважаємо цю групу помірно вологолюбною, пристосованою до більш-менш вологих наземних місцезростань. За нашими спостереженнями, зазначені водорості здатні формувати щільні розростання на затінених гранітних відслоненнях різних зон України, будучи видами-домінантами (Mikhailyuk et al., 2003; Mikhailyuk, 2008). Лише за морфологічними ознаками представників групи «Flaccidum» не завжди вдається ідентифікувати безпомилково. Так, деякі східноєвропейські штами з багато розсіченим хлоропластом легко сплутати з видами групи «Bilatium/Elegans» (подібна

⁸ З *K. dissectum*, однак, можна ототожнити також кілька штамів, представлених у групі «Nitens» (клада Е).

4.11. Рід *Klebsormidium*: морфологічні, генетичні, екологічні особливості, різноманіття

наша помилка була допущена у статті, присвяченій водоростям каньйону р. Тетерів (Mikhailyuk, 2008) або «Nitens». Цікаве також еволюційне значення групи «Flacidum», оскільки саме вона очевидно є предковою відносно до роду *Interfilum*. Слід зазначити, що деякі східноєвропейські штами з розсіченим хлоропластом у старій культурі переходять у майже одноклітинний стан, при цьому дуже нагадують види *Interfilum* (рис. 4.13, 8, див. вклейку); щоправда, представників, що імітують *Interfilum*, можна знайти і серед групи «Nitens» (рис. 4.15, 1, 2, 4, див. вклейку).

Морфолого-генетична група «Nitens» (клада E) (рис. 4.14, 4.15 1—4, див. вклейку). Ця група є найскладнішою для розуміння в межах роду *Klebsormidium*, хоча і репрезентована в наших аналізах найбільшою кількістю штамів (див. рис. 4.7, 4.8). Про загальні морфологічні ознаки групи було указано в попередньому розділі, додамо лише, що вони досить варіабельні в межах групи, а також певна кількість її представників є винятком із загальних правил. Загалом у межах групи «Nitens» можна виділити 5 морфотипів водоростей, що досить чітко різняться морфологічно: «acidophilum», «nitens-typical», «pseudoflacidum», «pseudointerfilum/dissectum», «fluitans». Проведені молекулярно-філогенетичні аналізи лише частково узгоджуються з морфологічними даними. Так, аналіз за нуклеотидною послідовністю ділянки ITS рДНК показав дуже низьку роздільну здатність у межах клади E (див. рис. 4.7), фактично виділивши лише одну підкладу E4. Об'єднаний аналіз ITS-*rbcL* засвідчив наявність 6 окремих підклад (E1—E6) (див. рис. 4.8), деякі з яких узгоджуються з певними морфотипами, характерними для цієї групи *Klebsormidium*. Слід зазначити, що ITS-дерево фактично має ті самі підклади в межах клади E, але генетична відстань за цією ділянкою ДНК настільки низька між штамми групи «Nitens», що вказані підклади надзвичайно нечіткі і не мають високої підтримки.

Морфотип «acidophilum» (див. рис. 4.14, 1—4) об'єднує виключно прісноводних представників, які характеризуються тонкими або середньої товщини нитками і видовжено-циліндричними клітинами (ширина ниток 5,0—6,4(6,8) мкм, індекс форми 1,5—2,2(3)). У більшості штамів нитки досить міцні, формують чіткі H-фрагменти оболонки, у інших — легко фрагментуються протягом усього життєвого циклу або у старих культурах. Цей морфотип переважно пов'язаний з підкладою E1 (див. рис. 4.8). Більшість досліджених штамів цього морфотипу — з річок Великої Британії, але до підклади E1 (аналіз за послідовністю *rbcL* (не наведений)) включено також кілька штамів, виділених з річок Австралії (Rindi et al., 2011). Частина цих штамів, що мають легкодезінтегруючі нитки, ототоженні з *K. dissectum*, інші описані як новий вид — *K. acidophilum* Novis (типовий штам — DQ028578), який мешкає у річках з кислою реакцією води (Novis, 2006).

Морфотип «pseudointerfilum/dissectum» (рис. 4.15, 1—4) є дуже цікавим, оскільки ці водорості імітують представників роду *Interfilum*: їх нитки фрагментуються до одноклітинного стану, клітини при цьому мають еліпсоїдну форму і хлоропласт, розсічений на кілька лопатей (ширина 5,5—6,6 мкм; індекс форми 1,1—1,7(2,8)). Навіть залишки материнських оболонок у цих штамів часто мають вигляд *Interfilum*-подібних шапинок, клітини

деяких штамів оточені тонким шаром слизу, але не таким потужним, як у видів *Interfilum* (рис. 4.15, 3). При цьому протягом життєвого циклу, як правило, в молодих культурах, ці штами формують чіткі нитки, характерні для *Klebsormidium* і абсолютно не типові для *Interfilum*. На жаль, дані стосовно екології чи географії цих штамів досить обмежені (див. табл. 4.1). Морфотип «*pseudointerfilum/dissectum*» частково підтримується обома наведеними філогенетичними аналізами, формуючи підкласу E4, проте частина штамів, що належить до нього, або виходить за межі підкласу (на ITS-дереві), або входять до підкласу E2 (на ITS-*rbcL*-дереві) (див. рис. 4.7, 4.8).

Цікаво, що штам, генетично дуже близький до одного зі штамів описаної групи (SAG 2065), виділено з ґрунтових кірок Альп (Австрія). Екофізіологічні дослідження штаму показали, попри його існування в досить жорстких гірських умовах, надзвичайну його чутливість і відсутність витривалості до висушування (Karsten, Holzinger, 2012), що можливо пов'язано з певною мікроекономією, яку цей представник займає в ґрунтових кірках. Зазначений штам попередньо було ідентифіковано як *K. dissectum*. У принципі, морфологічні особливості морфотипу «*pseudointerfilum/dissectum*» цілком відповідають основним ознакам *K. dissectum*, а розмірні характеристики узгоджуються з широким розумінням указанного виду (Ettl, Gärtner, 1995; Hindák, 1996). При цьому вужча трактовка *K. dissectum* (Starmach, 1972; Мошкова, 1979; Lokhorst, 1996) передбачає легкодезінтегруючі види роду з шириною нитки від 7 мкм. Тому якщо слідувати такому розумінню цього виду, то його швидше можна ототожнити зі східноєвропейськими легкодезінтегруючими штамми групи «*Flaccidum*» (див. вище). До речі, саме така трактовка *K. dissectum* узгоджується з тим, що це найближчий таксон до *K. flaccidum* (Мошкова, 1979; Lokhorst, 1996).

Морфотип «*nitens-typical*» (рис. 4.14, 5, 6, див. вклейку) характеризує найтонших представників роду *Klebsormidium*. Їхні нитки фрагментуються до коротких ниточок і окремих клітин, починаючи з молодих культур (ширина нитки 4,8—5,4(5,6) мкм, індекс форми 1,0—1,8(2)), часто вони оточені тонким шаром слизу, при цьому Н-фрагменти оболонки не утворюються або утворюються зрідка, як виняток. Хлоропласти цих штамів дуже ніжно і характерно кренульовані по краю. На жаль, незважаючи на таку чітку морфологічну характеристику, штами цього морфотипу не формують окремих підкласів, а входячи до підкласу E2, змішуються з іншими штамми, переважно морфотипів «*pseudointerfilum/dissectum*» та «*pseudoflaccidum*» (див. рис. 4.7, 4.8), хоча морфологічно вони, без жодного сумніву, належать до виду *K. nitens*, особливо в розумінні Г.М. Локхорста (Lokhorst, 1996). Штами морфотипу мешкають у прісноводних і наземних місцезростаннях.

Один із штамів морфотипу «*nitens-typical*» (SAG 2155) оголошено неотипом *K. dissectum* (Lokhorst, 1996; Rindi et al., 2011). Хоча цей представник звичайно характеризується основною ознакою *K. dissectum* — легкодезінтегруючими нитками, він не відповідає діагнозу цього виду в розумінні самого автора неотипу (Lokhorst, 1996), оскільки має значно тонші нитки (завширшки (4,5)4,8—5,1(5,5) мкм). Попри значну морфологічну варіабельність і пластичність цієї групи *Klebsormidium*, ми не вважаємо, що можливі настільки значні зміни культури водорості, і відносимо цю розбіж-

4.11. Рід *Klebsormidium*: морфологічні, генетичні, екологічні особливості, різноманіття

ність до ймовірної помилки під час пересівання культури або етикетування. Разом з тим, згідно із широким трактуванням *K. dissectum* (Ettl, Gärtner, 1995; Hindák, 1996), яке передбачає ширину нитки від 4,5 мкм, зазначений штам може бути ідентифікований як цей вид.

Морфотип «*pseudoflaccidum*» (рис. 4.14, 10–12) об'єднує штами з довгими нитками середньої товщини (5,3–7,6(8) мкм), які схильні до дезінтеграції у старих культурах. У молодому віці вони, як правило, мають видовжені циліндричні клітини, чим нагадують *K. flaccidum*, з віком клітини вкорочуються і стають короткоциліндричними, ізодіаметричними (індекс форми 0,7–1,5(2)) та істотно перетягнутими біля поперечних клітинних перегородок. Хлоропласт здебільшого з гладеньким краєм, містить дуже чіткий, компактний, округлий піреноїд, облямований одним рядом крохмальних гранул. Представники цього морфотипу переважно локалізуються в межах кладки E2, змішуючись зі штамами морфотипу «*nitens-typical*», деякі входять до підклади E1, здебільшого представлені морфотипом «*acidophilum*», або формують окремі підклади — E5 та E6. Цікаво, що іноді такий морфотип можуть мати штами інших морфотипів групи «*Nitens*» («*acidophilum*», «*nitens-typical*», «*fluitans*») на певних стадіях свого розвитку, хоча інші зберігають його протягом усього життєвого циклу. За екологічною характеристикою вони також досить різноманітні — від прісноводних до наземних водоростей.

Морфотип «*fluitans*» (рис. 4.14, 7, 9) представлений лише одним штамом на молекулярних деревах, який формує підкладу E3 (рис. 4.8). Цей штам є неотипом *K. fluitans* (SAG 9.96, Lokhorst, 1996; Rindi et al., 2011). Водорість має досить товсті міцні нитки (ширина 7,1–8,5(10,2) мкм, індекс форми 1,2–1,4), які рідко дезінтегрують, через що в культурі на рідкому живильному середовищі вона формує міцні конгломерати ниток (придонні туфи). Цю ознаку вважають таксономічно вагомим (Lokhorst, 1996) і характерною для товстонитчастих видів *Klebsormidium* груп «*Crenulatum/Mucosum*» і «*Bilatum/Elegans*». Саме на представників останньої групи, а також на певні штами групи «*Flaccidum*» і схожі ці водорості. Як не парадоксально, але найменше спільного вони мають зі штамами групи «*Nitens*», до якої належать. Ї річ не лише у наявності товстих міцних ниток у цих представників, а й у будові хлоропласта і піреноїда — хлоропласт часто дрібно чи грубо розсічений, піреноїд великий, облямований багатьма рядами дрібних крохмальних гранул, — це ознаки, типові для груп «*Bilatum/Elegans*» і «*Flaccidum*». Проте на певних стадіях розвитку ми спостерігали окремі нитки даних представників з ознаками морфотипу «*pseudoflaccidum*».

Дослідження ґрунтових кірок Альп (Австрія) показало, що представники, генетично і морфологічно близькі до *K. fluitans*, переважають в них (Mikhailyuk et al., 2012), тож ця група очевидно містить види, що домінують у наземних екосистемах, які характеризуються вологими умовами (неотиповий штам *K. fluitans* виділений з амфібіального екоотопу (Lokhorst, 1996), див. табл. 4.1).

Загалом, на наш погляд, морфолого-генетична група «*Nitens*» еволюційно молода, тому, ймовірно, процеси видоутворення є активними у наш час. На сьогодні неможливо чітко розмежувати окремі види водоростей, оскільки помітні лише тенденції формування і відособлення деяких підгруп

 Розділ 4. Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей ...

у межах групи «Nitens». У такому разі надзвичайно важко прийняти певне таксономічне рішення. Ситуація ускладнюється також певною кількістю штамів у межах цієї групи, що «імітують» морфологію представників інших груп. Часто на морфологічному рівні визначити положення згаданих штамів буває дуже складно або взагалі неможливо.

Разом з тим існує думка, що зазначена група *Klebsormidium* містить 14 прихованих видів, які чітко розмежовуються генетично (застосовано об'єднаний аналіз послідовностей ITS-*rbcL*) (Škaloud, Rindi, 2011). Топологія молекулярних дерев вказаних роботах цілком повторює топологію, наведену нами (див. рис. 4.8), проте виявляє чітку, на думку авторів, диференціацію в межах підклад: E1 містить 2 окремі генетичні групи, що репрезентують приховані види; E2 — 6 груп; E4 — 2 групи, та виявляє одну додаткову групу, не представлену на дереві, побудованому нами. При цьому підклади E3, E5 та E6 містять лише по одній групі та відповідно по одному виду. Згадані автори не обговорюють статус виявлених груп як окремих популяцій одного виду чи внутрішньовидових таксонів, а розглядають їх як окремі види. Як зазначено вище (див. розд. 4.9), автори вказують на неможливість розмежування вказаних прихованих видів на морфологічному рівні, проте вважають, що ці групи чітко корелюють з екологічними характеристиками досліджених штамів. Так, окремо виділяють прісноводні групи, групи, що мешкають наземно на природних (у ґрунті чи аерофітно) і на штучних (переважно на бетоні) субстратах. Автори вважають, що така морфологічна ознака, як ширина нитки, що широко використовується в таксономії *Klebsormidium*, не має філогенетичного значення і швидше за все залежить від екологічних умов. Зокрема, види, що мешкають у нейтральному чи лужному середовищі, мають ширші нитки, ніж види, що зростають у кислому середовищі.

Цей цікавий висновок звичайно потребує подальшого підтвердження, але слід зауважити, що він певною мірою корелює з даними Ф.М. Новіса щодо вивчення *Klebsormidium* з прісних водойм з різною реакцією води (Novis, 2006).

Автори розглянутого повідомлення, крім того, ототожнюють морфолого-генетичну групу «Nitens» з *K. flaccidum* (Škaloud, Rindi, 2011), що можливо лише у разі прийняття широкого розуміння цього виду (Starmach, 1972; Мошкова, 1979; Ettl, Gärtner, 1995; Hindák, 1996). Якщо ж притримуватися поглядів Г.М. Локхорста (Lokhorst, 1996), то *K. flaccidum* слід асоціювати з підклядою «Flaccidum», до якої входить один із штамів, досліджений цим автором та ідентифікований як зазначений вид (SAG 2307, див. табл. 4.1).

На наш погляд, група «Nitens», у цілому, є найвологолюбнішою серед *Klebsormidium*, оскільки деякі її представники — це прісноводні водорості, інша частина — штами з вологих наземних місцезростань, хоча й тут є певні винятки, про які йтиметься нижче. Серед представників групи є такі, що здатні формувати потужні розростання і бути домінантами (штами, споріднені з *K. fluitans*), хоча більшість — супутні види, які ми спостерігали під час вивчення ґрунтових водоростей Канівського заповідника (Черкаська обл.), гранітних відслонень різних регіонів України, ґрунтів НПП «Гуцульщина» (Івано-Франківська обл.) тощо (Демченко и др., 1998; Mikhailiuk et al., 2003; Mikhailiuk, 2008; Михайлюк, Дарієнко, 2011).

4.12. МОРФОЛОГІЧНІ ВИДИ *KLEBSORMIDIUM*, ЩО НЕ ВКЛЮЧЕНІ ДО ОПРАЦЮВАННЯ. «АНОМАЛЬНІ» ФОРМИ *KLEBSORMIDIUM*

Звичайно наше опрацювання не охоплює всі можливі морфологічні види *Klebsormidium*, тому подальші дослідження з включенням більшої кількості зразків із нових біотопів і географічних регіонів, імовірно, дасть відповіді на нині закриті питання. Так, крім розглянутих вище видів є ціла низка різновидів *K. flaccidum* та інших видів, які вважають визнаними таксонами (Guiry, Guiry, 2012), але інформація щодо них дуже обмежена, а штами відсутні у світових колекціях. Наприклад, деякі прісноводні представники, можливо, слід вважати видами роду *Ulothrix* (*K. flaccidum* f. *aquatica*, *K. rivulare* (Kütz.) M.O. Morison et Sheath, *K. subtile* (Kütz.) Tracanna ex Tell, *K. subtilissimum* (Rabenh.) P.S. Silva, Mattox et Blackwell) або *Gloeotila* (*K. scopulinum* (Hazen) H. Ettl et G. Gärtner, *K. tribonematoideum* (Skuja) Hindák), а очевидно, й ототожнити з певними прісноводними і вологолюбними представниками дуже різномірної групи «Nitens». Інші недостатньо описані види, можливо, є синонімами відомих видів *Klebsormidium* (*K. flaccidum* f. *tumidum* (Heering) H. Ettl et G. Gärtner — імовірний синонім *K. dissectum*; *K. flaccidum* var. *lubricum* (Chodat) H. Ettl та *K. sterile* (Deason et H.C. Bold) P.S. Silva, Mattox et Blackwell — близькі до *K. nitens*; *K. klebsii* (G.M. Sm.) P.S. Silva, Mattox et Blackwell, *K. flaccidum* var. *crassum* (Chodat) H. Ettl et G. Gärtner — до *K. flaccidum*; *K. lamellosum* і *K. montanum* — до *K. mucosum* чи *K. crenulatum*). Тонконитчасті види даного роду (*K. pseudostichococcus*), напевно, є представниками родів *Stichococcus* або *Gloeotila*, зокрема для *K. marinum* це уже доведено (Neustupa et al., 2007).

Надзвичайно цікавими, на наш погляд, є форми *Klebsormidium*, названі нами аномальними (рис. 4.15, 5—9, див. вклейку). До них ми відносимо кілька досліджених штамів, морфологія яких є дуже яскравою і деякою мірою подібною, проте генетично ці представники споріднені з абсолютно іншими з морфологічної точки зору штамми. Тому вони є свого роду винятками на філогенетичних деревах. Прикладами таких штамів є TR 24 (входить до групи «Flaccidum», клада В), TR 18 (група «Nitens», підклада E4, переважно морфотип «pseudointerfilum/dissectum») та Biota-14621.10.54 (група «Nitens», підклада E2, що містить морфотипи «nitens-typical» та «pseudoflaccidum») (див. рис. 4.7, 4.8). Спільні морфологічні ознаки цих штамів (досить широкі, довгі, перетягнуті біля поперечних перегородок, викривлені нитки; міцні клітинні оболонки; короткі, неначе затиснуті, здуті клітини; частий поділ клітин у кількох площинах з утворенням дворядних ниток, пакетів і псевдогілок) (див. рис. 4.15, 5—9), явно є ознаками ксерофітності та пристосованості до посушливих умов. Подібні морфологічні ознаки можна спостерігати у представників ксерофітних груп *Klebsormidium* — «Crenulatum/Mucosum» та «Desertus» (рис. 4.12), проте ці штами, згідно з молекулярно-філогенетичними даними, до них не належать, а входять до більш вологолюбних груп. Цікаво, що означені штами з аномальною морфологією були ізольовані з дійсно аридних місцезростань — ґрунтових кірок з пустель Африки, Австралії та з повітря степової зони України (див. табл. 4.1).

Інакше кажучи, вони несуть морфологічні риси, що відповідають умовам їх місцезростань, але при цьому генетично споріднені зовсім з іншими за екологією та морфологією групами.

Яскравим прикладом може бути порівняння морфології штаму TR 18 з Австралії з генетично близько спорідненими штамми підклади E4 (рис. 4.15, 1—5, див. вклейку). Можна припустити, що така морфологія у цих штамів не закріплена на генетичному рівні, а є лише певною мірою неспадковою мінливістю. Однак ці штами виділені з їх місцезростань понад 5 років тому, і протягом цього часу їх культивували на стандартних середовищах разом з іншими штамми. Постає питання: як вони зберегли морфологію, яка є відображенням пристосованості до їх природних місцезростань, якщо інформація про це не міститься у генах? Ця група водоростей, незважаючи на довгий період її вивчення, все ще містить дуже багато загадок.

4.13. ЕВОЛЮЦІЯ І ГЕОГРАФІЧНЕ ПОШИРЕННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ ПОРЯДКУ. ЕКОЛОГО-ФІЗІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ГРУПИ ЯК КЛЮЧ ДО ТАКСОНОМІЇ KLEBSORMIDIALES

Представники порядку Klebsormidiales — еволюційно прогресуюча група, переважно спрямована на експансію наземних місцезростань. Якщо представники родів *Hormidiella* та *Entransia* характеризуються обмеженим географічним поширенням, частина їх приурочена лише до тропічних регіонів, то *Klebsormidium* та *Interfilum* — широко поширені роди, знахідки яких можливі, очевидно, на всій земній кулі, від пустель і тропічних регіонів до Арктики та Антарктики (Rindi et al., 2011). Особливо цікавими є значна експансія та домінуюча роль цих представників у наземних місцезростаннях, де вони вдало конкурують із зеленими хлорофіцієвими й требуксієфіцієвими водоростями.

Що дає такі переваги цим представникам, адже у їх фізіології відомі дійсно «слабкі місця», зокрема, можливість росту лише у вузькому діапазоні солоності середовища, можливість активного росту лише починаючи від +5 °C для багатьох штамів, відсутність у клітинах таких важливих для існування у наземних умовах стрес-метаболітів, як поліоли, та ін. (Karsten, Rindi, 2010; Karsten et al., 2010). Можливо, ключем до розуміння такої успішності Klebsormidiales та Streptophyta в цілому є особливості їх ультраструктури, а саме наявність комплексу органел, що включає мітохондрії, хлоропласт, пероксисому та ядро. У розд. 4.5 показано фізіологічні переваги клітин, які мають подібний комплекс органел. Адже саме цей комплекс частково зберігся та розвинувся у вищих наземних рослин (Raven et al., 2005; Proctor et al., 2007).

Питання еволюції та географічного поширення даних водоростей все ще перебувають у стані розробки, хоча певні цікаві аспекти можна вже прокоментувати. За результатами попередніх досліджень родів *Klebsormidium* та *Interfilum* щодо баркодування та виявлення молекулярних сигнатур їх таксонів, імовірно, еволюційно старшою є група представників *Klebsormidium* із тропічних регіонів, тоді як помірні широти вони активно освоюють у

4.13. Еволюція і географічне поширення представників порядку ...

цей час (Т. Pröschold, персон. повідомл.; див. розд. 4.9). Тож можливо припустити, що різноманіття даного порядку у тропічних регіонах напевно значно вище, ніж нині відомо. На користь цього вказують знахідки найближчих до *Klebsormidium* та *Interfilum* таксонів — роду *Hormidiella* (див. розд. 4.7), саме з тропічних регіонів, а також у цілому «теплолюбна» спрямованість цієї групи, про що свідчать флористико-екологічні та еколого-фізіологічні дані (Rindi, Guiry, 2004; Karsten et al., 2010).

Усталене уявлення про рід *Klebsormidium* як космополітний таксон, очевидно, за детального його вивчення буде змінено. Вже на сьогодні видно певну географічну причетність у межах групи (виділення окремої лінії африканських таксонів, диференціація групи «Flaccidum» на підгрупи зі східним та західними ареалами тощо). Чудовою ілюстрацією суттєвої географічної диференціації *Klebsormidium* є дослідження видового складу біологічних ґрунтових кірок, в яких цей таксон є одним із важливих компонентів. Так, відомо, що склад водоростей ґрунтових кірок, незалежно від клімату регіону, більш-менш сталий, оскільки складений таксонами, адаптованими до екстремальних наземних умов (West, 1990; Sant'Anna, Pavia Azevedo, 1991; Rosentreter, Belnap, 2001). Проте дослідження ґрунтових кірок високогір'їв Альп (Австрія) показали переважання представників вологолюбної групи «Nitens» серед *Klebsormidium* (Mikhailyuk et al., 2012), тоді як одним із домінантів ґрунтових кірок піщаних кіс та островів Дніпра (Україна) виявлено ксерофітний *K. mucosum* (Бойко и др., 1984; Костиков, Рыбчинский, 1995), а ґрунтові кірки пустель Південної Африки складають майже виключно таксони з окремої ксерофітної лінії — групи «Desertus» (Rindi et al., 2011). Подальші дослідження *Klebsormidiales* із залученням матеріалів із різних регіонів земної кулі та різних біотопів, на наш погляд, дадуть змогу виявити значну географічну та екологічну диференціацію в межах цієї групи.

Активні екофізіологічні дослідження представників роду *Klebsormidium*, розпочаті нині, дають все більше цікавої інформації стосовно цих водоростей. Зокрема, нещодавно в їх клітинах віднайдено амінокислоту, що забезпечує захист проти дії ультрафіолетових променів (абсорбує їх) (Micosporine-like Amino Acid — МАА). Такого роду речовина відома для деяких груп наземних зелених водоростей, ціанобактерій та лишайників, а також червоних морських макрофітів, що живуть на мілководдях (Karsten et al., 2005). Проте у *Klebsormidium* виявлено її унікальний різновид (U. Karsten, персон. повідомл.). Згадані вище попередні екофізіологічні дослідження ряду штамів *Klebsormidium* показали цікаві результати, що узгоджуються з екологічними особливостями даних водоростей, зокрема значну фізіологічну пластичність і толерантність до висушування у ксерофітного *K. crenulatum* (Karsten et al., 2010; Holzinger et al., 2011) і високу чутливість до нестачі вологи у штамів вологолюбної лінії «Nitens» (Karsten, Rindi, 2010; Karsten, Holzinger, 2012).

З огляду на значну морфологічну пластичність клебсормідіальних водоростей та високий рівень морфологічного паралелізму між представниками різних ліній, імовірно, саме за даними екофізіології цих представників можна пояснити їх успішність у природі та встановити необхідні ознаки, що можуть бути використані в таксономії групи водоростей, яка певною мірою є предковою відносно вищих наземних рослин.

**MOLECULAR PHYLOGENY, TAXONOMY AND BIOLOGY
OF TERRESTRIAL ALGAE OF ORDER KLEBSORMIDIALES
(KLEBSORMIDIOPHYCEAE, STREPTOPHYTA)**

The order Klebsormidiales (Streptophyta) contains the genera *Klebsormidium*, *Interfilum*, *Hormidiella* and *Entransia*, which mostly represent widely distributed terrestrial and freshwater algae. The history of investigation of these taxa reaches XIX century, when the genus *Hormidium* (= *Klebsormidium*) was described; the taxonomic position of other genera was determined during XX and XXI centuries. These algae were originally placed to different orders of the Chlorophyta — Ulothrichales, Gloeotilales, Zygnematales, Chlorococcales. Ultrastructural data, later confirmed by molecular-phylogenetic investigations, shown their place to be among the streptophycean algae.

The taxonomy of Klebsormidiales is problematic because of probability that some taxa are still regarded in other groups of green algae or not found in nature as well as high morphological plasticity and morphological uniformity. The 18-S rDNA phylogeny demonstrates the group to be monophyletic and related to Coleochaetales, Charales and other streptophycean algae and higher plants. But morphologically similar genera such as *Stichococcus*, *Koliella*, *Raphidonema* and *Gloeotila* are phylogenetically distant from Klebsormidiales and belong to the Trebouxiophyceae. *Klebsormidium* and *Interfilum* are closely related within the order, but *Hormidiella* and *Entransia* are distant from each other and from previous genera.

All representatives of Klebsormidiales have many common ultrastructural characters (structure of flagellated cells, process of cytokinesis, presence of complex of cell organelles including peroxisomes) and morphological features (chloroplast and pyrenoid structure, position of nucleus, mucilage structure etc.). We think that the scheme of cell division and thallus formation by way similar to sporulation are common characters among all representatives of the order. Some differences in details of cell division in various taxa of Klebsormidiales cause formation of morphologically different types of thallus: filaments, unicells, chains of cells connected by «threads», sarcinoid packets, and pleurococcooid thallus. The evidence of such type of cell division is presence of H-, cap- or ring-like fragments of the cell wall as well as cell wall ultrastructure.

Hormidiella and *Entransia* represent taxa with small species diversity; the geographical range of the first one is limited to tropical areas, the second one is a rare freshwater alga known from North America. *Klebsormidium* and *Interfilum* are closely related paraphyletic taxa which include a greater diversity of terrestrial and freshwater algae. Species concept, number of taxa within the Klebsormidiales and phylogenetically significant morphological characters are debatable questions for the moment. On the one hand there is the possibility of integration of *Klebsormidium* and *Interfilum* and reducing the existing species into a few number of

Chapter 4. Molecular phylogeny, taxonomy and biology of terrestrial algae order Klebsormidiales ...

taxa. On the other hand, existence of high cryptic species diversity within *Klebsormidium* has been suggested.

Characteristic peculiarities of *Interfilum* are the following: the presence of a clear mucilage envelope in most taxa, cap-, ring- or thread-like remnants of the mother cell wall and formation of a unicellular or sarcinoid thallus. The species of *Interfilum* are terrestrial algae. Besides three known species which clearly differ according to ITS rDNA phylogeny (*I. paradoxum*, *I. terricola* and recently described *I. massjukiae*), *Interfilum* probably includes several undescribed taxa — with elongated unicells and strong cubical cell aggregations.

Klebsormidium, characterized by formation of filaments, divides into five clear clades according to ITS/*rbcL* phylogeny which corresponds to morpho-genetic groups assigned by us. Xerophytic lineages of *Klebsormidium* are represented by groups «Crenulatum / Mucosum» and «Desertus». The first one unites taxa with the thickest filaments; two known species (*K. crenulatum* and *K. mucosum*) are close according to morphological and genetic data. The group «Desertus» is a new lineage among *Klebsormidium*, which mostly unites strains from arid regions. They are characterized by strongly curved filaments, short cells, four-lobed chloroplasts, compact pyrenoids and unique change of cell shape during ontogenesis. Group «Bilatum / Elegans» represents two genetically and morphologically close species (*K. bilatum* and *K. elegans*) with rather thick, strong filaments and variously dissected chloroplasts.

Groups «Flaccidum» and «Nitens» are rather morphologically similar. The first one represents mostly terrestrial species typical for temperate regions with filaments of average width and different level of disintegration. It is possible to distinguish two subgroups within the «Flaccidum» group which include strains from East and West Europe. Perhaps the Western-European lineage includes the type species of the genus — *K. flaccidum*. However, according to an alternative opinion the type of the genus is necessary to deduce from morphologically close group «Nitens». The position of other widely distributed species — *K. dissectum* within the genus is debatable as well. Group «Nitens» is evolutionarily young, therefore the processes of species formation is still active in it. Phylogenetic trees, especially ITS rDNA phylogeny, show low resolution within this clade. The algae of the «Nitens» group represent a humid lineage, the following five main morphotypes are separated among them: «acidophilum» (freshwater algae), «pseudo-interfilum/dissectum» (unicells, average width of filaments), «nitens-typical» (thin, unicells), «pseudoflaccidum» (*K. flaccidum*-like, but with isodiametric cells), «fluitans» (long, strong, rather thick filaments).

Klebsormidiales is obviously an evolutionarily young group. General cosmopolitanism of the group, widely established in the literature, will be probably contradicted after detailed investigation of geographical distribution of the algae. Because of considerable morphological plasticity and a high level of morphological parallelism of Klebsormidiales taxa, new ecophysiological data may help explain their success in nature and provide necessary characters which may be used in taxonomy of this group of algae which may represent the ancestors of higher plants.

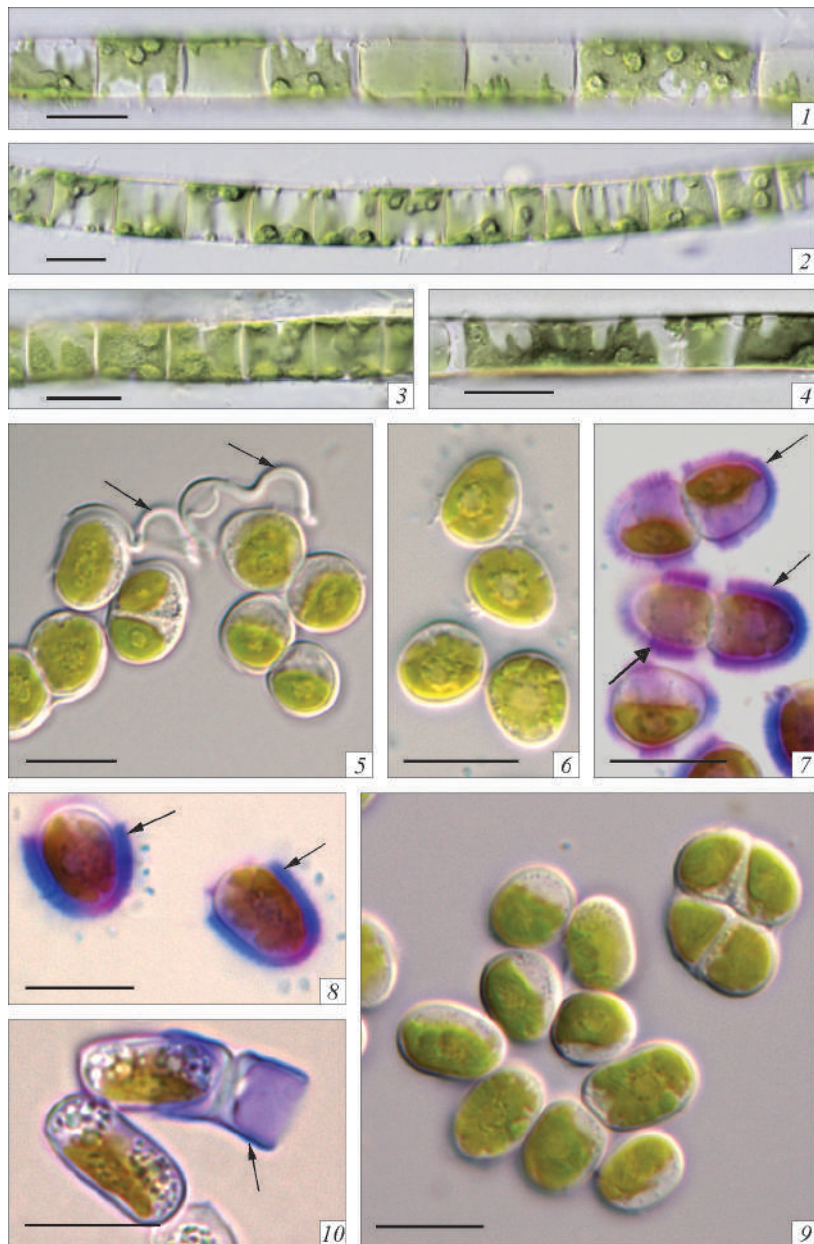


Рис. 4.6. Морфологічні особливості *Entransia* та *Interfilum*:

1–4 — *Entransia fimbriata*, різноманіття будови вегетативних клітин; 5 — *Interfilum paradoxum*, штам SAG 338.1 (стрілками показані залишки материнських клітинних оболонок); 6, 7 — *Interfilum terricola*, штам SAG 2100 (7 — фарбування метиленовим синім (стрілки показують шапінкоподібні залишки материнських оболонок, головка стрілки — кільцеподібні)); 8, 9 — *Interfilum* sp., SAG 2101 (8 — фарбування метиленовим синім (стрілки показують шапінкоподібні залишки материнських оболонок)); 10 — *Interfilum* sp., SAG 36.88, фарбування метиленовим синім, стрілка вказує на Н-подібний фрагмент оболонки. Лінійка — 20 мкм (1–4), 10 мкм (5–10)

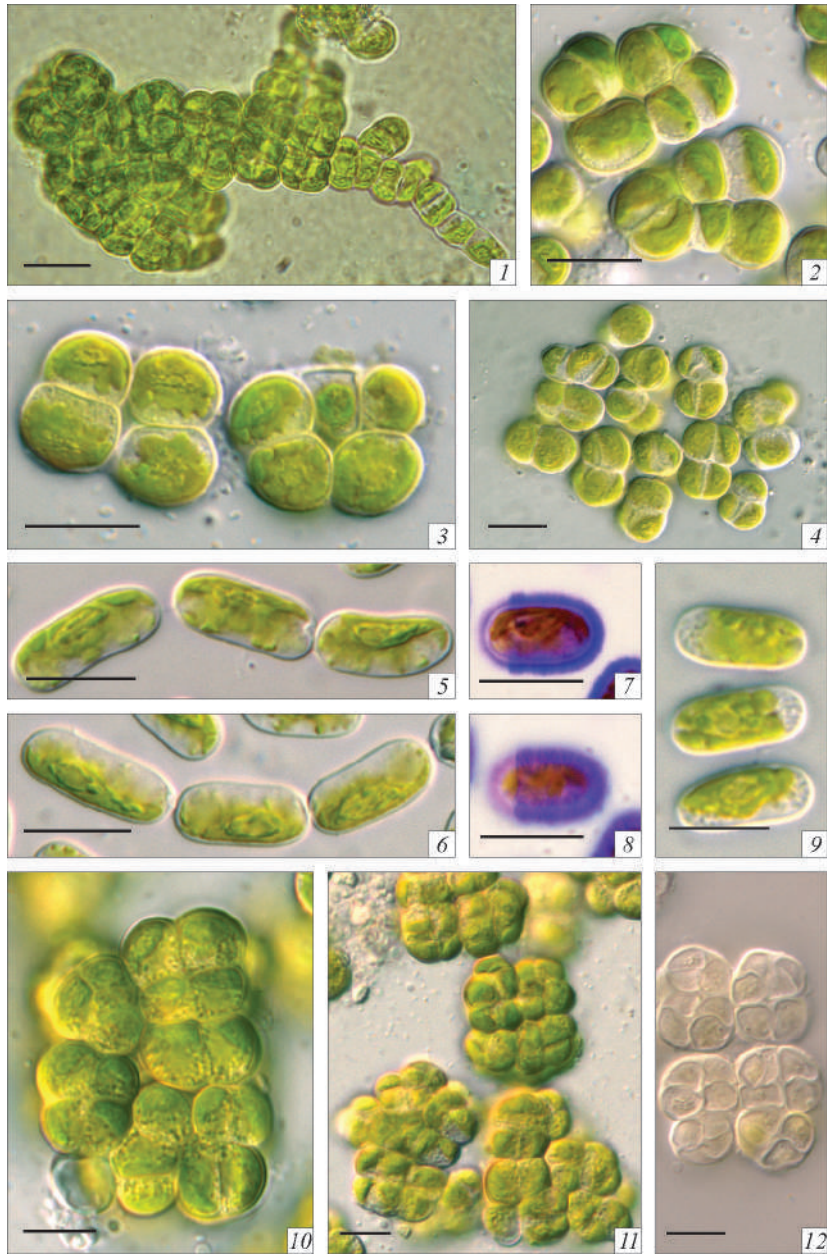


Рис. 4.10. Морфологічні особливості різних представників *Interfilum*:

1–4 — *Interfilum massjukiae*, штам SAG 2102 (1–3 — будова дорослої слані, 4 — вигляд молоді культури); 5–8 — *Interfilum* sp., штам LUK 317 (7, 8 — фарбування метиленовим синім, видно шапінкоподібні залишки материнських оболонок: 7 — оптичний переріз, 8 — вигляд з поверхні); 9 — *Interfilum* sp., штам LUK 313; 10–12 — *Interfilum* sp., штам SAG 2147 (12 — оболонки клітин, що загинули). Лінійки — 10 мкм

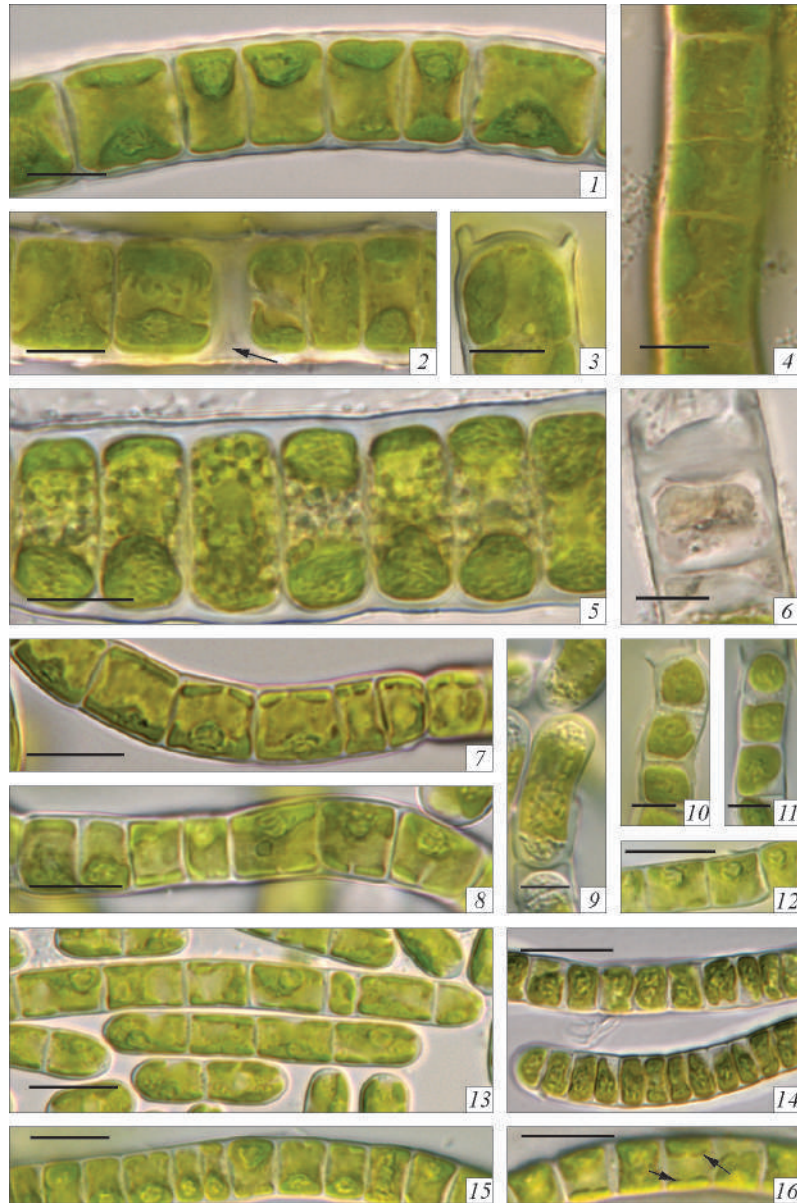


Рис. 4.12. Морфологічні особливості представників *Klebsormidium* морфолого-генетичних груп «Crenulatum / Mucosum» та «Desertus»:

1–4 — *K. crenulatum*, штам SAG 37.86 (3 — Н-подібний фрагмент оболонки, 4 — вигляд з поверхні, стрілка вказує на трикутний проміжок між оболонками клітин); 5, 6 — *K. mucosum*, штам SAG 8.96 (6 — Н-подібний фрагмент оболонки); 7, 8 — *K. sp.*, штам Biota 14614-18.18; 9–13 — *K. sp.*, штам Biota 14621-6 (9 — клітини у старій культурі, 10, 11 — Н-подібні фрагменти оболонок, 12 — деталі будови хлоропласта в молодій культурі, 13 — нитки в молодій культурі); 14 — *K. sp.*, штам LUK318; 15 — *K. sp.*, штам Biota 14614-18.24; 16 — *K. sp.*, штам 4 TR (стрілки вказують на лопаті хлоропласта).
Лінійка — 10 мкм

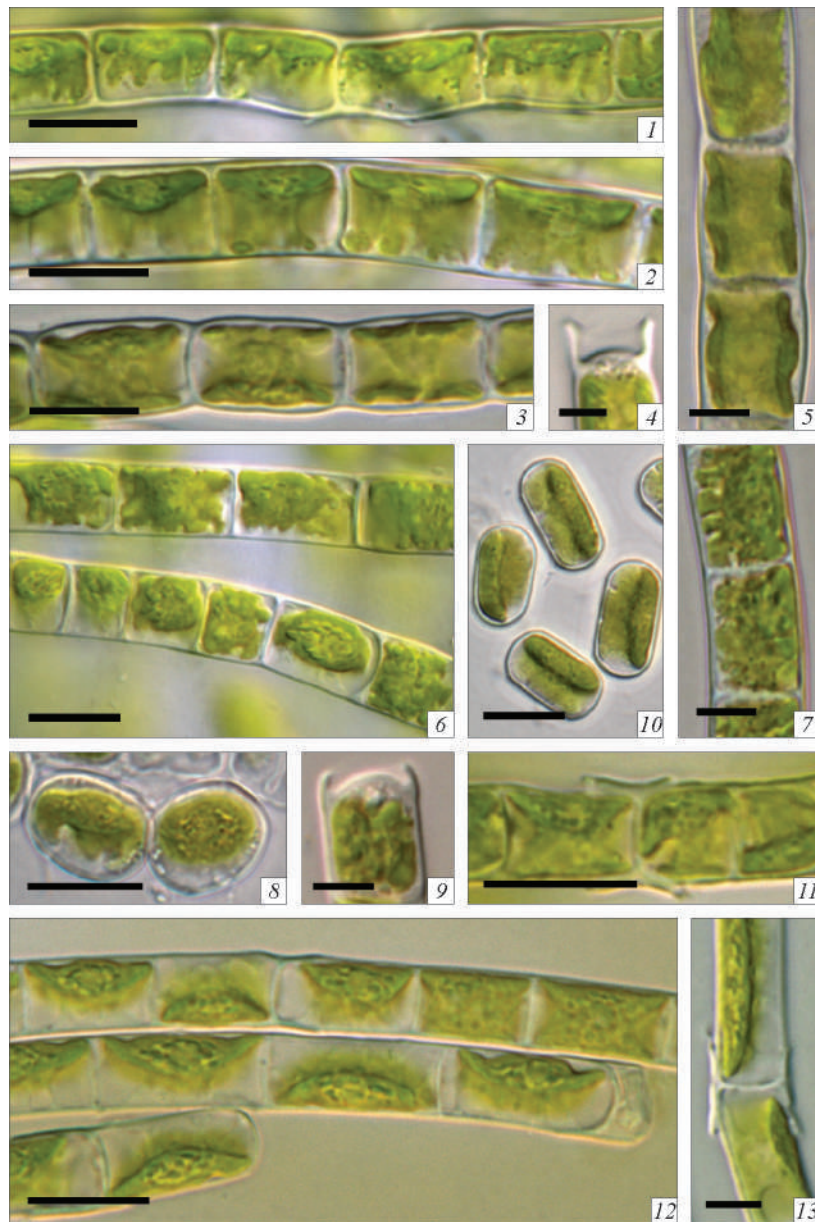


Рис. 4.13. Морфологічні особливості представників *Klebsormidium* морфолого-генетичних груп «Bilatum / Elegans» і «Flaccidum»:

1, 2 — *K. elegans*, штам SAG 7.96; 3–5 — *K. bilatum* (3, 4 — штам SAG 5.96 (4 — Н-подібний фрагмент оболонки); 5 — 13 TR); 6–10 — східноєвропейські штами групи «Flaccidum» (6–9 — штами з міцними нитками; 6, 8, 9 — TR 42 (8 — *Interfilum*-подібні клітини у старій культурі, 9 — Н-подібний фрагмент оболонки), 7 — *Vasota*); 10 — штам з легкодезінтегруючими нитками, TR 44); 11–13 — західноєвропейський штам групи «Flaccidum», SAG 12.91 (11, 13 — Н-подібні фрагменти оболонок у середині ниток). Лінійка — 10 мкм (1–3, 6, 8, 10–12), 5 мкм (4, 5, 7, 9, 13)

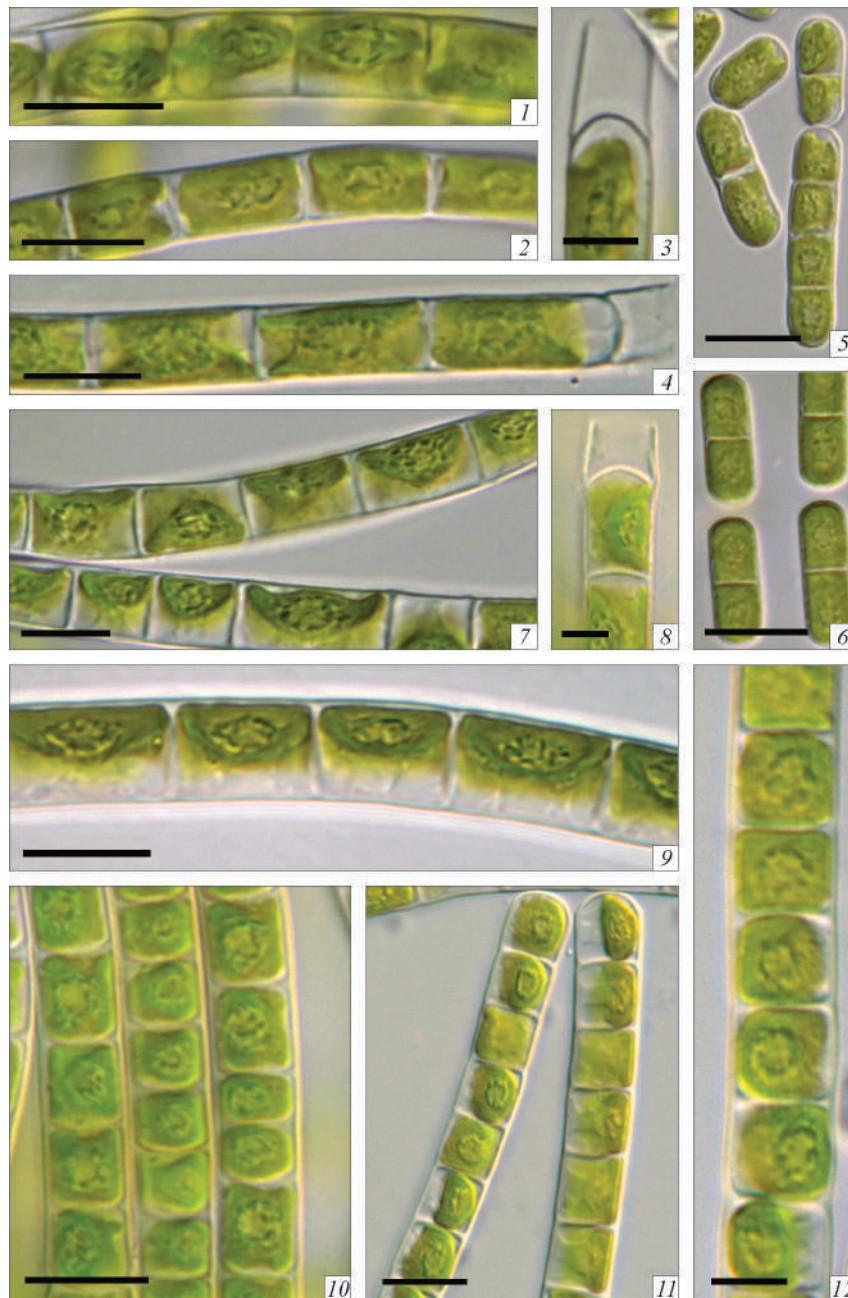


Рис. 4.14. Морфологічні особливості представників *Klebsormidium* морфолого-генетичної групи «Nitens»:

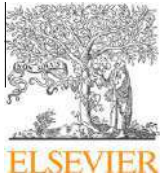
1–4 – морфотип «acidophilum» (1–3 – штам ССАР 335.12, 3 – Н-подібний фрагмент оболонки, 4 – штам ССАР 335.16); 5, 6 – морфотип «nitens-tyrica», штамми SAG 335-2b (5) і SAG 2155 (6); 7–9 – морфотип «fluitans», штам SAG 9.96 (8 – Н-подібний фрагмент оболонки); 10–12 – морфотип «pseudoflaccidum» (10 – штам SAG 33.91; 11, 12 – штам TR 41. Лінійка – 10 мкм (1, 2, 4–7, 6–11), 5 мкм (3, 8, 12)



Рис. 4.15. Морфологічні особливості представників *Klebsormidium* морфолого-генетичної групи «Nitens» та «аномальні» форми:

1–4 — морфотип «pseudointerfilum/dissectum» (1 — штам SAG 2109, 2, 3 — SAG 2108; 4 — SAG 2107; 5–9 — «аномальні» форми *Klebsormidium* (5 — штам TR 18, 6, 7 — TR 24, 8 — Biota-14621.10.54, 9 — TR 31. Лінійка — 10 мкм

**2.1.2. Філогенетичні взаємозв'язки центральних родів Klebsormidiphyceae –
Interfilum та *Klebsormidium* (Streptophyta)**



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Phylogenetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ympevPhylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta)Fabio Rindi^{a,*}, Tatiana I. Mikhailyuk^b, Hans J. Sluiman^c, Thomas Friedl^d, Juan M. López-Bautista^e^a *Università Politecnica delle Marche, Dipartimento di Scienze del Mare, Via Brecce Bianche, 60131 Ancona, Italy*^b *M.H. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereschenkivska St. 2, Kyiv, UA-01001, Ukraine*^c *Royal Botanic Garden Edinburgh, 20A Inverleith Row, Edinburgh EH3 5LR, Scotland, UK*^d *Experimental Phycology and Culture Collection of Algae, Georg-August University Göttingen, Untere Karspüle 2, 37073 Göttingen, Germany*^e *Department of Biological Sciences, The University of Alabama, P.O. Box 870345, 425 Scientific Collections Bldg., Tuscaloosa, AL 35487-0345, USA*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 May 2010

Revised 29 November 2010

Accepted 30 November 2010

Available online 9 December 2010

Keywords:

Green algae

Interfilum

ITS rRNA

Klebsormidiales

Klebsormidium

Molecular systematics

Phylogeny

rbcL gene

Streptophyta

ABSTRACT

Members of the genus *Klebsormidium* have cosmopolitan distribution and occur in a very wide range of freshwater and terrestrial habitats. Due to its simple filamentous morphology, this genus represents a taxonomically and systematically complex taxon in which phylogenetic relationships are still poorly understood. The phylogeny of *Klebsormidium* and closely related taxa was investigated using new ITS rRNA and *rbcL* sequences generated from 75 strains (isolated from field samples or obtained from culture collections). These sequences were analyzed both as single-marker datasets and in a concatenated dataset. Seven main superclades were observed in the analyses, which included sixteen well-supported clades. Some species of *Klebsormidium*, including the type species *Klebsormidium flaccidum*, were polyphyletic. *Interfilum* was recovered with high statistical support as sister taxon to a clade of *Klebsormidium* formed mainly by strains identified as *K. flaccidum*. Whereas some clades could be easily associated with described species, this was not possible for other clades. A new lineage of *Klebsormidium*, isolated from arid soils in southern Africa and comprising undescribed species, was discovered. Several morphological characters traditionally used for taxonomic purposes were found to have no phylogenetic significance and in some cases showed intra-clade variation. The capacity to form packet-like aggregates (typical of *Interfilum*), features of the morphology of the chloroplast and the type of habitat were the main phylogenetically relevant characters. Overall, *Klebsormidium* and *Interfilum* formed a more diverse algal group than was previously appreciated, with some lineages apparently undergoing active evolutionary radiation; in these lineages the genetic variation observed did not match the morphological and ecological diversity.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Green algae with a thallus formed by uniseriate filaments are among the most widespread and ecologically versatile photosynthetic eukaryotes. Organisms with this type of morphology occur in almost all aquatic and terrestrial environments and belong to five major green algal lineages (Chlorophyceae, Klebsormidiophyceae, Trebouxiophyceae, Ulvophyceae and Zygnemophyceae; Lewis and McCourt, 2004).

Klebsormidium P.C. Silva, Mattox et Blackwell is a cosmopolitan genus of filamentous green algae to which 20 species are currently ascribed (Guiry and Guiry, 2010). Species of *Klebsormidium* are common in the microalgal vegetation of many terrestrial and freshwater environments, occurring in habitats as diverse as

streams and rivers (Printz, 1964; John, 2002), margin of lakes (Lokhorst, 1996), bogs (John, 2002), soil (Ettl and Gärtner, 1995), natural rocks in plains and mountainous areas (Mikhailyuk et al., 2003), tree bark (Handa et al., 1991), acidic post-mining sites and water bodies (Lukešová, 2001; Sabater et al., 2003), golf courses (Baldwin and Whitton, 1992), sand dunes (Smith et al., 2004), biotic crusts of hot deserts (Lewis, 2007), bases of urban walls (Rindi and Guiry, 2004) and building façades (Barberousse et al., 2006). Species of *Klebsormidium* consist of uniseriate filaments devoid of differentiated or specialized cells. Each cell has a parietal chloroplast containing a pyrenoid and encircling half to 3/4 of the cell wall; reproduction takes place by biflagellate asymmetrical zoospores devoid of stigma that are produced singly in unspecialized cells, from which they escape through a pore (Silva et al., 1972; Lokhorst, 1991; Sluiman et al., 2008). The distinctness of *Klebsormidium* from similar genera of green algae was highlighted by TEM observations of cell division and zoospore ultrastructure

* Corresponding author. Fax: +39 071 2204650.

E-mail address: f.rindi@univpm.it (F. Rindi).

(Floyd et al., 1972; Marchant et al., 1973; Lokhorst and Star, 1985). Stewart and Mattox (1975) established the placement of *Klebsormidium* in the Charophyceae, noting the presence of ultrastructural characters typical of this class (a persistent interzonal mitotic spindle, two laterally inserted flagella, a single broad band of microtubules associated with the flagellar basal bodies). These authors also based on *Klebsormidium* the new family Klebsormidiaceae and the new order Klebsormidiales, using characters specific to this taxon (centripetal cleavage furrow, little change in chromosome to spindle pole distance during anaphase, persistent chromosomal microtubules at telophase, and absence of plasmodesmata). The circumscription of the Klebsormidiales has changed over time as new data became available (Lokhorst, 1991; Van den Hoek et al., 1995; Sluiman et al., 2008) and is not yet fully clarified; it has been established that species of two other filamentous genera, *Entransia* Hughes and *Hormidiella* Iyengar et Khantamma, are the closest known relatives of *Klebsormidium* (Karol et al., 2001; Sluiman et al., 2008). Molecular data have confirmed conclusions based on ultrastructure and have robustly established the position of *Klebsormidium* and related taxa in the streptophyten lineage (Kranz et al., 1995; Karol et al., 2001; Turmel et al., 2002; Qiu et al., 2006). In more recent treatments this group has been regarded as an independent class, the Klebsormidiophyceae (Van den Hoek et al., 1995; Lewis and McCourt, 2004; Becker and Marin, 2009).

The reconstruction of the phylogenetic relationships in *Klebsormidium* and closely related taxa is problematic. Until recently the taxonomy of these algae was based on morphological data, which offer only a limited set of characters. Width and length of filaments, shape of cells, texture of the cell wall, presence/absence of a mucilaginous envelope, presence/absence of cell doublets or false branches, formation of H-shaped pieces, shape of the chloroplast and shape and size of the pyrenoid are the characters most commonly used for identification of field-collected specimens of *Klebsormidium* (Hazen, 1902; Printz, 1964; Ramanathan, 1964; Ettl and Gärtner, 1995; Lokhorst, 1996; Rifón-Lastra and Nogueroles-Seoane, 2001; John, 2002). Some authors (Lokhorst, 1996) have attached more taxonomic significance to characters observable in liquid cultures, such as: presence/absence of a superficial hydrorepellent layer; tendency to fragment into short unattached filaments; type of reproduction (zoosporogenesis only or zoosporogenesis in combination with aplanosporogenesis); ease of inducibility of release of zoospores; shape of release aperture in lateral wall of zoosporangial cell (large and distinct or small and indistinct); and germination pattern of zoospores (unipolar or bipolar or unipolar only). It is known, however, that several characters exhibit great phenotypic plasticity and may vary dramatically in relation to environmental conditions and physiological state of the specimens examined (Lokhorst, 1996; Dřimalová and Pouličková, 2003; Škaloud, 2006; Rindi et al., 2008). It is presently unclear how morphological characters have evolved and which characters must be considered phylogenetically significant. In this regard, unfortunately, our understanding of the evolutionary history of the group is too limited to be of any assistance. No fossil record is available for *Klebsormidium* (a situation that is general to the green algae, with the exception of a few groups provided with calcified cell walls, e.g. McCourt et al., 1996; Verbruggen et al., 2009). Therefore, it is unknown what was the morphology of the ancestral klebsormidiallean alga and what character states should be considered ancestral.

Molecular studies focused on phylogeny at genus and species level have become available recently and have led to several unexpected discoveries (Novis, 2006; Mikhailuyuk et al., 2008; Rindi et al., 2008; Sluiman et al., 2008). Sluiman et al. (2008) demonstrated that *Entransia fimbriata* Hughes and *Hormidiella attenuata* Lokhorst are the closest relatives to *Klebsormidium* currently known. The topology of the ITS rRNA tree presented by these

authors is in disagreement with the morphological parsimony trees presented by Lokhorst (1996). Rindi et al. (2008), whose analyses included the largest taxon sampling of *Klebsormidium* strains currently available, found great difficulties in mapping morphological characters with phylogenetic significance on their *rbcl* trees. Recently, Mikhailuyuk et al. (2008) showed that *Interfilum* Chodat et Topali is closely related to *Klebsormidium*, but they were not able to clarify the relationships between these genera. Species of *Interfilum* consist of unicells, packet-like aggregates or filaments of cells united by thin mucilaginous envelopes or strands of cell wall material (Chodat and Topali, 1922; John, 2002; Mikhailuyuk et al., 2008). This finding revolutionised the concept of morphological evolution in *Klebsormidium* and close relatives, revealing that this group encompasses a wider range of morphological forms than previously appreciated. Overall, these studies indicate that our understanding of the genetic diversity and phylogeny of this algal group is still very incomplete and that new data are required.

In the present study, 29 new *rbcl* sequences and 66 new ITS rRNA sequences of *Interfilum* and *Klebsormidium* are added to the body of molecular data previously available. Sequences of these markers are also analyzed for the first time in a concatenated dataset. Our results extend considerably the taxon sampling and provide robust phylogenies that advance substantially our understanding of the relationships of these algae. These data will be of fundamental importance for future reassessments of the classification of the order Klebsormidiales.

2. Materials and methods

2.1. Collections, taxon sampling and vouchering

Samples of *Klebsormidium* and *Interfilum* were isolated by the authors or external collaborators or obtained from culture collections (Supplementary Table 1). For the new samples isolated in the course of this study, the following morphological characters were examined in freshly isolated cultures: habit of filaments; tendency to fragmentation; width and length of cells; shape of cells; formation of H-shaped pieces; thickness and texture of the cell wall; formation of a mucilaginous envelope; shape of the chloroplast; shape and size of pyrenoid; macroscopic habit on agar; macroscopic habit in liquid culture. For strains isolated in previous studies and included in the phylogenetic analyses, information on the morphology is available in Lokhorst (1996), Novis (2006), Mikhailuyuk et al. (2008), Rindi et al. (2008).

2.2. Culture conditions and microscopic observations on new strains

Cultures of strains isolated in this study were maintained on agar slants with Bold' Basal Medium with vitamins and triple nitrate (Starr and Zeikus, 1987) at 18 °C under a 14:10 h L:D regime at a photon irradiance of about 25 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ from white fluorescent bulbs. Microscopic observation was performed using an Olympus BX60 microscope (Olympus Europa Holding, Hamburg, Germany) with Nomarski DIC optics or with a Mikmed-2 bright field microscope on cultures not older than 5 weeks. Micrographs were taken with a ColorView III camera (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany) in connection with the Cell^{AD} imaging software (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany).

2.3. DNA extraction, PCR and sequencing

DNA was extracted from strains of *Klebsormidium* and *Interfilum* as detailed in Supplementary Table 1. PCR and sequencing of the *rbcl* gene were performed at the University of Alabama following

the methods of Rindi et al. (2008). PCR and sequencing of the ITS rRNA were performed at the Georg-August University Göttingen following the methods of Mikhailyuk et al. (2008).

2.4. Sequence alignment and phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses were performed separately on the two markers sequenced and on a concatenated ITS rRNA-*rbcl* dataset. Besides the new sequences produced in this study, most of the *rbcl* and ITS sequences available in GenBank were included in the alignments and used for the analyses. The *rbcl* alignment was constructed by eye using MacClade 4.05 (Maddison and Maddison, 2002); it consisted of 1149 basepairs, corresponding to the positions 61–1209 of the complete sequence of *Chlorella vulgaris* AB001684 (Wakasugi et al., 1997). No indels were created in the alignment. For *rbcl*, several preliminary analyses were performed in order to establish the best rooting method, following the recommendations of Verbruggen and Theriot (2008). Overall, these analyses showed a limited effect of the choice of the outgroup, providing identical topologies and very similar support values in all cases (including midpoint rooted trees devoid of designated outgroups). We present here trees in which species of *Klebsormidium* and *Interfilum* were treated as ingroup taxa, rooted using as outgroups *Chlorokybus atmophyticus* AY823706, *E. fimbriata* AF203496 (sequence obtained from strain UTEX2353) and a newly produced sequence of *H. attenuata* CCAP329/1 (HQ613235). Based on the information currently available (Karol et al., 2001; Turmel et al., 2002; Sluiman et al., 2008) these taxa are the closest known relatives of *Klebsormidium*, and therefore represent the most logical choice as outgroups. The ITS alignment consisted of 517 basepairs of the ITS-1 and ITS-2 regions that could be aligned unambiguously. To guide the alignment of the sequences, we used the secondary structure models of Mikhailyuk et al. (2008) (which were in turn based on those of Sluiman et al., 2008) and the corresponding alignment used by these authors. The newly generated sequences for the present study did not necessitate modification of the secondary structure models developed by Mikhailyuk et al. (2008). For the ITS dataset, it was chosen to perform the analyses only on *Klebsormidium* and *Interfilum* using midpoint rooting. The reason was that, as noted previously by Sluiman et al. (2008), alignment of complete ITS-1 and ITS-2 regions of all klebsormidial taxa including *E. fimbriata* UTEX2353 and *H. attenuata* CCAP329/1 proved to be problematic due to the high level of divergence of the unpaired inter-helix domains of these two species; it was therefore chosen not to use them. Despite different rooting methods, the analyses performed separately on the two markers showed a congruent phylogenetic signal and recovered equivalent topologies. In consideration of this, it was decided to join in a concatenated dataset 42 taxa for which both ITS and *rbcl* could be sequenced successfully. The concatenated dataset *rbcl*-ITS consisted of 1665 basepairs.

Phylogenetic inference was based on Neighbor Joining (NJ), Maximum-Likelihood (ML) and Bayesian (BI) analyses. NJ was performed using PAUP* 4.0b10 (Swofford, 1998). For the *rbcl* and ITS

rRNA datasets, NJ analyses were based on Maximum-Likelihood corrected distances. The parameters used to set the distances were obtained with ModelTest 3.7 (Posada and Crandall, 1998) under the Akaike Information Criterion (AIC). For the combined *rbcl*-ITS dataset, the analysis was based on uncorrected *p*-distances. For *rbcl* and the combined *rbcl*-ITS dataset, the model-based analyses (ML and BI) were performed on partitioned datasets, applying separate models to each partition. Three partitions were used for *rbcl* (first, second and third codon position); four partitions were used for the combined dataset (the three codon positions of *rbcl* and the whole ITS). Recent studies in which partitioning strategies were selected after tests based on the Bayesian Information Criterion (Verbruggen et al., 2010) indicated that the partition of protein-coding organellar genes in first, second and third codon position is a recommendable strategy, and we therefore decided to adopt it for our *rbcl* dataset. ML was performed using Treefinder (version October 2008; Jobb, 2008). The models and parameters selected by Treefinder under the corrected Akaike Information Criterion (AICc) were applied in the analysis. For NJ and ML, nodal support was assessed by non-parametric bootstrap analysis (Felsenstein, 1985) with 1000 resamplings.

BI was performed using MrBayes 3.04 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). Two parallel runs of four Monte Carlo Markov Chains (one cold and three incrementally heated) were conducted for 2000,000 generations, with tree sampling every 100 generations. Priors and probability proposals set as default in MrBayes were used. The stationary distribution of the runs was verified before to stop the analysis; it was assumed that the stationary distribution was reached when the average standard deviations of split frequencies between the two runs was lower than 0.01. The burn-in phase was assessed by plotting the number of generations against the likelihood scores and determining where the analysis reached stationarity; 100,000–400,000 generations were discarded as burn-in, and the remaining samples were used to construct the majority-rule consensus trees. In the *rbcl* and *rbcl*-ITS analyses, separate models were applied to each partition by setting number of substitution types, gamma shape parameter and proportion of invariable sites in accordance with the results of ModelTest. The parameters were unlinked and allowed to vary across partitions.

3. Results

Details of the characteristics of the datasets analyzed are presented in Table 1. For each dataset analyzed, analyses performed with different methods of inference provided similar topologies, usually with limited differences in nodal support. The *rbcl* gene and the ITS rRNA showed congruent phylogenetic signals and identical groups were recovered in the two phylogenies. However, most internal nodes did not receive significant statistical support in any analysis for any dataset.

The results of the ITS and *rbcl* analyses are shown in Figs. 1 and 2, respectively; the results of the analyses on the concatenated dataset are shown in Fig. 3. Seven main superclades (indicated

Table 1
Summary of the characteristics of the datasets analyzed.

	ITS rRNA	<i>rbcl</i>
Parsimony-informative characters	114 (22%)	296 (26%)
Parsimony-uninformative characters	42 (8%)	40 (3.5%)
Constant characters	361 (70%)	813 (71%)
Average uncorrected <i>p</i> -distance	5%	8.5%
Range of uncorrected <i>p</i> -distance	0.2–10.9%	0.2–16%
Taxa with maximal uncorrected <i>p</i> -distance	<i>Interfilum terricola</i> LUK305 <i>Klebsormidium</i> sp. 14613.5e	<i>Klebsormidium</i> cf. <i>flaccidum</i> Lira7 <i>Klebsormidium</i> sp. 14621.6

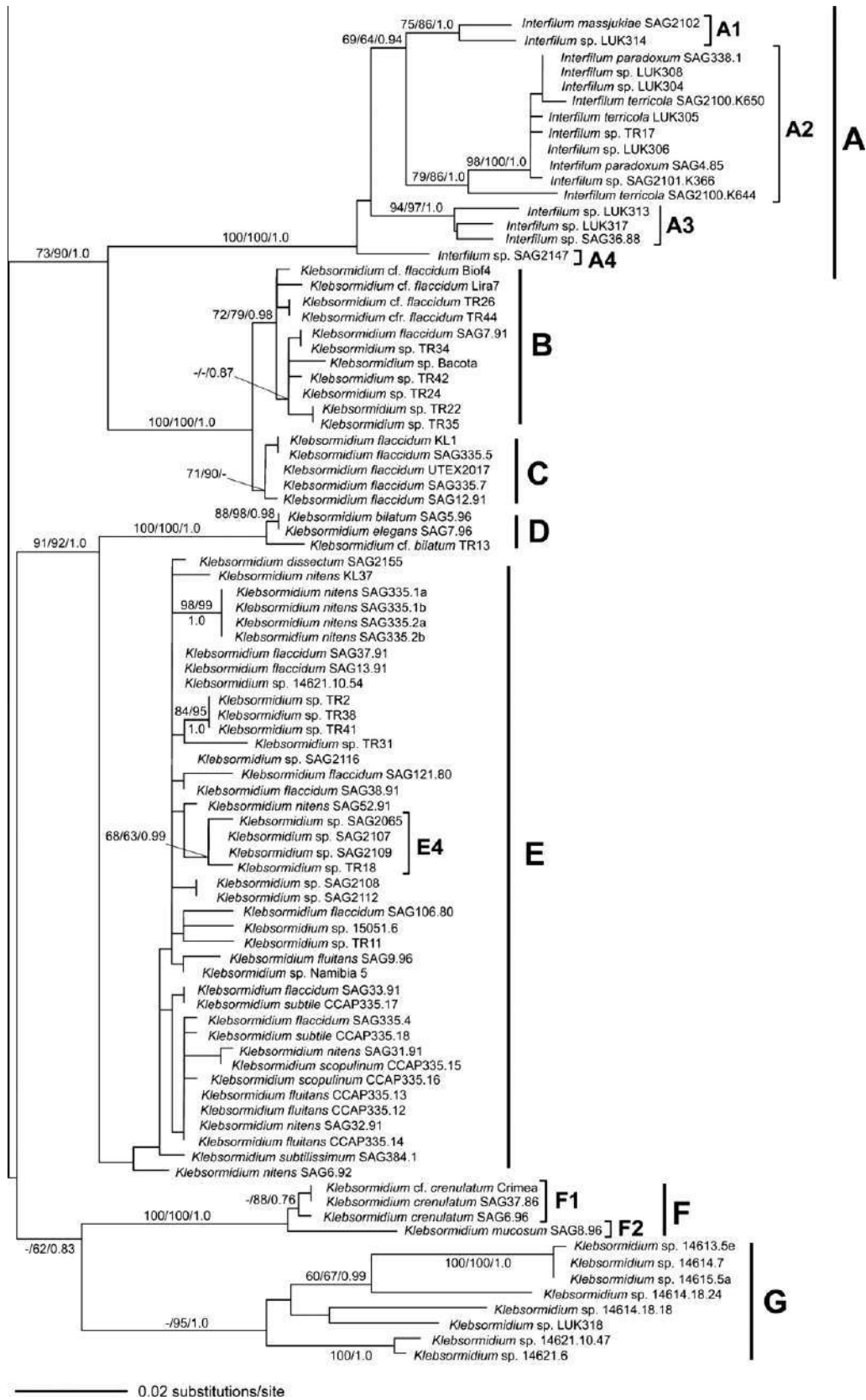


Fig. 1. Phylogram inferred from Maximum-Likelihood analysis of the ITS rRNA in the Klebsormidiales, with bootstrap support (BP) and Bayesian Posterior Probabilities (PP) indicated at the nodes. From left to right and from top to bottom the support values correspond to Neighbor Joining BP, Maximum-Likelihood BP and Bayesian PP. BP values lower than 60% and PP lower than 0.8 are not shown.



Fig. 2. Phylogram inferred from Maximum-Likelihood analysis of the *rbcL* gene in the Klebsormidiales, with bootstrap support (BP) and Bayesian Posterior Probabilities (PP) indicated at the nodes. From left to right and from top to bottom the support values correspond to Neighbor Joining BP, Maximum-Likelihood BP and Bayesian PP. BP values lower than 60% and PP lower than 0.8 are not reported. The tree was rooted using the sequences of *Hormidiella attenuata*, *Entransia fimbriata* and *Chlorokybus atmophyticus* specified in the Section 2.

with letters: A, B, C, D, E, F, G) were recovered in all phylogenies with moderate to high support. Additionally, in the ITS phylogeny four highly supported clades were identified within superclade A (indicated as A1, A2, A3 and A4 in Fig. 1) and in the *rbcL* phylogeny

six highly supported clades were recognized within clade E (indicated as E1, E2, E3, E4, E5 and E6 in Fig. 2). Two clades were also observed within the superclade F. All strains for which both markers could be sequenced occurred in corresponding superclades in

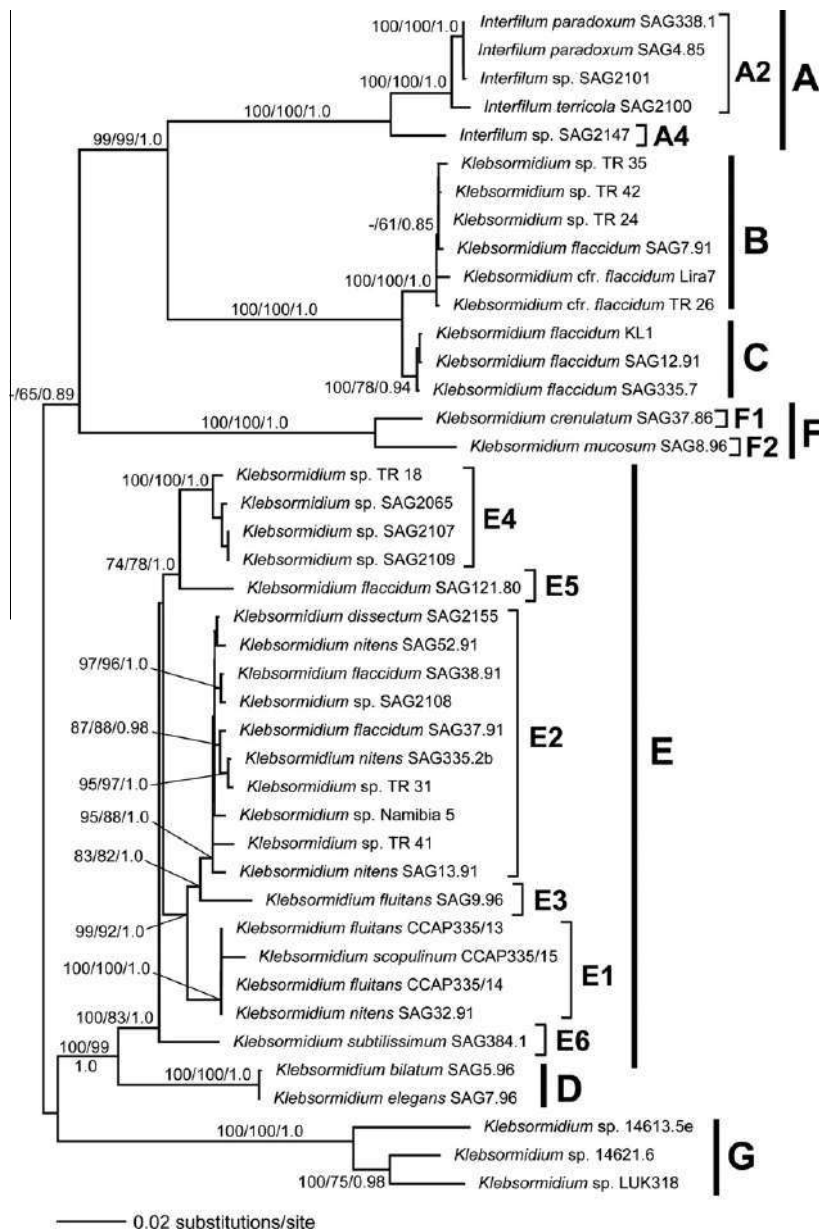


Fig. 3. Phylogram inferred from Maximum-Likelihood analysis of the concatenated dataset *rbcl*-ITS rRNA in the Klebsormidiales, with bootstrap support (BP) and Bayesian Posterior Probabilities (PP) indicated at the nodes. From left to right and from top to bottom the support values correspond to Neighbor Joining BP, Maximum-Likelihood BP and Bayesian PP. BP values lower than 60% and PP lower than 0.8 are not reported.

the two phylogenies. Morphological data of the strains belonging to these superclades/clades and habitat information are summarized in Table 2, and micrographs of a selection of the strains can be found in Figs. 4 and 5.

Superclade A corresponded taxonomically to the genus *Interfilum* and was recovered with high support in both phylogenies. More strains could be sequenced for ITS than for *rbcl*, and within this superclade ITS showed generally higher resolution. Four well-supported clades were found in the ITS phylogeny. The two most derived ones were referable to described morphological species (A1 to *I. massjukiae* Mikhailyuk et al., and A2 to *I. paradoxum* Chodat & Topali/*I. terricola* (J.B. Petersen) Mikhailyuk et al.). A3 and A4, the two earliest-diverging clades, could not be identified unambiguously, and may represent undescribed taxa. The separation of these four clades was supported by morphological differences (Table 2; see also Mikhailyuk et al., 2008).

Superclade A was sister with moderate support to a lineage formed by superclades B and C. A sister relationship between superclades B and C was recovered with very high support in both the ITS and *rbcl* analyses. Superclade B was composed of unidentified *Klebsormidium* strains isolated mainly from terrestrial habitats in eastern Europe (Ukraine and Russia). These strains showed morphological similarity to *K. flaccidum* (Kützing) P.C. Silva, Mattox & Blackwell, but they differed from it in some characters (in particular the morphology of the chloroplast) and could not be identified unambiguously. Superclade C included strains identified as *K. flaccidum* obtained from culture collections, isolated from different types of habitats mainly in western Europe.

Superclades D and E were recovered as sister taxa with moderate to high support in both phylogenies. Superclade D was formed by strains identified as (or morphologically resembling) *K. bilatum* Lokhorst and *K. elegans* Lokhorst. The strains *K. bilatum* SAG5.96

Table 2

Synopsis of the morphological features of the clades of Klebsormidiales recovered in the phylogenetic analyses. For some clades, the information is partially or primarily based on data published in other studies (Lokhorst, 1996; Novis, 2006; Mikhailuyk et al., 2008; Rindi et al., 2008).

Clade	Taxon with nomenclatural priority	Other taxa belonging to clade	Habitat	Morphology
A1	<i>Interfilum massjukiae</i>		Cracks in surface of natural rocks and soil; so far known only from eastern Europe	Cells aggregated in groups of 2–4, sometimes forming large multicellular cubic aggregations, uni- and bi-seriate branched filaments. Cells widely ellipsoid to rounded or hemispherical, (6) 7–11 µm long, (5) 6.4–9 µm wide; terminal cells in branched filaments 10–15 µm long; cell walls thick, without mucilage. Chloroplast parietal, plate-shaped, dissected in 5–8 lobes. Pyrenoid surrounded by one to several layers of starch. Cell division in three planes. Remnants of mother cell wall (if observed) with cap-like habit. Reproduction exclusively by fragmentation
A2	<i>Interfilum paradoxum</i>	<i>Interfilum terricola</i>	Soil and terrestrial habitats, rarely freshwater	Cells single or in pairs, sometimes forming short filaments or chains of cells. Cells ellipsoid, widely ellipsoid, oviform to rounded or hemispherical, (6) 7–10 (11) µm long, (4.5) 5.5–7 (7.5) µm wide, surrounded by clear mucilage envelope with striation. Chloroplast and pyrenoid with morphology similar to <i>I. massjukiae</i> . Remnants of mother cell wall well-developed, cap-like or forming threads between cells. Reproduction exclusively by fragmentation
A3	<i>Interfilum</i> sp.		Soil	Cells single or in pairs, sometimes forming short filaments. Cells ellipsoid, stretch-oviform to cylindrical, sometimes curved, (7) 9–13 (18) µm long, (4) 5–6 (7) µm wide. Chloroplast and pyrenoid with similar morphology to other species of <i>Interfilum</i> . Habit of mucilage envelope similar to <i>I. paradoxum</i> and <i>I. terricola</i> . Remnants of mother wall well-developed, cap-like. Reproduction exclusively by fragmentation.
A4	<i>Interfilum</i> sp.		Soil	Cells aggregated in strong groups of 4–16 and more cells. Cells widely ellipsoid to rounded or hemispherical, (5) 6–7.5 (9) µm long, (3) 4.5–6 (7) µm wide; cell walls thick, without mucilage. Chloroplast and pyrenoid with the same morphology as for the clades A1–A3. Cell division in three planes. Reproduction exclusively by fragmentation.
B	<i>Klebsormidium</i> sp.	Possibly <i>Klebsormidium dissectum</i> ?	Mainly natural rocks and soil, but also freshwater; so far recorded from eastern Europe.	Filaments long or easily disintegrated, (6) 6.8–8 (12) µm wide, not or slightly constricted; some strains showing fast and vigorous fragmentation; cells cylindrical, sometimes slightly swollen, (0.7)1.5–1.8 times as long as wide; cell doublets present in some strains; cell wall thin to moderately thickened; H-pieces absent or present; chloroplast covering 1/2–2/3 of the cell wall, with margins crenulated or irregularly dissected; pyrenoid large, surrounded by several layers of starch. In liquid media forming superficial hydrorepellent layer and submerged tufts; on agar forming waved colonies or colonies with homogeneous margins; reproduction appears to take place only by filament fragmentation
C	<i>Klebsormidium flaccidum</i>		Soil and freshwater habitats; so far recorded mainly from western Europe	Filaments long, 6–8 µm wide, not or slightly constricted; cells cylindrical, 1–1.4(2.4) times as long as wide; cell doublets absent; cell wall thin to moderately thickened; H-pieces absent or present (if present, not clear and located in the middle parts of the filaments); chloroplast covering 1/2–2/3 of the cell wall, with margins usually smooth, pyrenoid large, surrounded by several layers of starch. In liquid media forming superficial hydrorepellent layer and submerged tufts; on agar forming waved colonies; asexual reproduction by zoosporogenesis, easily inducible; release aperture small and indistinct; germination unipolar and bipolar
D	<i>Klebsormidium bilatum</i> / <i>Klebsormidium elegans</i>		Humid soils, particularly at margin of water bodies; bark at the base of trees, natural rocks.	Filaments long, generally robust but sometimes easily dissociating when old, 7–9(10.2) µm wide, sometimes growing in rope-like aggregates; cells cylindrical to barrel-shaped, 1–1.5(2.2) times as long as wide; cell doublets may be present or not; cell wall thin to moderately thickened; H-pieces present, prominent; chloroplast covering half to 3/4 of the cell wall, with a median incision in the margin, dissected in four or more lobes; pyrenoid large, surrounded by several layers of starch. In liquid media forming submerged tufts; the superficial layer may be present or not; on agar, forming wavy colonies with small waves; asexual reproduction absent or present, if present it takes place by zoosporogenesis and aplanosporogenesis; zoosporogenesis not easily inducible; release aperture small, not easily visible; germination unipolar
E1	<i>Klebsormidium acidophilum</i>	Probably <i>Klebsormidium scopulinum</i> and <i>Klebsormidium subtile</i>	Freshwater, including low pH habitats; rivers, streams.	Filaments long, either easily dissociating or not, 5–7(9) µm wide, without constrictions; cells stretch-cylindrical to cylindrical and slightly swollen, 1–3 times as long as wide; cell walls thin to moderately thickened; H-pieces absent or present; chloroplast covering approximately half of the cell wall, with smooth or slightly lobed margins; pyrenoid medium-sized, surrounded by a layer of starch. In liquid media forming a mixture of long and short filaments; on agar forming homogeneous growths with rough surface; reproduction only by filament fragmentation.
E2	<i>Klebsormidium nitens</i>	Probably	Soil, freshwater,	Filaments either long or short, (4)5–6.5(9) µm wide; tendency to

Table 2 (continued)

Clade	Taxon with nomenclatural priority	Other taxa belonging to clade	Habitat	Morphology
		<i>Klebsormidium klebsii</i>	natural rocks, artificial surfaces including bases of urban walls.	fragmentation variable between strains, but usually strong; cells cylindrical, constricted, (0.5)1–1.5(3) times as long as wide; cell wall thin to moderately thickened; H-pieces usually absent, but present in some strains; chloroplast covering 1/2–2/3 of the cell wall, with smooth margins, delicately lobed in some strains; pyrenoid small, usually surrounded by a layer of starch. In liquid culture forming submerged tufts and superficial layer, but the development of the superficial layer varies considerably between strains; on agar forming smooth colonies or wavy growths with homogeneous margin; asexual reproduction by zoosporogenesis, either easily inducible or not; release aperture large, well discernible; germination unipolar
E3	<i>Klebsormidium fluitans</i>		Freshwater and margin of freshwater bodies; humid soil	Filaments long, not easily dissociating, 7–8.5(10.2) μm wide; cells cylindrical to square or slightly swollen, 1–1.5 times as long as wide; cell wall thin, thickened in old cells; H-pieces present; chloroplast covering 1/2–3/4 of the cell wall, with margins smooth, sometimes slightly lobed; pyrenoid medium-sized, surrounded by several layers of starch. In liquid culture, submerged tufts present, superficial layer either present or absent; on agar, forming growths with rough surface; zoosporogenesis easily inducible; release aperture small, not easily visible; germination either unipolar or bipolar
E4	<i>Klebsormidium</i> sp.		Primarily epilithic; particularly common at the bases of urban walls	Filaments long in field specimens and young cultures, sometimes with slight constrictions, 5–9 μm wide; in mature cultures they may either remain long or disintegrate to short filaments and unicells, 5.5–8 μm wide, with cells cylindrical, more or less swollen or ellipsoid, 0.5–2 times as long as wide; cell doublets present in some strains; cell wall thin to moderately thickened; H-pieces absent; chloroplast covering 1/2–2/3 of the cell wall, either entire with smooth margins or lobed; pyrenoid medium-sized, surrounded by a layer of starch. In liquid culture forming submerged tufts, which may become completely fragmented; superficial layer absent in most strains but present in some; on agar, forming homogeneous colonies with smooth surface; reproduction only by filament fragmentation.
E5	<i>Klebsormidium</i> sp.		Tree bark and wooden surfaces	Filaments long, easily dissociating or not dissociating, 6–7 μm wide; cells cylindrical, 1–2 times as long as wide; cell doublets absent; cell wall medium-thickened; H-pieces absent; chloroplast covering 1/2–2/3 of the cell wall, with smooth margins; pyrenoid surrounded by a layer of starch. In liquid culture, forming submerged tufts and superficial layer; submerged filaments may become more or less fragmented; on agar, forming homogeneous growths with rough surface; reproduction only by filament fragmentation
E6	<i>Klebsormidium subtilissimum</i>		Not known in detail; the specimens sequenced were originally isolated from snow in Alaska	Filaments long, but easy disintegrated, curved, 5–6 μm wide, slightly constricted; cells cylindrical, (1)1.5–1.7 times as long as wide; cell wall moderately thickened; H-pieces present; chloroplast covering 1/2–2/3 of the cell wall, with smooth margins; pyrenoid small, surrounded by a layer of starch. In liquid media forming a mixture of long and short filaments; on agar forming wavy colonies with homogeneous margin.
F1	<i>Klebsormidium crenulatum</i>	Possibly <i>Klebsormidium lamellosum</i> and <i>Klebsormidium montanum</i>	Soil, especially sandy; margin of water bodies; base of tree trunks; natural rocks.	Filaments long, strong, thick, (9)13–15(18) μm wide, sometimes growing in rope-like aggregates; cells cylindrical, becoming barrel-shaped and narrow-square in old filaments, 0.5–1(1.5) times as long as wide; cell doublets occasionally present; cell wall initially thin, becoming thick and corrugated in old filaments; H-pieces common, prominent; chloroplast girdle-shaped, almost ring-like, covering most of the cell wall, with longitudinal margins smooth or slightly lobed; pyrenoid large, surrounded by several layers of small starch grains. In liquid media forming only submerged tufts, on agar forming rough, waved colonies with moss-like habit; asexual reproduction absent or not easily inducible; if present, it takes place by either zoosporogenesis or aplanosporogenesis; release aperture irregular and not easily observable; germination unipolar.
F2	<i>Klebsormidium mucosum</i>		Soil, margin of water bodies	Morphology very similar to <i>K. crenulatum</i> , but with thicker filaments, (13)15–20(23) μm wide. In liquid media forming only submerged tufts; on agar forming rough, waved colonies with moss-like habit; reproduction only by filament fragmentation.
G	<i>Klebsormidium</i> sp.		Arid soils, mainly in biotic crusts of warm desertic areas	Long filaments with tendency to disintegration, becoming completely disintegrated in some strains, curved, strongly constricted, bead-like, 4.5–8 μm wide; cells short or square, elongated in old filaments, 0.5–1(3) times as long as wide; cell wall thin to moderately thickened; H-pieces present or absent; chloroplast with smooth margin, often four-lobed; pyrenoid small, surrounded by a few starch grains. In liquid media forming mixture of short and long filaments; on agar forming cluster- and knot-like colonies. Reproduction only by filament fragmentation

and *K. elegans* SAG7.96 were originally isolated by Lokhorst (1996) and therefore represent authentic cultures for these two species.

Superclade E was an heterogeneous assemblage of strains with different morphologies, collected from many different habitats and

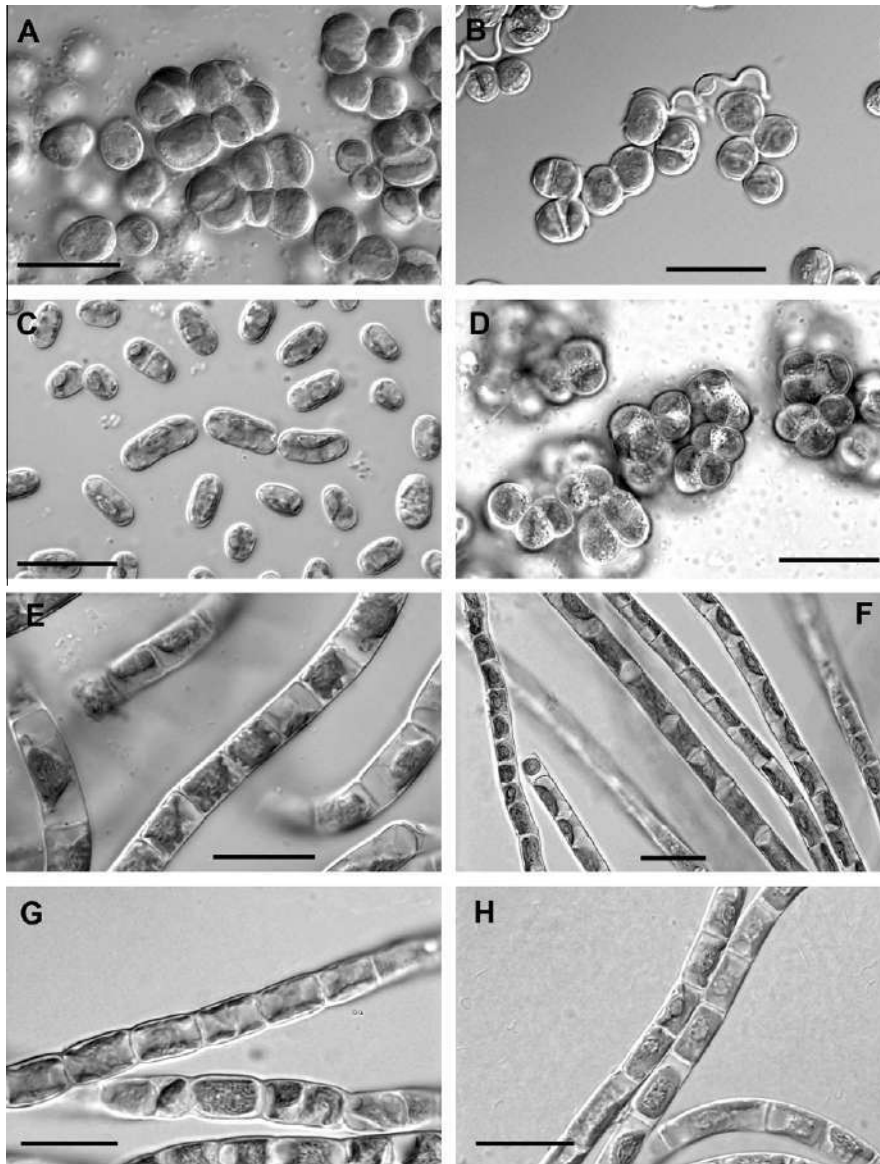


Fig. 4. Morphology of strains of Klebsormidiales belonging to the superclades A–E. (A) *Interfilum massjukiae* SAG2102 (clade A1). (B) *Interfilum paradoxum* SAG338.1 (clade A2). (C) *Interfilum* sp. LUK317 (clade A3). (D) *Interfilum* sp. SAG 2147 (clade A4). (E) *Klebsormidium* sp. TR42 (superclade B). (F) *Klebsormidium flaccidum* KL1 (superclade C). (G) *Klebsormidium bilatum* SAG5.96 (superclade D). (H) *Klebsormidium fluitans* CCAP335.13 (clade E1). Scale bar = 20 μm.

geographical regions. This superclade had no statistical support and very limited resolution in the ITS analyses, but a better resolution was obtained in the *rbcl* analyses in which six well-supported clades (E1, E2, E3, E4, E5, E6) were recovered (Fig. 2). Clade E1 was formed by strains from culture collections identified as *K. fluitans* (F. Gay) Lokhorst, *K. nitens* (Meneghini) Lokhorst and *K. scopulinum* (Hazen) Ettl & Gärtner, and GenBank sequences of specimens from New Zealand identified by Novis (2006) as *Klebsormidium acidophilum* Novis and *K. dissectum* (F. Gay) Ettl & Gärtner. Clade E2 consisted of a morphologically heterogeneous group of specimens, identified as *Klebsormidium nitens*, *Klebsormidium flaccidum* or not identified at species level. This clade included also *Klebsormidium dissectum* SAG2155; although not explicitly designated as neotype, this culture was isolated by Lokhorst (1996) from the locality that this author designated as neotype locality (Col du Bussang, France). A small clade (E3) was sister to clade E2 with high support; it consisted of *Klebsormidium fluitans* SAG9.96 (neotype culture of this species, Lokhorst, 1996) and an epilithic urban strain identified by Rindi et al. (2008) as *K. flaccidum*. For three other clades, the

relative positions were not resolved. One of these (E4) was formed by strains obtained from bases of urban walls by Rindi et al. (2008) and strains of unknown origin deposited in the SAG culture collection; this was the only clade that was recovered with high support in the ITS phylogeny too (Fig. 1). Another clade (E5) was formed by a strain of *K. flaccidum* from SAG (121.80) and an unidentified strain collected from a wooden building in Florida (described by Rindi et al., 2008). Sequences of *K. subtilissimum* (Rabenhorst) P.C. Silva, Mattox et Blackwell obtained from culture collections formed an additional clade (E6), whose relationships with the other lineages were not resolved.

Superclade F was formed by strains referable to two well-characterized morphological species, *Klebsormidium crenulatum* (Kützing) Lokhorst and *K. mucosum* (Boye Petersen) Lokhorst; its position could not be determined with certainty. In the ITS phylogeny, it was sister to superclade G (Fig. 1); in the *rbcl* phylogeny it was sister to the lineage formed by superclades A–C (Fig. 2). However, the statistical support of these relationships was low (Figs. 1 and 2) and the two topologies cannot be considered to be in conflict.

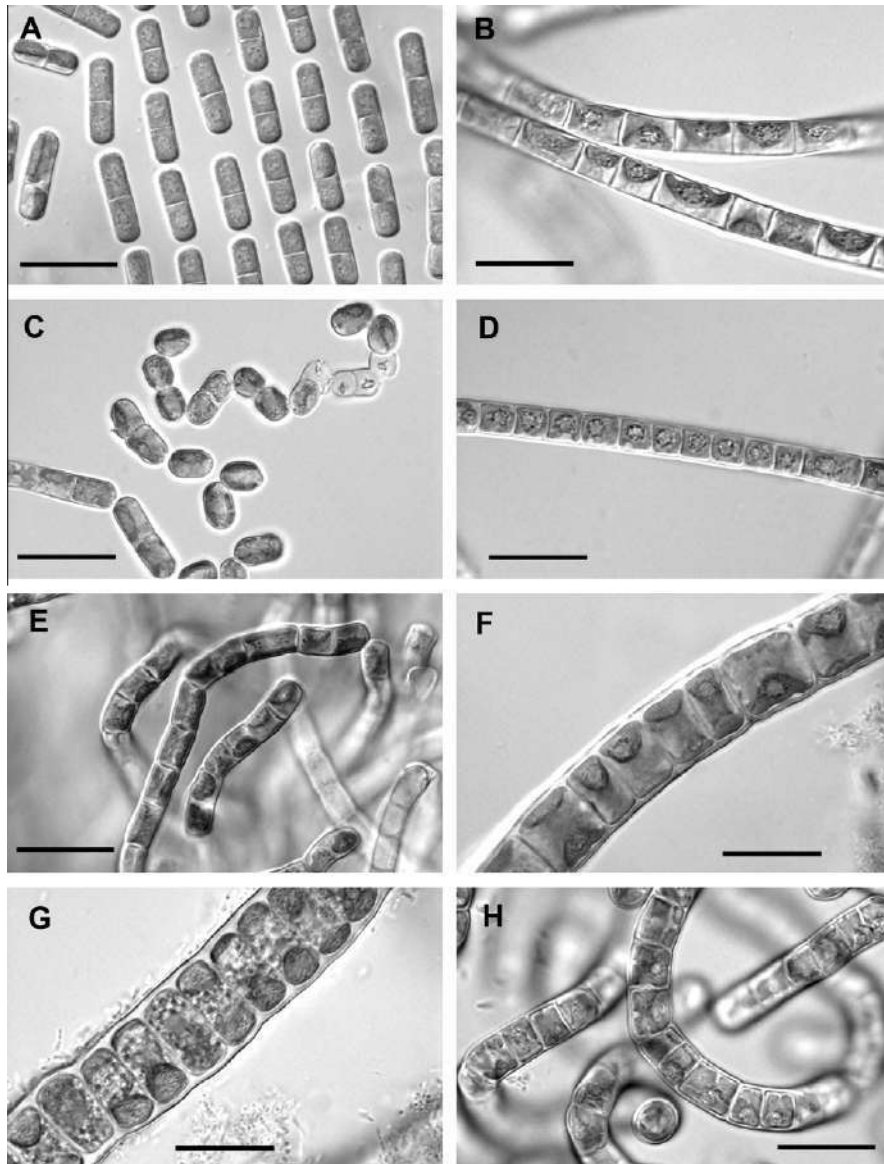


Fig. 5. Morphology of strains of Klebsormidiales belonging to the superclades E–G. (A) *Klebsormidium dissectum* SAG 2155 (clade E2). (B) *Klebsormidium fluitans* SAG9.96 (clade E3). (C) *Klebsormidium* sp. SAG2065 (clade E4). (D) *Klebsormidium* sp. SAG121.80 (clade E5). (E) *Klebsormidium subtilissimum* SAG384.1 (clade E6). (F) *Klebsormidium crenulatum* SAG37.86 (clade F1). (G) *Klebsormidium mucosum* SAG8.96 (clade F2). (H) *Klebsormidium* sp. 14614.18.18 (superclade G). Scale bar = 20 μ m.

Finally, a new and previously unknown lineage (superclade G) was revealed in our analyses. This lineage appeared relatively isolated from all other klebsormidialean taxa and no clear sister group was identified. It was formed by strains of *Klebsormidium* isolated mainly from biotic crusts of arid soils in South Africa. Morphologically, the strains belonging to this group were mainly characterized by the thin filaments and the four-lobed chloroplasts (Table 2).

The results obtained for the concatenated dataset (Fig. 3) reflected the topology of the *rbcl* analyses and provided stronger support for all relationships that had been recovered in the single-marker analyses. The same seven superclades were recovered with higher support; in particular, the sister relationship between superclade A and the lineage formed by superclades B and C showed a considerable increase in support. The most internal nodes, however, could not yet be resolved. The positions of superclades F and G remained unresolved.

4. Discussion

4.1. Characteristics of the datasets analyzed

The larger taxon sampling of the phylogenies presented here resulted in an increased statistical support and better resolution in comparison with previous investigations. This is also the first study on *Klebsormidium* and *Interfilum* in which two different molecular markers are combined and analyzed in a concatenated dataset. Not unexpectedly, in the combined dataset the nodal support is higher than in single-marker analyses; it is well established that an increase in the number of genes or characters improves the quality of phylogenetic inference (Sanderson and Shaffer, 2002). The phylogenetic signals of *rbcl* and ITS show excellent correspondence, recovering similar topologies and retrieving identical superclades and clades. These markers have comparable substitutions rates and are among the most popular for phylogenetic

inference at the species and genus level. When used in combination, they have been very effective and have contributed to the solving of major taxonomic problems (Hayden et al., 2003); it is in fact surprising that relatively few studies on freshwater and terrestrial green algae have used them in conjunction (e.g., Sakayama et al., 2005; Yamada et al., 2008; Xue et al., 2009). In terms of topology, the position of superclade F (sister to superclade G for ITS, sister to a lineage formed by superclades A–C for *rbcl*) is the only difference observed between the two phylogenies. However, the relationships of this superclade are poorly resolved by both *rbcl* and ITS, and the analyses on the concatenated dataset do not represent a significant improvement. Therefore, the position of superclade F is presently considered uncertain, and clarification requires further studies incorporating a larger number of molecular markers. Interestingly, even though the ITS and *rbcl* phylogenies are congruent, for certain superclades some differences in terms of substitution rate and phylogenetic resolution were observed between these markers. For superclade E, in particular, *rbcl* showed better resolution than ITS, recovering six different well-supported clades (E1, E2, E3, E4, E5, E6) that were not resolved by ITS (with the exception of E4). The combined analyses reflected the *rbcl* results and resolved the six clades with increased support, presumably because the higher length of *rbcl* (1149 bp versus 517 bp of ITS) makes the phylogenetic signal of this marker prevailing. The limited resolution of ITS was due to the low substitution rate in this superclade. Only 22 of 513 characters (equivalent to 4%) were parsimony informative, whereas 460 (=89%) were constant; uncorrected *p*-distances ranged between 0.1% and 2.5% (*Klebsormidium* sp. 15051.6 vs *K. nitens* SAG 31.91), with an overall average of 1.1%. It should be noted that *rbcl* showed also a low substitution rate in this lineage (highest uncorrected *p*-divergence was 5%, between *Klebsormidium fluitans* SAG9.96 and *K. subtilissimum* SAG384.1; overall average 2.3%). These results indicate that superclade E is a morphologically and ecologically dynamic group of relatively recent evolutionary origin, in which the genetic variation does not yet match morphological and ecological diversity. This group appears to be still in the process of active radiation and species boundaries are not yet well delineated. A direct implication emerging from these results is that in fast-evolving lineages of green microalgae phylogenetic inference and taxonomic conclusions should not be based on a single molecular marker. For the Klebsormidiales, the addition of sequences of further molecular markers will be necessary to clarify the relationships that could not be resolved by ITS and *rbcl*, especially in the basal nodes. Due to their proximity to land plants, we suggest that the Klebsormidiales are also a suitable group to test the usefulness of several chloroplast markers that have been recently used for DNA barcoding in vascular plants (Kress et al., 2005; Lahaye et al., 2008; Fazekas et al., 2008; Seberg and Petersen, 2009).

4.2. Phylogenetic relationships and taxonomic implications

Our analyses revealed new lineages and provided stronger support for several relationships observed in previous studies. In particular, the paraphyly of *Klebsormidium* caused by *Interfilum* (which was recovered in the ITS phylogeny of Mikhailuyuk et al., 2008, but without statistical support) was established with robust support. Two lineages of particular interest are superclade B and superclade G.

For superclade B, *Klebsormidium* sp. SAG7.91 was the only strain sequenced in previous investigations (Mikhailuyuk et al., 2008; Rindi et al., 2008). Morphologically, the strains of *Klebsormidium* forming this group show considerable similarity to *K. flaccidum* and *K. dissectum* (as characterized by Lokhorst, 1996), but they are set apart by the morphology of the chloroplast with margins crenulated or irregularly dissected. The combination of morphological characters observed for these strains does not correspond with any known species of *Klebsormidium* and will require the

description of one or more new species. Interestingly, from a biogeographic point of view this clade shows a marked association with eastern Europe (all strains sequenced were isolated from Ukraine and Russia, mainly from granite outcrops). Biogeography of small-sized organisms is a hotly debated topic (Finlay et al., 2006; Foissner, 2008), and it is extremely difficult to demonstrate endemicity or restricted distribution in terrestrial microalgae. This is particularly true for this study, because about 80% of the strains used have been isolated from Europe and the taxon sampling from other continents is currently too limited to draw strong generalizations. However, the fact that all the 11 strains belonging to superclade B originate from the same region is possibly not a coincidence.

The strains of *Klebsormidium* forming superclade G represent an unknown evolutionary lineage revealed in this study. These strains are characterized by a combination of morphological characters not found in any known species of *Klebsormidium* (filaments curved and strongly constricted, cells bead-like, chloroplast four-lobed with a small pyrenoid surrounded by a few starch grains, formation of cluster- and knot-like colonies on agar). This lineage includes several undescribed species, for which we are planning to propose formal descriptions in a forthcoming paper. These strains are unique in terms of habitat, since they are mostly associated with biotic crusts of arid soils in subdesertic regions of southern Africa (described in detail by Jürgens et al., 2010). It would be interesting to clarify their relationships with strains isolated from biotic crusts of North American deserts (Lewis and Flechtner, 2002; Lewis, 2007), in order to understand how many times the physiological attributes required to colonize arid habitats have evolved in *Klebsormidium*. Unfortunately our analyses do not allow clarification of the position of superclade G in relation to the other superclades; this lineage, however, appears relatively distant from the others (as is also suggested by the high uncorrected *p*-distances from all other strains of *Interfilum* and *Klebsormidium* sequenced). If future studies support the position of superclade G as the earliest-diverging lineage in the order, a very interesting evolutionary scenario would emerge. This would suggest a split of two early *Klebsormidium* lineages that colonized habitats with different characteristics: arid desertic and subdesertic habitats (the superclade G) and more or less humid habitats (a lineage that has diversified and developed into all other taxa).

The phylogenetic relationships revealed in this study have major implications for the taxonomy and classification of the Klebsormidiales. A taxonomic reassessment and development of a species concept are not among the aims of this study, as we are planning to address these questions in future investigations; it seems inevitable, however, that a major taxonomic rearrangement will be required. The most important problem is the correct characterization of *Klebsormidium flaccidum*, the type species of *Klebsormidium*, as its definition affects the circumscription of the whole genus. In our phylogenies, strains identified morphologically as *K. flaccidum* are polyphyletic and occur in five different clades/superclades (B, C, E2, E3, E5). At present it is impossible to assign the type specimen to any of these clades, as the original description (Kützing, 1849) does not provide sufficient information to link unambiguously the species with any of them. The ideal solution would be to sequence the type specimen, but unfortunately this is not possible (the type material consists of only few filaments embedded in a drop of mud; Willem Prud'homme van Reine, personal communication). Therefore, the designation of an epitype specimen based on a subjective choice will almost certainly be necessary. Due to the paraphyly of *Klebsormidium* caused by *Interfilum*, the choice of the new type will affect the classification at genus level and will either require the separation of one or more new genera or the reduction of *Interfilum* to a subgenus of *Klebsormidium*.

Linnaean names should be attached unambiguously to all clades and superclades recovered in our analyses. This appears straight-

Table 3

Summary of morphological characters that represent shared derived characters associated with individual clades or superclades.

Character	Superclade/ clade	Species
Unicellular or few-celled morphology with tendency to formation of more or less complex aggregations	A	Species of <i>Interfilum</i>
Mucilage envelope with striations and cap-like or thread-like remnants of mother cell wall	A	<i>Interfilum</i> spp. (some exclusions)
Thallus forming packet-like aggregations and bi-seriate branched filaments that may occasionally disintegrate	A1	<i>Interfilum massjukiae</i>
Thallus forming strong, not easily disintegrated packet-like aggregations	A4	<i>Interfilum</i> sp.
Filaments thick (mostly > 10 µm, up to 20–23 µm in old filaments) with walls rough and corrugated in old specimens	F	<i>Klebsormidium crenulatum</i> , <i>Klebsormidium mucosum</i>
Chloroplast dissected on 5–8 (sometimes more) clear lobes	A	Species of <i>Interfilum</i>
Chloroplast with margins crenulated or irregularly dissected	B	<i>Klebsormidium</i> sp.
Chloroplast with a median incision, divided in several lobes	D	<i>Klebsormidium bilatum</i> , <i>Klebsormidium elegans</i>
Chloroplast girdle-shaped (<i>Ulothrix</i> -like), encircling most of the cell wall	F	<i>Klebsormidium crenulatum</i> , <i>Klebsormidium mucosum</i>
Chloroplast four-lobed	G	<i>Klebsormidium</i> sp.
Pyrenoid small and surrounded by a few starch grains	G	<i>Klebsormidium</i> sp.
Distribution in freshwater, including low pH habitats	E1	<i>Klebsormidium acidophilum</i>
Distribution primarily in biotic crusts of hot subdesertic areas	G	<i>Klebsormidium</i> sp.
Distribution associated primarily with eastern Europe	B	<i>Klebsormidium</i> sp.

forward for some clades but it might prove complicated for others, and it will require the description of some new species (certainly for the superclades B and G, possibly for the clades E4 and E5). A number of species of *Klebsormidium* were unavailable for this study (*K. fragile* (Kützing) Wagner & Zaneveld, *K. drouetii* Wagner & Zaneveld, *K. klebsii* (G.M. Smith) P.C. Silva, Mattox & Blackwell, *K. lamellosum* Wei & Hu, *K. montanum* (Hansgirg) S. Watanabe, *K. pseudostichococcus* (Heering) Ettl & Gärtner, *K. subtile* (Kützing) Tracanna ex Tell and *K. tribonematoideum* (Skuja) Hindák). A comprehensive revision of the classification of the Klebsormidiales will only be possible after sequences of these species have become available.

4.3. Evolution of morphological characters

Most green algal lineages have a long and complex evolutionary history, in which many morphological characters were gained and lost multiple times. For some taxa, this may make it problematic to detect morphological characters with phylogenetic significance. This problem is exacerbated in taxa with a simple morphology, especially when strong morphological plasticity is evident (Leliaert et al., 2009; Rindi et al., 2009). Our results document this type of difficulty for *Klebsormidium*. Many morphological characters, including some considered of great taxonomic value, have evolved separately in different clades/superclades and therefore are phylogenetically irrelevant; in fact, some of them show different characters states even between different strains of the same clades. Examples of such characters include tendency to fragmentation, presence of H-shaped cell wall pieces, presence of water-repellent superficial layer of filaments in liquid culture and germination pattern of zoospores. However, our results suggest also a set of characters that appear to have phylogenetic significance; the characters that represent unique synapomorphies associated with particular clades/superclades are summarized in the Table 3. Characters related to the gross morphology represent the most obvious, since the capacity to form three-dimensional aggregations with packet-like habit is limited to species of *Interfilum* (superclade A). Characters related to the morphology of the chloroplast seem also to be phylogenetically valuable. In *Klebsormidium* the chloroplast is usually a parietal plate with smooth margins, encircling a half to 2/3 of the cell wall and containing one pyrenoid surrounded by a variable number of starch grains (Printz, 1964; Ettl and Gärtner, 1995; Lokhorst, 1996). This is the habit observed in most of the strains

that were sequenced in this study. However, variously lobed or dissected chloroplasts are found in several strains, and it is possible to observe variations that are unique to individual superclades (A, B, D, F, G; Table 2). Further, the distinctly lobed chloroplast in *E. fimbriata*, one of the closest relatives of *Klebsormidium*, indicates that this is a feature that was already present in the common ancestor of *Entransia* and *Klebsormidium*. The type of habitat may also be a character that deserves more attention than it has been so far appreciated, since some clades seem to be associated with certain habitats. For example, in our phylogenies strains of *Klebsormidium* isolated from biotic crusts in subdesertic areas of southern Africa were clustered in superclade G. In the same way, clade E1 consists of freshwater strains, some of which were isolated from low pH habitats (*K. acidophilum*; Novis, 2006). Species of *Klebsormidium* have been reported from low pH habitats in many regions (Lukešová, 2001; Verb and Vis, 2001; Sabater et al., 2003; Lear et al., 2009; Urrea-Clos and Sabater, 2009) and it would be interesting to verify whether acidophilic strains from different regions are closely related or not. To answer these and other questions an extended sampling that was not possible for this study will be required.

4.4. General aspects and conclusions

Our results highlight some points of general relevance with regard to diversity and evolution of terrestrial green algae. They show that the Klebsormidiales span a broader range of genetic, morphological and ecological diversity than previously believed. The demonstration of the paraphyly of *Klebsormidium* caused by *Interfilum* expands the morphological concept of this algal group, which so far was considered to include only uniseriate filamentous forms. *Interfilum* represents a further example of how widespread the sarcinoid or packet-like growth habit is among terrestrial green algae. It is clear that this habit is particularly suited to an aeroterrestrial lifestyle, since it is characteristic of some of the most widespread species (López-Bautista et al., 2007) and has evolved separately in several lineages of green algae (Friedl and O'Kelly, 2002; Watanabe et al., 2006; Lemieux et al., 2007; Rindi et al., 2007; Mikhailyuk et al., 2008), but it is not clear what features make it so advantageous. In consideration of this, it cannot be ruled out that new lineages of Klebsormidiales with morphologies currently unknown for this order (e.g., unicellular, or branched filamentous) will be discovered in the future. The discovery of

superclades G and B indicates that the Klebsormidiales have still major surprises in store and that the diversity and distribution of this order are still poorly understood. The complex of species currently belonging to *Klebsormidium* are among the most widespread and earliest-described terrestrial algae (Kützing, 1849). The fact that even such a common group still offers the opportunity of unexpected discoveries suggests that our knowledge of the diversity of terrestrial green algae is far from complete; therefore, the fundamental importance of new surveys of natural history combining morphological and molecular data cannot be stressed enough. Special attention should be devoted to unusual and extreme habitats or little-explored geographical regions, where new, hitherto unknown evolutionary lineages may be discovered. We suggest that for the Klebsormidiales acidic water bodies, sites affected by several types of chemical pollution, high mountain habitats, polar soils and rocks and tropical regions offer the best promises for the discovery of new taxa.

Acknowledgments

We wish to express sincere thanks to Dr. Alena Lukešová, Dr. Tatyana Darienko, Dr. Opayi Mudimu, Dr. Lira Gaysina and Dr. Mario Salisch for providing some strains of *Interfilum* and *Klebsormidium*. The study was funded by the US National Science Foundation (Systematics Program DEB-1036495 and Assembling the Tree of Life Program DEB-0542924 to J.M.L.-B.) and the European Community (INTAS Grant for Young Scientist Fellowship 06-1000014-6216 to T.I.M.). Parts of the research were carried out in the framework of the BIOTA Africa S05 (BIOLOG) program, funded by the German Ministry of Education and Research (BMBF).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jympev.2010.11.030.

References

- Baldwin, N.A., Whitton, B.A., 1992. Cyanobacteria and eukaryotic algae in sports turfs and amenity grasslands – a review. *J. Appl. Phycol.* 4, 39–47.
- Barberousse, H., Tell, G., Yéprémian, C., Couté, A., 2006. Diversity of algae and cyanobacteria growing on building façades in France. *Algol. Studies* 120, 81–105.
- Becker, B., Marin, B., 2009. Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Ann. Bot.* 103, 999–1004.
- Chodat, R., Topali, C., 1922. Un paradoxe algologique. *Bull. Soc. Bot. Genève* 2 (13), 66–74.
- Dřimalová, D., Pouličková, A., 2003. Filament fragmentation of *Klebsormidium flaccidum*. *Biologia* 58, 525–527.
- Ettl, H., Gärtner, G., 1995. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena and New York. 721 pp.
- Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Kesnakurti, P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G., Husband, B.C., Percy, D.M., Hajibabaei, M., Barrett, S.C.H., 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS One* 3 (e2802), 1–12.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Finlay, B.J., Esteban, G.F., Brown, S., Fenchel, T., Hoef-Emden, K., 2006. Multiple cosmopolitan ecotypes within a microbial eukaryote morphospecies. *Protist* 157, 377–390.
- Floyd, G.L., Stewart, K.D., Mattox, K.R., 1972. Cellular organization, mitosis and cytokinesis in the ulotrichalean alga *Klebsormidium*. *J. Phycol.* 8, 176–184.
- Foissner, W., 2008. Protist diversity and distribution: some basic considerations. *Biodivers. Conserv.* 17, 235–242.
- Friedl, T., O'Kelly, C.J., 2002. Phylogenetic relationship of green algae assigned to the genus *Planophila* (Chlorophyta): evidence from 18S rDNA sequence data and ultrastructure. *Eur. J. Phycol.* 37, 373–384.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2010. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 26 December 2009.
- Handa, S., Nakano, T., Takeshita, S., 1991. Some corticolous algae from Shibetsu, Hokkaido, northern Japan. *J. Jpn. Bot.* 66, 211–223.
- Hayden, H.S., Blomster, J., Maggs, C.A., Silva, P.C., Stanhope, M.J., Waaland, R.J., 2003. Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. *Eur. J. Phycol.* 38, 277–294.
- Hazen, T.E., 1902. The Ulotrichaceae and Chaetophoraceae of the United States. *Mem. Torrey Bot. Club* 11, 135–250.
- Huelsbenck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Jobb, G., 2008. TREEFINDER version October 2008. Munich, Germany. <http://www.treefinder.de>.
- John, D.M., 2002. Orders Chaetophorales, Klebsormidiales, Microsporaes, Ulotrichales. In: John, D.M., Whitton, B.A., Brook, A.J. (Eds.), *The Freshwater Algal Flora of the British Isles*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 433–468.
- Jürgens, N., Haarmeyer, D.H., Luther-Mosebach, J., Dengler, J., Finckh, M., Schmiedel, U., 2010. Biodiversity in southern Africa. *Patterns at a Local Scale – The BIOTA Observatories*, vol. 1. Klaus Hess Publisher, Göttingen and Windhoek. 801 pp.
- Karol, K.G., McCourt, R.M., Cimino, M.T., Delwiche, C.F., 2001. The closest living relatives of land plants. *Science* 294, 2351–2353.
- Kranz, H.D., Miks, D., Sieglar, M.L., Capesius, I., Senses, C.W., Huss, V.A., 1995. The origin of land plants: phylogenetic relationships among charophytes, bryophytes and vascular plants inferred from complete small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *J. Mol. Evol.* 41, 74–84.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A., Janzen, D.H., 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8369–8374.
- Kützing, F.T., 1849. *Species algarum*. F.A. Brockhaus, Leipzig, 922 pp.
- Lahaye, R., Bank, M.V.D., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G., Savolainen, V., 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 2923–2928.
- Lear, G., Niyogi, D., Harding, J., Dong, Y.M., Lewis, G., 2009. Biofilm bacterial community structure in streams affected by acid mine drainage. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3455–3460.
- Leliaert, F., Verbruggen, H., Wypor, B., De Clerck, O., 2009. DNA taxonomy in morphologically plastic taxa: algorithmic species delimitation in the *Boodlea* complex (Chlorophyta: Cladophorales). *Mol. Phylog. Evol.* 53, 122–133.
- Lemieux, C., Otis, C., Turmel, M., 2007. A clade uniting the green algae *Mesostigma viride* and *Chlorokybus atmophyticus* represents the deepest branch of the Streptophyta in chloroplast genome-based phylogenies. *BMC Biol.* 5, 2.
- Lewis, L.A., 2007. Chlorophyta on land: independent lineages of green eukaryotes from arid lands. In: Seckbach, J. (Ed.), *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Springer, Dordrecht, pp. 571–582.
- Lewis, L.A., Flechtner, V.R., 2002. Green algae (Chlorophyta) of desert microbiotic crusts: diversity of North American taxa. *Taxon* 51, 443–451.
- Lewis, L.A., McCourt, R.M., 2004. Green algae and the origin of land plants. *Am. J. Bot.* 91, 1535–1556.
- Lokhorst, G.M., 1991. Synopsis of Genera of Klebsormidiales and Ulotrichales. *Cryptogam. Bot.* 2, 274–288.
- Lokhorst, G.M., 1996. Comparative taxonomic studies on the genus *Klebsormidium* (Charophyceae) in Europe. In: Jülich, W. (Ed.), *Cryptogamic Studies*, vol. 5. Gustav Fischer, Stuttgart, pp. 1–132.
- Lokhorst, G.M., Star, W., 1985. Ultrastructure of mitosis and cytokinesis in *Klebsormidium mucosum* nov. comb., formerly *Ulothrix verrucosa* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 21, 466–476.
- López-Bautista, J.M., Rindi, F., Casamatta, D., 2007. The systematics of subaerial algae. In: Seckbach, J. (Ed.), *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Springer, Dordrecht, pp. 601–617.
- Lukešová, A., 2001. Soil algae in brown coal and lignite post-mining areas in central Europe (Czech Republic and Germany). *Restor. Ecol.* 9, 341–350.
- Maddison, D.R., Maddison, W.P., 2002. *MacClade 4.05: Analysis of Phylogeny and Character Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Marchant, H.J., Pickett-Heaps, J.D., Jacobs, K., 1973. An ultrastructural study of zoosporegenesis and the mature zoospore of *Klebsormidium flaccidum*. *Cytobios* 8, 95–107.
- McCourt, R.M., Karol, K.G., Guerlesquin, M., Feist, M., 1996. Phylogeny of extant genera in the family Characeae (Charales, Charophyceae) based on *rbcl* sequences and morphology. *Am. J. Bot.* 83, 125–131.
- Mikhailyuk, T.I., Demchenko, E.M., Kondratyuk, S.Y., 2003. Algae of granite outcrops from the left bank of the river Pivdenniy Bug (Ukraine). *Biologia* 58, 589–601.
- Mikhailyuk, T.I., Sluiman, H.J., Massalski, A., Mudimu, O., Demchenko, E.M., Kondratyuk, S.Y., Friedl, T., 2008. New streptophyte green algae from terrestrial habitats and an assessment of the genus *Interfilum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *J. Phycol.* 44, 1586–1603.
- Novis, P.M., 2006. Taxonomy of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in New Zealand streams and the significance of low-pH habitats. *Phycologia* 45, 293–301.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.
- Printz, H., 1964. Die Chaetophorales der Binnengewässer. Eine systematische Übersicht. *Hydrobiologia* 24, 1–376.
- Qiu, Y.L., Li, L., Wang, B., Chen, Z., Knoop, V., Groth-Malonek, M., Dombrowska, O., Lee, J., Kent, L., Rest, J., Estabrook, G.F., Hendry, T.A., Taylor, D.W., Testa, C.M., Ambros, M., Crandall-Stotler, B., Duff, R.J., Stech, M., Frey, W., Quandt, D., Davis, C.C., 2006. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 15511–15516.
- Ramanathan, K.R., 1964. Ulotrichales. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. 188 pp.

- Rifón-Lastra, A., Noguero-Seoane, Á., 2001. Green algae associated with the granite walls of monuments in Galicia (NW Spain). *Cryptogamie, Algol.* 22, 305–326.
- Rindi, F., Guiry, M.D., 2004. Composition and spatial variability of terrestrial algal assemblages occurring at the bases of urban walls in Europe. *Phycologia* 43, 225–235.
- Rindi, F., Guiry, M.D., López-Bautista, J.M., 2008. Distribution, morphology and phylogeny of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in urban environments in Europe. *J. Phycol.* 44, 1529–1540.
- Rindi, F., Lam, D.W., López-Bautista, J.M., 2009. Phylogenetic relationships and species circumscription in *Trentepohlia* and *Printzina* (Trentepohliales, Chlorophyta). *Mol. Phylog. Evol.* 52, 329–339.
- Rindi, F., Mclvor, L., Sherwood, A.R., Friedl, T., Guiry, M.D., Sheath, R.G., 2007. Molecular phylogeny of the green algal order Prasiolales (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 43, 811–822.
- Sabater, S., Buchaca, T., Cambra, J., Catalan, J., Guasch, H., Ivorra, N., Munoz, I., Navarro, E., Real, M., Romani, A., 2003. Structure and function of benthic algal communities in an extremely acid river. *J. Phycol.* 39, 481–489.
- Sakayama, H., Miyaji, K., Nagumo, T., Kato, M., Hara, Y., Nozaki, H., 2005. Taxonomic reexamination of 17 species of *Nitella* subgenus *Tieffallenia* (Charales, Charophyceae) based on internal morphology of the oospore wall and multiple DNA marker sequences. *J. Phycol.* 41, 195–211.
- Sanderson, M.J., Shaffer, H.B., 2002. Troubleshooting molecular phylogenetic analyses. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 33, 49–72.
- Seberg, O., Petersen, G., 2009. How many loci does it take to DNA barcode a *Crocus*? *PLoS One* 4 (e4598), 1–6.
- Silva, P.C., Mattox, K.R., Blackwell, W.H., 1972. The generic name *Hormidium* as applied to green algae. *Taxon* 21, 639–645.
- Škaloud, P., 2006. Variation and taxonomic significance of some morphological features in European strains of *Klebsormidium*. *Nova Hedwigia* 83, 533–550.
- Sluiman, H.J., Guihal, C., Mudimu, O., 2008. Assessing phylogenetic affinities and species delimitations in Klebsormidiales (Streptophyta): nuclear-encoded rDNA phylogeny and ITS secondary structure models in *Klebsormidium*, *Hormidiella* and *Entransia*. *J. Phycol.* 44, 183–195.
- Smith, S.M., Abed, R.M.M., Garcia-Pichel, F., 2004. Biological soil crusts of sand dunes in Cape Cod National Seashore, Massachusetts. *USA Microb. Ecol.* 48, 200–208.
- Starr, R.C., Zeikus, J.A., 1987. UTEX the culture collection of algae of the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 29 (Suppl.), 1–106.
- Stewart, K.D., Mattox, K.R., 1975. Comparative cytology, evolution and classification of the green algae with some consideration of the origin of other organisms with chlorophylls a and b. *Bot. Rev.* 41, 104–135.
- Swofford, D.L., 1998. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Turmel, M., Ehara, M., Otis, C., Lemieux, C., 2002. Phylogenetic relationships among streptophytes as inferred from chloroplast small and large subunit rRNA gene sequences. *J. Phycol.* 38, 364–375.
- Urrea-Clos, G., Sabater, S., 2009. Comparative study of algal communities in acid and alkaline waters from Tinto, Odiel and Piedras river basins (SW Spain). *Limnetica* 28, 261–271.
- Van den Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M., 1995. *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge. 623 pp.
- Verb, R.G., Vis, M.L., 2001. Microalgal communities from an acid mine drainage impacted watershed. *Aquat. Bot.* 71, 93–107.
- Verbruggen, H., Ashworth, M., LoDuca, S.T., Vlaeminck, C., Cocquyt, E., Sauvage, T., Zechman, F.W., Littler, D.S., Littler, M.M., Leliaert, F., De Clerck, O., 2009. A multi locus time-calibrated phylogeny of the siphonous green algae. *Mol. Phylog. Evol.* 50, 642–653.
- Verbruggen, H., Maggs, C.A., Saunders, G.W., Le Gall, L., Yoon, H.S., De Clerck, O., 2010. Data mining approach identifies research priorities and data requirements for resolving the red algal tree of life. *BMC Evol. Biol.* 10, 16.
- Verbruggen, H., Theriot, E.C., 2008. Building trees of algae: some advances in phylogenetic and evolutionary analysis. *Eur. J. Phycol.* 43, 229–252.
- Wakasugi, T., Nagai, T., Kapoor, M., Sugita, M., Ito, M., Ito, S., Tsudzuki, J., Nakashima, K., Tsudzuki, T., Suzuki, Y., Hamada, A., Ohta, T., Inamura, A., Yoshinaga, K., Sugiura, M., 1997. Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: the existence of genes possibly involved in chloroplast division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5967–5972.
- Watanabe, S., Mitsui, K., Nakayama, T., Inouye, I., 2006. Phylogenetic relationships and taxonomy of sarcinoid green algae: *Chlorosarcinopsis*, *Desmotetra*, *Sarcinochlams*, gen. nov., *Neochlorosarcina* and *Chlorosphaeropsis* (Chlorophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 42, 679–695.
- Xue, S., Wu, X., Li, X., Pei, L., 2009. Molecular identification of *Chlorella* strains based on sequence analysis of nuclear rDNA ITS and chloroplast *rbcl* gene. *J. Fish. China* 33, 565–571.
- Yamada, T.K., Miyaji, K., Nozaki, H., 2008. A taxonomic study of *Eudorina unicocca* (Volvocaceae, Chlorophyceae) and related species, based on morphology and molecular phylogeny. *Eur. J. Phycol.* 43, 317–326.

**2.1.3. Морфологія та ультраструктура центральних родів
Klebsormidiphyceae – *Interfilum* і *Klebsormidium* (Streptophyta)**

Morphology and ultrastructure of *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Streptophyta) with special reference to cell division and thallus formation

TATIANA MIKHAILYUK^{1,2}, ANDREAS HOLZINGER³, ANDRZEJ MASSALSKI⁴ AND ULF KARSTEN²

¹M.H. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereschenkivska St. 2, Kyiv UA-01001, Ukraine

²University of Rostock, Institute of Biological Sciences, Applied Ecology and Phycology, Albert-Einstein-Strasse 3, D-18059 Rostock, Germany

³University of Innsbruck, Institute of Botany, Functional Plant Biology, Sternwartestrasse 15, A-6020 Innsbruck, Austria

⁴Jan Kochanowski University, Institute of Biology, Dept of Botany, Świetokrzyska St. 15, PL-25-406, Kielce, Poland

(Received 20 December 2013; revised 14 March 2014; accepted 1 April 2014)

Representatives of the closely related genera, *Interfilum* and *Klebsormidium*, are characterized by unicells, dyads or packets in *Interfilum* and contrasting uniseriate filaments in *Klebsormidium*. According to the literature, these distinct thallus forms originate by different types of cell division, sporulation (cytogeny) versus vegetative cell division (cytotomy), but investigations of their morphology and ultrastructure show a high degree of similarity. Cell walls of both genera are characterized by triangular spaces between cell walls of neighbouring cells and the parental wall or central space among the walls of a cell packet, exfoliations and projections of the parental wall and cap-like and H-like fragments of the cell wall. In both genera, each cell has its individual cell wall and it also has part of the common parental wall or its remnants. Therefore, vegetative cells of *Interfilum* and *Klebsormidium* probably divide by the same type of cell division (sporulation-like). Various strains representing different species of the two genera are characterized by differences in cell wall ultrastructure, particularly the level of preservation, rupture or gelatinization of the parental wall surrounding the daughter cells. The differing morphologies of representatives of various lineages result from features of the parental wall during cell separation and detachment. Cell division in three planes (usual in *Interfilum* and a rare event in *Klebsormidium*) takes place in spherical or short cylindrical cells, with the chloroplast positioned perpendicularly or obliquely to the filament (dyad) axis. The morphological differences are mainly a consequence of differing fates of the parental wall after cell division and detachment. The development of different morphologies within the two genera mostly depends on characters such as the shape of cells, texture of cell walls, mechanical interactions between cells and the influence of environmental conditions.

Key words: *Interfilum*, *Klebsormidium*, molecular phylogeny, morphological characters, sporulation-like type of cell division, Streptophyta, ultrastructure

Introduction

Over the past few decades, newly obtained molecular phylogenetic data have often conflicted with traditional systems based on algal morphology (Pröschold & Leliaert, 2007; Friedl & Rybalka, 2012). Genetic data are presumed to reflect the real phylogenetic relationships between organisms and to shed light on their origin during evolution. Hence, morphology has become less significant in taxonomic and floristic studies, but detailed morphological (including ultrastructural) investigations can often help to interpret molecular results such as unusual phylogenetic positions of some organisms. Polyphasic approaches based

on comparisons of morphology, ultrastructure, molecular phylogenetics, ecophysiology and biochemistry have been used in recent taxonomic revisions of various groups of green and streptophycean algae (Pröschold *et al.*, 2001, 2011; Karsten *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2007; Eliáš *et al.*, 2008; Mikhailyuk *et al.*, 2008; Škaloud & Peksa, 2008; Darienko *et al.*, 2010; Bock *et al.*, 2011; Neustupa *et al.*, 2011; Demchenko *et al.*, 2012). Often, careful morphological and ultrastructural investigations undertaken several decades ago (Korshikov, 1938; Lokhorst, 1996; Lokhorst *et al.*, 2000; Ettl, 1983; Tschermak-Woess, 1980*a, b*) have partly been confirmed by modern phylogenetic data (e.g. Pröschold *et al.*, 2001; Eliáš *et al.*, 2008; Sluiman *et al.*, 2008; Škaloud & Peksa, 2010; Rindi *et al.*, 2011; Demchenko *et al.*, 2012).

Correspondence to: Tatiana Mikhailyuk.
E-mail: t-mikhailyuk@ukr.net

ISSN 0967-0262 (print)/ISSN 1469-4433 (online)/14/040395-412 © 2014 The Author(s). Published by Taylor & Francis.
<http://dx.doi.org/10.1080/09670262.2014.949308>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Combining data obtained by different methods (morphology, ultrastructure, molecular phylogeny) is important in algal taxonomy.

The Klebsormidiales (Streptophyta) contains the filamentous genera *Klebsormidium* P.S. Silva, Mattox & Blackwell, *Hormidiella* M.O.P. Iyengar & Khantamma and *Entransia* E.O. Hughes (Sluiman *et al.*, 2008). *Klebsormidium* are typical filamentous algae, with cells dividing vegetatively (Floyd *et al.*, 1972; Pickett-Heaps, 1972; Sluiman *et al.*, 1989; Van den Hoek *et al.*, 1995; Honda & Hashimoto, 2007; Katsaros *et al.*, 2011). The Klebsormidiales also includes the genus *Interfilum* Chodat which is characterized by unicells and the formation of short filaments, dyads, packets or branched pleurococcoid filaments (Mikhailyuk *et al.*, 2008). According to the original description, *Interfilum paradoxum* Chodat & Topali is an easily disintegrating filamentous alga, with cells surrounded by bipartite cell walls, dividing by vegetative cell division, forming chains of cells connected by 'threads' of unknown nature (Chodat & Topali, 1922). The cells divide by a process similar to sporulation; the remnants of parental walls form cap-like structures on the cells or thread-like structures between them, so cell walls appear bipartite (Mikhailyuk *et al.*, 2008).

We conducted a detailed morphological and ultrastructural investigation of representatives of *Interfilum* and *Klebsormidium*, with emphasis on the protoplast and cell wall, the 'behaviour' of the cell wall during cell detachment, and the morphology of cell division, in an attempt to understand how different morphologies develop in two closely related genera.

Materials and methods

Strains and culture conditions

About 100 strains of *Interfilum* and *Klebsormidium* from the Sammlung von Algenkulturen, University of Göttingen, Germany (SAG: Friedl & Lorenz, 2012; www.epsag.uni-goettingen.de), the Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP, Gachon *et al.*, 2007; www.ccap.uk), the collection from the project 'Biota of South Africa' (Büdel *et al.*, 2009), the collection of *Klebsormidium* strains from Alpine soil crusts (Karsten *et al.*, 2010; Holzinger *et al.*, 2011; Kaplan *et al.*, 2012; Karsten & Holzinger, 2012), some of our own isolates, and samples of field material were used for this study. Information about these strains is included in previous papers (Mikhailyuk *et al.*, 2008; Rindi *et al.*, 2011; Karsten *et al.*, 2013). Information about the 30 strains presented here is summarized in Supplementary Table 1.

All cultures were grown on solid 1.5% agar or liquid modified Bold's Basal Medium (3NBBM with vitamins; Starr & Zeikus, 1993), and kept at 20°C and 30–35 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ under a light/dark cycle of 16:8 h L:D. Osram Daylight Lumilux Cool White lamps (L36W/840; Osram, Munich, Germany) were used as light sources.

Light, fluorescent and laser scanning confocal microscopy, morphological characterization and vital staining

Young (2–3-week-old) and old (2–3-month-old) cultures of *Klebsormidium* and *Interfilum*, as well as field-collected material, were morphologically characterized using Olympus BX60 and Olympus IX70 light microscopes (Olympus Europe Holding, Hamburg, Germany) with Nomarski differential interference optics. The morphology of algae was documented with the attached Olympus ColorView III and II cameras (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany) using the imaging software Cell^D and analySIS (Soft Imaging System GmbH). An Olympus IX70 microscope equipped with a fluorescent lamp was used for investigation of mitochondria. A Leica TCS SP2 AOBs laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems, Germany) was used for chloroplast morphology and mitochondria.

Mucilage was stained with an aqueous solution of methylene blue at different concentrations. For mitochondrial observations, cells were stained overnight with about 0.75 μg MitoTracker Green FM (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) dissolved in 100 μl medium (3NBBM) with algal cells. The autofluorescence of chlorophyll was used to observe chloroplast structure (excitation at 488 nm, emission at 610–660 nm).

Transmission electron microscopy

Samples from different phylogenetic clades according to Rindi *et al.* (2011) (clade A: SAG 338.1, SAG 2100, SAG 2101, SAG 2102; clade B/C: KUE1 and ASIB V100; clade D: PIT1 and SAG 5.96; clade E: SAG 2417, BOT3, SAG 2416, STR1; clade F: SAG 2415; clade G: 14613.5e) were fixed for transmission electron microscopy (TEM) using chemical fixation protocols according to Massalski *et al.* (1995) or Holzinger *et al.* (2009). For TEM, ultrathin sections were prepared, counterstained with uranyl acetate and Reynold's lead citrate, and investigated in Zeiss LIBRA 120 or Tesla BS 500 transmission electron microscopes at 80 kV. Images were captured with a ProScan 2k SSCCD camera (Proscan Electronic Systems, Lagerlechfeld, Germany) and further processed using Adobe Photoshop software (Adobe Systems Inc., San José, California, USA).

Phylogenetic data

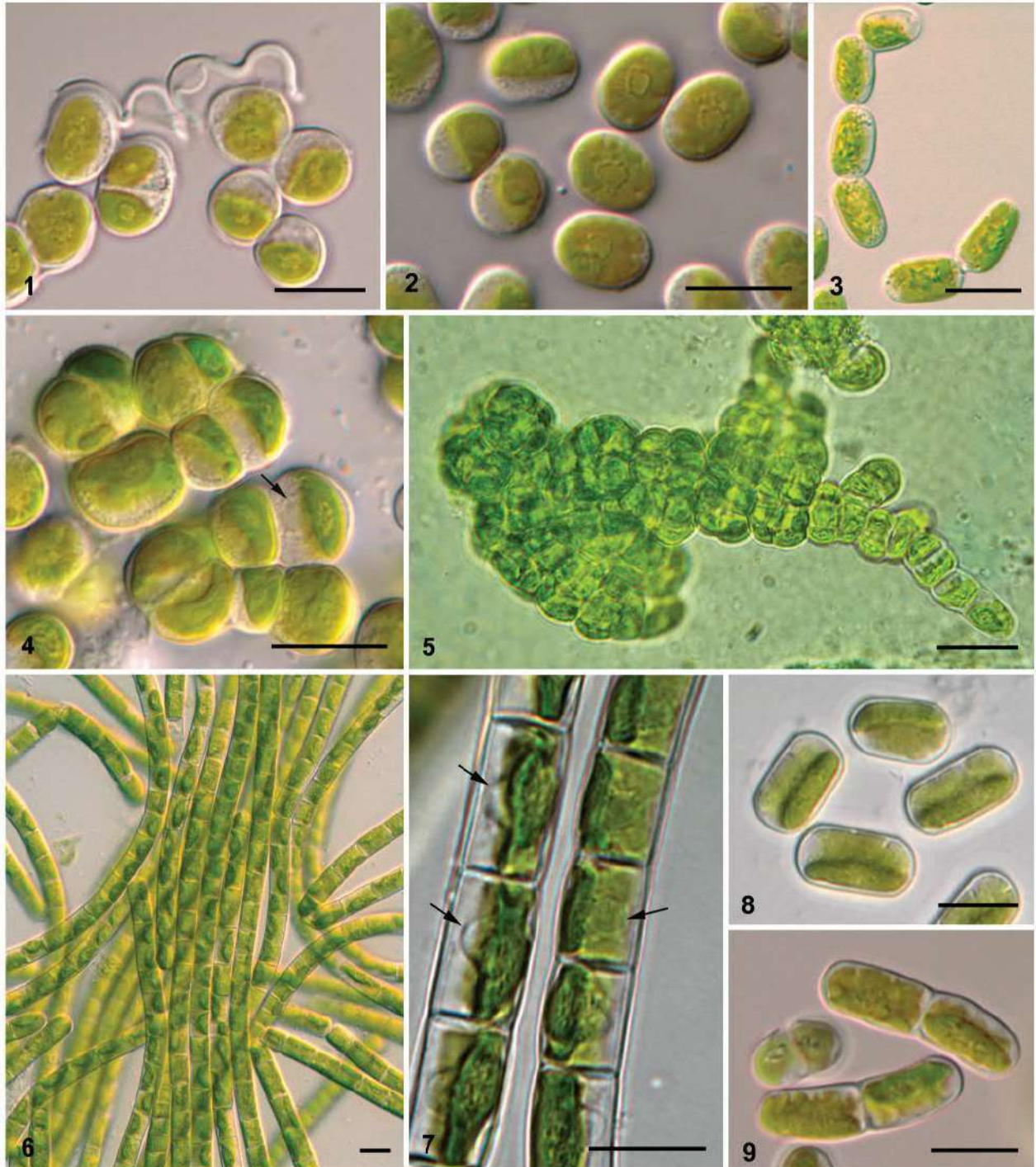
The phylogenetic positions of the strains were obtained from earlier publications (Mikhailyuk *et al.*, 2008; Rindi *et al.*, 2011; Kaplan *et al.*, 2012; Karsten & Holzinger, 2012; Karsten *et al.*, 2013; Kitzing *et al.*, 2014). Phylogenetic data for five *Klebsormidium* strains (HOH2, BRE, ASIB V100, PIT1, STR1) were obtained by T. Pröschold according to methods described in Karsten *et al.* (2013). Phylograms inferred from Maximum Likelihood analysis of the ITS rRNA in the Klebsormidiales published by Rindi *et al.* (2011) were used for designation of phylogenetic lineages within *Interfilum* and *Klebsormidium*.

Results

Light microscopy

Representatives of different lineages of *Interfilum* and *Klebsormidium* formed unicells, dyads, packets, cubic aggregates, and short and long uniseriate filaments, as well as biseriate parts and branched

pleurococoid thalli (Figs 1–9). The protoplast structure of the two genera was similar. Cells had one parietal chloroplast with smooth, undulating or variously dissected edges (Figs 1, 2, 4, 7–9) and a central pyrenoid surrounded by several or many starch grains (Figs 1, 2, 4). The nucleus was located opposite the pyrenoid (Fig. 7).

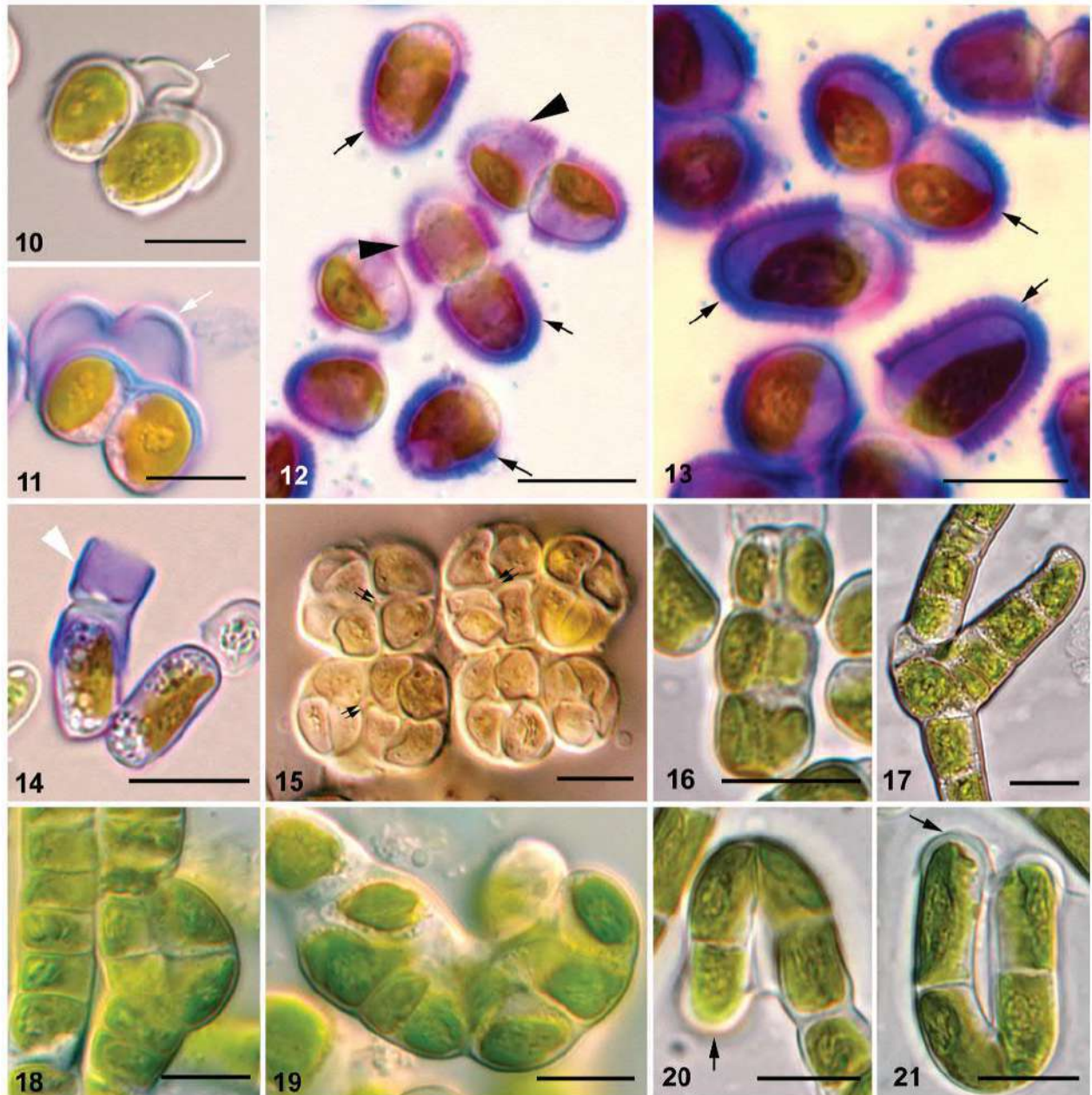


Figs 1–9. Diversity of morphotypes in *Interfilum* and *Klebsormidium*. **Fig. 1.** *Interfilum paradoxum* (SAG 338.1): unicells and dyads connected by ‘threads’. **Fig. 2.** *Interfilum* sp. (SAG 2101), unicells. **Fig. 3.** *Interfilum* sp. (SAG 36.88), short filaments. **Figs 4, 5.** *Interfilum massjukiae* (SAG 2102), packets and branched filaments. **Figs 6, 7.** Unbranched long filaments in *Klebsormidium* cf. *flaccidum* (Biof-4) (Fig. 6), and *Klebsormidium flaccidum* (ASIB V100) (Fig. 7). **Figs 8, 9.** Unicells and dyads in *Klebsormidium* cf. *dissectum* (TR 44) (Fig. 8) and *Klebsormidium* sp. (SAG 2108) (Fig. 9). Arrows indicate nuclei. Scale bars 10 µm.

Investigation of the *Interfilum* cell wall by light microscopy and mucilage staining showed the presence of cap- and ring-like structures as well as exfoliations of the parental wall, forming bridges between cells (Figs 10–13). H-like fragments of the cell wall were found occasionally (Fig. 14). Spaces between neighbouring cells were observed in packet-forming strains (Fig. 15). All these characters were related to

the presence of individual walls in each cell and a parental wall.

Klebsormidium observed with light microscopy showed the rare presence of biseriate parts of filaments, packet- and branch-like structures in some strains, especially in old cultures (Figs 16–19). Cap-like structures (Figs 20, 21), H-like fragments of cell walls (Figs 22, 23, 25, 27, 28), and exfoliations of



Figs 10–21. Morphology of *Interfilum* and *Klebsormidium* cell walls, ability of *Klebsormidium* cells to divide in several planes, and formation of branches. **Figs 10, 11.** Exfoliated parental walls forming ‘threads’ between cells (white arrows). **Figs 12, 13.** Cap-like (black arrows) and ring-like (black arrowheads) structures. **Fig. 14.** Stained H-like cell wall fragment in *Interfilum* (white arrowhead). **Fig. 15.** Spaces between cells in *Interfilum* packets (double black arrows). **Figs 16–19.** Biseriate parts of filaments, and packet- and branch-like structures in *Klebsormidium*. **Figs 20, 21.** Cap-like structures of *Klebsormidium* (black arrows). Material illustrated is as follows: Figs 10, 11, *Interfilum paradoxum* (SAG 338.1); Figs 12, 13, *Interfilum terricola* (SAG 2100); Fig. 14, *Interfilum* sp. (SAG 36.88); Fig. 15, *Interfilum* sp. (SAG 2147); Fig. 16, *Klebsormidium* cf. *subtile* (BRE); Fig. 17, *Klebsormidium nitens* (SAG 2417); Fig. 18, *Klebsormidium* sp. (TR 18); Fig. 19, *Klebsormidium* sp. (TR 24); Figs 20, 21, *Klebsormidium* cf. *subtile* (HOH2). Scale bars 10 μ m.



Figs 22–31. Structure of *Klebsormidium* cell wall on morphological level. **Figs 22, 23, 25, 27, 28, 30, 31.** H-like fragments of cell wall (white arrowheads). **Figs 24, 26.** Exfoliations of parental wall (black arrows). **Fig. 29.** Triangular spaces between daughter- and mother-cell walls (white arrows). Material illustrated is: **Figs 22–24,** *Klebsormidium* sp. (14621-6); **Fig. 25,** *Klebsormidium* cf. *flaccidum* (TR 42); **Fig. 26,** *Klebsormidium* cf. *subtile* (BRE); **Fig. 27,** *Klebsormidium* cf. *flaccidum* (SAG 12.91); **Fig. 28,** *Klebsormidium* cf. *subtile* (HOH2); **Fig. 29,** *Klebsormidium* *crenulatum* (SAG 37.86); **Figs 30, 31,** *K. crenulatum* (field-collected material). Scale bars 10 μ m.

parental walls (Figs 24, 26), as well as triangular spaces between walls of neighbouring cells (Fig. 29), were frequently present. These structures were most obvious in field-collected material of *Klebsormidium*, which showed dense cell walls (Figs 30, 31).

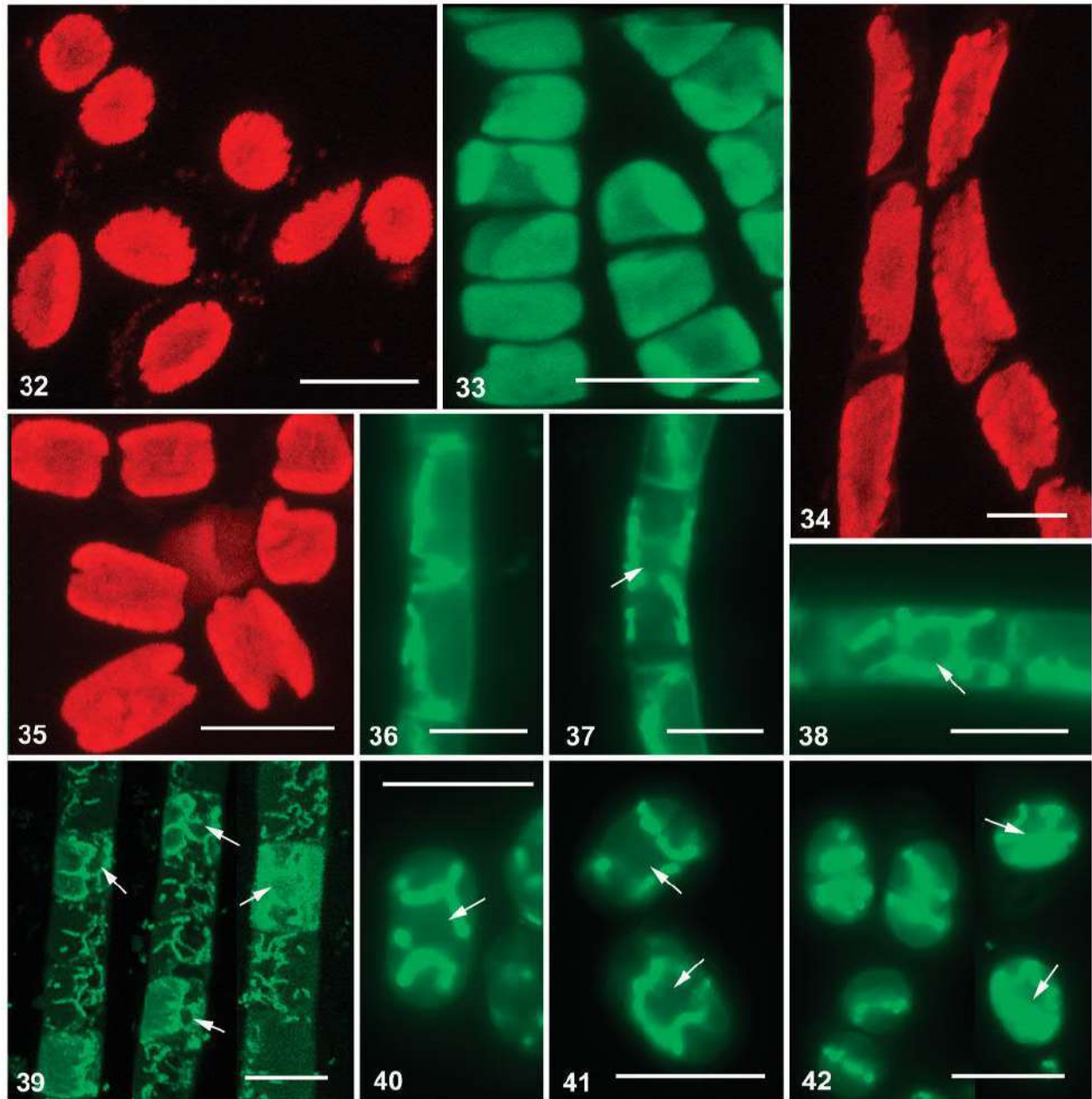
Confocal laser scanning and fluorescence microscopy

Images obtained with confocal laser scanning and fluorescence microscopy showed that *Interfilum* and *Klebsormidium* strains contained the same type of variously lobed plate-shaped chloroplasts (Figs 32–35).

Vital staining of cells of both genera revealed the presence of several polymorphic mitochondria, which were located around the nucleus and along the chloroplast lobes (Figs 36–42).

Transmission electron microscopy

TEM investigations showed a similar pyrenoid ultrastructure in both genera (Figs 43–45, 48, 52, 53). Starch grains formed one or several layers around the pyrenoid body, arranged in parallel rows. Several to many parallel single thylakoid membranes



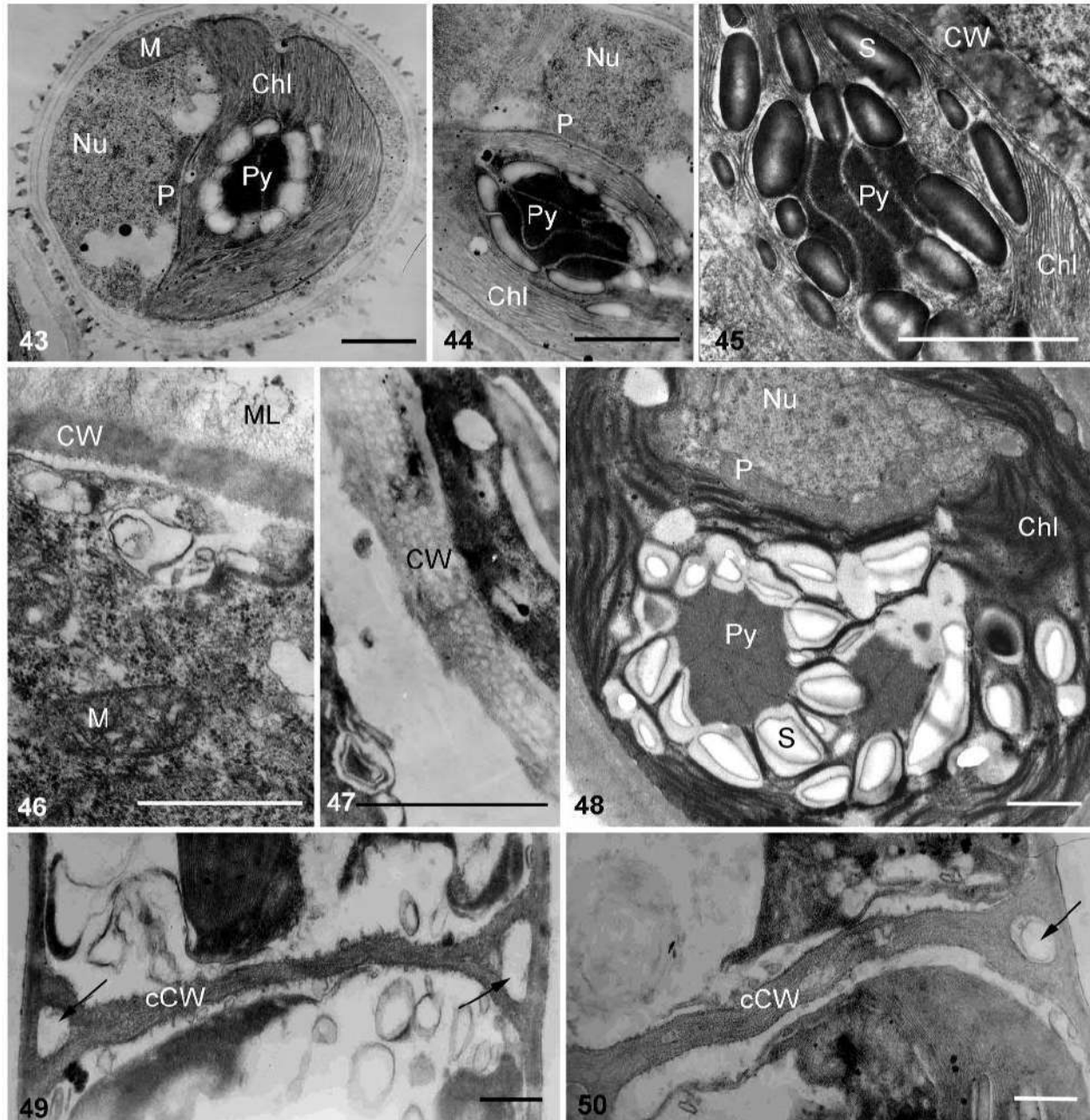
Figs 32–42. Confocal laser scanning and fluorescence micrographs of *Interfilum* and *Klebsormidium*. **Figs 32–35.** Autofluorescence of chloroplasts of different strains (confocal micrographs). **Figs 36–42.** Vital staining of mitochondria, arrows indicate position of nucleus (Figs 36–38, 40–42: fluorescence micrographs; Fig. 39: confocal micrograph). Material illustrated is: Figs 32, 42, *Interfilum terricola* (SAG 2100); Fig. 33, *Klebsormidium* sp. (14621.6); Fig. 34, *Klebsormidium subtile* (CCAP 335.17); Figs 35, 40, 41, *Klebsormidium* sp. (SAG 2107); Figs 36–38, *Klebsormidium fluitans* (CCAP 335.12); Fig. 39, *Klebsormidium* cf. *flaccidum* (TR 42). Scale bars 10 μ m.

penetrated the pyrenoid body, which determined the orientation of the starch grains. One peroxisome was located between the chloroplast and the nucleus (Figs 43, 44, 48). Mitochondrial profiles were located close to the chloroplast (Fig. 43).

Depending on the lineage, the *Interfilum* cell wall differed ultrastructurally. Unicellular species (*Interfilum terricola* (B. Petersen) Mikhailyuk, Sluiman, A. Massalski, Mudimu, Demchenko, T. Friedl & S.Y. Kondr. or *I. paradoxum*) had homogeneous cell walls with a fibrous mucilage

layer (Fig. 46). Species forming cell packets (*I. massjukiae* Mikhailyuk, Sluiman, A. Massalski, Mudimu, Demchenko, T. Friedl & S.Y. Kondr.) were characterized by layered cell walls without mucilage (Fig. 47).

The cell walls of *Klebsormidium* strains showed triangular spaces between the cell walls of neighbouring cells (Figs 49, 50, 52, 54), as well as projections and exfoliations of the parental walls formed during cell detachment (Figs 56–58), and gelatinous parental walls similar to the cap-like structures of *Interfilum* (Figs 55, 58). All these characters indicate

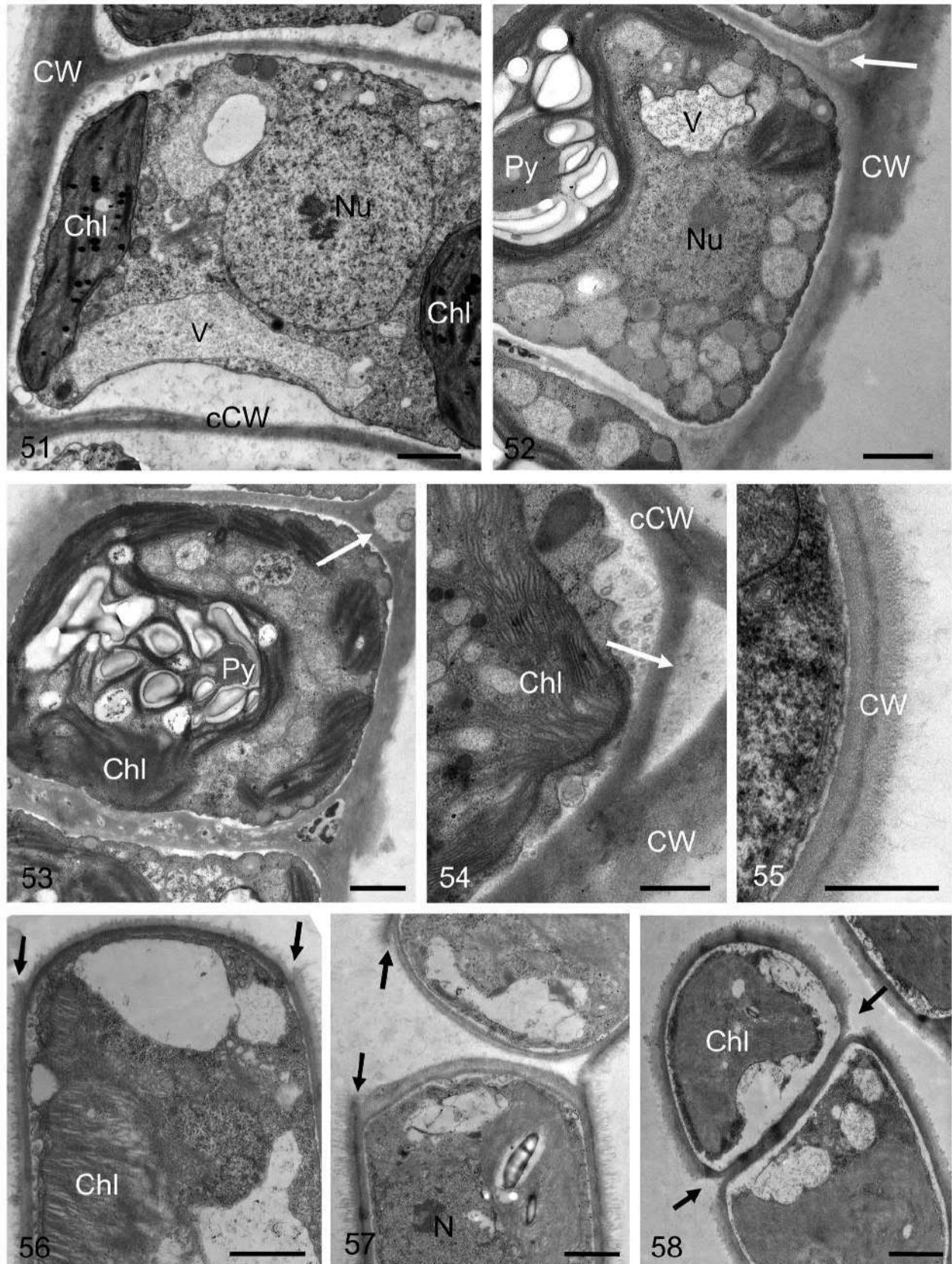


Figs 43–50. Transmission electron micrographs of vegetative cells and cell wall structure of *Interfilum* and *Klebsormidium*. **Figs 43–45.** Pyrenoid structure and position of peroxisome, nucleus and mitochondria in *Interfilum* cells. **Figs 46, 47.** Cell wall structure of *Interfilum* (homogeneous cell wall with mucilage (Fig. 46) and multilayered cell wall without mucilage (Fig. 47)). **Fig. 48.** Pyrenoid structure and position of peroxisome, nucleus and mitochondria in *Klebsormidium* cell. **Figs 49, 50.** Cross-cell wall structure of *Klebsormidium*; arrows indicate triangular spaces between the cell walls of daughter cells and the mother cell wall. Material illustrated is: Fig. 43, *Interfilum paradoxum* (SAG 338.1); Fig. 44, *Interfilum terricola* (SAG 2100); Figs 45, 46, *Interfilum* sp. (SAG 2101); Fig. 47, *Interfilum massjukiae* (SAG 2102); Fig. 48, *Klebsormidium crenulatum* (SAG 2415); Figs 49, 50, *Klebsormidium bilatum* (SAG 5.96). Abbreviations: Chl, chloroplast; CW, cell wall; cCW, cross-cell wall; ML, mucilage layer; P, peroxisome; Nu, nucleus; S, starch grain; M, mitochondrion; Py, pyrenoid. Scale bars 1 μ m.

discontinuity of the *Klebsormidium* cell wall, and thus the presence of individual walls in each cell and parental wall. Cross-walls of *Klebsormidium* were bi- or multilayered, lacked plasmodesmata, and often showed different thicknesses within the same filament (Figs 51–53).

Ultrastructural analysis of cell walls in different lineages of *Klebsormidium* indicated overall similarity,

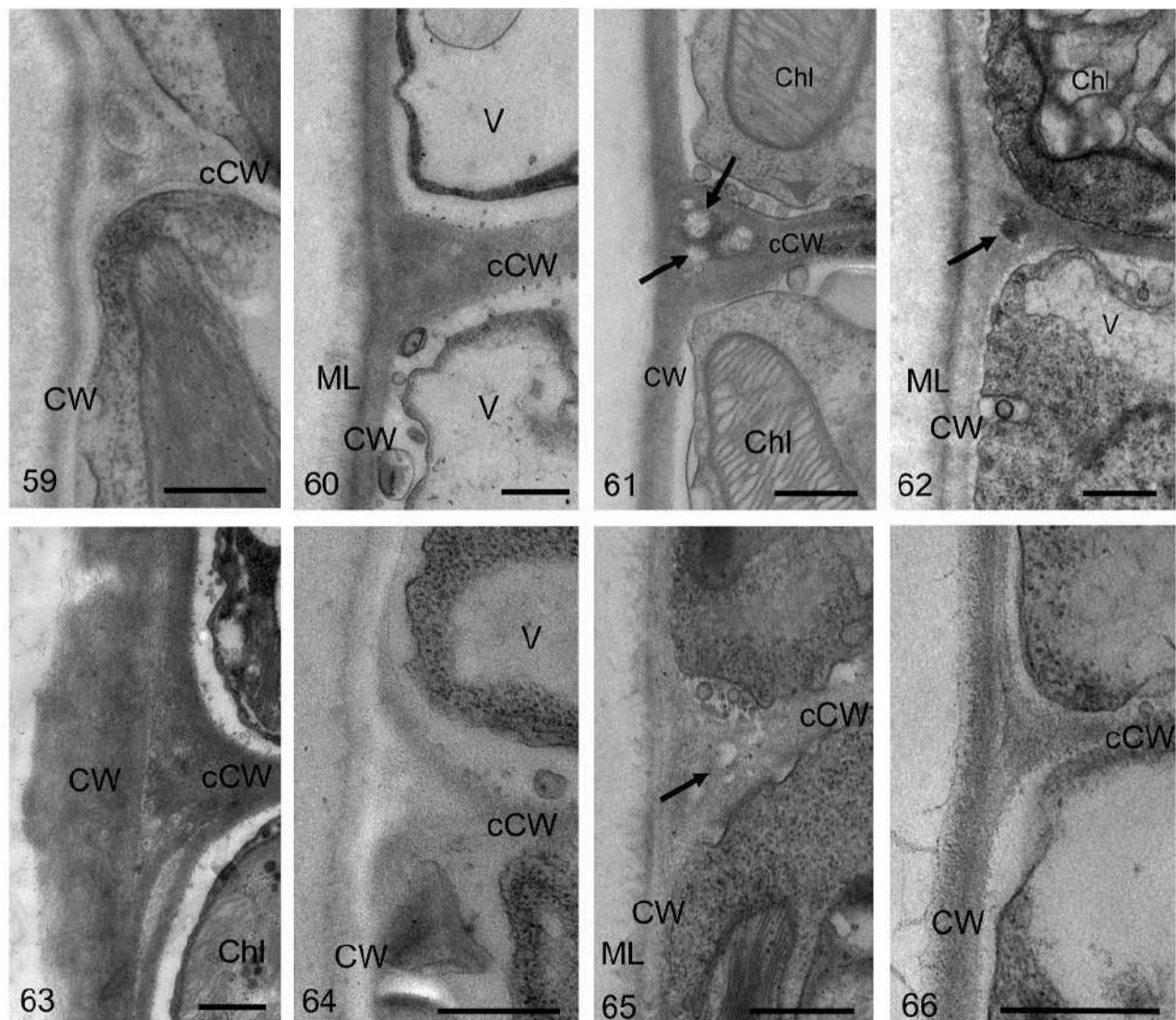
but also some differences in detail (Figs 59–66). Samples from clades B/C KUE1 and ASIB V100 (Figs 59, 60) exhibited bilayered outer cell walls covered by a clearly distinguishable mucilage layer. The outer cell walls were ~ 0.16 μ m thick in KUE1 and ~ 0.22 μ m in ASIB V100, which together with the mucilage layer was ~ 0.4 – 0.5 μ m in thickness (Figs 59, 60). The cell cross-walls were sometimes



Figs 51–58. Transmission electron micrographs of different *Klebsormidium* strains. **Fig. 51.** Central nucleus and parietal chloroplast clearly visible. **Fig. 52.** Chloroplast contains pyrenoid, the outer cell wall exhibits clear layering with a corrugated outer surface, and the triangular space between the outer cell wall and the cross-wall is marked with a white arrow. **Fig. 53.** Pyrenoid with numerous starch grains, triangular space is marked with a white arrow. **Fig. 54.** Triangular space (white arrow) between the outer cell wall and the cross-wall. **Fig. 55.** Double-layered outer cell wall. **Fig. 56.** Terminal cell, showing the projections of the mother-cell wall (black arrows). **Fig. 57.** Two cells still not fully separated, showing the projections of the mother-cell wall (black arrows). **Fig. 58.** Initiating separation of two cells, the mother-cell wall is already separated (black arrows). Material illustrated is: Figs 51–54, *Klebsormidium crenulatum* (SAG 2415); Fig. 55, *Klebsormidium dissectum* (SAG 2416); Figs 56, 57, *Klebsormidium nitens* (SAG 2417); Fig. 58, *Klebsormidium* cf. *nitens* (STR1). Abbreviations: Chl, chloroplast; CW, cell wall; cCW, cell cross-wall; Nu, nucleus; Py, pyrenoid; V, vacuole. Scale bars Figs 51–53, 56–58, Figs 54–55: 1 μ m; d, e: 500 nm.

separated in KUE1, while in ASIB V100 they were rather thick and multilayered (Figs 59, 60). Representatives of clades D and G, PIT1 and 14613.5e (Figs 61, 62) showed bilayered outer cell walls with the outer layer less obvious in 14613.5e. The cell walls in PIT1 were $\sim 0.17 \mu\text{m}$ thick, and in 14613.5e $\sim 0.2 \mu\text{m}$. In both strains, triangular spaces between the cross-walls and the outer cell wall were detectable (Figs 61, 62). The cross-walls were layered in 14613.5e, while they appeared rather smooth in PIT1. The thickest outer cell walls, in a *Klebsormidium* strain from clade F (*K. crenulatum* (Kützing) Ettl & Gärtner, SAG 2415), were up to $\sim 0.6 \mu\text{m}$ thick, clearly layered and corrugated (Fig. 63). The cross-walls were also layered and clearly

separated from the outer cell walls (Fig. 63). In many cases, triangular spaces between the outer cell walls and the cross-walls were visible (Figs 52–54). In contrast, *Klebsormidium* samples from clade E (*K. nitens* (Meneghini in Kützing) Lokhorst (SAG 2417), *K. cf. fluitans* (Gay) Lokhorst (BOT3) and *K. dissectum* (Gay) Ettl & Gärtner (SAG 2416), Figs 64–66) had rather thin cell walls, reaching $0.26 \mu\text{m}$ thickness in SAG 2417, $0.15 \mu\text{m}$ in BOT3 and $0.17 \mu\text{m}$ in SAG 2416. The cross-walls were thin and clearly separated from the outer cell wall in SAG 2416 (Fig. 66). Triangular spaces were observed only in BOT3 (Fig. 65). Layering of the cell walls and a mucilage layer were observed in all strains of clade E (Figs 64–66).



Figs 59–66. Transmission electron micrographs of different *Klebsormidium* strains; each image shows the left corners of two neighbour cells in a median section. The outer cell walls (CW) and cross-walls (cCW) separating the two cells are visible. **Fig. 59.** *Klebsormidium cf. flaccidum* (KUE1). **Fig. 60.** *Klebsormidium cf. flaccidum* (ASIB V100). **Fig. 61.** *Klebsormidium* sp. (14613.5e). **Fig. 62.** *Klebsormidium cf. bilatum* (PIT1). **Fig. 63.** *Klebsormidium crenulatum* (SAG 2415). **Fig. 64.** *Klebsormidium nitens* (SAG 2417). **Fig. 65.** *Klebsormidium cf. fluitans* (BOT3). **Fig. 66.** *Klebsormidium dissectum* (SAG 2416). Abbreviations: Chl, chloroplast; CW, cell wall; cCW, cell cross-wall; ML, mucilage layer; V, vacuole; arrows point to triangular spaces between the cell cross-walls on the edges. Scale bars 500 nm.

Discussion

Protoplast structure of Interfilum and Klebsormidium

According to our observations and to previously published data, protoplasts of *Interfilum* and *Klebsormidium* are characterized by common morphological and ultrastructural features: similar structures of the chloroplast and pyrenoid, position of the nucleus in a cytoplasmic bridge between the two terminal vacuoles, fibrous mucilage structure, shape and position of the single peroxisome, and mitochondria (Stewart *et al.*, 1972; Silverberg, 1975; Lokhorst & Star, 1985; Morison & Sheath, 1985; Honda & Hashimoto, 2007; Mikhailiyuk *et al.*, 2008). The protoplast structure of some related streptophycean algae, e.g. members of *Entransia*, *Hormidiella*, *Chlorokybus* Geitler and *Coleochaete* Brébisson, is mostly similar as well (Rogers *et al.*, 1980; Sluiman, 1985a; Lokhorst *et al.*, 2000; Cook, 2004). Some conjugating green algae (Holzinger *et al.*, 2009) and Anthocerotae mosses (Cook, 2004) have similar pyrenoid starch envelope structure. A large single peroxisome located between the chloroplast and the nucleus is also characteristic of *Mesostigma* Lauterborn, *Chaetosphaeridium* Klebahn, *Chlorokybus*, *Coleochaete* and *Hormidiella* (Rogers *et al.*, 1980; Sluiman, 1985a; Melkonian, 1989; Van den Hoek *et al.*, 1995; Lokhorst *et al.*, 2000). Multiple peroxisomes of other shapes, closely adjacent to the chloroplast, are found in *Nitella* C. Agardh (Silverberg & Sawa, 1973), *Micrasterias* C. Agardh ex Ralfs (Tourte, 1972), photosynthetic cells of *Polytrichum* (Proctor *et al.*, 2007) and vascular plants (Raven *et al.*, 2005). The peroxisome, nucleus, chloroplast and mitochondria form a specific structural complex, which has been suggested to be a diagnostic feature for streptophycean green algae (Massalski, 2002; Massalski & Kostikov, 2005). The close arrangement of these organelles in the cell is considered to be an evolutionarily progressive character, because it guarantees rapid metabolic exchange processes during photorespiration (Raven *et al.*, 2005). In addition, the enzyme composition of peroxisomes of streptophycean algae and embryophytes is similar, and differs from other algae (Gross, 1993). The structural complex plays an important role in cell division of streptophycean algae (see below). It is likely that the presence of this structural complex reflects the evolutionary success of this algal group (worldwide distribution in terrestrial ecosystems; Rindi *et al.*, 2009), and hence is partially retained in embryophytes (Raven *et al.*, 2005; Proctor *et al.*, 2007).

Mitochondria are probably components of the structural complex as well. There are abundant TEM data on mitochondrial profiles in sections of *Klebsormidium* cells (Stewart *et al.*, 1972; Silverberg, 1975; Lokhorst & Star, 1985; Morison &

Sheath, 1985; Honda & Hashimoto, 2007), but little information about their spatial organization is available. Our data indicate that the location of mitochondria is always similar and strictly ordered. This spatial distribution may support the proposal that streptophycean algae contain a structural complex consisting of the peroxisome, nucleus, mitochondria and chloroplast. Small differences in mitochondrial location among different strains mostly depend on the cell shape and details of chloroplast morphology.

Structure of cell walls and possible origin of cell wall remnants

Originally *Interfilum* was described as a genus with bipartite cell walls, closely related to the genus *Radiofilum* Schmidle (Chodat & Topali, 1922). Detailed morphological investigations by Fritsch & John (1942) showed that each *Interfilum* cell has its own integral cell wall, which is formed inside the parental wall during cell division. The parental wall ruptures in the middle during cell growth and detachment, resulting in cap-like structures closely associated with daughter cell walls. The origin of cap-, ring- and thread-like structures from parental wall remnants was shown in the present study and in a previous publication (Mikhailiyuk *et al.*, 2008).

Some cell wall structures observed here in *Klebsormidium* (H-like and cap-like structures, exfoliations and projections of the parental wall, triangular spaces between the parental wall and the cell walls of neighbouring cells) indicate that the cell wall is heterogeneous and includes daughter walls with closely adhering remnants of the parental wall. The H-like fragments represent structures homologous to the cap-like remnants characteristic of *Interfilum*: two cap-like structures connected by their tops. H-like fragments are observed in some filamentous algae with bipartite (*Microspora* Thur., *Tribonema* Derbès et Solier) or separated (consisted of daughter and parental walls) cell walls (*Binuclearia* Wittrock, *Cylindrocapsa* Reinsch) (Sluiman *et al.*, 1989; Massjuk, 1993; Sluiman, 1985b; Van den Hoek *et al.*, 1995), and probably in *Klebsormidium* as well. Cap-like structures characteristic of *Interfilum* were recently reported in some strains of *Klebsormidium* by Škaloud & Rindi (2013).

H-like fragments of cell walls are well known in *Klebsormidium* (Starmach, 1972; Moshkova, 1979; Ettl & Gärtner, 1995; Van den Hoek *et al.*, 1995; Lokhorst, 1996), but their origin has not been explained satisfactorily. Lokhorst (1996) indicated that H-fragments are remnants of the parental wall, but did not explain how they are formed in an alga with vegetative cell division (only cross-walls are formed during this kind of cell division, as described below, without formation of separate daughter cell walls). Some proposed explanations indicate

occasional formation of akinetes or hypnozoospores in *Klebsormidium* (Moshkova, 1979; Morison & Sheath, 1985). In this case, the cell protoplast forms its own cell wall, and the resting cell remains enclosed inside the parental wall. However, according to other authors (Klebs, 1896; Lokhorst, 1996), specialized resting cells are not formed in *Klebsormidium* because cells neighbouring H-fragments are usually not distinguishable (judging by the presence and location of cellular organelles) from other vegetative cells of the filament. Jane & Woodhead (1941) reported that field-collected filaments of *Ulothrix* Kützing and *Klebsormidium* contain many H-fragments of cell walls. Detailed microscopic investigation of the filaments showed that their cell walls are discontinuous, with distinct inner and outer layers. Microchemical tests revealed that these layers differ in chemical composition: whilst the inner layer consists of cellulose, the outer layer represents an intermediate stage in the degradation of cellulose to mucilage. Consequently, it is possible to interpret these layers as the daughter cell wall and gradually degrading remnants of the parental wall.

Formation of packets, biseriate parts of filaments and branches in *Interfilum* and *Klebsormidium*

Some *Interfilum* strains are able to form packets, cubic cell aggregations and branched pleurococcoid thalli. Cells divide in several planes and remain enclosed within widened parental walls; the central space between cells of a packet observed in this study indicates that each daughter cell has its own cell wall.

The formation of packets, biseriate parts of a filament and branching have rarely been reported in *Klebsormidium* (Ettl & Gärtner, 1995; Lokhorst, 1996). The latter author interpreted these structures mostly as the formation and further germination of aplanospores, which formed one per cell and often remained inside the sporangial wall. Germination of the aplanospores led to the formation of branches or cell complexes. Lokhorst (1996) expressed some doubts concerning this interpretation, but proposed that this ability of *Klebsormidium* might be the first step in the development of definite side-branching.

Some examples of this branching are actually caused by germination of cells originating from zoospores (hemizoospores/aplanospores) inside a sporangial wall. Germination of these cells inside the sporangium leads to the formation of young filaments growing from a parental filament. This type of pseudobranching is clearly visible in some published figures (Lokhorst, 1996, figs 36, 75, 97, 186; Škaloud, 2006, fig. 8). Pseudobranches originating from reproductive cells are evident in micrographs of *Entransia fimbriata* E. O. Hughes (Cook, 2004, figs. 5e, f), which is closely related to *Klebsormidium*. This observation provides clear evidence that small branches can originate from reproductive cells, as the tip (characteristic of

germinating zoospores of *E. fimbriata* and absent in *Klebsormidium*) is clearly visible on the branches.

However, the formation of biseriate parts, packet-like structures and some other kinds of branches in *Klebsormidium* has another origin, i.e. the division of vegetative cells occurs in several planes. This behaviour was observed in the present study and has been reported in the literature (Ettl & Gärtner, 1995, fig. 203d; Lokhorst, 1996, figs 188, 203, 207, 224). It seems that the cells divide in the same way as packet-forming strains of *Interfilum*.

It is known that the division of chloroplasts, together with the closely adhered peroxisome, occurs before division in vegetative cells of *Klebsormidium* and some other streptophycean algae (*Coleochaete*) (Floyd *et al.*, 1972; Pickett-Heaps *et al.*, 1972; Lokhorst & Star, 1985; Van den Hoek *et al.*, 1995; Honda & Hashimoto, 2007). Furthermore, the septum dividing two protoplasts forms at the same position in the cell where cleavage of these organelles had occurred: the central part of the chloroplast and the centre of the structural complex, where the pyrenoid is located. Therefore, the site of septum formation is strongly correlated with the chloroplast position. Chloroplasts of *Klebsormidium* are usually located laterally, near longitudinal walls of cylindrical cells and parallel to the filament axis. Therefore, a septum dividing two daughter cells is formed in the plane perpendicular to the filament axis (Fig. 67a),

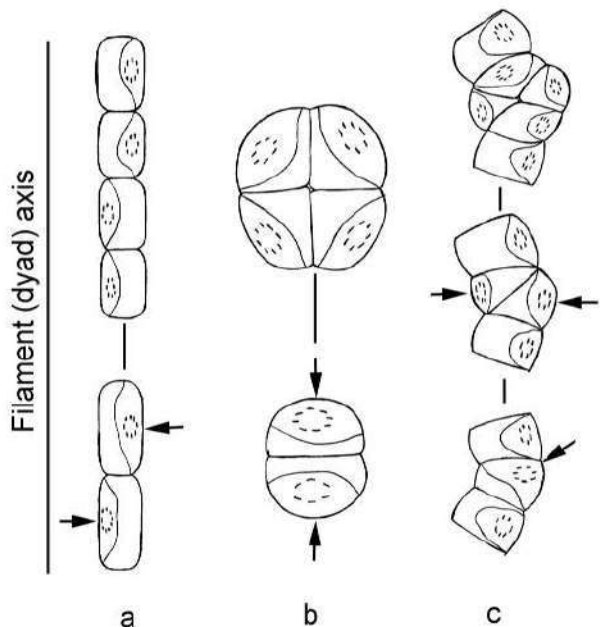


Fig. 67. Scheme of cell division in *Klebsormidium* and *Interfilum*. a: division of cylindrical *Klebsormidium* cells, with formation of normal filament; b: division of almost spherical or wide-ellipsoid *Interfilum* cells, with formation of a packet; c: division of deformed *Klebsormidium* cell, with formation of biseriate part and packet-like structure. Arrows indicate the site of septa formation and plane of cell division.

resulting in a chain of cells. Cells of packet-forming members of *Interfilum* range from nearly spherical to broadly ellipsoid. Chloroplasts in the cell dyad are usually located perpendicular to the dyad axis. This part of the cell wall is the longest, and the chloroplasts are maximally exposed to light. The septum is formed similarly to that in *Klebsormidium*, but parallel to the dyad axis and perpendicular to the previous cross-wall (Fig. 67b). A four-celled packet is formed as a result.

Therefore, the location of the chloroplast (or structural complex) and, partly, the shape of the cell determine the plane of cell division in *Interfilum* and *Klebsormidium*. Interestingly, some fundamental rules concerning cell division in embryophytes indicate that the plane of cell division is correlated with the shape of a cell: new cell walls normally form perpendicularly to the axis of growth of a cell (Dupuy *et al.*, 2010). Therefore, the cross-dividing walls are normally formed in long cells, and longitudinal walls in short cells. Division in several planes does not occur in *Interfilum* strains with long cells. Occasional formation of biserial parts was observed in *Klebsormidium* with short cells, i.e. *K. crenulatum* (Lokhorst, 1996) and *K. montanum* (Hansgirg) S. Watanabe (Ettl & Gärtner, 1995). We usually observed these structures in old cultures of *Klebsormidium*, when the cells became shorter. Sometimes the formation of biserial parts of filaments is related to the deformation of cells, causing a curvature of the filament. The chloroplast has too little space for lateral dislocation in short or deformed cells, and hence sometimes turns from the short lateral wall to the longer cross-wall, or locates obliquely. The septum forms according to the usual rule, but perpendicularly or obliquely to the filament axis (Fig. 67c), in this case forming biserial parts, packet-like structures or branches. Cell division in several planes in both *Interfilum* and *Klebsormidium* shows clearly that many of the properties of dividing plant cells are influenced physically or mechanically (Dupuy *et al.*, 2010).

Type of cell division in Interfilum and Klebsormidium

Various modes of cell division of algae have been described. However, at present two main types of division can be distinguished among green algae with rigid cell walls: sporulation (cytogeny, eleutheroschisis) and vegetative cell division (cytotomy, desmoschisis) (Ettl, 1988a, b; Sluiman *et al.*, 1989). The mechanism of cytokinesis of the two types differs substantially and leads to the formation of different division products: specialized reproductive cells (spores or gametes) or young vegetative cells.

The fundamental morphological characters distinguishing sporulation and vegetative cell division are distinctive features in the formation of daughter cell walls. The cross-wall is always formed *de novo*, but longitudinal cell walls of parental cells are preserved and become part of the daughter cell wall during

vegetative cell division (Ettl, 1988a, b; Massjuk, 1993; Van den Hoek *et al.*, 1995). Therefore, the cell wall of a thallus is integral, since each cell is part of the multicellular organism. Pores with plasmodesmata are often characteristic of cross-walls of multicellular algae, in which separate cells are united in an integrated organism (Van den Hoek *et al.*, 1995). The main characteristic of sporulation is the formation of cell walls by each cell independently within the parental (sporangial) wall (Ettl, 1988a, b; Sluiman *et al.*, 1989). The protoplast of the parental cell divides into several parts, each forming its own cell wall during sporulation. The wall of the parental cell is transformed in different ways: it may degrade, releasing the cells to form unicellular organisms, or remain intact, holding the cells in colonies and forming extracellular structures. The cell walls are discontinuous and the cells are not connected by plasmodesmata, although they are united in multicellular complexes that represent colonies of unicellular organisms (Sluiman *et al.*, 1989).

The type of cell division of many algae is easy to attribute to sporulation because it leads to the formation of a typical unicellular state. Cell division of packet-forming (sarcinoid morphotype) and filamentous algae traditionally was regarded as vegetative cell division (Fritsch, 1935; Smith, 1955). However, the morphological classification created by Ettl (1988a, b) and supported with some ultrastructural characters by Sluiman *et al.* (1989) determined that cell division of many filamentous and sarcinoid algae is actually a kind of sporulation. A complex of ultrastructural and morphological features (mostly accompanied by the presence of partially reduced flagellar structures in daughter cells, specific origin of the septum plasma membrane and a post-cytokinetic circumferential deposition pattern of extracellular material) were used as diagnostic characters indicating cell division via sporulation. The ultrastructural characters of the above-mentioned spores are completely reduced in some algae. The last character (circumferential deposition of the new cell wall) is the most important, as it indicates the formation of a daughter cell wall within the parental wall and attributes cell division to the sporulation type. Cell division of some packet-forming (*Chlorosarcinopsis* Herndon, *Tetracystis* R. M. Brown & H.C. Bold, *Trebouxia* Puymaly) and filamentous algae (*Geminella* Turpin, *Binuclearia*, *Cylindrocapsa*, *Nannochloris* Naumann, *Marvania* F. Hindák, *Microspora*, *Stichococcus* Nägeli, *Oedogonium* Link ex Him) was determined to be sporulation on the basis of these characters (Sluiman, 1985b; Sluiman & Reymond, 1987; Sluiman & Lokhorst, 1988; Sluiman *et al.*, 1989; Yamamoto *et al.*, 2007). The next conclusion derived from this classification was a fundamentally different concept of thallus organization in these algae: colonies of unicellular organisms (packets or pseudofilaments)

and their vegetative cells are spores, according to their origin (Ettl, 1988a, b; Sluiman *et al.*, 1989).

Although this classification system of cell division is generally accepted (Van den Hoek *et al.*, 1995), there are also contradictory arguments (Massjuk, 1997, 2000; Massjuk & Demchenko, 2001), i.e. that the products of the cell division are not spores or gametes, but rather vegetative cells. A wider concept of vegetative cell division was proposed later: 'During vegetative cell division the parental cell wall does not rupture or gelatinize, but is used for organization of daughter cell walls, which leads to the formation of vegetative (somatic, not specialized reproductive) cells and growth of thallus' (Massjuk, 2000). This concept has some debatable points as well. Although parental cell walls in pseudofilamentous algae usually represent support for the daughter cell and are involved in the formation of a thallus, they degrade via rupture or gelatinization and transform into remnants (Sluiman, 1985b; Sluiman & Reymond, 1987; Yamamoto *et al.*, 2007).

The cell division of packet-like and pseudofilamentous algae is a transitional type between sporulation and vegetative cell division. The mechanism of this cell division must be attributed to sporulation: the daughter cell wall forms within the parental wall, and the parental wall represents different stages of degradation. The products of cell division (somatic cells, not spores or gametes) reflect vegetative cell division. The parental cell wall is partially retained after this cell division and participates in the formation of the thallus. In our opinion, the best definition of cell division within packet-like and pseudofilamentous algae is 'desmoschisis' *sensu* Groover & Bold (1969), as previously proposed by Massjuk (2000). However, this term is not generally accepted in modern phycological literature, and is considered a synonym of classical vegetative cell division (Sluiman *et al.*, 1989).

Although cell division in *Interfilum* initially was determined to be vegetative cell division (Chodat & Topali, 1922), Fritsch & John (1942) reported a sporulation-like type of formation of daughter cell walls. The latter authors even considered *I. paradoxum* to be a colonial member of the Chlorococcales. The characters of *Interfilum* cell walls obtained in the present study are arguments for the formation of daughter cell walls within parental walls. Therefore, a sporulation-like type of cell division is characteristic for *Interfilum*.

Vegetative cells of *Klebsormidium* divide by vegetative cell division according to the traditional point of view (Floyd *et al.*, 1972; Pickett-Heaps, 1972; Lokhorst & Star, 1985; Sluiman *et al.*, 1989; Van den Hoek *et al.*, 1995; Lokhorst, 1996). The cell cross-walls form by cleavage furrow and lack plasmodesmata (Lokhorst & Star, 1985; Van den Hoek *et al.*, 1995; Lokhorst, 1996). However, different kinds of remnants of parental cell walls and triangular spaces between parental walls and cell walls of neighbouring cells are structures

characteristic of the sporulation-like type of cell division, and are homologous to structures observed in *Interfilum*. Therefore, the type of cell division within the two genera must be the same. In addition, the presence of cross-walls with an H-like appearance (*Microspora*-type) is an argument for cell division by the sporulation-like type (Sluiman *et al.*, 1989).

Transformation of parental wall and probable structure of thalli in Interfilum and Klebsormidium

Gelatinization of parental walls leads to the formation of a mucilage envelope and disintegration of the thallus to the unicellular state. The cell walls of these *Interfilum* strains are usually thin and homogeneous because they represent a daughter cell wall. Preservation of parental walls around daughter cells caused the formation of densely layered walls, retaining cellular packets. The cell walls of these *Interfilum* strains are thick and layered, because they consist of a daughter cell wall and several generations of parental walls and their remnants. Partial rupture of the parental walls leads to the formation of cap-, ring- and thread-like structures. The left part of the scheme (Fig. 68b–g) shows that different routes of transformation of *Interfilum* parental walls lead to the formation of a specific thallus structure.

Vegetative cells of *Klebsormidium* usually divide in one plane, with subsequent formation of filamentous thalli. The scheme of a filament typical for other algae with the sporulation-like type of cell division (*Geminella*, *Binuclearia*, *Cylindrocapsa*; Massjuk, 1993; Van den Hoek *et al.*, 1995) was chosen as a model of *Klebsormidium* filaments. The parental walls of *Klebsormidium* are partially preserved around two daughter cells during cell division (Fig. 68a). Further division of these cells proceeds in the same way, i.e. a chain of cells surrounded by many generations of parental walls is formed (Fig. 68a, h, j). Generations of parental walls are transformed in different ways (ruptured or gelatinized) because of the pressure of growing cells and remnants over time. This model corresponds to some characters of a *Klebsormidium* thallus and explains the formation of H- and cap-fragments of the cell wall. The different widths of cross-walls within the same filament of *Klebsormidium* is a further confirmation of this scheme; i.e. the cell walls are thin and bilayered between freshly divided cells, and thick and multi-layered between groups of dividing cells.

The morphological diversity within *Klebsormidium* reflects different routes of further transformation of parental walls. The preservation of these parental walls around daughter cells leads to the formation of dense filaments, often with H-fragments (Fig. 68h). The mechanism for the formation of an H-fragment is as follows: the cell cross-wall is pressed from opposite sides by two growing neighbouring cells, and the

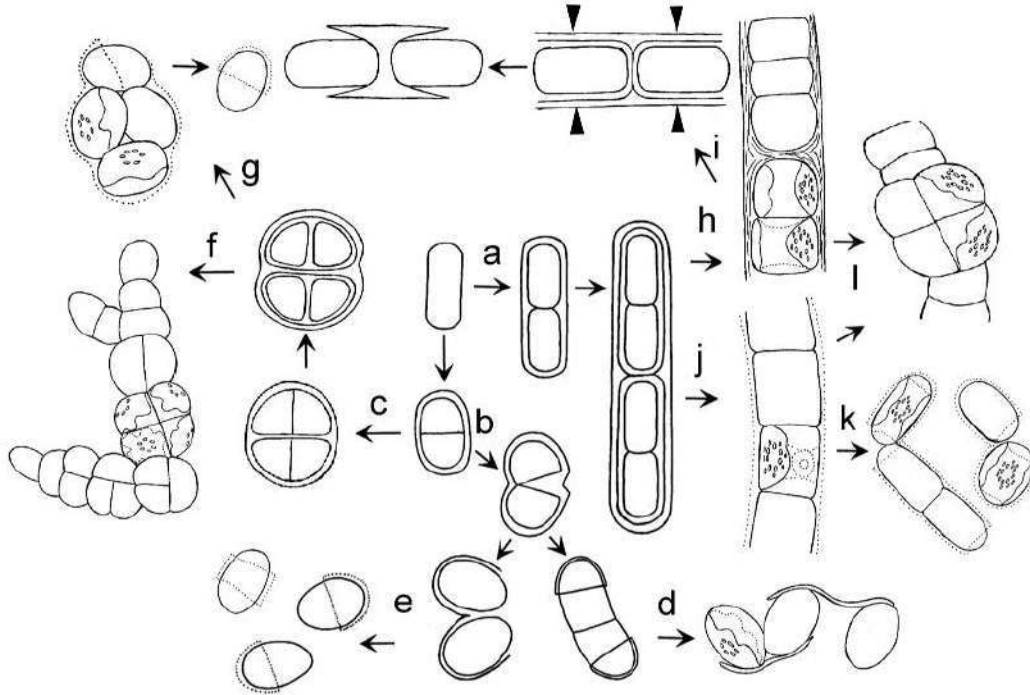


Fig. 68. Scheme showing different routes of transformation of the *Interfilum* and *Klebsormidium* parental-cell wall, leading to formation of different morphotypes. a: preservation of parental wall, cylindrical cells divided mostly in one plane; b: gelatinization or rupture of parental wall; c: preservation of parental wall, almost-spherical cells divided in several planes; d: formation of unicells connected by ‘threads’; e: formation of unicells with cap- and ring-like structures; f: formation of packets and branched thallus; g: gelatinization of parental wall and formation of unicells with cap-like structures; h: preservation of parental wall, formation of strong filaments; i: formation of H-like fragments; j: partial gelatinization of parental wall; k: formation of short filaments, dyads and unicells; l: occasional division in several planes, formation of packet-like structures and biserial parts. Arrowheads indicate sites of rupture of parental wall.

layers of parental cell walls are compressed. Longitudinal cell walls, in contrast, are stretched and become thinner. The filaments are ruptured first in the middle of the longitudinal walls, and the cross-wall is preserved and forms an H-fragment (Fig. 68i). H-fragments are usually formed within the thickest cross-walls, i.e. between groups of dividing cells.

A second route of transformation of the *Klebsormidium* parental wall leads to gelatinization and formation of a delicate mucilage envelope around the filament (Fig. 68j). The filament can easily disintegrate into short filaments, and the unicells are sometimes morphologically similar to unicellular strains of *Interfilum*. These *Klebsormidium* strains sometimes form H-fragments, but this phenomenon is observed rarely because their parental walls are thin and delicate, and gelatinization of cross-walls leads to easy separation of cells. Biserial and packet-like parts of filaments occur occasionally in *Klebsormidium* because of an atypical position of the chloroplast in the cell (Fig. 68l).

Investigations of the ultrastructure of *Klebsormidium* cell walls of different phylogenetic lineages showed a high structural similarity, with some differences in details. These details are the width and degree of lamination of the cell walls, as well as the presence or absence of mucilage. Therefore, the diversity of structures and textures of *Klebsormidium* cell walls

probably represents two main types: (1) dense filaments without mucilage (mostly characteristic of representatives of xerophytic lineages, i.e. clades D, F and G according to Rindi *et al.*, 2011; Fig. 69), and (2) filaments with gelatinized cell walls that easily transform into short filaments or into the unicellular state (characteristic of mesophytic and hydrophytic lineages, i.e. clades E and partially B and C; Fig. 69).

In summary, the data presented here indicate a high similarity in the morphology and ultrastructure of vegetative cells and cell walls of *Interfilum* and *Klebsormidium*, and this similarity is in concordance with results of a recent phylogenetic analysis (Rindi *et al.*, 2011). The different morphology of these genera is mostly a consequence of the different ‘behaviour’ of parental walls after cell division and detachment, as well as of the shape of the vegetative cells. Therefore, the presence of different morphotypes within the two genera depends on shape of cells, mechanical interactions between cells and the influence of environmental conditions.

Structure of cell wall and possible type of cell division in other green and streptophycean algae

Cell walls of two other genera of Klebsormidiales, *Entransia* and *Hormidiella* Iyengar & Kanthamma,

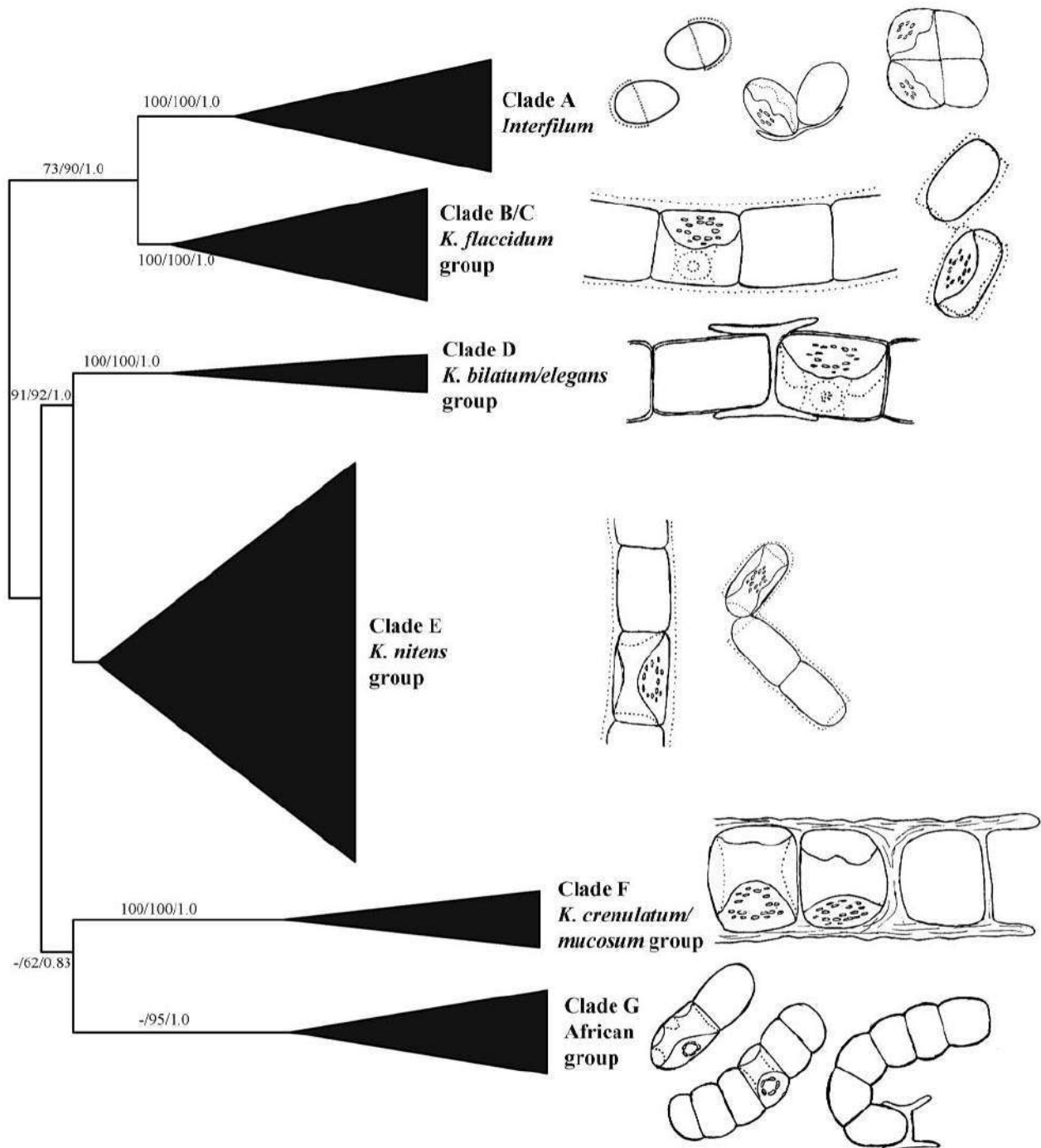


Fig. 69. Schematic phylogenetic tree inferred from Maximum Likelihood analysis of the ITS rRNA in the Klebsormidiales, with bootstrap support (BP) and Bayesian posterior probabilities (PP) indicated at the nodes; from left to right the support values correspond to Neighbour Joining BP, Maximum Likelihood BP and Bayesian PP (Rindi *et al.*, 2011, fig. 1). Right part of the figure shows schematic pictures of representatives corresponding to each clade.

exhibit similar characters to those found in *Interfilum* and *Klebsormidium*. Triangular spaces between daughter and parental walls are visible in TEM micrographs of vegetative cells of *E. fimbriata* (Cook, 2004, figs. 6c, 7g). H-fragments of the cell wall are characteristic for this species (Cook, 2004). H-fragments are unknown for *H. attenuata* Lokhorst (Lokhorst *et al.*, 2000), but we observed these structures in strain CCAP 329/1 cultivated on agar medium (data not

shown). Consequently, cell division in *Entransia* and *Hormidiella* seems to be similar to that in *Interfilum* and *Klebsormidium*.

Triangular spaces between cells and the clear parental wall surrounding cell packet are visible in TEM micrographs of another streptophycean alga, *Chlorokybus atmophyticus* Geitler (Lokhorst *et al.*, 1988, fig. 5). This species was mentioned as the sole representative among species formerly assigned to

Charophyceae that shows a type of cell division intermediate between vegetative cell division and sporulation (Sluiman *et al.*, 1989).

Investigation of species of *Coleochaete* cultivated under conditions simulating the terrestrial habitat (on solid medium and on sand grains) showed the formation of packet-like cell aggregates instead of the typical radial thalli (Graham *et al.*, 2012). Cell packets are formed because of preservation of the parental walls (Graham *et al.*, 2012, fig. 3c). It seems that vegetative cells of *Coleochaete* divide by the sporulation-like type because of the presence of the parental wall. However, the ultrastructural characters of cytokinesis in *Coleochaete* are completely different (formation of the cell plate in a phragmoplast) from those seen in the members of Klebsormidiales or Chlorokybales (cleavage furrow) (Lokhorst *et al.*, 1988; Van den Hoek *et al.*, 1995). These data show that a transition between two fundamentally different thallus structures or morphotypes (radial plate and sarcinoid packet) occurs in nature more often than was previously thought, and depends on environmental conditions. In general, the formation of cell packets and cubic aggregations is typical for many terrestrial algae, and is related to a reduction of the cell surface area subject to evaporation (Nienow, 1996; Karsten *et al.*, 2010). The example of *Coleochaete* shows that the formation of a packet-like morphotype might be an adaptation to terrestrial conditions.

The tendency for cells to easily transition to divide in three planes and form packet-like cell aggregates is probably typical for the sporulation-like type of cell division. This phenomenon was observed within the clade 'Prasiola', including taxa with pseudofilamentous (*Stichococcus*) and pleurococoid packet-like thalli (*Desmococcus* F. Brand, *Diplosphaera* M. N. Bialosuknia) (Pröschold & Leliaert, 2007; Friedl & Rybalka, 2012). Various morphotypes among different lineages of algae are not the result of their multiple origins, but result from tiny morphological changes that dramatically influence their gross morphology.

Acknowledgements

This study was supported by a Georg-Forster research fellowship from the Alexander von Humboldt Foundation, a Grant for Young Scientist Fellowship extended by INTAS (Ref. No. 06-1000014-6216) (T. M.), a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (KA899/16-1/2/3/4) (U.K.), and FWF grant P24242-B16 (A.H.). Our sincere thanks are extended to Professor Thomas Friedl (University of Göttingen) and Dr Sergey Kuznetsov (University of Rostock, Light Microscopy Center) for their help and support, as well as to Dr Thomas Pröschold for information concerning the phylogenetic positions of five strains used, and for fruitful discussion. We thank Beatrix Jungwirth,

University of Innsbruck, for help in sectioning some of the TEM samples.

Supplementary information

The following supplemental material is available for this article, accessible via the Supplementary Content tab on the article's online page at <http://dx.doi.org/10.1080/09670262.2014.949308>

Supplementary table 1. Information for strains of *Klebsormidium* and *Interfilum* used in the study.

References

- BOCK, C., KRIENITZ, L. & PRÖSCHOLD, T. (2011). Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*, **11**: 293–312.
- BÜDEL, B., DARIENKO, T., DEUTSCHWITZ, K., DOJANI, S., FRIEDL, T., MOHR, K.I., SALISCH, M., REISSER, W. & WEBER, B. (2009). Southern African biological soil crusts are ubiquitous and highly diverse in drylands, being restricted by rainfall frequency. *Microbial Ecology*, **57**: 229–247.
- CHODAT, R. & TOPALI, C. (1922). Un paradoxe algologique. *Bulletin de la Société Botanique de Genève*, 2 sér., **13**: 66–74.
- COOK, M.E. (2004). Structure and asexual reproduction of the enigmatic charophycean green alga *Entransia fimbriata* (Klebsormidiales, Charophyceae). *Journal of Phycology*, **40**: 424–431.
- DARIENKO, T., GUSTAVS, L., MUDIMU, O., MENENDES, C., SCHUMANN, R., KARSTEN, U., FRIEDL, T. & PRÖSCHOLD, T. (2010). *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, **45**: 79–95.
- DEMCHENKO, E., MIKHAILYUK, T., COLEMAN, A.W. & PRÖSCHOLD, T. (2012). Generic and species concepts in *Microglena* (previously the *Chlamydomonas monadina* group) revised using an integrative approach. *European Journal of Phycology*, **47**: 264–290.
- DUPUY, L., MACKENZIE, J. & HASELOFF, J. (2010). Coordination of plant cell division and expansion in a simple morphogenetic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **107**: 2711–2716.
- ELIÄS, M., NEUSTUPA, J. & ŠKALOUD, P. (2008). *Elliptochloris bilobata* var. *corticola* var. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccal green alga. *Biologia*, **63**: 791–798.
- ETTL, H. (1983). Chlorophyta I. Phytomonadina. In *Süßwasserflora von Mitteleuropa* (Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. & Mollenhauer, D., editors), Vol. 9: I. Gustav Fischer, Stuttgart.
- ETTL, H. (1988a). Über definition und terminologie der asexuellen fortpflanzungszellen bei grünalgen (Chlorophyta). *Archiv für Protistenkunde*, **135**: 17–34.
- ETTL, H. (1988b). Zellteilung und sporulation als wichtige unterscheidungsmerkmale bei grünalgen (Chlorophyta). *Archiv für Protistenkunde*, **135**: 103–118.
- ETTL, H. & GÄRTNER, G. (1995). *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- FLOYD, G.L., STEWART, K.D. & MATTOX, K.R. (1972). Cellular organization, mitosis and cytokinesis in the Ulotrichalean alga *Klebsormidium*. *Journal of Phycology*, **8**: 176–184.
- FRIEDL, T. & LORENZ, M. (2012). The Culture Collection of Algae at Göttingen University (SAG): a biological resource for biotechnological and biodiversity research. *Procedia Environmental Sciences*, **15**: 110–117.
- FRIEDL, T. & RYBALKA, N. (2012). Systematics of the green algae: a brief introduction of the current status. *Progress in Botany*, **73**: 259–280.
- FRIEDSCH, F.E. (1935). *The Structure and Reproduction of the Algae*. Vol. I. Cambridge University Press, Cambridge.

- FRICTSCH, F.E. & JOHN, R.P. (1942). An ecological and taxonomic study of the algae of British soils. 2. Consideration of the species observed. *Annals of Botany N. S.*, **6**: 371–395.
- GACHON, C.M., DAY, J.G., CAMPBELL, C.N., PRÖSCHOLD, T., SAXON, R. J. & KÜPPER, F.C. (2007). The Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP): a biological resource for protistan genomics. *Gene*, **406**: 51–57.
- GRAHAM, L.E., ARANCIBIA-AVILA, P., TAYLOR, W.A., STROTHER, P.K. & COOK, M.E. (2012). Aeroterrestrial *Coleochaete* (Streptophyta, Coleochaetales) models early plant adaptation to land. *American Journal of Botany*, **99**: 130–144.
- GROOVER, R.D. & BOLD, H.C. (1969). The taxonomy and comparative physiology of the Chlorosarcinales and certain other edaphic algae. *Phycological Studies VIII*. University of Texas Publication no. 6907: 1–165.
- GROSS, W. (1993). Peroxisomes in algae: their distribution, biochemical function and phylogenetic importance. *Progress in Phycological Research*, **9**: 47–78.
- HOLZINGER, A., ROLEDA, M.Y. & LÜTZ, C. (2009). The vegetative arctic green alga *Zygnema* is insensitive to experimental UV exposure. *Micron*, **40**: 831–838.
- HOLZINGER, A., LÜTZ, C. & KARSTEN, U. (2011). Desiccation stress causes structural and ultrastructural alterations in the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) isolated from an alpine soil crust. *Journal of Phycology*, **47**: 591–602.
- HONDA, M. & HASHIMOTO, H. (2007). Close association of centrosomes to the distal ends of the microbody during its growth, division and partitioning in the green alga *Klebsormidium flaccidum*. *Protoplasma*, **231**: 127–135.
- JANE, F.W. & WOODHEAD, N. (1941). The formation of “H-pieces” in the walls of *Ulothrix* and *Hormidium*. *New Phytologist*, **40**: 183–188.
- KAPLAN, F., LEWIS, L.A., WASTIAN, J. & HOLZINGER, A. (2012). Plasmolysis effects and osmotic potential of two phylogenetically distinct alpine strains of *Klebsormidium* (Streptophyta). *Protoplasma*, **249**: 789–804.
- KARSTEN, U., FRIEDL, T., SCHUMANN, R., HOYER, K. & LEMBECKE, S. (2005). Mycosporine-like amino acids and phylogenies in green algae: *Prasiola* and its relatives from the Trebouxioophyceae (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, **41**: 557–566.
- KARSTEN, U. & HOLZINGER, A. (2012). Light, temperature and desiccation effects on photosynthetic activity and drought-induced ultrastructural changes in the green alga *Klebsormidium dissectum* (Streptophyta) from a high alpine soil crust. *Microbial Ecology*, **63**: 51–63.
- KARSTEN, U., LÜTZ, C. & HOLZINGER, A. (2010). Ecophysiological performance of the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Charophyceae, Streptophyta) isolated from an alpine soil crust with an emphasis on desiccation stress. *Journal of Phycology*, **46**: 1187–1197.
- KARSTEN, U., PRÖSCHOLD, T., MIKHAILYUK, T. & HOLZINGER, A. (2013). Photosynthetic performance of different genotypes of the green alga *Klebsormidium* sp. (Streptophyta) isolated from biological soil crusts of the Alps. *Algological Studies*, **142**: 45–62.
- KATSAROS, C.I., VARVARIGOS, V., CACHON, C.M.M., BRAND, J., MOTOMURA, T., NAGASATO, C. & KÜPPER, F. (2011). Comparative immunofluorescence and ultrastructural analysis of microtubule organization in *Uronema* sp., *Klebsormidium flaccidum*, *K. subtilissimum*, *Stichococcus bacillaris* and *S. chloranthus* (Chlorophyta). *Protist*, **162**: 315–331.
- KITZING, C., PRÖSCHOLD, T. & KARSTEN, U. (2014). UV-induced effects on growth, photosynthetic performance and sunscreen contents in different populations of the green alga *Klebsormidium fuitans* (Streptophyta) from alpine soil crusts. *Microbial Ecology*, **67**: 327–340.
- KLEBS, G. (1896). *Über die Fortpflanzungs-Physiologie der niederen Organismen, der Protobionten. Spezieller Theil. Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen*. Gustav Fischer, Jena.
- KORSHIKOV, O.A. (1938). Volvocineae. In *Významyk prsnovodnykh vodorostej Ukrainskoj RSR* (Roll, Y.V., editor). Akad. Nauk USSR, Kiev [in Ukrainian].
- LOKHORST, G.M. (1996). Comparative taxonomic studies on the genus *Klebsormidium* (Charophyceae) in Europe. *Cryptogamic Studies*, **5**. Gustav Fischer, Stuttgart.
- LOKHORST, G.M. & STAR, W. (1985). Ultrastructure of mitosis and cytokinesis in *Klebsormidium mucosum* nov. comb., formerly *Ulothrix verrucosa* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, **21**: 466–476.
- LOKHORST, G.M., SLUIMAN, H.J. & STAR, W. (1988). The ultrastructure of mitosis and cytokinesis in the sarcinoid *Chlorokybus atmophyticus* (Chlorophyta, Charophyceae) revealed by rapid freeze fixation and freeze substitution. *Journal of Phycology*, **24**: 237–248.
- LOKHORST, G.M., STAR, W. & LUKEŠOVA, A. (2000). The new species *Hormidiella attenuata* (Klebsormidiales), notes on morphology and reproduction. *Algological Studies*, **100**: 11–27.
- MASSALSKI, A. (2002). Ultrastructural investigations of algae and the products of their secretion in development of modern taxonomical and hydrobiological concepts. D.Sc. Thesis, Taras Shevchenko Kyiv National University, Kiev [in Ukrainian].
- MASSALSKI, A. & KOSTIKOV, I. (2005). Mitochondrial approach in taxonomy of green algae. In *International Conference on “Algae in Terrestrial Ecosystems”*. Kaniv, Ukraine, 27–30, September 2005. Abstracts: 50.
- MASSALSKI, A., MROZINSKA, T. & OLECH, M. (1995). *Lobococcus irregularis* (Boye-Pet.) Reisinger var. nov. (Chlorellales, Chlorophyta) from King George Island, South Shetland Islands, Antarctica, and its ultrastructure. *Nova Hedwigia*, **61**: 199–206.
- MASSJUK, N.P. (1993). *Evolutionary Aspects of Morphology of Eukaryotic Algae*. Nauk. Dumka, Kiev [in Russian].
- MASSJUK, N.P. (1997). Diversity of ways of cell division of eukaryotic algae and principles of their classification. *Ukrainian Botanical Journal*, **54**: 221–231 [in Ukrainian].
- MASSJUK, N.P. (2000). The concept of vegetative cell division in phycology. *International Journal on Algae*, **2**: 1–14.
- MASSJUK, N.P. & DEMCHENKO, E.N. (2001). A new type of cell division in Chlamydomonadaceae (Chlorophyta). *International Journal on Algae*, **3**: 18–30.
- MELKONIAN, M. (1989). Flagellar apparatus ultrastructure in *Mesosigma viride* (Prasinophyceae). *Plant Systematics and Evolution*, **164**: 93–122.
- MIKHAILYUK, T.I., SLUIMAN, H., MASSALSKI, A., MUDIMU, O., DEMCHENKO, E., KONDRATYUK, S. & FRIEDL, T. (2008). New streptophyte green algae from terrestrial habitats and an assessment of the genus *Interfilum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Journal of Phycology*, **44**: 1586–1603.
- MORISON, M.O. & SHEATH, R.G. (1985). Responses to desiccation stress by *Klebsormidium rivulare* (Ulotrichales, Chlorophyta) from a Rhode Island stream. *Phycologia*, **24**: 129–145.
- MOSKOVA, N.A. (1979). Ulotrichales, Cladophorales. In *Významyk prsnovodnykh vodorostej Ukrainskoj RSR*. Issue VI. Nauk. Dumka, Kiev [in Ukrainian].
- NEUSTUPA, J., ELIÁŠ, M., ŠKALOUŠ, P., NEMCOVÁ, Y. & ŠEJNOHÁ, L. (2011). *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (Trebouxioophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga. *Phycologia*, **50**: 57–66.
- NIENOW, J.A. (1996). Ecology of subaerial algae. *Nova Hedwigia, Beiheft*, **112**: 537–552.
- PICKETT-HEAPS, J.D. (1972). Cell division in *Klebsormidium subtilissimum* (formerly *Ulothrix subtilissima*) and its possible phylogenetic significance. *Cytobiosis*, **6**: 167–183.
- PROCTOR, M.C.F., LIGRONE, R. & DUCKETT, J. (2007). Desiccation tolerance in the moss *Polytrichum formosum*: physiological and fine-structural changes during desiccation and recovery. *Annals of Botany*, **99**: 75–93.
- PRÖSCHOLD, T. & LELIAERT, F. (2007). Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. In *Unravelling the Algae: the Past, Present, and Future of Algal Systematics* (Brodie, J. & Lewis, J., editors), 123–153. Taylor and Francis, London.
- PRÖSCHOLD, T., MARIN, B., SCHLÖSSER, U.G. & MELKONIAN, M. (2001). Molecular phylogeny and taxonomic revision of

- Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chloromonas* Gobi, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist*, **152**: 265–300.
- PRÖSCHOLD, T., DARIENKO, T., SILVA, P.C., REISSER, W. & KRIENITZ L. (2011). The systematics of *Zoochlorella* revisited employing an integrative approach. *Environmental Microbiology*, **13**: 350–364.
- RAVEN, P.H., EVERE, R.F. & EICHORN, S.E. (2005). *Biology of Plants*. 7th ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- RINDI, F., ALLALI, H.A., LAM, D.W. & LÓPEZ-BAUTISTA, M. (2009). An overview of the biodiversity and biogeography of terrestrial green algae. In *Biodiversity Hotspots* (V. Rescigno et al., editors), 105–122. Nova Science Publishing, Hauppauge, NY.
- RINDI, F., MIKHAILYUK, T.I., SLUIMAN, H.J., FRIEDL, T. & LÓPEZ-BAUTISTA, J.M. (2011). Evolutionary patterns and phylogenetic relationships in the green algal order Klebsormidiales (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **58**: 218–231.
- ROGERS, C.E., MATTOX, K.R. & STEWART, K.D. (1980). The zoospore of *Chlorokybus atmophyticus*, a charophyte with sarcinoid growth habit. *American Journal of Botany*, **67**: 774–783.
- SILVERBERG, B.A. (1975). An ultrastructural and cytochemical characterization of microbodies in the green algae. *Protoplasma*, **83**: 269–295.
- SILVERBERG, B.A. & SAWA, T. (1973). An ultrastructural and cytochemical study of microbodies in the genus *Nitella* (Characeae). *Canadian Journal of Botany*, **51**: 2025–2032.
- ŠKALOUD, P. (2006). Variation and taxonomic significance of some morphological features in European strains of *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Nova Hedwigia*, **83**: 533–550.
- ŠKALOUD, P. & PEKSA, O. (2008). Comparative study of chloroplast morphology and ontogeny in *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Biologia*, **63**: 873–880.
- ŠKALOUD, P. & PEKSA, O. (2010). Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **54**: 36–46.
- ŠKALOUD, P. & RINDI, F. (2013). Ecological differentiation of cryptic species within an asexual protist morphospecies: a case study of filamentous green alga *Klebsormidium* (Streptophyta). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **60**: 350–362.
- SLUIMAN, H.J. (1985a). *Comparative Studies on the Ultrastructure, Phylogeny and Classification of Green Algae*. Academisch Proefschrift, VU Uitgeverij, Amsterdam.
- SLUIMAN, H.J. (1985b). Mitosis and cell division in *Cylindrocapsa geminella* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, **21**: 523–532.
- SLUIMAN, H.J. & LOKHORST, G.M. (1988). The ultrastructure of cellular division (autosporegenesis) in the coccoid green alga, *Trebouxia aggregata*, revealed by rapid freeze fixation and freeze substitution. *Protoplasma*, **144**: 149–159.
- SLUIMAN, H.J. & REYMOND, O.L. (1987). Cell division in the green microalga *Marvania geminata*: Semi-exogenous autosporegenesis, role of coated pit-microtubule complexes, and systematic significance. *Acta Botanica Neerlandica*, **36**: 231–245.
- SLUIMAN, H.J., KOUWETS, A.C. & BLOMMERS, P.C.J. (1989). Classification and definition of cytokinetic patterns in green algae: sporulation versus (vegetative) cell division. *Archiv für Protistenkunde*, **137**: 277–290.
- SLUIMAN, H.J., GUIHAL, C. & MUDIMU, O. (2008). Assessing phylogenetic affinities and species delimitations in Klebsormidiales (Streptophyta): nuclear-encoded rDNA phylogeny and ITS secondary structure models in *Klebsormidium*, *Hormidiella* and *Entransia*. *Journal of Phycology*, **44**: 183–195.
- SMITH, G.M. (1955). *Cryptogamic Botany*. Vol. I. McGraw-Hill, New York.
- STARMACH, K. (1972). Chlorophyta III. Zielenice nitkowate. In *Flora Sładowodna Polski*. Vol. 10. (Starmach, K., editor). Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warsaw-Krakow.
- STARR, R.C. & ZEIKUS, J.A. (1993). UTEX – the Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. *Journal of Phycology*, **29**(Suppl.): 1–106.
- STEWART, K.D., FLOYD, G.L., MATTOX, K.R. & DAVIS, M.E. (1972). Cytochemical demonstration of a single peroxisome in a filamentous green alga. *Journal of Cell Biology*, **54**: 431–434.
- TOURTE, M. (1972). Mise en évidence d'une activité catalasique dans les peroxysomes de *Micrasterias fimbriata* Ralfs. *Planta*, **105**: 50–59.
- TSCHERMAK-WOESS, E. (1980a). *Asterochloris phycobiontica*, gen. et spec. nov., der Phycobiont von der Flechte *Varicellaria carneonivea*. *Plant Systematics and Evolution*, **135**: 279–294.
- TSCHERMAK-WOESS, E. (1980b). *Elliptochloris bilobata*, gen. et spec. nov., der Phycobiont von *Catolechia wahlenbergii*. *Plant Systematics and Evolution*, **136**: 63–72.
- VAN DEN HOEK, C., MANN, D.G. & JAHNS, H.M. (1995). *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- YAMAMOTO, M., NISHIKAWA, T., KAJITANI, H. & KAWANO, S. (2007). Patterns of asexual reproduction in *Nannochloris bacillaris* and *Marvania geminata* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta*, **226**: 917–927.

2.2. Молекулярна філогенія, таксономія, різноманіття та біологія роду

Klebsormidium

2.2.1. Різноманіття *Klebsormidium* у альпійських біологічних ґрунтових кірочках (Альпи, Тіроль, Австрія та Італія)

BIODIVERSITY OF *KLEBSORMIDIUM* (STREPTOPHYTA) FROM ALPINE BIOLOGICAL SOIL CRUSTS (ALPS, TYROL, AUSTRIA, AND ITALY)¹

Tatiana Mikhailyuk

M.H. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Science of Ukraine, Tereshchenkivska St. 2, Kiev UA-01001, Ukraine

Karin Glaser

Institute of Biological Sciences, Applied Ecology and Phycology, University of Rostock, Albert-Einstein-Strasse 3, Rostock D-18057, Germany

Andreas Holzinger

Institute of Botany, Functional Plant Biology, University of Innsbruck, Sternwartestrasse 15, Innsbruck A-6020, Austria

and *Ulf Karsten*²

Institute of Biological Sciences, Applied Ecology and Phycology, University of Rostock, Albert-Einstein-Strasse 3, Rostock D-18057, Germany

Forty *Klebsormidium* strains isolated from soil crusts of mountain regions (Alps, 600–3,000 m elevation) were analyzed. The molecular phylogeny (internal transcribed spacer rDNA sequences) showed that these strains belong to clades B/C, D, E, and F. Seven main (*K. flaccidum*, *K. elegans*, *K. crenulatum*, *K. dissectum*, *K. nitens*, *K. subtile*, and *K. fluitans*) and four transitional morphotypes (*K. cf. flaccidum*, *K. cf. nitens*, *K. cf. subtile*, and *K. cf. fluitans*) were identified. Most strains belong to clade E, which includes isolates that prefer humid conditions. One representative of the xerophytic lineage (clade F) as well as few isolates characteristic of temperate conditions (clades B/C, D) were found. Most strains of clade E were isolated from low/middle elevations (<1,800 m above sea level; a.s.l.) in the pine-forest zone. Strains of clades B/C, D, and F occurred sporadically at higher elevations (1,548–2,843 m a.s.l.), mostly under xerophytic conditions of alpine meadows. Comparison of the alpine *Klebsormidium* assemblage with data from other biogeographic regions indicated similarity with soil crusts/biofilms from terrestrial habitats in mixed forest in Western Europe, North America, and Asia, as well as walls of buildings in Western European cities. The alpine assemblage differed substantially from crusts from granite outcrops and sand dunes in Eastern Europe (Ukraine), and fundamentally from soil crusts in South African drylands. Epitypification of the known species *K. flaccidum*, *K. crenulatum*, *K. subtile*, *K. nitens*, *K. dissectum*, *K. fluitans*,

K. mucosum, and *K. elegans* is proposed to establish taxonomic names and type material as an aid for practical studies on these algae, as well as for unambiguous identification of alpine strains. New combination *Klebsormidium subtile* (Kützing) Mikhailyuk, Glaser, Holzinger et Karsten comb. nov. is made.

Key index words: biodiversity; distribution; ecology; epitypification; *Klebsormidium*; molecular phylogeny; morphological characters; phenotypic plasticity

Abbreviations: a.s.l., above sea level; ITS, internal transcribed spacer; ML, maximum likelihood; SAG, Culture Collection of Algae at Göttingen University, Germany

Biological soil crusts are essential elements of extreme terrestrial habitats, where the growth of higher plants is limited by a complex of unfavorable abiotic factors. These communities represent composite micro-ecosystems that mainly include bacteria, cyanobacteria, algae, fungi, lichens, liverworts, and mosses, in varying proportions depending on the environmental conditions (Belnap and Lange 2001, Büdel 2002). Biological crusts can stabilize soil surfaces by gluing together sand grains and soil particles, thereby acting as the first (pioneer) stage of soil formation before settlement of higher plant propagules. In addition, these cryptogamic crusts form water-stable aggregates that have important ecological roles in primary production, nutrient cycling, and water retention of soils (Evans and Johansen 1999, Lewis 2007). Biological soil crusts are present in all terrestrial habitats worldwide, where the growth of

¹Received 7 November 2014. Accepted 12 May 2015.

²Author for correspondence: e-mail ulf.karsten@uni-rostock.de.
Editorial Responsibility: P. Gabrielson (Associate Editor)

vascular plants is limited by low water availability and extremes of temperature (Belnap and Lange 2001).

The algal species composition of cryptogamic crusts in different regions is astonishingly similar and typically includes taxa that are adapted to extreme environments, mostly cyanobacteria (West 1990, Sant'Anna and Azevedo 1991, Rosentreter and Belnap 2001). However, some studies have indicated that the climatic conditions of some regions influence the composition of crusts. Biological soil crusts from deserts of North America (temperate zone) include many green algae (Johansen et al. 1982), whereas significant parts of cryptogamic crusts from Antarctica are composed of prasiolacean green algae (Green and Broady 2001). Filamentous streptophycean green algae (*Zygonium* Kützing and *Klebsormidium* P.C. Silva, Mattox & Blackwell) dominate the soil crusts of temperate Europe (Lukešová and Komárek 1987, Hoppert et al. 2004), while diatoms and conjugating green algae are the main components of soil crusts in the tundra zone (Skuja 1964).

The Alps constitute an extreme habitat for photosynthetic organisms, including terrestrial algae, due to their harsh climatic and environmental conditions: wide seasonal and diurnal temperature fluctuations, occasional frost in summer, strong impact of wind causing drought and abrasion, and rarefied atmosphere, as well as high levels of insolation including intense ultraviolet radiation that increases with elevation (Lütz and Engel 2007). Investigation of algae present in alpine soil crusts is important because of their possible adaptation to withstand the extreme environmental conditions that are typical for mountains, and because of their essential role in alpine terrestrial ecosystems. Nevertheless, data on the composition and ecology of these algal assemblages are sparse in comparison with the knowledge of soil crusts from arid and polar regions (Türk and Gärtner 2001, Karsten and Holzinger 2014).

Investigations of the species composition, distribution, and ecology of algae from alpine soils began in the 1960s (Pitschmann 1963, Reisingl 1964, 1969, Trenkwalder 1975, Vinatzer 1975). The information was completed and summarized by Reisingl (1964) and later by Türk and Gärtner (2001) and Ettl and Gärtner (1995, 2014). Some data on the species composition and characteristics of alpine soil algae are included in the contributions of Gärtner (2004), Tschakner et al. (2007, 2008) and Tschakner (2008). As a result, new species of terrestrial algae from different genera (especially *Heterococcus* Chodat, *Myrmecia* Printz, *Leptosira* Borzi, *Botrydiopsis* Borzi, *Trochisciopsis* Vinatzer, *Coelastrella* Chodat, and others) were described, and some data on the ecology and distribution of known taxa were provided (Ettl and Gärtner 2014). Türk and Gärtner (2001) provided information about the species composition of algae of biological soil crusts in the Alps, which contain abundant filamentous streptophycean and xanthophycean algae, along with cyanobacteria.

Members of the filamentous green alga genus *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) are one of the essential components of soil crusts. These algae are widely distributed in terrestrial habitats worldwide (Hoffmann 1989, Lokhorst 1996, Rindi et al. 2008, 2011). The reasons for the ability of *Klebsormidium* to survive and develop high biomass under extremely dry, insolated, hot, or cold terrestrial conditions are not completely understood, but more recent publications indicate a high potential for acclimation to fluctuations in water availability, temperature, and solar radiation (Holzinger and Karsten 2013, Karsten and Holzinger 2014, Kitzing et al. 2014). A recent transcriptomic approach revealed that all prerequisites for living in a terrestrial habitat (e.g., ROS protection mechanisms, and up-regulation of enzymes involved in the biosynthesis of the raffinose family of oligosaccharides for osmotic protection) are present in *Klebsormidium crenulatum* (Kützing) Lokhorst (Holzinger et al. 2014). The presence of these prerequisites was further supported by a genome-sequencing study of *Klebsormidium flaccidum* (Kützing) P.C. Silva, Mattox & W.H. Blackwell (Hori et al. 2014). However, the taxonomy of *Klebsormidium* is problematic because of high morphological uniformity and plasticity as well as, probably, a high degree of hidden cryptic diversity (Rindi et al. 2008, 2011, Škaloud and Rindi 2013). Despite the many investigations on morphology, ontogeny, ultrastructure, and phylogeny of *Klebsormidium* (Stewart and Mattox 1975, Lokhorst and Star 1985, Lokhorst 1996, Škaloud 2006, Rindi et al. 2008, 2011, Sluiman et al. 2008, Škaloud and Rindi 2013, Škaloud et al. 2014, Ryšánek et al. 2015 and references therein), unambiguous identification of species in the genus remains difficult. Species delimitation within *Klebsormidium* and even the phylogenetic position of the type species, *K. flaccidum*, are still under debate (Rindi et al. 2011, Škaloud and Rindi 2013, Škaloud et al. 2014). The type material of most of the known *Klebsormidium* species is represented by herbarium sheets (Lokhorst 1996, Rindi et al. 2011), and it is urgently necessary to provide epitypification and designation of the various taxa based on algal strains that are deposited and accessible in culture collections.

Our investigation is part of a broader study on the ecology and ecophysiological performance of *Klebsormidium* as a component of alpine biological soil crusts of the Tyrolean Alps (Karsten et al. 2010, 2013, Holzinger et al. 2011, Kaplan et al. 2012, Karsten and Holzinger 2012, 2014, Kitzing et al. 2014), highlighting its biodiversity using an integrative approach. We isolated strains of *Klebsormidium* from biological soil crusts collected in mountain regions at different elevations (Tyrolean Alps, Austria and Italy, between 600 and 3,000 m a.s.l.), to undertake morphological identifications, to evaluate their genetic diversity, and finally to correlate the biodiversity with the elevational and ecological/biogeographic

graphic distributions. Another goal was the epitypification of some well-described *Klebsormidium* species, to link names to type material, as an improved baseline for future taxonomic studies on original and newly isolated material.

MATERIAL AND METHODS

Collection sites, strain isolation and culture conditions. Most of the 40 strains of *Klebsormidium* were isolated from samples of the top 5 mm of alpine biological soil crust collected at different locations in Tyrol (Austria, Italy) during spring 2009; a few samples were collected as biofilms covering rock surfaces or artificial stone substrates. Two strains were isolated in 2007, and five isolates were provided by Prof. Georg Gärtner, University of Innsbruck, Austria. The strain number, origin, and habitat of all the *Klebsormidium* isolates are provided in Table S1 in the Supporting Information.

Klebsormidium from the field samples were purified and established as unialgal cultures by the procedure of Tschalner (2008). All *Klebsormidium* cultures were cultured on solid (1.5% agar) and liquid modified Bold's Basal Medium (Starr and Zeikus 1993) and kept at 20°C and 30–35 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ under a light:dark cycle of 16:8 L:D. Osram Daylight Lumilux Cool White lamps (L36W/840; Osram, Munich, Germany) were used as light sources. The cultures are kept in duplicates in the culture collections of the University of Innsbruck, Institute of Botany, Functional Plant Biology and at the University of Rostock, Institute of Biological Sciences, Applied Ecology and Phycology.

Other *Klebsormidium* strains involved in the investigation. Epitypification of known *Klebsormidium* species was undertaken to link names to their respective type specimens, thus allowing consistent species identification of strains isolated from alpine soil crusts. Eight strains from the Sammlung von Algenkulturen, University of Göttingen, Germany (SAG: Friedl and Lorenz 2012, www.epsag.uni-goettingen.de) were used for comparison with the alpine isolates. Comprehensive information on these strains was previously presented by Rindi et al. (2011).

Light microscopy and morphological characterization. Young (2- to 3-week old) and old (2- to 3-month old) cultures of all *Klebsormidium* strains were characterized morphologically using an Olympus IX70 light microscope (Olympus Europa Holding, Hamburg, Germany) with Nomarski differential interference optics. Filament morphology was documented with a ColorView II camera (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany) using the imaging software analySIS (Soft Imaging System GmbH). The identification keys of Starmach (1972), Moshkova (1979), Ettl and Gärtner (1995), Hindák (1996) and Lokhorst (1996) were used to identify the taxa prior to the morphological studies. Filament and cell shape and size, morphology of chloroplasts and pyrenoids, presence of H-like fragments of cell wall and mucilage, growth habit on solid and in liquid medium, as well as modifications of all these characters during the life cycle were documented.

DNA isolation, PCR, sequencing, and phylogenetic analyses of the *Klebsormidium* strains. Genomic DNA was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Internal transcribed spacer (ITS) rDNA was amplified in a thermocycler (T gradient Thermoblock, Biometra, Germany) according to Luo et al. (2006) using the Taq PCR Mastermix Kit (Qiagen GmbH) with the primers (EAF3 and ITS055R) published by Marin et al. (2003); PCR products were purified using the Qiagen PCR purification kit (Qiagen GmbH), following the instructions provided by the manufacturer; purified PCR products were sequenced with an ABI 3730 sequencer using the primers 1400F, ITS2F, GF, and GR

(Marin et al. 2003, Pröschold et al. 2005). Nucleotide sequences were deposited in GenBank under the accession numbers given in Figure 1 and Table S1. Sequences of strains marked with an exclamation point in Figure 1 were previously published by Rindi et al. (2011), but without 5.8S rDNA. These sequences were completed or corrected by one of us (TM) and were resubmitted to GenBank. The new accession numbers of these sequences are given in Figure 1.

Forty-nine sequences of *Klebsormidium* and *Interfilum* Chodat strains were used for comparison with strains from alpine soil crusts. These sequences were published by Sluiman et al. (2008), Rindi et al. (2008), and Škaloud and Rindi (2013). Multiple alignments of the newly determined ITS1 and ITS2 rDNA sequences and other sequences selected from the GenBank databases were made using ClustalW and then corrected manually using Bioedit software (Hall 1999). The resulting alignments of the 89 *Klebsormidium* and *Interfilum* strains were a concatenated data set (611 bp) of ITS-1 (365 bp) and ITS-2 (246 bp) rDNA sequences according to other researchers working on these genera (Rindi et al. 2008, 2011, Škaloud and Rindi 2013).

To determine the evolutionary model that best fit the data set, the program MEGA version 6 (Tamura et al. 2013) was used. For maximum likelihood (ML), the GTR model with the proportion of invariable sites (I), and the gamma shape parameter (G) resulted in the lowest Akaike Information Criterion (Akaike 1974). For Bayesian analyses, GTR+G had the lowest Bayesian Information Criterion.

The unrooted phylogenetic tree was constructed in MrBayes 3.2.2 (Huelsenbeck and Ronquist 2001, Ronquist and Huelsenbeck 2003) using the GTR+G model with 5,000,000 generations. Two runs of four Monte Carlo Markov Chains were calculated simultaneously, with trees sampled every 500 generations. Split frequency between the runs was below 0.01 at the end of the calculation. The trees sampled before the likelihood scores reached saturation were discarded afterward. The robustness of the tree topology was confirmed by ML (GTR+I+G) performed in GARLI 2.0 (March 2011), and bootstrap support was calculated with 1,000 replicates.

Statistical analyses. Statistical analyses were done in R software (Version 3.1, R Development Core Team 2009). To visualize the dissimilarities in the composition of *Klebsormidium* clades between different habitats, the non-metric multidimensional scaling (nMDS) plot was calculated based on the Bray-Curtis dissimilarity index (Bray and Curtis 1957). Goodness of fit was estimated based on the threshold recommended by Clarke and Ainsworth (1993). The distribution patterns of *Klebsormidium* clades along the elevation gradient were visualized by boxplots, also calculated with R software.

RESULTS

Eleven distinct morphotypes were identified among the alpine *Klebsormidium* strains studied. Seven morphotypes represented known *Klebsormidium* species, according to their morphology: *K. flaccidum* K. elegans Lokhorst, *K. crenulatum*, *K. dissectum* (F. Gay) H. Ettl & G. Gärtner, *K. nitens* (Kützing) Lokhorst, *K. subtile* (Kützing) Tracanna ex Tell and *K. fluitans* (F. Gay) Lokhorst. Four morphotypes were impossible to identify unambiguously with reference to known species, because they were transitional morphological forms between described species. These isolates were identified as follows: *K. cf. flaccidum* (transitional morphotype between *K. flaccidum* and *K. dissectum*), *K. cf. nitens* (*K. nitens*

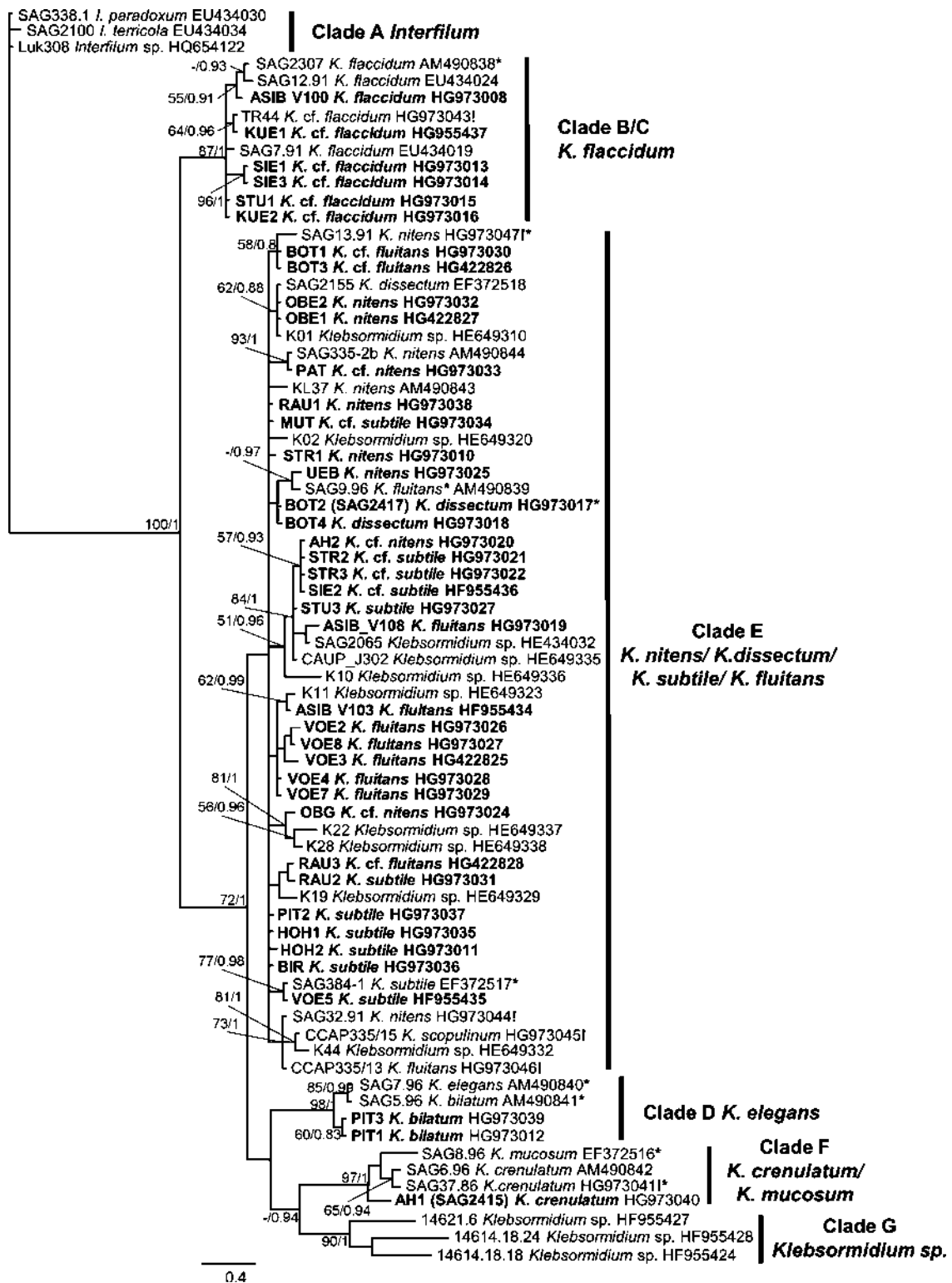


Fig. 1. Molecular phylogeny (unrooted) of *Interfilum* (*I.*) and *Klebsormidium* (*K.*) based on ITS-1 and ITS-2 rDNA sequence comparisons. Phylogenetic tree was inferred by Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and maximum likelihood (ML) bootstrap support (BP) indicated at nodes. From left to right, support values correspond to Bayesian PP and ML BP; BP values lower than 50% and PP lower than 0.8 not shown. Strains marked in bold are sequences of *Klebsormidium* strains from alpine soil crusts. Strains marked with asterisk (*) are proposed as epitypes. Strains marked with exclamation mark (!) are resubmissions of corrected or completed sequences previously published by Rindi et al. (2011). Clade designations follow Rindi et al. (2011).

and *K. dissectum*), *K. cf. subtile* (*K. nitens* and *K. subtile*), and *K. cf. fluitans* (*K. subtile* and *K. fluitans*).

Klebsormidium is characterized by a high level of morphological plasticity, and hence we often found different morphotypes over the course of repeated observations on the same strain, reflecting different culture ages and developmental stages. The representatives with thin or medium-sized filaments had in general a high level of variability. This variation in what are considered informative taxonomic characters, such as cell length and filament width and the degree of its disintegration, influenced the general appearance of *Klebsormidium* filaments. Descriptions and images of morphotypes of alpine *Klebsormidium* strains are presented in Table 1 and Figures 2–4.

The Bayesian phylogenetic tree of ITS rDNA sequences is presented in Figure 1. Six previously described clades are shown on the tree: A, B/C, D, E, F, and G. The ITS phylogeny did not clearly differentiate between clades B and C. Clade E, which included the majority of strains, had weak statistical support and limited resolution of some subclades.

Forty of the strains from alpine soil crusts were distributed among the main phylogenetic lineages of *Klebsormidium*: clades B/C, D, E, and F. An exception was clade G, which is composed mostly of strains isolated from arid regions. The majority of alpine strains (31, 77.5%) were included in clade E, which contains the largest number of taxa (Fig. 5): *K. dissectum*, *K. nitens*, *K. cf. nitens*, *K. subtile*, *K. cf. subtile*, *K. fluitans*, and *K. cf. fluitans*. Many fewer strains were distributed among clades B/C (6 strains, 15.0%), D (2 strains, 5.0%) and F (1 strain, 2.5%). Clade B/C united two morphotypes: *K. flaccidum* and *K. cf. flaccidum*. Clades D and F included one morphotype each: *K. elegans* and *K. crenulatum*, respectively.

The distribution of *Klebsormidium* morphotypes and lineages along the elevation gradient showed some clustering (Fig. 6). Strains from the largest clade E were distributed evenly over the elevations sampled. However, a closer look revealed that strains of the *K. dissectum* and *K. cf. fluitans* morphotypes were collected only at lower elevations, whereas *K. nitens* occurred at middle elevations, and morphotype *K. cf. nitens* at high elevations. Four of six members of clade B/C, along with all strains of clades D and F, were collected at high elevations (Fig. 6).

DISCUSSION

Distribution of alpine Klebsormidium strains among different phylogenetic clades and along elevation gradients. The phylogeny presented in Figure 1 corresponds well with the ITS phylogeny of *Klebsormidium* and *Interfilum* published by Rindi et al. (2011) and with the ITS-*rbcL* phylogeny from more recent publications (Škaloud et al. 2014, Ryšánek et al. 2015). However, clade A (*Interfilum*), which usually appears as a sister group to clade B/C, is distant from other *Klebsormidium* clades (B/C, D, E, F, and G). As the

largest number of strains isolated from the alpine habitats were representatives of clade E it formed the base of biodiversity for the alpine *Klebsormidium* strains (77.5%). In addition, this group also united the largest number of *Klebsormidium* morphotypes (Fig. 5). Clade E is the most common group worldwide, and is typical for terrestrial habitats of Europe, North America, and Asia (Ryšánek et al. 2015). Alpine strains were found in all known *Klebsormidium* lineages, with the exception of clade G. This clade consists mostly of strains isolated from arid regions such as in Africa (Rindi et al. 2011), and hence did not contribute to the *Klebsormidium* biodiversity of the Alps. More recently, however, several strains of *Klebsormidium* from acidic soils in Europe were added to clade G (Škaloud et al. 2014).

Although the number of samples is too small for a proper correlation analysis, at least some conspicuous trends among the *Klebsormidium* morphotypes/clades and their elevational distributions were apparent (Figs. 6 and 7). Representatives of clades B/C, D, and F were collected mainly from soil crusts at high elevations near the pine-forest line and above on alpine meadows and in the nival belt. In contrast, strains from clade E were mostly found at low and middle elevations in the forest zone. In total, 20 *Klebsormidium* strains from clade E (64.5%) were isolated <1,800 m a.s.l. within the zone of pine forests, and 11 strains (35.5%) were found above this level. Therefore, despite their morphological and ecological plasticity, strains of clade E in general may be more typical of humid and shaded habitats globally (e.g., Škaloud and Rindi 2013), such as pine forest. Strains of clades B/C, D, and F appear to be more adapted to xerophytic habitats characteristic of higher elevations exposed to greater amounts of solar radiation.

Comparing distribution patterns of Klebsormidium phylogenetic clades from alpine soil crusts to terrestrial habitats from other regions. We compared our biodiversity data on the alpine *Klebsormidium* isolates with those from other regions to verify our proposed ecological preferences of *Klebsormidium* strains from different phylogenetic lineages, as well as to reveal species composition patterns in terrestrial habitats of the Alps. We selected studies that reflected the most comprehensive *Klebsormidium* biodiversity of some terrestrial habitats, using an integrative approach. Although the monograph of Kostikov et al. (2001) contains only morphological data, it was very helpful because of the detailed descriptions of easily identifiable species (*K. crenulatum* / *K. mucosum* (J.B. Petersen) Lokhorst complex).

The results of our analysis are presented in Figure 8. Differences in species composition of *Klebsormidium* in alpine soil crusts appear related more to different habitats (forest or meadows) than to elevations (see Fig. 7). Therefore the assemblage of *Klebsormidium* from alpine soil crust was divided into two groups, according to their site of collection in either forest or meadows. The species composition

TABLE 1. Description of *Klebsormidium* morphotypes from alpine soil crusts collected at different elevations.

Morphospecies	Strain	Elevation m a.s.l.	Description
<i>K. flaccidum</i>	ASIB V100	2,363	Filaments long, (7.8)8.1–8.5(9.3) × (7.3)10.7–14.3(17.8) µm, with tendency to disintegration, not or slightly constricted; cells cylindrical, (1)1.3–1.5(1.8) times as long as wide; cell wall moderately thickened; H-pieces present rarely; chloroplast covers 1/2–2/3 of the cell inner surface, with smooth margins, pyrenoid large, surrounded by several layers of starch grains. In liquid media forming superficial hydrorepellent layer and submerged tufts; on agar forming undulating colonies
<i>K. cf. flaccidum</i>	SIE1	1,548	Similar to <i>K. flaccidum</i> , but with much stronger tendency to disintegration, especially in old culture, cells (6.5)7–8.3(11.7) × (4.0)5.7–12.1(13.2) µm, chloroplast usually with crenulated or irregularly dissected margins, appears to be intermediate between <i>K. flaccidum</i> and <i>K. dissectum</i> morphospecies
	SIE3	1,548	
	KUE1 ^a	2,435	
	KUE2	2,435	
	STU1	2,866	
<i>K. elegans</i>	PIT1	2,843	Filaments long, robust, (8)8.5–9.5(9.8) × (5)7.3–11.8(16.7) µm, sometimes growing in rope-like aggregates; cells cylindrical to barrel-shaped, (1.1)1.2–1.7 times as long as wide; cell wall moderately thickened; H-pieces present, prominent; chloroplast covering half to 3/4 of the cell inner surface, with a median incision in the margin, dissected in four or more lobes; pyrenoid large, surrounded by several layers of starch grains. In liquid media forming submerged tufts; on agar forming rough undulating colonies
	PIT3	2,843	
<i>K. crenulatum</i>	AH1	2,350	Filaments long, strong, thick, (9.2)10–11.5 × (6.4)7.1–12.9(16.8) µm wide, sometimes growing in rope-like aggregates; cells cylindrical, becoming barrel-shaped and sub quadrate in old filaments, 0.5–1(1.5) times as long as wide; cell doublets occasionally present; cell wall initially thin, becoming thick and corrugated in old filaments; H-pieces common, prominent; chloroplast girdle-shaped, almost ring-like, covers most of the cell inner surface, with longitudinal margins smooth or slightly lobed; pyrenoid large, surrounded by several layers of starch grains. In liquid media forming only submerged tufts, on agar forming rough, undulating colonies
	(SAG 2415) ^b		
<i>K. dissectum</i>	BOT2	609	Filaments moderately long, but easily disintegrated, especially in mature and old cultures, (6)6.4–8.6(9.3) × (5.9)8.9–15.5(16.7) µm, slightly or distinctly constricted; cells cylindrical, often slightly swollen, in unicell stage ellipsoid or ovoid, (1.1)1.5–1.8(2.5) times as long as wide; cell wall moderately thickened; H-pieces usually absent; chloroplast covers 1/2–2/3 of the cell inner surface, with margins crenulated or irregularly dissected; pyrenoid somewhat large, surrounded by several layers of starch grains. In liquid media forming superficial hydrorepellent layer and submerged tufts; on agar forming homogeneous colonies with crenulate margins
	(SAG 2417) ^c		
	BOT4		
<i>K. nitens</i>	OBE1 ^d	1,046	Filaments short, thin, (4.5)5–5.9(6.7) × (6.3)7.2–13.6(19.5) µm; easily disintegrated to unicells; cells cylindrical, constricted, 1.3–1.5(3) times as long as wide; cell wall thin; H-pieces usually absent; chloroplast covers 1/2–2/3 of the cell inner surface, with delicately lobed margins; pyrenoid small, surrounded by a layer of starch grains. In liquid culture forming submerged tufts and superficial layer; on agar forming smooth colonies
	OBE2	1,046	
	RAU1	1,074	
	STR1	1,280	
	UEB	1,680	
<i>K. cf. nitens</i>	PAT	2,145	Similar to <i>K. nitens</i> , but filaments thin to medium width, (5.3)5.6–6.8(7.8) × (6.3)7.2–10.9(13.6) µm; sometimes unicellular stage with ellipsoid cells and lobed chloroplast resembling <i>Interfilum</i> species
	AH2	2,350	
	(SAG 2416) ^c		
<i>K. subtile</i>	OBG	2,350	Filaments long, with some tendency to fragmentation, medium width, in young culture cells are long and cylindrical, in mature and old cultures the cells become isodiametric (length/width—(0.8)1–1.3(1.8)), (5.4)6.0–6.8(7.6) × (4.7)5.8–10.3(13.1) µm, filaments are slightly bead-like, constricted near cross walls, H-like pieces sometimes present; chloroplast covers 2/3 of the cell inner surface, with smooth or wavy margins; the pyrenoid is small, round, compact, surrounded by a layer of starch grains. In liquid culture forming submerged tufts and superficial layer; on agar forming smooth colonies
	STU3	649	
	RAU2	1,074	
	BIR	1,953	
	HOH1	2,207	
	HOH2	2,207	
	PIT2	2,843	
	VOE5 ^f	2,866	
<i>K. cf. subtile</i>	STR2	1,280	Similar to <i>K. subtile</i> , but filaments often fragmented and usually in mature culture have long, filaments and unicells, from thin to medium in width, (5.4)5.8–6.8(7.2) × (4.0)5.6–10.8(11.9) µm
	STR3	1,280	
	SIE2 ^g	1,548	
	MUT	2,650	

(continued)

TABLE 1. Continued

Morphospecies	Strain	Elevation m a.s.l.	Description
<i>K. fluitans</i>	VOE2	649	Filaments long, strong, sometimes with tendency to disintegration, (6.5)7.5–8.8(10.7) × (6.6)7.1–11.5 (17.4) µm; cells cylindrical to isodiametric, slightly swollen, (0.6)0.9–1.4 times as long as wide; cell wall of medium thickness; H-pieces present; chloroplast covers 1/2–3/4 of the cell inner surface, with margins smooth or delicately crenulated; pyrenoid medium-sized, surrounded by several layers of starch grains. In liquid culture submerged tufts present; on agar forming growths with rough surface
	VOE3 ^d	649	
	VOE4	649	
	VOE7	649	
	VOE8	649	
	ASIB V103 ^h	2,363	
	ASIB V108	2,363	
<i>K. cf. fluitans</i>	BOT1	609	Similar to <i>K. fluitans</i> , but in culture abundant thick filaments often present together with thin filaments similar to <i>K. subtilis</i> morphotype, cell width (5.4)6.4–7.8(8.8) µm
	BOT3 ^d	609	
	RAU3 ^d	1,074	

^aStrain KUE1 was previously identified as transitional morphotype between *K. flaccidum* and *K. dissectum*, based on morphological characters (Karsten et al. 2013).

^bStrain AH1 (SAG 2415) was previously identified as *K. crenulatum*, based on morphological characters (Karsten et al. 2010, Holzinger et al. 2011) and *rbcL* phylogeny (Kaplan et al. 2012).

^cStrain BOT2 (SAG 2417) was previously identified as *K. nitens*, based on *rbcL* phylogeny (Kaplan et al. 2012).

^dStrains OBE1, VOE3, BOT3 and RAU3 were previously identified as *K. fluitans*, based on ITS phylogeny (Kitzing et al. 2014).

^eStrain AH2 (SAG 2416) was previously identified as *K. dissectum*, based on morphological characters (Karsten and Holzinger 2012).

^fStrain VOE5 was previously identified as a transitional morphotype between *K. subtilis* and *K. subtilissimum*, based on morphological characters (Karsten et al. 2013).

^gStrain SIE2 was previously identified as a transitional morphotype between *K. nitens* and *K. dissectum*, based on morphological characters (Karsten et al. 2013).

^hStrain ASIB V103 was previously identified as *K. fluitans*, based on morphological characters (Karsten et al. 2013) and ITS phylogeny (Kitzing et al. 2014).

of *Klebsormidium* from different terrestrial habitats (soil, stones, and tree bark) under cover of mixed forests in Washington and Ohio (United States), Czech Republic and Wales (Western Europe), and Japan (Asia) is similar to that of alpine soil crusts from the forest zone, with a conspicuous dominance of representatives of clade E. Algal biofilms growing on building walls in different cities of Western Europe are similar as well, because they consist solely of clade E strains. Although *Klebsormidium* communities from alpine meadows are more diverse, those close to forest ecosystems include a high number of strains from clade E. This phylogenetic lineage includes several groups of freshwater *Klebsormidium* strains (clade E1 according to Rindi et al. 2011, or clades 5, 6, 8, 9, 13, and 14 according to Škaloud and Rindi 2013). Some ecophysiological data on E clade strains indicate a high sensitivity to desiccation (Karsten and Rindi 2010, Karsten and Holzinger 2012). Therefore, it is reasonable to assume that this group of *Klebsormidium* species is, in general, adapted to more hydrophilic habitats, because it is widely distributed in humid and shaded habitats of Western Europe, North America, and Asia, as well as at middle elevations in the Alps, especially in forest belts where adequate humidity is always available.

Biofilms from granite outcrops of steppe slopes and from sand dunes of the Ukraine showed a different composition of *Klebsormidium* species: a predominance of strains from clade B/C, with a strong contribution of clade F in the assemblage (Fig. 8; Kostikov et al. 2001, Mikhailyuk et al. 2011). Members of clade F undoubtedly represent a xerophytic

adapted lineage of *Klebsormidium*, according to their characteristic morphological and ultrastructural features (thick cell walls, narrow cells, and a tendency of filaments to fold in braids, which aids in self-protection by preventing excessive water evaporation) along with a high desiccation tolerance (Karsten et al. 2010, Holzinger et al. 2011, Kaplan et al. 2012). It is possible that representatives of clade B/C are more xerophytic than strains of clade E, regardless of the morphological similarity of this genetically separated lineage. Particularly the more xerophytic clades of *Klebsormidium* (B/C, F) have a wider distribution in terrestrial habitats of open landscapes of the Ukraine, due to the more continental (drier) climate and more insolated conditions on steppe slopes and sand dunes. Recently, it was reported that clade B/C does not include acidophilic strains, which were found in all other lineages of *Klebsormidium* (Škaloud et al. 2014).

The soil crusts from savannas and deserts of South Africa have a unique assemblage of *Klebsormidium* species that may reflect the specific climatic conditions of these habitats (Büdel et al. 2009, Rindi et al. 2011). Most of these strains of *Klebsormidium* belong to the unique and recently discovered phylogenetic lineage clade G. This lineage is xerophytic as well, as its representatives have morphological similarities to species of clade F (thick cell walls and narrow cells, and strongly curved filaments arranged in ball-like aggregations and cluster-like colonies). Strains of clade E, typical of rather humid conditions, are found in the savannas and deserts of South Africa only sporadically.

FIG. 2. Morphotypes of *Klebsormidium* from alpine soil crusts: (a–c) *K. flaccidum* (ASIB V100), (d–f) *K. cf. flaccidum* (KUE1), (g–j) *K. elegans* (PIT3), (k–n) *K. crenulatum* (SAG 2415). (a, b, d, e, g, i, m) Filaments of young (2–3 weeks old), and (c, f, h, g–l, n) filaments of old (2–3 months old) cultures; scale bars: 10 μ m.



The nMDS plot (Fig. 9) clearly confirms the expected similarity of the *Klebsormidium* species composition among alpine soil crusts from forest habitats of Western Europe, North America, and Asia (stress = 0.06). The *Klebsormidium* assemblages of alpine soil crusts from meadows and from forests in the U.S. occupy a transitional position between those of alpine soil crusts in Western Europe, North America, and Asia, and those of open landscapes in Eastern Europe. The species composition of African *Klebsormidium* points to a very high dissimilarity compared with all other habitats, due to the presence of members of clade G (Fig. 9).

Klebsormidium is a cosmopolitan genus, and its members seem to be easily dispersed via air transport (Hoffmann 1989, Ettl and Gärtner 1995, 2014, Lokhorst 1996, Rindi et al. 2011). Ecological differentiation has been described for some genetic lineages and clades (Rindi et al. 2011, Škaloud and Rindi 2013), showing that not geographic, but rather ecological factors determine the distribution of members of the genus, because no endemic lin-

eages could be detected (Ryšánek et al. 2015). However, it appears that ecological and geographic factors are interdependent, as climatic peculiarities determine the characteristics of a habitat. Although geographic barriers do not affect the distribution of microscopic organisms (Finlay et al. 1996, Finlay 2002), the geographic position determines environmental conditions. Our analysis indicates the influence of both parameters (geographic and ecological) on the distribution of *Klebsormidium* species in soil crusts. The composition of *Klebsormidium* assemblages from shaded or open habitats (e.g., forests or steppes, savannas) in different geographic regions exhibits similarities due to the influence of comparable microclimatic conditions. Despite statements that the species composition of organisms forming soil crusts (lichens, mosses, and algae) in different regions is similar because of adaptation to extreme environments (West 1990, Sant'Anna and Azevedo 1991, Rosentreter and Belnap 2001, Türk and Gärtner 2001), our data showed that a key genus of soil crusts, *Klebsormidium*, contains different

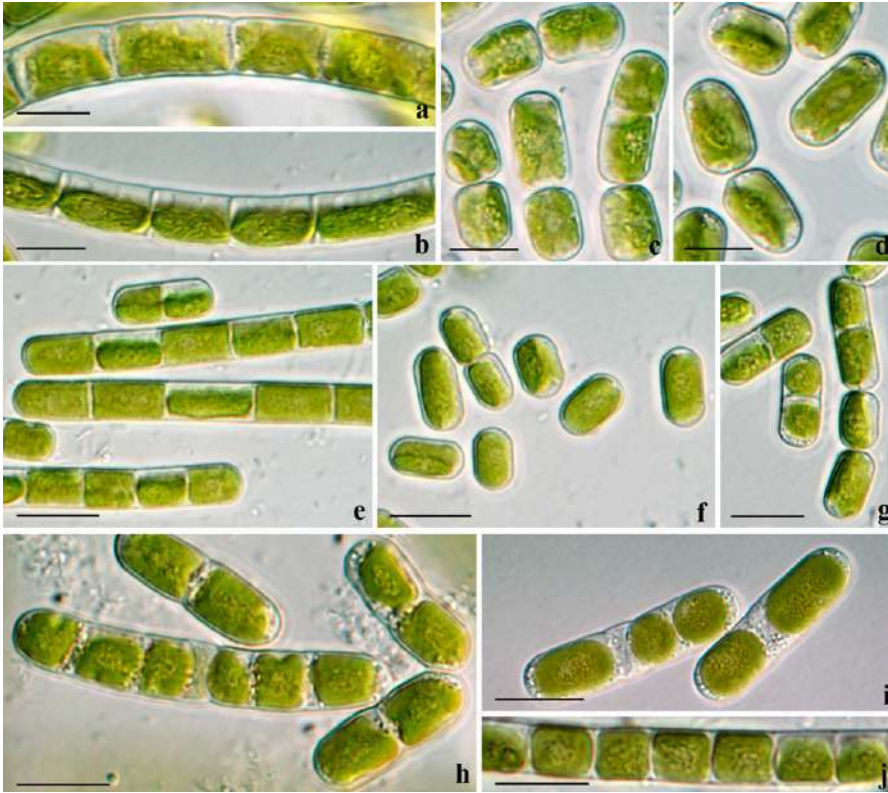


FIG. 3. Morphotypes of *Klebsormidium* from alpine soil crusts: (a–d) *K. dissectum* (SAG 2417), (e–g) *K. nitens* (OBE1 (e), STR1 (f, g), (h–j) *K. cf. nitens* (PAT (h), AH 2(SAG 2416) (i), OBG (j)). (b, e, f, j) Filaments of young (2–3 weeks old), and (a, c, d, g–i) filaments of old (2–3 months old) cultures; scale bars: 10 μ m.

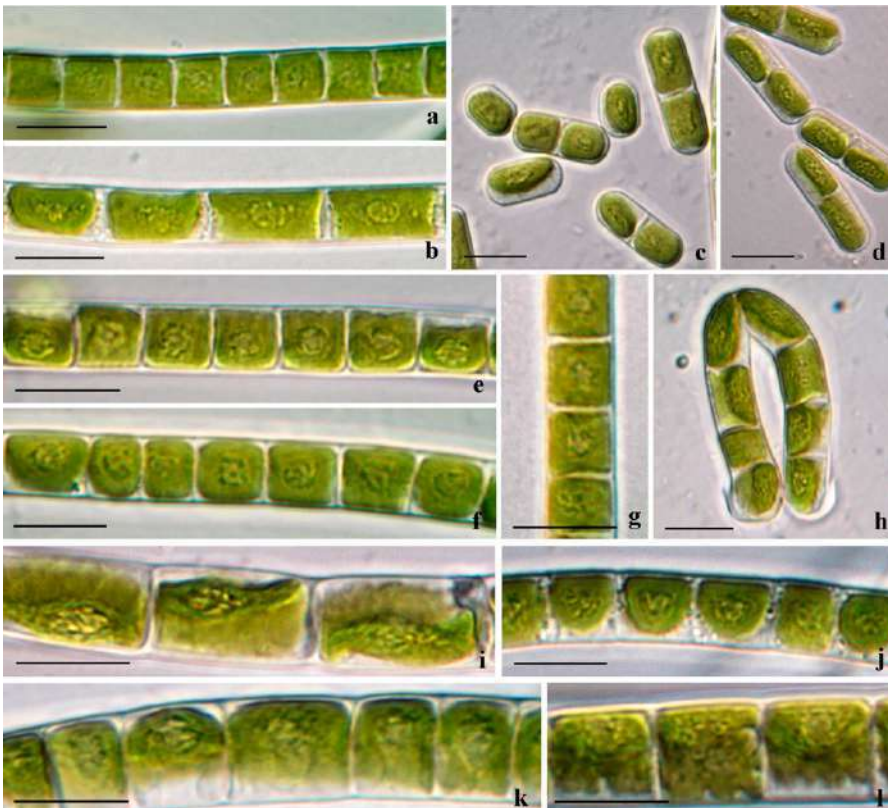


FIG. 4. Morphotypes of *Klebsormidium* from alpine soil crusts: (a–d) *K. cf. subtile* (STR2 (a), SIE2 (b–d), (e–h) *K. subtile* (VOE5 (e), HOH2 (f, g), PIT 2 (h)), (i, j) *K. cf. fluitans* (BOT3), (k, l) *K. fluitans* (VOE2 (k), ASIB V103 (l)). (a, c–e, j–i, k) Filaments of young (2–3 weeks old) and (b, f, j, l) filaments of old (2–3 months old) cultures; scale bars: 10 μ m.

FIG. 5. Total number of *Klebsormidium* strains found in alpine soil crusts, assigned to phylogenetic clades and morphotypes.

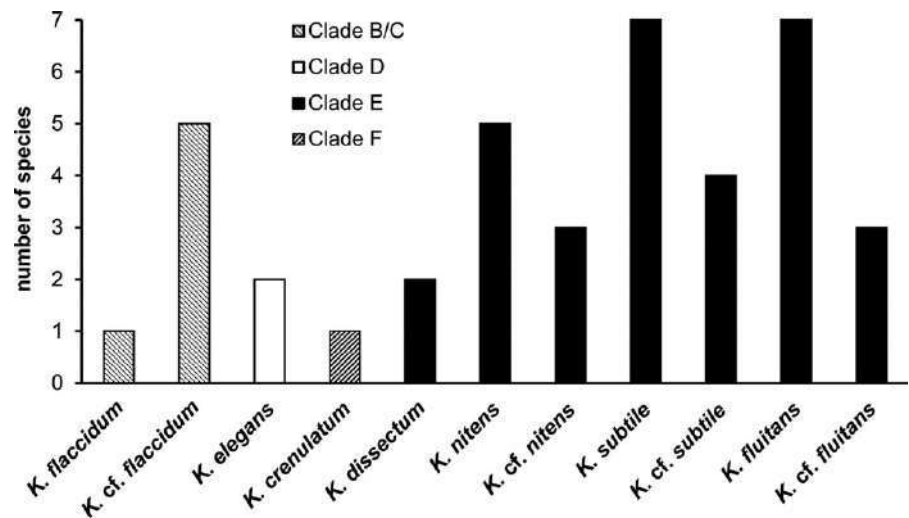
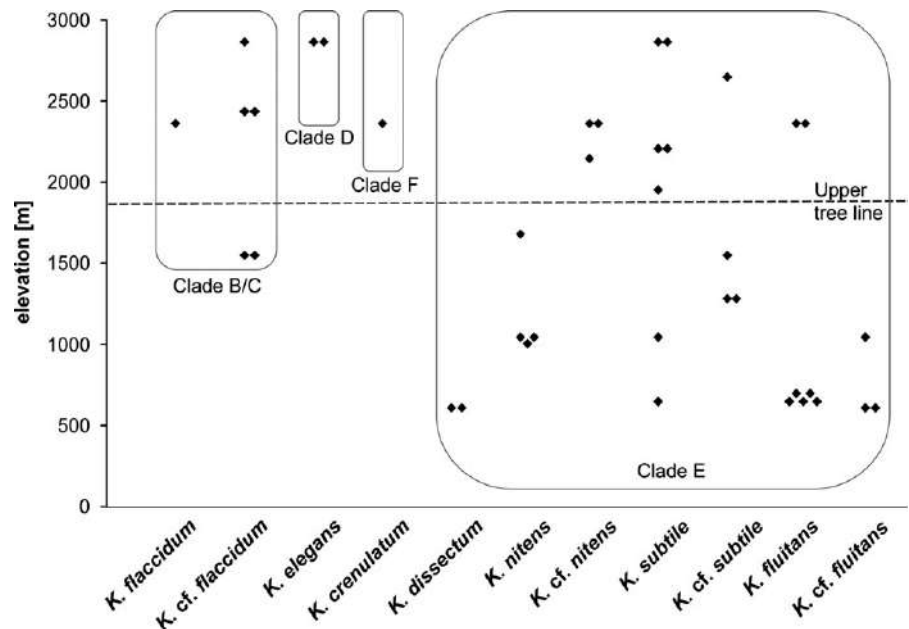


FIG. 6. Distribution of alpine *Klebsormidium* strains along elevation gradient and among phylogenetic clades and morphotypes.



genetic lineages with different ecological features, depending on the local environmental conditions.

Identification of alpine strains, problems of species delimitation, morphological plasticity. The phylogenetic analysis of *Klebsormidium* alpine isolates (Fig. 1) showed that only a small number of the described morphotypes clearly corresponded to known taxa. Alpine strains assigned to the *K. flaccidum* and *K. dissectum* morphotypes, along with one strain of the *K. subtile* morphotype showed high similarity to the respective epitypes (see below). Two strains of the morphotypes *K. elegans* and *K. crenulatum* were included in clades D and F, respectively, but each formed a separate subclade. Strains belonging to the morphotypes *K. fluitans*, *K. nitens*, and *K. subtile*

(in part) appeared in several subclades of E, far distant phylogenetically from the corresponding epitype strains. Data concerning the polyphyletic position of these morphotypes were partially reported in previous papers (Rindi et al. 2011, Škaloud and Rindi 2013, Škaloud et al. 2014). Some of our alpine strains represented transitional morphotypes (*K. cf. flaccidum*, *K. cf. nitens*, *K. cf. subtile*, and *K. cf. fluitans*) that do not clearly correspond to existing morphological species. The strains of the *K. cf. flaccidum* morphotype belonged to clade B/C, but formed separate subclades (Fig. 1). Morphotypes of *K. cf. nitens*, *K. cf. subtile*, and *K. cf. fluitans* were all distributed within clade E, in no clear order, but with a gradual transition from one morphotype to another (Fig. 1).

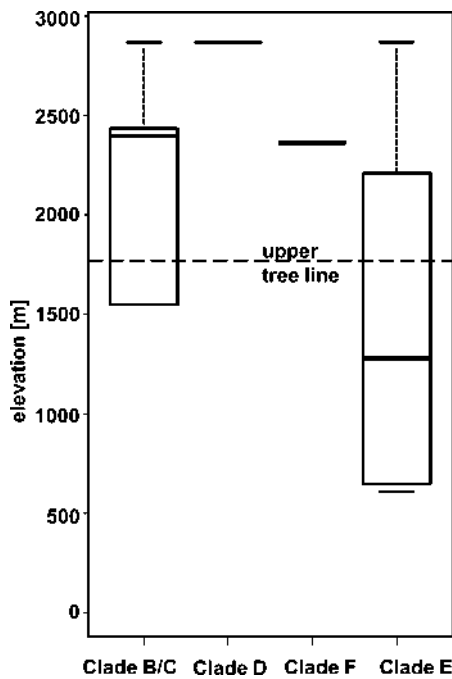


FIG. 7. Boxplots showing median, 25%–75% percentiles and range of distribution of *Klebsormidium* phylogenetic clades in alpine soil crusts along elevation gradient.

Some alpine strains of *Klebsormidium* were mentioned in other publications, where they were identified based on morphology or ITS/*rbcL* phylogeny (see Table 1). While most identifications could be confirmed, two strains BOT2 (SAG 2417) and OBE1 were different: *K. nitens* as described by Kaplan et al. (2012) represents *K. dissectum*, and *K. fluitans* as described by Kitzing et al. (2014) is a member of *K. nitens*. This misidentification is related to the absence of reference strains for most species of *Klebsormidium*. Identification based purely on molecular data, as in the above papers, without comparison to morphology is problematic. Therefore, a comprehensive taxonomic revision of *Klebsormidium*, combining molecular, morphological, and ecological data is needed.

Recent data of other authors showed the existence of a high number of cryptic *Klebsormidium* species within clade E (Škaloud and Rindi 2013), as determined on the basis of ITS-*rbcL* phylogeny and some ecological preferences. Sequences of several strains published by these authors are included in our phylogenetic tree. Alpine strains formed separate subclades and corresponded to some cryptic species according to Škaloud and Rindi (2013), but were distributed among other, previously known strains in no clear order (Fig. 1). Therefore, it is

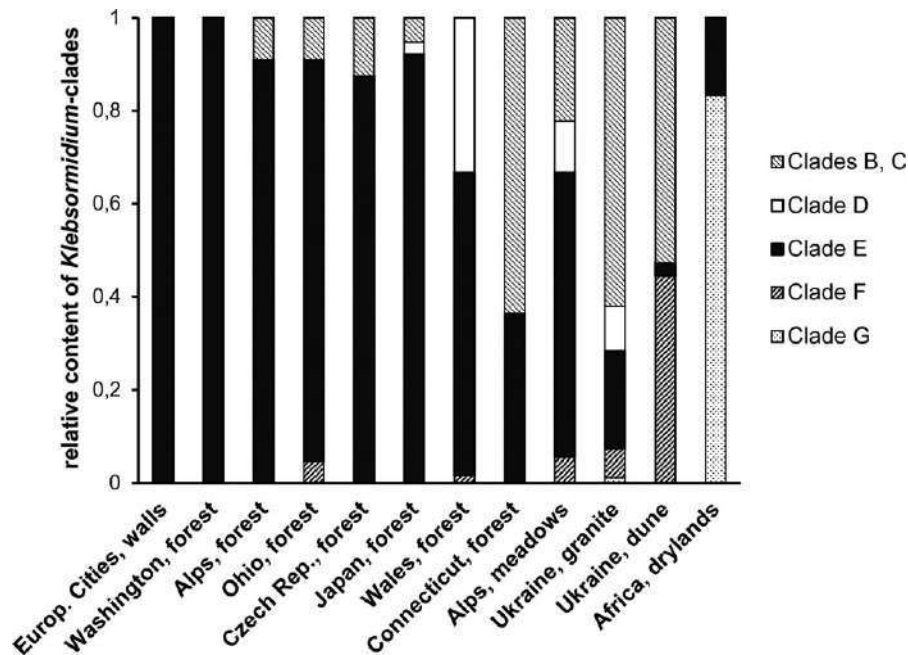


FIG. 8. Comparison of distribution pattern of phylogenetic clades within *Klebsormidium* collected from alpine soil crusts (“Alps, forest” and “Alps, meadows”) and other sites. “Europ. cities, walls” refers to algal crusts from building walls of Western European cities (Rindi et al. 2008); “Washington, forest,” “Ohio, forest,” “Connecticut, forest,” “Czech Rep., forest,” “Wales, forest,” and “Japan, forest” are terrestrial habitats under mixed forest of northern temperate zones of United StatesA, Western Europe and Japan (Ryšánek et al. 2015); “Ukraine, granite” stands for algal crusts from granite outcrops in Ukraine (Mikhailyuk et al. 2011); “Ukraine, dunes” refers to soil crusts from dunes along Dnieper River Dnipro sand dunes in Ukraine (Kostikov et al. 2001); “Africa, drylands” to soil crusts from South African drylands (Büdel et al. 2009, Rindi et al. 2011).

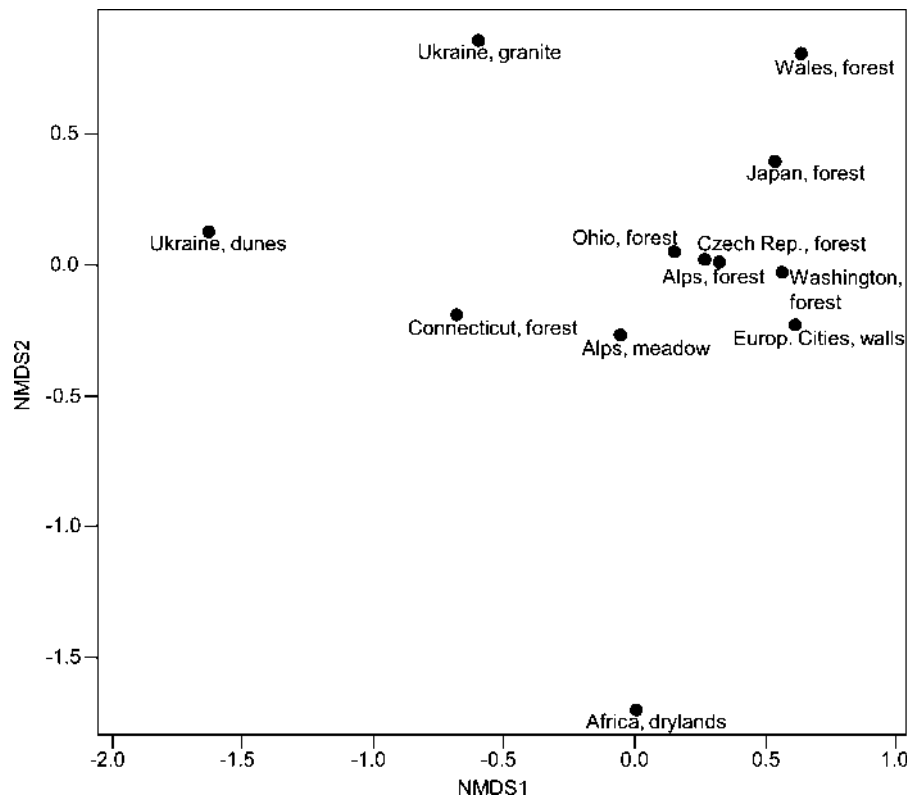


FIG. 9. nMDS plot based on Bray–Curtis dissimilarity index visualizes differences in composition of *Klebsormidium* clades, based on absolute numbers in alpine region and other terrestrial habitats. For explanation of symbols, see legend of Figure 8; stress = 0.06.

difficult to reach a definite conclusion on the taxonomic position of some alpine isolates, or on their ecological preferences, because they are distributed among taxa identified by other authors as cryptic species characteristic of artificial subaerial substrates or freshwater habitats (Škaloud and Rindi 2013). We agree with the statement of these authors that the morphological, genetic, and ecological variability in clade E members is difficult to address because of high plasticity with respect to these parameters.

We compared our data with those of an early publication (Reisigl 1964) on the diversity of *Klebsormidium* from alpine soils, which was later cited by Türk and Gärtner (2001) and Ettl and Gärtner (1995, 2014). Four morphotypes of *Klebsormidium* (Types 1, 2, 3, and 4) referred to *Hormidium flaccidum* (Kützing) A. Brown were found in alpine soils at elevations between 3,457 and 3,739 m a.s.l. (Reisigl 1964). Reisigl used a wide species concept for *H. flaccidum* and mentioned a high morphological plasticity in culture as well as taxonomic problems with the genus. Although a precise evaluation of Reisigl's data is difficult because of the brief descriptions and the absence of illustrations of the four morphotypes, most probably all of these morphotypes belonged to clade E, as they consisted of thin filaments (~5.5 μm diameter). Another species, *K. montanum* (Hansgirg) S.Watanabe, found in soil in South Tyrol, Italy (Ettl and Gärtner 1995, 2014)

represents a morphotype very similar to the *K. crenulatum*/*K. mucosum* complex.

Epitypification of known Klebsormidium species. Identification of *Klebsormidium* species remains difficult for several reasons including incomplete species descriptions without illustrations in the 19th century (Kützing 1845, 1849, Rabenhorst 1857, Gay 1891, 1894) and further changing species concepts as a result of the studies of several generations of scientists (Klebs 1896, Mattox 1968, Silva et al. 1972, Starmach 1972, Tell 1976, Moshkova 1979, Ettl and Gärtner 1995, 2014, Hindák 1996, Lokhorst 1996, Novis 2006, Sluiman et al. 2008, Rindi et al. 2011). For example, the type species of *K. flaccidum* was described as *Ulothrix flaccida* Kützing with a short diagnosis where data about filament structure, dimensions and shape of cells, presence of nucleus and locality were provided (Kützing 1849). Actually, it was described as a green terrestrial alga with filaments of average width in comparison with *U. nitens* Kützing (thinner filaments) and *U. crenulata* Kützing (thicker filaments), both described at the same time. Later much more data were added to the species diagnosis, including chloroplast and pyrenoid structure, presence/absence of H-like fragments of cell wall, details of asexual reproduction, macroscopic growth habit, ecological features, and distribution (Klebs 1896, Starmach 1972, Moshkova 1979, Ettl and Gärtner 1995, 2014, Hindák 1996, Lokhorst 1996, Sluiman et al. 2008, Rindi et al.

2011). However, even more recent publications exhibit many contradictions concerning the characterization of *Klebsormidium* species. For example, width of filaments of *K. flaccidum* is 5.5–6 µm in Starmach (1972), (5.6) 6.5–7.4 µm in Lokhorst (1996), but much broader in Moshkova (1979), Ettl and Gärtner (1995, 2014), and Hindák (1996) (5–14 µm).

For taxa assigned to *Klebsormidium*, we propose using species' protologues as well as Lokhorst (1996) to designate epitypes. Lokhorst (1996) provided the most comprehensive morphological treatment of *Klebsormidium* species in Western Europe, based primarily on cultured material. His work is valuable because Lokhorst (1996) designated holotypes, lectotypes, or neotypes of all *Klebsormidium* species that he investigated. Unfortunately, Lokhorst's monograph does not refer to any strain numbers, and type material cannot be used to study morphological plasticity and molecular phylogeny (Rindi et al. 2011, Škaloud et al. 2014) or even to identify species (Pröschold and Leliaert 2007, Friedl and Rybalka 2012). According to Article 9.8 of the ICN (McNeill et al. 2012), "An epitype is a specimen or illustration selected to serve as an interpretative type when the holotype, lectotype, or previously designated neotype, or all original material associated with a validly published name, is demonstrably ambiguous and cannot be critically identified for purposes of the precise application of the name to a taxon." For *Klebsormidium* species, as for many other species of microalgae (e.g., Darienko et al. 2010, Bock et al. 2011, Demchenko et al. 2012, Rybalka et al. 2013), epitypification is necessary to unambiguously link names to sequenced specimens. In most cases, the strains isolated and investigated by Lokhorst (1996) are proposed as epitypes, except for *K. subtile* that he did not treat. For each recognized species, we usually accept Lokhorst's (1996) heterotypic synonyms.

Klebsormidium flaccidum (Kützing) Silva et al. (1972). Taxon 21:643.

Basionym: *Ulothrix flaccida* Kützing (1849: 349), Species Algarum.

Synonyms: see Lokhorst (1996: 17).

Type locality: Stony road in Strasbourg (France).

Emended description: Lokhorst (1996) Cryptogamic Studies 5: 17–20, figs. 31–68.

Lectotype: L 939.67-905, annotated as "Strassburg Febr 1846," leg. A. Braun, designated by Lokhorst (1996).

Epitype: Strain SAG 2307 designated here to support the lectotype specified above and the authentic strain of *K. flaccidum* that is permanently preserved in a metabolically inactive state (cryopreserved in liquid nitrogen) in the SAG.

Comments: *Klebsormidium flaccidum* has a simple morphological appearance and therefore could be identified as strains of several genetic lineages of *Klebsormidium* (clades B, C, or E; Rindi et al. 2011,

Škaloud et al. 2014). The herbarium type material and the incomplete original diagnosis cannot be used to clarify the situation with this species. Therefore, the designation of an epitype specimen based on a subjective choice is the only feasible solution for a reassessment for this species (Rindi et al. 2011, Škaloud et al. 2014). We propose a strain of *K. flaccidum* isolated by Lokhorst and now preserved in the SAG collection (SAG 2307) as the epitype. SAG 2307 was isolated from clayey soil in a field of beets near Niederkruechten (Germany), original number KL 1. It does not conflict with the original description, is ~400 km from the type locality (Kützing 1849), and generally corresponds to the emended description. Minor differences include the slightly wider filaments, 7.8(8.8) µm (in the emended description—(5.6)6.5–7.4 µm). The epitype strain rarely has H-like fragments of cell walls in agar culture and has a prominent starch envelope composed of several layers of small starch grains surrounding the pyrenoid (the starch envelope of the pyrenoid is visible in Lokhorst's micrographs (Lokhorst 1996, figs. 44, 45), although the description mentions "without distinct starch envelope").

Klebsormidium crenulatum (Kützing) Lokhorst in Lokhorst and Star (1985). *J. Phycol.* 21:474.

Basionym: *Hormidium crenulatum* Kützing (1845:193), Phycol.Germ.

Synonyms: *Klebsormidium crenulatum* (Kützing) H. Ettl & G. Gärtner nom. inval.; see also Lokhorst 1996 (p. 30).

Type locality: On wet and warm wall of a bath house, Padua (Italy).

Emended description: Lokhorst (1996). Cryptogamic Studies 5: 30–34, figs. 181–219.

Lectotype: L 939.67-834, annotated as "1/280" *Hormidium crenulatum*, Patavii, leg. G. Meneghini, designated in Lokhorst and Star (1985).

Epitype: Strain SAG 37.86 designated here to support the lectotype specified above and the authentic strain of *K. crenulatum* that is permanently preserved in a metabolically inactive state (cryopreserved in liquid nitrogen) in the SAG.

Comments: Strain SAG 37.86 was isolated by H. Trenkwalder (original number T 93) from a soil from Brixen, South Tyrol (Italy) and was previously identified as *Ulothrix tenuissima* Kützing. Strain SAG 6.96, isolated by Lokhorst (original number KL 64) is no longer available. The phylogenetic analysis provided by Rindi et al. (2011) showed a close relationship between the two isolates. Strain SAG 37.86 does not conflict with the original description and type locality (Kützing 1845) and generally corresponds well with the emended description, but differs in having slightly thicker filaments, reaching 16.6(17.8) µm (the original description gives the maximum width as 14.0(15.8) µm). The taxonomic combination *Klebsormidium crenulatum* (Kützing) H. Ettl & G. Gärtner (Ettl and Gärtner 1995) is invalid, because of priority rules.

Klebsormidium subtile (Kützing) Mikhailyuk, Glaser, Holzinger et Karsten **comb. nov.**

Basionym: *Ulothrix subtilis* Kützing (1845). Phycol. Germ.: 197 pro parte.

Synonyms: *Stichococcus subtilis* (Kützing) Klercker, *Hormidium subtile* (Kützing) Heering, *Chlorhormidium subtile* (Kützing) Starmach, *Ulothrix subtilissima* Rabenhorst, *Ulothrix subtilis* var. *subtilissima* (Rabenhorst) Rabenhorst, *Ulothrix subtilis* spp. *subtilissima* (Rabenhorst) Hansgirg, *Hormiscia subtilis* (Kützing) De Toni, *Hormiscia subtilis* var. *subtilissima* (Rabenhorst) Hansgirg, *Hormidium subtilissimum* (Rabenhorst) Mattox & Bold, *Chlorhormidium subtilissimum* (Rabenhorst) Fott, *Klebsormidium subtilissimum* (Rabenhorst) P.C.Silva, Mattox & Blackwell, *Klebsormidium subtile* (Kützing) Tracanna ex Tell nom. inval.

Type locality: In a mill-course.

Emended description: Filaments long, with some tendency to fragmentation, sometimes curved, thin or medium in width, in young culture cells are long and cylindrical, in mature and old cultures sometimes isodiametric, (5.1)6.0–6.6(7.0) × (4.7)5.8–10.3(11.5) μm (length/width—1.0–1.8), filaments are slightly bead-like, constricted near cross walls, H-like pieces of cell walls sometimes present; chloroplast covering 2/3 of the cell inner surface, with smooth or undulating margins; the pyrenoid is small, round, compact, surrounded by a layer of starch grains. It forms submerged tufts and a superficial layer in liquid culture, and smooth or slightly undulating colonies on an agar plate.

Epitype (designated here): Strain SAG 384-1 (proposed here as the authentic strain of *K. subtile*) is permanently preserved in a metabolically inactive state (cryopreserved in liquid nitrogen) in the SAG.

Comments: *K. subtile* is morphologically and ecologically close to *K. subtilissimum* (Rabenhorst) P.C. Silva, Mattox et Blackwell. Both these taxa may represent a single species inhabiting water bodies or humid terrestrial habitats. They were initially described as representatives of *Ulothrix* Kützing (Kützing 1845, Rabenhorst 1857). As *K. subtile* was described earlier than *K. subtilissimum* (as *Ulothrix subtilis* Kützing 1845), the former name has priority. Strain SAG 384-1, initially identified as *K. subtilissimum*, is proposed as the epitype for *K. subtile*. Strain SAG 384-1 was isolated by R.A. Lewin from snow (United States). It does not conflict with the original description (Kützing 1845), the description in Tell (1976) and thus generally corresponds to the emended description. The combination *Klebsormidium subtile* (Kützing) Tracanna ex Tell (Tell 1976, p. 535) is invalid because although the basionym is listed in this study, a complete and direct reference to its author and place of valid publication including page reference and date is missing (see Article 41.5 of the ICN (McNeill et al. 2012)).

Klebsormidium nitens (Kützing) Lokhorst (1996). *Cryptogamic Studies* 5:13–17, figs. 1–30.

Basionym: *Ulothrix nitens* Kützing (1849: 349). *Species Algarum*.

Synonyms: see Lokhorst (1996:13–14).

Type locality: In plate with another terrestrial alga *Palmella cruenta* (J.W. Smith) C. Agardh collected in Italy.

Lectotype: L 939.67-828, annotated as “Cum *Palmella cruenta* in cubacula culta,” leg. G. Meneghini, designated by Lokhorst (1996).

Epitype: Strain SAG 13.91, designated here to support the lectotype specified above. This authentic strain of *K. nitens* is permanently preserved in a metabolically inactive state (cryopreserved in liquid nitrogen) in the SAG.

Comments: The *K. nitens* morphotype is present in several lineages of clade E (Fig. 1), but most of the investigated strains with this morphotype can be grouped in E2 (Rindi et al. 2011, Skaloud and Rindi 2013). Strains of clade E2 were proposed as good candidates for designation as *K. nitens* (Škaloud et al. 2014). We propose as the epitype strain SAG 13.91 that belongs to E2 (Rindi et al. 2011), and its morphological and ecological features correspond with the diagnosis of *K. nitens* as emended by Lokhorst (1996). SAG 13.91 was isolated by E.A. Flint from Tekoa soil (New Zealand), original number No 60/74. It does not conflict with the original description (Kützing 1849) and generally corresponds to the emended description. SAG 13.91 is also genetically close to Lokhorst’s strain of *K. nitens* (KL 37), which was lost (Rindi et al. 2011).

Klebsormidium dissectum (F. Gay) H. Ettl et G. Gärtner (1995). *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*:601.

Basionym: *Stichococcus dissectus* Gay (1891). *Recherches dévlop. classific. algues vertes*: 78, pl. X: figs. 96–97, pl. XI: 98–100.

Synonyms: *Klebsormidium dissectum* (F. Gay) Lokhorst nom. inval., *K. dissectum* (F. Gay) T. Mrozinska nom. inval., see also Lokhorst (1996: 24).

Emended description: Lokhorst (1996) *Cryptogamic Studies* 5: 24–25, figs. 110–129.

Neotype: prepared from cultures initiated from a soil sample collected from a forest track near Col du Bussang (France). 12.09.1992, leg. Lokhorst (L), designated by Lokhorst (1996).

Epitype: Strain SAG 2417 is designated here to support the neotype specified above and proposed as the authentic strain of *K. dissectum*. It is permanently preserved in a metabolically inactive state (cryopreserved in liquid nitrogen) in the SAG.

Comments: Strain SAG 2155 isolated by Lokhorst from the neotype locality (original number KL 2) cannot be used as the epitype, because it does not correspond to emended description of *K. dissectum*. SAG 2155 morphologically and genetically corresponds to *K. nitens* (Rindi et al. 2011). Perhaps, this strain was mislabeled. We propose a strain SAG 2417 that was isolated by U. Karsten (originally labeled BOT2) from the concrete basement of a

greenhouse in the Botanical Garden of Innsbruck (Austria) as the epitype of *K. dissectum*. It does not conflict with original description (Gay 1891) and generally corresponds to the emended description (Lokhorst 1996). It differs in having slightly thinner filaments, reaching 8.6(9.3) μm (in emended description—to 9.3(10.2) μm). The taxonomic combination *Klebsormidium dissectum* (Gay) Lokhorst (1996) mentioned by Lokhorst (1996, p. 24) is invalid because of priority rules.

Klebsormidium fluitans (F. Gay) Lokhorst (1996). *Cryptogamic Studies* 5:20–23, figs. 69–109.

Basionym: *Stichococcus fluitans* Gay (1894) Bull. Soc. Bot. France 40: CLXXIV, fig. 1.

Synonyms: see Lokhorst (1996: 20).

Emended description: Lokhorst (1996) *Cryptogamic Studies* 5: 20–23, figs 69–109.

Neotype: prepared as a herbarium sheet from a former culture derived from material collected from sheet-piling of Westeinderplassen Lakeneer Rijshout (the Netherlands), 17.11.1992, leg. Lokhorst (L), designated by Lokhorst (1996).

Epitype: Strain SAG 9.96, designated here to support the neotype specified above and proposed here as the authentic strain of *K. fluitans* that is permanently preserved in a metabolically inactive state (cryopreserved in liquid nitrogen) in the SAG.

Comments: Strain SAG 9.96 was isolated by Lokhorst from the neotype locality (original number KL 22). It does not conflict with the original description (Gay 1894) and generally corresponds to the emended description. It differs in the absence of pseudobranching in the current state of culture, and in having a prominent starch envelope composed of several layers of small starch grains surrounding the pyrenoid (the starch envelope of the pyrenoid is visible in Lokhorst's micrographs 102–104, although the description states: "without starch envelope").

Klebsormidium mucosum (J.B. Petersen) Lokhorst in Lokhorst and Star (1985). *J. Phycol.* 21:474.

Basionym: *Hormidium mucosum* Petersen (1915). K. Dan. Vidensk. Selsk. Biol. Skr. 7. Raekke, Naturv. Math. 12: 340, 376, text-figs. 21, 22, pl. III: figs. 38–40.

Synonyms: see Lokhorst (1996:34).

Emended description: Lokhorst (1996) *Cryptogamic Studies* 5: 34–37, figs. 220–254.

Type locality: On naked clay soil of road in plantation at Rø, Bornholm (Denmark).

Lectotype: C, annotated as "*Hormidium mucosum* n. sp. Road in plantation at Rø, Bornholm, on naked clay soil, 12.10.1912"; designated by Lokhorst and Star (1985).

Epitype: Strain SAG 8.96 designated here to support the lectotype specified above and is the authentic strain of *K. mucosum*, that is, permanently preserved in a metabolically inactive state (cryopreserved in liquid nitrogen) in the SAG.

Comments: Strain SAG 8.96 was isolated by Lokhorst (original number KL 63) from soil near the

water level of the river Dommel near Valkenswaard (the Netherlands). It does not conflict with the original description (Petersen 1915) and generally corresponds to the emended description. The only difference is the slightly thinner filaments, not exceeding 20.0 μm (in original description—to 23.3 μm).

Klebsormidium elegans Lokhorst (1996). *Cryptogamic Studies* 5:28–30, figs. 149–180.

Heterotypic synonym: *K. bilatum* Lokhorst

Original description: Lokhorst (1996) *Cryptogamic Studies* 5: 28–30, figs. 149–180.

Holotype: prepared from a herbarium sheet of a former culture derived from an algal coat growing on bark on the foot of an oak tree, near Staverden (the Netherlands). 24.11.1992, leg. Lokhorst. (L), designated by Lokhorst (1996).

Epitype: Strain SAG 7.96 designated here to support the type specified above and proposed as the authentic strain of *K. elegans* is permanently preserved in a metabolically inactive state (cryopreserved in liquid nitrogen) in the SAG.

Comments: Strain SAG 7.96 was isolated by Lokhorst from the type locality (original number KL 24) and generally corresponds to the original description. The only difference consists of the slightly thinner filaments—(7.8)8.1–9.3(10.0) μm (in original description—(8.4)9.3–10.2(13.0) μm). *Klebsormidium bilatum* is proposed as a synonym of *K. elegans* because the ITS and *rbcL* sequences as well as the morphological characters of the strain isolated by Lokhorst (SAG 5.96) are close to the proposed epitype strain (see Rindi et al. 2011 and present paper). The *rbcL* sequences of both strains (SAG 7.96 and SAG 5.96) are identical, but ITS 2 sequences have differences in one nucleotide.

Other species of Klebsormidium, poorly described or doubtful taxa. The remaining species of *Klebsormidium* are morphologically similar to the above-mentioned taxa, and hence may be synonyms of these, but need additional research. *Klebsormidium klebsii* (G.M. Smith) P.C. Silva, Mattox & Blackwell is probably a synonym of *K. flaccidum*; *K. lamellosum* Y.X. Wei & H. Hu and *K. montanum* (Hansgirg) S. Watanabe are morphologically similar to *K. crenulatum*; *K. sterile* (Deason & Bold) P.C. Silva, Mattox & Blackwell is close to *K. nitens*. Species of *Klebsormidium* with extremely thin filaments (*K. pseudostichococcus* (Heering) H. Ettl & G. Gärtner, *K. tribonematoideum* (Skujala) Hindák and *K. scopulinum* (Hazen) H. Ettl & G. Gärtner) probably belong to the genera *Stichococcus* Nägeli or *Gloeotila* Kützing (Lokhorst 1996). Another species with thin filaments (*K. marinum* (Deason) P.C. Silva, Mattox & Blackwell) was transferred to *Stichococcus* as *S. deasonii* Neustupa et al. (2007). *Klebsormidium drouetii* H.P. Wagner & J.S. Zaneveld and *K. rivulare* (Kützing) M.O. Morison & Sheath are insufficiently described and doubtful taxa, and the latter may be a species of *Ulothrix* (Lokhorst 1996). *K. fragile* (Kützing) H.P. Wagner & J.S. Zaneveld and

K. catenatum (Dangeard) Guiry are invalidly described taxa (<http://ucjeps.berkeley.edu/CPD>; Guiry and Guiry 2015). Different intraspecific taxa of *K. flaccidum* are now restricted to synonyms of morphologically related species: f. *aquatica* (Heering) Nizamuddin & Gerloff to *K. mucosum*, f. *tumidum* (Heering) H. Ettl & G. Gärtner to *K. dissectum*, var. *crassum* (Chodat) H. Ettl & Gärtner to *K. flaccidum*, and var. *lubricum* (Chodat) H. Ettl & G. Gärtner to *K. nitens* (Lokhorst 1996).

Our sincere thanks to Dr. Thomas Pröschold for providing sequences of the alpine *Klebsormidium* strains and fruitful discussion on taxonomic aspects, to Prof. Thomas Friedl for making it possible to compare our material with strains in the SAG collection, and to Dr. Maike Lorenz and the SAG staff for their help with cryopreservation of epitype strains. T.M. thanks the DAAD for a short-term research fellowship and the Alexander von Humboldt Foundation for a Georg-Förster research fellowship at the University of Rostock. The support of this study by Austrian Science Fund (FWF) grant P 24242-B16 is acknowledged by A.H. Finally, U.K. thanks the DFG for financial support (KA899/16-1/4) and the University of Innsbruck as host during his sabbatical.

Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Auto. Con.* 19:716–23.

Belnap, J. & Lange, O. L. 2001. *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. Springer, Berlin.

Bock, C., Krienitz, L. & Pröschold, T. 2011. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea* 11:293–312.

Bray, J. R. & Curtis, J. T. 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27:325–49.

Büdel, B. 2002. Diversity and ecology of biological crusts. *Prog. Bot.* 63:386–404.

Büdel, B., Darienko, T., Deutschewitz, K., Dojani, S., Friedl, T., Mohr, K. I., Salisch, M., Reisser, W. & Weber, B. 2009. Southern African biological soil crusts are ubiquitous and highly diverse in drylands, being restricted by rainfall frequency. *Microb. Ecol.* 57:229–47.

Clarke, K. R. & Ainsworth, M. 1993. A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 92:205–19.

Darienko, T., Gustavs, L., Mudimu, O., Menendes, C., Schumann, R., Karsten, U., Friedl, T. & Pröschold, T. 2010. *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.* 45:79–95.

Demchenko, E., Mikhailyuk, T., Coleman, A. W. & Pröschold, T. 2012. Generic and species concepts in *Microglena* (previously the *Chlamydomonas monadina* group) revised using an integrative approach. *Eur. J. Phycol.* 47:264–90.

Ettl, H. & Gärtner, G. 1995. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/Jena/New York.

Ettl, H. & Gärtner, G. 2014. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*, 2nd edn. Springer, Berlin.

Evans, R. D. & Johansen, J. R. 1999. Microbiotic crusts and ecosystem processes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:183–225.

Finlay, B. J. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296:1061–3.

Finlay, B. J., Corliss, J. O., Esteban, G. & Fenchel, T. 1996. Biodiversity at the microbial level: the number of free-living ciliates in the biosphere. *Q. Rev. Biol.* 71:221–37.

Friedl, T. & Lorenz, M. 2012. The Culture Collection of Algae at Göttingen University (SAG): a biological resource for biotechnological and biodiversity research. *Proc. Environ. Sci.* 15:110–7.

Friedl, T. & Rybalka, N. 2012. Systematics of the green algae: a brief introduction of the current status. *Prog. Bot.* 73:259–80.

Gärtner, G. 2004. ASIB – The Culture Collection of Algae at the Botanical Institute, Innsbruck, Austria. *Nova Hedwigia* 79:71–6.

Gay, F. 1891. *Recherches sur le développement et la classification de quelques algues vertes*. Klincksieck, Paris.

Gay, F. 1894. Sur quelques algues de la flore de Montpellier. *Bull. Soc. Bot. France*, Sect. Session extraordinaire à Montpellier 40: CLXXIII–CLXXVIII.

Green, T. G. A. & Broady, P. A. 2001. Biological soil crusts of Antarctica. In Belnap, J. & Lange, O. L. [Eds.] *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. *Ecol. Stud.* 150:133–9. Springer, Berlin.

Guiry, M. D. & Guiry, G. M. 2015. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Available at: <http://www.algaebase.org> (searched on 16 February 2015).

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95–8.

Hindák, F. 1996. *Kľúč na určovanie nerozkoňá rených zelených rias (Ulotrichineae, Ulotrichales, Chlorophyceae)*. Slovenská Botanická Spoločnosť pri SAV, Bratislava, Slovakia.

Hoffmann, L. 1989. Algae of terrestrial habitats. *Bot. Rev.* 55:77–105.

Holzinger, A., Kaplan, F., Blaas, K., Zechmann, B., Komsic-Buchmann, K. & Becker, B. 2014. Transcriptomics of desiccation tolerance in the streptophyte green alga *Klebsormidium* reveal a land plant-like defense. *PLoS ONE* 9:e110630.

Holzinger, A. & Karsten, U. 2013. Desiccation stress and tolerance in green algae: consequence for ultrastructure, physiological and molecular mechanism. *Front. Plant Sci.* 4:article 327.

Holzinger, A., Lütz, C. & Karsten, U. 2011. Desiccation stress causes structural and ultrastructural alterations in the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) isolated from an alpine soil crust. *J. Phycol.* 47:591–602.

Hoppert, M., Reimer, R., Kemmling, A., Schröder, A., Günzl, B. & Heinke, T. 2004. Structure and reactivity of a biological soil crust from a xeric sandy soil in Central Europe. *Geomicrob. J.* 21:183–91.

Hori, K., Maruyama, F., Fujisawa, T., Togashi, T., Yamamoto, N., Seo, M., Sato, S. et al. 2014. *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nat. Commun.* 5:3978.

Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754–5.

Johansen, J. R., Javakul, A. & Rushforth, S. R. 1982. Effect of burning on the algal communities of a high desert soil near Wallsburg, Utah. *J. Range Manag.* 35:598–600.

Kaplan, F., Lewis, L. A., Wastian, J. & Holzinger, A. 2012. Plasmolysis effects and osmotic potential of two phylogenetically distinct alpine strains of *Klebsormidium* (Streptophyta). *Protoplasma* 249:789–804.

Karsten, U. & Holzinger, A. 2012. Light, temperature, and desiccation effects on photosynthetic activity, and drought-induced ultrastructural changes in the green alga *Klebsormidium dissectum* (Streptophyta) from a High Alpine soil crust. *Microb. Ecol.* 63:51–63.

Karsten, U. & Holzinger, A. 2014. Green algae in alpine biological soil crust communities: acclimation strategies against ultraviolet radiation and dehydration. *Biodivers. Conserv.* 23:1845–58.

Karsten, U., Lütz, C. & Holzinger, A. 2010. Ecophysiological performance of the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Charophyceae, Streptophyta) isolated from an alpine soil crust with an emphasis on desiccation stress. *J. Phycol.* 46:1187–97.

Karsten, U., Pröschold, T., Mikhailyuk, T. & Holzinger, A. 2013. Photosynthetic performance of different genotypes of the green alga *Klebsormidium* sp. (Streptophyta) isolated from biological soil crusts of the Alps. *Algol. Stud.* 142:45–62.

- Karsten, U. & Rindi, F. 2010. Ecophysiological performance of an urban strain of the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium* sp. (Klebsormidiales, Klebsormidiophyceae). *Eur. J. Phycol.* 45:426–35.
- Kützing, C., Pröschold, T. & Karsten, U. 2014. UV-induced effects on growth, photosynthetic performance and sunscreen contents in different populations of the green alga *Klebsormidium fluitans* (Streptophyta) from alpine soil crusts. *Microb. Ecol.* 67:327–40.
- Klebs, G. 1896. *Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen*. Gustav Fischer, Jena, Germany.
- Kostikov, I. Y., Romanenko, P. O., Demchenko, E. M., Darienko, T. M., Mikhailyuk, T. I., Rybchynskiy, O. V. & Solonenko, A. M. 2001. *Gruntovi vodorosti Ukrainy (istoria, metody doslidzhennya, systema, konspekt flory)* [The soil algae of Ukraine (history and methods of investigations, system, list of taxa)]. Phytosotsiotsentr, Kyiv, Ukraine (in Ukrainian).
- Kützing, F. T. 1845. *Phycologia germanica*. Köhne, Nordhausen, Germany.
- Kützing, F. T. 1849. *Species Algarum*. Brockhaus, Leipzig, Germany.
- Lewis, L. A. 2007. Chlorophyta on land. Independent lineages of green eukaryotes from arid lands. In Seckbach, J. [Ed.] *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 571–84.
- Lokhorst, G. M. 1996. *Comparative Taxonomic Studies on the Genus Klebsormidium* (Charophyceae) in Europe. *Cryptogam. Stud.* 5: 1–55.
- Lokhorst, G. M. & Star, W. 1985. Ultrastructure of mitosis and cytokinesis in *Klebsormidium mucosum* nov. comb., formerly *Ulothrix verrucosa* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 21:466–76.
- Lukešová, A. & Komárek, J. 1987. Succession of soil algae on dumps from strip coal-mining in the most region (Czechoslovakia). *Folia Geobot. Phytotax. Praha* 22:355–62.
- Luo, W., Pflugmacher, S., Pröschold, T., Walz, N. & Krienitz, L. 2006. Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Protist* 157:315–33.
- Lütz, C. & Engel, L. 2007. Changes in chloroplast ultrastructure in some high-alpine plants: adaptation to metabolic demands and climate? *Protoplasm* 231:183–92.
- Marin, B., Palm, A., Klingberg, M. & Melkonian, M. 2003. Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist* 154:99–145.
- Mattox, K. R. 1968. Proposal for the conservation of the generic name *Hormidium* Klebs 1896 vs. *Hormidium* Kütz. 1843. *Taxon* 17:442–3.
- McNeill, J., Barrie, F. R., Buck, W. R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D. L., Herendeen, P. S. et al. 2012. *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)*. Adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011.
- Mikhailyuk, T. I., Kondratyuk, S. Y., Nyporko, S. O., Darienko, T. M., Demchenko, E. M. & Voytsekhovich, A. O. 2011. *Lys-hainyky, mokhapodibni ta nazemni vodorosti granitnykh kanyoniv Ukrainy* [Lichens, mosses and terrestrial algae from granite canyons of Ukraine]. Alterpres, Kiev, Ukraine (in Ukrainian).
- Moshkova, N. A. 1979. *Ulotryksovi vodorosti – Ulotrichales. Kladoforovi vodorosti – Cladophorales. Vyznachnyk prysnovodnykh vodorostej Ukrainskoj RSR. Vyp. VI [Ulotrichalean algae – Ulotrichales. Cladophoralean algae – Cladophorales. Identification guide of freshwater algae of Ukrainian RSR. Issue VI]*. Naukova Dumka, Kiev, Ukraine (in Ukrainian).
- Neustupa, J., Eliáš, M. & Šejnohová, L. A. 2007. Taxonomic study of two *Stichococcus* species (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) with a starch-enveloped pyrenoid. *Nova Hedwigia* 84:51–63.
- Novis, P. M. 2006. Taxonomy of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in New Zealand streams and the significance of low-PH habitats. *Phycologia* 45:293–301.
- Petersen, J. B. 1915. Studier over Danske aërofile alger. *K. Dan. Vidensk. Selsk. Biol. Skr. 7. Raekke Naturv. Math.* 12:272–379.
- Pitschmann, H. 1963. Vorarbeiten zu einer Monographie der Gattung *Heterococcus*. *Nova Hedwigia* 5:487–531.
- Pröschold, T., Harris, E. H. & Coleman, A. W. 2005. Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 170:1601–10.
- Pröschold, T. & Leliaert, F. 2007. Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. In Brodie, J. & Lewis, J. [Eds.] *Unraveling the Algae: The Past, Present, and Future of the Algae Systematics*. Taylor & Francis, London, pp. 123–53.
- R Development Core Team. 2009. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rabenhorst, L. 1857. *Die Algen Sachsens. Vol. Decades 57/58*, printed by C. Heinrich, Leipzig, Germany, pp. 561–80.
- Reisigl, H. 1964. Zur Systematik und Ökologie alpiner Bodenalgen. *Österr. Bot. Z.* 111:402–99.
- Reisigl, H. 1969. Bodenalgen-Studien II. *Österr. Bot. Z.* 116:492–506.
- Rindi, F., Guiry, M. D. & López-Bautista, J. M. 2008. Distribution, morphology and phylogeny of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in urban environments in Europe. *J. Phycol.* 44:1529–40.
- Rindi, F., Mikhailyuk, T. I., Sluiman, H. J., Friedl, T. & López-Bautista, J. M. 2011. Phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Mol. Phylogenet. Evol.* 58:218–31.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–4.
- Rosentreter, R. & Belnap, J. 2001. Biological soil crusts of North America. In Belnap, J. & Lange, O. L. [Eds.] *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management. Ecol. Stud.* 150:31–50. Springer, Berlin, Germany.
- Rybalka, N., Wolf, M., Andersen, R. A. & Friedl, T. 2013. Congruence of chloroplast- and nuclear-encoded DNA sequence variations used to assess species boundaries in the soil micro-alga *Heterococcus* (Stramenopiles, Xanthophyceae). *BMC Evol. Biol.* 13:39. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/13/39>.
- Ryšánek, D., Hřčková, K. & Škaloud, P. 2015. Global ubiquity and local endemism of free-living terrestrial protists: phylogeographic assessment of the streptophyte alga *Klebsormidium*. *Environ. Microbiol.* 17:689–98.
- Sant'Anna, C. L. & Azevedo, M. T. P. 1991. Oscillatoriaceae (Cyanophyceae) from São Paulo State, Brazil. *Nova Hedwigia* 60:19–58.
- Silva, P. C., Mattox, K. R. & Blackwell, W. H. 1972. The generic name *Hormidium* as applied to green algae. *Taxon* 21:639–45.
- Škaloud, P. 2006. Variation and taxonomic significance of some morphological features in European strains of *Klebsormidium*. *Nova Hedwigia* 83:533–50.
- Škaloud, P., Lukešová, A., Malavasi, V., Ryšánek, D., Hřčková, K. & Rindi, F. 2014. Molecular evidence for the polyphyletic origin of low pH adaptation in the genus *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Plant Ecol. Evol.* 147:333–45.
- Škaloud, P. & Rindi, F. 2013. Ecological differentiation of cryptic species within an asexual protist morphospecies: a case study of filamentous green alga *Klebsormidium* (Streptophyta). *J. Eukaryot. Microbiol.* 60:350–62.
- Skuja, H. 1964. Grundzüge der Algenflora und Algenvegetation der Fjeldgegenden um Abisko in Schwedisch Lapland. *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Ups. Ser. I.* 18:1–465.
- Sluiman, H. J., Guihal, C. & Mudimu, O. 2008. Assessing phylogenetic affinities and species delimitations in Klebsormidiales (Streptophyta): nuclear-encoded rDNA phylogeny and ITS secondary structure models in *Klebsormidium*, *Hormidiella* and *Entransia*. *J. Phycol.* 44:183–95.
- Starmach, K. 1972. *Chlorophyta III. Zielenice nitowate: Ulotrichales, Ulvales, Prasiolales, Sphaeropleales, Cladophorales, Chaetophorales, Trentepohliales, Siphonales, Dichotomosiphonales*. Flora słodkowodna Polski. T. 10. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warsaw, Poland.

- Starr, R. C. & Zeikus, J. A. 1993. UTEX the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 29(Suppl.):1–106.
- Stewart, K. D. & Mattox, K. R. 1975. Comparative cytology, evolution and classification of the green algae with some consideration of the origin of other organisms with chlorophylls a and b. *Bot. Rev.* 41:104–35.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725–9.
- Tell, G. 1976. Algas del suelo de los alrededores de Buenos Aires (República Argentina). *Darwiniana* 20:491–548.
- Trenkwalder, H. 1975. Neue Bodenalgae aus Föhrenwäldern im Raum von Brixen (Südtirol, Italien). *Ber. Nat. Med. Ver. Innsbruck* 62:7–19.
- Tschaikner, A. 2008. Soil algae and soil algal crusts in the alpine regions of Tyrol (Ötztal, Austria). PhD thesis, University of Innsbruck, 58 p.
- Tschaikner, A., Gärtner, G. & Kofler, W. 2008. *Coelastrella aeroterrestica* sp. nov. (Chlorophyta, Scenedesmoideae) – a new, obviously often overlooked aeroterrestrial species. *Algol. Stud.* 128:11–20.
- Tschaikner, A., Ingolić, E., Stoyneva, M. P. & Gärtner, G. 2007. Autosporeulation in the soil alga *Coelastrella terrestris* (Chlorophyta, Scenedesmales, Scenedesmoideae). *Phytol. Balcan.* 13:29–34.
- Türk, R. & Gärtner, G. 2001. Biological soil crusts of subalpine, alpine, and nival areas in the Alps. In Belnap, J. & Lange, O. L. [Eds.] *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management. Ecol. Stud.* 150:67–72. Springer, Berlin, Germany.
- Vinatzer, G. 1975. Neue Bodenalgae aus den Dolomiten. *Plant Syst. Evol.* 123:213–35.
- West, N. E. 1990. Structure and function of microphytic soil crusts in wild land ecosystems of arid to semiarid regions. *Adv. Ecol. Res.* 20:179–223.

Supporting Information



Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

Table S1. Information for *Klebsormidium* strains isolated from alpine soil crusts in the Tyrolean Alps, Austria, and Italy.

2.2.2. Різноманіття *Klebsormidium* у біологічних ґрунтових кірочках лук та лісів центральної Німеччини



Habitat-specific composition of morphotypes with low genetic diversity in the green algal genus *Klebsormidium* (Streptophyta) isolated from biological soil crusts in Central European grasslands and forests

K. Glaser ¹, A. Donner ¹, M. Albrecht¹, T. Mikhailyuk² and U. Karsten¹

¹University of Rostock, Institute of Biological Sciences, Applied Ecology and Phycology, Albert-Einstein-Strasse 3, D-18059 Rostock, Germany; ²M.H. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Science of Ukraine, Tereshchenkivska St. 2, UA-01001 Kiev, Ukraine

ABSTRACT

Terrestrial filamentous green algae of the widely distributed, cosmopolitan genus *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) are typical components of biological soil crusts (BSCs). These communities occur in all climatic zones and on all continents, where soil moisture is limited or where there has been disturbance. BSCs form water-stable aggregates that have important ecological roles in primary production, nitrogen fixation, nutrient cycling, water retention and stabilization of soils. Although available data on *Klebsormidium* are limited, its functional importance in BSCs is regarded as high. Therefore, in the present study *Klebsormidium* strains were isolated from BSCs sampled from various grassland and forest plots of different land use intensities in Central Europe, as provided by the Biodiversity Exploratories, and its intraspecific genetic diversity was evaluated. Previous phylogenetic analyses revealed a relationship between sequence similarity and habitat preference with a higher genetic diversity than expected from a morphological classification. We isolated and sequenced 75 *Klebsormidium* strains. The molecular phylogeny based on the ITS regions showed that all strains belong to either the previously described clade B/C or clade E. This classification was supported by morphological characteristics: strains assigned to clade B/C were identified as *Klebsormidium* cf. *flaccidum* or *Klebsormidium* cf. *dissectum*, and strains from clade E as *K. nitens* or *Klebsormidium* cf. *subtile*. Within one clade the strains showed low sequence divergences. These minor differences were independent of the sampling region and land use intensity. Interestingly, most of the strains assigned to clade E were isolated from forest sites, whereas strains from clade B/C occurred equally in grassland and forest sites. Therefore, it is reasonable to assume that habitat with its microenvironmental conditions, and not biogeography, controls genetic diversity in *Klebsormidium*.

ARTICLE HISTORY Received 31 May 2016; Revised 12 August 2016; Accepted 13 August 2016

KEYWORDS Biodiversity Exploratories; biological soil crusts; forest; genetic diversity; grassland; ITS; *Klebsormidium*

Introduction

Members of the filamentous green algal genus *Klebsormidium* can be found worldwide in biogeographic regions ranging from temperate to tropical, and from cold to hot environments (Hoffmann, 1989; Broady, 1996; Lokhorst, 1996; Rindi *et al.*, 2008; Neustupa & Škaloud, 2010). *Klebsormidium* occurs in aquatic, terrestrial, urban and disturbed habitats, and in biological soil crusts (BSCs) (Ettl & Gärtner, 1995; Lukešová, 2001; Rindi *et al.*, 2008; Mikhailyuk *et al.*, 2015; Schulz *et al.*, 2016).

Members of *Klebsormidium* are typical components of BSC communities, where they occur at the surface (epidaphic) or just below the surface (enedaphic) of these microsystems. BSCs have been reported from all continents, in arid and semi-arid hot and cold habitats as well as in other climatic zones, where limiting water availability is one of the key environmental factors or where there has been ecosystem/soil disturbance (Belnap *et al.*, 2001). *Klebsormidium* and other green

algae, as well as cyanobacteria, bacteria, fungi, lichens and bryophytes, form an intimate association with soil particles within, or immediately on top of, the upper few millimetres of soil (Belnap *et al.*, 2001; Büdel, 2005). Here the BSCs form water-stable aggregates that have important ecological roles in primary production, water retention and soil stabilization (Evans & Johansen, 1999; Lewis, 2007; Wei *et al.*, 2015). Global carbon fixation equivalent to 6% of terrestrial vegetation and about 40% of global biological N fixation has been attributed to the activities of these communities (Elbert *et al.*, 2009).

The worldwide distribution of *Klebsormidium* can be explained by its ability to cope with high fluctuations of temperature, water availability, pH and solar radiation (Elster *et al.*, 2008; Karsten *et al.*, 2010; Kaplan *et al.*, 2012; Holzinger and Karsten, 2013; Škaloud *et al.*, 2014; Kitzing & Karsten, 2015). Species of *Klebsormidium* typically exhibit a rather uniform morphology consisting of uniseriate filaments without differentiated or specialized cells.

Each cell has a parietal chloroplast containing a pyrenoid and encircling more than half of the cell wall; reproduction takes place via biflagellate asymmetrical zoospores, with no stigma, that are produced singly in unspecialized cells, from which they escape through a pore (Silva *et al.*, 1972; Lokhorst, 1996; Sluiman *et al.*, 2008). Traditionally, *Klebsormidium* species were identified by morphological characteristics, such as cell width, length of filaments and shape of pyrenoids (Mikhailyuk *et al.*, 2015, and references therein), or the presence of a hydro-repellent layer in liquid media, as well as by special characters of the zoosporangia and pattern of zoospore germination (Printz, 1964; Lokhorst, 1996; Ettl & Gärtner, 2013). Nevertheless, morphological species identification in *Klebsormidium* remains difficult and challenging because in many cases strains with intermediate characteristics can be found (Rindi *et al.*, 2008). The definition of clades within *Klebsormidium* improved the assignment of genotypes (Rindi *et al.*, 2011), however, the species concept of *Klebsormidium* is still under revision (Škaloud & Rindi, 2013; Škaloud *et al.*, 2014; Mikhailyuk *et al.*, 2015).

Members of this genus have developed various physiological, biochemical and ultrastructural mechanisms to withstand numerous environmental stressors, which include photoprotection (e.g. formation of UV-sunscreen compounds), photochemical quenching, high osmotic values to avoid water loss and in some groups flexibility of secondary cell walls to maintain turgor pressure even in water-limited situations (Karsten & Holzinger, 2014, and references therein). These characteristics allow *Klebsormidium* to survive changes in prevailing environmental factors. Changes in environmental conditions are not only a result of the intrinsic characteristics of the respective habitat, but can also be caused by anthropogenic influences such as mechanical disturbance, nutrient inputs and intensive land use due to enhanced agriculture and forestry. Land use is a major driver in biodiversity changes (Sala *et al.*, 2000). The Biodiversity Exploratories are a German Science Foundation funded project for large-scale and long-term research into functional biodiversity (Fischer *et al.*, 2010). They provide a broad set of standardized field plots with different land use intensities in grassland and forests in three regions of Germany. These plots enabled sampling of BSCs in habitats with different land use intensities, from which *Klebsormidium* strains were isolated and genetically characterized.

Determining *Klebsormidium* diversity is challenging because of high morphological plasticity and uniformity (Rindi *et al.*, 2008; Mikhailyuk *et al.*, 2015). Molecular methods to support identification have been widely used in the classification of members of *Klebsormidium* (Sluiman *et al.*, 2008). Several

clades were recognized within *Klebsormidium* based on sequences of the ITS regions and *rbcL* (Rindi *et al.*, 2011). Rindi *et al.* (2011) reported six main clades (B, C, D, E, F and G) which were recovered in all phylogenies, and this clade structure was later confirmed by other studies (Škaloud & Rindi, 2013; Ryšánek *et al.*, 2014; Škaloud *et al.*, 2014; Mikhailyuk *et al.*, 2015). However, unambiguous identification of species in the genus *Klebsormidium*, as well as their relationship with these clades, remains difficult (Mikhailyuk *et al.*, 2015). Previous studies observed higher genetic diversity for ITS than was expected based on morphological data (Rindi *et al.*, 2011; Škaloud & Rindi, 2013). Recently, the hidden cryptic genetic diversity of *Klebsormidium* was estimated as globally ubiquitous with some local endemism (Ryšánek *et al.*, 2014, 2016a). The observed genetic variation within *Klebsormidium* could partly be explained by various environmental factors, especially by the habitat differentiation of particular genotypes (Ryšánek *et al.*, 2014). The latter authors also identified a large number of new lineages. *Klebsormidium* strains in clade E are considered to prefer humid conditions, while those of clade F are representative of the xerophytic lineage (Mikhailyuk *et al.*, 2015). Certain *Klebsormidium* clades seem to prefer either open or closed habitats, and pH preferences of *Klebsormidium* strains are reflected within the phylogenetic tree (Škaloud *et al.*, 2014; Ryšánek *et al.*, 2016b). All these studies clearly indicate a correlation between cryptic diversity and environmental factors. Therefore, the main expectation of the present investigation was that there would be high genetic diversity within strains of *Klebsormidium* isolated from BSC communities in grassland and forest plots with different habitat characteristic and land use regimes in Central Europe. The main aim was to outline the cryptic and intraspecific genetic diversity of *Klebsormidium* as a function of the habitat, and to document whether and how changes in land use intensity will influence population structure in BSCs.

Materials and methods

Study sites and sampling

Biological soil crust (BSC) samples were collected in 2011 and 2012 as part of the DFG priority programme 1374 Biodiversity Exploratories (Fischer *et al.*, 2010). Forest and grassland sites were sampled in three regions of Germany, Schwäbische Alb, Hainich-Dün and Schorfheide-Chorin. The distance between the Schorfheide-Chorin and Hainich-Dün Biodiversity Exploratories and between Hainich-Dün and the third site, Schwäbische Alb, is about 400 km. The three Biodiversity Exploratories differ in their soil characteristics (e.g. soil organic matter

(Baumann *et al.*, 2016), pH (Herold *et al.*, 2014)) and microclimatic conditions (e.g. precipitation (Schorfheide-Chorin, 520–580 mm; Hainich-Dün, 600–800 mm; Schwäbische Alb, 1000–1100 mm; www.dwd.de)).

The Schwäbische Alb Biosphere Reserve in Southern Germany covers >85 000 hectares of sub-montane to montane plateaus. Extensive grasslands, grazed by sheep for centuries, cover limestone soils across rolling hills and are interspersed with large forests and arable lands. The Hainich-Dün National Park is a low mountain range in the west of Thuringia. It covers >16 000 hectares, consisting mainly of varied forests including almost unspoiled woodland, interspersed with extensively managed grasslands formerly grazed by sheep, the more fertile intensive grasslands being under pressure for conversion to arable land. The lowland Schorfheide-Chorin Biosphere Reserve in Northeast Germany covers >129 000 hectares, and the characteristic postglacial geomorphological structures result in diverse habitats with various forest and grassland types. The sampled forest and grassland plots represent different land-use systems ranging from near-natural to intensively used plots. Grassland plots were categorized into pastures, mown pastures, and meadows differing in fertilization, grazing and number of cuts per year. The forest plots were either natural sites or age-class forests in different states. In every region grassland and forest plots were visited (110 in total). BSCs from the top 2 cm of soil surface were collected and stored dry in paper bags until isolation.

Culturing

Solid 3N-Bolds Basal Medium (1.5% agar) with vitamins (Starr & Zeikus, 1993) was used for enrichment cultures. Several 7–10 mm BSC pieces were cleaned with forceps to remove all roots and leaves to avoid the additional growth of fungi and bacteria and placed on the surface of an agar plate under sterile conditions. Plates were incubated at 20°C, 30–35 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Osram Lumilux Cool White lamps L36W/840) under a light/dark cycle of 16:8 h L:D. The Petri dishes were regularly inspected for green filaments. *Klebsormidium* species are often selected by this treatment and can be identified based on characteristic cell and chloroplast morphology. Using sterilized toothpicks single filaments from each observed *Klebsormidium* colony were transferred, using a stereo microscope (ZS40, Olympus, Tokyo, Japan), from the raw culture to new agar plates, which were then incubated under the same conditions as described above. *Klebsormidium* generally grows much faster on moist agar than other terrestrial green algae or fungi, therefore single filaments from the youngest part of the respective colony

can easily be re-isolated and transferred to a new agar plate until the successful establishment of a unialgal culture. In most cases this protocol is quite successful, and has been developed for *Klebsormidium* from alpine BSCs (Karsten *et al.*, 2010). Nevertheless, unialgal status was checked regularly and carefully using a light microscope. Unialgal *Klebsormidium* strains were grown in test tubes filled with solid 3N-Bolds Basal Medium (see above) under the conditions described above to produce sufficient biomass for DNA extraction. Seventy-five isolates were picked and kept in unialgal cultures.

All strains were inspected and the morphology of 15 strains with high genetic divergences were described in detail, using a light microscope (BX51, Olympus) with Nomarski differential interference optics. Light micrographs were taken with an Olympus UC30 camera attached to the microscope and processed with the software cellSens Entry (Olympus).

DNA extraction, PCR, PCR purification and sequencing

Genomic DNA was extracted from the clonal *Klebsormidium* strains using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) following the instructions of the manufacturer. DNA was amplified using the Taq PCR Mastermix Kit (Qiagen GmbH) with the primers EAF3 (Marin *et al.*, 2003) and ITS055R (Marin *et al.*, 1998). Thirty PCR cycles were run at the following conditions: initial denaturation for 3 min at 96°C, cyclic repeated denaturation for 1 min at 96°C, annealing for 2 min at 55°C and elongation for 3 min at 68°C followed by a final elongation of 7 min at 68°C. The PCR products were purified using the Qiagen PCR purification kit (Qiagen GmbH) following the instructions provided by the manufacturer. The purified PCR products were commercially sequenced by Qiagen using the primers GF and GR (Marin *et al.*, 1998). The ITS rDNA was sequenced from 75 strains. Sequences were deposited in GenBank under the accession numbers LK392518–LK392592.

Phylogenetic analyses

Twenty-three sequences of *Klebsormidium* and *Interfilum* strains were used for comparison with 75 sequences of the newly isolated *Klebsormidium* strains. Multiple alignments of the newly determined ITS1, 5.8S and ITS2 rDNA sequences and other sequences selected from GenBank were conducted using the Muscle algorithm implemented in Geneious (version 8.1.8; Biomatters). The evolutionary model that best fits the data set was chosen based on the lowest AIC (Akaike, 1974) calculated

with the software MEGA version 6 (Tamura *et al.*, 2013). The unrooted Bayesian tree was constructed in MrBayes 3.2.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) using the GTR+G+I model with 5 000 000 generations. Two runs of four Monte Carlo Markov Chains were calculated simultaneously, with trees sampled every 500 generations. Split frequency between the runs was below 0.01 at the end of the calculation. The trees sampled before the likelihood scores reached saturation were discarded afterwards.

Secondary structures

For determination of secondary structures the ITS2 regions were aligned and helices identified according to previously published secondary structures (Caisová *et al.*, 2013; Škaloud & Rindi, 2013; Kitzing *et al.*, 2014). The helices were folded with the online software mfold (Zuker, 2003); for visualization the online tool Pseudoviewer (Byun & Han, 2009) was used.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using R software (R Development Core Team, 2009). To determine the dissimilarities between the compositions of the *Klebsormidium* communities from different locations around the world, non-metric multidimensional scaling using the Bray–Curtis Index (Bray & Curtis, 1957) was performed. The relative abundances of *Klebsormidium* clades from study sites worldwide were taken from the literature and compared with the current study (Kostikov *et al.*, 2001; Büdel *et al.*, 2009; Mikhailyuk *et al.*, 2011, 2015; Ryšánek *et al.*, 2014, 2016a, b).

An analysis of variance (ANOVA) was conducted using the command aov in R (Chambers *et al.*, 1992) in order to test for significant effects of habitat, land use and sampled region on the presence and absence of *Klebsormidium* species; $P < 0.05$ was regarded as significant.

Results

Sampling and isolation

Klebsormidium strains were successfully isolated from almost half of the BSC samples (35 of 62 forest and 19 of 48 grassland plot samples) from the Biodiversity Exploratories (Table 1). In total, 75 unialgal cultures (= strains) were successfully established from various grassland and forest sites and morphologically and genetically characterized (Table S1).

Occurrence of *Klebsormidium*

Klebsormidium was regularly observed in forest as well as in grassland sites; the presence of

Table 1. Number of visited plots categorized by the habitat type (grassland/forest) and land-use type. The number of plots where *Klebsormidium* was detected is given together with the number of strains and their clade affiliation (according to the phylogenetic tree; Fig. 11).

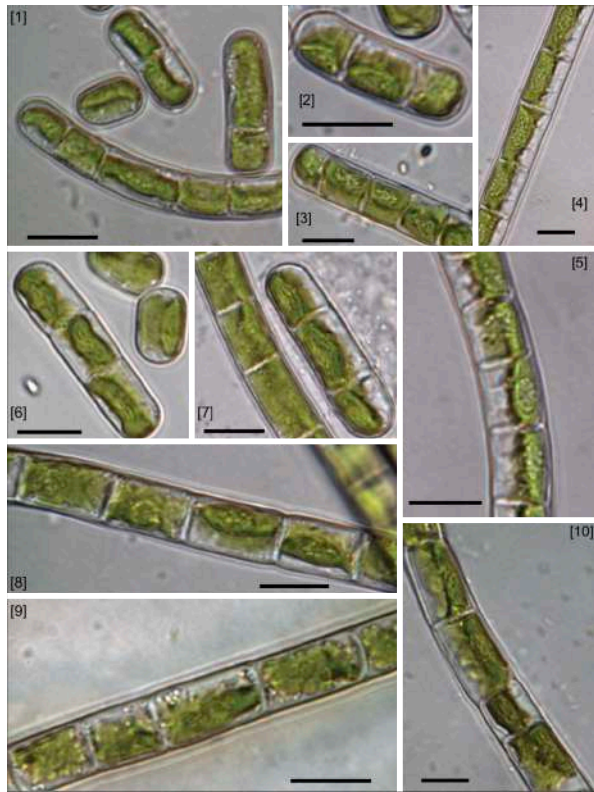
Habitat/land use type	Number of visited plots/Number of plots with <i>Klebsormidium</i>	Number of strains (phylogenetic clades)
Schwäbische Alb		
Grassland/meadows	15/4	6 (clade B/C)
Grassland/mown pastures	5/1	1 (clade B/C)
Grassland/pastures	2/0	–
Forest	18/8	4 (clade B/C) 12 (clade E)
Hainich		
Grassland/meadows	2/2	1 (clade B/C)
Grassland/mown pastures	2/1	– ^a
Grassland/pastures	5/4	– ^a
Forest	16/12	6 (clade B/C) 15 (clade E)
Schorfheide-Chorin		
Grassland/meadows	6/4	2 (clade B/C) 2 (clade E)
Grassland/mown pastures	2/0	–
Grassland/pastures	9/3	5 (clade B/C)
Forest	28/15	2 (clade B/C) 19 (clade E)

^aStrains were lost during cultivation steps.

Klebsormidium was independent of the habitat (ANOVA; $P > 0.05$). The presence or absence of *Klebsormidium* species was not linked to the sampled regions, application of fertilizers or the different land-use categories in the grassland sites (ANOVA; $P > 0.05$; Table 1).

Morphological variation

The morphological classification of some selected strains is congruent with the phylogenetic tree (Figs 1–11): long, firm filaments with average width of 7.3 to 8.7 μm were identified as *Klebsormidium* (cf.) *flaccidum* and all sequences of these strains were positioned in clade B/C. Also within clade B/C were those strains identified as *Klebsormidium* cf. *dissectum*. These isolates were characterized by cell width and appearance similar to *K. flaccidum* but with disintegrated filaments. In contrast, strains identified as *Klebsormidium nitens* typically exhibited short and thinner filaments (cell width 4.9 to 6.7 μm). The sequences of these strains are all positioned within clade E. The resolution of relationships among clade E sequences was low but they were morphologically identified as *Klebsormidium* cf. *subtile* with partly



Figs. 1–10. Micrographs of 10 selected *Klebsormidium* strains, which were morphologically assigned to four morphotypes. *Klebsormidium nitens*: **Fig. 1** HEW 1-2 **Fig. 2** AEW 33-3; *Klebsormidium* cf. *subtile*: **Fig. 3** SEW 35-6 **Fig. 4** SEW 25-3 **Fig. 5** AEW 13-2; *Klebsormidium* cf. *dissectum*: **Fig. 6** AEG 12-1 **Fig. 7** AEW 23-1 **Fig. 8** HEG 3-1; *Klebsormidium* cf. *flaccidum*: **Fig. 9** SEG 31-3 **Fig. 10** HEW 42-5; identification is based on Mikhailuyk *et al.* (2015, and references therein); scale bar corresponds to 10 μm .

disintegrated filaments of average width (7.3–7.9 μm) (Figs 3–5, 11).

Genetic variation

The ITS and 5.8S rDNA sequences could be assigned to *Klebsormidium* clades B/C and E following the system proposed by Rindi *et al.* (2011) (Fig. 11), except that as the divergence between clades B and C was low, we refer to clade B/C (Ryšánek *et al.*, 2014; Mikhailuyk *et al.*, 2015).

In most cases, multiple strains from the same plot belonged to the same clade with two exceptions: strains from the plots AEW35 and HEW42 represented both clades. The phylogenetic tree differentiated between clades B/C and E, but resolution was low within clade E. Most of the strains within each clade differed only by one or two bases in the ITS sequences.

Analysing the secondary structure, we found the same landmarks in the ITS2 region (Fig. 12) proposed by Caisová *et al.* (2013) for four orders of the Chlorophyta (Sphaeropleales, Oedogoniales,

Chaetopeltidales, Chaetophorales), with minor differences in the core region (Škaloud & Rindi, 2013; Kitzing *et al.*, 2014). All the sequence variation was located within the helices, mostly in the loops (Fig. 12). Various positions within or very close to the loop were identified where a certain base was only present in one clade. For example, in the stem of helix 1 cytosine was only found in clade B/C and adenosine only in clade E. Nevertheless, only one of those changes was detected within the barcode regions (Coleman, 2009; Demchenko *et al.*, 2012). This particular base change cannot be regarded as a hemi-CBC (compensatory base change) because it was observed within a mismatch position in the *Klebsormidium* clades.

Distribution pattern

The distribution of the *Klebsormidium* clades showed a clear pattern depending on the habitat (Fig. 13). Interestingly, almost all strains assigned to clade E were isolated from forest sites with one exception (SEG 13; Fig. 11). Strains in clade B/C were isolated from both habitats in similar numbers (12 from forest, 15 from grassland sites). In contrast, the sampling region seemed not to be related to the position of the isolate within the *Klebsormidium* clades. The clade composition of the present study was compared with previously published data in an nMDS analysis (Fig. 14). The composition of the *Klebsormidium* clade in the forest sites from our study was similar to studies conducted in closed habitats and the same applies to the grassland sites, which were similar to studies conducted in open habitats elsewhere. In general, the results of studies from closed habitats were clustered whereas those from open habitats were more variable.

Discussion

The occurrence of *Klebsormidium* in at least half of the samples confirms that members of this genus are common in BSC algal communities in temperate regions of Europe, as previously suggested, but not experimentally proven, by Ettl & Gärtner (2013). This genus has been reported to have a cosmopolitan distribution in numerous terrestrial and freshwater habitats (Rindi *et al.*, 2011, and references therein). Its presence in other terrestrial habitats such as natural rocks in plains and mountainous areas (Mikhailuyk, 2008), caves (Vinogradova & Mikhailuyk, 2009), sand dunes (Schulz *et al.*, 2016), tree bark (Freystein *et al.*, 2008), acidic post-mining sites (Lukešová, 2001), golf courses (Baldwin & Whitton, 1992), bases of urban walls (Rindi & Guiry, 2004) and building facades (Barberousse *et al.*, 2006) is well documented.

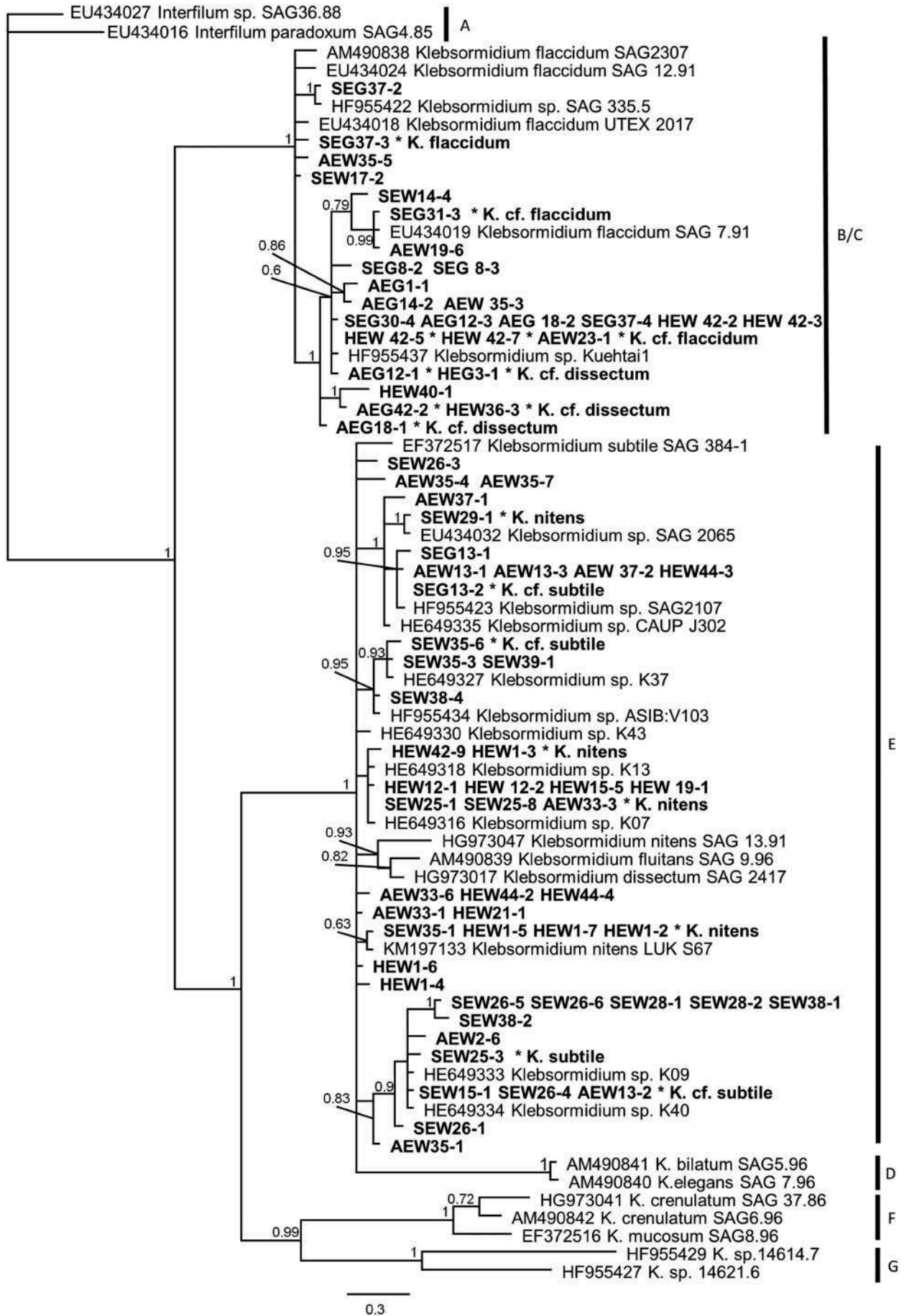


Fig. 11. Molecular phylogeny of *Interfilum* (I.) and *Klebsormidium* (K.) based on ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA sequence comparisons. Bayesian tree showing the phylogenetic position of the newly sequenced *Klebsormidium* strains (bold) within the genus *Klebsormidium*. The clade designation (A–G) followed the suggestion of Rindi *et al.* (2011). Probabilities below 0.6 are not shown. Strains that were morphologically assigned are marked with an asterisk Figs. 1–10.

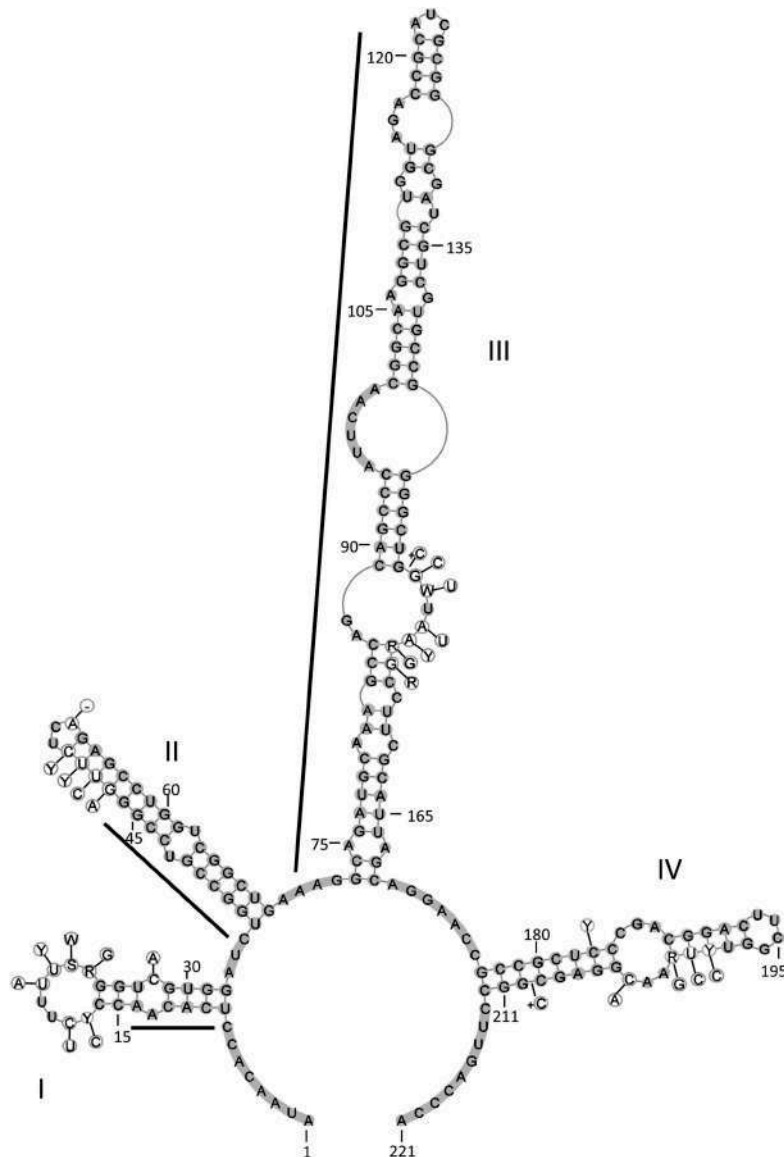


Fig. 12. Secondary structure of a consensus sequence from the ITS2 region obtained from the B/C clade of the *Klebsormidium* strains isolated in this study (construction followed the proposed structure of Kitzing *et al.*, 2014). The four helices are numbered by roman numerals. Single base changes in the *Klebsormidium* strains from clade E are labelled with white circles, and conserved bases are in grey. Plus symbol shows an insertion, minus a deletion. Black lines indicate the barcode regions proposed by Coleman (2009).

In the present study, the occurrence of *Klebsormidium* was independent of land use intensity in grassland sites. Why soil fertilization did not affect the occurrence of *Klebsormidium* is probably because the total soil nitrogen content did not differ between fertilized and unfertilized plots (Stempfhuber *et al.*, 2014). Different land-use categories (meadow, mown pasture and pasture) did not influence the occurrence of *Klebsormidium*. Previous studies within the Biodiversity Exploratories also observed that the chosen land-use gradient does not affect soil microorganisms (Nacke *et al.*, 2011; Domonell *et al.*, 2013; Glaser *et al.*, 2015) although an effect on multicellular organisms (e.g. higher plants) was reported (Allan *et al.*, 2014). The ability of *Klebsormidium* species to tolerate a wide range of environmental factors might

contribute to the lack of effect of land use intensity on the occurrence of this genus.

Members of the genus *Klebsormidium* exhibit a rather uniform morphology and hence morphological identification remains challenging. Molecular methods are widely used in taxonomic and phylogenetic studies of *Klebsormidium* (Rindi *et al.*, 2011; Škaloud & Rindi, 2013; Mikhailyuk *et al.*, 2015). The morphological assignments were congruent with the sequence data for the same strains, although minor differences in some sequences were detected.

In the present study a surprisingly low genetic diversity was found among all strains of *Klebsormidium* belonging to clades B/C or E, although the number of sequences (75) exceeded or was comparable to previously published data

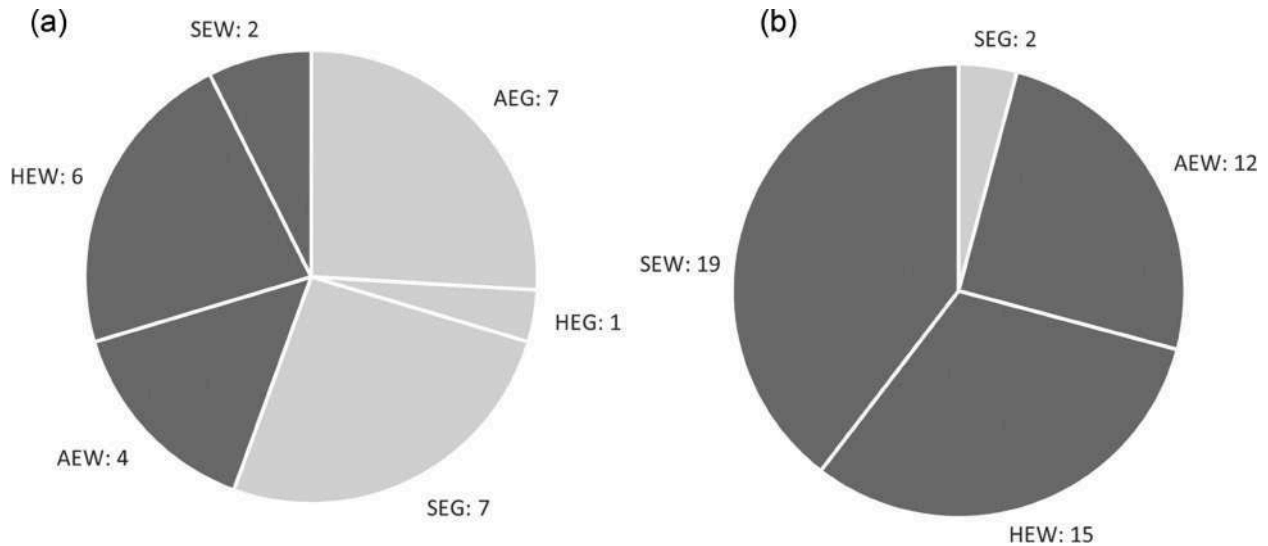


Fig. 13. Distribution of the newly isolated *Klebsormidium* strains belonging to (a) clade B/C and (b) to clade E according to Biodiversity Exploratory and habitat; light grey – grassland sites, dark grey – forest sites. The first letter of the abbreviation accounts for the sampled region: A – Schwäbische Alb, H – Hainich-Dün, S – Schorfheide-Chorin.

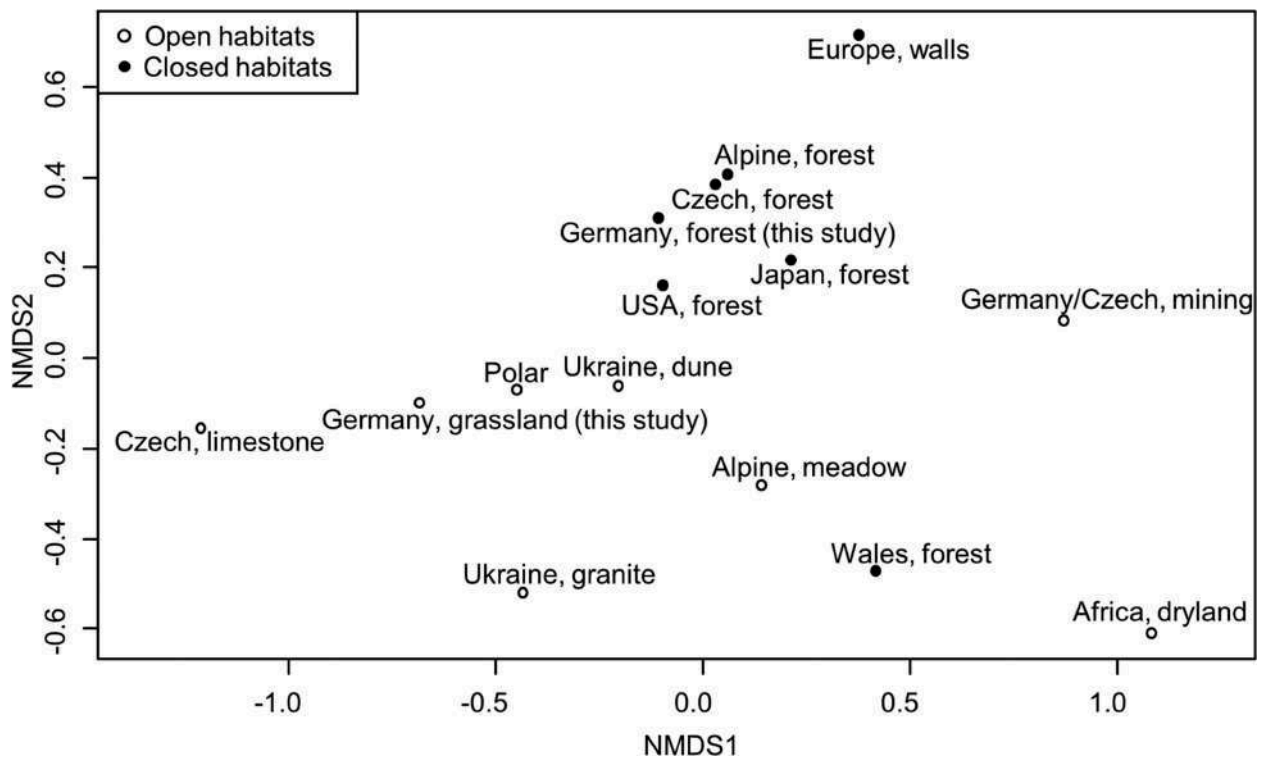


Fig. 14. nMDS plot based on Bray-Curtis dissimilarity index visualizes the dissimilarities in the clade composition of *Klebsormidium* strains from this study compared with data from the literature (Kostikov *et al.*, 2001; Büdel *et al.*, 2009; Mikhailiyuk *et al.*, 2011, 2015; Ryšánek *et al.*, 2014, 2016a, b); open symbols reflect data from open habitats (grasslands), while closed symbols represent data from closed habitats (forests). Stress=0.1.

(Škaloud & Rindi, 2013; Ryšánek *et al.*, 2014, 2016a; Škaloud *et al.*, 2014; Mikhailiyuk *et al.*, 2015). Mikhailiyuk *et al.* (2015) isolated 40 strains of *Klebsormidium* from alpine BSC communities of the Central Alps along elevational gradients from 600 to 3000 m above sea level (a.s.l.), and also investigated ITS sequence diversity. The molecular phylogeny

indicated that these strains from biogeographically adjacent sampling locations exhibited rather high genetic diversity and hence could be assigned to clades B/C, D, E and F. Most strains belonged to clade E, which included isolates that prefer humid conditions and hence were isolated from low to middle elevations (<1800 m a.s.l.). One representative of

the xerophytic lineage (clade F) as well as a few isolates characteristic of temperate conditions (clades B/C, D) were isolated mainly from higher elevations (>1800 m a.s.l.) (Mikhailyuk *et al.*, 2015). One explanation for the conspicuously low genetic diversity of the present study is the fact that the ITS region is relatively conserved and thus may not differentiate *Klebsormidium* lineages. It is possible that the application of a different phylogenetic marker, like the plastid spacers between *atpE* and *trnM* or between *ndhK* and *ndhC* would resolve higher cryptic diversity (Rindi *et al.*, 2011; Ryšánek *et al.*, 2014, 2016b). For example, Škaloud & Rindi (2013) investigated the ecological differentiation of cryptic *Klebsormidium* species within clade E (*K. subtile*/*K. nitens* complex) which contains a number of morphologically similar strains. These authors reported 14 subclades in their phylogenetic analysis based on a concatenated ITS rDNA + *rbcL* data set of about 70 strains, as well as a strong correlation between the lineages recovered and habitat preference (natural terrestrial substrata, anthropogenic terrestrial substrata, aquatic habitat). Our research sites, the Biodiversity Exploratories, differ in their soil characteristics and microclimate conditions and hence according to Škaloud & Rindi (2013) a much higher degree of genetic differentiation within *Klebsormidium* was expected as a function of the different environmental conditions. However, it seems that the habitat conditions in the Biodiversity Exploratories are not so different in terms of ecological requirements of *Klebsormidium*, which has been described in previous ecophysiological studies as a generally euryoecious genus (Karsten & Holzinger, 2014, and references therein). Also the dispersal of *Klebsormidium* through the atmosphere is possible because filaments can easily disintegrate and the cells are highly tolerant of desiccation (Škaloud, 2006; Holzinger & Karsten, 2013). Living cells of *Klebsormidium* have been isolated from air samples (Sharma *et al.*, 2007; Sahu & Tangutur, 2015).

The analyses of the secondary structure of the ITS2 region from the newly isolated *Klebsormidium* strains allowed the identification of several base positions which were unique to either clade E or B/C. Compensatory base changes (CBC), according to the barcode concept of Coleman (2009), could not clearly be identified within the two clades of the BSC *Klebsormidium* strains originating from the Biodiversity Exploratories. Most of the base changes occurred in highly variable loops of the helices or beyond the designated barcode regions. Nevertheless, a kind of 'barcode' in the lateral loop of helix 3 could be proposed to distinguish clades E and B/C, and this could theoretically also be applied to the other *Klebsormidium* clades based on the sequences published so far (GenBank December 2015).

In the present study *Klebsormidium* from clade E was nearly exclusive to BSCs of forest habitats, whereas members of clade B/C were detected in similar numbers in BSCs of the forest and grassland sites. Grassland sites are open habitats and consequently BSCs have to face a higher radiation and lower soil moisture compared with BSCs from forest sites. The habitats also differ in their soil pH: forest sites always have a lower soil pH (3.5–5.1) than the grassland sites (5.3–6.7). Other studies also reported that the most common *Klebsormidium* strains belong to clades E or B/C, and clade E has been described as the most cosmopolitan clade (Novis & Visnovsky, 2011; Ryšánek *et al.*, 2014; Mikhailyuk *et al.*, 2015). Clade B/C seems to be dominant in polar regions and on the surface of limestone (Ryšánek *et al.*, 2016a). In contrast, *Klebsormidium* clade G has rarely been found, except in BSCs of South African drylands where it occurs more often (Büdel *et al.*, 2009; Rindi *et al.*, 2011; Karsten *et al.*, 2016). Nevertheless, clade G members have also been found in Europe (Škaloud *et al.*, 2014). Figure 14 compares the clade composition of *Klebsormidium* strains between different habitats using the data from the present investigation and those from other study sites worldwide. Closed habitats, such as forest sites, were more similar to each other, whereas the open habitats (drylands, grasslands and polar samples) show more dissimilarities between each other and in particular with most of the closed habitats. The reason for this conspicuous pattern was mainly the strong dominance of clade E in forest sites, whereas the open habitats seem to support other clades also, in particular clade B/C (Mikhailyuk *et al.*, 2015; Ryšánek *et al.*, 2016a). This observation implies a better adaptation of strains belonging to clade B/C to open habitats. Organisms living in open habitats have to deal, for example, with higher solar radiation and more frequent desiccation events compared with shaded habitats. Also differences in the pH might promote a certain clade. A recent study indicated that members of clade E are more tolerant to low pH than members of clade B (Ryšánek *et al.*, 2016b). Further, previous studies showed that some lineages of the *Klebsormidium* E clade are habitat-specific (Rindi *et al.*, 2011). As already mentioned, Mikhailyuk *et al.* (2015) characterized clade E members as a typical humid lineage, whereas clade B/C representatives are moderately xerophytic. These data are confirmed by controlled desiccation experiments which point to different tolerances based on physiological and ultrastructural features (Holzinger & Karsten, 2013; Karsten & Holzinger, 2014). In contrast, a better adaptation of the *Klebsormidium* B/C clade to higher UV radiation compared with clade E could not be confirmed (Kitzing & Karsten, 2015). In terms of desiccation tolerance, it remains an unresolved question if all

strains from open habitats are ecophysiologicaly better adapted to the environmental conditions than strains originating from shaded habitats (Kaplan *et al.*, 2012; Karsten & Holzinger, 2012, 2014).

In the present study we undertook a broad survey of the genetic diversity of *Klebsormidium* strains originating from forest and grassland BSC communities in Central Europe and discovered low genetic differentiation within this genus. Sexual reproduction has never been reported for this genus, and hence only vegetative spore formation and cell division are documented in *Klebsormidium*. Nevertheless, we could clearly see a preference of clade E for closed habitats, whereas clade B/C was equally distributed in open and closed habitats. Comparing the results with published sequences confirmed the suggestion that genetic diversity within the genus *Klebsormidium* is more related to habitat than to geographic distance (Škaloud & Rindi, 2013; Ryšánek *et al.*, 2016a). The ecological reason for this observation is still an open question, since ecophysiological studies performed so far have not explained the preferences of certain clades for open or closed habitats. Low genetic differentiation and asexual reproduction can nevertheless be associated with high ecological success, since *Klebsormidium* has such a wide biogeographic distribution in BSC communities.

Acknowledgements

We thank Dr Thomas Pröschold and Dr Tatyana Darienko for setting up the isolates and providing the sequences. T.M. thanks the Alexander von Humboldt Foundation for a Georg Forster research fellowship at the University of Rostock.

We thank the managers of the three Exploratories, Kirsten Reichel-Jung, Swen Renner, Katrin Hartwich, Sonja Gockel, Kerstin Wiesner and Martin Gorke for their work in maintaining the plot and project infrastructure; Christiane Fischer and Simone Pfeiffer for giving support through the central office, Michael Owonibi for managing the central data base, and Markus Fischer, Eduard Linsenmair, Dominik Hessenmöller, Jens Nieschulze, Daniel Prati, Ingo Schöning, François Buscot, Ernst-Detlef Schulze, Wolfgang W. Weisser and the late Elisabeth Kalko for their role in setting up the Biodiversity Exploratories project.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

The work has been funded by the DFG Priority Program 1374 'Infrastructure-Biodiversity-Exploratories' in the frame of the project SoilCrust (KA899/20-1). Fieldwork permits were issued by the responsible state environmental offices of Baden-Württemberg, Thüringen, and Brandenburg (according to § 72 BbgNatSchG).

Author contributions

K. Glaser: drafting and editing manuscript, analysis and interpretation of molecular data and phylogenetic trees; A. Donner: interpretation of data, editing manuscript; M. Albrecht: setting up and maintaining cultures, editing manuscript; T. Mikhailyuk: morphological description, interpretation data, editing manuscript; U. Karsten: original concept, interpretation data, editing manuscript.

Supplementary information

The following supplementary material is accessible via the Supplementary Content tab on the article's online page at <http://dx.doi.org/10.1080/09670262.2016.1235730>

Supplementary Table 1. Overview of the *Klebsormidium* strains isolated in this study and their morphological identification, accession number and short description of the sampling site; geographic position (RW and HW) is given as Gauß-Krüger coordinate system.

ORCID

K. Glaser  <http://orcid.org/0000-0002-5962-3603>

A. Donner  <http://orcid.org/0000-0001-9931-594X>

References

- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *Automatic Control, IEEE Transactions on Automatic Control*, **19**: 716–723.
- Allan, E., Bossdorf, O., Dormann, C.F., Prati, D., Gossner, M.M., Tscharnkte, T. et al. (2014). Interannual variation in land-use intensity enhances grassland multidiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **111**: 308–313.
- Baldwin, N.A. & Whitton, B.A. (1992). Cyanobacteria and eukaryotic algae in sports turf and amenity grasslands: a review. *Journal of Applied Phycology*, **4**: 39–47.
- Barberousse, H., Tell, G., Yéprémian, C. & Couté, A. (2006). Diversity of algae and cyanobacteria growing on building facades in France. *Algological Studies*, **120**: 81–105.
- Baumann, K., Schöning, I., Schrupf, M., Ellerbrock, R.H. & Leinweber, P. (2016). Rapid assessment of soil organic matter: soil colour analysis and Fourier transform infrared spectroscopy. *Geoderma*, **278**: 49–57.
- Belnap, J., Büdel, B. & Lange, O.L. (2001). Biological soil crusts: characteristics and distribution. In *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. (Belnap, J. & Lange, O.L., editors), 3–30. Springer-Verlag, Berlin.
- Bray, J.R. & Curtis, J.T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, **27**: 325–349.
- Broady, P.A. (1996). Diversity, distribution and dispersal of Antarctic terrestrial algae. *Biodiversity and Conservation*, **5**: 1307–1335.
- Büdel, B. (2005). Microorganisms of biological crusts on soil surfaces. In *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions* (Buscot, F. & Varma, A., editors), 307–323. Springer, Berlin.
- Büdel, B., Darienko, T., Deutschewitz, K., Dojani, S., Friedl, T., Mohr, K.I. et al. (2009). Southern African biological soil crusts are ubiquitous and highly diverse in drylands, being restricted by rainfall frequency. *Microbial Ecology*, **57**: 229–247.

- Byun, Y. & Han, K. (2009). PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. *Bioinformatics*, **25**: 1435–1437.
- Caisová, L., Marin, B. & Melkonian, M. (2013). A consensus secondary structure of ITS2 in the Chlorophyta identified by phylogenetic reconstruction. *Protist*, **164**: 482–496.
- Chambers, J.M., Freeny, A. & Heiberger, R.M. (1992). Analysis of variance; designed experiments. In *Statistical Models in S* (Chambers, J.M. & Hastie, T.J., editors), 145–194. Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.
- Coleman, A.W. (2009). Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **50**: 197–203.
- Demchenko, E., Mikhailyuk, T., Coleman, A.W. & Pröschold, T. (2012). Generic and species concepts in *Microglena* (previously the *Chlamydomonas monadina* group) revised using an integrative approach. *European Journal of Phycology*, **47**: 264–290.
- Domonell, A., Brabender, M., Nitsche, F., Bonkowski, M. & Arndt, H. (2013). Community structure of cultivable protists in different grassland and forest soils of Thuringia. *Pedobiologia*, **56**: 1–7.
- Elbert, W., Weber, B., Büdel, B., Andreae, M.O. & Pöschl, U. (2009). Microbiotic crusts on soil, rock and plants: neglected major players in the global cycles of carbon and nitrogen? *Biogeosciences Discussions*, **6**: 6983–7015.
- Elster, J., Degma, P., Kováčik, L., Valentová, L., Šramková, K. & Batista Pereira, A. (2008). Freezing and desiccation injury resistance in the filamentous green alga *Klebsormidium* from the Antarctic, Arctic and Slovakia. *Biologia*, **63**.
- Ettl, H. & Gärtner, G. (1995). *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*. Spektrum Akademischer Verlag, Munich.
- Ettl, H. & Gärtner, G. (2013). *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*. 2nd ed. Spektrum Akademischer Verlag, Munich.
- Evans, R.D. & Johansen, J.R. (1999). Microbiotic crusts and ecosystem processes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **18**: 183–225.
- Fischer, M., Bossdorf, O., Gockel, S., Hänsel, F., Hemp, A., Hessenmöller, D. et al. (2010). Implementing large-scale and long-term functional biodiversity research: The Biodiversity Exploratories. *Basic and Applied Ecology*, **11**: 473–485.
- Freystein, K., Salisch, M. & Reisser, W. (2008). Algal biofilms on tree bark to monitor airborne pollutants. *Biologia*, **63**: 866–872.
- Glaser, K., Kuppardt, A., Boenigk, J., Harms, H., Fetzer, I. & Chatzinotas, A. (2015). The influence of environmental factors on protistan microorganisms in grassland soils along a land-use gradient. *Science of the Total Environment*, **537**: 33–42.
- Herold, N., Schöning, I., Gutknecht, J., Alt, F., Boch, S., Müller, J. et al. (2014). Soil property and management effects on grassland microbial communities across a latitudinal gradient in Germany. *Applied Soil Ecology*, **73**: 41–50.
- Hoffmann, L. (1989). Algae of terrestrial habitats. *Botanical Review*, **55**: 77–105.
- Holzinger, A. & Karsten, U. (2013). Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, **4**: 327.
- Kaplan, F., Lewis, L.A., Wastian, J. & Holzinger, A. (2012). Plasmolysis effects and osmotic potential of two phylogenetically distinct alpine strains of *Klebsormidium* (Streptophyta). *Protoplasma*, **249**: 789–804.
- Karsten, U. & Holzinger, A. (2012). Light, temperature, and desiccation effects on photosynthetic activity, and drought-induced ultrastructural changes in the green alga *Klebsormidium dissectum* (Streptophyta) from a high alpine soil crust. *Microbial Ecology*, **63**: 51–63.
- Karsten, U. & Holzinger, A. (2014). Green algae in alpine biological soil crust communities: acclimation strategies against ultraviolet radiation and dehydration. *Biodiversity and Conservation*, **23**: 1845–1858.
- Karsten, U., Lütz, C. & Holzinger, A. (2010). Ecophysiological performance of the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Charophyceae, Streptophyta) isolated from an alpine soil crust with an emphasis on desiccation stress. *Journal of Phycology*, **46**: 1187–1197.
- Karsten, U., Herburger, K. & Holzinger, A. (2016). Living in biological soil crust communities of African deserts – physiological traits of green algal *Klebsormidium* species (Streptophyta) to cope with desiccation, light and temperature gradients. *Journal of Plant Physiology*, **194**: 2–12.
- Kitzing, C. & Karsten, U. (2015). Effects of UV radiation on optimum quantum yield and sunscreen contents in members of the genera *Interfilum*, *Klebsormidium*, *Hormidiella* and *Entransia* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *European Journal of Phycology*, **50**: 279–287.
- Kitzing, C., Pröschold, T. & Karsten, U. (2014). UV-induced effects on growth, photosynthetic performance and sunscreen contents in different populations of the green alga *Klebsormidium fluitans* (Streptophyta) from alpine soil crusts. *Microbial Ecology*, **67**: 327–340.
- Kostikov, I.Y., Romanenko, P.O., Demchenko, E.M., Darienko, T.M., Mikhailyuk, T.I., Rybchynskiy, O.V. & Solonenko, A.M. (2001). Gruntovi vodorosti Ukrainy (istoria, metody doslidzhennya, systema, konspekt flory) [The soil algae of Ukraine (history and methods of investigations, system, list of taxa)]. *Phitosotsiotsentr, Kiev*, 300 pp.
- Lewis, L.A. (2007). Chlorophyta on land: independent lineages of green eukaryotes from arid lands. In *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments* (Seckbach, J., editor). Springer Netherlands, Dordrecht.
- Lokhorst, G.M. (1996). *Comparative Taxonomic Studies on the Genus Klebsormidium (Charophyceae) in Europe*. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Lukešová, A. (2001). Soil algae in brown coal and lignite post-mining areas in Central Europe (Czech Republic and Germany). *Restoration Ecology*, **9**: 341–350.
- Marin, B., Klingberg, M. & Melkonian, M. (1998). Phylogenetic relationships among the Cryptophyta: analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences support the monophyly of extant plastid-containing lineages. *Protist*, **149**: 265–276.
- Marin, B., Palm, A., Klingberg, M. & Melkonian, M. (2003). Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist*, **154**: 99–145.
- Mikhailyuk, T. (2008). Terrestrial lithophilic algae in a granite canyon of the Teteriv River (Ukraine). *Biologia*, **63**: 824–830.
- Mikhailyuk, T., Kondratyuk, S.Y., Nyporko, S.O., Darienko, T.M. & Demchenko, E.M. (2011). Lyshainyky, mokhapodibni ta nazemni vodorosti

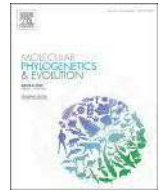
- granitnykh kanyoniv Ukrainy [Lichens, mosses and terrestrial algae from granite canyons of Ukraine]. *Alterpres, Kiev*, 398 pp.
- Mikhailyuk, T., Glaser, K., Holzinger, A. & Karsten, U. (2015). Biodiversity of *Klebsormidium* (Streptophyta) from alpine biological soil crusts (Alps, Tyrol, Austria, and Italy). *Journal of Phycology*, **51**: 750–767.
- Nacke, H., Thürmer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N. et al. (2011). Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. *PLoS ONE*, **6**: e17000.
- Neustupa, J. & Škaloud, P. (2010). Diversity of subaerial algae and cyanobacteria growing on bark and wood in the lowland tropical forests of Singapore. *Plant Ecology and Evolution*, **143**: 51–62.
- Novis, P., & Visnovsky, G. (2011). Novel alpine algae for New Zealand: Klebsormidiales. *New Zealand Journal of Botany*, **49**: 339–349.
- Printz, H. (1964). Die Chaetophorales der Binnengewässer. *Hydrobiologia*, **24**: 1–376.
- R Development Core Team (2009). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org/>.
- Rindi, F. & Guiry, M.D. (2004). Composition and spatial variability of terrestrial algal assemblages occurring at the bases of urban walls in Europe. *Phycologia*, **43**: 225–235.
- Rindi, F., Guiry, M.D. & López-Bautista, J.M. (2008). Distribution, morphology, and phylogeny of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in urban environments in Europe. *Journal of Phycology*, **44**: 1529–1540.
- Rindi, F., Mikhailyuk, T.I., Sluiman, H.J., Friedl, T. & López-Bautista, J.M. (2011). Phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **58**: 218–231.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**: 1572–1574.
- Ryšánek, D., Hřčková, K. & Škaloud, P. (2014). Global ubiquity and local endemism of free-living terrestrial protists: phylogeographic assessment of the streptophyte alga *Klebsormidium*: global biogeography of a terrestrial protist. *Environmental Microbiology*, **17**: 689–698.
- Ryšánek, D., Elster, J., Kováčik, L. & Škaloud, P. (2016a). Diversity and dispersal capacities of a terrestrial algal genus *Klebsormidium* (Streptophyta) in polar regions. *FEMS Microbiology Ecology*, **92**: fnw039.
- Ryšánek, D., Holzinger, A., & Škaloud, P. (2016b). Influence of substrate and pH on the diversity of the aeroterrestrial alga *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Streptophyta): a potentially important factor for sympatric speciation. *Phycologia*, **55**: 347–358.
- Sahu, N. & Tangutur, A.D. (2015). Airborne algae: overview of the current status and its implications on the environment. *Aerobiologia*, **31**: 89–97.
- Sala, O.E., Stuart Chapin, F., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R. et al. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, **287**: 1770–1774.
- Schulz, K., Mikhailyuk, T., Dreßler, M., Leinweber, P. & Karsten, U. (2016). Biological soil crusts from coastal dunes at the Baltic Sea: cyanobacterial and algal biodiversity and related soil properties. *Microbial Ecology*, **71**: 178–193.
- Sharma, N.K., Rai, A.K., Singh, S. & Brown, R.M. (2007). Airborne algae: their present status and relevance. *Journal of Phycology*, **43**: 615–627.
- Silva, P., Mattox, K.R. & Blackwell, W.H. (1972). The generic name *Hormidium* as applied to green algae. *Taxon*, **21**: 639–645.
- Škaloud, P. (2006). Variation and taxonomic significance of some morphological features in European strains of *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Nova Hedwigia*, **83**: 533–550.
- Škaloud, P. & Rindi, F. (2013). Ecological differentiation of cryptic species within an asexual protist morphospecies: a case study of filamentous green alga *Klebsormidium* (Streptophyta). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **60**: 350–362.
- Škaloud, P., Lukešová, A., Malavasi, V., Ryšánek, D., Hřčková, K. & Rindi, F. (2014). Molecular evidence for the polyphyletic origin of low pH adaptation in the genus *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Plant Ecology and Evolution*, **147**: 333–345.
- Sluiman, H.J., Guihal, C. & Mudimu, O. (2008). Assessing phylogenetic affinities and species delimitations in Klebsormidiales (Streptophyta): nuclear-encoded rDNA phylogenies and ITS secondary structure models in *Klebsormidium*, *Hormidiella*, and *Entransia*. *Journal of Phycology*, **44**: 183–195.
- Starr, R.C. & Zeikus, J.A. (1993). UTEX the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *Journal of Phycology*, **29** (Suppl.): 1–106.
- Stempfhuber, B., Welzl, G., Wubet, T., Schöning, I., Marhan, S., Buscot, F. et al. (2014). Drivers for ammonia-oxidation along a land-use gradient in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **69**: 179–186.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**: 2725–2729.
- Vinogradova, O.N. & Mikhailyuk, T.I. (2009). Algal flora of the caves and grottoes of the National Nature Park “Podilsky Tovtry” (Ukraine). *International Journal on Algae*, **11**: 289–304.
- Wei, W., Yu, Y. & Chen, L. (2015). Response of surface soil hydrology to the micro-pattern of bio-crust in a dry-land Loess environment, China. *PLoS ONE*, **10**: e0133565.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, **31**: 3406–3415.

**2.2.3. Звичайна водорість з незвичайних місцезростань: різноманіття
Klebsormidium з філогенетичної суперклади G**



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Phylogenetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ympev

Usual alga from unusual habitats: Biodiversity of *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) from the phylogenetic superclade G isolated from biological soil crusts

Elena Samolov^{a,*}, Tatiana Mikhailyuk^{a,b,e}, Alena Lukešová^c, Karin Glaser^a, Burkhard Büdel^d, Ulf Karsten^a

^a Applied Ecology and Phycology, Institute of Biological Sciences, University of Rostock, Albert-Einstein-Strasse 3, D-18059 Rostock, Germany

^b M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereshchenkivska Str. 2, Kyiv 01004, Ukraine

^c Institute of Soil Biology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, v.v.i., Na Sádkách 7, České Budějovice CZ-37005, Czech Republic

^d Plant Ecology and Systematics, Department of Biology, University of Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Str. Bau 13, D-67663 Kaiserslautern, Germany

^e Department of Botany, Functional Plant Biology, University of Innsbruck, Sternwartestrasse 15, A-6020 Innsbruck, Austria

ARTICLE INFO

Keywords:

Klebsormidium

Streptophyta

Phylogenetic superclade G

New species

New varieties

Unusual habitats

Southern hemisphere

Integrative approach

ABSTRACT

Seven new species and two varieties of *Klebsormidium* were described using an integrative approach on the base of 28 strains from the poorly studied phylogenetic superclade G. These strains originated from the unusual and exotic habitats (semi-deserts, semi-arid shrublands, Mediterranean shrub and deciduous vegetation, temperate *Araucaria* forests, peat bogs, dumps after coal mining, maritime sand dunes etc.) of four continents (Africa, South and North America, and Europe). Molecular phylogenies based on ITS-1,2, *rbcL* gene and concatenated dataset of ITS-1,2-*rbcL*, secondary structure of ITS-2, morphology, ecology and biogeography, micrographs and drawings of the investigated strains were assessed. Additionally, phylogeny and morphology of 18 *Klebsormidium* strains from other lineages isolated from the same localities (different vegetation types of Chile and maritime sand dunes of Germany) were investigated for the comparison with representatives of clade G. Clade G *Klebsormidium* is characterized by distant phylogenetic position from the other *Klebsormidium* lineages and prominent morphology: four-lobed chloroplasts and mostly short swollen cells in young culture, compact small pyrenoids, curved or disintegrated filaments, unusual elongation of cells in old culture, formation of specific cluster- and knot-like colonies on agar surface, especially prominent in strains isolated from desert regions, from which the group probably originated. Comparison of *Klebsormidium* diversity from different biogeographic regions showed that the representatives of clade G are common algae in regions of the southern hemisphere (South Africa and Chile) and rare representatives in terrestrial ecosystems of the northern hemisphere. Further investigation of mostly unstudied territories of the southern hemisphere could bring many surprises and discoveries, leading to a change of the present concept that *Klebsormidium* is cosmopolitan in distribution.

1. Introduction

Klebsormidium Silva, Mattox et Blackwell (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) is a cosmopolitan, widely distributed filamentous green alga which inhabits extremely diverse terrestrial and fresh-water habitats (Hoffmann, 1989; Lokhorst, 1996; Rindi et al., 2008, 2011; Škaloud et al., 2014; Mikhailyuk et al., 2015; Ryšánek et al., 2015; Büdel et al., 2016). Representatives of this genus are known since the 19th century when they were discovered and described as *Hormidium* Kützing (Kützing, 1843). Since then this algae were intensively

investigated by generations of scientists (Kützing, 1845; 1849; Klebs, 1896; Mattox, 1968; Fott, 1960; Silva et al., 1972 and others). The knowledge about *Klebsormidium* was increased by numerous new facts about morphology, diversity, phylogeny, ultrastructure, ecology, physiology, biogeography etc. (Stewart & Mattox, 1975; Lokhorst, Starr, 1985; Turmel et al., 2002; Mattox, Stewart, 1984; Lokhorst, 1996; Sluiman et al., 2008; Karsten et al., 2010; 2013; Holzinger et al., 2011; Kitzing et al., 2014; Mikhailyuk et al., 2014; Donner et al., 2017 and references therein). *Klebsormidium* is one of the most well-known, recognizable and ubiquitous alga in the world (Lokhorst, 1996; Rindi

* Corresponding author at: Applied Ecology and Phycology, Institute of Biological Sciences, University of Rostock, Albert-Einstein-Strasse 3, D-18059 Rostock, Germany.

E-mail address: elena.samolov@uni-rostock.de (E. Samolov).

<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.12.018>

Received 19 June 2018; Received in revised form 10 December 2018; Accepted 13 December 2018

Available online 18 December 2018

1055-7903/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

et al., 2011; Škaloud & Rindi, 2013). The interest for this taxon is constantly increasing because of its phylogenetic position as a basal lineage of the Streptophyta (Kranz et al., 1995; Turmel et al., 2002; Sluiman et al., 2008; Hori et al., 2014) and its importance for the understanding of the origin of higher plants and evolutionary tendencies within the Streptophyta, but also because of its wide distribution and vital ecological role in terrestrial ecosystems. *Klebsormidium* can develop in high biomass on soil as well as on different natural and artificial substrates in aeroterrestrial conditions (Hoffmann, 1989; Rindi et al., 2009; Büdel et al., 2016; Ettl & Gärtner, 2014). It contributes to the formation of biological soil crusts and aeroterrestrial biofilms, which provide refuge for other algae creating micro-ecosystems. These micro-ecosystems play a key role in overgrowing of barren substrates, formation and stabilization of soils, and improvement of soil characters such as fertility and soil hydrology (Belnap & Lange, 2001; Weber et al., 2016).

Despite long period of investigation and considerable amount of accumulated data, taxonomy of this genus is still, at least partly, unresolved. Several modern studies were devoted to the phylogeny, epitypification and genetic diversity of *Klebsormidium* (Rindi et al., 2011, 2017; Škaloud & Rindi, 2013; Škaloud et al., 2014; Mikhailuyuk et al., 2015; Ryšánek et al., 2015, 2016). Major problems concerning *Klebsormidium* taxonomy are related to the uniform morphology and absence of clear morphological characters to divide separate lineages, followed by a considerable morphological plasticity and morphological parallelism inside the genus (Rindi et al., 2011). *Klebsormidium* includes 6 main phylogenetic lineages (superclades B, C, D, E, F and G) which are inseparable from the genus *Interfilum* Chodat (superclade A), with which the relationship is still undefined (Mikhailuyuk, 2008; Rindi et al., 2011). The genus *Klebsormidium* includes at least 20 species (Guiry & Guiry, 2018), though it might be more diverse according to the modern molecular phylogenetic data (Škaloud & Rindi, 2013; Ryšánek et al., 2015). One of the most sampled, diverse and widely distributed *Klebsormidium* clades in nature is superclade E, which is characterized by the highest level of morphological variability and plasticity (Škaloud & Rindi, 2013; Ryšánek et al., 2015). The superclade E is also the most uniform and homogenous according to the ITS phylogeny (Rindi et al., 2011; Škaloud & Rindi, 2013). Different terrestrial habitats are characterized by various *Klebsormidium* lineages (Ryšánek et al., 2015; Mikhailuyuk et al., 2015). These studies reflect that the distribution of clade members follows the model of moderate endemicity, which considers that both ecological factors and geography determine its distribution (Ryšánek et al., 2015, 2016; Van der Gast, 2014).

Despite numerous data about *Klebsormidium* our knowledge is based mainly on the material collected within Europe, except some sporadic investigations in North America, Asia, Australia and the Polar Regions (Wei, 1984; Wagner & Zaneveld, 1988; Novis, 2006; Ryšánek et al., 2015). The first study of *Klebsormidium* from the southern hemisphere, based on molecular phylogenetic data, was within the long-term project BIOTA Southern Africa devoted to the biodiversity along 2000-km-long transect (see www.biota-africa.org; Büdel et al., 2009, 2010). A unique phylogenetic lineage of *Klebsormidium*, named as superclade G, was discovered from biological soil crusts of the Namib dryland region (Rindi et al., 2011). The uniqueness of this lineage was in its considerable genetic distance from the other *Klebsormidium* lineages, uncommonness of the exotic habitat and locality (biological soil crusts of arid and semi-arid regions of South Africa) as well as a significant morphological peculiarity of the strains (Rindi et al., 2011; Mikhailuyuk et al., 2013). Hypothesis regarding biogeographic differentiation within the genus and the possibility of finding new endemic lineages in future appeared after the discovery of clade G (Rindi et al., 2011). But in later investigations clade G was complemented by few strains isolated from European habitats (Škaloud et al., 2014). These findings implied that real geographical barriers for the distribution of some *Klebsormidium* representatives are absent, therefore its diversity within specific habitats could be driven by ecological preferences rather than by

biogeography (Ryšánek et al., 2015).

Recent investigations of biological soil crusts from different climate zones in Chile (South America) (Fiore-Donno et al., 2018) allowed us to isolate several new *Klebsormidium* strains which also belong to the clade G. The available collection of clade G *Klebsormidium* is based on the South American cultures, strains from South Africa, complemented by several isolates from terrestrial habitats of Europe and North America. The number of cultures (28 strains), and variability of habitats and localities (four continents within both southern and northern hemispheres) are sufficient for in-depth phylogenetic investigation of this group. As mentioned before members of clade G are representatives of the new taxa of *Klebsormidium* since they were found in unstudied and often uncommon habitats. This statement is reasonable for European strains as well, as they were isolated from swamped soils and dumps after coal mining characterized by very low pH, and from maritime sand dunes. All strains of clade G *Klebsormidium* are characterized by unique morphological characters which are not typical for other described *Klebsormidium* taxa (Rindi et al., 2011; Mikhailuyuk et al., 2013). Therefore it allows us to present descriptions of several new species within *Klebsormidium* clade G, with potential ecological and biogeographic preferences.

2. Methods

2.1. Study areas, sampling and strains

For the present study 46 unialgal cultures of *Klebsormidium* were isolated from different terrestrial habitats worldwide, of which 28 strains belong to the phylogenetic clade G (see below) and represent main focus of our study. The strains were isolated from unusual habitats: biological soil crusts from semi-deserts (South Africa) and semi-arid shrublands (Chile, South America), Mediterranean shrub (South Africa) and deciduous vegetation (Chile), *Araucaria* forests (Chile), maritime sand dunes under sparse pine forest (Germany, Europe), re-cultivated dumps after coal mining (USA, North America; Czech Republic, Germany, Europe) and peat bogs under spruce forest (Czech Republic). African strains were previously isolated during the project BIOTA Southern Africa (Büdel et al., 2009, 2010), all other strains were established more recently in the frame of different projects (see Acknowledgements; Lukešová (2001).)

The other 18 non-G clade *Klebsormidium* strains were used for comparison with the G-clade material in focus. These strains were isolated from biological soil crusts from Chile (8 strains) and sand dunes along the Baltic Sea coast of Germany (10 strains). The information on studied strains, study areas and habitats are provided in Table 1 and Suppl. Table S1; images of study areas are presented in Fig. 1.

Sampling procedure, cultivation conditions and isolation of strains were described in detail in previous papers (Büdel et al., 2009; Schulz et al., 2016; Lukešová, 2001). The majority of strains is kept in the culture collection at the University of Rostock, proposed authentic strains of new taxa (see below) were deposited in the Culture collection of soil algae and cyanobacteria of the Institute of Soil Biology, a member of BCCO (Biology Centre Collection of Organisms), České Budějovice, Czech Republic). Authentic strains were permanently cryopreserved in metabolically inactive state and stored as holotypes. Herbaria of these strains (made from material maintained in liquid culture, in age 2–3 weeks) were deposited in Algotheca of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine (AKW-M49 – AKW-M57) and used as isotypes.

2.2. Culture conditions, light microscopy

The strains were maintained on solid medium (1.5% agar with 3 N BBM and vitamins) (Starr & Zeikus, 1993) at 20 °C with 25 μmol photons·m⁻²·s⁻¹ (Osram Lumilux Cool White lamps L36W/840) under a light/dark cycle of 12:12 h L:D. Morphological examination of unialgal

Table 1
Details on sampling sites where the strains of G-clade *Klebsormidium* examined in the present study were collected.

Strain, culture number ¹	Species	Location	Vegetation	Soil type, pH	Mean annual precipitation	Site description	Collection information, isolator
Biota 14614.18.18	<i>K. africanum</i>	South Africa, Grootdrem BIOTA observatory S21	Biome = Succulent Karoo, semi-desert	Ferralic, Aridic Arenosol Hyposalic, pH less 8	50 mm, winter rainfalls	Patchy vascular plant vegetation formed by shrubs and succulents, dark colored cyanobacteria-dominated biological soil crusts, with a coverage of up to 35%. 193 m a.s.l.	28°36'44.42"S, 16°39'15.59"E Stephanie Dojani
Biota 14614.18.24	<i>K. karooense</i>						
Biota 14615.5a	<i>K. deserticola</i>	South Africa, Koeroegap Vlakte BIOTA observatory S18	Biome = Succulent Karoo, semi-desert	Hypersalic Duric Solonchak (ochric), pH 8	70-80 mm, summer rainfalls	Vascular plant vegetation patchy, dominant plant families <i>Aizoaceae</i> , <i>Asteraceae</i> , <i>Poaceae</i> ; dark colored cyanobacterial crusts, dominant on the surface. 635 m a.s.l.	28°13'35.92"S, 17°01'32.40" E Stephanie Dojani
Biota 14613.5e		South Africa, Kuboes	Biome = Succulent Karoo, semi-desert	Sandy soil	60 mm, winter rainfalls	Patchy vegetation cover, vegetation-free patches sometimes covered by a pavement of quartz gravel, bearing hypolithic cyanobacteria, green algae, mosses and lichens. 200 m a.s.l.	28°25'60.00"S, 16°58'60.00"E Stephanie Dojani
Biota 14614.7		South Africa, Grootdrem BIOTA observatory S21	Biome = Succulent Karoo, semi-desert	Ferralic Aridic Arenosol Hyposalic, pH less 8	50 mm, winter rainfalls	Patchy vascular plant vegetation formed by shrubs and succulents. Dark colored cyanobacteria-dominated biological soil crusts, with a coverage of up to 35%. 193 m a.s.l.	28°36'44.42"S, 16°39'15.59"E Stephanie Dojani
Biota 14614.2							
SG03-7.2		South America, Chile, Santa Gracia Natural Reserve	Semi-arid shrubland vegetation	Sandy soil, pH 6.7	83.4 mm	Shrub vegetation with open patches, heavily disturbed by goat and cattle trampling. Dark cyanobacterial crust dominated by <i>Microcoleus vaginatus</i>	29°45'25.40"S, 71°10'01.90"W Elena Samolov
Biota 14621.10.21	<i>K. vermiculatum</i>	South Africa, Roscherpan Nature Reserve BIOTA observatory S29	Biome = Fynbos (specific African Mediterranean type of vegetation with hard-leaved shrubs, own floristic province)	-	250 mm, winter rainfalls	Shrub vegetation with few bare patches in-between. Dominant plant families are <i>Asteraceae</i> , <i>Restionaceae</i> , <i>Anacardiaceae</i> . Dark colored cyanobacterial crusts, dominant on the surface, along dripping zone of shrubs. 35 m a.s.l.	32°36'03.05"S, 18°18'20.16"E Stephanie Dojani
Biota 14621.10.44							
Biota 14621.10.47							
Biota 14621.6							
Biota 14621.10.26							
LC006-44	<i>K. chilense</i>	South America, Chile, La Campana National Park	Deciduous mediterranean vegetation, shrubs, "Honey - palm" trees <i>Jubaea chilensis</i>	pH 5.5	314.5 mm	Vascular plant vegetation, dominant plant families <i>Poaceae</i> spp. Light colored crust dominated by green algae	32°57'16.46"S, 71°04'15.19"W Elena Samolov
LC006-25							
LC006-28							
NH-18.1	<i>K. sylvaticum</i>	South America, Chile, Nahuelbuta National Park	<i>Araucaria</i> temperate forest	pH 5.4	934.3 mm	Light colored crust dominated by green algae	37°47'30.30"S, 73°00'08.24"W Elena Samolov
NV-14							
NV-16							
Z-7-3		Europe, Germany, Bad Prerow	Baltic Sea coast, maritime sand dunes under sparse pine forest	Quartz sand, pH 5.8	500-600 mm	Dark colored crust dominated by moss Crust formed by green algae, dominated by <i>Klebsormidium</i> cf. <i>flaccidum</i>	54°27'10.27"N, 12°33'48.37"E Tatiana Mikhailiyuk

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Strain, culture number ¹	Species	Location	Vegetation	Soil type, pH	Mean annual precipitation	Site description	Collection information, isolator
Luk-318	<i>K. delicatum</i>	Europe, Czech Republic, Sokolov mining district	Dumps after coal mining	Sandy substrate, pH 3.8	600–700 mm	Initial crust dominated by different <i>Klebsormidium</i> species on bare soil surface without vegetation, about 430 m a.s.l.	50°14'12.78"N, 12°41'42.77"E Alena Lukešová
Luk S66		Europe, Germany, Weissagker Berg, near Cottbus	Lusatian lignite mining area, dumps after coal mining, 2 years after recultivation	Tertiary carboniferous and pyritic sand, ameliorated with fly ash and mineral fertilizers, pH 2.9	565.7 mm	Crust dominated by different <i>Klebsormidium</i> species. 72 m a.s.l.	51°46'53.19"N, 14°26'30.68"E Alena Lukešová
Luk-68 Luk S12		Europe, Czech Republic, Slavkovský les	Peat bog Krásno under spruce forest, meliorated area	Peat soil, pH 4.0	> 900 mm	Peat with dense cover, dominated by <i>Calluna vulgaris</i> ; thick litter layer. 775 m a.s.l.	50°60'30.85"N, 12°45'37.47"E Alena Lukešová
Luk-70	<i>K. delicatum</i> var. <i>americanum</i>	North America, USA, Wyoming, Bell Ayr Mine	Dump after coal mining 4 years after recultivation by top soil and seeding of local grass mixture (climax shortgrass prairie dominated by sagebrush)	Loam, pH 7.2	380 mm	Bare soil between plants <i>Pascopyrum smithii</i> , <i>Nassella viridula</i> , <i>Hesperostipa comata</i> , sagebrush. 1378 m a.s.l.	44°05'24.4"N, 105°22'06.3"W Alena Lukešová
NH-216		South America, Chile, Nahuelbuta National Park	<i>Araucaria</i> temperate forest	pH 5.4	934.3 mm	Dark colored crust dominated by moss	37°47'30.30"S, 73°00'08.24"W Elena Samolov
4SG-1 4SG-6 SG03-12.2	<i>K. delicatum</i> var. <i>deserticum</i>	South America, Chile, Santa Gracia Natural Reserve	Semi-arid shrubland vegetation	Sandy soil, pH 6.7	83.4 mm	Shrub vegetation with open patches, heavily disturbed by goat and cattle trampling. Dark cyanobacterial crust dominated by <i>Microcoleus vaginatus</i>	29°45'28.58"S, 71°09'58.24"W Elena Samolov 29°45'25.40"S, 71°10'1.90"W Elena Samolov

¹ Proposed authentic strains of the new taxa are marked with bold.



Fig. 1. General view on localities from which strains of clade G *Klebsormidium* were isolated. (A) South Africa, Northern Cape Koerogab Vlake, Biota Observatory S18. (B) South Africa, Kuboes, fairy circles and biological soil crusts patches. (C) South Africa, Cape Peninsula, Roscherpan Biota Observatory S29, dark patches of biological soil crusts. (D) Chile, Santa Gracia Natural Reserve, semi-arid shrubland vegetation. (E) Chile, La Campana National Park, vegetation with participation of *Jubaea chilensis*. (F) Chile, Nahuelbuta National Park, *Araucaria* forest; (G) Germany, Bad Prerow, Baltic sea coast, maritime sand dunes under sparse pine forest. (H) USA, Wyoming, dump after coal mining, 4 years after recultivation, shortgrass prairie dominated by sagebrush. (I) Czech Republic, Sokolov mining district, dumps after coal mining, soil crust dominated by different *Klebsormidium* species on bare soil surface.

cultures was performed using a stereoscopic microscope Olympus SZX16 and Olympus BX51 light microscope with Nomarski DIC optics. Photomicrographs were taken with digital cameras Olympus DP26 and Olympus UC30 attached to the microscopes and processed by the Olympus cellSens Entry software. Cultures were examined in young stage (2–3 weeks-old) and in old stage (3 months and more). Zoospore formation was induced by transferring the cultures into liquid BBM without nitrogen – 0 N BBM and keeping them under dark conditions for several days, as well as by transferring culture to a 1% glucose solution and keeping them in darkness at a temperature of about 10 °C, as

suggested in other investigations (Lokhorst, 1996; Škaloud & Rindi, 2013; Rindi et al., 2017).

Some of our data obtained during previous projects and published in Rindi et al. (2011) were used for morphological comparison of investigated clade G strains with other *Klebsormidium* lineages. Morphological data used are summarized in Suppl. Table S2.

2.3. DNA isolation, PCR and sequencing

Genomic DNA of investigated strains was extracted using the

DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences of the ITS-1–5.8S rRNA–ITS-2 region were amplified using a set of Taq PCR Mastermix Kit (Qiagen GmbH), algal-specific primer G730F (T. Pröschold, personal communication), and standard primer ITS055R (Marin et al., 1998). Nucleotide sequences of partial *rbcl* gene were obtained using specific primers for Klebsormidiophyceae *rbcl*-KF2, *rbcl*-KR2, and KF590 (Škaloud & Rindi, 2013; Ryšánek et al., 2015). The PCR were made using conditions published in Mikhailuyk et al. (2018) and Škaloud & Rindi (2013). PCR products were cleaned with the Qiagen PCR purification kit (Qiagen GmbH) according to the manufacturer's instructions. Cleaned PCR products were sequenced commercially by Qiagen Company using primers 1400F, GF, ITS2F, and ITS05R (Marin et al., 1998; 2003; Pröschold et al., 2005) for ribosomal operon and *rbcl*-KF2, *rbcl*-KR2, and KF590 for *rbcl* gene. The resulting sequences were assembled and edited using Geneious software (version 8.1.8; Biomatters). They were deposited at GenBank under the accession numbers MH971175–MH971211 and MH986616–MH986646.

2.4. Phylogenetic analyses

89 sequences of *Klebsormidium* and *Interfilum* strains were used for comparison with strains of clade G *Klebsormidium*. These sequences were published by Sluiman et al. (2008), Rindi et al. (2008, 2011), Škaloud & Rindi (2013), and Mikhailuyk et al. (2019). Multiple alignments of the nucleotide sequences of the ITS-1,2 as well as *rbcl* were made using Mafft web server (version 7, Katoh & Standley, 2013) followed by manually editing in the program BioEdit (version 7.2). The evolutionary model that was best suited to the used database was selected on the basis of the lowest AIC value (Akaike, 1974) and calculated in the program MEGA (version 6, Tamura et al., 2013). The unrooted phylogenetic trees were constructed in the program MrBayes 3.2.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), using an evolutionary model GTR + G + I, with 5,000,000 generations. Two out of the four runs of Markov chain Monte Carlo were made simultaneously, with the trees, taken every 500 generations. Split frequencies between runs at the end of calculations were below 0.01. The trees selected before the reached saturation likelihood rate were subsequently rejected. The reliability of tree topology verified by the maximum likelihood analysis (ML, GTR + I + G) were made using the program GARLI 2.0 (Zwickl, 2006), and bootstrap support was calculated with 1000 replicates.

2.5. Analysis of the ITS-2 secondary structure, p-distance

The models of the secondary structure of ITS-2 region together with 5.8S–LSU rRNA stem were predicted for the investigated strains of clade G using the model of authentic strains of *K. fluitans* (Gay) Lokhorst (SAG 9.96) proposed by Kitzing et al. (2014). Helices were folded with the online software mfold (Zuker, 2003) and visualized in the online tool PseudoViewer (Byun & Han, 2009). Compensatory base changes (CBCs), base-pair indels (mismatches, deletions, single or unpaired bases), were estimated for the helices I–III as the most conservative part of ITS-2 (Demchenko et al., 2012).

Genetic distances between *Klebsormidium* clade G and E, and among strains of clade G were calculated in the program MEGA using p-distance and uniform rates.

3. Results

3.1. Molecular phylogeny based on ITS-1, 2 and *rbcl* gene, identification

The phylogenetic analysis of ITS-1,2 revealed that the newly sequenced isolates together with the published sequences of *Klebsormidium* from clade G formed 7 separate lineages (Fig. 2), which corresponded to the described new species (see below). The phylogenetic trees of *rbcl* gene and concatenated dataset of ITS-1,2 – *rbcl*

mostly showed similar topology (Figs. 3 and 4). The main differences of the phylogenies were larger genetic distances between different strains within clade G in ITS-1,2 phylogeny in comparison with *rbcl* phylogeny. Therefore clades sequences of newly described *K. delicatum* Mikhailuyk et Lukešová sp. nov. and *K. deserticola* Mikhailuyk sp. nov. on ITS-1,2 and ITS-1,2 – *rbcl* phylogenetic trees (Figs. 2 and 4) formed subclades which corresponded to new varieties of *K. delicatum* (see below), whereas phylogeny based on *rbcl* gene did not show these subclades (Fig. 3).

Strains isolated from South Africa formed 3 separated lineages inside clade G (new species *K. africanum* Mikhailuyk sp. nov., *K. karooense* Mikhailuyk sp. nov. and *K. vermiculatum* Mikhailuyk sp. nov.) and mixed clade (*K. deserticola*) with a strain from Chile and two strains from deserts of USA (isolated during Biotic Crust Project in arid regions of the southwestern USA (Lunch et al., 2013)) (Figs. 2–4). Other Chilean strains formed one separate lineage (*K. chilense* Mikhailuyk et Samolov sp. nov.), a mixed lineage with a strain from German sand dunes (*K. sylvaticum* Mikhailuyk et Samolov sp. nov.), and a joined lineage formed mainly by European strains, four strains from Chile, and a strain from USA (*K. delicatum*).

We compared genetic distances of *Klebsormidium* within different clades on the base of dataset used in the present paper. All strains within clade E were characterized by higher genetic distances of *rbcl* gene than ITS-1,2 (*rbcl*: 3%; ITS: 1.3%). In contrast, strains of clade G showed opposite situation: higher genetic distances of ITS-1,2 than *rbcl* (*rbcl*: 3.4%; ITS: 4.3%). Genetic distances between different *Klebsormidium* species of clade G, based on both markers, supported the proposal of 7 new species. Two lineages have tendencies to form further subclades, but with a remarkable lower p distance (Table 2).

Several *Klebsormidium* strains from other clades (B–F) were found together with clade G *Klebsormidium* during our investigation of different vegetation communities of Chile (8 strains) and sand dunes of German Baltic Sea coast (10 strains). These strains were examined using ITS-1,2 and *rbcl* gene for comparison with clade G *Klebsormidium* (Suppl. Table S1 and Suppl. Figs. S1–S3). Chilean strains clustered in clade E and were identified as *K. nitens* (Kützing) Lokhorst, *K. fluitans* and *Klebsormidium* sp. German strains were more diverse and distributed among all known clades: 1 strain was placed in clade B (*K. cf. flaccidum* (Kützing) Silva, Mattox & Blackwell), 1 strain was in clade C (*K. flaccidum*), 1 strain was assigned to clade D (*K. elegans* Lokhorst), 3 strains were in clade F (*K. crenulatum* (Kützing) Lokhorst, *K. cf. crenulatum* and *K. mucosum* (Petersen) Lokhorst), and 4 strains were clustered in clade E (*Klebsormidium* sp.).

3.2. Comparison of ITS-2 secondary structures

The secondary structure of ITS-2 of clade G *Klebsormidium* was evaluated together with 5.8S–LSU rRNA stem of all investigated isolates (Fig. 5). Secondary structures of ITS-2 of all strains were identical in 5.8S–LSU rRNA stem. We analyzed helices I–III as the most conservative part of ITS-2, helix IV was extremely variable in all strains. The main differences of ITS-2 secondary structure were localized in helices I and II, helix III is quite conservative with differences in some strains only. Several CBCs and hemi-CBSs as well as deletions of base pairs, mismatches, unpaired or single bases were determined among investigated strains. All data were summarized in the Table 2.

3.3. Morphology and reproduction

All investigated strains of clade G *Klebsormidium* were filamentous algae with strong and long filaments, or easily disintegrated to short filaments which even became unicellular sometimes. Strains with easily disintegrating filaments usually formed smooth or slightly rough colonies. Long filaments of G-clade *Klebsormidium* were strongly curved and associated in aggregates, therefore these strains formed rough cluster-like and knot-like colonies. All investigated clade G

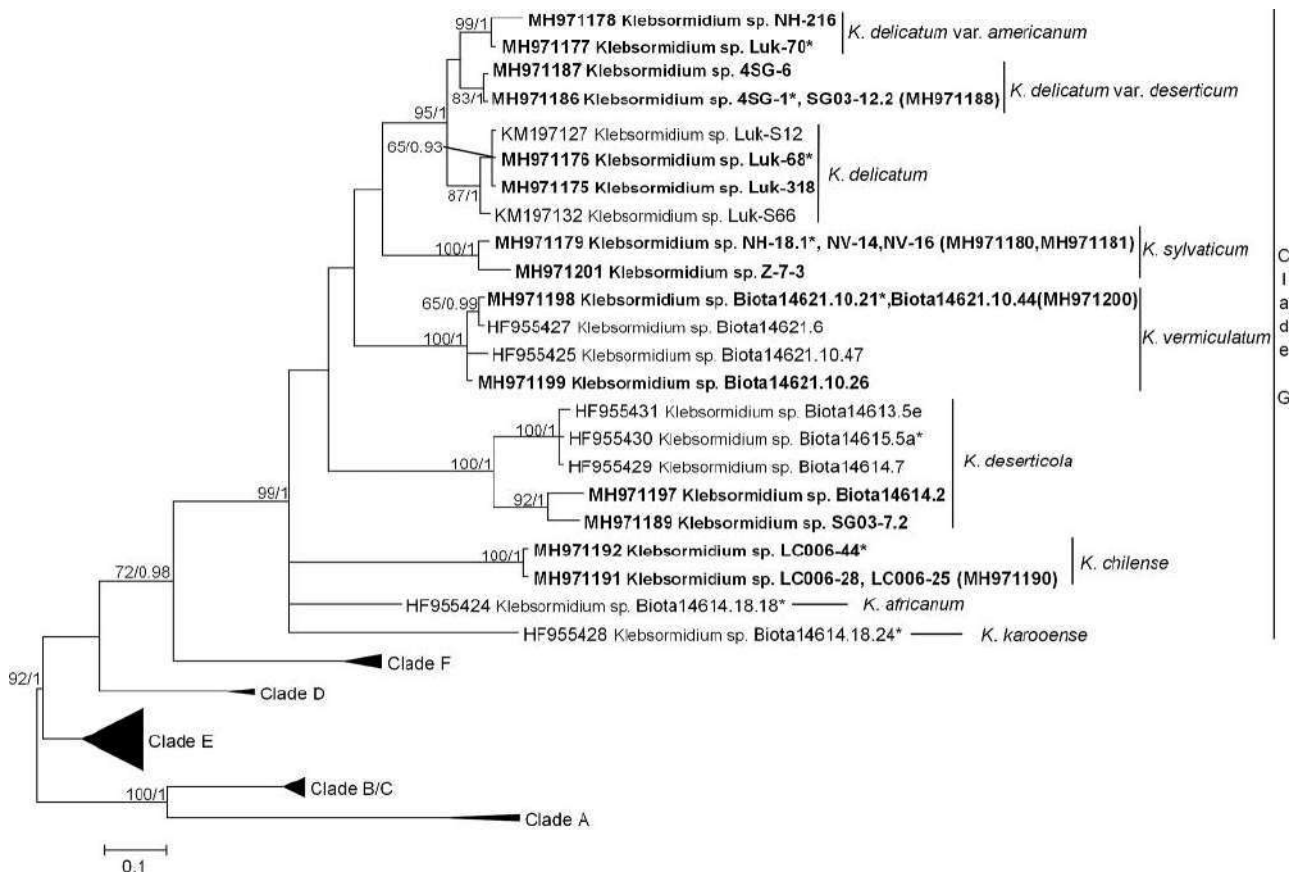


Fig. 2. Molecular phylogeny of *Klebsormidium* and *Interfilum* based on ITS-1,2 sequences. Phylogenetic tree was inferred by Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and maximum likelihood (ML) bootstrap support (BP) indicated at nodes. From left to right, support values correspond to ML BP and Bayesian PP; BP values lower than 50% and PP lower than 0.9 not shown. Strains marked with bold are newly sequenced isolates, with asterisk are proposed authentic strains of newly described taxa. Clade designations follow Rindi et al. (2011).

Klebsormidium strains were characterized by prominent morphology. Young cultures had mostly narrow or short cylindrical swollen cells with dense cell wall and prominent constrictions near cross walls. Old cultures of clade G *Klebsormidium* looked completely different: cells elongated, barrel- or bean-like, often curved or asymmetrical. Strains with easily disintegrating filaments often formed ellipsoid unicells, morphologically similar with cells of *Interfilum*. All investigated *Klebsormidium* strains form clade G had a parietal, plate-shaped chloroplast that occupied half of inner cell surface, with central incision and consequently four lobes, typical for young cultures with actively dividing cells. Chloroplasts in cells after division or in mature and old filaments were usually with waved or smooth margin. Pyrenoids were small, compact, surrounded by several starch grains, oriented in parallel rows. Nucleus was situated in the opposite to the pyrenoid. Big terminal vacuoles were usually observed in old elongated cells. H-like fragments of cell wall were registered for some strains. Mucilage was usually absent or it formed thin layer around some cells. Young cultures of some strains with disintegrated filaments formed very delicate mucilage envelope, which disappeared in adult cultures. Morphological characters of all investigated strains of clade G *Klebsormidium* were presented in Figs. 6–10 and Suppl. Table 3.

Investigated strains of clade G *Klebsormidium* reproduced by vegetative cell division in one plane (sporulation-like type) and fragmentation of filaments. Zoospore formation was induced in all investigated strains, but without positive result.

4. Discussion

4.1. Phylogeny, ITS-2 secondary structure and species delimitation of clade G *Klebsormidium*

Phylogenetic analyses provided in the present study on the base of ITS-1,2, *rbcL* gene and concatenated dataset of ITS-1,2 – *rbcL* sequences showed congruent results, mostly corresponding with the phylogenies of *Klebsormidium* and *Interfilum* published by Rindi et al. (2011), Škaloud & Rindi (2013), Ryšánek et al. (2015), and Škaloud et al. (2014). Clade G forms an independent lineage among other *Klebsormidium* clades with high statistical support. It is quite distant from other clades as it was indicated earlier (Rindi et al., 2011). *Klebsormidium* strains inside clade G were distributed among 7 lineages, all with high statistical support in all our analyses, thus they were proposed as separate species (see below).

Some lineages (described as species *K. delicatum* and *K. deserticola*) form additional subclades clearly visible on ITS-1,2 and ITS-1,2 – *rbcL* phylogenetic trees. But *rbcL* analysis did not support these subclades. It was stated before that the *rbcL* gene is more variable than ITS in *Klebsormidium*, therefore it provides better resolution for the phylogeny and species delimitation inside the genus than the rapidly evolving ITS (Rindi et al., 2011, Ryšánek et al., 2015). Our analyses of clade G *Klebsormidium* showed opposite situation: higher resolution on the base of ITS-1,2 and lower resolution on the base of *rbcL*. This particular character of clade G was already implied on phylogenetic trees published in Rindi et al. (2011), Karsten et al. (2013), Škaloud et al. (2014), and others. Calculated uncorrected p-distance of ITS-1,2 and *rbcL* for

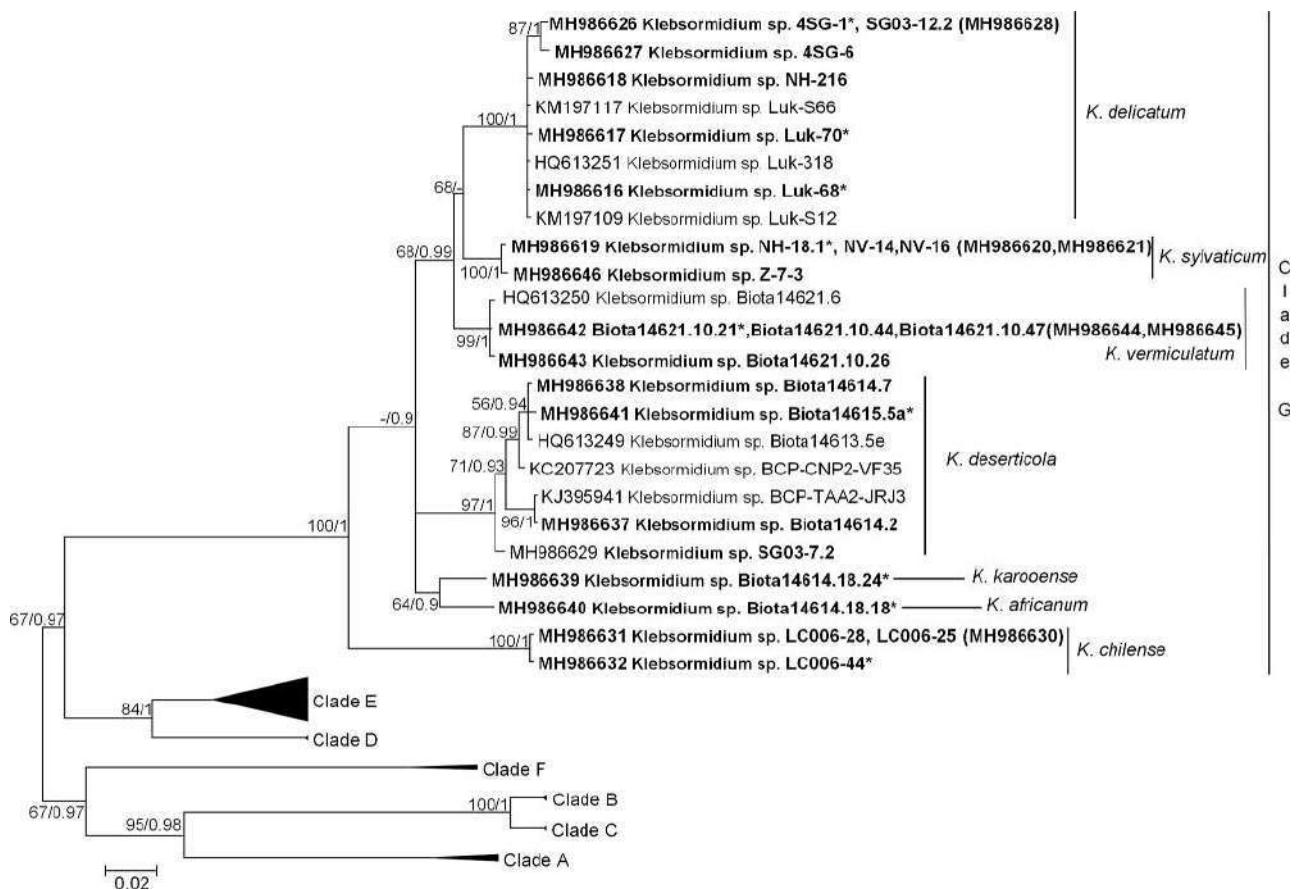


Fig. 3. Molecular phylogeny of *Klebsormidium* and *Interfilum* based on *rbcL* sequences. Phylogenetic tree was inferred by Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and maximum likelihood (ML) bootstrap support (BP) indicated at nodes. From left to right, support values correspond to ML BP and Bayesian PP; BP values lower than 50% and PP lower than 0.9 not shown. Strains marked with bold are newly sequenced isolates, with asterisk are proposed authentic strains of newly described taxa. Clade designations follow Rindi et al. (2011).

different strains of clade G compared to clade E confirmed this result. It is visible that genetic distances of ITS-1,2 among strains of clade E are very low, lower than distances of *rbcL* gene. But strains of clade G are characterized by opposite situation, it seems that ITS-1,2 is more variable in this case than *rbcL*.

To get better resolution we compared ITS-2 secondary structures of all clade G *Klebsormidium* strains using the CBC approach proposed by Coleman (2000, 2009). ITS-2 of all analyzed clade G strains was quite uniform, although some differences (CBCs, hemi-CBCs, mismatches or deletions of base pairs) were found (see Table 2). The differences among group of strains assigned to newly described taxa vary from 2 CBCs to 1 hCBCs. CBC-concept stated that organisms without any CBC in conservative ITS-2 regions do not necessarily belong to the same biological species (Coleman, 2000). Moreover it is known that some lineages of green algae are characterized by low number of CBCs. For example, it was found that CBCs in the ITS-2 were not diagnostic at the species level for some orders of green algae (Chaetophorales, Chaetopeltidales, Oedogoniales etc.) (Caisová et al., 2013). The representatives of Klebsormidiophyceae are also characterized by quite uniform ITS-2 with low amount of CBCs between different lineages (Rindi et al., 2011; Škaloud & Rindi, 2013; Škaloud et al., 2014). For example, no CBCs were found among different clades inside clade E which is characterized by strong ecological differentiation (Škaloud & Rindi, 2013). *rbcL* gene was proposed in these studies as a more suitable marker for species delimitation (Rindi et al., 2011; Škaloud & Rindi, 2013; Ryšánek et al., 2015; Škaloud et al., 2014). *rbcL* analysis provided in the present study showed that all 7 lineages have high statistical support, since this result is completely congruent with ITS-1,2 and

combined ITS-1,2 – *rbcL* phylogenies, we propose the description of 7 new species of *Klebsormidium* (see below).

Subclades of some lineages (corresponded to new species *K. delicatum* and *K. deserticola*) formed on the base of ITS-1,2 phylogeny could also represent separate taxa. We proposed 2 additional varieties of *K. delicatum* which differ by 1 CBC or 1 hCBC (see Table 2). Strong congruence with ecological and morphological characters for these groups support this statement (see below). Nevertheless, we propose to keep the lineage representing *K. deserticola* as one taxon since two subclades differ only by one mismatch in ITS-2 (see Table 2) which does not justify assignment to a separate taxon.

4.2. Morphological characters of *Klebsormidium* from clade G

All analyzed strains of clade G *Klebsormidium* are characterized by prominent morphology which clearly differentiates these algae from other lineages of the genus. Macroscopic colonies of clade G *Klebsormidium* mostly have cluster- or knot-like appearance that differs from the other lineages with waved colonies typical for *Klebsormidium* (see Fig. 6A–D). This specific colony structure, especially typical for the strains isolated from arid habitats, is formed due to the strongly curved filaments which form aggregations. Formation of cell aggregations is a common character for many algae with terrestrial life style, as it provides self-protection against strong insolation and water loss (Nienow, 1996; Graham et al., 2012; Karsten et al., 2014; Mikhailuyk et al., 2014). It could be possible that members of this *Klebsormidium* group share similar adaptive traits to hot and dry environment.

Typical chloroplasts of clade G *Klebsormidium* with central incision

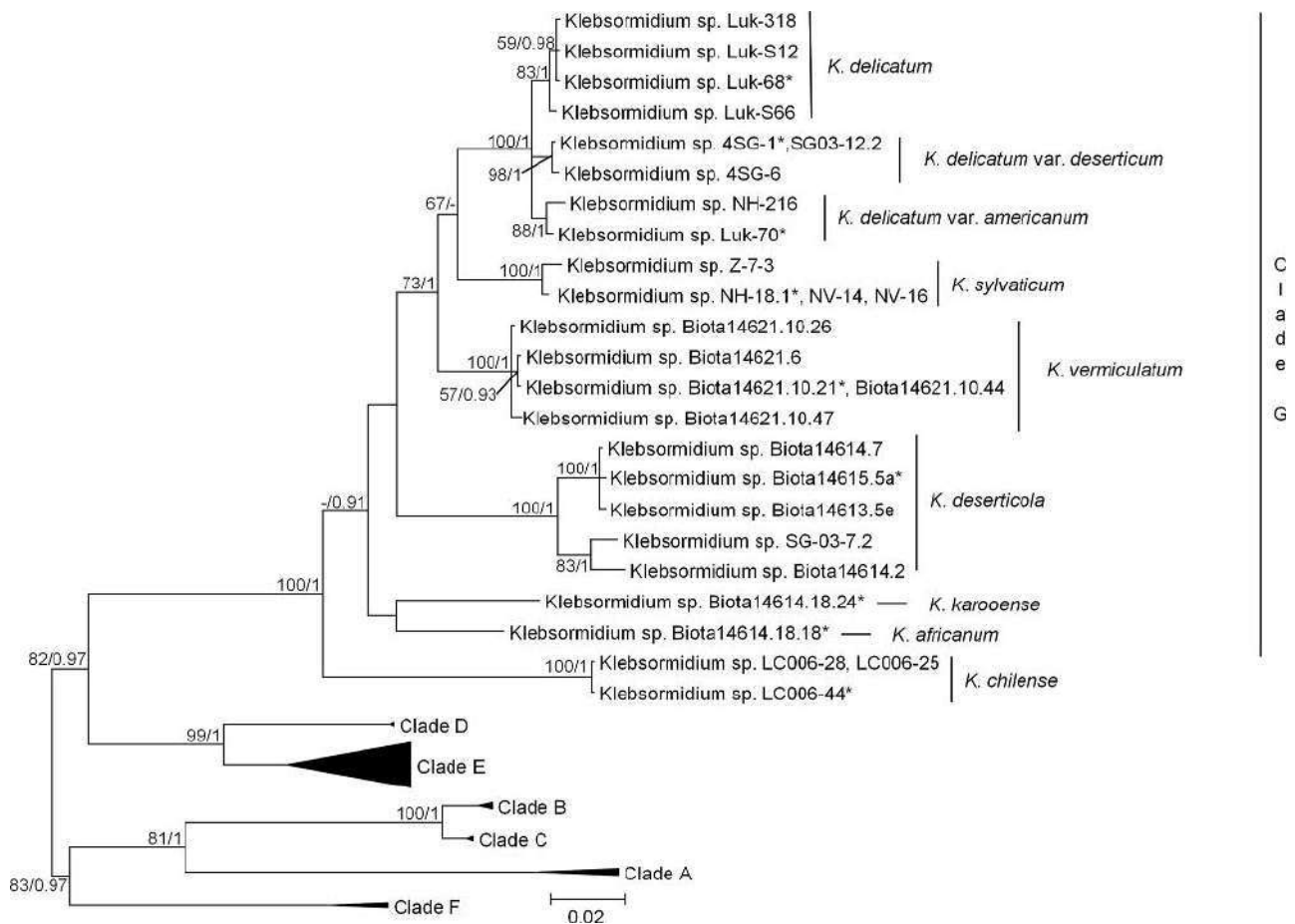


Fig. 4. Molecular phylogeny of *Klebsormidium* and *Interfilum* based on concatenated dataset ITS-1,2 and *rbcL* sequences. Phylogenetic tree was inferred by Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and maximum likelihood (ML) bootstrap support (BP) indicated at nodes. From left to right, support values correspond to ML BP and Bayesian PP; BP values lower than 50% and PP lower than 0.9 not shown. Strains marked with asterisk are proposed authentic strains of newly described taxa. Clade designations follow Rindi et al. (2011).

and four lobes is often observed in young cultures. It could be related to the cell division which starts with the division of chloroplast in the central part of the cell (Floyd et al., 1972; Lokhorst & Star, 1985; Honda & Hashimoto, 2007). Presence of such kind of chloroplasts may be associated with a very dynamic and fast cell division observed in young cultures of clade G *Klebsormidium*. After the cell division as well as in the older cultures chloroplasts usually have smooth edges.

Cultures of clade G *Klebsormidium* look completely different in various developmental stages. Young cultures are characterized by the presence of filaments with short-cylindrical, swollen cells (cell length/width ratio is 0.5–1.4) and four-lobed chloroplasts. Old cultures are built of filaments with elongated cells (cell 2.0–2.5 times longer than wide) and compressed chloroplasts with smooth edges (see Suppl. Table 3). Representatives from *Klebsormidium* clades B, C, D, E and F showed slightly shortening of cells while aging – cells length/width ratio in young cultures varies from 0.8 to 3.2 and in old cultures 0.5–1.8 (see Suppl. Table 2). These small morphological changes are expected, since young culture is characterized by active processes of growth which are being suppressed as the culture is aging. But strains of clade G *Klebsormidium* show completely different “behavior” – they are characterized by mainly short cells in young culture, which are getting strongly elongated in old culture. Cells of some lineages of clade G are elongated in young cultures (cell length/width ratio 1.1–2.4), a characteristic typical for the algae isolated from the localities in temperate or Mediterranean climatic regions, with easily disintegrating filaments. But cells of these strains in old cultures start to be longer anyway (cell

length/width ratio 1.5–2.8–3.3, see Suppl. Table 3).

It seems that these alterations of cell morphology reflect adaptation of clade G *Klebsormidium* to the arid environment: fast cell divisions during limited wet periods in order to increase biomass rapidly results in short-celled filaments, and slow growth with cell elongations during the long dry periods. Described characters are typical for every clade G strain, but they are most prominent in strains isolated from semi-deserts and less clear in strains from regions with temperate or Mediterranean climate. Moreover, short swollen cells typical for the clade G *Klebsormidium* is a feature observed in other xeric *Klebsormidium* lineages as well, for example *K. mucosum* and *K. crenulatum* (clade F) isolated from open and dry habitats: sand dunes, steppes, grasslands (Karsten et al., 2010; Holzinger et al., 2011; Mikhailyuk et al., 2015). Narrow cells could provide lower cell surface which would be advantageous character in hot and dry habitats.

Another typical character of clade G *Klebsormidium* is a very compact pyrenoid surrounded by several starch grains oriented in parallel rows. *Klebsormidium* from other clades usually have prominent pyrenoids with several layers of many small starch grains oriented in parallel rows (Lokhorst, 1996; Lokhorst & Star, 1985; Mikhailyuk et al., 2014). The typical characters related to pyrenoid and chloroplast morphology of clade G *Klebsormidium* were also registered in other studies (Škaloud et al., 2014).

Comparison of morphological features of clade G strains with known *Klebsormidium* taxa showed that characters described are rather unique and that these strains cannot be assigned to any of the known

Table 2
Comparison of different taxa of G-clade *Klebsormidium* by CBC approach and p distances of ITS-1,2 and rbcL (concatenated dataset).

	p-distance ITS-1,2 + rbcL									
	CBC/hCBC/deletions/mismatches									
	<i>K. africanum</i> (n=1)	<i>K. karoense</i> (n=1)	<i>K. vermiculatum</i> (n=5) 1)	<i>K. deserticola</i> (clade 2) [*] (n=3)	<i>K. sylvaticum</i> (n=4)	<i>K. delicatum var. americanum</i> (n=2)	<i>K. delicatum</i> (n=4)	<i>K. delicatum var. deserticum</i> (n=3)	<i>K. chilense</i> (n=3)	
<i>K. africanum</i>										
<i>K. karoense</i>	0.043	1/1/-/2	1/1/-/1	1/1/-/-	-/1/1/2	1/-/-/2	-/1/-/2	-/1/-/3	1/2/-/3	
<i>K. vermiculatum</i>	0.046	0.049	-/1/-/3	-/1/-/2	-/1/1/2	1/1/-/2	1/2/-/1	1/1/-/3	-/2/-/1	
<i>K. deserticola</i> (clade 1)	0.054	0.056	-/1/1/2	-/1/1/1	-/1/1/2	1/-/1/1	-/1/1/2	-/1/1/2	-/2/1/2	
<i>K. deserticola</i> (clade 2)	0.049	0.055	0.050	-/-/-/1	-/2/1/3	2/-/-/3	1/1/-/4	2/-/-/4	-/2/-/4	
<i>K. sylvaticum</i>	0.050	0.059	0.048	0.048	-/2/1/2	2/-/-/2	1/1/-/3	2/-/-/3	-/2/-/3	
<i>K. delicatum var. americanum</i>	0.043	0.054	0.051	0.053	0.036	1/1/1/2	-/2/1/3	-/2/1/3	-/2/1/3	
<i>K. delicatum</i>	0.042	0.055	0.051	0.052	0.035	0.01	-/1/-/2	1/3/-/3	1/3/-/3	
<i>K. delicatum var. deserticum</i>	0.042	0.052	0.051	0.053	0.036	0.01	0.009	1/2/-/4	1/2/-/4	
<i>K. chilense</i>	0.065	0.069	0.070	0.076	0.069	0.07	0.068	0.068		

* The information for *K. deserticola* was presented for two phylogenetic clades: clade 1 united strains Biota 14614.2 and clade 2 with strains Biota 14615.5a, Biota 14613.5e and Biota 14614.7.

taxa of the genus (Moshkova, 1979; Hindák, 1996; Lokhorst, 1996; Ettl & Gärtner, 2014). This can be explained by the ecologically and geographically unusual habitats from which these strains originated. As *Klebsormidium* species were described mostly from Europe and temperate zone of North America, with some small exclusion like *K. acidophilum* Novis described from New Zealand, *K. lamellosum* Wei et Hu from China, and *K. drouetii* Wagner et Zaneveld from Antarctica (Wei, 1984; Wagner & Zaneveld, 1988; Novis, 2006). Therefore this group represents several undescribed species as it was mentioned before in Rindi et al. (2011).

Although morphology of clade G *Klebsormidium* is in general quite prominent, differences among separate lineages inside clade G, described by us as separate species (see below), are not completely clear. Several lineages are characterized by long filaments with different level of disintegration and some differences in cell shape (*K. africanum*, *K. karoense*, *K. deserticola*, *K. sylvaticum*). Other lineages include taxa with short filaments and unicells (*K. vermiculatum*, *K. chilense*, *K. delicatum*). The last representative is also characterized by thin filaments (with exclusion of *K. delicatum var. americanum* Mikhailuyuk et Lukešová var. nov.). But overlaps in morphology and sizes occur quite often among described species. Therefore attention should be paid mainly on habitats and localities of clade G *Klebsormidium* during species identification, and less on morphological peculiarities.

4.3. Ecology and distribution of clade G *Klebsormidium*

Representatives of *Klebsormidium* from clade G were discovered during investigation of strains from South Africa isolated in the course of the project BIOTA Southern Africa (Rindi et al., 2011) and previously identified as *Klebsormidium* cf. *flaccidum* (Büdel et al., 2009). Furthermore, these strains were interpreted as a group considerably distant from the other *Klebsormidium* clades, and ecologically restricted to arid soil environments such as warm and arid deserts, and sub-desert areas (Rindi et al., 2011). Later on, the group was widened due to the discovery of several strains isolated from European habitats characterized by low pH (Škaloud et al., 2014; Ryšánek et al., 2016). Presently the G clade group includes strains originating from four continents: Africa, Europe, South and North America, from semi-desert regions as well as from places with Mediterranean and temperate climate, specific forests and various vegetation types, maritime sand dunes, natural and artificial habitats with low soil pH, etc.

For a deeper understanding of ecology and biogeography of G-clade *Klebsormidium* we analyzed results of several studies focused on the biodiversity and occurrence of *Klebsormidium* representatives from different clades isolated from the biological soil crusts of Chile (present study), South Africa (Büdel et al., 2009; Rindi et al., 2011), maritime sand dunes of Germany (Schulz et al., 2016; Mikhailuyuk et al., 2019 and present study), and habitats with low soil and water pH which mainly included European¹ strains (Škaloud et al., 2014). A summarizing diagram showing the diversity of representatives of each *Klebsormidium* clade in all mentioned studies is presented on Fig. 11. It is interesting that terrestrial habitats of the southern hemisphere (Africa and South America) are rich in clade G *Klebsormidium* (more than 50% of the whole *Klebsormidium* diversity), followed by the clade E representatives. Thus clade G *Klebsormidium* could be the key alga in these habitats, found not only in the soils of desert regions, but also in other ecosystems characterized by temperate and Mediterranean climate (see Table 1).

Terrestrial habitats of northern hemisphere (Europe) showed presence of all *Klebsormidium* clades, with the highest diversity of clade E *Klebsormidium*, and the insignificant number of strains from clade G (not more than 10% of whole diversity). Other studies focused on the

¹ Strains isolated outside of Europe (USA) were excluded from further analysis.

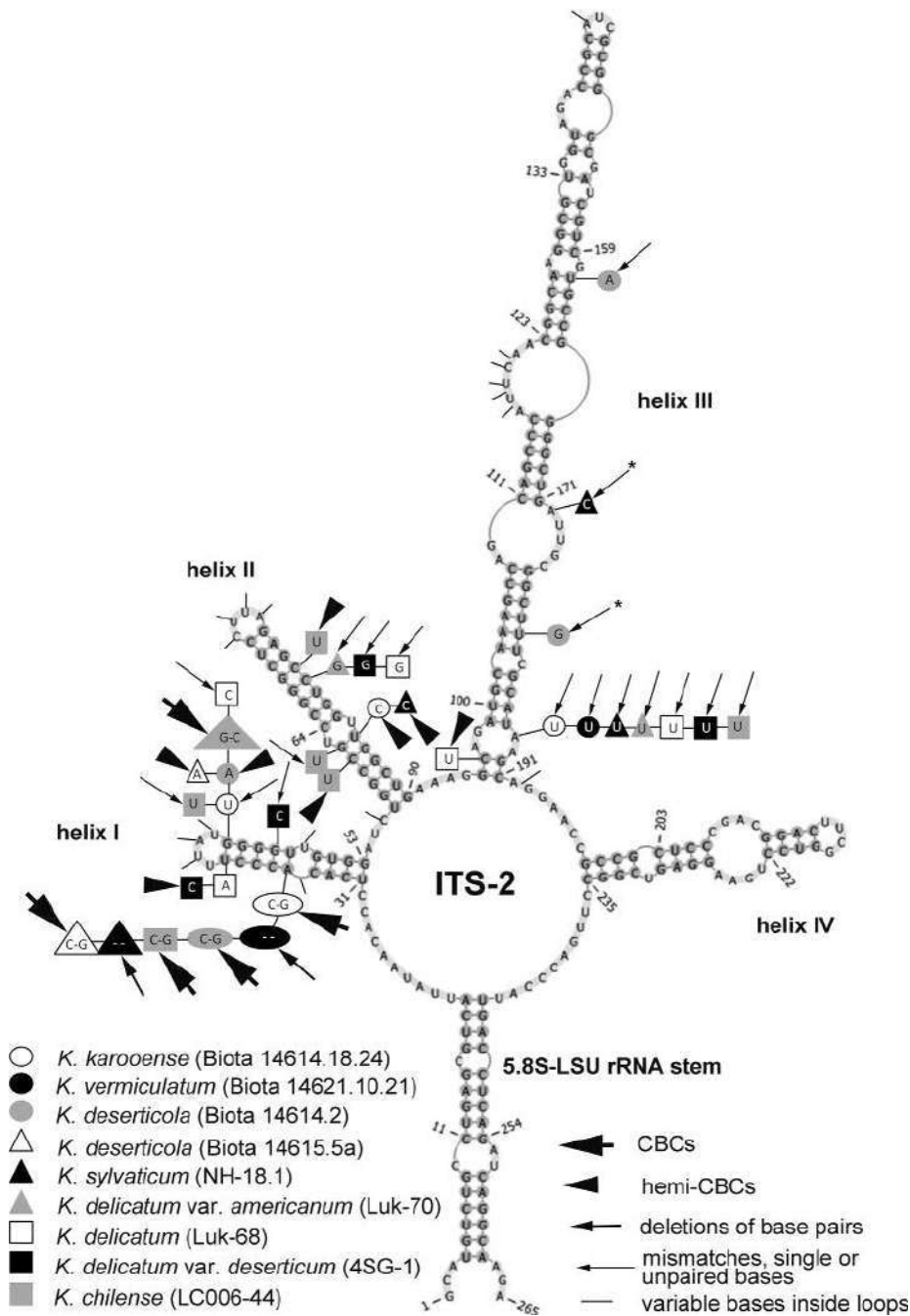


Fig. 5. Comparison of ITS-2 secondary structure of clade G *Klebsormidium* strains. The structure of *K. africanum* (Biota 14614.18.18) is presented with the differences to another species. Variable bases or base pairs are shown with circles, triangles and boxes (see the legend above). Positions marked with asterisk are variable in different strains of the same species.

diversity of *Klebsormidium* representatives isolated from the river sand dunes of Ukraine, surfaces of artificial substrates in European cities, soils in forests of USA, Czech Republic, Japan, UK, soil crusts of Tyrolean Alps (Austria and Italy), grassland and forest plots of different land use intensities in Central Europe (Biodiversity Exploratories) did not provide any data about clade G representatives (Kostikov et al., 2001; Rindi et al., 2008; Ryšánek et al., 2015; Mikhailuyuk et al., 2015; Glaser et al., 2017). Some reports on finding *Klebsormidium* similar to clade G representatives are presented in studies devoted to algae from natural granite outcrops of Ukraine (Mikhailuyuk et al., 2011; Mikhailuyuk, 2013; Mikhailuyuk et al., 2013) and soil crusts of Svalbard (Borchhardt et al., 2017), but these data require confirmation since

phylogenetic data were not provided. Thus, clade G *Klebsormidium* are rare algae in terrestrial habitats of the Northern hemisphere. It is interesting that they originated from unusual habitats of these territories, such as soils with low pH (peat bogs or re-cultivated dumps after coal mining), and maritime sand dunes.

The majority of strains of clade G *Klebsormidium* were isolated from arid regions, from which this algal group possibly originated. Some specific morphological characters of these algae regarding their adaptation to arid conditions (see above) support this assumption. These characters are especially prominent in strains isolated from semi-desert regions of Africa and South America. Isolates from arid regions belong to four phylogenetic lineages, three of which include exclusively desert



Fig. 6. Morphology of clade G *Klebsormidium*. (A–D) colonies of algae on agar surface: (A, B) *K. deserticola* (Biota 14614.2), (C) *K. flaccidum* (Ru-1-2), (D) *K. mucosum* (Us-4-2). (E) General view of curved filaments (*K. deserticola*, Biota 14614.7). (F–J) *K. africanum* (Biota 14614.18.18), filaments in young (F–I) and old (J) culture. (K–N) *K. karooense* (Biota 14614.18.24), filaments in young culture. Scale bars: (A–D) 500 μm , (E–N) 10 μm .

algae. The most interesting lineage is the clade described in the present study as *K. deserticola*, which consists of strains from desert ecosystems of South Africa, Chile and USA. Strains from desert regions of USA were isolated and investigated during Biotic Crust Project (Lunch et al., 2013). The hypothesis that these algae are representatives of clade G was stated earlier in Rindi et al. (2011). Strains of clade G *Klebsormidium* from habitats with Mediterranean climate are also specific, they form two independent lineages including algae from African fynbos (*K. vermiculatum*) and South American forest with participation of “Honey-palm” trees *Jubaea chilensis* (Molina) Baill. Representatives of clade G isolated from habitats with temperate climate form one separate lineage (*K. sylvaticum*), probably adapted to humid and shaded conditions, as well as to soils with low pH which is typical for forests. Strains of this

lineage were isolated from South American forest formed by *Araucaria araucana* K. Koch and maritime sand dunes of Germany covered by sparse pine forest.

Phylogenetic lineage described as *K. delicatum* unites three separated subclades which are characterized by differences in morphology, ecology and biogeography. We propose description of three varieties of this species, taking into consideration genetic differences especially prominent in ITS phylogeny. Two lineages unite algae isolated from territories with temperate climate, Europe (*K. delicatum*, type variety) and North and South America (*K. delicatum* var. *americanum*) as well as soils characterized by low pH (swamp and forest soils or dumps after coal mining). The third lineage unites algae from semi-deserts of Chile (*K. delicatum* var. *deserticum* Mikhailuyk et Samolov var. nov.).

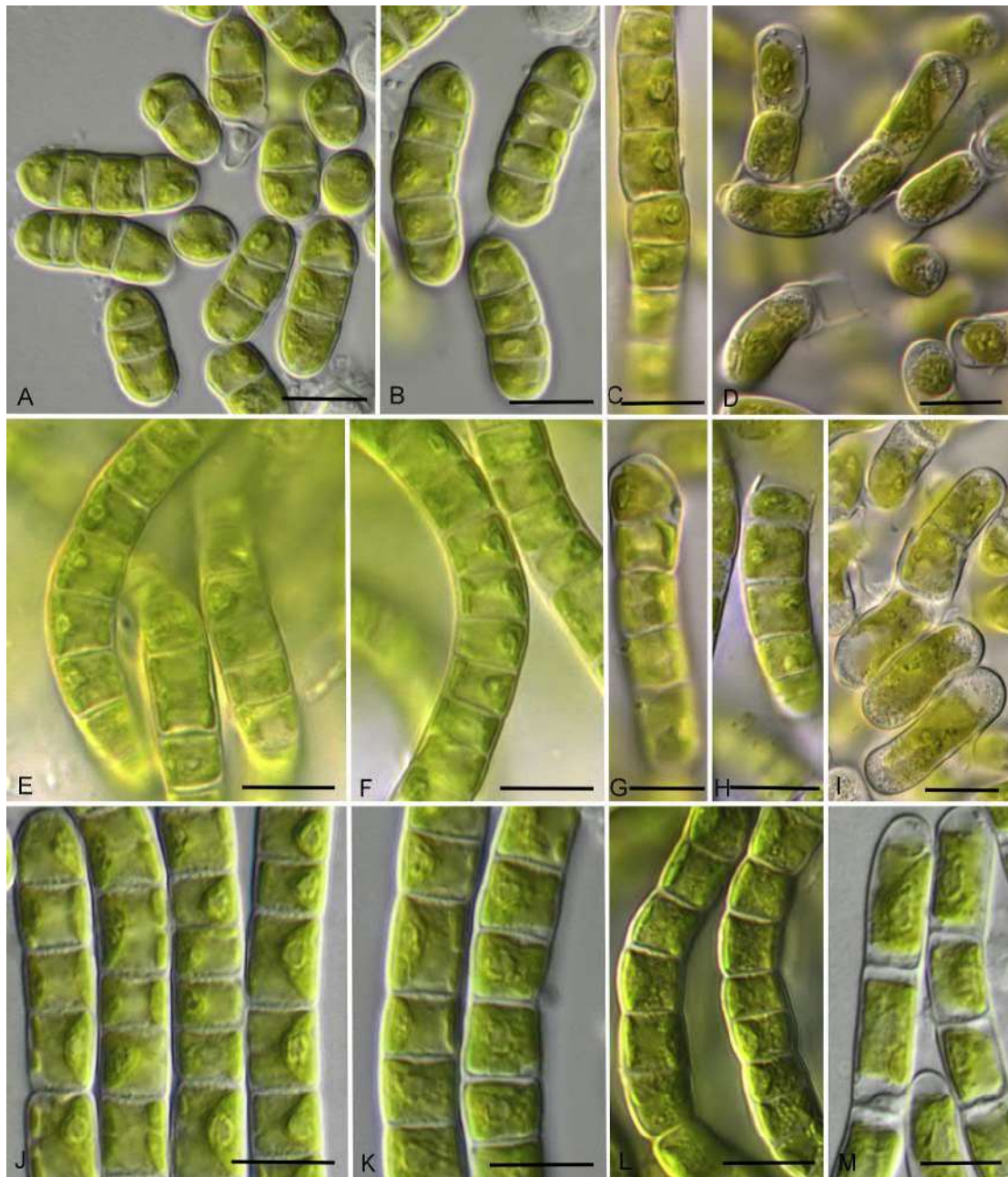


Fig. 7. Morphology of clade G *Klebsormidium*. (A–D) *K. vermiculatum*, filaments in young (A, B (Biota 14621.10.21), C (Biota 14621.6)) and old culture (D (Biota 14621.6)). (E–I) *K. deserticola*, filaments in young (E–G (Biota 14615.5a), H (Biota 14614.7)) and old culture (I (Biota 14613.5e)). (J–M) *K. sylvaticum* (filaments in young (J, K (NH-18.1), L (Z-7-3), and old culture (M (NV-1)). Scale bars: 10 μ m.

Considerable influence of pH on distribution of different terrestrial algae (Hoffmann, 1989) as well as on *Klebsormidium* was registered earlier (Škaloud et al., 2014; Ryšánek et al., 2016). It is interesting that arid habitats from which some species of clade G *Klebsormidium* originated are characterized by neutral or slightly alkaline pH (see Table 1). But habitats with Mediterranean and temperate climate are determined by low pH and respectively acidic soils. Adaptation to low pH was found in different *Klebsormidium* lineages (Škaloud et al., 2014). Three different lineages typical for acidic soils (*K. sylvaticum*, *K. delicatum* and perhaps *K. delicatum* var. *americanum*) were found within clade G *Klebsormidium*. All these lineages include strains isolated from different habitats and localities, always associated with acidic soils.

A comprehensive diversity of clade G *Klebsormidium* was not

explored by now, hence our data are preliminary. Our investigation clearly shows that new findings are possible even among ubiquitous algal taxa when studying unusual, biogeographically distant habitats. It testifies that our knowledge about algal diversity, despite long period of investigation, is still incomplete (Rindi et al., 2009). This is particularly true for many unstudied regions in the southern hemisphere, which may change even our concept of the well-known and widely distributed algal genus *Klebsormidium*.

4.4. Proposed taxonomic revision

Klebsormidium africanum Mikhailuyuk sp. nov. (Figs. 6F–J, 9A and B).
Diagnosis: Filaments long, strongly curved, (7.8)8.0–8.5(9.0) μ m

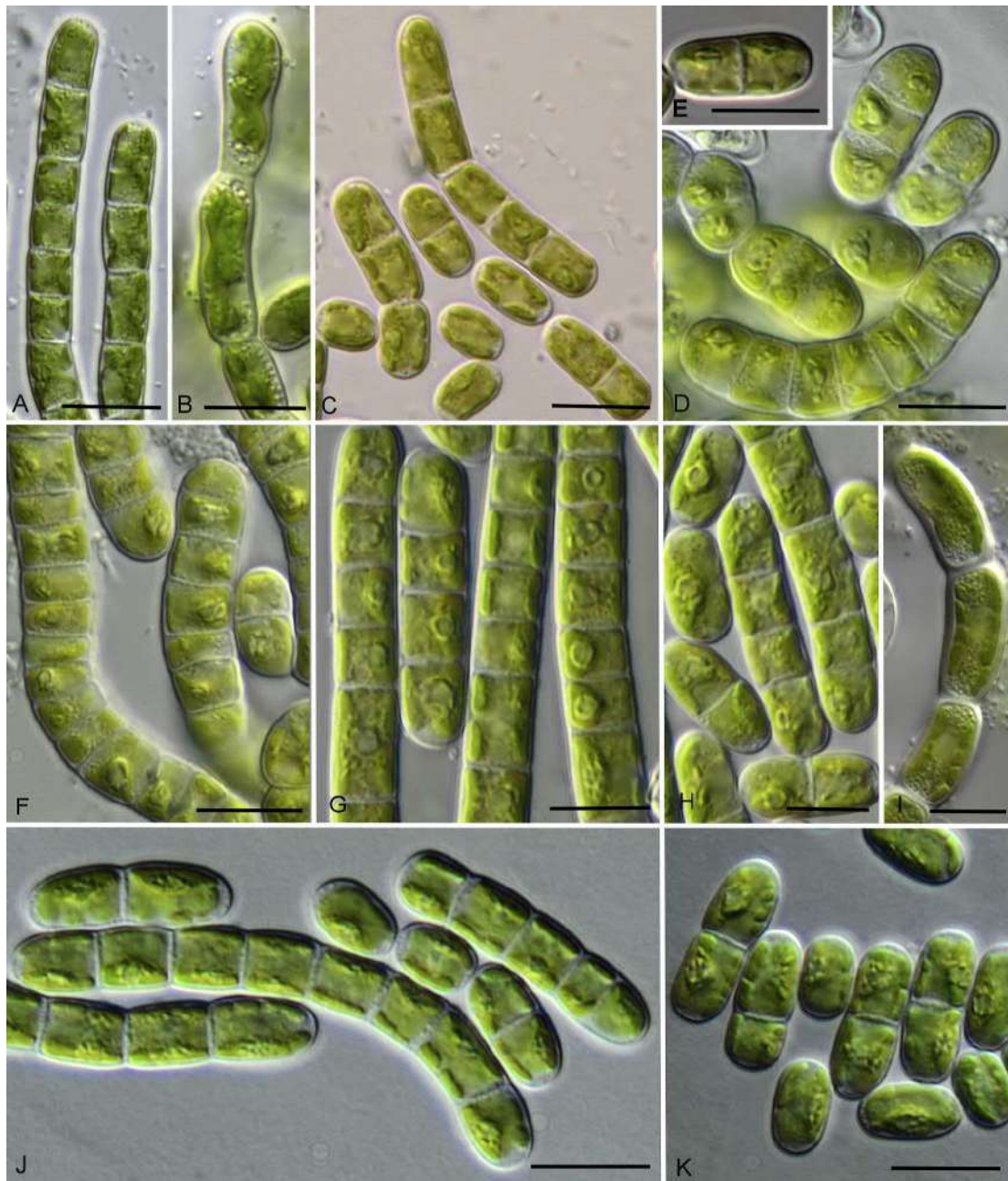


Fig. 8. Morphology of clade G *Klebsormidium*. (A–C) *K. delicatum*, filaments in young (A (Luk-68), C (Luk-318)) and old culture (B (Luk-68)); (D–F) *K. delicatum* var. *deserticum*, filaments in young culture (D, F (4SG-1), E (4SG-6)). (G–I) *K. delicatum* var. *americanum* (filaments in young (G (NH-216), H (Luk-70), and old culture (I (Luk-70)). (J, K) *K. chilense*, filaments in young culture (LC006-44). Scale bars: 10 μ m.

wide, with constrictions near cross walls. Colony on agar surface cluster- and knot-like. Vegetative cells of young and mature filaments short-cylindrical to cylindrical, (6.9)8.0–9.5(11.3) μ m long (length/width ratio (0.8)1.1–1.3). Vegetative cells of old filaments elongated-cylindrical or elongated-doliiform, up to 17.0–22.5 μ m long (length/width ratio 2.0–2.5). Cell wall dense, smooth, H-like fragments are rare. Chloroplast parietal, plate-shaped, with central incision and consequently four lobes in young culture, with more lobes or smooth margin in mature and old culture. Pyrenoid small, compact, surrounded by several starch grains. Vegetative reproduction by cell division in one plane (sporulation-like type) and fragmentation of thalli.

Zoospores and sexual reproduction was not observed.

Morphologically similar to other species related to clade G

Klebsormidium with long filaments, especially to *K. karoense*, but it differs by cylindrical cells in young culture as well as by ITS-1,2 and *rbcL* sequences.

Habitat: soil and biological soil crusts.

Type locality: South Africa, Grootderm, Karoo Namib, Succulent Karoo, semi-desert, cyanobacterial crusts on the soil surface, 28°36'44.42"S, 16°39'15.59"E.

Holotype (designated here): The authentic strain Biota 14614.18.18 (BCCO 30_2910) is permanently cryopreserved in metabolically inactive state in the Culture collection of soil algae and cyanobacteria at the Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic.

Isotype (designated here): Herbarium of authentic strain Biota 14614.18.18 is deposited in Algotheca of the M.G. Kholodny Institute of

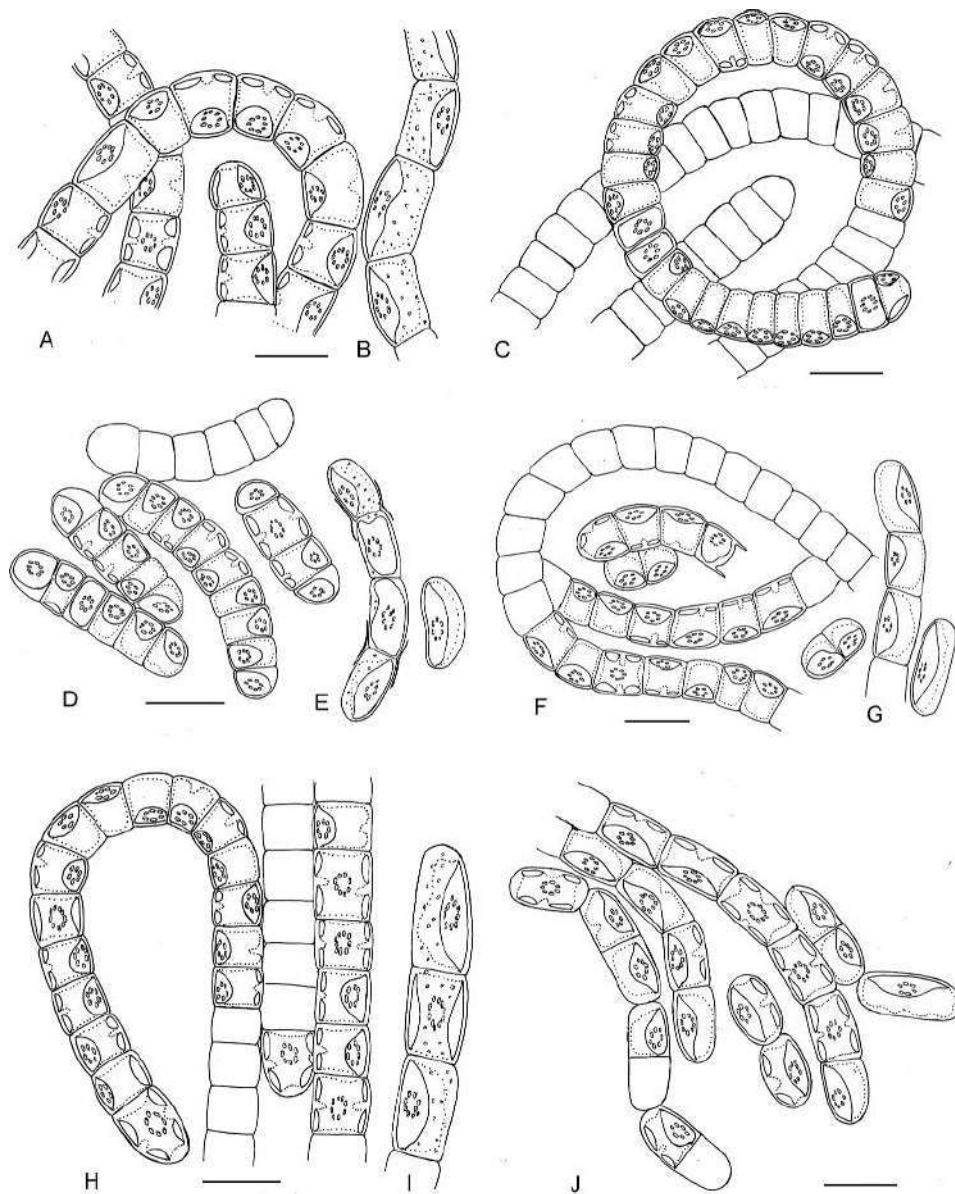


Fig. 9. Drawings of clade G *Klebsormidium*. (A, B) *K. africanum* (Biota 14614.18.18), filaments in young (A) and old (B) culture. (C) *K. karoense* (Biota 14614.18.24), filaments in young culture. (D, E) *K. vermiculatum* (Biota 14621.10.21), filaments in young (D) and old culture (E). (F, G) *K. deserticola* (Biota 14615.5a), filaments in young (F) and old culture (G). (H, I) *K. sylvaticum* (NH-18.1), filaments in young (H) and old culture (I). (J) *K. chilense* (LC006-44), filaments in young culture. Scale bars: 10 μm .

Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine (AKW-M49).

Iconotype (designated here in support of the holotype): Fig. 9A and B.

Authentic strain: Biota 14614.18.18 was deposited in BCCO, Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic under number BCCO 30_26910.

Etymology: africanum = from Africa (referring to the type locality).

Klebsormidium karoense Mikhailiuk sp. nov. (Figs. 6K–N, 9C).

Diagnosis: Filaments long, strongly curved, (7.0)7.6–8.0(9.0) μm wide, constricted near cross walls. Colony on agar surface cluster- and knot-like. Vegetative cells of young and mature filaments narrow-cylindrical to short-cylindrical, (3.1)3.6–6.0(6.3) μm long (length/width ratio 0.5–0.7). Vegetative cells of old filaments short-cylindrical or elongated-doliiform, up to 15.2 μm long (length/width ratio 1.0–1.8). Cell wall dense, smooth, H-like fragments are rare. Chloroplast parietal, plate-shaped, with central incision and consequently four lobes in

young culture, with smooth margin in mature and old culture. Pyrenoid small, compact, surrounded by several starch grains. Vegetative reproduction by cell division in one plane (sporulation-like type) and fragmentation of thalli.

Zoospores and sexual reproduction were not observed.

Morphologically similar to other species related to clade G *Klebsormidium* with long filaments, especially to *K. africanum*. It differs by very narrow cells in young culture as well as by ITS-1,2 and *rbcl* sequences.

Habitat: soil and biological soil crusts.

Type locality: South Africa, Grootderm, Karoo Namib, Succulent Karoo, semi-desert, cyanobacterial crusts on the soil surface, 28°36'44.42"S, 16°39'15.59"E.

Iconotype: Fig. 9C.

Holotype (designated here): The authentic strain Biota 14614.18.24 (BCCO 30_2911) is permanently cryopreserved in metabolically

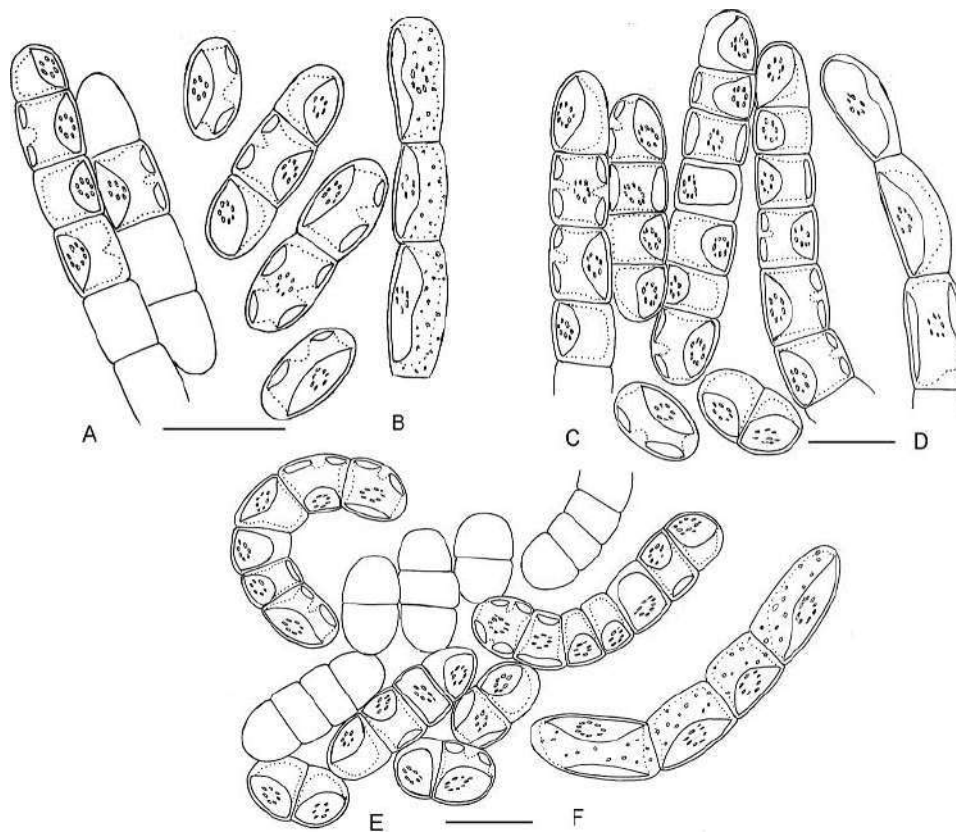


Fig. 10. Drawings of clade G *Klebsormidium*. (A, B) *K. delicatum* (Luk-68), filaments in young (A) and old culture (B). (C, D) *K. delicatum* var. *americanum* (Luk-70), filaments in young (C) and old culture (D). (E, F) *K. delicatum* var. *deserticum* (4SG-1), filaments in young (E) and old culture (F). Scale bars: 10 µm.

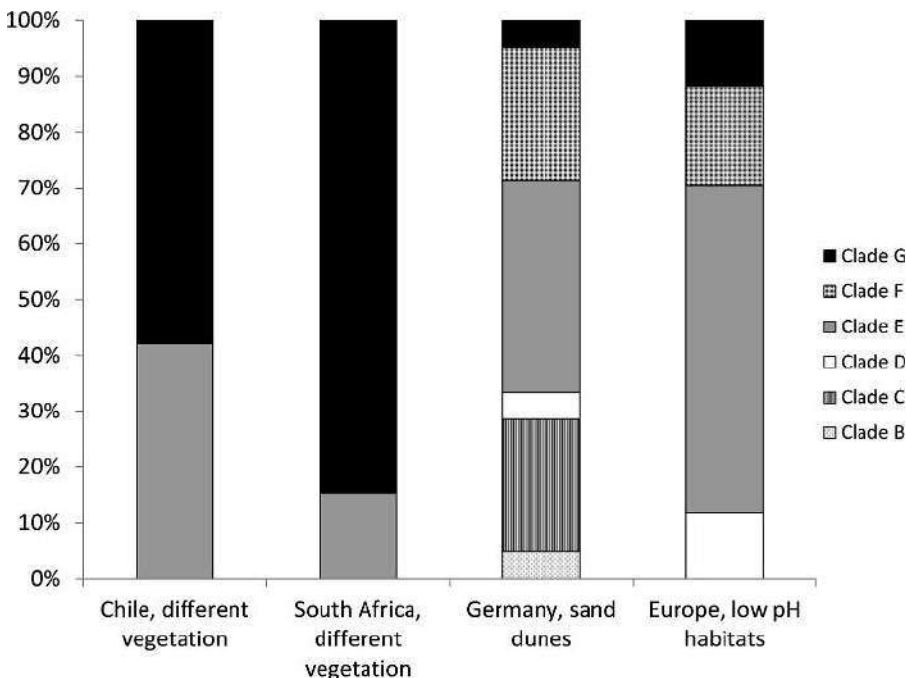


Fig. 11. Comparison of distribution pattern of phylogenetic clades within *Klebsormidium* collected from different regions of South and North hemisphere: different plant formations of Chile (present study), South Africa (Büdel et al., 2009, Rindi et al., 2011), maritime sand dunes of Germany (Schulz et al., 2016; Mikhailyuk et al., 2019 and present study) and habitats with low soil and water pH, Europe (Škaloud et al., 2014).

inactive state in the Culture collection of soil algae and cyanobacteria at the Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic.

Isotype (designated here): Herbarium of authentic strain Biota 14614.18.24 is deposited in Algotheca of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine (AKW-M50).

Iconotype (designated here in support of the holotype): Fig. 9C.

Authentic strain: Biota 14614.18.24 was deposited in BCCO, Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic under number BCCO 30_2911.

Etymology: karoense = from Karoo (referring to the type locality).

Klebsormidium vermiculatum Mikhailyuk sp. nov. (Figs. 7A–D, 9D and E).

Diagnosis: Filaments typically short, usually composed of 3–5–10 cells, curved, constricted near cross walls, bead-like, 6.3–7.0(8.5) μm wide. Long filaments are rare in young culture. Colony on agar usually have smooth surface, occasionally slightly cluster-like. Vegetative cells of young and mature filaments are narrow, short-cylindrical to cylindrical, swollen, (3.0)4.0–6.7(7.3) μm long (length/width ratio 0.5–1.2), with constrictions near cross walls. Vegetative cells of old filaments elongated, cylindrical or doliiform, up to 12.8 μm long (length/width ratio 1.0–1.5). Cell wall dense, smooth; H-like fragments are rare. Chloroplast parietal, plate-shaped, with central incision and consequently four lobes in young culture, with smooth margin in mature and old culture. Pyrenoid small, compact, surrounded by several starch grains. Vegetative reproduction by cell division in one plane (sporulation-like type) and fragmentation of thalli.

Zoospores and sexual reproduction were not observed.

Morphologically similar to species related to clade G *Klebsormidium* with disintegrated filaments, especially to *K. delicatum* and *K. chilense*; it differs, however, by the width of the filament, specific type locality as well as by differences in ITS-1,2 and *rbcl* sequences.

Habitat: soil and biological soil crusts.

Type locality: South Africa, Roscherpan Nature Reserve, Fynbos, cyanobacterial crusts on the soil surface, along dripping zone of shrubs, 32°36'03.05"S, 18°18'20.16"E.

Holotype (designated here): The authentic strain Biota 14621.10.21 (BCCO 30_2912) is permanently cryopreserved in metabolically inactive state in the Culture collection of soil algae and cyanobacteria at the Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic.

Isotype (designated here): Herbarium of authentic strain Biota 14621.10.21 is deposited in Algotheca of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine (AKW-M51).

Iconotype (designated here in support of the holotype): Fig. 9D and E.

Authentic strain: Biota 14621.10.21 was deposited in BCCO, Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic under number BCCO 30_2912.

Other strains: Biota 14621.6, Biota 14621.10.44, Biota 14621.10.47 and Biota 14621.10.26 were isolated from the same locality.

Etymology: *vermiculatum* = from Latin word *vermiculatus* – vermiform (referring to specific shape of short filaments).

Klebsormidium deserticola Mikhailyuk sp. nov. (Figs. 7E–I, 9F and G).

Diagnosis: Filaments long, strongly curved, (5.9)6.3–7.8(8.2) μm wide, constricted near cross walls, with clear tendencies to disintegration. Colony on agar cluster- and knot-like. Vegetative cells of young and mature filaments are narrow-cylindrical to short-cylindrical, (2.6) 3.7–10.4(11.0) μm long (length/width ratio 0.6–1.3). Vegetative cells of old filaments cylindrical and elongated-doliiform, up to up to 18.2–25.0 μm long (length/width ratio 1.5–3.0). Cell wall dense, smooth, H-like fragments present. Chloroplast parietal, plate-shaped, with central incision and consequently four lobes in young culture and with smooth margin in mature and old culture. Pyrenoid small, compact, surrounded by several starch grains. Vegetative reproduction by cell division in one plane (sporulation-like type) and fragmentation of thalli.

Zoospores and sexual reproduction were not observed.

Morphologically similar to other species related to clade G *Klebsormidium* from semi-desert areas, especially with *K. karoense* and *K. africanus*. It differs, however, by disintegrating filaments, shape of cells, as well as by differences in ITS-1,2 and *rbcl* sequences.

Habitat: soil and biological soil crusts.

Type locality: South Africa, Koeroegap Vlakte, Karoo Namib, Nama Karoo, semi-desert, cyanobacterial crusts on the soil surface, 28°13'35.92"S, 17°01'32.40"E.

Holotype (designated here): The authentic strain Biota 14615.5a (BCCO 30_2913) is permanently cryopreserved in metabolically

inactive state in the Culture collection of soil algae and cyanobacteria at the Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic.

Isotype (designated here): Herbarium of authentic strain Biota 14615.5a is deposited in Algotheca of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine (AKW-M52).

Iconotype (designated here in support of the holotype): Fig. 9F and G.

Authentic strain: Biota 14615.5a was deposited in BCCO, Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic under number BCCO 30_2913.

Other strains: isolated from desert habitats of 3 continents: Biota 14613.5e, Biota 14614.7, Biota 14614.2 (South Africa, Koeboes and Grootderm, Karoo Namib, Succulent Karoo, semi-desert), SG03-7.2 (Chile, Santa Gracia Natural Reserve, semi-arid shrubland vegetation), BCP-CNP2-VF35, BCP-TAA2-JR3 (southwestern USA, arid regions).

Etymology: *deserticola* = from Latin words *deserta* – deserts and *colo* – inhabit (referring to the type locality).

Klebsormidium sylvaticum Mikhailyuk et Samolov sp. nov. (Figs. 7J–M, 9H and I).

Diagnosis: Filaments long, constricted, slightly curved, (6.3) 6.7–6.9 μm wide, constricted near cross walls. Colony on agar cluster- and knot-like. Vegetative cells of young and mature filaments short-cylindrical to cylindrical, (4.5)6.4–9.2 μm long (length/width ratio 1.0–1.4). Vegetative cells of old filaments short-cylindrical to elongated-ellipsoid, up to 18.7 μm long (length/width ratio 1.3–2.8). Cell wall dense, smooth, H-like fragments usually absent. Chloroplast parietal, plate-shaped, with central incision and consequently four lobes in young culture and with smooth margin in mature and old culture. Pyrenoid small, compact, surrounded by several starch grains. Vegetative reproduction by cell division in one plane (sporulation-like type) and fragmentation of thalli.

Zoospores and sexual reproduction were not observed.

Morphologically similar to other related clade G *Klebsormidium* with long filaments, especially to *K. delicatum* var. *americanum*. It has some similarity with *K. africanum*, *K. karoense* and *K. deserticum*, but differs in details of morphology, habitat and type locality as well as by differences in ITS-1,2 and *rbcl* sequences.

Habitat: soil and biological soil crusts.

Type locality: Chile, Nahuelbuta National Park, *Araucaria* temperate forest, biological soil crusts, 37°47'30.30"S, 73°00'08.24"W.

Holotype (designated here): The authentic strain NH-18.1 (BCCO 30_2914) is permanently cryopreserved in metabolically inactive state in the Culture collection of soil algae and cyanobacteria at the Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic.

Isotype (designated here): Herbarium of authentic strain NH-18.1 is deposited in Algotheca of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine (AKW-M53).

Iconotype (designated here in support of the holotype): Fig. 9H and I.

Authentic strain: NH-18.1 was deposited in BCCO, Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic under number BCCO 30_2914.

Other strains: NV-14 and NV-16 were isolated from the same locality; Z-7-3 was isolated from biological soil crust, maritime sand dunes under sparse pine forest, Baltic Sea coast, Bad Prerow, Mecklenburg-Vorpommern, Germany.

Etymology: *sylvaticum* = from Latin word *silvaticus* – growing in the forest (referring to the type habitat).

Klebsormidium delicatum Mikhailyuk et Lukešová sp. nov. (Figs. 8A–C, 10A and B).

Diagnosis: Filaments usually short, easily disintegrating to very short 3–5-celled filaments, unicells and diads, constricted near cross walls, (4.6)5.0–5.5(6.0) μm wide. Long filaments rare, in young culture. Colony on agar surface usually smooth or slightly cluster-like. Vegetative cells of young and mature filaments cylindrical to ellipsoid, (6.4)7.6–10.7(14.3) μm long (length/width ratio 1.5–2.1), with

constrictions near cross walls. Vegetative cells of old filaments elongated-cylindrical or elongated-doliiform, up to 15.8–19.5 µm long (length/width ratio 2.6–3.3). Cell wall dense, smooth, H-like fragments are rare. Chloroplast parietal, plate-shaped, with central incision and consequently four lobes in young culture and with smooth margin in mature and old culture. Pyrenoid small, compact, surrounded by several starch grains. Vegetative reproduction by cell division in one plane (sporulation-like type) and fragmentation of thalli.

Zoospores and sexual reproduction were not observed.

Morphologically similar with other species related to clade G *Klebsormidium* with disintegrating filaments, especially with *K. chilense*, *K. vermiculatum* and *K. delicatum* var. *deserticum*, but it differs by the width of the filament, specific low-pH habitats, type locality as well as by the differences in ITS-1,2 and *rbcl* sequences.

Habitat: soil and sand with low pH.

Type locality: Europe, Czech Republic, Slavkovský les, peat bog Krásno, under spruce forest, meliorated area, 50°63'30.85"N, 12°45'37.47"E.

Holotype (designated here): The authentic strain Luk-68 (BCCO 30_2904) is permanently cryopreserved in metabolically inactive state in the Culture collection of soil algae and cyanobacteria at the Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic.

Isotype (designated here): Herbarium of authentic strain Luk-68 is deposited in Algotheca of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine (AKW-M54).

Iconotype (designated here in support of the holotype): Fig. 10A and B.

Authentic strain: Luk-68 was deposited in BCCO, Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic under number BCCO 30_2904.

Other strains: Luk S12 was isolated from the same locality, Luk-318 and Luk S66 were isolated from dumps after coal mining, Sokolov mining district, Czech Republic and Weissacker Berg, near Cottbus, Germany respectively.

Etymology: *delicatum* = from Latin word – *delicatus* – thin, fine (referring to thin easily disintegrating filaments).

Klebsormidium delicatum var. *deserticum* Mikhailyuk et Samolov var. nov. (Figs. 8D–F, 10E and F).

Diagnosis: Filaments short, 3–5–10-celled, easily disintegrating to unicells and diads, constricted near cross walls, bead-like, (5.3) 6.0–7.0(8.5) µm wide. Colony on agar with rough surface. Vegetative cells of young and mature filaments narrow- or short-cylindrical to ellipsoid (3.7)5.8–7.6(9.3) µm long (length/width ratio 0.5–1.3), with constrictions near cross walls. Vegetative cells of old filaments cylindrical to ellipsoid, up to 21.0 µm long (length/width ratio 1.6–2.0). Cell wall dense, smooth, H-like fragments rare. Chloroplast parietal, plate-shaped, with central incision and consequently four lobes in young culture and with smooth margin in mature and old culture. Pyrenoid small, compact, surrounded by several starch grains. Vegetative reproduction by cell division in one plane (sporulation-like type) and fragmentation of thalli.

Zoospores and sexual reproduction were not observed.

Morphologically similar with other species related to clade G *Klebsormidium* with disintegrating filaments especially with *K. vermiculatum* and *K. delicatum*, type variety (differs by type locality, width of filaments and habitat), there are similarities with *K. chilense*, but it differs by some morphological characters, type locality as well as by the ITS-1,2 and *rbcl* sequences.

Habitat: soil and biological soil crusts.

Type locality: Chile, Santa Gracia Natural Reserve semi-arid shrubland vegetation, soil crust, 29°45'28.58"S, 71°09'58.24"W.

Holotype (designated here): The authentic strain 4SG-1 (BCCO 30_2907) is permanently cryopreserved in metabolically inactive state in the Culture collection of soil algae and cyanobacteria at the Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic.

Isotype (designated here): Herbarium of authentic strain 4SG-1 is

deposited in Algotheca of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine (AKW-M55).

Iconotype (designated here in support of the holotype): Fig. 10E and F.

Authentic strain: 4SG-1 was deposited in BCCO, Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic under number BCCO 30_2907.

Other strains: 4SG-6 and SG03-12.2 were isolated from the same locality.

Etymology: *deserticum* = from Latin word *deserta* – deserts (referring to the type locality).

Klebsormidium delicatum var. *americanum* Mikhailyuk et Lukešová var. nov. (Figs. 8G–I, 10C and D).

Diagnosis: Filaments long and short, disintegrating to unicells and diads, constricted near cross walls, swollen, (6.8)7.1–7.8(8.4) µm wide. Long filaments quite often, in mature and old culture. Colony on agar with rough surface. Vegetative cells of young and mature filaments are short-cylindrical to cylindrical, swollen, (4.7)6.7–10.1(11.9) µm long (length/width ratio 0.8–1.4), with constrictions near cross walls. Vegetative cells of old filaments cylindrical, elongated-cylindrical and doliiform, up to 17.8–22.2 µm long (length/width ratio 2.3–2.8). Cell wall dense, smooth, H-like fragments present. Chloroplast parietal, plate-shaped, with central incision and consequently four lobes in young culture and with more lobes or smooth margin in mature and old culture. Pyrenoid small, compact, surrounded by several starch grains. Vegetative reproduction by cell division in one plane (sporulation-like type) and fragmentation of thalli.

Zoospores and sexual reproduction were not observed.

Morphologically similar to other species related to clade G *Klebsormidium* with disintegrating filaments, especially with *K. sylvaticum* and *K. delicatum*, type variety, it differs by the width of the filaments, habitat and type locality, as well as by the differences in ITS-1,2 and *rbcl* sequences.

Habitat: soil and biological soil crusts.

Type locality: USA, Wyoming, Bell Ayr Mine, recultivated dump after coal mining, soil, 44°05'24.4"N, 105°22'06.3"W.

Holotype (designated here): The authentic strain Luk-70 (BCCO 30_2908) is permanently cryopreserved in metabolically inactive state in the Culture collection of soil algae and cyanobacteria at the Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic.

Isotype (designated here): Herbarium of authentic strain Luk-70 is deposited in Algotheca of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine (AKW-M56).

Iconotype (designated here in support of the holotype): Fig. 10C and D.

Authentic strain: Luk-70 was deposited in BCCO, Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic under number BCCO 30_2908.

Other strains: NH-216 was isolated from biological soil crust under *Araucaria* temperate forest, Nahuelbuta National Park, Chile.

Etymology: *americanum* = from America (referring to the type locality).

Klebsormidium chilense Mikhailyuk et Samolov sp. nov. (Figs. 8J and K, 9J).

Diagnosis: Filaments usually short, easily disintegrating to unicells and diads, constricted near cross walls, (4.5)5.5–6.3(7.3) µm wide. Colony on agar usually with rough surface. Vegetative cells of young and mature filaments are cylindrical to ellipsoid, (4.5)6.3–8.8(11.8) µm long (length/width ratio 1.1–1.8), with constrictions near cross walls. Vegetative cells of old filaments elongated cylindrical to ellipsoid, swollen, up to 15.8–19.3 µm long (length/width ratio 2.3–2.6). Cell wall dense, smooth, H-like fragments absent. Chloroplast parietal, plate-shaped, with central incision and consequently four lobes in young culture and with more lobes or smooth margin in mature and old culture. Pyrenoid small, compact, surrounded by several starch grains. Vegetative reproduction by cell division in one plane (sporulation-like

type) and fragmentation of thalli.

Zoospores and sexual reproduction were not observed.

Morphologically similar to other species related to clade G *Klebsormidium* with disintegrating filaments, especially to *K. delicatum* and *K. delicatum* var. *deserticum*, has some similarity with *K. vermiculatum*, but differs by some details of morphology, type locality as well as by the differences in ITS-1,2 and *rbcl* sequences.

Habitat: soil and biological soil crusts.

Type locality: Chile: La Campana National Park, deciduous Mediterranean vegetation with *Jubaea chilensis*, soil crust, 32°57'16.46"S, 71°4'15.19"W.

Holotype (designated here): The authentic strain LC006-44 (BCCO 30_2909) is permanently cryopreserved in metabolically inactive state in the Culture collection of soil algae and cyanobacteria at the Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic.

Isotype (designated here): Herbarium of authentic strain LC006-44 is deposited in Algotheca of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine (AKW-M57).

Iconotype (designated here in support of the holotype): Fig. 9J.

Authentic strain: LC006-44 was deposited in BCCO, Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic under number BCCO 30_2909.

Other strains: LC006-25, LC006-28 were isolated from the same locality.

Etymology: chilense = from Chile (referring to type locality).

Acknowledgements

This study was supported by the German Science Foundation (DFG) priority program SPP-1803 “EarthShape: Earth Surface Shaping by Biota” (E.S., U.K., B.B.) [KA899/32-1; BU666/18-1], SPP 1991 “Taxonomics” (K.G.) [GL 909/1-1], Georg-Forster research fellowship from the Alexander von Humboldt Foundation (T.M.), Grant Agency of the Czech Republic (GAČR) [206/96/1382, 526/98/P156] (A.L.) and program KONTAKT [CZ-DE grant ME 076, CZ-USA grant ME 08085] (A.L.). German Ministry of Education and Research (BMBF) supported the BIOTA Africa project in the BIOLOG Program (B.B.). The study was summarized during a stay of T.M. at the University of Innsbruck, Austria funded by a program to revise the culture collection of algae (ASIB). We thank Prof. Thomas Friedl (University of Göttingen, Germany) for valuable discussion during the preparation of material, Dr. Thomas Pröschold (University of Innsbruck, Austria) for permission to use algal specific primer he designed, and Dr. David Ryšánek (Institute of Microbiology, Czech Republic) for valuable help and advice during work with *rbcl* gene. We are grateful to the Chilean National Park Service (CONAF) for providing access to sampling locations (Pan de Azúcar, La Campana, and Nahuelbuta) as well as CEAZA for providing access to the Santa Gracia Natural Reserve. We are grateful to Sergei L. Mosyakin (M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine) for his valuable advice on nomenclatural issues. Finally we greatly acknowledge the contribution in biological soil crust sampling by Prof. Dr. Peter Leinweber (University of Rostock, Germany) and Dr. Karen Baumann (University of Rostock, Germany), as well as the provision of habitat pictures by Prof. Dr. Todd Ehlers (University of Tübingen, Germany) and Dr. K. Tajovsky (Institute of Soil Biology, Czech Republic).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.12.018>.

References

Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control* 19 (6), 716–723.

- Belnap, J., Lange, O.L., 2001. Structure and functioning of biological soil crusts: a synthesis. In: *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 471–479.
- Borchardt, N., Baum, C., Mikhailuyk, T., Karsten, U., 2017. Biological soil crusts of Arctic Svalbard—water availability as potential controlling factor for microalgal biodiversity. *Front. Microbiol.* 8, 1485.
- Büdel, B., Darienko, T., Deuschewitz, K., Dojani, S., Friedl, T., Mohr, K.I., Salisch, M., Reisser, W., Weber, B., 2009. Southern African biological soil crusts are ubiquitous and highly diverse in drylands, being restricted by rainfall frequency. *Microb. Ecol.* 57 (2), 229–247.
- Büdel, B., Deuschewitz, K., Dojani, S., Friedl, T., Darienko, T., Mohr, K.I., Weber, B., 2010. Biological soil crusts along the Biota Southern Africa transects. 93–99. (348p.) In: Schmiedel, U., Jürgens, N., Hoffman, M.T. (Eds.), *Biodiversity in South Africa 2: Patterns and processes at regional scale*. Klaus Hess, Göttingen & Windhoek, Germany.
- Büdel, B., Dulić, T., Darienko, T., Rybalka, N., Friedl, T., 2016. Cyanobacteria and algae of biological soil crusts. In: Weber, B., Büdel, B., Belnap, J. (Eds.), *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 55–80.
- Byun, Y., Han, K., 2009. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. *Bioinformatics* 25, 1435–1437.
- Caisová, L., Marin, B., Melkonian, M., 2013. A consensus secondary structure of ITS2 in the Chlorophyta identified by phylogenetic reconstruction. *Protist* 164, 482–496.
- Coleman, A.W., 2000. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist* 151 (1), 1–9.
- Coleman, A.W., 2009. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide. *Mol. Phylogenet. Evol.* 50, 197–203.
- Demchenko, E., Mikhailuyk, T., Coleman, A.W., Pröschold, T., 2012. Generic and species concepts in *Microglena* (previously the *Chlamydomonas monadina* group) revised using an integrative approach. *Eur. J. Phycol.* 47 (3), 264–290.
- Donner, A., Glaser, K., Borchardt, N., Karsten, U., 2017. Ecophysiological response on dehydration and temperature in terrestrial *Klebsormidium* (Streptophyta) isolated from biological soil crusts in Central European grasslands and forests. *Microb. Ecol.* 73 (4), 850–864.
- Ettl, H., Gärtner, G., 2014. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*, second ed. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- Fiore-Donno, A.M., Rixen, C., Rippin, M., Glaser, K., Samolov, E., Karsten, U., Becker, B., Bonkowski, M., 2018. New barcoded primers for efficient retrieval of cercozoan sequences in high-throughput environmental diversity surveys, with emphasis on worldwide biological soil crusts. *Mol. Ecol. Resour.* 18 (2), 229–239.
- Floyd, G.L., Stewart, K.D., Mattox, K.R., 1972. Cellular organization, mitosis, and cytokinesis in the ulotrichalean alga, *Klebsormidium*. *J. Phycol.* 8 (2), 176–184.
- Fott, B., 1960. *Taxonomische Übertragungen und Namensänderungen unter den Algen*. Preslia 32, 142–154.
- Glaser, K., Donner, A., Albrecht, M., Mikhailuyk, T., Karsten, U., 2017. Habitat-specific composition of morphotypes with low genetic diversity in the green algal genus *Klebsormidium* (Streptophyta) isolated from biological soil crusts in Central European grasslands and forests. *Eur. J. Phycol.* 52 (2), 188–199.
- Graham, L.E., Arancibia-Avila, P., Taylor, W.A., Strother, P.K., Cook, M.E., 2012. *Aeroterrestrial Coleochaete* (Streptophyta, Coleochaetales) models early plant adaptation to land. *Am. J. Bot.* 99 (1), 130–144.
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2018. *AlgaeBase*. World-wide Electronic Publication. National University of Ireland, Galway searched on 11 May 2018. <http://www.algaebase.org>.
- Hindák, F., 1996. *Klúč na určovanie nerozkoná rených zelených rias (Ulotrichineae, Ulotrichales, Chlorophyceae)*. Slovenská Botanická Spoločnosť pri SAV, Bratislava, Slovakia.
- Hoffmann, L., 1989. *Algae of terrestrial habitats*. *Bot. Rev.* 55 (2), 77–105.
- Holzinger, A., Lütz, C., Karsten, U., 2011. Desiccation stress causes structural and ultrastructural alterations in the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) isolated from an alpine soil crust. *J. Phycol.* 47 (3), 591–602.
- Honda, M., Hashimoto, H., 2007. Close association of centrosomes to the distal ends of the microbody during its growth, division and partitioning in the green alga *Klebsormidium flaccidum*. *Protoplasma* 231 (3–4), 127–135.
- Hori, K., Maruyama, F., Fujisawa, T., Togashi, T., Yamamoto, N., Seo, M., Sato, S., Yamada, T., Mori, H., Tajima, N., Moriyama, T., 2014. *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nat. Commun.* 5, 3978.
- Karsten, U., Herburger, K., Holzinger, A., 2014. Dehydration, temperature, and light tolerance in members of the aeroterrestrial green algal genus *Interfilum* (Streptophyta) from biogeographically different temperate soils. *J. Phycol.* 50 (5), 804–816.
- Karsten, U., Lütz, C., Holzinger, A., 2010. Ecophysiological performance of the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Charophyceae, Streptophyta) isolated from an alpine soil crust with an emphasis on desiccation stress. *J. Phycol.* 46 (6), 1187–1197.
- Karsten, U., Pröschold, T., Mikhailuyk, T., Holzinger, A., 2013. Photosynthetic performance of different genotypes of the green alga *Klebsormidium* sp. (Streptophyta) isolated from biological soil crusts of the Alps. *Algal Stud.* 142 (1), 45–62.
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30 (4), 772–780.
- Kitzing, C., Pröschold, T., Karsten, U., 2014. UV-induced effects on growth, photosynthetic performance and sunscreen contents in different populations of the green alga *Klebsormidium fluitans* (Streptophyta) from alpine soil crusts. *Microb. Ecol.* 67 (2), 327–340.
- Klebs, G., 1896. *Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen*. Gustav Fischer, Jena, Germany.

- Kostikov, I.Y., Romanenko, P.O., Demchenko, E.M., Darienko, T.M., Mikhailyuk, T.I., Rybchynskiy, O.V., Solonenko, A.M., 2001. Gruntovi vodorosti Ukrainy (istoria, metody doslidzhennya, systema, konspekt flory)[The soil algae of Ukraine (history and methods of investigations, system, list of taxa)]. Phitosotsiotsentr, Kyiv, Ukraine [in Ukrainian].
- Kranz, H.D., Miks, D., Siegler, M.L., Capesius, I., Sensen, C.W., Hass, V.A., 1995. The origin of land plants: phylogenetic relationships among charophytes, bryophytes, and vascular plants inferred from complete small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *J. Mol. Evol.* 41 (1), 74–84.
- Kützing, F.T., 1843. *Phycologia generalis: oder Anatomie, Physiologie und Systemkunde der Tange*. Brockhaus.
- Kützing, F.T., 1845. *Phycologia Germanica*. Köhne, Nordhausen, Germany.
- Kützing, F.T., 1849. *Species Algarum*. Brockhaus, Leipzig, Germany.
- Lokhorst, G.M., Star, W., 1985. Ultrastructure of mitosis and cytokinesis in *Klebsormidium mucosum* nov. comb., formerly *Ulothrix verrucosa* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 21 (3), 466–476.
- Lokhorst, G.M., 1996. Comparative taxonomic studies on the genus *Klebsormidium* (Charophyceae) in Europe. *Cryptogamic Stud.* 5, 1–55.
- Lukešová, A., 2001. Soil algae in brown coal and lignite post-mining areas in central Europe (Czech Republic and Germany). *Restor. Ecol.* 9 (4), 341–350.
- Lunch, C.K., LaFountain, A.M., Thomas, S., Frank, H.A., Lewis, L.A., Cardon, Z.G., 2013. The xanthophyll cycle and NPQ in diverse desert and aquatic green algae. *Photosynth. Res.* 115 (2–3), 139–151.
- Marin, B., Klingberg, M., Melkonian, M., 1998. Phylogenetic relationships among the Cryptophyta: analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences support the monophyly of extant plastid-containing lineages. *Protist* 149 (3), 265–276.
- Marin, B., Palm, A., Klingberg, M., Melkonian, M., 2003. Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist* 154 (1), 99–145.
- Mattox, K.R., 1968. (231) Proposal for the Conservation of the Generic Name *Hormidium* Klebs 1896 vs. *Hormidium* Kütz. 1843. *Taxon* 17, 442–443.
- Mattox, K.R., 1984. Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology. *Syst. Green Algae* 29–72.
- Mikhailyuk, T., 2008. Terrestrial lithophilic algae in a granite canyon of the Teteriv River (Ukraine). *Biologia* 63 (6), 824–830.
- Mikhailyuk, T., 2013. New for the flora of Ukraine and rare green and streptophycean algae from terrestrial habitats. *Ukr. Bot. J.* 70 (5), 655–663 [in Ukrainian].
- Mikhailyuk, T.I., Kondratyuk, S.Y., Nyporko, S.O., Darienko, T.M., Demchenko, E.M., Voytsekhovich, A.O., 2011. Lichen-forming fungi, bryophytes and terrestrial algae of granitic canyons of Ukraine. *Alterpress*, Kyiv, pp. 398.
- Mikhailyuk, T.I., Lukešová, A., Massalski, A., Friedl, T., 2013. Molecular phylogeny, taxonomy and biology of terrestrial algae of order Klebsormidiales (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) (In: *Molecular phylogeny and recent taxonomy of terrestrial spore plants*, Ed: S. Kondratyuk)—Nauk dumka Kyiv. *Molecular phylogeny and recent taxonomy of terrestrial spore plants*, pp. 95–145.
- Mikhailyuk, T., Glaser, K., Holzinger, A., Karsten, U., 2015. Biodiversity of *Klebsormidium* (Streptophyta) from alpine biological soil crusts (Alps, Tyrol, Austria, and Italy). *J. Phycol.* 51 (4), 750–767.
- Mikhailyuk, T., Holzinger, A., Massalski, A., Karsten, U., 2014. Morphology and ultrastructure of *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Streptophyta) with special reference to cell division and thallus formation. *Eur. J. Phycol.* 49 (4), 395–412.
- Mikhailyuk, T., Lukešová, A., Glaser, K., Holzinger, A., Obwegeser, S., Nyporko, S., Friedl, T., Karsten, U., 2018. New taxa of streptophyte algae (Streptophyta) from terrestrial habitats revealed using an integrative approach. *Protist* 169, 406–431.
- Mikhailyuk, T., Glaser, K., Tsarenko, P., Demchenko, E., Karsten, U., 2019. Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria. *Eur. J. Phycol.* <https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1557257>.
- Moshkova, N.A., 1979. Ulotrichales, Cladophorales. In: *Vyznachnyk prysnovodnykh vodorostej Ukrainskoj RSR*. Issue VI. Nauk. Dumka, Kiev, 498p (in Ukrainian).
- Nienow, J.A., 1996. Ecology of subaerial algae. *Nova Hedwig. Beih.* 112, 537–552.
- Novis, P.M., 2006. Taxonomy of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in New Zealand streams and the significance of low-pH habitats. *Phycologia* 45 (3), 293–301.
- Pröschold, T., Harris, E.H., Coleman, A.W., 2005. Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 170, 1601–1610.
- Rindi, F., Allali, H.A., Lam, D.W., López-Bautista, M., 2009. An overview of the Biodiversity and Biogeography of Terrestrial Green Algae. In: *Rescingo, V. (Ed.), Biodiversity Hotspots*. Nova Science Publishers, Inc, pp. 105–122.
- Rindi, F., Guiry, M.D., López-Bautista, J.M., 2008. Distribution, morphology, and phylogeny of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in urban environments in Europe. *J. Phycol.* 44 (6), 1529–1540.
- Rindi, F., Mikhailyuk, T.I., Sluiman, H.J., Friedl, T., López-Bautista, J.M., 2011. Phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Mol. Phylogenet. Evol.* 58, 218–231.
- Rindi, F., Ryšánek, D., Škaloud, P., 2017. Problems of epitypification in morphologically simple green microalgae: a case study of two widespread species of *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *FOTTEA* 17 (1), 78–88.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Ryšánek, D., Hřčková, K., Škaloud, P., 2015. Global ubiquity and local endemism of free-living terrestrial protists: phylogeographic assessment of the streptophyte alga *Klebsormidium*. *Environ. Microbiol.* 17 (3), 689–698.
- Ryšánek, D., Holzinger, A., Škaloud, P., 2016. Influence of substrate and pH on the diversity of the aeroterrestrial alga *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Streptophyta): a potentially important factor for sympatric speciation. *Phycologia* 55 (4), 347–358.
- Schulz, K., Mikhailyuk, T., Dreßler, M., Leinweber, P., Karsten, U., 2016. Biological soil crusts from coastal dunes at the Baltic Sea: cyanobacterial and algal biodiversity and related soil properties. *Microb. Ecol.* 71 (1), 178–193.
- Silva, P.C., Mattox, K.R., Blackwell Jr, W.H., 1972. The generic name *Hormidium* as applied to green algae. *Taxon* 639–645.
- Škaloud, P., Rindi, F., 2013. Ecological differentiation of cryptic species within an asexual protist morphospecies: a case study of filamentous green alga *Klebsormidium* (Streptophyta). *J. Eukaryot. Microbiol.* 60 (4), 350–362.
- Škaloud, P., Lukešová, A., Malavasi, V., Ryšánek, D., Hřčková, K., Rindi, F., 2014. Molecular evidence for the polyphyletic origin of low pH adaptation in the genus *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Plant Ecol. Evol.* 147 (3), 333–345.
- Sluiman, H.J., Guihal, C., Mudimu, O., 2008. Assessing phylogenetic affinities and species delimitations in Klebsormidiales (Streptophyta): nuclear-encoded rDNA phylogeny and ITS secondary structure models in *Klebsormidium*, *Hormidiella* and *Entransia*. *J. Phycol.* 44 (1), 183–195.
- Starr, R.C., Zeikus, J.A., 1993. UTEX—the culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures. *J. Phycol.* 29 (s2), 1–106.
- Stewart, K.D., Mattox, K.R., 1975. Comparative cytology, evolution and classification of the green algae with some consideration of the origin of other organisms with chlorophylls a and b. *Bot. Rev.* 41 (1), 104–135.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipitskiy, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30 (12), 2725–2729.
- Turmel, M., Otis, C., Lemieux, C., 2002. The chloroplast and mitochondrial genome sequences of the charophyte *Chaetosphaeridium globosum*: insights into the timing of the events that restructured organelle DNAs within the green algal lineage that led to land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (17), 11275–11280.
- Van der Gast, C.J., 2014. Microbial biogeography: the end of the ubiquitous dispersal hypothesis? *Environ. Microbiol.* 17 (3), 544–546.
- Wagner, H.P., Zaneveld, J.S., 1988. The Xanthophyceae and Chlorophyceae of the Western Ross Sea, Victoria Land, Antarctica and Macquarie Island collected under the direction of Prof. Dr. JS Zaneveld (1963–1967). *Blumea-Biodivers.* *Evol. Biogeography Plants* 33 (1), 141–180.
- Weber, B., Büdel, B., Belnap, J. (Eds.), 2016. *Biological Soil Crusts: An Organizing Principle in Drylands*, vol. 226 Springer.
- Wei, Y.-X., 1984. Some new green algae from Xizang (Tibet). *Acta Phytotaxonomica Sinica* 22 (5 figs), 321–336.
- Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31 (13), 3406–3415.
- Zwickl, D.J., 2006. *Genetic Algorithm Approaches for the Phylogenetic Analysis of Large Biological Sequence Datasets Under the Maximum Likelihood Criterion* (Doctoral Dissertation). The University of Texas at Austin.

2.3. Молекулярна філогенія, таксономія, різноманіття та біологія роду
Interfilum

NEW STREPTOPHYTE GREEN ALGAE FROM TERRESTRIAL HABITATS
 AND AN ASSESSMENT OF THE GENUS *INTERFILUM*
 (KLEBSORMIDIOPHYCEAE, STREPTOPHYTA)¹

Tatiana I. Mikhailyuk

M.H. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereshchenkivska St. 2, Kyiv, UA-01001, Ukraine

Hans J. Sluiman

Royal Botanic Garden Edinburgh, 20A Inverleith Row, Edinburgh EH3 5LR, Scotland, UK

Andrzej Massalski

Jan Kochanowski University of Humanities and Sciences, Institute of Biology, Department of Botany, Świetokrzyska St. 15, PL-25-406, Kielce, Poland

Opayi Mudimu

Experimental Phycology and Culture Collection of Algae, Georg-August University Göttingen, Untere Karspüle 2, 37073 - Göttingen, Germany

Eduard M. Demchenko

Department of Botany, Taras Shevchenko Kyiv National University, Volodymyrska St. 64, Kyiv, UA-01017, Ukraine

Sergej Ya. Kondratyuk

M.H. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereshchenkivska St. 2, Kyiv, UA-01001, Ukraine

and *Thomas Friedl*²

Experimental Phycology and Culture Collection of Algae, Georg-August University Göttingen, Untere Karspüle 2, 37073 Göttingen, Germany

Sarcinoid aeroterrestrial green algae were isolated from three arid locations in Ukraine and the Czech Republic. Although gross morphology suggested an affinity with *Desmococcus* (for taxonomic authorities, see Table S1 in the supplementary material), the cellular morphological characteristics were reminiscent of those of *Geminella terricola*. However, the presence of a complex of ultrastructural features indicated that these isolates were members of the streptophyte lineage in the green plants. 18S rDNA sequence phylogenies provided evidence of a close relationship with *Klebsormidium* in the Streptophyta, while the position of *Desmococcus* was within the Trebouxiophyceae. In the internal transcribed spacer (ITS) rDNA phylogeny, the sarcinoid isolates were closely related with strains of *G. terricola* and *Interfilum paradoxum*. Strains of that clade were morphologically united by a specific type of cell division that involves the association of persistent, cap-shaped remains of the mother cell wall with daughter cells. Consequently, these strains were assigned to a redefined genus *Interfilum*, and a new species, *I. massjukiae*, was described to accommo-

date one of the sarcinoid isolates. As the position of the genus *Geminella* was in the Trebouxiophyceae, the streptophyte *G. terricola* was transferred to *Interfilum*, as *I. terricola* comb. nov., but the ITS rDNA analyses proved inconclusive to resolve its affinities with other species of *Interfilum* due to intragenomic polymorphisms. The species of *Interfilum* had a closer relationship with *K. flaccidum* than with other species of *Klebsormidium*. The latter genus may not be monophyletic in its present circumscription.

Key index words: *Desmococcus*; *Geminella*; *Interfilum*; intron; *Klebsormidium*; morphology; rDNA; Streptophyta; Trebouxiophyceae; ultrastructure

Abbreviations: ACKU, Algal Culture Collection at Kyiv University, Ukraine; AIC, Akaike information criterion; DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis; ITS, internal transcribed spacer; ME, minimum-evolution distance; ML, maximum likelihood; MP, maximum parsimony; NJ, neighbor joining; RI, rescaled consistency index; SAG, Culture Collection of Algae at Göttingen University, Germany; TBR, tree-bisection-reconnection branch swapping; UTEX, The Culture Collection of Algae at the University of Texas

¹Received 11 December 2007. Accepted 19 June 2008.

²Author for correspondence: e-mail tfriedl@uni-goettingen.de.

The identification of filamentous and sarcinoid green algae generally presents a challenge for most algal systematists and ecologists due to the scarcity of visual characters that are available for diagnostic purposes and the less than perfect taxonomies that are available for these groups. Recent molecular studies have led to the recognition that there is rampant morphological homoplasy in these groups and that only a tiny proportion of the genetic diversity that is revealed by DNA sequencing can be captured by microscopic observation of cellular and reproductive features. The general lack of understanding of the taxonomic diversity in these groups not only creates difficulties when attempting to accurately assess the species richness of habitats that they dominate, such as soil and other terrestrial habitats, but also leads to a significant underestimation of the number of species of coccoid and sarcinoid algae that exist. Relatively new technologies, such as separation of PCR amplified rDNA from heterogeneous environmental samples with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), have shown considerable promise to help reveal more of the genetic diversity of microbial and microalgal communities, and the results of these analyses can be useful pointers for microscopists to identify morphological diagnostic markers that were previously overlooked (Head et al. 1998, Diez et al. 2001, Sigler et al. 2003). However, despite the increasing popularity of and dependency on molecular genetic methods to catalogue the taxonomic diversity of microalgae, discoveries of new taxa by careful observations of experienced microscopists still occur.

An example of new green microalgae that were discovered recently by careful microscopical screening of natural samples are aerophytic organisms that were isolated from rock outcrops of the steppe zone and Mountain Crimea in Ukraine, and from soil in the Czech Republic. While showing morphological similarity in cellular structure to the filamentous green alga *G. terricola*, their sarcinoid packets were reminiscent of those typically produced by *Desmococcus*. To assess their taxonomic affinities and phylogenetic relationships within the green algae more accurately, we undertook a detailed study involving LM and TEM as well as rDNA sequence analyses. The results of these studies represent the main subject of this paper. They led to the conclusion that the three new sarcinoid isolates as well as an isolate of *G. terricola* are representatives of the genus *Interfilum*. The two Ukrainian isolates had previously been assigned to a new genus *Massjukia* (as *M. desmococcoidea*, Mikhailiuk et al. 2005). Ultrastructural and rDNA sequence evidence indicated that *Interfilum* belongs to the streptophycean lineage in the green algae, with a close relationship with *Klebsormidium*, *Hormidiella*, and *Entransia*. These conclusions applied also to strains from the SAG culture collection that represented *I. paradoxum* and to an unidentified strain of the genus. To accommodate

these new observations in a new taxonomic framework, the diagnosis of the genus *Interfilum* and that of the type species *I. paradoxum* were emended, and one of the new isolates was assigned to a new species, *I. massjukiae* sp. nov. Finally, the diagnosis of *G. terricola* was emended, and this species was transferred to *Interfilum* as *I. terricola* comb. nov.

MATERIALS AND METHODS

Culture strains. Two isolates with sarcinoid growth habit isolated from subaerial outcrops in Ukraine, a third sarcinoid isolate from soil in the Czech Republic, and a new isolate representing *G. terricola* (see Table S1 for details about the localities) were the focus of this study. The four strains have been accessioned by the SAG culture collection as strains SAG 2101, SAG 2102, SAG 2147, and SAG 2100. The strains representing *G. terricola* and the two sarcinoid strains from Ukraine are also available from the ACKU culture collection at Kyiv University (Table S1). For comparisons at the morphological and molecular levels, additional strains representing the genera *Interfilum*, *Klebsormidium*, and *Geminella* were used as listed in Tables S1 and S2 (in the supplementary material).

Culture conditions, microscopy, ultrastructure. The cultures were maintained in agar slants with Bold Basal Medium with vitamins and triple nitrate (Starr and Zeikus 1993) at 18°C under a light:dark (L:D) regime of 14:10 and a photon fluence rate of ~25 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ from white fluorescent bulbs. Microscopic observation was accomplished using an Olympus BX60 microscope (Tokyo, Japan) with Nomarski DIC optics and with a LOMO Mikmed-2 bright field microscope (St. Petersburg, Russia) on cultures not older than 5 weeks. Micrographs were taken with the Olympus BX60 microscope with an attached ColorView III camera (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany) and processed with the CellAD image programme (Soft Imaging System GmbH). Mucilage of algal cells was stained with an aqueous solution of methylene blue.

For TEM, colonies were removed with a spatula from the surface of 1- to 2-month-old agar cultures, fixed for 1 h in 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.1 at room temperature, and processed further according to Massalski et al. (1995).

DNA extraction, PCR amplification, and sequencing. The strains for which rDNA sequences were determined in this study are listed in Tables S1 and S2. DNA was extracted from the strains listed in Tables S1 and S2 using the Invisorb Spin Plant Kit (Invitek, Berlin, Germany) as recommended by the manufacturer after cells were broken in a 2 mL microcentrifuge tube three-fourths filled with 425–600 μm glass beads using a MiniBeadBeater (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) at 38,000–50,000g for 30–50 s. Nuclear-encoded 18S rDNAs were amplified using primers NS1 and 18L (Hamby et al. 1988), and for amplification of the ITS-1, 5.8S, and ITS-2 regions, primers NS7m and LR1850 (Friedl 1996) were used. For some strains, an rDNA region containing the 18S, ITS-1, 5.8S, and ITS-2 regions was amplified using the primers NS1 and LR1850 (Friedl 1996). In case of a culture contaminated with fungi, the PCR products were cloned (see below), and the clone sequences checked for their algal origin using the BLASTn search tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As an alternative, a PCR primer that preferentially binds to a region at the 3'-end of algal 18S rDNAs, LR 1650 (5'-TCACCAGCACACCCAAT-3'), combined with primer NS1 was used to amplify the algal 18S rDNA, or primer combination AL1500af (Helms et al. 2001) and LR1850 to amplify the algal ITS-1–5.8S–ITS-2 regions. The PCRs took place in a 50 μL volume containing 2 U of Bioline-DNA-polymerase in 1 \times PCR buffer (Bioline, Luckenwalde,

Germany), 2 μ L 2 mM $MgCl_2$, 100 μ M of dNTP mix, the two primers (each 2 μ L 0.5 μ M), and \sim 30 ng of the extracted DNA. PCR conditions were as follows: initial denaturation for 5 min at 95°C followed by 30 cycles of denaturing at 94°C for 30 s, annealing at 52°C for 30 s, and extension at 72°C for 120 s. A final extension at 72°C for 10 min completed the PCR. The size and yield of the PCR products were analyzed by electrophoresis in a 1% agarose gel stained with Gelstar[®] (Lonza, Basel, Switzerland). The positive PCR products were pooled, purified using the NucleoSpin-Extract-Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and eluted in 30 μ L elution buffer provided by the kit. For cloning, the purified PCR products were ligated into the PCR[®] 2.1-TOPO[®]-vector-system (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and cloned in *E. coli* TOP 10. Plasmid DNA was extracted from positive clones with the NucleoSpin-Plasmid-Kit and was used as template for sequencing reactions. Cycle sequencing was performed using the Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the following PCR conditions: initial denaturation for 1 min at 96°C followed by 35 cycles of denaturing at 96°C for 30 s, annealing at 50°C for 45 s, and extension at 60°C for 180 s. For the 18S rDNA sequencing, a set of nested standard primers (Elwood et al. 1985) was used, for the ITS-1–5.8S–ITS-2 regions the primers 1800F (Friedl 1996), 5.8SbF (5'-CGATGAAGAACGCAGCG-3'), 5.8SbR (5'-CGCTGCGTTCCTCATCG-3'), and ITS4 (White et al. 1990). When no clear sequences of the ITS-1–5.8S–ITS-2 regions were obtained from sequencing the PCR products, they were cloned, and \sim 15 positive clones were sequenced. Sequencing reactions were separated on an ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) automated sequencer. The sequences were assembled using the programme SeqAssem (Hepperle 2004). All sequences determined in this study were deposited in GenBank (accession numbers EU434016–EU434040, Tables S1, S2).

Sequence alignment. To assess the phylogenetic position of three new sarcinoid isolates, *G. terricola* SAG 2100 and the two strains of *I. paradoxum* available from the SAG culture collection their 18S rDNA sequences were compared to a broad selection of corresponding sequences from members of the Streptophyta and Chlorophyta. This analysis also included newly determined sequences for *Geminella* and *Desmococcus* as well as other trebouxiophyte green algae (Table S2). The selection of sequences was based on a phylogenetic tree comprising an expanded sample of >1,500 rDNA sequences from green algae and embryophytes, which is available in the 18S rDNA sequence database maintained in the ARB program (version 05.05.26, Ludwig et al. 2004, <http://www.arb-home.de>). This database was updated with all currently available 18S rDNA sequences from streptophyte green algae and Chlorophyta. The newly determined sequences were added to the database using the parsimony interactive tool in ARB. The alignment was refined by comparing the sequences with their next relatives from the ARB database based on their pairing across a helix using secondary structure models as implemented in ARB. This program generates an MP tree from all sequences and all positions in the database as its reference tree, using a filter based on 50% base frequency across all species. A subset of these sequences comprising a total of 55 representatives of streptophyte green algae, embryophytes (8 sequences), prasinophyte green algae, Trebouxiophyceae, and two glaucophytes (as outgroup taxa) were then downloaded from the ARB database for further analyses using the 50% base frequency filter. The sequence alignment was 1,711 nucleotides long, of which 678 positions were variable and 474 parsimony informative. Because in the 18S rDNA phylogeny the sarcinoid isolates, *G. terricola* SAG 2100 and strains of *Interfilum paradoxum* were nested within a clade otherwise comprising strains and species of *Klebsormidium* and no resolution was found within that clade due to only minor

sequence differences, their ITS-1–5.8S–ITS-2 rDNAs were compared with corresponding sequences of *Klebsormidium* and phylogenetically analyzed. For the ITS rDNA data set, secondary structure models for ITS-1 and ITS-2 of the new sequences were constructed. Using these models, the new sequences were then aligned to the alignment of *Klebsormidium* ITS rDNAs of Sluiman et al. (2008) (EMBL, <http://www.ebi.ac.uk>, accession no. ALIGN_001122). The ITS rDNA data set also included four sequences newly determined for *K. flaccidum* and an unidentified *Klebsormidium* strain (Table S2). This data set comprised the ITS-1 and ITS-2 rDNA regions for a total of 24 taxa and was 551 nucleotides long, of which 121 positions were variable and 78 parsimony informative. The SSU and ITS alignments used in this study are available from EMBL Align (<http://www.ebi.ac.uk>), accession numbers ALIGN_001255 and ALIGN_001256.

Phylogenetic analyses. The 18S and ITS rDNA sequence data sets were subjected to minimum-evolution (ME), maximum-parsimony (MP), and maximum-likelihood (ML) approaches with the programmes PAUP* version 4.0b10 (Swofford 2001) or MrBayes version 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist 2001, Ronquist and Huelsenbeck 2003). For the model-based approaches ME and ML, a likelihood ratio test using MODELTEST version 3.7 (Posada and Crandall 1998; Akaike information criterion [AIC]) was performed to determine the model that fits the observed data best. For the 18S rDNA data set, the selected model was Tamura and Nei (TrN+I+G; Tamura and Nei 1993) with estimations of nucleotide frequencies (A = 0.2525, C = 0.2205, G = 0.2759, T = 0.2511), a rate matrix with six different substitution types, assuming a heterogeneous rate of substitutions with a gamma distribution of variable sites (number of rate categories = 4, shape parameter α = 0.5801) and a proportion of invariable sites (pinvar) of 0.3734. For the ITS-1,2 rDNA data set, the selected model was a general-time-reversible model (GTR+G; Tavaré 1986) with estimations of nucleotide frequencies (A = 0.2005, C = 0.3066, G = 0.3048, T = 0.1881), a rate matrix with six different substitution types, assuming a heterogeneous rate of substitutions with a gamma distribution of variable sites (number of rate categories = 4, shape parameter α = 0.3402) without a proportion of invariable sites (pinvar = 0). For the distance analyses, two different methods were used, that is, NJ (Saitou and Nei 1987) in connection with the “HKY85 model” (Hasegawa et al. 1985) and ME (Rzhetsky and Nei 1992). ME distance trees were constructed with DNA distances set to ML, and a heuristic search procedure with 10 random input orders and tree-bisection-reconnection branch swapping (TBR) were employed to find the best tree. Best scoring trees were held at each step. In MP analyses, the sites were weighted (rescaled consistency index [RI] over an interval of 1–1,000). The heuristic search for the best tree was the same as in ME analyses. Bootstrap resampling was performed on NJ trees with 2,000, for ME (only ITS rDNA data set) and MP with 1,000 replications. Due to CPU time constraints, bootstrapping in ME analyses was not possible for the 18S rDNA data set. For the ML method, two approaches were used. The ML trees shown in Figures 6 and 7 (with $-\ln$ likelihoods of 12755.4585 and 1733.9832) were calculated with PAUP using best-fit models as determined above and used as input for three additional rounds of ML analyses to search for trees with smaller $-\ln$ likelihoods, but trees with better likelihood scores were not obtained. The other approach was Bayesian analysis performed in MrBayes with a GTR+I+G model (rate matrix with six different substitution types, number of rate categories = 4, and with the nucleotide frequencies, shape parameter α , and pinvar estimated from the data). Four Markov chains and 2,000,000 generations sampling every 100 generations were used with the first 25% of the sampled trees discarded, leaving 15,000 trees. Posterior probabilities were then calculated from two

independent runs using the 50% majority-rule consensus of the kept trees.

RESULTS

Morphology and ultrastructure. Isolates SAG 2101, SAG 2102, and SAG 2147 were characterized by the ability to form cell packages (Figs. 1, 2). In strains SAG 2102 and SAG 2147, large sarcinoid aggregations as well as long uni- and biserial filaments were expressed prominently, particularly in cultures older than 3 weeks (Figs. 1, e, f, h; 2g). Strain SAG 2101, however, only rarely formed single packets and short biserial filaments (Fig. 2, a, b, f) as unicells (Fig. 2, b, d, e) or short uniseriate filaments (Fig. 2c) prevailed. Vegetative cells of the sarcinoid strains had a very similar size and morphology (Figs. 1, 2). A single parietal, plate-shaped chloroplast was positioned to one side of the cell and had lateral incisions resulting in 5–8 lobes (Figs. 1, c, d, g; 2, a, b, f, g). The center of the chloroplast contained one pyrenoid, surrounded by 8–10 small elongated starch grains, which were oriented parallel to the longitudinal axis of the cell and were sometimes arranged in layers (Figs. 1, a, c, d, g; 2, b, f). Cells contained a single nucleus situated opposite the pyrenoid (Fig. 1c). Various stages of cell division and the formation of cell packages were observed in cultures of different ages. Briefly, the protoplast divided into two parts, each forming a new cell wall within the mother cell wall. Then the latter ruptured in the middle (aequatorially) and split into two equal halves. The mother cell halves became separated during expansion of the daughter cells. As a result, the daughter cells were capped by the mother cell wall “halves” (Figs. 1b; 2, c–e). Sometimes the mother cell wall halves further disintegrated due to the continuous growth of the daughter cells, resulting in a ring-like structure around the daughter cell (Fig. 3d). Sarcinoid packages were formed when this process was repeated during subsequent division cycles and successive division planes were perpendicular to the previous ones. In cell packages, the remains of the mother cell walls mostly remained closely associated with the daughter cell walls, resulting in an integrated wall structure without intervening spaces and in which no remains of the mother cell wall were visible (Fig. 1, c and d). Only in cases when the cell packages started to disintegrate were wall remains visible as tiny wedges (Fig. 1b), especially after methylene blue staining (Fig. 2, c–e). In strain SAG 2101, the remains of mother cell walls appeared to gelatinize because methylene blue stained the mucilaginous remains of the mother cell wall more intensely than the thin mucilage envelope of the daughter cells (Fig. 2, c–e). The layer of mucilage on daughter cells was ~0.3–0.5 μm thick and had a pattern of radiating striations (Fig. 2, c–e). No mucilage was discernable in strains SAG 2102 and SAG 2147.

In *G. terricola* strain SAG 2100 vegetative cells had a morphology that was virtually identical to that observed in the three sarcinoid isolates (Fig. 3). However, the cells were sometimes more elongated, oviform, or slightly cylindrical (Fig. 3, a, b, c, g). In long cells, sometimes two prominent terminal vacuoles were visible, with the nucleus situated in a cytoplasmic bridge located between the vacuoles (Fig. 3g). The cells had a thin (~1–3 μm) mucilaginous envelope in which, as in SAG 2101, a pattern of radial striations was visible (Fig. 3, c, d, f). Cells formed uniseriate short filaments that readily disintegrated into diads and unicells (Fig. 3). The process of cell division appeared to be the same as in the sarcinoid strains except that division occurred only in one plane. Mother and daughter cell walls adhered so closely to one another that the cell wall appeared as a single integrated structure (Fig. 3, a and b). Remains of mother cell walls appeared as small wedges at the sides of cell (Fig. 3, a and b) or after methylene blue staining (Fig. 3, c–f, h). The mucilaginous material formed after gelatinization of these walls was striated (Fig. 3, c, d, f).

I. paradoxum strains SAG 338-1 and SAG 4.85 had a cellular morphology that was virtually identical to that of the sarcinoid isolates SAG 2101, SAG 2102, and SAG 2147 and *G. terricola* SAG 2100 (Fig. 4). As in *G. terricola*, cells of *I. paradoxum* divided in one plane only, forming short uniseriate filaments that often disintegrated into diads or unicells (Fig. 4). However, a unique feature of these strains was that the remains of the mother cell wall did not adhere closely to the daughter cells. Instead, remains of mother cell walls were often separated from the daughter cells, giving rise to anastomosing structures that connected daughter cells (Fig. 4, b–d, f–h), or were simply discarded (Fig. 4, a, e, j). Cells of *I. paradoxum* were surrounded by a thin (~0.5–1 μm) mucilaginous envelope with a radial structure after staining with methylene blue (Fig. 4, e and i). There were only minor differences between *I. paradoxum* strains SAG 338-1 and SAG 4.85, that is, in the size and shape of the cells (Fig. 4f).

EM. The ultrastructure of vegetative cells of the two sarcinoid strains SAG 2101 and SAG 2102, and the weakly filamentous *G. terricola* SAG 2100 and *I. paradoxum* SAG 338-1 were observed to be virtually identical (Fig. 5). The chloroplast was located at one side of the cell, covering half of the cell's volume (Fig. 5, a and f). The pyrenoid matrix was traversed by an array of parallel thylakoid bands, which sometimes formed loops (Fig. 5, a, d, g). Between the nucleus and chloroplast, a microbody (peroxisome) was located that had a slightly curved bacilliform shape in cross-sections (Fig. 5, b, d, f, g). The mitochondrion was single, curved, and slightly branched. It was associated with the chloroplast, the nuclear envelope, and perhaps the microbody (Fig. 5, d, f). The strains differed slightly in the cell wall ultrastructure: vegetative cells of strain SAG

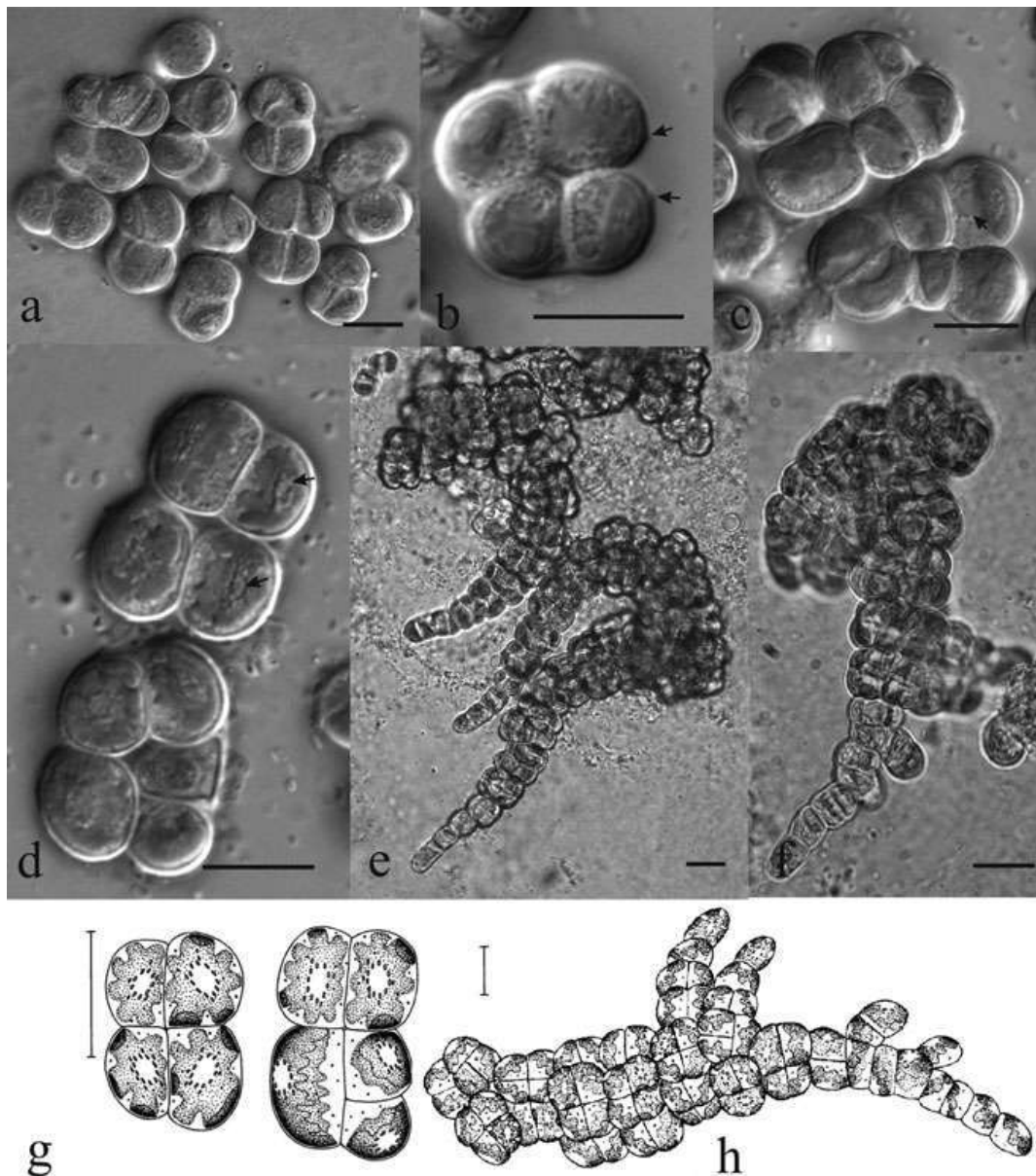


FIG. 1. Morphology of strain SAG 2102 (*Interfilum massjukiae* sp. nov.). (a) Cell packets in young culture. (b) Disintegrating cell package with remains of the mother cell wall (arrows). (c, d) Cell packages with details of cell morphology showing location of nucleus directly opposite the pyrenoid (arrows in c) and lobed chloroplast with pyrenoid surrounded by numerous starch grains (arrows in d). (e, f) Large sarcinoid aggregations and uni- and biserial filaments in a 3-week-old culture. (g, h) Interpretative drawings showing cell packages and chloroplast morphology in a young culture (g), and sarcinoid and filamentous aggregation of cells (h). Scale bars, 10 μ m.

2102 had a thick cell wall with a unique layered-lacunar structure without a mucilage envelope (Fig. 5, a and c), whereas the cell walls of the other strains had a homogeneous structure and were surrounded by a clear mucilage envelope with radial striations (Fig. 5, e and f).

Phylogenetic analysis of rDNA sequences. Comparisons of 18S rDNA sequences suggested a close relationship of the three new sarcinoid isolates and *G. terricola* SAG 2100 with strains of *Interfilum* and

Klebsormidium. The 18S rDNA sequences of strain SAG 2101, *G. terricola* SAG 2100, *I. paradoxum* SAG 338-1 and SAG 4.85 were identical, apart from the presence/absence of a group I intron in some sequences (see below). Comparison of this invariant exon region with the 18S rDNA of the sarcinoid strains SAG 2102 and SAG 2147 revealed two and five differences, respectively. All six strains had no more than 3–7 base differences when compared with the 18S rDNA regions of *Klebsormidium* spp.

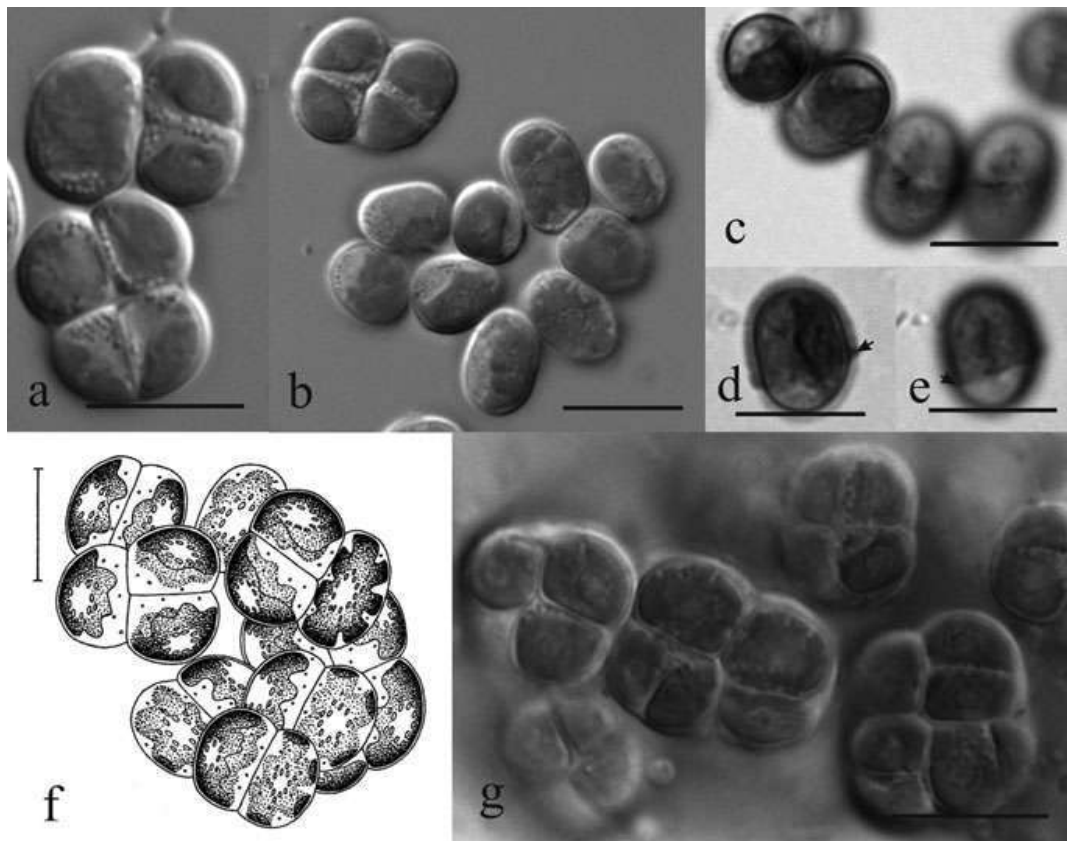


FIG. 2. Morphology of strains SAG 2101 and SAG 2147 (*Interfilum* sp.). (a–f) SAG 2101. (g) SAG 2147. (a, b) Cell packets and unicells in a 3-week-old culture. Note chloroplast with lobes and central pyrenoid (b, right half). (c–e) Diads and unicells in different optical sections after staining with methylene blue showing cap-like remains of mother cell wall closely associated with daughter cells (arrows) and gelatinized cell walls with striations. (f) Interpretative drawing of cell packages in a young culture showing chloroplast morphology. (g) Sarcinoid packets and cubic aggregations in a 3-week-old culture. Note lobed chloroplast with central pyrenoid. Scale bars, 10 μ m.

Interestingly, there were no more than one or three synapomorphic sequence differences between the six strains and *Klebsormidium* spp. In the six strains, an A was located in a loop in the V5 region of the 18S rRNA secondary structure model (Wuyts et al. 2000, Ueno et al. 2007), that is, at pos. 1619 of the SAG 2102 18S rDNA sequence, corresponding with a G in all *Klebsormidium* spp. Strains of *Klebsormidium* other than *K. flaccidum* were characterized by a double-sided compensatory base substitution (CBS) in stem E32-1 of the V4 region (at pos. 1068 and 1097 of the SAG 2102 18S rDNA sequence) where a C-G pair was exchanged for a U-A.

Phylogenetic analyses of the 18S rDNA sequences (Fig. 6) showed that two of the three sarcinoid isolates, SAG 2102 and SAG 2147, and *I. paradoxum* SAG 338-1 (representing a group of identical exon sequences, that is, from strains SAG 2100, SAG 2101, and SAG 4.85) formed a clade together with strains of *Klebsormidium* in the Streptophyta. The clade received high support in bootstrap and Bayesian analyses, and *Entransia fimbriata* and *Hormidiella attenuata* were resolved as closest relatives. Two

strains of *Desmococcus* (SAG 1.92, SAG 25.92), which have a similar growth habit as the three sarcinoid isolates, were positioned within the Trebouxiophyceae. The *Desmococcus* strains shared a single origin and were a sister-group of two strains of *Stichococcus bacillaris*, SAG 335-3 and SAG 379-1b. In contrast to strain SAG 2100, identified as *G. terricola*, which was a member of Streptophyta, all other *Geminella* strains including two that represented *G. interrupta*, the type species of the genus (SAG 9.91 and SAG 9.97), were placed within a lineage in the Trebouxiophyceae. This lineage also contained strain SAG 20.91, previously assigned to *G. terricola*. A sequence accessioned in GenBank as AF387153 reportedly representing “*Microspora stagnorum*” SAG 51.86 was also placed within the trebouxiophyte clade representing *Geminella*; it was almost identical to our newly determined sequence of *Geminella* sp. SAG 20.84 (GenBank accession EU434025). Interestingly, the latter strain had been sequenced previously (GenBank accession AF387157), but that sequence was positioned firmly within the *Klebsormidium* clade of the Streptophyta (Fig. 6). Microscopic

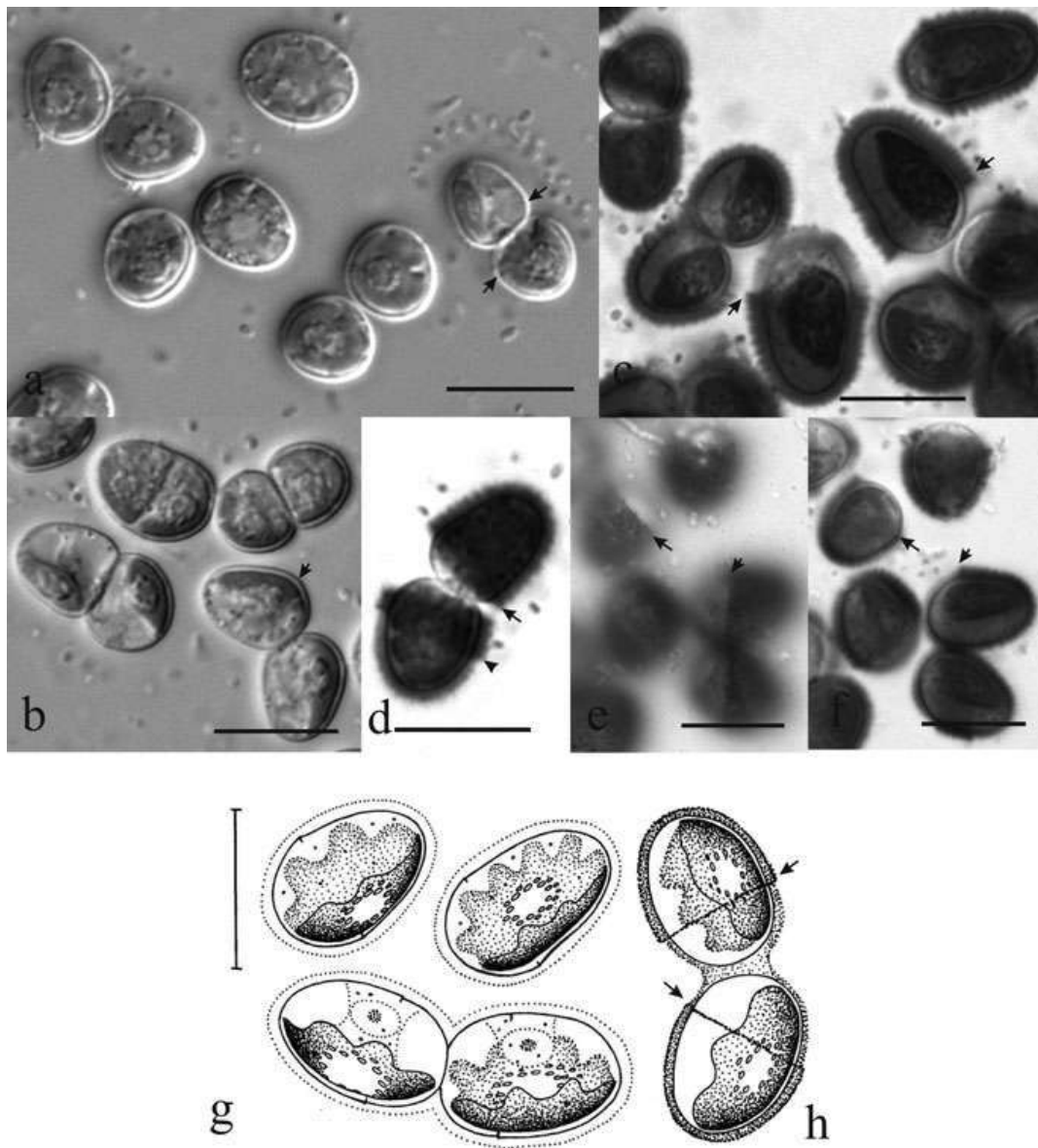


FIG. 3. Morphology of *Geminella terricola* (*Interfilum terricola* comb. nov.) strain SAG 2100. (a–b) Single vegetative cells and diads with ellipsoidal-ovoid shape. Note lobed chloroplast with central pyrenoid and remains of mother cell walls as projections at the sides of cell (arrows). (c–f) Diads and unicells after staining with methylene blue in different optical sections. Cap-like (arrows) and ring-like (d, arrow-head) gelatinized and striated remains of mother cell walls are closely associated with daughter cells. (g–h) Interpretative drawings. (g) Single vegetative cells and details of cellular morphology. (h) Diad of cells after methylene blue staining revealing the cap-like remains of the mother cell wall (arrows). Scale bars, 10 μ m.

analysis of strain SAG 51.86 revealed features that are characteristic for *Klebsormidium* (e.g., the chloroplast shape and parallel arrangement of starch grains around the pyrenoid), which is at variance with the position of its sequence within the Trebouxiophyceae. We therefore resequenced strain SAG 51.86, and a comparison of its 18S rDNA sequence (GenBank accession EU434028) confirmed a close relationship with *Klebsormidium* spp. (Fig. 6). This finding suggested that the earlier

sequences, AF387157 and AF387153, had been wrongly assigned to SAG 20.84 and SAG 51.86.

Group I introns at *E. coli* position 516 were present in the SSU rDNAs of all three sarcinoid strains, SAG 2101, SAG 2102, SAG 2147, and *I. paradoxum* SAG 338-1 but were absent in *G. terricola* SAG 2100 and *I. paradoxum* SAG 4.85. The 516 intron sequence of SAG 2101 was identical with that of *I. paradoxum* SAG 338-1. The corresponding intron of strain SAG 2102, however, was longer (432 bp) than

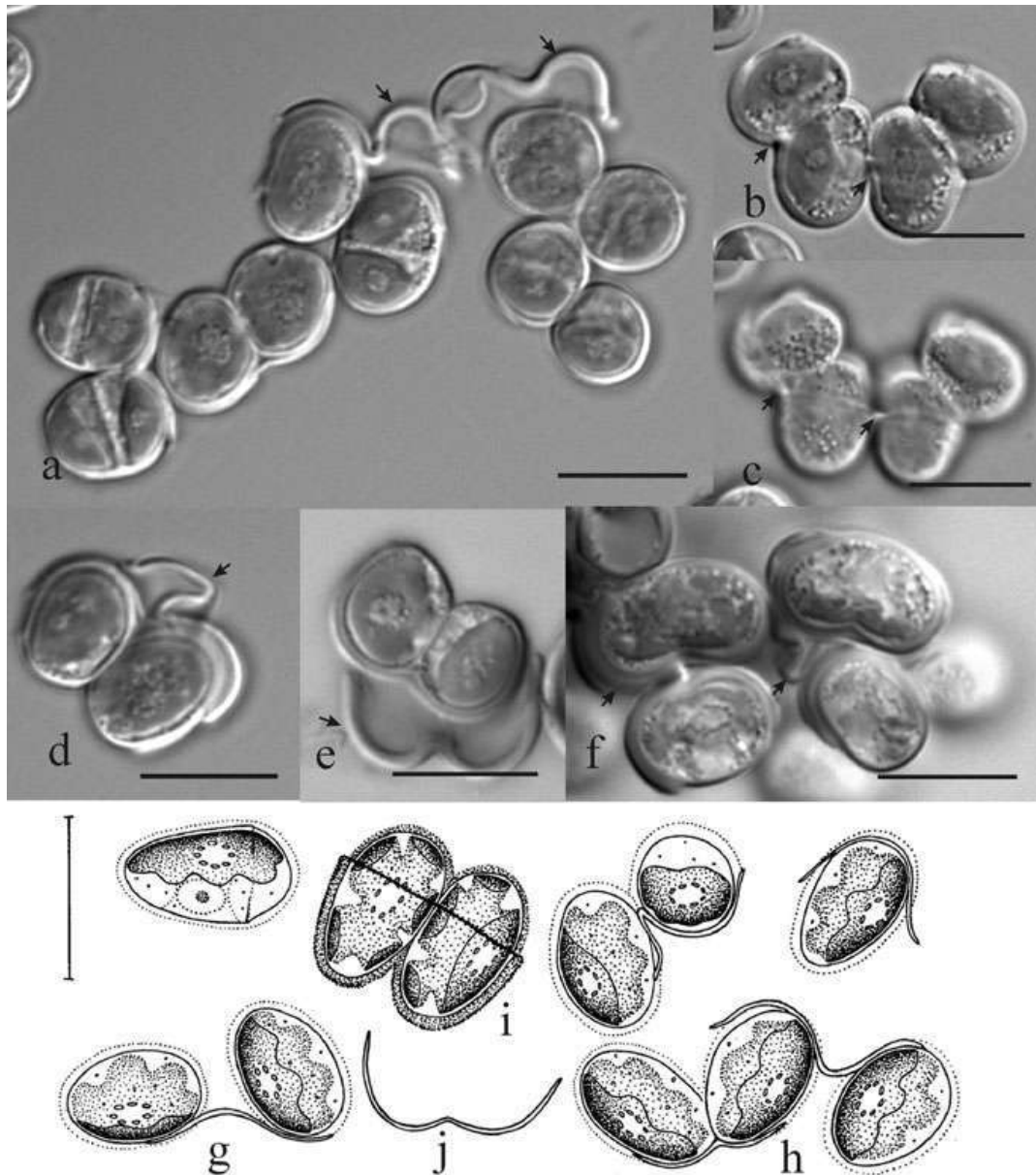


FIG. 4. Morphology of *Interfilum paradoxum* strains SAG 338-1 and SAG 4.85. (a–e, g–j) SAG 338-1. (f) SAG 4.85. (a) Unicells and diads with exfoliated mother cell walls (arrows) and details of cellular morphology. (b, c) Cells connected by remains of mother cell walls (arrows) in a four-celled filament in different optical sections. (d) Diad of cells with exfoliated remains of mother cell wall (arrow). (e) Diad of cells stained with methylene blue. Note remains of mother cell wall (arrow). (f) Elongated vegetative cells connected to each other by mother cell wall remains (arrows). (g–j) Interpretative drawings of single vegetative cells, diads connected by mother cell wall remains, details of cellular morphology (g, h, i), and a discarded remain of the mother cell wall (j). Cells shown at (i) were stained with methylene blue. Scale bars, 10 μ m.

in SAG 2101/SAG 338-1 and SAG 2147 (401 bp and 378 bp). This was due to different lengths in the terminal loops of the P2, P5, P8, and P9.2 regions of the secondary structure model (Cech et al. 1994). Interestingly, the SAG 2102 intron was almost identical in its primary structure with that of the corresponding intron from *K. nitens* SAG 335-2b (AM490844), except for length differences located

in the P2 and P9.2 regions. The results of a phylogenetic analysis of green algal 516 introns will be published separately, but preliminary studies showed that the introns occurring in strains SAG 2101, SAG 2102 and *I. paradoxum* SAG 338-1 formed a robust clade together with the position 516 introns in *Klebsormidium* (H. J. Sluiman, unpublished). The 516 introns found elsewhere in the green algae, that

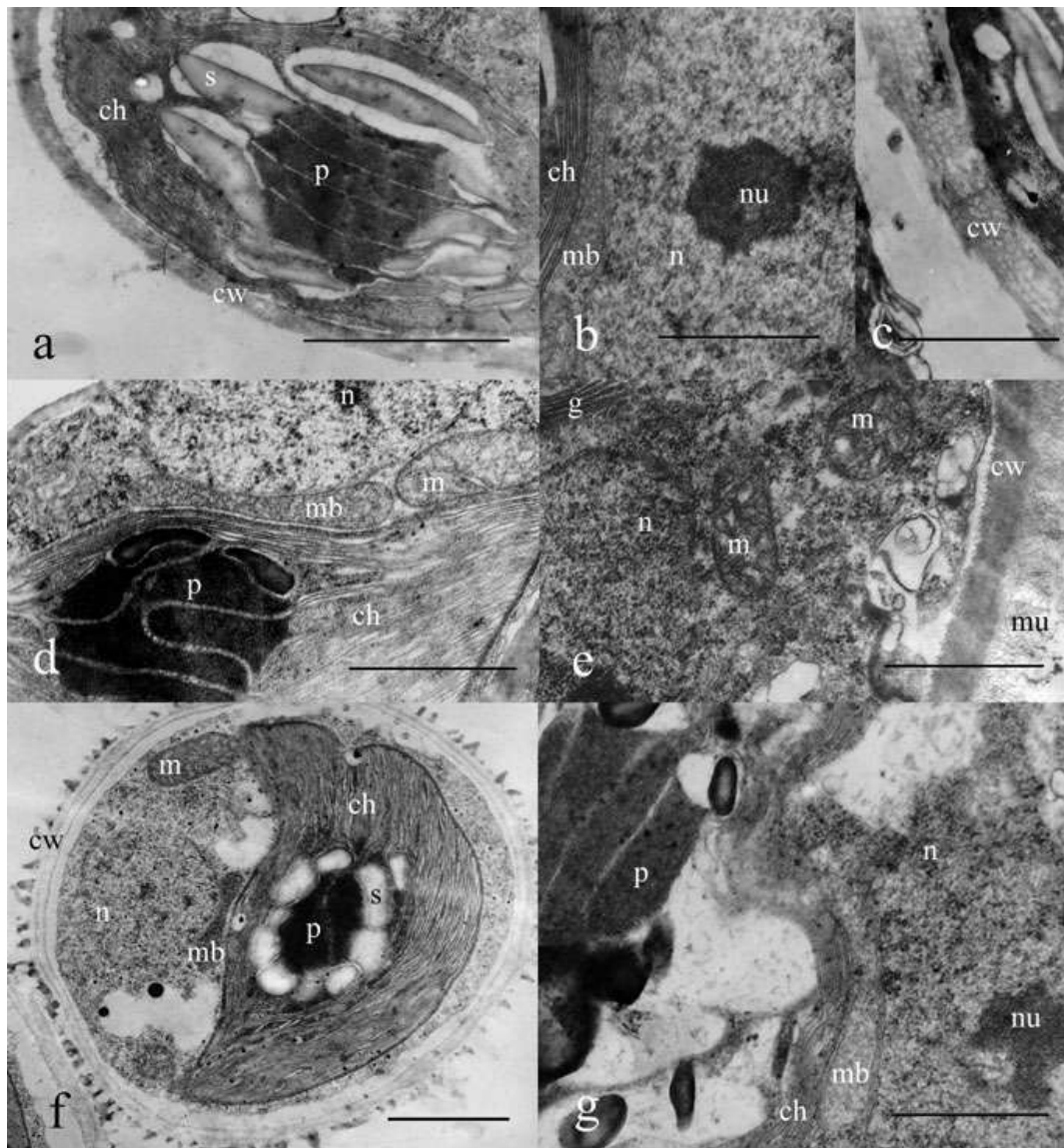


FIG. 5. Transmission electron micrographs of vegetative cells of strains *Interfilum massjukiae* sp. nov. SAG 2102, *Interfilum* sp. SAG 2101, *Interfilum terricola* comb. nov. SAG 2100, and *I. paradoxum* SAG 338-1. (a–c) SAG 2102. (a) Portion of cell showing the pyrenoid whose matrix is traversed by parallel thylakoids and associated starch grains. Note the absence of extracellular mucilage. (b) Section showing a microbody situated between the chloroplast and the nucleus. (c) Section showing a cell wall without mucilage and exhibiting a layered-lacunar structure. (d, e) SAG 2101. (d) Section showing a chloroplast containing a pyrenoid whose matrix is traversed by parallel thylakoid bands and loops and the chloroplast-nucleus-microbody-mitochondrion (CMNM) complex. (e) Cell wall with mucilage (right) and portion of protoplast with nucleus, Golgi body, and mitochondrial profiles. (f) SAG 338-1. Overview of vegetative cell in cross-section showing pyrenoid, CMNM complex, and cell wall with mucilaginous envelope. (g) The CMNM complex in strain SAG 2100. ch, chloroplast; s, starch grains; p, pyrenoid; m, mitochondrion; mb, microbody; n, nucleus; nu, nucleolus; cw, cell wall; mu, mucilage envelope; g, Golgi body. Scale bar, 1 μm (b–e, g) or 2 μm (a, f).

is, in certain Trebouxiophyceae and Chlorophyceae, were relatively unrelated.

Phylogenetic analyses of the ITS-1 and ITS-2 rDNAs revealed five distinct clades (Fig. 7). The “*Interfilum* clade” was formed by the three sarcinoid isolates (SAG 2101, SAG 2102, SAG 2147), *G. terricola* SAG 2100, and strains representing *I. paradoxum* and *Interfilum* sp. The other clades were formed by

strains assigned to *K. flaccidum*, *K. mucosum/crenulatum*, *K. bilatum/K. elegans*, and a larger clade comprising all other remaining species of *Klebsormidium*. Interestingly, in the unrooted phylogeny, *K. flaccidum* did not group with other *Klebsormidium* spp., but with the *Interfilum* clade. In *G. terricola* SAG 2100 and the sarcinoid isolate SAG 2101, intragenomic variation in the ITS-1 and ITS-2 rDNA regions was detected.

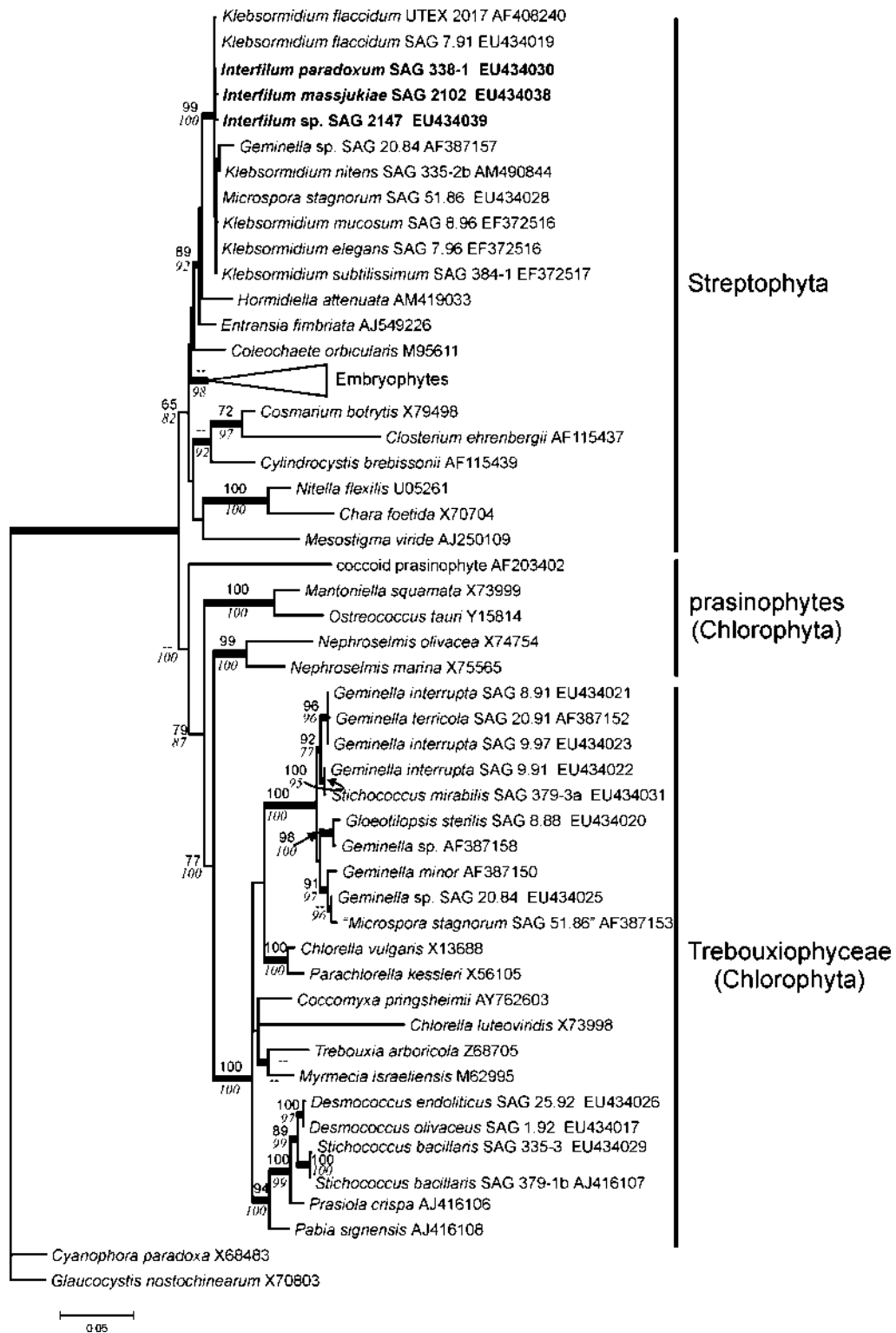


FIG. 6. Maximum-likelihood phylogeny of 18S rDNA sequences of species of *Interfilum* (shown in bold), *Klebsormidium*, other representatives of streptophyte green algae, embryophytes, *Geminella*, *Desmococcus*, other members of the Trebouxiophyceae, and some prasinophyte green algae. Thick lines mark internal branches that were supported by Bayesian analysis with posterior probabilities >0.95. Numbers above and below (italicized) branches represent bootstrap support values (if >70%) from neighbor-joining distance and maximum-parsimony analyses, respectively. Sequences representing the embryophytes included *Cucurbita pepo* AF206895, *Cyperus albostrigatus* AF168838, *Ginkgo biloba* D16448, *Haplomitrium hookeri* U18504, *Pinus wallichiana* X75080, *Sphagnum palustre* Y11370, and *Welwitschia mirabilis* D85299. The tree is rooted with the glaucophytes *C. paradoxa* and *G. nostochinearum*.

As we failed to obtain unambiguous sequences by direct sequencing, we cloned the ITS-1, 5.8S, and ITS-2 region PCR products of both strains. For the sarcinoid strain SAG 2101, three types of sequences (ITS variants, named K366, K370, and K371) were detected, which exhibited differences at only three positions. However, in *G. terricola* SAG 2100, the two detected, ITS variants (named K644 and K650) differed considerably, that is, by 15 sequence positions. The ITS-1, 5.8S, and ITS-2 region sequences among the sarcinoid isolate SAG 2101, *G. terricola* SAG 2100 K650, and the two *I. paradoxum* strains had no more than six positions that were different. Consequently, in the phylogenetic analyses, these sequences formed a distinct subclade within the *Interfilum* clade, which, however, received only moderate bootstrap support, but which was distant from the other sequences of the *Interfilum* clade in all analyses. ITS variant K644 of *G. terricola* SAG 2100 branched off as next sister to that clade, followed by the sarcinoid strains SAG 2102, *I. sp.* SAG 36.88, and SAG 2147. The branching order of these three strains was the same in all different analyses, although it was not supported by bootstrap tests and in Bayesian analyses; only the ME distance analysis showed strain SAG 2102 instead of *G. terricola* SAG 2100 K644 as the next sister with the *Interfilum* subclade. The basal position in the *Interfilum* clade of strain SAG 2147 was well supported in all analyses. The *Klebsormidium* sequences formed two separate clades, that is, one by the four *K. flaccidum* sequences with only little within-group variation, and a well-supported clade comprising the remaining *Klebsormidium* strains. Within the latter, three well-supported subclades were resolved: a clade formed by *K. crenulatum* and *K. mucosum*; another by the species pair *K. bilatum*-*K. elegans*; and an unresolved group comprising six sequences representing *K. dissectum*, *K. fluitans*, *K. nitens*, *K. subtilissimum*, and one unidentified isolate. The topology of the *Klebsormidium* part of the ITS phylogeny was essentially the same as reported by Sluiman et al. (2008). The absolute genetic distances among sequences of the *Klebsormidium* spp. clade ranged from 1 to 44; those between the four *K. flaccidum* strains, from 1 to 7; and the range of differences observed within the *Interfilum* clade, from 1 to 20.

DISCUSSION

This study has provided microscopical and molecular evidence that the three new sarcinoid isolates, the weakly filamentous *G. terricola* SAG 2100, as well as culture strains assigned to the genus *Interfilum* are all closely related and are members of the streptophycean lineage in the green plants, with a clear affinity to the Klebsormidiales. This finding is in concordance with characteristic ultrastructural features that the four strains that have been studied at the TEM level so far (SAG 2100, SAG 2101, SAG

2102, and SAG 338-1) share with various streptophycean algae, namely, the presence of a large single microbody in vegetative cells typically located between the nucleus and the chloroplast, and a branched mitochondrion closely associated with the chloroplast and the microbody. This chloroplast-mitochondrion-nucleus-microbody (CMNM) complex is characteristic of vegetative cells of various streptophycean algae (Kostikov et al. 2001, Massalski 2002, Massalski and Kostikov 2005), including *Klebsormidium* (e.g., Stewart et al. 1972, Silverberg 1975, Lokhorst and Starr 1985, Morison and Sheath 1985), Mesostigmatophyceae (Melkonian 1989), Chlorokybophyceae (Rogers et al. 1980), Coleochaetophyceae (Stewart et al. 1972, Sluiman 1985, Van den Hoek et al. 1995), Charophyceae (Silverberg and Sawa 1973), Zygnemaphyceae (Tourte 1972), and embryophytes (e.g., Raven et al. 2005). Thus, the CMNM complex appears to be a reliable character at the cellular level to identify streptophyte green algae. In addition, there was also a complex of certain light microscopical features of the protoplasts seen in the new sarcinoid isolates, *G. terricola* SAG 2100, and the studied strains of *Interfilum* that are shared with *Klebsormidium* spp. (see below); its phylogenetic significance is supported by the ITS rDNA analyses that show a very close relationship with species of *Klebsormidium*.

Definition and phylogeny of the genus Interfilum. Isolates SAG 2101 and 2102 were initially identified as species of *Desmococcus* (Mikhailyuk et al. 2003), but the position of this genus (represented by strains SAG 1.92 and SAG 25.82 in our 18S rDNA analysis) is clearly in the Trebouxiophyceae. This necessitates the identification of a suitable genus in the Streptophyta to which isolates SAG 2101, SAG 2102, and SAG 2147 could be assigned. While the 18S rDNA analyses failed to provide the resolution necessary to clarify relationships with specific strains of *Interfilum*, analyses of the more variable ITS rDNA regions have revealed the relationships of the three sarcinoid isolates and *G. terricola* SAG 2100 with strains of *Interfilum*. The seven studied strains formed a well-supported clade that is considered to represent the genus *Interfilum*, albeit in a broader sense than originally described by Chodat and Topali (1922). The oldest validly described taxon and type species in this clade is *I. paradoxum*, which predates Petersen's *G. terricola* (Petersen 1932), represented here by strain SAG 2100, by 10 years. Our phylogenetic analyses of 18S rDNA sequences have established that the genus *Geminella* is not a taxon of the Streptophyta because strains assigned to the type species, *G. interrupta*, are clearly placed in the Trebouxiophyceae. Consequently, strain SAG 2100 cannot be accepted as a species of *Geminella*. Several morphological characters are shared between the newly isolated strains and the type of *Interfilum*, *I. paradoxum*, namely, an almost identical chloroplast and pyrenoid structure, and a peculiar type of

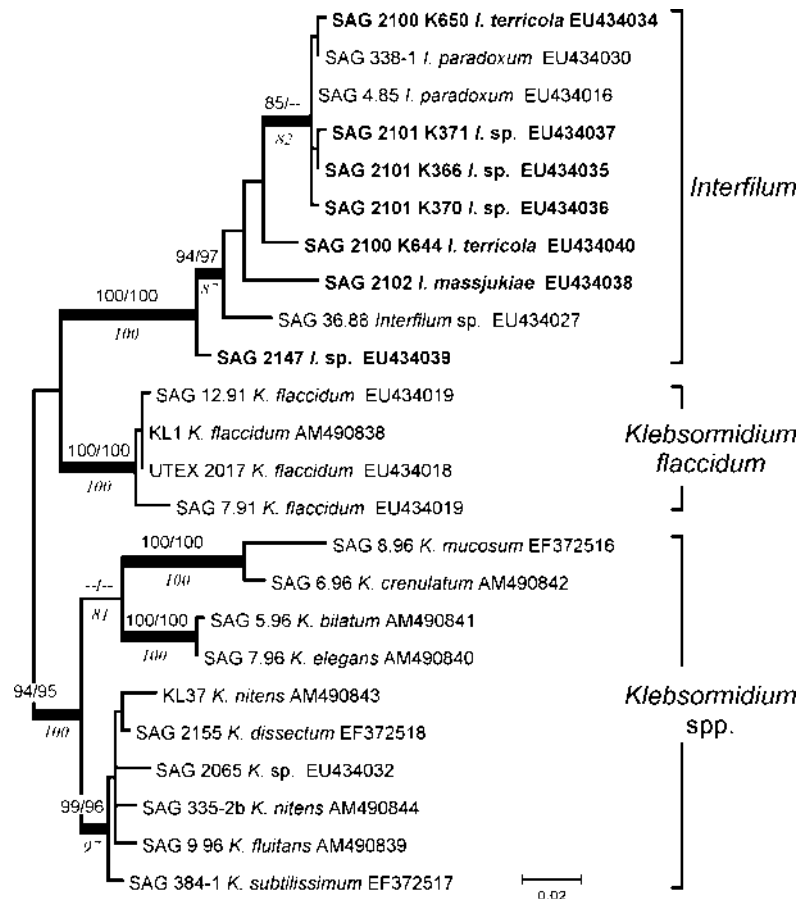


FIG. 7. Unrooted maximum-likelihood phylogeny of ITS-1,2 rDNA sequences of strains and species of *Interfilum* and *Klebsormidium*. The three studied sarcinoid isolates, *I. terricola* comb. nov., and *I. massjukiae* sp. nov. are shown in bold. Thick lines mark internal branches that were supported by Bayesian analysis with posterior probabilities >0.95. Numbers above lines are bootstrap values from neighbor-joining (left) and minimum-evolution (right) distance analyses; numbers below lines (italicized) are from maximum-parsimony analyses. Only bootstrap values >70% have been recorded.

formation of daughter cells within the mother cell wall that typically results in cap- or ring-like structures (Figs. 2, c–e; 3, c–f; 4, a, d–f). In addition, the general ultrastructural features of all these strains are very similar. We therefore assign the three sarcinoid isolates, SAG 2101, SAG 2102, and SAG 2147, as well as the weakly filamentous SAG 2100 to the genus *Interfilum* notwithstanding the fact that there are certain morphological differences with the type species *I. paradoxum*, namely, the sarcinoid growth habit and the absence of exfoliated mother cell walls. The monotypic genus *Interfilum* as described by Chodat and Topali (1922) includes usually unbranched or slightly branched uniseriate filamentous green algae composed of chains of nearly spherical cells that have bipartite cell walls, are connected by thin threads, and are surrounded by a mucilaginous sheath that displays radial striations upon staining with methylene blue. The validity of Chodat and Topali's description of *I. paradoxum* was confirmed in a later study by Fritsch and John (1942) who found it in liquid cultures derived from

soil, and by our observations on strains SAG 338-1 and SAG 4.85. In the latter strains, it was observed that the remains of mother cell walls, which initially formed hemispherical "caps" closely associated with daughter cells, became gradually detached and sometimes formed a short, thin structure that connected the daughter cells for some time. There is little doubt that these structures are the same as those described as "threads" by previous authors. Fritsch and John (1942) described the interconnecting threads as mucilaginous, but it seems likely that mother cell wall material also contributes to the formation of these structures. Contrary to the previous reports, we only observed unbranched chains of cells. We obtained clear evidence of the bipartite nature of the cell walls, as shown in Chodat and Topali's figure 2(B).4, and Fritsch and John's figure 4, F–J. However, this is different from "true" bipartite cell walls in algae where the cell wall consists of two halves with one half formed by the mother cell and the other by the daughter cell. In *Interfilum*, the daughter cell walls are formed within

and closely associated with the mother cell wall. After cell division and upon daughter cell release, the mother cell wall splits in two halves; thereby each daughter cell receives one half of the mother cell wall, which results in cap- or ring-like structures on the daughter cells. We suggest naming this type of cell wall "pseudobipartite." On the basis of the information currently available, we propose an emended diagnosis of the genus *Interfilum*.

Interfilum Chodat and Topali (1922) emend. Mikhailiyuk, Sluiman, A. Massalski, Mudimu, Demchenko, T. Friedl et, S. Y. Kondr.

Thalli cellulis unis, cellulis paribus, cellularum laxis seriebus vel sarcinoidalibus aggregationibus compositi. Cellulae ellipsoideae, oviformes, hemisphaericae vel sphaericae. Parietes cellulares crassae, cum vagina mucilaginis in speciebus nonnullis. Cellulae filis subtilibus, desquamazione cellulae matris parietis orientibus, connexae. Chloroplastus unicus, parietalis, laminaris, lateralibus incisuris lobatus, dimidium cellulae complens. Pyrenoides unicum, ellipticum, in chloroplasti centro locatum, parvis amylaceis granis, vulgo parallelis, circumcinctum. Nucleus unicus, centralis, pyrenoidi oppositus. Cellulae filiae in cellulae matris pariete productae. Paries divisione cellulari in dimidiis fracta; cellulae filiae ambae dimidia parietis, pileata vel annulata, accipientes. Fragmentatio sola reproductio cognita.

Type species: *I. paradoxum* Chodat and Topali (1922), p. 66, Figs. 1A, 2B.

Epitype: The strain SAG 338-1 permanently preserved in a metabolic inactive state (cryopreservation in liquid nitrogen) in the Sammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG), Göttingen, Nikolausberger Weg 18, Germany.

Taxonomic assessment of G. terricola. The morphological features of strain SAG 2100 are in full agreement with Petersen's diagnosis of *G. terricola* (Petersen 1932), and hence there is little doubt that this strain represents this species. Petersen (1932) commented that *G. terricola* is morphologically similar to other *Geminella* species. Their common characters include the formation of uniseriate unbranched filaments surrounded by a common mucilage envelope and a plate-shaped chloroplast with one pyrenoid. Three years later, however, Petersen (1935) stated (without presenting supporting reasons) that *G. terricola* might actually represent a form of *Klebsormidium* ("Hormidium") *flaccidum*. Although we do not know what led to this change of mind, it is interesting that in retrospect Petersen's second thoughts were justified. Additional features of *G. terricola* observed here were the structure of starch envelope of the pyrenoid, the chloroplast morphology, and the pseudobipartite nature of the cell wall. Similar cap-like structures were recently found in a strain assigned to *G. terricola* that was isolated from Belgian forest soil (Hoffmann et al. 2007) and are a feature that unites this species with

I. paradoxum. The close affiliation of *G. terricola* SAG 2100 and *I. paradoxum* as members of the Streptophyta is further supported by cytological and rDNA sequence data (this study). In contrast, the type species of the genus *Geminella*, *G. interrupta*, represented in our analyses by strains SAG 8.91, SAG 9.91, and SAG 9.97, forms an independent lineage within the Trebouxiophyceae, together with a number of other *Geminella* strains, including SAG 20.91, which previously was assigned to *G. terricola* (Fig. 6). The latter strain, however, does not exhibit the species characteristic features that are displayed by strain SAG 2100; hence, it is concluded that the correct identity of SAG 20.91 is not *G. terricola*. Also, in the studied strains assigned to *G. interrupta* as well as in SAG 20.91, no cap- or ring-like structures are seen.

It is proposed that *G. terricola* is transferred to the genus *Interfilum* as *I. terricola* comb. nov.

Interfilum terricola (B. Petersen) Mikhailiyuk, Sluiman, A. Massalski, Mudimu, Demchenko, T. Friedl et, S. Y. Kondr.

Basionym: *G. terricola* Petersen (1932), p. 39, Fig. 21.

Epitype: The strain SAG 2100 permanently preserved in a metabolic inactive state (cryopreservation in liquid nitrogen) in SAG, Göttingen, Nikolausberger Weg 18, Germany.

An attempt to resolve the affinities of *I. terricola* with species *I. paradoxum* by comparing ITS-1,2 rDNA sequences proved inconclusive due to intragenomic polymorphisms. Two ITS rDNA variants, K650 and K644, were detected in the same strain SAG 2100, and the differences between the two variants resulted in different positions in the ITS phylogeny. The sequence of variant K650 and those of *I. paradoxum* SAG 338-1 and SAG 4.85 were virtually indistinguishable, while variant K644 of the same strain was clearly very distinct (Fig. 7). The level of intragenomic rDNA variation within a species is normally low, due to a homogenization process known as concerted evolution (Elder and Turner 1995). The efficiency of concerted evolution is influenced by the degree to which sexual reproduction occurs. Sexual processes have not been observed in any member of the Klebsormidiales, which therefore are assumed to propagate and multiply solely by asexual (vegetative) means. The high intragenomic variation demonstrated for *I. terricola* strain SAG 2100 may be attributed to the absence of sexual recombination, possibly in combination with a low growth rate. Despite the virtual identity of one variant of *I. terricola* SAG 2100 with strains of *I. paradoxum*, there is a morphological character that distinguishes both species, namely, the absence in *I. terricola* of any signs of exfoliated cell walls in the vegetative cells, thread-like connections (anastomoses) between cells in short chains, and discarded cell wall halves. We therefore regard *I. terricola* SAG 2100 as representing a species clearly distinct from *I. paradoxum*.

Taxonomy of sarcinoid strains of Interfilum. Strains SAG 2102 and SAG 2147 share the ability to form sarcinoid cell packages with strain SAG 2101, but it is less pronounced in the latter. The ability to form sarcinoid stages seems to be correlated with the absence of mucilage that envelopes cell walls: in strain SAG 2101 as well as *I. paradoxum* and *I. terricola*, mucilage is present around the cell walls, and cell packages are absent or poorly developed. Conversely, mucilage is lacking in SAG 2102 and SAG 2147, strains that form prominent sarcinoid stages. Strain SAG 2102 is characterized by the formation of large cubic packages, a phenomenon that is far more pronounced than in SAG 2101. This finding is congruent with strain SAG 2102 being phylogenetically separated from *I. paradoxum*, *I. terricola*, and strain SAG 2147 by the ITS rDNA sequence analyses and 2–5 sequence positions in the 18S rDNA. As this prominent sarcinoid growth habit is a feature that uniquely distinguishes SAG 2102 from *I. paradoxum* and *I. terricola*, it is proposed to designate this strain to a new species of *Interfilum*, *I. massjukiae*.

Interfilum massjukiae Mikhailyuk, Sluiman, A. Massalski, Mudimu, Demchenko, T. Friedl et, S. Y. Kondr.

Cellulae latelliipsoideae, rotundae vel hemisphaericae, (6.0) 8.5–9.8 (11.9) μm longae, (5.1) 6.8–8.1 (9.8) μm latae; cellulae apicales in filamentis ramosis 10.2–14.5 μm longae. Cellulae binae, trinae quaternaeque aggregatae. Thalli latis cubicis multicellularibus aggregationibus, filamentis uniseriatis vel filamentis biseriatis compositi. Parietes cellularis crassa, sine vagina mucilaginosa. Chloroplastus unicus, parietalis, laminaris, in latere parietis locatus, cum 5–8 lobis. Pyrenoides unicum, in chloroplasti centro locatum, 8–10 parvis elongatis amyliceis granis, ad longitudinem cellulae parallelis, circumcinctum. Nucleus unicus, pyrenoidi oppositus. Cellularum divisio in directiones tres. Cellulae filiae in cellula matre orientes, ambae dimidia parietis accipientes; dimidia parietis pileata residua producentia. Reproduction thallorum fragmentatione; reproductio sexualis incognita.

Cells widely ellipsoid to rounded or hemispherical, length (6.4)–6.8–10.7 μm , width (5.1)–6.4–8.6 μm , terminal cells in branched filaments up to 10.2–14.5 μm long; cells aggregated in groups of 2–4, sometimes forming large multicellular cubic aggregations as well as uni- and biseriate branched filaments. Cell walls thick, without mucilage. Chloroplast single, parietal, plate-shaped, positioned at one side of the cell wall, dissected in 5–8 lobes. Pyrenoid single, located in the center of the chloroplast, surrounded by 8–10 or more small elongated starch grains orientated parallel to the longitudinal axis of the cell. Nucleus single, situated opposite the pyrenoid. Cell division in three planes, resulting in daughter cells being formed within the mother cell wall and each receiving one half of the mother cell wall, which remains closely associated with the

daughter cell wall (resulting in cap-like remains of mother cell wall). Reproduction by fragmentation of thalli; sexual reproduction not observed.

Holotype: A fixed sample of strain SAG 2102 has been deposited at the Herbarium of University of Göttingen (GOET) as No. SAG 2102 (GOET) and is designated as type material. Figures 1, a–h, illustrate this material.

Epitype: Strain SAG 2102 permanently preserved in a metabolic inactive state (cryopreserved in liquid nitrogen) in SAG, Nikolausberger Weg 18, Germany.

Iconotype: Figures 1, d, f–h.

Type locality: Cracks and surface of pyroclastic outcrops, mountain range “Karagach,” Karadag Nature Reserve (Crimea, Ukraine).

Etymology: The species is named after renowned Ukrainian phycologist Prof. Dr. Sc. Nadiya Prokhorivna Massjuk in recognition of her contributions to the taxonomy of various algal groups, as well as the education of a generation of students in Ukrainian cryptogamic plants.

Distribution: Presently known only from the type locality.

I. massjukiae SAG 2102 differs morphologically from SAG 2101 and SAG 2147 in the absence of a mucilaginous envelope and in a tendency to form biseriate branched filaments. Preliminary TEM studies have revealed differences in the structure of the cell walls; that is, in strain SAG 2102 a sublayer with a lacunar or alveolate substructure that may support the formation of sarcinoid cell packages is present, whereas SAG 2101 (with a reduced ability to form prominent cell packages) has a homogenous cell wall structure, like *I. paradoxum* and *I. terricola*. It is expected that a more detailed morphological and ultrastructural study that also should include strains SAG 2147 and SAG 36.88 will reveal additional diagnostic features of the three sarcinoid isolates. Strains SAG 2147 and SAG 36.88 may represent separate new species of *Interfilum* distinct from *I. massjukiae* and *I. terricola*/*I. paradoxum*. Preliminary investigations have shown that SAG 36.88 stands apart by its elongated and almost cylindrical cells, differences in chloroplast structure, and lack of sarcinoid stages.

Cell division in Interfilum. A common feature of all species of *Interfilum* is that the daughter cell walls are formed within the mother cell wall followed by the formation of a cap- or ring-like structure associated with the daughter cells. This feature is reminiscent of a type of cell division known as sporulation (as variously defined, e.g., by Sluiman et al. 1989, Massjuk 1993, 1997, Massjuk and Demchenko 2001, Yamamoto et al. 2007), although there may be differences regarding the function and structure of the division products, and sequence of division stages (Ettl 1988a,b, Massjuk 1993). This type of cell division in *Interfilum* may be seen as transitional between typical “sporulation” and “vegetative cell

division" (in the sense of Sluiman et al. 1989 and Massjuk 1993). The term "desmoschisis" as proposed by Massjuk (1993, 1997) may not be appropriate because "desmoschisis" is also used to describe a process known as "vegetative cell division" (*Zellteilung* = *Cytotomie* = desmoschisis, Ettl 1988a,b, Sluiman et al. 1989). When daughter cells form within a persisting mother cell, their growth requires the mother cell walls to be at least partially eliminated or to be transformed in a similar way as during sporulation. In green algae this transformation can be achieved in different ways: gelatinization of walls, which gives rise to the formation of mucilage envelopes, or widening and retention of the mother cell wall, which, after successive division cycles, leads to thick multiple-layered cell walls (Starmach 1972, Hindák 1996). In *Interfilum* two ways of transformation of mother cell walls appear to be realized (Fig. 8: 1): gelatinization and rupture (Fig. 8a) or preservation and rupture (Fig. 8b). The first process leads to short filaments and easily disintegrating packets, and single cells, and is exemplified by *I. paradoxum*, *I. terricola*, as well as strains SAG 2101 and SAG 36.88. These have a mucilage envelope, and their cell walls appear homogenous at the ultrastructural level. The second process (Fig. 8b) leads to packets, that is, a tight cubic aggregation of closely adhering cells, and to biserial filaments, and is exemplified by *I. massjukiae* and strain SAG 2147. There is no mucilage envelope and, in *I. massjukiae*, the ultrastructure of the cell wall reveals a layered-lacunar texture. The latter may have originated from many generations of mother cell walls that were compressed during successive cell division cycles, as also visible on TEM micrographs of the related genus *Klebsormidium* (Lokhorst 1996, figs. 251–253). *Interfilum* shares with *Klebsormidium* a tendency that cell division can take place in three planes, leading to the development of sarcinoid cell packages. Biserial filaments or sarcinoid packages have been observed in *K. montanum*, *K. crenulatum*, and *K. mucosum* (Ettl and Gärtner 1995, Lokhorst 1996, T. I. Mikhailyuk unpublished). Our interpretation is that the type of cell division in these cases is fundamentally similar between both genera, namely, protoplast division and daughter cell wall formation taking place within the mother cell wall (Fig. 8: 2). As shown for *Interfilum* here, in *Klebsormidium* the nonelastic mother cell wall ruptures in the central region during the process of growth of daughter cells, but it remains closely associated with the daughter cell walls (Fig. 8: 2). This may lead to either a layered-lacunar dense cell wall consisting of many generations of mother cell walls (visible at the ultrastructural level; Lokhorst 1996) or one resembling the pseudobipartite cell walls that are formed in *Interfilum*. Rupture of the mother cell wall leads to H-pieces, which often can be observed at the ends of filaments in many species of *Klebsormidium* (Fig. 8c). Similar H-pieces are also known for other

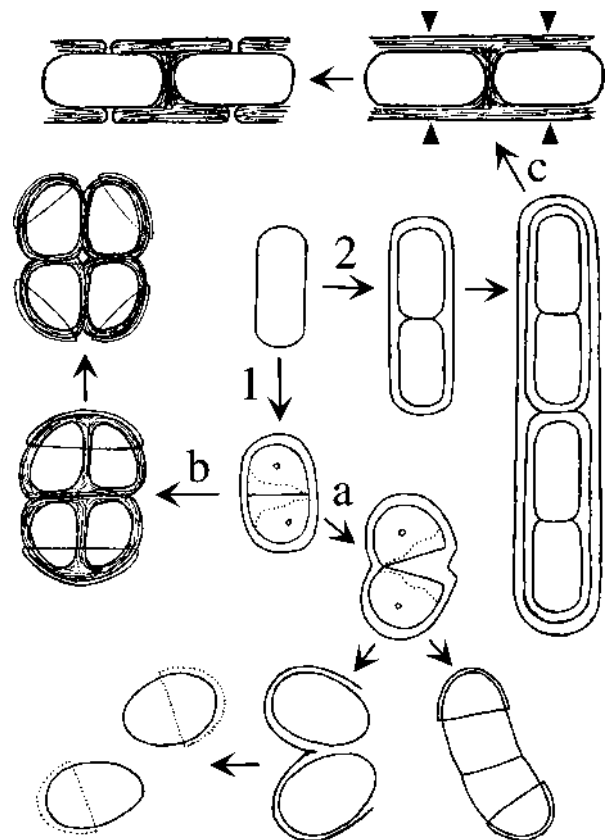


FIG. 8. Diagrammatic summary of the types of cell division characteristic for *Interfilum* and *Klebsormidium* and their distinct developmental pathways. (1) Formation of short disintegrated filaments and cell packet formation (*Interfilum*). (2) Formation of long filaments (*Klebsormidium*). (a) Rupture and later gelatinization of mother cell walls while remaining closely associated with daughter cells. (b) Rupture and preservation of the mother cell wall while remaining closely associated with daughter cells. (c) Close association of preserved mother cell walls with daughter cells followed by their rupture at the equatorial plane of the daughter cells resulting in H-shaped wall pieces. Arrowheads mark sites of rupture.

representatives of streptophycean algae, namely, *Entransia* (Cook 2004) and the sarcinoid streptophyte alga *Chlorokybus atmophyticus* (Rieth 1972).

Relationship of Interfilum and Klebsormidium. Certain morphological characters that are shared among the various strains of *Interfilum* appear to be characteristic of members of the Klebsormidiophyceae and even other streptophycean algae. These characters include a plate-shaped chloroplast occupying half of the cell volume, a starch envelope surrounding the pyrenoid consisting of numerous single grains arranged almost in parallel, and a position of the nucleus opposite to pyrenoid. The same morphological features apply to "*Microspora stagnorum*" strain SAG 51.86 (T. I. Mikhailyuk, unpublished observation), which corroborates its placement in the *Interfilum/Klebsormidium* clade in the 18S rDNA phylogeny (Fig. 6). Therefore, it is concluded that

strain SAG 51.86 has been wrongly identified as "*Microspora stagnorum*"; it actually represents a species of *Klebsormidium*. Interestingly, it represents a species isolated from freshwater. We anticipate further ITS rDNA sequence analyses to reveal its phylogenetic position relative to aeroterrestrial members of the genus.

In the ITS rDNA phylogenies, the four sarcinoid isolates, *I. terricola* SAG 2100, and *I. paradoxum* appeared to be more closely related with *K. flaccidum* than with any other species of *Klebsormidium* (Fig. 7). In an attempt to further clarify the relationship between *Interfilum* and *Klebsormidium*, and in particular to determine whether the two genera are monophyletic or paraphyletic, we included *Entransia fimbriata* and *Hormidiella attenuata* in the analyses. A previous study (Sluiman et al. 2008) has shown that these taxa are the closest known relatives of *Klebsormidium*, and that, by virtue of a certain degree of similarity between their ITS rDNA sequences, they can serve as outgroups to resolve the phylogeny of *Klebsormidium*. The ITS rDNAs were aligned according to the alignment of Sluiman et al. (2008), which only included putative preserved secondary structure elements, resulting in a data set of 272 aligned bases. Phylogenetic analyses recovered a tree topology (not shown), which, when rooted with *E. fimbriata* and *H. attenuata* as outgroups, showed again the sister group relationship of *K. flaccidum* and *Interfilum*, and the distribution of *Klebsormidium* species over the same four clades as reported by Sluiman et al. (2008) and shown in Figure 7, albeit with low support for internal branches. A number of alternative topologies were tested with the Paired Sites test suite as implemented in the program Treefinder (Jobb 2008) (results not shown). These included trees in which (a) *Interfilum* was sister to all *Klebsormidium* sequences (nonrejection of which would support the monophyletic status of each genus), (b) *Interfilum* was sister to *K. flaccidum* only (nonrejection of which would indicate that *Klebsormidium* is paraphyletic), and (c) some changes in the branching order within the *Klebsormidium* clade. None of these alternative trees was rejected by these tests, which leads to the conclusion that the currently available ITS rDNA data set is not able to resolve unequivocally whether *Klebsormidium* is paraphyletic and *Interfilum* is monophyletic, or whether both genera represent two closely related but distinct monophyletic entities. The taxonomic and phylogenetic relationships of these genera and of Klebsormidiophyceae in general may become clearer when a broader range of samples, both geographically and taxonomically, and information from other genetic markers will become available for analysis.

Our sincere thanks to Dr. Thomas Pröschold for discussion on taxonomical aspects and Dr. Fabio Rindi for provision of the Latin diagnoses. We thank Elke Zufall-Roth for her

skillful sequencing work as well as for purification and maintenance of cultures, Dr. K. Mohr for assistance with preparing the sequence submissions, Professor Igor Kostikov for providing an isolate of *Interfilum terricola* (as "*Geminella terricola*"), Dr. Pavel Škaloud for providing an isolate of *Interfilum* sp., and Dr. Jiří Neustupa for helpful discussions. Parts of this work were supported by the German Science Foundation (DFG) by a grant extended to T. F. (Fr 905/14-1,2) and by the German Federal Ministry of Education and Research, BMBF (AlgaTerra project, grant 01 LC 0026) within the BIOLOG program. T. M. gratefully acknowledges the support through a Grant for Young Scientist Fellowship extended to her by INTAS (Ref. No. 06-1000014-6216).

- Cech, T. R., Damberger, S. H. & Gutell, R. R. 1994. Representation of the secondary and tertiary structure of group I introns. *Nat. Struct. Biol.* 1:273–80.
- Chodat, R. & Topali, C. 1922. Un paradoxe algologique. *Bull. Soc. Bot. Genève 2 sér.* 13:66–74.
- Cook, M. E. 2004. Structure and asexual reproduction of the enigmatic charophycean green alga *Entransia fimbriata* (Klebsormidiales, Charophyceae). *J. Phycol.* 40:424–31.
- Diez, B., Pedros-Alio, C., Marsh, T. L. & Massana, R. 2001. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2942–51.
- Elder, J. F. & Turner, B. J. 1995. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q. Rev. Biol.* 70:297–320.
- Elwood, H. J., Olsen, G. J. & Sogin, M. L. 1985. The small-subunit ribosomal RNA gene sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonichia pustulata*. *Mol. Biol. Evol.* 2:399–410.
- Ettl, H. 1988a. Über Definitionen und Terminologie der asexuellen Fortpflanzungszellen bei Grünalgen (Chlorophyta). *Arch. Protistenk.* 135:17–34.
- Ettl, H. 1988b. Zellteilung und Sporulation als wichtige Unterscheidungsmerkmale bei Grünalgen (Chlorophyta). *Arch. Protistenk.* 135:103–18.
- Ettl, H. & Gärtner, G. 1995. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtentalgen*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Germany, 721 pp.
- Friedl, T. 1996. Evolution of the polyphyletic genus *Pleurostrum* (Chlorophyta): inferences from nuclear-encoded ribosomal DNA sequences and motile cell ultrastructure. *Phycologia* 35:456–69.
- Fritsch, F. E. & John, R. P. 1942. An ecological and taxonomic study of the algae of British soils. 2. Consideration of the species observed. *Ann. Bot. N. S.* 6:371–95.
- Hamby, R. K., Sims, L. E., Issel, L. E. & Zimmer, E. A. 1988. Direct RNA sequencing: optimization of extraction and sequencing techniques for work with higher plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 6:179–97.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, K. 1985. Dating of the human–ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22:160–74.
- Head, I. M., Saunders, J. R. & Pickup, R. W. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* 35:1–21.
- Helms, G., Friedl, T., Rambold, G. & Mayrhofer, H. 2001. Identification of photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing. *Lichenologist* 33:74–86.
- Hepperle, D. 2004. *SeqAssem*©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. Distributed by the author at <http://www.sequentix.de/>.
- Hindák, F. 1996. *Klíč na určovanie nerozkonárených zelených rias (Ulotrichineae, Ulotrichales, Chlorophyceae)* [Key to Unbranched Filamentous Green Algae (Ulotrichineae, Ulotrichales, Chlo-

- rophyceae)]. Slovenská botanická spoločnosť pri SAV, Bratislava, 77 pp.
- Hoffmann, L., Ector, L. & Kostikov, I. 2007. Algal flora from limed and unlimed forest soils in the Ardenne (Belgium). *Syst. Geogr. Plants* 77:17–90.
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754–5.
- Jobb, G. 2008. *TREEFINDER version of January 2008*. Munich, Germany. Distributed by the author at <http://www.treefinder.de>.
- Kostikov, I. Yu., Romanenko, P. O., Demchenko, E. M., Darienko, T. M., Mikhailyuk, T. I., Rybchynskiy, O. V. & Solonenko, A. M. 2001. *Vodorasti gruntiv Ukrainy (istoria ta metody doslidzhennia, sistema, konspekt flory)* [The Soil Algae from Ukraine (History and Methods of Investigation, Classification System, Floristics)]. Phitosotsiotsentr, Kyiv, 300 pp. (in Ukrainian).
- Lokhorst, G. M. 1996. Comparative taxonomic studies on the genus *Klebsormidium* (Charophyceae) in Europe. *Cryptogam. Stud.* 5:1–132.
- Lokhorst, G. M. & Starr, W. 1985. Ultrastructure of mitosis and cytokinesis in *Klebsormidium mucosum* nov. comb., formerly *Ulothrix verrucosa* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 21:466–76.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., et al. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32:1363–71.
- Massalski, A. 2002. Ultrastrukturni doslidzhennya vodorostey ta produktiv ikh sekretsiy v rozytku suchasnykh taksonomichnykh ta gidrobiologichnykh kontseptsiy [Ultrastructural investigations of algae and the products of their secretion in development of modern taxonomical and hydrobiological concepts]. D.Sc. thesis, Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, 40 pp. (in Ukrainian).
- Massalski, A. & Kostikov, I. 2005. Mitochondrial approach in taxonomy of green algae. In *Abstracts of International Conference "Algae in Terrestrial Ecosystems"* (Kaniv, Ukraine, September 27–30, 2005), p. 50.
- Massalski, A., Mrozinska, T. & Olech, M. 1995. *Lobococcus irregularis* (Boye-Pet.) Reisinger var. nov. (Chlorellales, Chlorophyta) from King George Island, South Shetland Islands, Antarctica, and its ultrastructure. *Nova Hedwigia* 61:199–206.
- Massjuk, N. P. 1993. *Evolutsionnye aspekty morfologii eukarioticheskikh vodorosley*. [Evolutionary Aspects of Morphology of Eukaryotic Algae]. Nauk. Dumka, Kyiv, 232 pp. (in Russian).
- Massjuk, N. P. 1997. Riznomanitnist sposobiv dilennya klityn eukariotichnykh vodorostey ta pryntsyipy ikh klasyfikatsii [Diversity of ways of cell division of eukaryotic algae and principles of their classification]. *Ukr. Bot. J.* 54:221–31 (in Ukrainian).
- Massjuk, N. P. & Demchenko, E. M. 2001. A new type of cell division in Chlamydomonadaceae (Chlorophyta). *Int. J. Algae.* 3:18–30.
- Melkonian, M. 1989. Flagellar apparatus ultrastructure in *Mesostigma viride* (Prasinophyceae). *Plant Syst. Evol.* 164:93–122.
- Mikhailyuk, T. I., Demchenko, E. M. & Kondratyuk, S. Ya. 2003. Algae of granite outcrops from the left bank of Pivdennyi Bug River (Ukraine). *Biologia (Bratisl.)* 58:589–601.
- Mikhailyuk, T. I., Demchenko, E. M. & Massalski, A. 2005. *Massjukia* gen. nov. (Chlorophyta, Charophyceae), a new aerophytic algae from granite outcrops (Ukraine). In *Abstracts of International Conference "Algae in Terrestrial Ecosystems"* (Kaniv, Ukraine, September 27–30, 2005), p. 52.
- Morison, M. O. & Sheath, R. G. 1985. Responses to desiccation stress by *Klebsormidium rivulare* (Ulotrichales, Chlorophyta) from a Rhode Island stream. *Phycologia* 24:129–45.
- Petersen, J. B. 1932. The algal vegetation of Hammer Bakker. *Bot. Tidskr. (Lund)* 42:1–48.
- Petersen, J. B. 1935. Studies on the biology and taxonomy of soil algae. *Dan. Bot. Arkiv.* 8:1–180.
- Posada, D. & Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Appl. Note* 14:817–8.
- Raven, P. H., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. 2005. *Biology of Plants*, 7th ed. W.H. Freeman and Company Publishers, New York, 686 pp.
- Rieth, A. 1972. Über *Chlorokybus atmophyticus* Geitler 1942. *Arch. Protistenkunde* 114:330–42.
- Rogers, C. E., Mattox, K. R. & Stewart, K. D. 1980. The zoospore of *Chlorokybus atmophyticus*, a charophyte with sarcinoid growth habit. *Am. J. Bot.* 67:774–83.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–4.
- Rzhetsky, A. & Nei, H. 1992. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol. Biol. Evol.* 9:945–67.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406–25.
- Sigler, W. V., Bachofen, R. & Zeyer, J. 2003. Molecular characterization of endolithic cyanobacteria inhabiting exposed dolomite in central Switzerland. *Environ. Microbiol.* 5:618–27.
- Silverberg, B. A. 1975. An ultrastructural and cytochemical characterization of microbodies in the green algae. *Protoplasma* 83:269–95.
- Silverberg, B. A. & Sawa, T. 1973. An ultrastructural and cytochemical study of microbodies in the genus *Nitella* (Characeae). *Can. J. Bot.* 51:2025–32.
- Sluiman, H. J. 1985. *Comparative Studies on the Ultrastructure, Phylogeny and Classification of Green Algae*. Academisch proefschrift. VU Uitgeverij, Amsterdam, 155 pp.
- Sluiman, H. J., Guihal, C. & Mudimu, O. 2008. Assessing phylogenetic affinities and species delimitations in Klebsormidiales (Streptophyta): nuclear-encoded rDNA phylogenies and ITS secondary structure models in *Klebsormidium*, *Hormidiella* and *Entransia*. *J. Phycol.* 44:183–95.
- Sluiman, H. J., Kouwets, A. C. & Blommers, P. C. J. 1989. Classification and definition of cytokinetic patterns in green algae: sporulation versus (vegetative) cell division. *Arch. Protistenkunde* 137:277–90.
- Starmach, K. 1972. *Chlorophyta III. Zielenice nitowate: Ulotrichales, Ulvales, Prasiolales, Sphaeropleales, Cladophorales, Chaetophorales, Trentepochliales, Siphonales, Dichotomosiphonales. Flora slaskowodna Polski. Tom 10.* [Chlorophyta III. Green filamentous algae: Ulotrichales, Ulvales, Prasiolales, Sphaeropleales, Cladophorales, Chaetophorales, Trentepochliales, Siphonales, Dichotomosiphonales. Flora of freshwater bodies of Poland. Vol. 10]. Warszawa, Krakow, 750 pp.
- Starr, R. C. & Zeikus, J. A. 1993. UTEX The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 29(Suppl.): 1–106.
- Stewart, K. D., Floyd, G. L., Mattox, K. R. & Davis, M. E. 1972. Cytochemical demonstration of a single peroxisome in a filamentous green algae. *J. Cell Biol.* 54:431–4.
- Swofford, D. L. 2001. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K. & Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10:512–26.
- Tavaré, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* 17:57–86. American Mathematical Society.
- Tourte, M. 1972. Mise en évidence d'une activité catalasique dans les peroxysomes de *Micrasterias fimbriata* (Ralfs). *Planta (Berl.)* 105:50–9.
- Ueno, R., Huss, V. A. R., Urano, N. & Watabe, S. 2007. Direct evidence for redundant segmental replacement between multiple 18S rRNA genes in a single *Prototheca* strain. *Microbiology* 153:3879–93.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G. & Jahns, H. M. 1995. *Algae. An Introduction to Phycology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, 623 pp.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. [Eds.] *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, pp. 315–22.

- Wuyts, J., De Rijk, P., Van de Peer, Y., Pison, G., Rousseeuw, P. & De Wachter, R. 2000. Comparative analysis of more than 3000 sequences reveals the existence of two pseudoknots in area V4 of eukaryotic small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 28:4698–708.
- Yamamoto, M., Nishikawa, T., Kajitani, H. & Kawano, S. 2007. Patterns of asexual reproduction in *Nannochloris bacillaris* and *Marvania geminata* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta* 226:917–27.

Supplementary Material

The following supplementary material is available for this article:

Table S1. The strains and species of *Interfilum* used in this study, their origin and GenBank sequence accession numbers.

Table S2. rDNA sequences and their corresponding GenBank accession numbers for strains and species of *Klebsormidium*, *Geminella*, *Desmococcus*, and additional green algae (Trebouxiophyceae) that have been determined in this study.

This material is available as part of the online article.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

**2.4. Молекулярна філогенія, таксономія, різноманіття та біологія родів
Streptosarcina, *Streptofilum* і *Hormidiella***

ORIGINAL PAPER

New Taxa of Streptophyte Algae (Streptophyta) from Terrestrial Habitats Revealed Using an Integrative Approach



Tatiana Mikhailyuk^{a,1}, Alena Lukešová^b, Karin Glaser^c, Andreas Holzinger^d, Sabrina Obwegeser^d, Svetlana Nyporko^a, Thomas Friedl^e, and Ulf Karsten^c

^aM.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereschenkivska Str. 2, Kyiv 01004, Ukraine

^bBiology Centre of the Czech Academy of Sciences, v.v.i., Institute of Soil Biology, Na Sádkách 7, České Budějovice CZ-37005, Czech Republic

^cApplied Ecology and Phycology, Institute of Biological Sciences, University of Rostock, Albert-Einstein-Strasse 3, D-18059 Rostock, Germany

^dDepartment of Botany, University of Innsbruck, Sternwartestrasse 15, A-6020 Innsbruck, Austria

^eExperimental Phycology and Culture Collection of Algae, Georg-August University of Göttingen, Untere Karspüle 2, 37073 Göttingen, Germany

Submitted July 24, 2017; Accepted March 12, 2018

Monitoring Editor: Michael Melkonian

Two new genera (*Streptosarcina* and *Streptofilum*) and three new species (*Streptosarcina arenaria*, *S. costaricana* and *Streptofilum capillatum*) of streptophyte algae were detected in cultures isolated from terrestrial habitats of Europe and Central America and described using an integrative approach. Additionally, a strain isolated from soil in North America was identified as *Hormidiella parvula* and proposed as an epitype of this species. The molecular phylogeny based on 18S rRNA and *rbcL* genes, secondary structure of ITS-2, as well as the morphology of vegetative and reproductive stages, cell ultrastructure, ecology and distribution of the investigated strains were assessed. The new genus *Streptosarcina* forms a sister lineage to the genus *Hormidiella* (Klebsormidiophyceae). *Streptosarcina* is characterized by packet-like (sarcinoid) and filamentous thalli with true branching and a cell organization typical for Klebsormidiophyceae. *Streptofilum* forms a separate lineage within Streptophyta. This genus represents an easily disintegrating filamentous alga which exhibits a cell coverage of unique structure: layers of submicroscopic scales of piliform shape covering the plasmalemma and exfoliate inside the mucilage envelope surrounding cells. The implications of the discovery of the new taxa for understanding evolutionary tendencies in the Streptophyta, a group of great evolutionary interest, are discussed.

© 2018 The Author(s). Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Key words: *Streptosarcina*; *Streptofilum*; *Hormidiella*; Streptophyta; integrative approach; ultrastructure.

¹Corresponding author; fax +38 044 234 40 41
 e-mail t-mikhailyuk@ukr.net (T. Mikhailyuk).

<https://doi.org/10.1016/j.protis.2018.03.002>

1434-4610/© 2018 The Author(s). Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Streptophycean algae are an extremely interesting and important group in plant evolution as they are related to the ancestry of embryophytes (Graham et al. 1991; Kranz et al. 1995; Marin and Melkonian 1999; Lewis and McCourt 2004; Wodniok et al. 2011). Investigation of these algae will contribute to a deeper understanding about the evolution of basal lineages of the Streptophyta and the transition to land plants.

At present lineages of Streptophyta include several algal classes: Mesostigmato-phyceae, Chlorokybophyceae, Charophyceae, Coleochaetophyceae, Zygnematophyceae and Klebsormidiophyceae (Becker and Marin 2009; Friedl and Rybalka 2012; Lemieux et al. 2016; Lewis and McCourt 2004; Marin and Melkonian 1999; Van den Hoek et al. 1995). The three last mentioned classes exhibit considerable species biodiversity, with many taxa widely distributed and inhabiting aquatic and terrestrial environments (Delwiche et al. 2002; Gontcharov et al. 2003; Rindi et al. 2011). In contrast, the other mentioned lineages contain very low number of species which might be considered as rather rare or relict representatives (Leliaert et al. 2012; Lewis and McCourt 2004).

Streptophycean algae are a morphologically diverse group ranging from unicellular flagellates (*Mesostigma* Lauterborn) to coccoid (some Zygnematophyceae), filamentous (*Klebsormidium* Silva, Mattox et Blackwell, *Hormidiella* Iyengar et Kanthamma and others), sarcinoid taxa (*Chlorokybus* Geitler, some *Interfilum* Chodat) as well composite branched or parenchymatous thalli (*Coleochaete* Brébisson, Charophyceae) (Friedl and Rybalka 2012; Leliaert et al. 2012; Lewis and McCourt 2004). Also in terms of reproduction streptophycean algae exhibit numerous strategies: from simple binary fission to unique conjugation and highly developed oogamy in multicellular reproductive organs. Streptophycean algae are characterized by some ultrastructural characters typical for the majority of representatives: An asymmetrical cytoskeleton in flagellate cells with basal bodies connected with multilayered structures (MLS), presence of submicroscopic organic scales on plasmalemma and flagella (Lokhorst et al. 2000; Marin and Melkonian 1999; Mattox and Stewart 1984; Van den Hoek et al. 1995), open mitosis, persistent telophase spindle, cell division via a cleavage furrow or with formation of a phragmoplast in later diverging taxa (Lokhorst and Star 1985; Mattox and Stewart

1984; Pickett-Heaps 1972; Sluiman 1985; Van den Hoek et al. 1995) and presence of large peroxisomes located between chloroplast and nucleus (Lokhorst and Star 1985; Lokhorst et al. 2000; Melkonian 1989; Mikhailuyuk et al. 2014; Stewart et al. 1972).

The phylogeny of streptophycean algae is still controversially discussed over the past decades. The discovery of a unique phylogenetic position of the scaly flagellate *Mesostigma* in the Streptophyta and description of its ultrastructure was a remarkable event in phycology, because it justified the concept of structure, development and evolution of the streptophycean lineage (Marin and Melkonian 1999). Later investigations specified the taxonomic position of some other genera: *Chaetosphaeridium* Klebahn inside Coleochaetophyceae (Delwiche et al. 2002), *Spirotaenia* Brébisson in close relationship with *Chlorokybus* and distant from Zygnematophyceae (Gontcharov and Melkonian 2004), and some other genera (e.g. *Hormidiella*, *Entransia* Hughes, *Interfilum*) were added to Klebsormidiophyceae (Cook 2004; Lokhorst et al. 2000; Mikhailuyuk et al. 2008). Discussions concerning the possible sister group to the embryophytes also continue. Several lineages were proposed as putative ancestors of the embryophytes based on morphology, ultrastructure and molecular phylogeny (Bhattacharya and Medlin 1998; Graham 1984; Kranz et al. 1995; McCourt et al. 2004). More advanced analyses using multigene phylogenies showed a progress from early to the most recent studies, the latter included the largest data sets with better resolution than the previous ones (Cocquyt et al. 2010; Finet et al. 2010; Karol et al. 2001; Turmel et al. 2007; Wickett et al. 2014). The question of the closest relative of the embryophytes has been addressed by recent multigene-phylogenies, and it is currently thought that the Zygnematophyceae are the sister branch to embryophytes (Lemieux et al. 2007; Turmel et al. 2006; Wodniok et al. 2011). Phylotranscriptomic analysis using up to 852 nuclear genes clearly demonstrated, that the Zygnematophyceae is the sister lineage to embryophytes with maximal support (Wickett et al. 2014). However, the topology of the Streptophyta phylogeny is changing considerably depending on markers and datasets used (Lewis and McCourt 2004). The number of species known from this group is relatively small (except for the Zygnematophyceae) which represents a serious problem for resolving basal lineages of the Streptophyta in molecular phylogenies. The reason of the instability of this phylogeny is simply a lack of data, and hence it is reasonable

to assume that not all streptophycean taxa existing in nature were discovered and investigated so far.

Studies on terrestrial streptophycean algae are especially important in the evolutionary context of invasion of the land by plants ('terrestrialization'). Algae with a terrestrial life style were found mostly among Chlorokybophyceae and Klebsormidiophyceae, as well as some taxa of Zygnematophyceae, which all thrive in terrestrial and amphibian habitats (Ettl and Gärtner 2014). Over the years of research on terrestrial green algae from different biogeographic regions numerous new isolates were established as clonal cultures. The aim of the present study was to characterize undescribed isolates of the Streptophyta from terrestrial habitats in Europe, Central and North America. The selection of the strains derived from uncommon morphological traits, already observed in the light microscope. The description of new taxa included a polyphasic approach using a combination of molecular, morphological and ultrastructural markers.

Results

Molecular Phylogeny Based on 18S rRNA and *rbcL* Genes

For the present study five unialgal terrestrial strains from different biogeographic regions were used. The phylogenetic analyses of a concatenated 18S rRNA – *rbcL* sequence dataset revealed that the newly sequenced isolates belonged to three different lineages in the Streptophyta (Fig. 1). Two of these lineages were assigned to the clade that corresponded to the Klebsormidiophyceae with the genera *Klebsormidium*, *Interfilum*, *Hormidiella* and *Entransia*. Strain Luk-89 fell into the clade designated as *Hormidiella* and therefore represented a species of this genus. Strains AL-63 and SAG 36.98 formed a separate clade with a high level of support, sister to *Hormidiella*. This new lineage corresponded to a separate genus, which was named *Streptosarcina* Mikhailyuk et Lukešová gen. nov. (see below). Strain Luk-316a formed a separate lineage in the monophyletic Streptophyta but its precise position was unresolved in our phylogeny. The isolated position of this strain in the 18S rRNA – *rbcL* phylogeny suggested that it represents a separate genus, which was named *Streptofilum* Mikhailyuk et Lukešová gen. nov. (see below).

Comparison of ITS-2 Secondary Structures

To obtain better resolution within clades formed by strains of *Hormidiella* and *Streptosarcina*, the secondary structure of ITS-2 was evaluated together with 5.8S–28S rRNA stem region in all new isolates and the authentic strain of *Hormidiella attenuata* Lokhorst (CCAP 329/1). Secondary structures of ITS-2 of both *Hormidiella* strains (Luk-89 and CCAP 329/1) were similar in the 5.8S–28S rRNA stem and in helices I and II, but essentially different in helices III and IV (Fig. 2). In general, 6 CBCs (in helices II–IV), 3 hemi-CBCs (in helices II and III), 16 deletions of base pairs (in helices III and IV) and 7 mismatches, unpaired or single bases (in helices I, III and IV) were determined. Most of these differences were localized in the conservative part of ITS-2 (4 CBCs, 3 hemi-CBCs, 10 deletions of base pairs and 4 mismatches, unpaired or single bases) (Fig. 2).

The ITS-2 secondary structure of the investigated *Streptosarcina* strains (Fig. 3) differed in some essential details. Most differences were found between strain SAG 36.98 and the new strains AL-63 and Prim 3-3. Five hemi-CBCs (in helices I–IV), 3 deletions of base pairs (in helices III and IV) and 4 mismatches, unpaired or single bases (in helices I–III) were determined. Most of these differences were localized in the conservative part of ITS-2 (3 hemi-CBCs, 2 deletions of base pairs and 1 mismatch). Strains AL-63 and Prim 3-3 exhibited similar ITS-2 sequences (differed by 4 nucleotides). The secondary structure of ITS-2 of these strains showed differences in 2 mismatches or unpaired bases (in helices II and III) and 2 different nucleotides in loops (Fig. 3).

Morphology and Reproduction

The newly investigated strains represented either a filamentous morphotype (Luk-89, *Hormidiella*) or filaments that easily disintegrated to diads and unicells (Luk-316a, *Streptofilum*, and SAG 36.98, *Streptosarcina*), or a sarcinoid packet-like morphotype (AL-63 and Prim 3-3, *Streptosarcina*), see Figs 4A–C, 5A–D, H–M, 6A–C, 7A, F, I–L. The *Hormidiella* strain (Luk-89) was characterized by strong or disintegrating filaments with short-cylindrical cells, partly slightly constricted at cross walls and with some attributes of heteropolarity (Figs 4A–C, 7A). H-like fragments sometimes formed (Fig. 4J). Two strains of *Streptosarcina* (AL-63 and Prim 3-3, *S. arenaria* Mikhailyuk et Lukešová gen. et sp. nov.) had spherical, hemispherical or widely

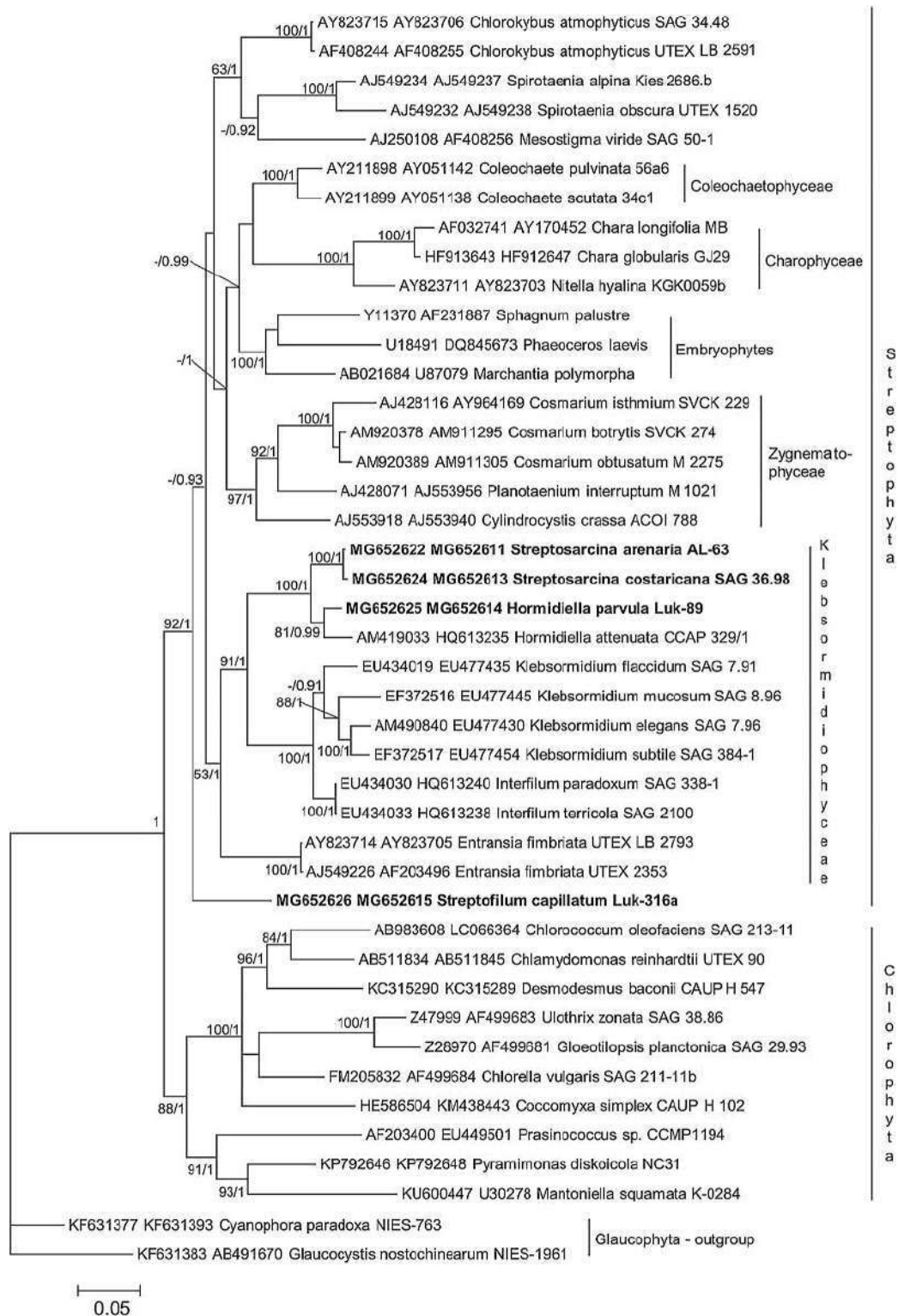


Figure 1. Molecular phylogeny of Streptophyta based on concatenated dataset 18S rRNA and *rbcL* sequences. Phylogenetic tree was inferred by Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and maximum likelihood (ML) bootstrap support (BP) indicated at nodes. From left to right, support values correspond to ML BP and Bayesian PP; BP values lower than 50% and PP lower than 0.8 not shown. Strains marked with bold are newly sequenced isolates. Clade designations follow [Leliart et al. \(2012\)](#).

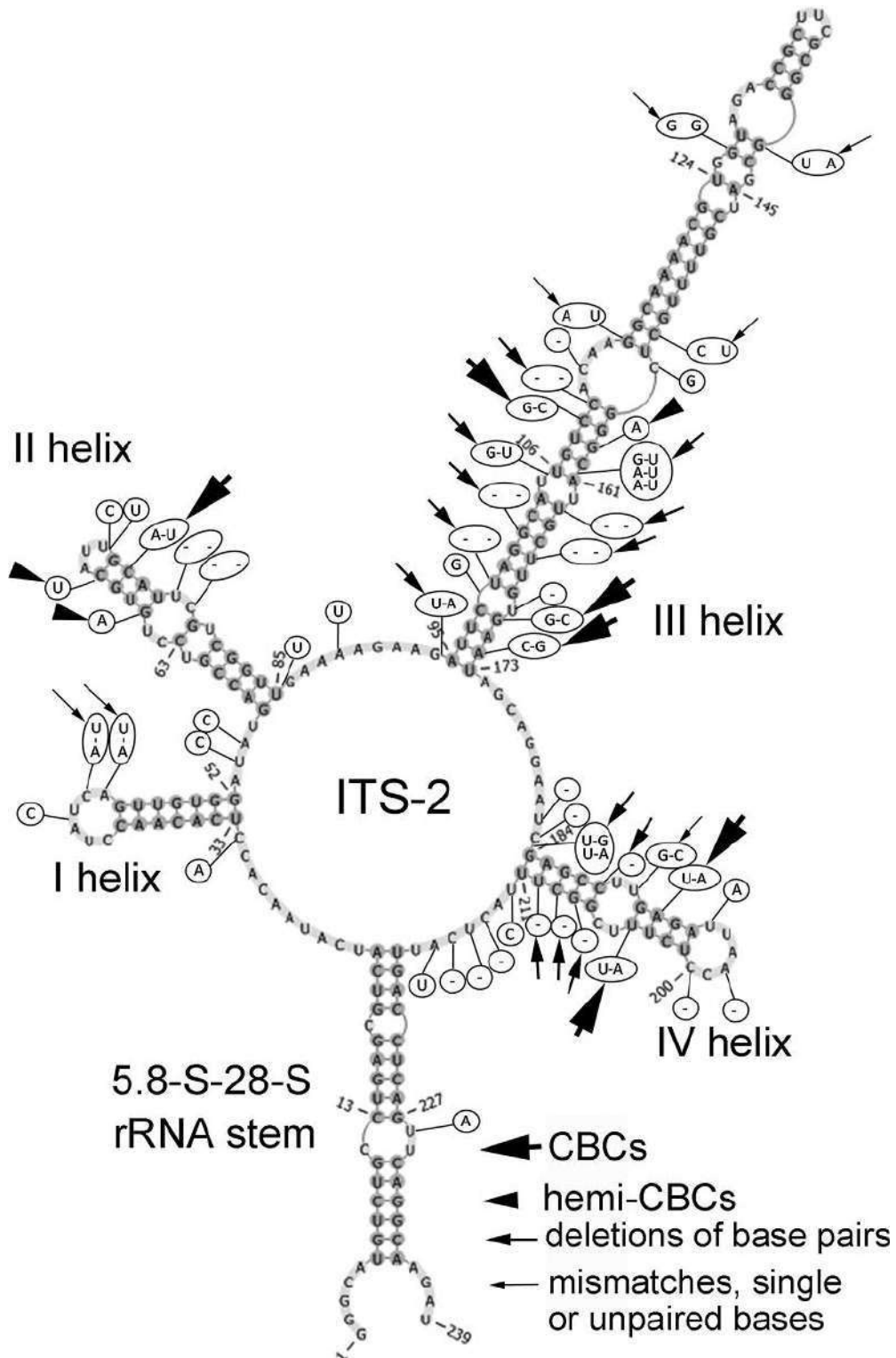


Figure 2. Comparison of ITS-2 secondary structure of *Hormidiella* strains. The structure of *H. parvula* (Luk-89) is presented with the differences to *H. attenuata* (CCAP 329/1) highlighted. Variable bases or base pairs of *H. attenuata* are shown with circles.

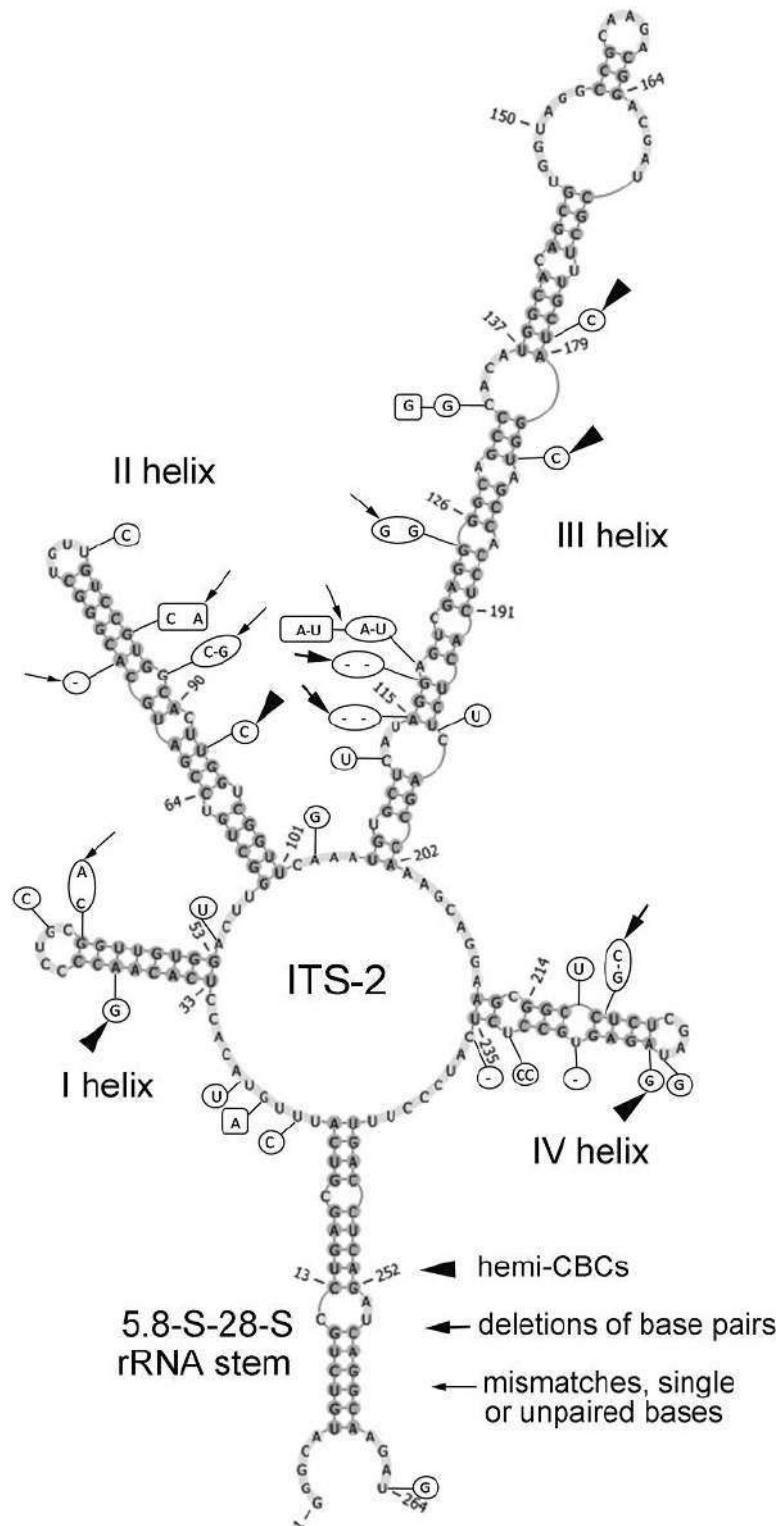


Figure 3. Comparison of ITS-2 secondary structure of *Streptosarcina* strains. The structure of *S. arenaria* (AL-63) is presented with the differences to another strain of *S. arenaria* (Prim 3-3) and to *S. costaricana* (SAG 36.98). Variable bases or base pairs of *S. arenaria* (Prim 3-3) are shown with boxes and *S. costaricana* (SAG 36.98) with circles.



Figure 4. Morphology and reproduction of *Hormidiella parvula* (Luk-89). **A–C**) Vegetative filaments in adult (**A, B**) and young state (**C**). **D**) Formation of sporangia (arrows). **E**) Empty sporangia with openings in cell wall (arrows). **F**) Zoospore. **G**) Stopped zoospore, formation of papilla (arrow). **H, I**) Germination of young filament with the stalk. **J**) H-like fragments of cell wall (arrows). Scale bars: A–E, J are 10 μm , F–I are 5 μm .

ellipsoid cells grouped in three-four-celled packets or formed sometimes short filaments (Figs 5A–D, 7F). Another *Streptosarcina* strain (SAG 36.98, *S. costaricana* Mikhailyuk et Lukešová gen. et sp. nov.) exhibited elongated cylindrical cells which were separated or grouped in short easily disintegrated filaments or diads (Figs 5H, 7I). Also attributes of branching or budding (lateral bulging of the cell wall close to the cell's apex) could be observed in this strain (Figs 5I–K, 7K). H-like fragments sometimes formed at the end of filaments (Figs 5L, 7J). Strain Luk-316a (*Streptofilum*) was characterized by ellipsoid cells, separated or grouped in diads or short filaments by a mucilaginous sheath that surrounded the cells (Figs 6A–C, 7L). All investigated strains showed a plate-shaped chloroplast that occupied 50–70%

of inner cell circumference with smooth (*Hormidiella* and *Streptofilum*, Figs 4A–C, 6A–C, 7A, L) or wavy and lobed edges (*Streptosarcina* strains, Figs 5A–D, H–M, 7F, I). All algal strains exhibited single pyrenoids surrounded by several or many starch grains, and in *Streptosarcina* strains numerous starch grains oriented in parallel rows (Figs 4A–C, 5A–D, H–M, 6A–C, 7A, F, I, L). The pyrenoid of *Streptosarcina* strain SAG 36.98 elongated in long cells and disintegrated into several small pyrenoids forming a line (Figs 5L, M, 7J). Cells were uninucleate with nuclei located opposite the pyrenoids (Figs 4A, C, 5H, I, K, 6B, 7A, F, I, L). The nucleus was located in a cytoplasmic bridge between two terminal vacuoles in the long cylindrical cells of *Streptosarcina* strain SAG 36.98 (Figs 5H, 7I). A mucilage sheath was observed only in the

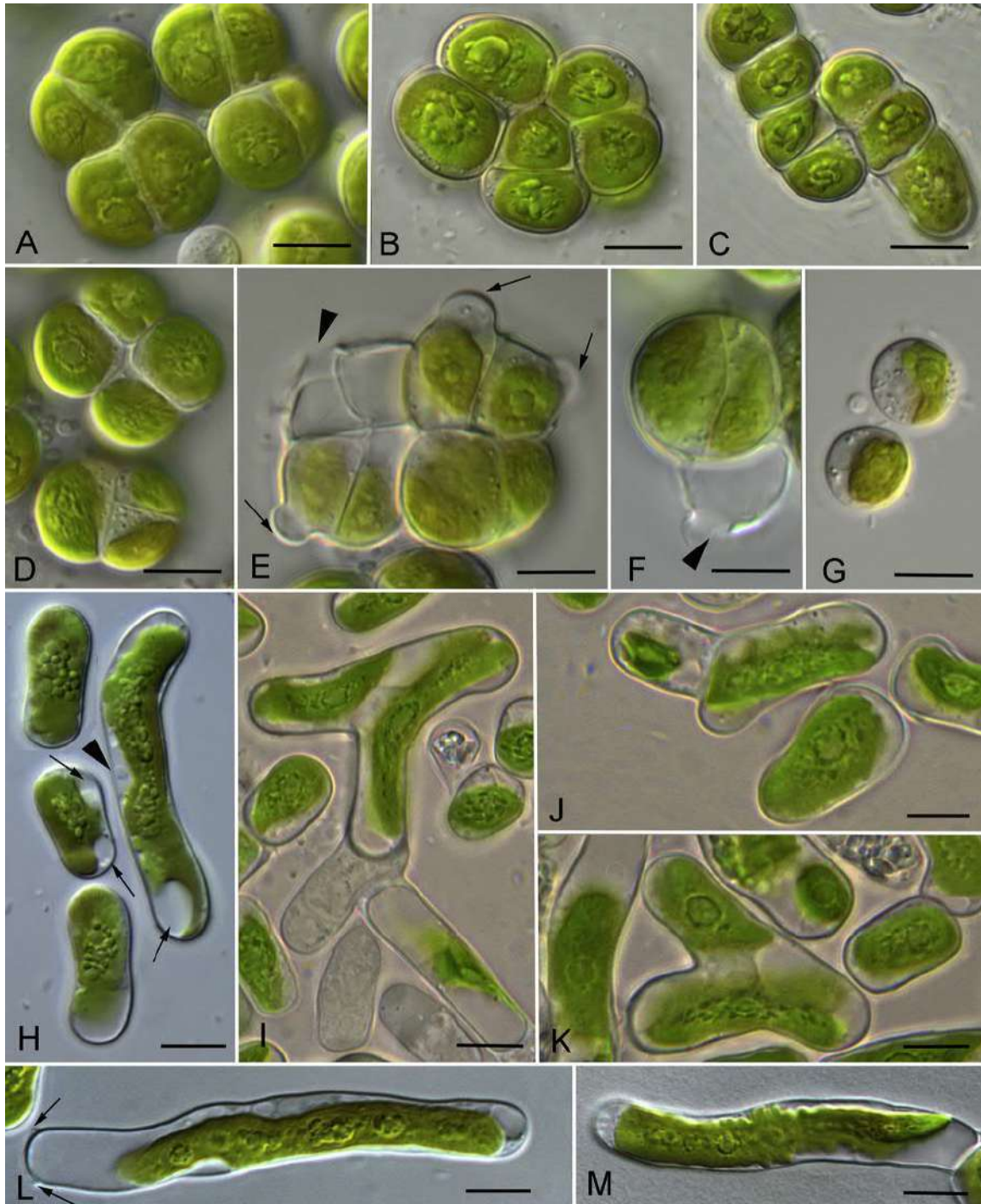


Figure 5. Morphology and reproduction of *Streptosarcina* gen. nov. **A–G** *S. arenaria* sp. nov. (AL-63 (**B, C**) and Prim-3-3 (**A, D–G**), **A, B, D**). Packet-like vegetative thallus. **C** Filaments. **E, F** Formation of sporangia (arrows) and empty sporangia with openings in cell wall (arrowheads). **G** Stopped zoospores. **H–M** *S. costaricana* sp. nov. (SAG 36.98). **H** Unicellular stage, nucleus (arrowhead) and terminal vacuoles (arrows) are visible. **I–K** Branching of filaments. **L, M** Elongated cells with multiple pyrenoids from old culture, H-like fragments of cell wall are visible (arrows). Scale bars are 10 μm.

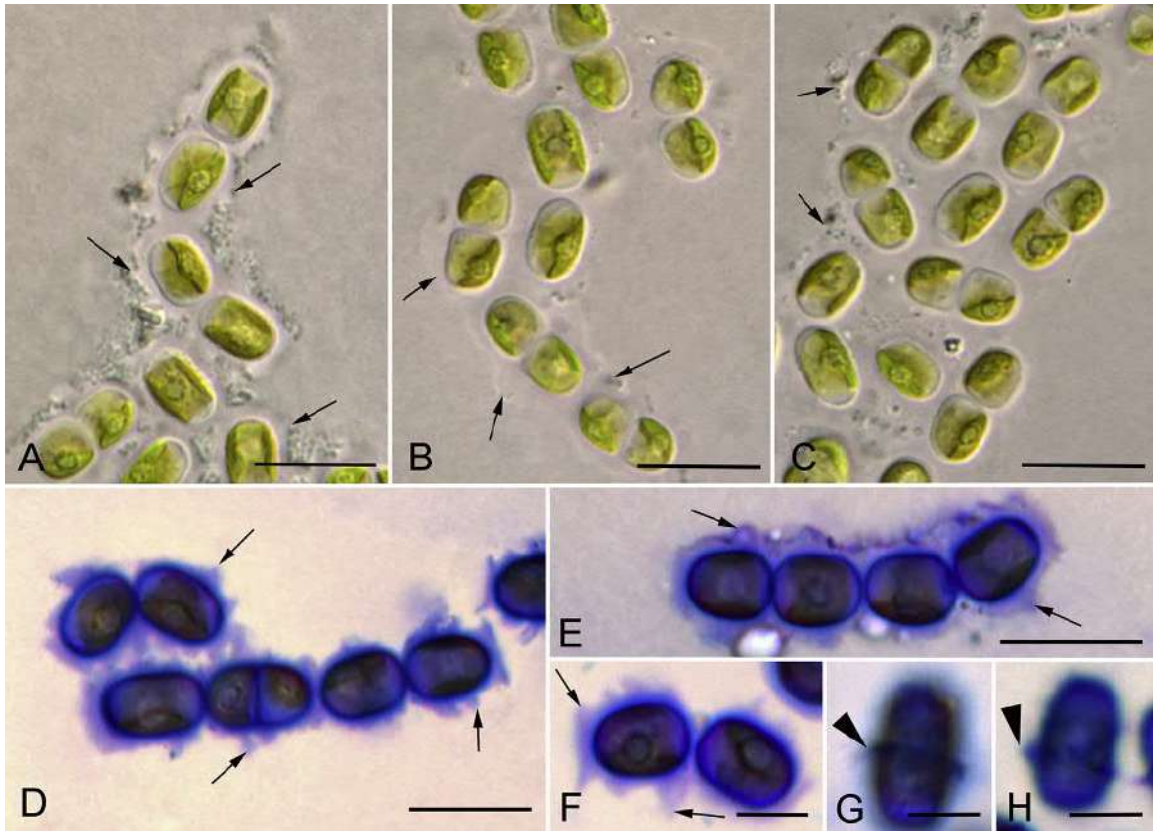


Figure 6. Morphology of *Streptofilum capillatum* gen. et sp. nov. (Luk-316a). **A–C**) Filaments and cell dyads surrounded by mucilage envelope (arrows). **D–H**) Mucilage staining by methylene blue. Homogenous mucilage envelope with lobbed edge (arrows) and collar structures (arrowheads) are visible. Scale bars: A–E are 10 μm , F–H are 5 μm .

Streptofilum strain, while all other isolates lacked this feature. Mucilage showed a homogenous structure and a specific irregular to lobbed surface (Figs 6D–F, 7L), as well as formation of a collar in the middle of the cell or cap-like structures during staining with methylene blue (Fig. 6G, H).

Cells of *Hormidiella* and *Streptofilum* divided in one plane with the formation of uniseriate filaments or cell diads (Figs 4A–C, 6A–C, 7A, L). Cells of *Streptosarcina* divided in several planes with the formation of packets (AL-63 and Prim 3-3, Fig. 5A–D), and branch-like structures (SAG 36.98, Figs 5I–K, 7K). Reproduction by zoospores was induced in the new *Hormidiella* strain and in two strains of *Streptosarcina* (AL-63 and Prim 3-3). One zoospore per cell was formed. Zoosporangia formed a rounded protrusion which later ruptured by a small opening releasing zoospores (Figs 4D, E, 5E, F, 7B, G). Zoospores were ellipsoid, lacking cell wall and stigma, with two equal subapical flagella (Figs 4F, 7C, H). Vegetative cells originating

from zoospores of *Streptosarcina* were spherical (Figs 5G, 7H). Zoospores of *Hormidiella* formed a papilla at the area where the flagella were inserted (Figs 4G, 7D). The papilla formed later a conspicuous stalk with a small non-ramified holdfast (foot) and young cells developed a *Characium*-like morphology (Figs 4H, I, 7E).

Ultrastructure

The ultrastructure of the cytoplasmic part of vegetative cells of *Streptosarcina*, *Hormidiella* and *Streptofilum* were similar. The chloroplast was always located at one side of the cell, covering half of the cell's inner surface (Figs 7M, 8A, C, G, 9A, B), and it was richly lobed in *Streptosarcina* or had a smooth edge in *Hormidiella* and *Streptofilum*. The pyrenoid matrix was traversed by several parallel arranged thylakoid membranes in *Streptosarcina*, and often surrounded by several layers of small starch grains (Fig. 8C, D, G, I). In

contrast, pyrenoids of *Hormidiella* and *Streptofilum* were surrounded by a layer of large starch grains (Figs 7M, 8A, 9A). The pyrenoid matrixes of these representatives were homogenous with thylakoid membranes invading the surrounding starch and continuing between starch grains and pyrenoid matrix (Figs 7M, 8A, 9A). Between the nucleus and chloroplast, one single peroxisome was located in all investigated strains, that showed a slightly curved bacilliform shape in cross-sections, occasionally several profiles of the peroxisome were observed (Figs 7M, 8B, D, H, 9B). Numerous mitochondrial profiles were observed in the cells of all strains and were mostly located close to the chloroplast (Figs 7M, 8A–H, 9A). The vegetative cells of *Streptosarcina* included a pair of centrioles (Fig. 8E, F, H).

Vegetative cells of all investigated strains of *Streptosarcina* and *Hormidiella* were surrounded by a cell wall of typical structure for Klebsormidiophyceae (Fig. 8A–C, E, G–I). Although cells of *Streptofilum* were lacking a classical cell wall, they were surrounded by a plasmalemma with many layers of specific scales submerged in the mucilage surrounding the cells (Figs 7M, N, 9A–G). These scales exhibited a piliform shape, oriented in different directions and formed two distinct layers. The scales of the inner layer were more densely arranged, while the outer layer was friable with wavy edges and exfoliated scales (Figs 7N, 9C, D, F). Sometimes exfoliated layers of scales formed cap-like structures (Figs 7M, 9D). Some clusters of scales enclosed in the cytoplasm were observed, perhaps acting as transport mechanism to the cell surface (Fig. 9F, G).

Discussion

Phylogeny of *Hormidiella*, *Streptosarcina* and *Streptofilum*

Phylogenetic analysis based on a concatenated set of 18S rRNA and *rbcL* sequences mostly corresponded with the phylogeny of streptophycean algae provided in studies of [Bhattacharya and Medlin \(1998\)](#), [Marin and Melkonian \(1999\)](#), [Delwiche et al. \(2002\)](#), [Mikhailyuk et al. \(2008\)](#), [Sluiman et al. \(2008\)](#) and was also mostly in agreement with investigations using multigene phylogenies ([Finet et al. 2010](#); [Lemieux et al. 2007, 2016](#); [Wodniok et al. 2011](#)). Some differences between the mentioned and the phylogenetic trees of the present study are typical for the general topology of the Streptophyta tree which might

strongly vary depending on the selection of data sets in terms of taxa or characters used ([Friedl and Rybalka 2012](#); [Leliaert et al. 2012](#); [Lewis and McCourt 2004](#)).

Strain Luk-89 showed clearly a very close position to *Hormidiella* with high support. Morphological characters of the vegetative thallus and reproductive stages of this strain confirmed the position of Luk-89 inside *Hormidiella* as well (see below). The resolution between the investigated strain Luk-89 and the authentic strain *H. attenuata* CCAP 329/1 was quite prominent. Comparison of the ITS-2 secondary structures of both strains showed some differences too: 6 CBCs, 3 hemi-CBCs, 23 deletions of base pairs, mismatches, unpaired or single bases, the most part of which are localized in conservative region of ITS-2. These conspicuous base pair differences are the basis for assigning both strains to two separate species (see [Coleman 2009](#); [Dariencko et al. 2010](#); [Demchenko et al. 2012](#)). Sequence comparison of Luk-89 and CCAP 329/1 with other known species of *Hormidiella* (*H. parvula* [Iyengar et Kanthamma](#) and *H. bhartiensis* [Subrahmanyam](#)) is not possible because of lack of molecular data. However, comparison of morphological characters, ecology and distribution of the new isolate with other known species of *Hormidiella* showed that strain Luk-89 can be identified as *H. parvula* (type species of the genus). Therefore, we emended the diagnosis of this species and proposed strain Luk-89 as the epitype of *H. parvula* (see below).

The isolates SAG 36.98 and AL-63 formed a well-supported clade corresponding to the newly erected genus *Streptosarcina*. Resolution between the investigated strains of *Streptosarcina* in our 18S rRNA – *rbcL* phylogeny is not clear, although comparison of ITS-2 secondary structures of these strains showed some differences among two groups: European strains AL-63 and Prim 3-3 were different from the Costa-Rica isolate SAG 36.98. The observed differences (in general 5 hemi-CBCs, 3 deletions of base pairs and 4 mismatches, unpaired or single bases) are mainly localized in the conservative region and might be sufficient to justify two separate species. Therefore, two new species of *Streptosarcina*, namely *Streptosarcina arenaria* (AL-63 and Prim 3-3) and *S. costaricana* (SAG 36.98) were erected, based on ITS-2 secondary structure as well as on geographical distribution and morphology (see below).

Isolate Luk-316a was positioned in the phylum Streptophyta as a separate lineage. This new lineage is very distant from all known genera of Streptophyta. Therefore Luk-316a was erected as

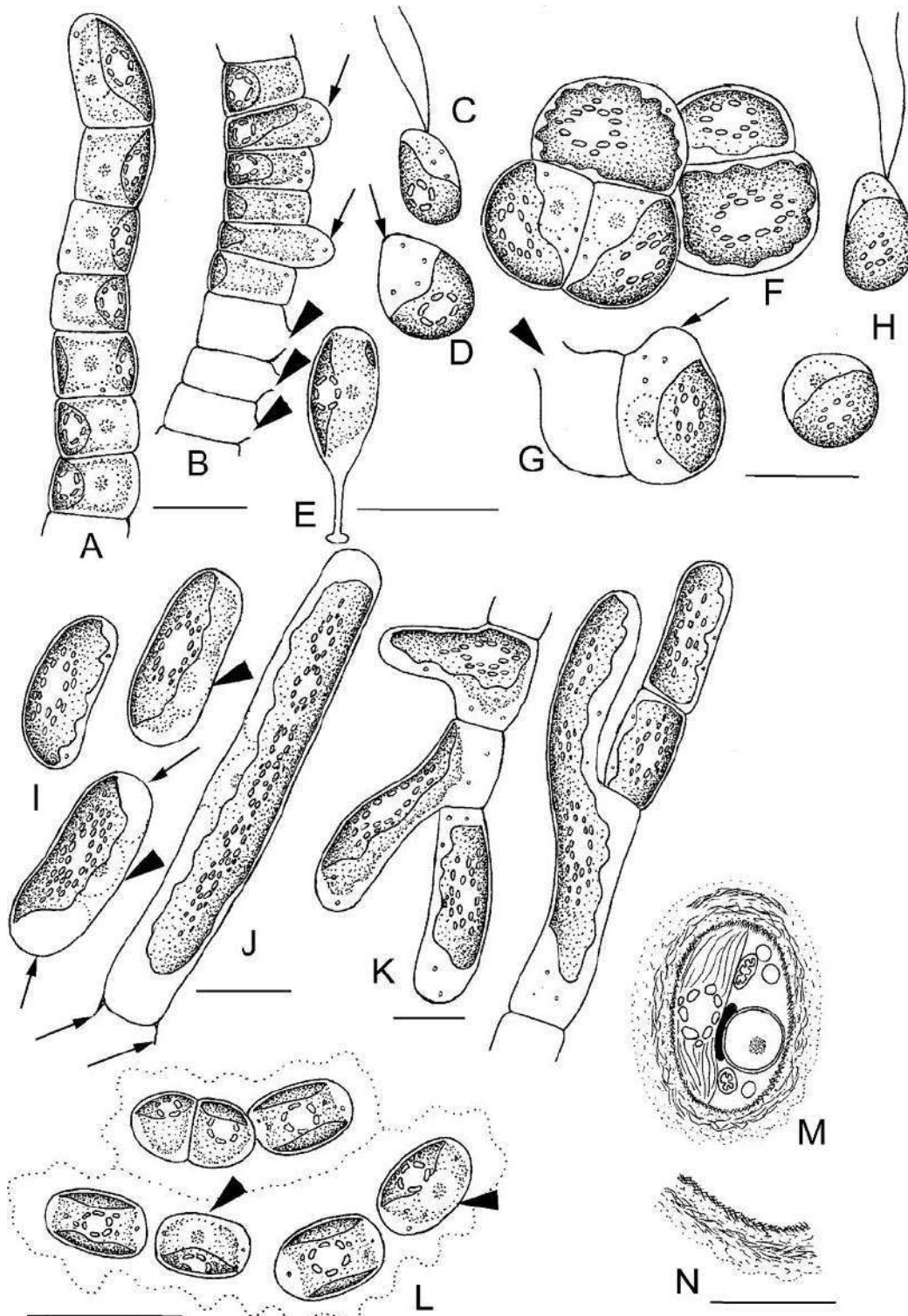


Figure 7. Drawings of *Hormidiella*, *Streptosarcina* and *Streptofilum* species. **A-E**) Morphology and reproduction of *Hormidiella parvula* **A**) Vegetative filament. **B**) Sporangia (arrows) and empty sporangia with openings in cell wall (arrowheads). **C**) Zoospore. **D**) Stopped zoospore, formation of papilla (arrow). **E**) Germination of young filament with the stalk. **F-H**) *Streptosarcina arenaria* sp. nov. **F**) Packet-like vegetative thallus. **G**). Sporangium (arrow) and empty sporangium with opening in cell wall (arrowhead). **H**) Zoospore and stopped zoospore. **I-K**)

a new genus (*Streptofilum* gen. nov.). Unique ultrastructural characters, particularly the absence of a classical cell wall in this strain, confirmed its separate position in the Streptophyta (see below).

Definition and Phylogeny of the Genus *Hormidiella*

Isolate Luk-89 was assigned as member of *Hormidiella*. Morphology, ultrastructure and reproduction of Luk-89 completely corresponded with characters described for other members of *Hormidiella*: filaments with a tendency for heteropolarity, formed by narrow short-cylindrical cells, plate-shaped chloroplast with pyrenoid surrounded by several starch grains, reproduction by naked stigma-less zoospores with two subapical flagella, germination of zoospores with a stalk, large peroxisome between chloroplast and nucleus, homogenous pyrenoid matrix, etc. (Iyengar and Kanthamma 1940; Lokhorst et al. 2000). Further analysis of the ITS-2 secondary structure showed that Luk-89 and *H. attenuata* CCAP 329/1 differed considerably and hence represent two separate species.

Three species of *Hormidiella* are known: *H. parvula* (type of the genus), *H. bhartiensis* and *H. attenuata* which differ by width of filaments, number of pyrenoids per cell, shape of terminal cell, zoospores structure, absence/presence of sexual reproduction etc. (Iyengar and Kanthamma 1940; Subrahmanyam 1976; Lokhorst et al. 2000). All these species inhabit soils or amphibian habitats (rain puddle), and they were described from tropical regions (India and Brazil). But only *H. attenuata* was so far comprehensively investigated due to the availability of the authentic strain CCAP 329/1. Moreover, *H. bhartiensis* seems to be the most unique species (characterized by sexual reproduction via heterogamy and the presence of zoospores and gametes with uneven flagella) and probably represents another separate lineage outside of the Klebsormidiophyceae (Lokhorst et al. 2000).

Strain Luk-89 is morphologically similar to *H. parvula* especially with respect to the width of filaments, but differs by the absence of a stalk in adult filaments (perhaps due to culture conditions, although zoospores germinate with the formation

of stalks with a non-ramified holdfast, the same as illustrated for *H. parvula* and *H. attenuata* (Iyengar and Kanthamma 1940; Lokhorst et al. 2000)). The place of origin of Luk-89 (isolated from soils of North America) is distant from the type locality of *H. parvula* (soils of India). Members of *Hormidiella* are rather rare algae, but some findings of *H. parvula* are also known for Europe, North and South America (Freitas and Loverde-Oliveira 2013; Paczuska and Paczuski 2015; Patrick 1996). Therefore, we identified Luk-89 as *H. parvula*, and propose Luk-89 as epitype of this species together with an emendation of the species diagnosis based on new data.

Hormidiella parvula Iyengar et Kanthamma (1940) J. Indian Bot. Soc. 19: 165, pl. V; text-figs 1–35 **emend. Mikhailiyuk et Lukešová** (Figs 4A–J, 7A–E, 8A, B)

Emended description: Filaments long, unbranched, sometimes disintegrated to short filaments in old state, (6.0)7.8–8.8(10.2) μm width. Vegetative cells cylindrical to short-cylindrical and doliiform by slight constrictions, (4.4)5.3–8.5(14.6) μm length, to 2 times as long as wide in young state and (0.3)0.5–1(1.4) times as long as wide in mature filaments. Apical cell slightly narrowed and attenuated, especially in young filaments. Cell wall smooth, H-like fragments rarely observed. Chloroplast parietal, plate-shaped, with smooth margin and single pyrenoid surrounded by a layer of several starch grains. Vegetative reproduction by cell division in one plane (perhaps sporulation-like type) and fragmentation of thalli. Asexual reproduction by ellipsoid, naked, stigma-less zoospores with two equal subapical flagella. Zoosporangia originated from vegetative cells by formation of small rounded protrusion which later ruptured by small opening releasing zoospores. Zoospores formed one per sporangium and germinate with formation of a stalk with non-ramified holdfast. Germ has *Characium*-like morphology. Sexual reproduction not observed.

Type locality: India, Madras, soil.

Epitype (designated here): The authentic strain Luk-89 (BCCO 30_2136, SAG 2558) is permanently cryopreserved in metabolically inactive state

S. costaricana sp. nov. **I**) Unicellular stage, nuclei (arrowheads) and terminal vacuoles (arrows) are visible. **J**) Elongated cell with multiple pyrenoids from old culture, H-like fragments of cell wall are visible (arrows). **K**) Branching of filaments. **L–N**) Morphology and ultrastructure of *Streptofilum capillatum* gen. et sp. nov. **L**) Filament and cell dyad surrounded by mucilage envelope, nuclei (arrowheads) are visible. **M, N**) Reconstruction of TEM micrographs with details of cell ultrastructure and coverage. Scale bars: A–L are 10 μm , M, N is 5 μm .

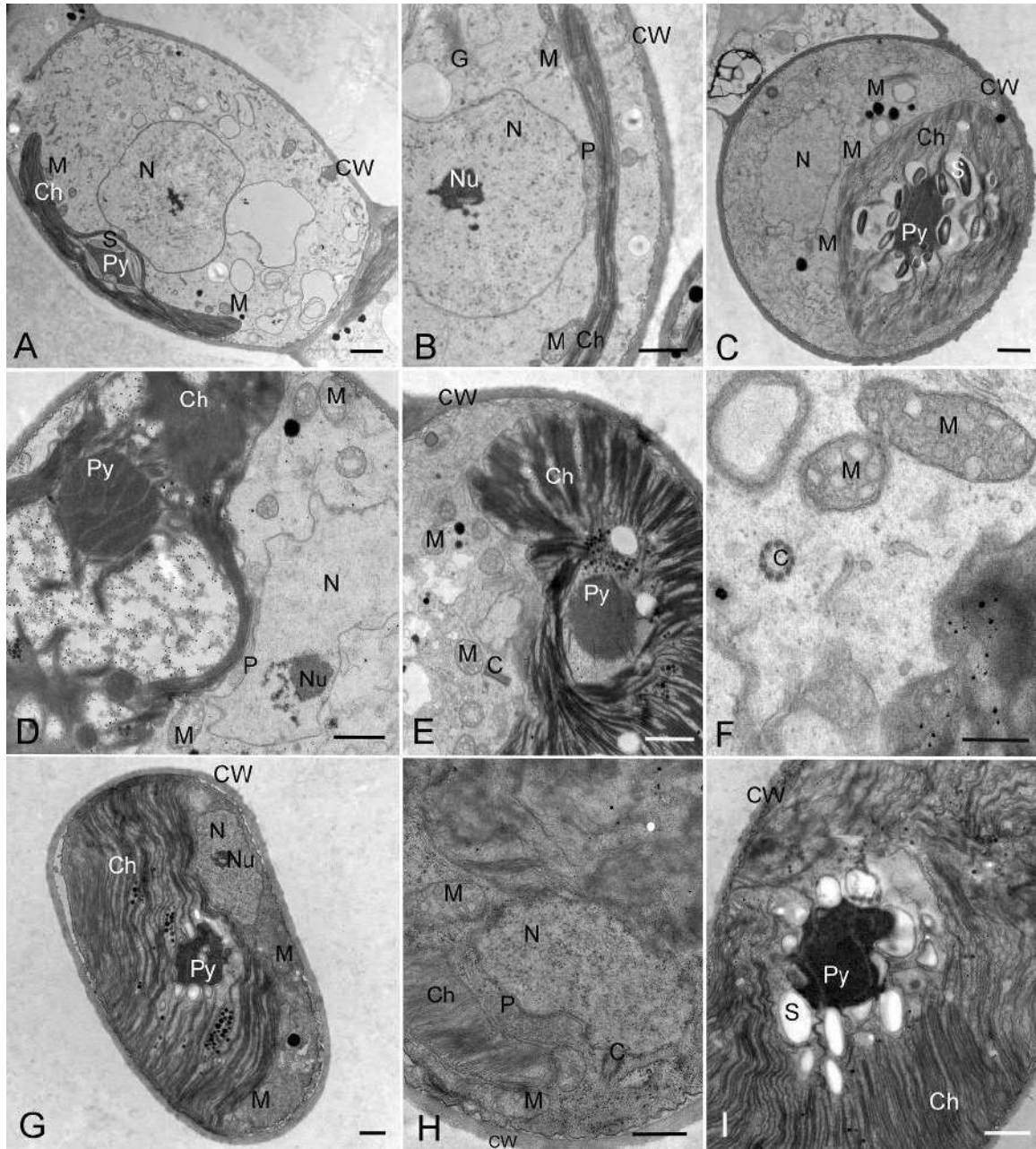


Figure 8. Transmission electron micrographs of *Hormidiella* and *Streptosarcina* species. **A, B**) *H. parvula* (Luk-89). **A**) Cell in overview. **B**) Portion of cell showing closely arranged chloroplast, peroxisome and nucleus. **C-F**) *S. arenaria* gen. et sp. nov. (Prim-3-3). **C**) Cell in overview. **D-F**) Portions of cells showing closely arranged chloroplast, peroxisome and nucleus, pyrenoid traversable by parallel thylakoids, centrioles and chloroplast structure. **G-I**) *S. costaricana* gen. et sp. nov. (SAG 36.98). **G**) Cell in overview. **H, I**) Portions of cells showing closely arranged chloroplast, peroxisome and nucleus, pyrenoid traversed by parallel arranged thylakoids and chloroplast structure. Abbreviations: Ch, chloroplast; Py, pyrenoid; S, starch; N, nucleus, Nu, nucleolus; P, peroxisome; M, mitochondrion, G, Golgi body; C, centrioles; CW, cell wall. Scale bars: A-E, G-I are 1 μm , F is 0.5 μm .

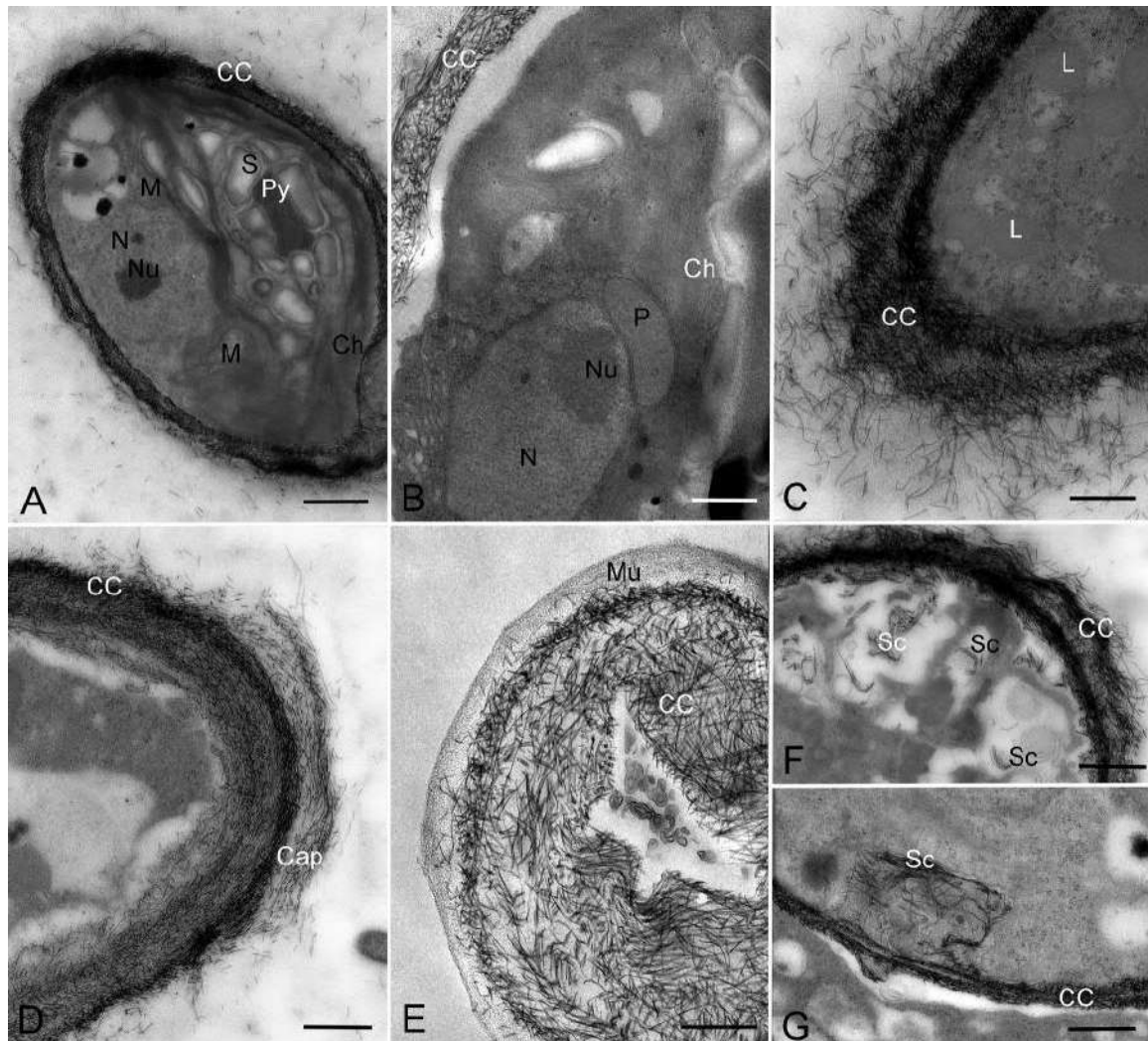


Figure 9. Transmission electron micrographs of *Streptofilum capillatum* gen. et sp. nov. (Luk-316a). **A**) Cell in overview showing pyrenoid, chloroplast and cell coverage by scales. **B**) Portion of cell showing closely arranged chloroplast, peroxisome and nucleus. **C-E**) Cell coverage forming by scales in section (**C**, **D**) and surface section (**E**). **F**, **G**) Origination of scales inside cells (likely transported to cell surface). Abbreviations: Ch, chloroplast; Py, pyrenoid; S, starch; N, nucleus; Nu, nucleolus; P, peroxisome; M, mitochondria; L, lipid globules; CC, cell coverage; Mu, mucilage; Sc, scales in the inner parts of the cell, likely prior to deposition to the cell surface. Scale bars: A, E are 1 μm , B-D, F, G are 0.5 μm .

(cryopreserved in liquid nitrogen) in the Culture collection of soil algae and cyanobacteria of the Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic. Additionally culture material of strain Luk-89 (BCCO 30_2136, SAG 2558) preserved in 4% formaldehyde, Algotheca of M.G. Kholodny Institute of Botany of NASU of Ukraine (AKW-32371).

Epitype strain: Luk-89 was deposited in SAG, University of Göttingen, Germany under number SAG

2558 and BCCO, Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic under number BCCO 30_2136.

Comments: The proposed epitype strain Luk-89 is morphologically similar to the original description, but differs by the absence of a stalk in adult filaments perhaps because of culture conditions, although zoospores germinate with the formation of stalks.

Definition and Phylogeny of the Genus *Streptosarcina*

Three isolates (AL-63, Prim 3-3 and SAG 36.98) were assigned to the clade of Klebsormidiophyceae, but formed a separate lineage which refers to a new genus (*Streptosarcina* gen. nov.). All investigated strains exhibited similar morphological and ultrastructural characters which are typical for Klebsormidiophyceae: plate-shaped chloroplast with several layers of small starch grains, pyrenoid matrix traversable by several single thylakoids, reproduction by naked stigma-less zoospores with two equal subapical flagella, large peroxisome between chloroplast and nucleus etc. (Cook 2004; Lokhorst 1996; Lokhorst et al. 2000; Mikhailyuk et al. 2008, 2014; Rindi et al. 2011). One particularly interesting ultrastructural feature is the occurrence of centrioles in strain Prim-3-3 (*S. arenaria*). This underpins also the phylogenetic position close to *Hormidiella* and *Entransia*. Centrioles have been observed in both genera (Cook 2004; Herburger et al. 2016; Lokhorst et al. 2000), and this was regarded as a clear difference from *Klebsormidium* and *Interfilum*, both lacking these structures.

The general morphology of the three isolates is quite different: packet-like thallus (AL-63 and Prim 3-3, *S. arenaria*) and filamentous thallus with tendency to branching (SAG 36.98, *S. costaricana*). Strain SAG 36.98 was formerly identified as *Pseudopleurococcus speciosus* nom. inval. (<http://www.uni-goettingen.de/en/45175.html>), its sequence was placed in NCBI under the species name *Pseudopleurococcus* sp. The genus *Pseudopleurococcus* Snow unites algae with branched, sarcinoid or pleurococoid thalli (Ettl and Gärtner 2014). Some species of *Pseudopleurococcus* were transferred to the genus *Dilabifilum* Tschermak-Woess (Ulvophyceae), while others remained representatives of the mentioned genus (Trebouxiophyceae) (Ettl and Gärtner 2014). Darienko and Pröschold (2017) recently revised some members of the Ulvophyceae and transferred different *Pseudopleurococcus* species to the genera *Pseudendozonium* Wille and *Ctenocladus* Borzi. It might be possible that initially SAG 36.98 represented a richly branched alga with pleurococoid thallus, but growing in culture for decades influenced its morphology. This strain still forms branched filaments which appear extremely fragile, and therefore this alga in the light microscope appears as unicells or short filaments with a tendency to branching.

AL-63 and Prim 3-3 have identical morphology and represent strong sarcinoid aggregates composed mostly of 2-3-4 and more vegetative cells (up to 8-16), but sometimes form unicells and short non-branched filaments. Both strains of *S. arenaria* (AL-63 and Prim 3-3) were isolated from sandy soils, but from different regions (Slovakia and Ukraine). Both *Streptosarcina* species exhibit a similar type of cell division (sporulation-like type) that is typical for *Klebsormidium* and *Interfilum* (Mikhailyuk et al. 2014) and probably for some other streptophycean taxa (e.g. *Chlorokybus*). Differences in thallus morphology of *Streptosarcina* are caused by different shape of cells of both species: almost spherical in *S. arenaria* and elongated in *S. costaricana*. But in both species cells divide in several planes with the formation of packet-like aggregation of cells, non-branched or branched filaments. Branches in *S. costaricana* are formed by budding; branching starts by lateral bulging of the cell wall close to the cell's apex, a process typical for many branched algae from different lineages (Starmach 1972; Moshkova 1979; Van den Hoek et al. 1995).

Streptosarcina Mikhailyuk et Lukešová gen. nov.

Diagnosis. Thallus with sarcinoid, packet-like or branched morphology, sometimes disintegrating to short filaments, cell diads and unicells. Vegetative cells wide-ellipsoid, hemispherical to ellipsoid and cylindrical. Cell wall smooth. Chloroplast parietal, plate-shaped, with wavy or dissected margin and one or several pyrenoid surrounded by layers of small starch grains. Vegetative reproduction by cell division in several planes (sporulation-like type) and fragmentation of thalli. Formation of branches by budding. Asexual reproduction by naked, stigma-less zoospores with two equal subapical flagella. Zoospores formed one per sporangium and released through small opening in the cell wall. Sexual reproduction not observed.

Morphologically similar with other sarcinoid and filamentous algae from Streptophyta (*Interfilum*, *Chlorokybus*, *Klebsormidium*), but differs by true branching and absence of mucilage. Generally morphologically similar to some genera of Chlorophyta (*Apatococcus* Brand, *Desmococcus* Brand, *Pseudendozonium* etc.), but differs by organization of vegetative and reproductive cells typical for Streptophyta, as well as by 18S rRNA and *rbcl* sequences.

Type species: *Streptosarcina arenaria* Mikhailyuk et Lukešová sp. nov.

Etymology: from the name of division – Streptophyta and Latin word sarcina – packet, cluster (referring to packet-like, sarcinoid morphology).

Streptosarcina arenaria Mikhailyuk et Lukešová sp. nov. (Figs 5A–G, 7F–H, 8C–F)

Diagnosis. Thallus with sarcinoid, packet-like morphology, sometimes disintegrating to short filaments, cell diads and unicells. Vegetative cells wide-ellipsoid or hemispherical, 8.7–10.3(11.9) μm width, 14.2–15.5 μm length. Cell wall smooth. Chloroplast parietal, plate-shaped, with wavy or dissected margin and single pyrenoid surrounded by layers of small starch grains. Vegetative reproduction by cell division in several planes (sporulation-like type) and fragmentation of thalli. Asexual reproduction by naked, stigma-less zoospores with two equal subapical flagella. Zoosporangia originated from vegetative cells by formation of small rounded protrusion which later ruptured by small opening releasing zoospores. Zoospores formed one per sporangium. Sexual reproduction not observed.

Differs from *S. costaricana* by shape of cells and general sarcinoid morphology. Morphologically similar with other sarcinoid algae from Streptophyta (*Interfilum*, *Chlorokybus*), but differs by absence of mucilage. Generally similar to some genera of Chlorophyta (*Apatococcus*, *Desmococcus*), but differs by organization of vegetative and reproductive cells typical for Streptophyta, as well as by 18S rRNA and *rbcL* sequences.

Habitat: sand or sandy soil.

Type locality: Slovakia, near town Malacky, Lozorno, completely burned out pine forest (pine plantation) in drift sand, sandy soil with thin layer of ash, altitude: 48.373890864, longitude: 17.029250428, 202 m a.s.l.

Holotype (designated here): The authentic strain AL-63 (BCCO 30_2608, SAG 2560) is permanently cryopreserved in metabolically inactive state (cryopreserved in liquid nitrogen) in the Culture collection of soil algae and cyanobacteria of the Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic. Additionally culture material of authentic strain AL-63 (BCCO 30_2608, SAG 2560) preserved in 4% formaldehyde, Algotheca of M.G. Kholodny Institute of Botany of NASU of Ukraine (AKW-32372).

Iconotype (designated here in support of the holotype): Figure 7F–H.

Authentic strain: AL-63 was deposited in SAG, University of Göttingen, Germany under number SAG 2560 and BCCO, Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic under number BCCO 30_2608.

Other strain: Prim-3-3 (Ukraine, Kiliya District, Odessa Region, vicinity of the Danube Delta Biosphere Reserve, the Black Sea coast, sand dunes, greenish crust, altitude: 45.544505, longitude: 29.66442, 4 m a.s.l.) was deposited in SAG, University of Göttingen, Germany under number SAG 2562 and BCCO, Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic under number BCCO 30_2609.

Etymology: arenaria = from Latin word arena – sand (referring to type habitat).

Streptosarcina costaricana Mikhailyuk et Lukešová sp. nov. (Figs 5H–M, 7I–K, 8G–I)

Diagnosis. Thallus disintegrating in culture to short filaments, cell diads and unicells, but with tendency to true branching. Vegetative cells ellipsoid to cylindrical and elongated cylindrical, (7.0)7.7–8.6 μm width, 13.2–30.0(41.9) μm length. H-like fragments of cell wall observed. Chloroplast parietal, plate-shaped, with wavy or dissected margin. Pyrenoid single in young cells or several formed a line in old elongated cells. Pyrenoid surrounded by layers of small starch grains. Vegetative reproduction by cell division in several planes (sporulation-like type) and fragmentation of thalli. Formation of branches by budding. Asexual and sexual reproduction not observed.

Differs from *S. arenaria* by shape of cells and general filamentous branched morphology. Morphologically similar with other filamentous algae from Streptophyta (*Interfilum*, *Klebsormidium*), but differs by absence of mucilage and true branching. Generally similar with some genera of branching algae from Chlorophyta (*Pseudendozonium*), but differs by organization of vegetative cells typical for Streptophyta, as well as by 18S rRNA and *rbcL* sequences.

Habitat: soil.

Type locality: Costa Rica, CICAFAE, Suelo cafetal, sin sombra, soil, altitude: 10.033693, longitude: –84.137314, 50 m a.s.l.

Holotype (designated here): The authentic strain SAG 36.98 (BCCO 30_2610) is permanently

422 T. Mikhailyuk et al.

cryopreserved in metabolically inactive state (cryopreserved in liquid nitrogen) in the Culture collection of soil algae and cyanobacteria of the Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic. Additionally culture material of authentic strain SAG 36.98 (BCCO 30_2610) preserved in 4% formaldehyde, Algotheca of M.G. Kholodny Institute of Botany of NASU of Ukraine (AKW-32373).

Iconotype (designated here in support of the holotype): [Figure 7I–K](#).

Authentic strain: SAG 36.98 was deposited in SAG, University of Göttingen, Germany in 1998, by U. Wyrzycka, original strain number GCh-05-1.

Etymology: *costaricana* = from Costa Rica (referring to type locality).

Definition and Phylogeny of the Genus *Streptofilum*

Isolate Luk-316a forms a separate lineage in the Streptophyta based on combined 18S rRNA and *rbcL* phylogeny. Therefore, it is possible to refer this to a new genus (*Streptofilum* gen. nov.). The investigated strain exhibited some morphological and ultrastructural characters typical for other streptophycean algae: general filamentous morphology, plate-shaped chloroplast, pyrenoid with a layer of starch grains, large peroxisome between the chloroplast and the nucleus ([Cook 2004](#); [Lokhorst et al. 1988, 2000](#); [Lokhorst 1996](#); [Marin and Melkonian 1999](#); [Mikhailyuk et al. 2008, 2014](#); [Rindi et al. 2011](#); [Sluiman 1985](#)). Morphologically *Streptofilum* looks similar to a species of *Interfilum* because of the cell shape, organization as disintegrating short filament surrounded by a mucilage envelope and formation of mucilaginous cap-like structures ([Mikhailyuk et al. 2008](#)). On the other hand, cells of *Streptofilum* are generally smaller, and mucilage has a different structure (striated with smooth margin in *Interfilum*, and morphologically homogenous with waved margin in *Streptofilum*).

TEM investigation of vegetative cells of *Streptofilum* showed cellular coverage by an unusual and unique structure: plasmalemma covered by a mucilage envelope with submerged layers of specific piliform scales. Such type of cell coverage can be compared with submicroscopic organic scales of some prasinophyte flagellate algae ([Domozych and Korbusieski 1985](#); [Manton 1966](#); [McFadden et al. 1986](#); [Melkonian](#)

[1982](#); [Melkonian et al. 1991](#); [Moestrup 1990](#), etc.). Organic scales are also typical for the cell and flagella surface of other representatives of the Streptophyta: *Mesostigma*, zoospores and gametes of *Chaetosphaeridium*, *Coleochaete*, *Chlorokybus*, genera of Charophyceae as well as some embryophytes (mosses and liverworts, *Lycopodium* L., *Psilotum* Sw. etc.) ([Domozych et al. 1991, 1992](#); [Duncan et al. 1997](#); [Maden et al. 1996](#); [Marin and Melkonian 1999](#); [Moestrup 1970](#); [Renzaglia et al. 2001](#); [Van den Hoek et al. 1995](#)). Scales of *Streptofilum* probably originated by the same mechanism as described for the other mentioned taxa, i.e. presumable originating from the Golgi bodies followed by a transport to the cell surface. Despite some similarity, scales of *Streptofilum* are completely different compared to the other taxa, because they are oriented irregularly on the cell surface and have a much more simple appearance. Scales of prasinophytes and other Streptophyta are morphologically very diverse, having a complicated structures and shapes. For example, *Mesostigma* has three different types of scales on the cell surface ([Manton and Ettl 1965](#)). Scales of variable structure and refined filigree shape are typical for the flagellar surface of zoospores and spermatozoids of *Chara* L., *Chaetosphaeridium*, *Coleochaete* ([Duncan et al. 1997](#); [Marin and Melkonian 1999](#)). Usually these scales cover the cell surface overlying each other, similar to tile or fish scales. Structure and organization of *Streptofilum* scales appear rather unique. However, the chemical composition and structure of the cell coverage of *Streptofilum* remain unknown and will be subject for further investigation. This will allow better understanding of its origin and development, and could serve as an ultrastructural proxy for evolutionary differentiation among streptophycean algae.

Streptofilum Mikhailyuk et Lukešová gen. nov.

Description. Thallus filamentous, short, unbranched, often disintegrated to diads and unicells. Cells naked, surrounded by dense layers of piliform scales possibly organic nature (visible with TEM) and layer of homogenous mucilage. Vegetative cells ellipsoid to ovoid and hemispherical. Chloroplast parietal, plate-shaped, with single pyrenoid surrounded by a layer of starch grains. Vegetative reproduction by cell division in one plane (sporulation-like type) and fragmentation of thalli. Asexual and sexual reproduction not observed.

Morphologically similar to filamentous species of *Interfilum* (Streptophyta), but differs by homogenous mucilage and unique cell coverage formed by specific piliform scales as well as by 18S rRNA and *rbcL* sequences.

Type species: *Streptofilum capillatum* Mikhailyuk et Lukešová sp. nov.

Etymology: from the name of division – Streptophyta and Latin word *filum* – filament, thread (referring to filamentous morphology).

Streptofilum capillatum Mikhailyuk et Lukešová sp. nov. (Figs 6, 7L–N, 9)

Description. Tallus filamentous, short, unbranched, often disintegrated to diads and unicells. Cells naked, surrounded by dense layers of piliform scales possibly of organic nature (visible with TEM) and layer of homogenous mucilage with waved lobbed edge. Sometimes mucilaginous caps on cells or specific collar in the middle of cells are formed. Vegetative cells ellipsoid to ovoid and hemispherical, (4.0)5.7–6.7(8.0) μm length, 4.6–5.0 μm width. Chloroplast parietal, plate-shaped, with smooth margin and single pyrenoid surrounded by a layer of starch grains. Vegetative reproduction by cell division in one plane (sporulation-like type) and fragmentation of thalli. Asexual and sexual reproduction not observed.

Habitat: sandy soil.

Type locality: Czech Republic, near Kamenice nad Lipou, Benešov, sandy soils, arable field, pH 6.4, altitude: 49.326089, longitude: 15.033993105, 602 m a.s.l.

Holotype (designated here): The authentic strain Luk-316a (BCCO 30_0050, SAG 2559) is permanently cryopreserved in metabolically inactive state (cryopreserved in liquid nitrogen) in the Culture collection of soil algae and cyanobacteria of the Institute of Soil Biology, České Budějovice, Czech Republic. Additionally culture material of authentic strain Luk-316a (BCCO 30_0050, SAG 2559) preserved in 4% formaldehyde, Algotheca of M.G. Kholodny Institute of Botany of NASU of Ukraine (AKW-32374).

Iconotype (designated here in support of the holotype): Figure 7L–N.

Authentic strain: Luk-316a was deposited in SAG, University of Göttingen, Germany under number SAG 2559 and BCCO, Institute of Soil Biology,

České Budějovice, Czech Republic under number BCCO 30_0050.

Etymology: *capillatum* = from Latin words *capillus* – hair and *capillatus* – hairy (referring to unique cell coverage by piliform scales).

Relevance of the Newly Described Taxa in Evolution of Streptophycean Lineages

Investigation of algal taxa from early diverging lineages of Streptophyta is very important for understanding the evolutionary traits of this group, as well as questions on the origin of embryophytes and the process of terrestrialization. Some classes of streptophycean algae are represented only by one or few genera (Mesostigmatophyceae and Chlorokybophyceae) (Leliaert et al. 2012; Lewis and McCourt 2004; Marin and Melkonian 1999). Genetic distances between these taxa are large, as many representatives might be extinct or were not discovered in nature until now.

The newly described and investigated taxa supplement current knowledge about diversity of early diverging lineages of Streptophyta. These taxa eventually will shorten genetic distance between known genera and classes. *Streptofilum* represents a conspicuously separate lineage in the Streptophyta and due its unique phylogenetic position might be erected even to class level in the future. For this, a more detailed investigation of genetic, ultrastructural, biochemical and physiological traits is required. Such results might contribute to an improved phylogeny of the Streptophyta.

Finding a new alga with true thallus branching inside Klebsormidiophyceae is also a new observation. This class unites taxa of filamentous algae with uniseriate unbranched thalli (Ettl and Gärtner 2014; Lokhorst 1996; Lokhorst et al. 2000; Rindi et al. 2011; Van den Hoek et al. 1995). Some reports on branching in *Klebsormidium*, *Interfilum* or *Entransia* are related to cell division in several plains due to cell deformation or cellular organelles displacement (Mikhailyuk et al. 2014), as well as because of germination of aplanospores inside filaments (Cook 2004; Lokhorst 1996). These cases are considered as characters of so called “false branching”. *Streptosarcina costaricana*, however, showed features corresponding with the formation of true branched filaments. This type of branching is typical for algae with a filamentous branched (heterotrichal) thallus, such as *Cladophora* Kützing, *Trentepohlia* Martius, the recently described *Ekerewekia* Kas-tovský, Fučíková, Stenclová et Brewer-Carías etc.

(Kaštovský et al. 2016; Moshkova 1979; Starmach 1972; Van den Hoek et al. 1995). Consequently, it is possible to state the occurrence of true branching in the Streptophyta inside the class Klebsormidiophyceae.

The most unique morphological observation of the present paper is the unusual cell coverage in *Streptofilum capillatum*. The authors are not aware of any similar cell coverage among algae. Although it is possible to superficially compare pili-form coverage in *S. capillatum* with submicroscopic organic scales of early diverging representatives of the green algae: Different lineages of prasinophytes (Chlorophyta) and Mesostigmatochyceae (Streptophyta), as well as with flagellate cells of some streptophycean algae and early-diverging embryophytes (Domozych et al. 1991; Duncan et al. 1997; Maden et al. 1996; Moestrup 1970; Renzaglia et al. 2001; etc.). But the cell coverage of *Streptofilum* is highly specific. Therefore, *Streptofilum* represents a separate lineage of Streptophyta based on molecular and ultrastructural traits despite its simple morphology. Undoubtedly further investigation of the cell coverage of *Streptofilum* will give new material for understanding the structure and evolution of streptophycean algae.

It is amazing that *Streptofilum* originates from an usual terrestrial habitat in Central Europe (soil of Czech Republic), a region which is considered as one of the best investigated with respect to terrestrial algae in the world (Büdel et al. 2016; Rindi et al. 2009). Therefore, using an integrative approach (combination of molecular-phylogenetic, morphological and ultrastructural markers) is essential for exploring novel biodiversity of microalgae.

Morphological parallelism or similarity of representatives of different phylogenetic lineages is a typical phenomenon for various algal groups as a result of adaptation of algae to similar environmental conditions. The newly described taxa are difficult to identify at the morphological level. However, these algae show quite prominent morphological and ultrastructural characters typical for Streptophyta. On the other hand they are similar to other genera of streptophycean algae. Therefore, it is difficult to distinguish *Hormidiella* and *Klebsormidium*, *Streptosarcina* and *Interfilum* or *Chlorokybus*, *Streptofilum* and *Interfilum* (see Table 1). The useful morphological characters in these cases are not the general morphology, but small details of the structure of vegetative and reproductive stages described above.

Conclusions

Two new genera and three new species were erected using an integrative approach in the Streptophyta, a group of great evolutionary and genomic interest related to the ancestry of embryophytes. Additionally, emendation of the diagnosis and epitypification of *Hormidiella parvula* (type species of the genus) were proposed. The phylogenetic position of the new genera affects the current classification of early-diverging lineages of Streptophyta and the new data presented contribute to a deeper understanding of biodiversity and evolutionary tendencies inside this group.

Methods

Strains, culture conditions, light microscopy, ultrastructure: As material for the present study five unialgal strains were used. They were isolated from terrestrial habitats (soil, sandy soil or biological soil crusts) of Europe (Ukraine, Czech Republic and Slovakia) and America (USA and Costa-Rica). A short information about sample areas and sampling sites is provided in Table 2. Four strains were isolated and preliminary investigated morphologically by Alena Lukešová and Tatiana Mikhailyuk during several projects devoted to studies on algal biodiversity in soils of different regions. One strain was isolated by Ursula Wydrzycka (Universidad de Costa-Rica) and deposited in the SAG collection in 1998, and was later morphologically investigated by us. All preliminary data already indicated that the 5 taxa have uncommon morphological traits, and comprise mainly unstudied isolates of Streptophyta. Later they were investigated in more detail using molecular phylogenetic methods in the frame of research projects devoted to Streptophyta (Mikhailyuk et al. 2008, 2014, 2015; Rindi et al. 2011).

The strains were maintained on solid medium (1.5% agar with 3N BBM and vitamins) (Starr and Zeikus 1993) at 20 °C with 25 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Osram Lumilux Cool White lamps L36W/840) under a light/dark cycle of 12:12 h L:D. Morphological examinations of unialgal cultures were performed using a Olympus BX51 light microscope with Nomarski DIC optics. Photomicrographs were taken with digital camera Olympus UC30 attached to the microscope and processed by software cell Sens Entry. Zoospore formation was induced by transferring the cultures into liquid BBM without nitrogen – 0N BBM and keeping them under dark conditions for several days. This procedure was done for all investigated strains, but zoospores were obtained in *Hormidiella* and some *Streptosarcina* strains (AL-63 and Prim-3-3) only. Mucilage of algal cells was stained with an aqueous solution of methylene blue.

Samples were fixed for transmission electron microscopy (TEM) using a standard chemical fixation protocol (2.5% glutaraldehyde, 1% OsO₄ in 10 mM cacodylate buffer, pH = 6.8) according to Holzinger et al. (2009). Samples were dehydrated in increasing ethanol concentrations, transferred to modified Spurr's resin and heat polymerized. For TEM, ultrathin sections were prepared, counterstained with uranyl acetate and Reynold's lead citrate, and investigated in Zeiss LIBRA 120 transmission electron microscopes at 80 kV. Images were cap-

Table 1. Comparison of morphological and some ultrastructural characters of new and known genera of Streptophyta which characterized by similar morphology.¹

Character	<i>Klebsormidium</i>	<i>Interfilum</i>	<i>Hormidiella</i>	<i>Entransia</i>	<i>Streptosarcina</i>	<i>Chlorokybus</i>	<i>Streptofilum</i>
Thallus morphology	Filaments or short filaments disintegrating to unicells	Filaments surrounding by mucilage, easily disintegrating to unicells, or packets	Filaments with a stalk (or without it in culture conditions)	Filaments	Packets or branched filaments	Packets surrounding by strong mucilage envelope	Filaments surrounding by mucilage, easily disintegrating to unicells
Chloroplast morphology	Plate shaped, with smooth margin or with marginal dissections	Plate shaped, waved or dissected on several lobes	Plate shaped, with smooth margin	Plate shaped, deeply dissected on several long finger-like lobes	Plate shaped, waved or dissected on several lobes	Plate shaped with smooth margin	Plate shaped, with smooth margin
Pyrenoid morphology	Single, surrounded by several/many small starch grains	Single, surrounded by several starch grains	Single, surrounded by several starch grains	Several, surrounded by many small starch grains	Single or several in old stage, surrounded by many small starch grains	Single, surrounded by many small starch grains, presence of pseudopyrenoid (discrepancy of chloroplast lamellae)	Single, surrounded by several starch grains
Pyrenoid ultrastructure	Pyrenoid matrix traversed by several/many parallel thylakoids	Pyrenoid matrix traversed by several parallel thylakoids	Pyrenoid matrix homogenous	Pyrenoid matrix traversed by many parallel thylakoids	Pyrenoid matrix traversed by several parallel thylakoids	Pyrenoid matrix traversed by many parallel thylakoids	Pyrenoid matrix homogenous
Cell coverage	Cell wall, thin mucilage envelope in some species	Cell wall with mucilage envelope striated structure	Cell wall	Cell wall	Cell wall	Cell wall, strong mucilage envelope	Layers of piliform scales submerged in the mucilage with homogenous structure and waved margin
Cell wall/coverage remnants	H-like and cap-like (rarely) fragments	Cap-like fragments	H-like fragments, rarely	H-like fragments	H-like fragments	Cap-like fragments	Cap-like fragments
Cell division	Mostly in one plane (sporulation-like type)	In one/several planes (sporulation-like type)	In one plane (sporulation-like type)	In one plane (perhaps sporulation-like type)	In several planes (sporulation-like type)	In several planes (sporulation-like type)	In one plane (sporulation-like type)

Table 1 (Continued)

Character	<i>Klebsormidium</i>	<i>Interfilum</i>	<i>Hormidiella</i>	<i>Entransia</i>	<i>Streptosarcina</i>	<i>Chlorokybus</i>	<i>Streptofilum</i>
Asexual reproduction	Zoospores, aplanospores	-	Zoospores, aplanospores	Zoospores, aplanospores	Zoospores, aplanospores	Zoospores, aplanospores	-
Sporangium morphology	One zoospore per sporangium, realized through opening in cell wall	-	One zoospore per sporangium, realized through opening in cell wall, sporangium with rounded protrusion	Zoospores realized through opening in cell wall	One zoospore realized through opening in cell wall, sporangium with rounded protrusion	One zoospore realized through opening in cell wall	-
Zoospores morphology	Wall- and stigma-less, with two equal subapical flagella	-	Wall- and stigma-less, with two equal or unequal (doubtful) subapical flagella	-	Wall- and stigma-less, with two equal subapical flagella	Wall-less (covered by submicroscopic scales) and stigma-less, with two equal subapical flagella	-
Zoospores germination	Ellipsoid cell with mucilage disc	-	Ellipsoid cell with stalk and holdfast	Ellipsoid cell with apical spine and mucilage adhesive	Spherical cell	Spherical cell	-
Young thallus originated from zoospore	Heteropolar filament with mucilage disc	-	Heteropolar filament with stalk	Heteropolar filament with mucilage adhesive and apical spine	Homopolar, sarcinoid packet	Homopolar, sarcinoid packet	-
Sexual reproduction	Isogamy, doubtful	-	Heterogamy, doubtful	-	-	-	-
Big single peroxisome	Present	Present	Present	Perhaps absent	Present	Present	Present
Ecology	Terrestrial and aquatic	Terrestrial	Terrestrial or amphibian	Aquatic (typical for peat bogs)	Terrestrial	Terrestrial	Terrestrial
Number of described species	About 20	3	3	2	2	1	1

¹Characters of known genera were provided on the base of following works: Lokhorst 1996; Mikhailiuk et al. 2008, 2014; Lokhorst et al. 1988, 2000; Cook 2004; Ettl and Gärtner 2014.

Table 2. Details of strains of new streptophycean algae examined in the present study.

Species	Strain label	Collection information	Culture numbers	Gen Bank accession number		
				18S rRNA	ITS-1, 5.8S rRNA, ITS-2	rbcl
<i>Hormidiella parvula</i>	Luk-89	USA, Wyoming, Belle Ayr Mine near Gillette, natural prairie, soil, A. Lukešová, May 2008, altitude: 44.2910915, longitude: -105.50222050, 1395 m a.s.l.	BCCO 30_2136 SAG 2558	MG652625		MG652614
<i>Streptosarcina arenaria</i> gen. and sp. nov.	AL-63	Slovakia, near town Malacky, Lozorno, completely burned out pine forest (pine plantation) in drift sand, sandy soil with thin layer of ash, A. Lukešová, October 1993, altitude: 48.373890864, longitude: 17.029250428, 202 m a.s.l.	BCCO 30_2608 SAG 2560	MG652622		MG652611
	Prim-3-3	Ukraine, Odessa oblast, Kiliya district, near the Danube Delta Biosphere Reserve, Black Sea coast, sand dunes, soil crust, T. Mikhailuk, September 2013, altitude: 45.544505, longitude: 29.66442, 4 m a.s.l.	BCCO 30_2609 SAG 2562	MG652623		MG652612
<i>Streptosarcina costaricana</i> gen. and sp. nov.	GCh-05-1	Costa Rica, Cicafe, Suelocafetal, sin sombra, soil, U. Wydrzycka, 1991, altitude: 10.033693, longitude: -84.137314, 50 m a.s.l.	BCCO 30_2610 SAG 36.98	MG652624		MG652613
<i>Streptofilum capillatum</i> gen. and sp. nov.	Luk-316a	Czech Republic, near Kamenice nad Lipou, Benešov, sandy soils, arable field, pH 6.4, A. Lukešová, April 2002, altitude: 49.326089, longitude: 15.033993105, 602 m a.s.l.	BCCO 30_0050 SAG 2559	MG652626	-	MG652615

tured with a TRS 2k SSCCD camera and further processed using Adobe Photoshop software (Adobe Systems Inc., San José, California, USA).

DNA isolation, PCR and sequencing: Genomic DNA of all investigated strains was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences of the 18S rRNA gene together with ITS-1-5.8S-ITS-2 region were amplified using a set of Taq PCR Mastermix Kit (Qiagen GmbH) and algal-specific primers G800R, G500F and G730F (T. Pröschold, personal communication) or standard primers EAF3, ITS055R, NS1F and 18LR (Hamby et al. 1988; Marin et al. 1998, 2003). Nucleotide sequences of partial *rbcL* gene were obtained using specific primers for Klebsormidiophyceae *rbcL*-KF2, *rbcL*-KR2 and KF590 (Ryšánek et al. 2015; Škaloud and Rindi 2013). PCR reactions were made in a thermocycler T gradient Thermoblock (Biometra, Germany). The PCR for ribosomal operon comprised 30 cycles: initial denaturation at 96 °C for 3 min, the cyclic repeating denaturation 1 min at 96 °C, annealing 2 min at 55 °C, elongation fragment – 3 min at 68 °C, followed by a final elongation of the fragment – 7 min at 68 °C. The PCR for *rbcL* gene were made using conditions published in Škaloud and Rindi (2013). PCR products were cleaned using a Qiagen PCR purification kit (Qiagen GmbH) according to the manufacturer's instructions. Cleaned PCR products were sequenced commercially by Qiagen Company using primers G800R, NS1F, N82F, 536R, 920R, 1400R, 920F, 1400F, GF, ITS2F and ITS05R (Hamby et al. 1988; Marin et al. 1998, 2003; Pröschold et al. 2005) for ribosomal operon and *rbcL*-KF2, *rbcL*-KR2 and KF590 for *rbcL* gene. The resulting sequences were assembled and edited using Geneious software (version 8.1.8; Biomatters). They were deposited at GenBank under the accession numbers MG652611–MG652615 and MG652622–MG652626.

Phylogenetic analyses: Sequences of our isolates were compared to those from reference strains at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using BLASTn queries (Altschul et al. 1997) for searching of the closest relatives. For comparison with original strains, we used nucleotide sequences available in GenBank (NCBI) of representatives of the Klebsormidiophyceae, Coleochaetophyceae, Chlorokybophyceae, Mesostigmatophyceae, Zygnematophyceae, Charophyceae, Embryophytes, Chlorophyta and Glaucophyta as out-group. Multiple alignments of the nucleotide sequences of the 18S rRNA and *rbcL* genes were made using Mafft web server (version 7, Katoh and Toh 2008) followed by manually editing in the program BioEdit (version 7.2). The evolutionary model that is best suited to the used database was selected on the basis of the lowest AIC value (Akaike 1974) and calculated in MEGA (version 6, Tamura et al. 2013). Phylogenetic trees were constructed in the program MrBayes 3.2.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003), using an evolutionary model GTR + G + I, with 5,000,000 generations. Two of the four runs of Markov chain Monte Carlo were made simultaneously, with the trees, taken every 500 generations. Split frequencies between runs at the end of calculations were below 0.01. The trees selected before the likelihood rate reached saturation were subsequently rejected. The reliability of tree topology verified by the maximum likelihood analysis (ML, GTR + I + G) were made using the program GARLI 2.0 (Zwickl 2006), and bootstrap support was calculated with 1,000 replicates.

Analysis of the ITS-2 secondary structure: The models of the secondary structure of ITS-2 region together with 5.8S–28S rRNA stem were predicted for species of *Hormidiella* and *Streptosarcina*. Helices were folded with the

online software mfold (Zuker 2003) and visualized in the online tool Pseudoviewer (Byun and Han 2009). Compensatory base changes (CBCs), base-pair indels (mismatches, deletions, single or unpaired bases) and position of conservative regions of ITS-2 (15 base pairs of the 5.8S–18S rRNA stem, the first 5 base pairs of Helix I, the first 11 base pairs of Helix II (including the pyrimidine-pyrimidine mismatch), and all base pairs of Helix III) were estimated using recommendations published in Demchenko et al. (2012).

Acknowledgements

This study was supported by a Georg-Forster research fellowship from the Alexander von Humboldt Foundation and a Grant for Young Scientist Fellowship extended by INTAS (Ref. No. 06-1000014-6216) (T.M.). We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for financial support (KA899/16 (U.K.) and SPP 1991 Taxonomics (KG)). The study was supported by the Austrian Science Fund (FWF) project P 24242-B16 and I 1951-B16 to A.H. Our sincere thanks are extended to Dr. Thomas Pröschold (University of Innsbruck, Austria) for permission of using algal specific primers designed by him and Dr. Martin Albrecht (University of Rostock, Germany) for valuable help in purification of investigated strains. We thank Beatrix Jungwirth, University of Innsbruck, for help in cultivation of the algal strains and Dr. Maike Lorenz, University of Göttingen, for help during strain deposition to SAG.

References

- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Cont* **19**:716–723
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA (1997) Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389–3402
- Becker B, Marin B (2009) Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Ann Bot* **103**:999–1004
- Bhattacharya D, Medlin L (1998) Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant Physiol* **116**:9–15
- Büdel B, Dulić T, Darienko T, Rybalka N, Friedl T (2016) Cyanobacteria and algae of biological soil crusts. In Weber B, Büdel B, Belnap J (eds) *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 55–80
- Byun Y, Han K (2009) PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. *Bioinformatics* **25**:1435–1437
- Cocquyt E, Verbruggen H, Leliaert F, De Clerck O (2010) Evolution and cytological diversification of the green seaweeds (Ulvophyceae). *Mol Biol Evol* **27**:2052–2061

- Coleman AW** (2009) Is there a molecular key to the level of 'biological species' in eukaryotes? A DNA guide. *Mol Phylogent Evol* **50**:197–203
- Cook ME** (2004) Structure and asexual reproduction of the enigmatic charophycean green alga *Entransia fimbriata* (Klebsormidiales, Charophyceae). *J Phycol* **40**:424–431
- Darienko T, Pröschold T** (2017) Toward a monograph of non-marine Ulvophyceae using an integrative approach (Molecular phylogeny and systematics of terrestrial Ulvophyceae II.). *Phytotaxa* **324**:1–41
- Darienko T, Gustavs L, Mudimu O, Menendes C, Schumann R, Karsten U, Friedl T, Pröschold T** (2010) *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Eur J Phycol* **45**:79–95
- Delwiche CF, Karol KG, Cimino MT, Sytsma KJ** (2002) Phylogeny of the genus *Coleochaete* (Coleochaetales, Charophyta) and related taxa inferred by analysis of the chloroplast gene *rbcl*. *J Phycol* **38**:394–403
- Demchenko E, Mikhailyuk T, Coleman AW, Pröschold T** (2012) Generic and species concepts in *Microglena* (previously the *Chlamydomonas monadina* group) revised using an integrative approach. *Eur J Phycol* **47**:264–290
- Domozych DS, Korbusieski TJ** (1985) The disruption of dictyosome structure, polarity and secretory activity in the scale-producing green alga, *Pyramimonas inconstans*. *J Exp Bot* **36**:1304–1312
- Domozych DS, Wells B, Shaw PJ** (1991) The basket scales of the green alga, *Mesostigma viride*: chemistry and ultrastructure. *J Cell Sci* **100**:397–407
- Domozych DS, Wells B, Shaw PJ** (1992) Scale biogenesis in the green alga *Mesostigma viride*. *Protoplasma* **167**:19–32
- Duncan TM, Renzaglia KS, Garbary DJ** (1997) Ultrastructure and phylogeny of the spermatozoid of *Chara vulgaris* (Charophyceae). *P1 Syst Evol* **204**:125–140
- Ettl H, Gärtner G** (2014) Syllabus der Boden-, Luft und Flechtentalgen. 2nd edn Spektrum Akademischer Verlag, Munich, 772 p
- Finet C, Timme RE, Delwiche CF, Marlétaz F** (2010) Multi-gene phylogeny of the green lineage reveals the origin and diversification of land plants. *Curr Biol* **20**:2217–2222
- Freitas LC, Loverde-Oliveira SM** (2013) Checklist of green algae (Chlorophyta) for the state of Mato Grosso, Central Brazil. *Check List* **9**:1471–1483
- Friedl T, Rybalka N** (2012) Systematics of the green algae: a brief introduction to the current status. *Progr Bot* **73**:259–280
- Gontcharov AA, Melkonian M** (2004) Unusual position of the genus *Spirotaenia* (Zygnematophyceae) among streptophytes revealed by SSU rDNA and *rbcl* sequence comparisons. *Phycologia* **43**:105–113
- Gontcharov AA, Marin B, Melkonian M** (2003) Molecular phylogeny of conjugating green algae (Zygnemophyceae, Streptophyta) inferred from SSU rDNA sequence comparisons. *J Mol Evol* **56**:89–104
- Graham LE** (1984) *Coleochaete* and the origin of land plants. *Am J Bot* **71**:603–608
- Graham LE, Delwiche CF, Mishler BD** (1991) Phylogenetic connections between the «green algae» and the «bryophytes». *Adv Bryol* **4**:213–244
- Hamby RK, Sims LE, Issel LE, Zimmer EA** (1988) Direct RNA sequencing: optimization of extraction and sequencing techniques for work with higher plants. *Plant Mol Biol Rep* **6**:179–197
- Herburger K, Karsten U, Holzinger A** (2016) *Entransia* and *Hormidiella*, sister lineages to *Klebsormidium* (Streptophyta) respond differently to light and temperature gradients. *Protoplasma* **253**:1309–1323
- Holzinger A, Roleda MY, Lütz C** (2009) The vegetative arctic green alga *Zygnema* is insensitive to experimental UV exposure. *Micron* **40**:831–838
- Iyengar MOP, Kanthamma S** (1940) *Hormidiella*, a new member of the Ulvothricaceae. *J Indian Bot Soc* **19**:157–166
- Karol KG, McCourt RM, Cimino MT, Delwiche CF** (2001) The closest living relatives of land plants. *Science* **294**:2351–2353
- Kaštovský J, Veselá J, Bohunická M, Fučíková K, Štenclová L, Brewer-Carias C** (2016) New and unusual species of cyanobacteria, diatoms and green algae, with a description of a new genus *Ekerewekia* gen. nov. (Chlorophyta) from the table mountain Churš-tepui, Chimantý Massif (Venezuela). *Phytotaxa* **247**:153–180
- Katoh K, Toh H** (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform* **9**:286–298
- Kranz HD, Miks D, Siegler ML, Capesius I, Sensen CW, Huss VA** (1995) The origin of land plants: phylogenetic relationships among charophytes, bryophytes, and vascular plants inferred from complete small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *J Mol Evol* **41**:74–84
- Leliaert F, Smith DR, Moreau H, Herron MM, Verbruggen H, Delwiche CF, De Clerck O** (2012) Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Crit Rev Plant Sci* **31**:1–46
- Lemieux C, Otis C, Turmel M** (2007) A clade uniting the green algae *Mesostigma viride* and *Chlorokybus atmophyticus* represents the deepest branch of the Streptophyta in chloroplast genome-based phylogenies. *BMC Biology* **5**, art no. 2
- Lemieux C, Otis C, Turmel M** (2016) Comparative chloroplast genome analyses of Streptophyte green algae uncover major structural alterations in the Klebsormidiophyceae, Coleochaetophyceae and Zygnematophyceae. *Front Plant Sci* **7**, art no. 697
- Lewis LA, McCourt RM** (2004) Green algae and the origin of land plants. *Am J Bot* **91**:1535–1556
- Lokhorst GM** (1996) Comparative taxonomic studies on the genus *Klebsormidium* (Charophyceae) in Europe. *Cryptogamic Studies*, 5. Gustav Fischer Stuttgart, 132 p
- Lokhorst GM, Star W** (1985) Ultrastructure of mitosis and cytokinesis in *Klebsormidium mucosum* nov. comb., formerly *Ulothrix verrucosa* (Chlorophyta). *J Phycol* **21**:466–476
- Lokhorst GM, Sluiman HJ, Star W** (1988) The ultrastructure of mitosis and cytokinesis in the sarcinoid *Chlorokybus atmophyticus* (Chlorophyta, Charophyceae) revealed by rapid freeze fixation and freeze substitution. *J Phycol* **24**:237–248

430 T. Mikhailyuk et al.

- Lokhorst GM, Star W, Lukešová A** (2000) The new species *Hormidiella attenuata* (Klebsormidiales), notes on morphology and reproduction. *Algol Stud* **100**:11–27
- Maden AR, Renzaglia KS, Whittier DP** (1996) Ultrastructure of the spermatozoid of *Lycopodium obscurum* (Lycopodiaceae). *Am J Bot* **83**:419–429
- Manton I** (1966) Observations on scale production in *Pyramimonas amyliifera* Conrad. *J Cell Sci* **1**:429–438
- Manton I, Ettl H** (1965) Observations on the fine structure of *Mesostigma viride* Lauterborn. *J Linn Soc (Bot)* **59**:175–184
- Marin B, Melkonian M** (1999) Mesostigmatophyceae, a new class of streptophyte green algae revealed by SSU rRNA sequence comparisons. *Protist* **150**:399–417
- Marin B, Klingberg M, Melkonian M** (1998) Phylogenetic relationships among the Cryptophyta: Analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences support the monophyly of extant plastid-containing lineages. *Protist* **149**:265–276
- Marin B, Palm A, Klingberg M, Melkonian M** (2003) Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist* **154**:99–145
- Mattox KR, Stewart KD** (1984) Classification of the Green Algae: A Concept Based on Comparative Cytology. In Irvin DEG, John DM (eds) *Systematics of the Green Algae*. Acad Press, London, pp 29–72
- McCourt RM, Delwiche CF, Karol KG** (2004) Charophyte algae and land plant origins. *Trends Ecol Evol* **19**:661–666
- McFadden GI, Preisig HR, Melkonian M** (1986) Golgi apparatus activity and membrane flow during scale biogenesis in the green flagellate *Scherffelia dubia* (Prasinophyceae) II. Cell wall secretion and assembly. *Protoplasma* **131**:174–184
- Melkonian M** (1982) Effect of divalent cations on flagellar scales in the green flagellate *Tetraselmis cordiformis*. *Protoplasma* **111**:221–233
- Melkonian M** (1989) Flagellar apparatus ultrastructure in *Mesostigma viride* (Prasinophyceae). *Pl Syst Evol* **164**:93–122
- Melkonian M, Becker B, Becker D** (1991) Scale formation in algae. *J Electron Microsc Techn* **17**:165–178
- Mikhailyuk T, Holzinger A, Massalski A, Karsten U** (2014) Morphology and ultrastructure of *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Streptophyta) with special reference to cell division and thallus formation. *Eur J Phycol* **49**:395–412
- Mikhailyuk T, Glaser K, Holzinger A, Karsten U** (2015) Biodiversity of *Klebsormidium* (Streptophyta) from alpine biological soil crusts (Alps, Tyrol, Austria, and Italy). *J Phycol* **51**:750–767
- Mikhailyuk TI, Sluiman H, Massalski A, Mudimu O, Demchenko E, Kondratyuk S, Friedl T** (2008) New streptophyte green algae from terrestrial habitats and an assessment of the genus *Interfilum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *J Phycol* **44**:1586–1603
- Moestrup Ø** (1970) The fine structure of mature spermatozooids of *Chara corallina*, with special reference to microtubules and scales. *Planta* **93**:295–308
- Moestrup Ø** (1990) Scale structure in *Mantoniella squamata*, with some comments on the phylogeny of Prasinophyceae. *Phycologia* **29**:437–442
- Moshkova NO** (1979) Ulotrichales, Cladophorales. *Vyznacyk prysnovodnykh vodorostej Ukrainskoj RSR*. Nauk. Dumka, Kiev, Issue VI. 498 p [in Ukrainian]
- Paczuska B, Paczuski R** (2015) Small water ponds as reservoirs of algae biodiversity. *Oceanolog Hydrobiol Stud* **44**:480–486
- Patrick R** (1996) Rivers of the United States. *The Eastern and Southeastern States Vol. III*, John Wiley and Sons, Inc., New York, 829 p
- Pickett-Heaps JD** (1972) Cell division in *Klebsormidium subtilissimum* (formerly *Ulothrix subtilissima*) and its possible phylogenetic significance. *Cytobiosis* **6**:167–183
- Pröschold T, Harris EH, Coleman AW** (2005) Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **170**:1601–1610
- Renzaglia KS, Johnson TH, Gates HD, Whittier DP** (2001) Architecture of the sperm cell of *Psilotum*. *Am J Bot* **88**:1151–1163
- Rindi F, Allali HA, Lam DW, López-Bautista M** (2009) An overview of the Biodiversity and Biogeography of Terrestrial Green Algae. In Rescingo V, et al. (eds) *Biodiversity Hotspots*. Nova Science Publ Inc, pp 105–122
- Rindi F, Mikhailyuk TI, Sluiman HJ, Friedl T, López-Bautista JM** (2011) Phylogenetic patterns and phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Mol Phyl Evol* **58**:218–231
- Ronquist F, Huelsenbeck JP** (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**:1572–1574
- Ryšánek D, Hřčková K, Škaloud P** (2015) Global ubiquity and local endemism of free-living terrestrial protists: phylogeographic assessment of the streptophyte alga *Klebsormidium*. *Environ Microbiol* **17**:689–698
- Škaloud P, Rindi F** (2013) Ecological differentiation of cryptic species within an asexual protist morphospecies: a case study of filamentous green alga *Klebsormidium* (Streptophyta). *J Eukaryot Microbiol* **60**:350–362
- Sluiman HJ** (1985) Comparative studies on the ultrastructure, phylogeny and classification of green algae. *Academisch proefschrift*. VU Uitgeverij, Amsterdam, 155 p
- Sluiman HJ, Guihal C, Mudimu O** (2008) Assessing phylogenetic affinities and species delimitations in Klebsormidiales (Streptophyta): nuclear-encoded rDNA phylogenies and ITS secondary structure models in *Klebsormidium*, *Hormidiella*, and *Entransia*. *J Phycol* **44**:183–195
- Starmach K** (1972) Chlorophyta III. Zielenice nitkowate: Ulotrichales, Ulvales, Prasiolales, Sphaeropleales, Cladophorales, Chaetophorales, Trentepohliales, Siphonales, Dichotomosiphonales. *Flora sladkowodna Polski*, 10. Panstwowe Wydawnictwo Naukowe, Warsaw, Poland, 750 p
- Starr RC, Zeikus JA** (1993) UTEX the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *J Phycol* **29**(Suppl):1–106

Stewart KD, Floyd GL, Mattox KR, Davis ME (1972) Cytochemical demonstration of a single peroxisome in a filamentous green algae. *J Cell Biol* **54**:431–434

Subrahmanyam A (1976) Structure and reproduction of *Hormidiella bharatiensis* sp. nov. *Hydrobiologia* **48**:33–36

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6. *Mol Biol Evol* **30**:2725–2729

Turmel M, Otis C, Lemieux C (2006) The chloroplast genome sequence of *Chara vulgaris* sheds new light into the closest green algal relatives of land plants. *Mol Biol Evol* **23**:1324–1338

Turmel M, Otis C, Lemieux C (2007) An unexpectedly large and loosely packed mitochondrial genome in the charophycean green alga *Chlorokybus atmophyticus*. *BMC Genomics* **8**:137

Van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM (1995) Algae: An Introduction to Phycology. *Cambr Univ Press, Cambridge*, 623 p

Wickett NJ, Mirarab S, Nguyen N, Warnow T, Carpenter E, Matasci N, Ayyampalayam S, Barker MS, Burleigh JG,

Gitzendanner MA, Ruhfel BR, Wafula E, Der JP, Graham SW, Mathews S, Melkonian M, Soltis DE, Soltis PS, Miles NW, Rothfels CJ, Pokorny L, Shaw AJ, DeGironimo L, Stevenson DW, Surek B, Villarreal JC, Roure B, Philippe H, dePamphilis CW, Chen T, Deyholos MK, Baucom RS, Kutchan TM, Augustin MM, Wang J, Zhang Y, Tian Z, Yan Z, Wu X, Sun X, Wong GK-S, Leebens-Mack J (2014) Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**:E4859–E4868, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1323926111>

Wodniok S, Brinkmann H, Glockner G, Heidel A, Philippe H, Melkonian M, Becker B (2011) Origin of land plants: Do conjugating green algae hold the key? *BMC Evol Biol* **11**:104–114

Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl Acid Res* **31**:3406–3416

Zwickl DJ (2006) Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. *Ph.D. dissertation. The University of Texas at Austin*

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

**РОЗДІЛ 3. ВОДОРСТІ ТА ЦАНОБАКТЕРІЇ БІОЛОГІЧНИХ
ГРУНТОВИХ КІРОЧОК, ЦІКАВІ З ФЛОРИСТИКО-ТАКСОНОМІЧНОЇ
ТОЧКИ ЗОРУ**

**3.1. Філогенія і таксономія зелених та жовтозелених водоростей –
мешканців біокірочок**

**3.1.1. Таксономія та біологія роду *Parietochloris* (Trebouxiophyceae,
Chlorophyta)**

Parietochloris ovoideus sp. nova (Trebouxiophyceae,
Chlorophyta), a new aerophyte alga from Ukraine

By TATYANA I. MIKHAILYUK¹, EDUARD M. DEMCHENKO²
and SERGIY YA. KONDRATYUK¹

¹M.H. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv, Ukraine

²Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine

With 28 figures and 1 table in the text

Abstract: Morphology of *Parietochloris ovoideus* MIKHAILYUK et DEMCHENKO sp. nova, found at first from air samples collected among granitic outcrops of the Steppe zone of Ukraine, as well as material from chasmoendolithic and epiphytic algal groups of the same locality, was studied under the LM and in cultural conditions. This species differs from all other species of this genus by the shape of vegetative cells, morphology of chloroplast, shape of zoospores and the number of zoo- and aplanospores in sporangia. Latin diagnosis, description, illustrations, data on age stages and life cycle of the new species are present. The morphological characters of *P. ovoideus* are compared with all known species of genus *Parietochloris*.

Key words: *Parietochloris*, Trebouxiophyceae, Chlorophyta, new species, air samples, Ukraine.

Introduction

The genus *Parietochloris* WATANABE et FLOYD was recently segregated from *Neochloris* described by R. STARR (1955) on the basis of presence of wall-less zoospores with two equal flagella, as well as parietal chloroplast and pyrenoid in vegetative cells. *Neochloris* is well known to have included 16 species (KOMÁREK & FOTT 1983), differing by their morphology. It was considered to be an artificial aggregation (DEASON et al. 1991). The genera *Ettlia* KOMÁREK, *Neochloris*, *Parietochloris* were segregated from *Neochloris* after the study of their morphological and ultrastructural peculiarities (KOMÁREK 1989, WATANABE & FLOYD 1989, DEASON et al. 1991). The genus *Ettlia* includes uninuclear species, which have zoospores with a thin cell wall. The genus *Neochloris* includes polynuclear species which have wall-less zoospores and zoospores with some unorganized fibrous material (the fuzzi material) outside the cell membrane. The genus

0342-1123/03/0149-001 \$ 4.00

© 2003 E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, D-70176 Stuttgart
Algological Studies 110 = Arch. Hydrobiol. Suppl. 149

Parietochloris is described by WATANABE & FLOYD (1989) on the basis of its single nucleus in vegetative cells, peculiarities of pyrenoid, as well as ultrastructure of flagella in wall-less zoospores.

Taking into consideration flagella ultrastructure, namely counterclockwise absolute orientation of flagella basal bodies, the genus *Parietochloris* was included in the class Trebouxiophyceae, while the genera *Ettlia* and *Neochloris* are still representatives of the Chlorophyceae. Now the genus *Parietochloris* is represented by 4 species (*P. alveolaris* (BOLD) WATANABE et FLOYD, *P. cohaerens* (GROOVER et BOLD) (WATANABE & FLOYD, *P. pseudoalveolaris* (DEASON et BOLD) (WATANABE & FLOYD 1989), *P. bilobata* (VINATZER) V. ANDREEVA (ANDREEVA 1998) growing mainly in soil and terricolous habitats.

A new hitherto unknown representative of the genus *Parietochloris* is found during a special study of species diversity and distribution peculiarities of terricolous epilithic algae of granite outcrops from the Regional Landscape Park "Granite-Steppe Pobuzhzhia" (Pervomaysk district, Mykolaiv oblast, Ukraine). Special detailed cultural study of the material mentioned established that it represents one more undescribed representative of the genus *Parietochloris*. It was included into the genus *Parietochloris* according to the following characters: coccoid cells, single or in irregular aggregations; chloroplast parietal; pyrenoid surrounded by numerous small starch grains; zoospores without cell wall with two equal flagella.

Latin diagnosis, description, illustrations, data on reproduction and morphological variability for the newly described species *Parietochloris ovoideus* are presented below.

Material and methods

Type strain (unialgal culture) of *P. ovoideus* sp. nova was selected from air samples collected among granite outcrops on the south-western slope of the left bank of the Pivdennyi Bug River in the vicinity of Yuzhnoukrainsk town (the Regional Landscape Park "Granite-Steppe Pobuzhzhia"). Samples were selected on the 28th of October 2000 according to the following methodics. Standard Petri dishes with agarised Bold Basal Medium (INBBM) (BISCHOFF & BOLD 1963) were exposed among granite outcrops of steep slope of river bank during 1.5 hours. Later on the samples were transported to the laboratory. Material was cultivated at standard laboratory conditions under 12/12 hours light/dark cycle at 3000 lx provided by 40W cool fluorescent tubes. Cultures were investigated under light microscopes MBI-3 and Biolam P-14 (objectives 20x, 40x, 90x) and stereoscopic microscopes MBS-1 and MBS-10.

Results

Diagnosis and observations

Parietochloris ovoideus MIKHAILYUK et DEMCHENKO sp. nova

Diagnosis: Cellulae vegetativae solitariae vel in accumulationibus ab rotundatis (aetate juvenili) ad ovoideae, pyriformes, late ellipsoideae (aetate adulto); longitudo – (4.5)

Parietochloris ovoideus sp. nova, a new aerophyte alga from Ukraine 3

5.6–26.4 (28.8) μm ; latitudo – (4.5) 5.0–22.8 (23.4) μm . Tunica cellularum tenuis in culturis veteris unilateraliter incrassata. Chloroplastum bilobatum cum lobis adicionalibus minusculis, non profundo dissectis inaequiincrassatis. Pyrenoidum unum granulis multis minusculis amylaceis cinctum. Nucleus unus cum nucleolo excentrico.

Reproductio asexualis zoo-, aplano- et autosporis. Sporangium (32)–64–128 zoo- vel aplanosporas continet. Zoosporae modo corrupto lateralis sporangiae in vesica mucosa liberant. Zoosporae (longitudo – 3.0–9.6 μm ; latitudo – 0.9–4.8 μm) atunicatae ab guttoideis ad fusiformes dorsiventraliter applanatae, cum flagellis duobus, aequalibus, vacuolis duobus contractilibus, chloroplasto parietale, pyrenoido inconspicuo, stigmate mediano, nucleo centralis. Aplanosporae rotundae (diametro 2.4–4.8 μm) stigma habent. Autosporangium (4)–8–16 autosporas (diametro 4.8–8.1 μm) continet.

Reproductio sexualis non observata.

Cultura duo-tres hebdomadis in agaro BBM viridis subbotrosa; color senectute non mutatur.

Habitatio: in probes aëris meridionali occidentale declive litore dextri fluminis Iuzhno Bugi in marginibus urbis Iuzhnoukrainsk viridarium regionale locorum “Granitno-Stepove Pobuzhzhia” (regio Mykolaivski, Ukraina). Legunt: T. I. MIKHAILYUK, E. M. DEMCHENKO, S. YA. KONDRATYUK anno 2000 28 Octobris.

Iconotypus (icona typica): Fig. 10 a,b; 12 a,b. Cultura pura in collectio culturarum cathedrae botanicae Nationali Universitatis nomine Tarassii Schevtshenko et Institutii botanicae M.G. Cholodnii NAN Ukrainae (IBASU-380).

Vegetative cells single or in aggregations, from a rounded shape (at young stages) to ovoid, pyriform and wide-ellipsoid shape (at mature stages); (4.5) 5.6–26.4 (28.8) μm long, (4.5) 5.0–22.8 (23.4) μm wide. The cell wall thin, in old cultures somewhat thickened at one side. Chloroplast belobed with additional small lobules, with shallow dissections, and with uneven thickenings. The pyrenoid single, surrounded by numerous small starch grains. A single nucleus occurs with an excentric nucleolus.

Reproduction by zoo-, aplano- and autospores. Sporangium with (32)–64–128 zoo- or aplanosporas. Liberation of zoospores by rupture of sporangial wall in a gelatinous vesicle. Zoospores 3.0–9.6 μm long, 0.9–4.8 μm wide, wall-less, from drop-like to fusiform, dorsiventral flattened, with two equal flagella and two contractile vacuoles; with a parietal chloroplast, usually containing an inconspicuous pyrenoid and an equatorial stigma; nucleus central. Aplanosporas rounded (2.4–4.8 μm in diam.), with stigma. Autosporangium with (4)–8–16 autospores (4.8–8.1 μm in diam.).

Sexual reproduction not observed.

2–3 week-old cultures on INBBM-agar green, slightly cluster-like; their colours do not change with age.

Habitat: in air samples, selected from south-western slope of left bank of Pivdennyi Bug River in vicinity of Yuzhnoukrainsk (Regional Landscape Park “Granite-Steppe Pobuzhzhia”) (Mykolaiv oblast, Ukraine). Collected: T. I. MIKHAILYUK, E. M. DEMCHENKO, S. YA. KONDRATYUK; 28 October 2000.

Type: Figs 10 a,b; 12 a,b. Uni-algal culture was deposited to the culture collection of Department of Botany of Taras Shevchenko National University and M. H. Kholodny Institute of Botany NAS of Ukraine (IBASU-380).

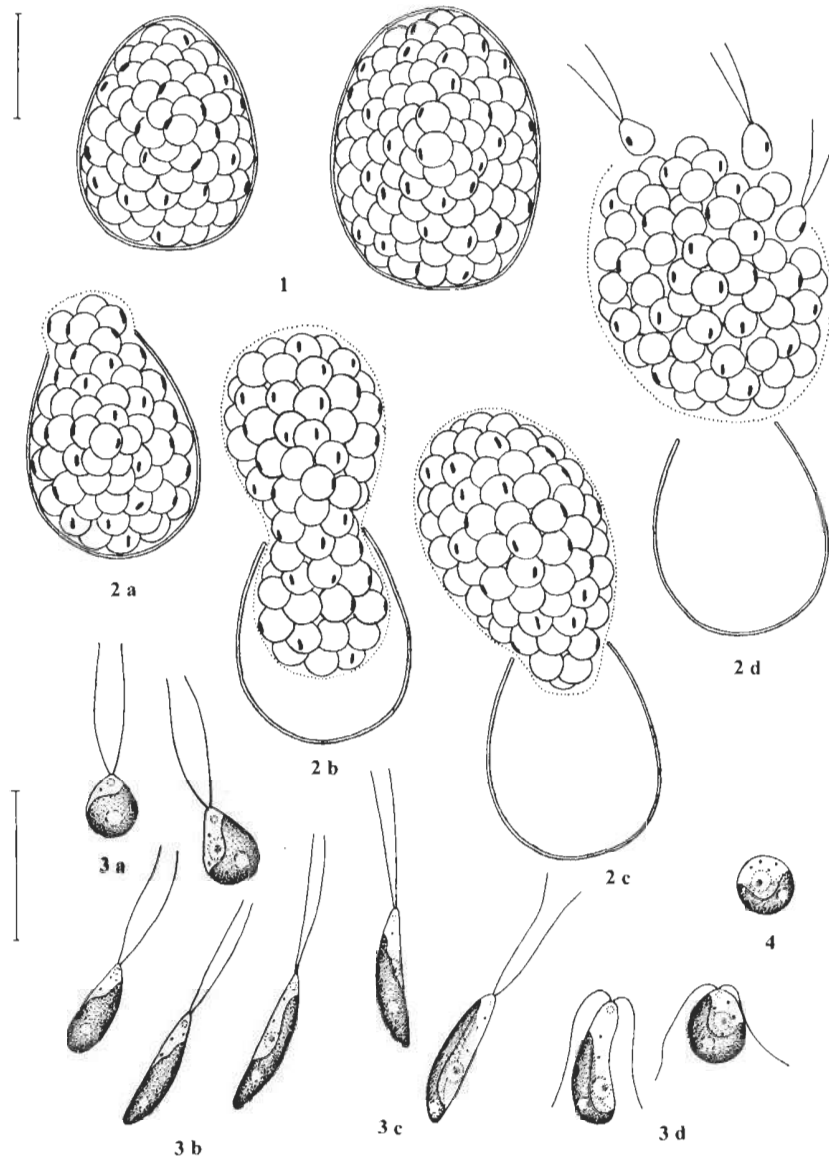
During study of age variability of *P. ovoideus* in culture we noted and investigated several age states of alga as well as determined its life cycle.

Reproductive stages

Asexual reproduction of *P. ovoideus* by zoo-, aplano- and autospores proves to be dependent on the conditions of cultivation. When the material is carried on the fresh 1NBBM-agar, the mature cells produce zoospores in great numbers. Zoosporangia ((14.4) 16.8–21.6 (33.6) μm long, (9.6) 12.0–17.4 (18.0) μm wide) repeating the form of the mature vegetative cells (ovoid, pyriform to wide-ellipsoidal), have large amount of zoospores ((32)–64–128) (Figs 1, 17, 19, 20). Zoospores become free by rupture of sporangial wall and are liberated into a gelatinous vesicle (Figs 2a–d). The empty sporangial wall remains for some time in the culture. Zoospores of *P. ovoideus*, as of all species of this genus, are wall-less, metabolic, which is why they can change their shape from roundish, drop-like (Fig. 3a), slightly fusiform to characteristically flattened dorsiventral spindle-like form, in which “front” cell side is flat, and “back” one is protuberant (Figs 3b–d). Such stable zoospores form in case of the lack of cell wall is evidently reached at the expense of the cytoskeleton peculiarities. It is interesting to mention, that rather movable zoospores of *P. ovoideus* have, however, a short period of movement (3–5 min.) and during liberation from zoosporangium they act in different ways. Some of them move only near the sporangium, in this case they have a drop-like and roundish form (Fig. 3a), while the other “swim” far enough and they have a dorsiventral spindle-like form (Fig 3b–c). The zoospores are of variable measurements ((3.0) 3.6–8.4 (9.6) μm long and (0.9) 1.2–3.6 (4.8) μm wide). They have two equal flagella, two contractile vacuoles in anterior part of cells. The chloroplast is parietal, it covers the posterior end to share the half of the cell’s periphery. It has an inconspicuous pyrenoid and an equatorial ellipsoidal flattened stigma. The nucleus is central, with an excentric nucleolus. After zoospores have stopped moving, they become rounded (Fig. 4).

Aplanosporangia originated from zoosporangia in case of somewhat exhaustion of medium and culture aging. They do not morphologically differ from the zoosporangia. Aplanospores are rounded ((2.4) 2.7–4.5 (4.8) μm in diam.), with mainly the same peculiarities as zoospores (in protoplast structure), they have some characteristics of monad organization, i.e. stigma as well (Fig. 5).

Autospores are formed simultaneously with the zoospores, but when the culture is aging zoospores appear more seldom, while the process of forming autospores becomes more important. Autosporangium also is ovoid, ellipsoidal or pyriform ((20.4) 21.0–27.6 (28.8) μm long, (10.8) 15.0–21.6 (22.8) μm wide), but it consists of a considerably lower number of spores ((4)–8–16) (Figs 6a–d, 20). Besides, autospores are much bigger than zoo- and aplanospores and they have no characteristics of monad organization (Fig. 7). They are roundish or angular in shape as a result of mutual pressure in autosporangium. Often, the autosporangium wall becomes much widened and autospores, which have already turned into young vegetative cells, form irregular groups. Detached vegetative cells originate from zoo- and aplanospores.



Figs 1–4. Reproduction of *Parietochloris ovoideus* by zoospores.
1 – Zoosporangia. **2** – Liberation of zoospores from zoosporangium in a gelatinous vesicle: **a–d** – stages of liberation. **3** – Morphology of zoospores: **a–d** – change of zoospore's shape in process moving and stopping. **4** – Young vegetative cell just after quiescence of zoospore. [Bar: 10 μm .]

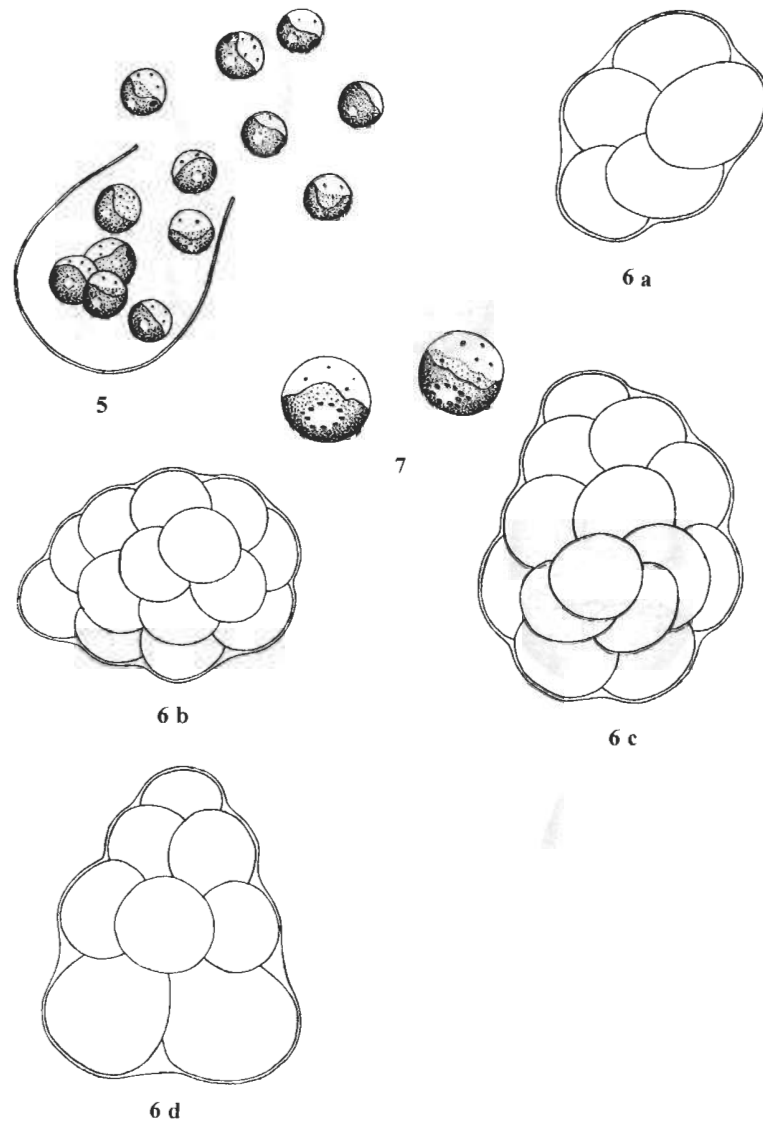
Vegetative cells

Young vegetative cells, which form the majority of culture at an age of 1–2 weeks, can be divided into 2 groups, which differ in morphology and origin as a result of the different ways of asexual reproduction of *P. ovoideus*. After zoospores stopped moving and together with aplanospores become rounded, they lose the characteristics of monad organization, the chloroplast is divided into 2 unequal lobes, the pyrenoid becomes more clearly distinguished, in optical section it is surrounded by 1–2 rows of small starch grains and gradually the cells get an ovoid shape (Figs 8a–d, 18). With time, young vegetative cells (when their length is on average – 7.8–13.2 μm , their width – 6.6–11.4 μm) are distinctly ovoid with one pole getting narrower, with bilobed chloroplast, with small lobes of the second level appearing and dissected, with wavy edge, etc. The nucleus is big, it is between chloroplast lobes in the narrow (apical) part of the cell. Young vegetative cells originated from autospores, are rounded or only slightly wide-ellipsoidal (having the same measurements – 6.0–13.2 μm in diam.), but in other respects they fully repeat the young cells originated from zoo- and aplanospores (Figs 9a–d). In our opinion, it is connected firstly with initially bigger size of autospores, secondly, with mutual pressure of young cells in irregular aggregations, which appear as a result of widening autosporangial wall, while the cells originated from zoo- and aplanospores are isolated and do not form aggregations. These cells become ovoid too.

Mature vegetative cells, which form the majority of culture at an age of 2–3 weeks, are (14.4) 15.0–26.4 (28.8) μm long, (11.4) 12.0–22.8 (23.4) μm wide, ovoid to pyriform and wide-ellipsoidal with narrowed pole (Figs 10, 11, 19–21, 23–25). Their chloroplast is richly dissected (Fig. 13). Its bilobed shape can be defined only in two following cases: firstly, when to examine the edge of the lobes from surface view (Fig. 12a); secondly, the septum between the chloroplast lobes when to examine the cell from the wider pole (Figs 12b, 22). In optical section a great number of small lobes and dissections create the effect of asteroid *Trebouxia*-like chloroplast (Figs 19–21). This effect is also reached owing to the increased amount of starch grains which cover the lobes and mask the chloroplast. Nearwall layers of cytoplasm of mature cells are very granulated.

Observation on old culture

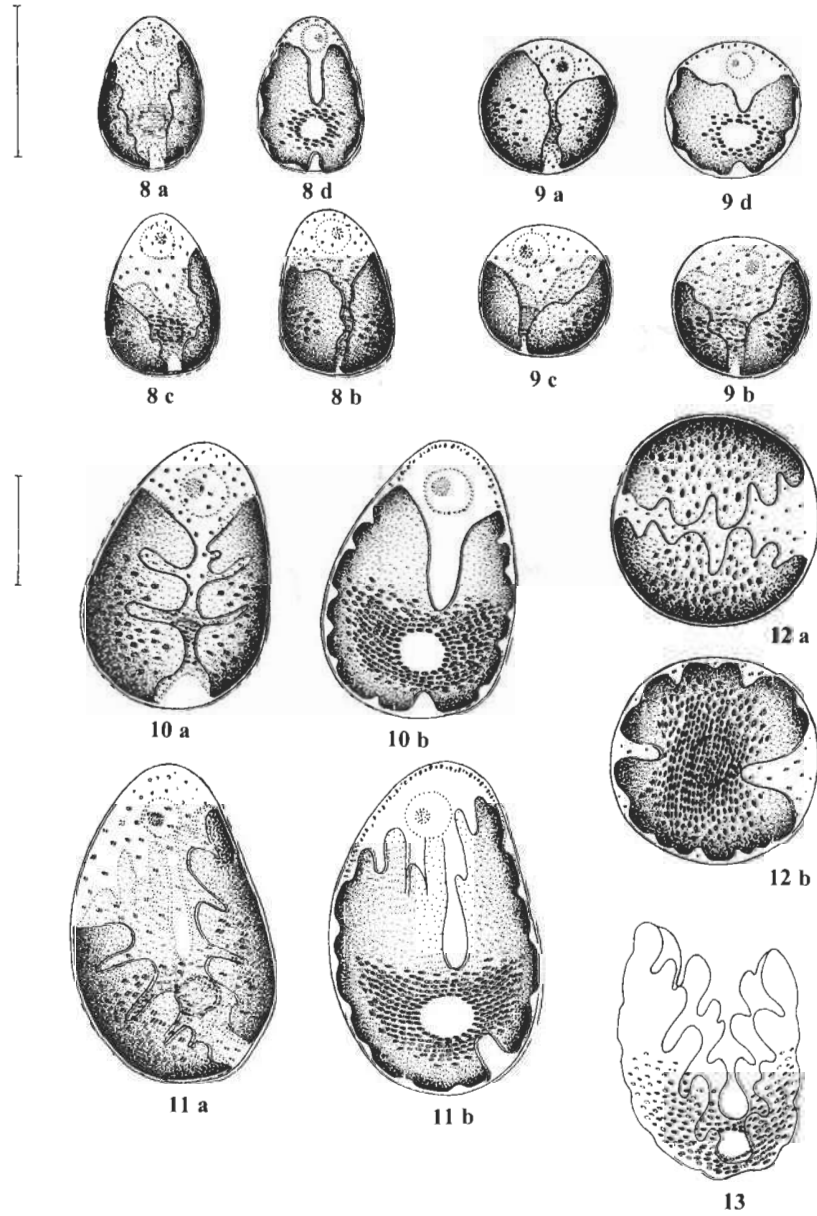
At an older culture, chloroplast in the cell compresses and subsides, its bilobed shape becomes more distinct, then it partially degrades. In this state it covers the half of cell cavity (Figs 14a–b). The pyrenoid's body is distinguished with difficulties, starch grains fill the whole chloroplast. The nucleus goes down and often takes the middle place in the cell. The quantity of cytoplasmic inclusions grows, small drops of oil appear. The cells in old culture (2–3 months) have various shapes, mostly ovoid, pyriform, irregular (Figs 15, 16, 26–27) often wide-ellipsoidal to roundish. Sometimes cells are widened on sides and get a widely oval form along the short axis (Fig. 14b). Usually thin, the cell wall is thickened, as a

Parietochloris ovoideus sp. nova, a new aerophyte alga from Ukraine 7

Figs 5–7. Reproduction of *Parietochloris ovoideus* by aplano- and autospores.
5 – Liberation of aplanospores from aplanosporangium. **6** – Aplanosporangia: **a–d** – variety of shape and number of autospores. **7** – Morphology of autospores.
 [Bar: 10 μ m.]

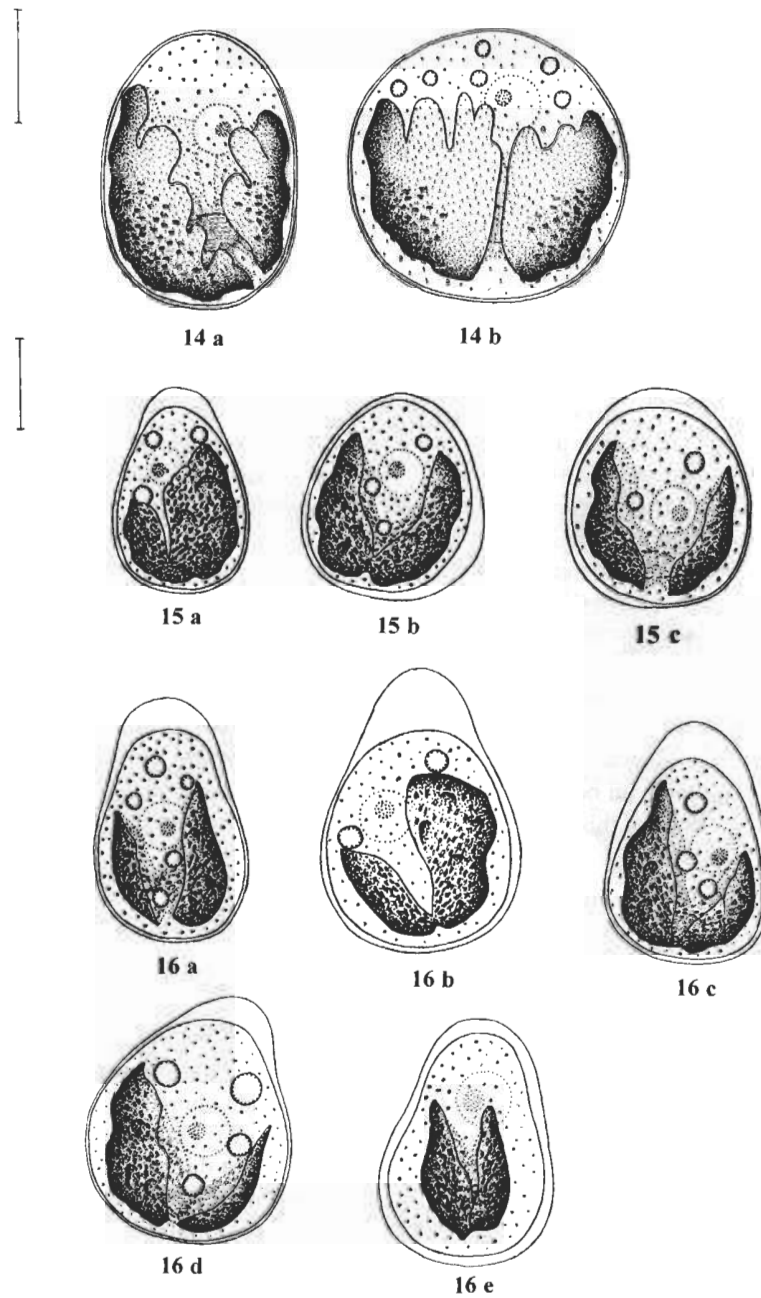
8

T. I. MIKHAILYUK et al.



Figs 8–13. Young and mature vegetative cells of *Parietochloris ovoideus*.

8 – Young vegetative cells originated from zoospores: **a–c** – general view of cells; **d** – median optical section. **9** – Young vegetative cells originated from autospores: **a–c** – general view of cells; **d** – median optical section. **10–12** – Mature vegetative cells: **10a**, **11a** – general view of cells; **10b**, **11b** – median optical section; **12** – surface view of cell on pole: **a** – on narrow pole (apical part of the cell), **b** – on wider pole (subapical part of the cell). **13** – Morphology of chloroplast of mature vegetative cell. [Bar: 10 μm .]



Figs 14–16. Vegetative cells of *Parietochloris ovoideus* in old culture. **14** – Morphology of vegetative cells in 1.5-month-culture. **15** – Morphology of vegetative cells in 2-month-culture: **a–c** – various of cell's shape. **16** – Morphology of vegetative cells in 3-month-culture: **a–e** – various of cell's shape. [Bar: 10 μm .]

rule, unevenly. One-side thickenings (mostly at narrow cell pole, but sometimes at the sides) are 0.6–2.4 μm (in 2-month old culture) and 3.0–5.4 μm (in 3-month old culture). The cells of *P. ovoideus* do not accumulate secondary carotenoids and they remain green until decomposition of chlorophyll.

The life cycle diagram of *P. ovoideus* is present in Fig. 28.

The ecology of *P. ovoideus*

It is worth mentioning that besides the type locality of *P. ovoideus*, it was found from the other samples as well which were collected from the same territory and of the same date but from other localities. This species was also found among chasmoendolithic algae (in microcracks of granite outcrops) and among epiphytic algae (from the surface of thallus of epilithic lichen *Candellariella vitellina* (HOFFM.) MÜLL. ARG.). These strains were identical to type strain. Species composition of algae from these localities is very close and genetically closely related (MIKHAILYUK et al. (in press)). The presence of alga in air samples obviously proves the cells of the species to be stable to dryness and to be able to migrate by using air flows.

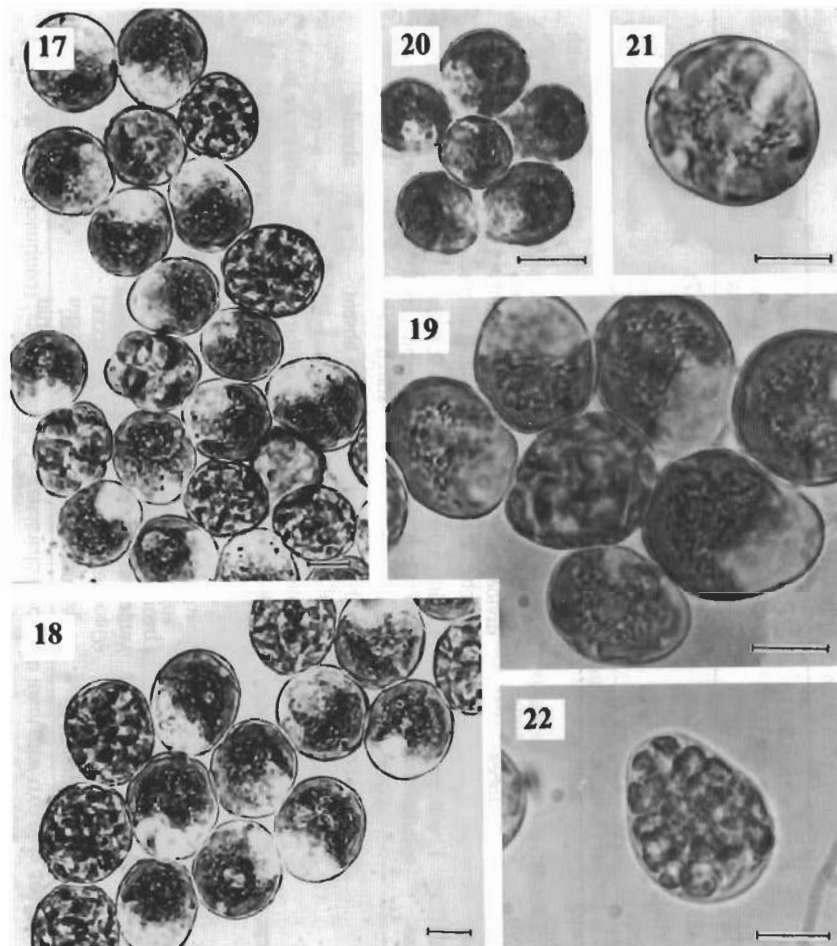
All species of the genus *Parietochloris* described earlier are mostly noted for different types of soil (KOMÁREK & FOTT 1983, EITL & GÄRTNER, 1995, ANDREEVA 1998) except *P. alveolaris*, described from the water body with lime water and later found on the tree bark. Evidently the ecology of *P. ovoideus* is wider and subsequently it is probable to be found in soil as chasmoendolithic algae are known to be close in their species composition (FRIEDMANN et al. 1967), and in air flows the given organism could be carried over together with dust and soil particles. One more argument can be mentioned in favour of this statement: we have registered another species of this genus – *P. alveolaris*, in the same samples.

Discussion

Parietochloris ovoideus differs from all known species of this genus by the unique shape of vegetative cells – ovoid and pyriform, morphology of chloroplast, shape of zoospores and the number of zoo- and aplanospores in the sporangia (Table 1). *P. ovoideus* is rather close to *P. pseudoalveolaris* according to ellipsoidal and irregular shaped cells together with sphaerical ones in culture. *P. pseudoalveolaris* has one-side thickened cell wall, the same as in *P. ovoideus*. WATANABE (1983) records dorsiventral zoospores for some strains of this species as well.

Furthermore similar to *P. ovoideus* a polar shape of cells was found by us in some strains of *P. alveolaris* (Israel, from bark of trees) (MIKHAILYUK et al. 2001) and *P. bilobata* (Ukraine, soil) (DEMCHENKO 1998), for which this phenomenon is not typical according to author's descriptions (BOLD 1958, VINATZER 1975).

This tendency to the formation of polar cells seems to us to be present in many representatives of this genus, however, it is not a constant characteristic. In contrast to this, *P. ovoideus* is characterised by that ovoid and pyriform shape of cells



Figs 17–22. Light micrographs of *Parietochloris ovoideus* in 2–3-week-culture. 17–19 – Groups of mature vegetative cells, zoo- and autosporangia. 20 – Young vegetative cells originated from zoospores. 21 – Surface view of cell on wider pole (subapical part of the cell). 22 – Zoosporangium. [Bar: 10 μ m.]

which is typical for this species. Cells of this species are spherical only in young stages. Furthermore, thickened cell walls of *P. pseudoalveolaris* were observed in 2-weeks old culture. Owing to this thickening, cells were ovoid or of irregular shape (WATANABE 1983). Cells of *P. ovoideus* have a thin cell wall which becomes thickened only in 2–3 month old cultures. So cells of the last species are ovoid and pyriform in their shape which is not caused by the thickened cell wall.

It should be mentioned that dorsiventral zoospores registered for *P. pseudoalveolaris* were found only in one strain (TOT-40) (WATANABE 1983)

Table 1. A survey of the genus *Parietochloris* WATANABE et FLOYD with main diacritical characters of all the species¹.

Characters	<i>P. ovoideus</i> MIKHAILYUK et DEMCHENKO sp. nov.	<i>P. abveolaris</i> (BOLD) WATANABE et FLOYD	<i>P. cohaerens</i> (GROOVER et BOLD) WATANABE et FLOYD	<i>P. bilobata</i> (VINATZER) V. ANDREEVA	<i>P. pseudoalveolaris</i> (DEASON et BOLD) WATANABE et FLOYD
Vegetative cells	size [µm] 5–26 (–29) x 5–22 (–23) spherical (young cells) to ovoid, pyriform, wide-ellipsoidal	Ø 10–25 (–30) spherical	Ø 3–15 (–20) spherical	Ø 20–30 (–37) spherical	Ø 10–25 (–33) spherical, sometimes ellipsoidal
cell wall	thin, in old culture with one-side thickenings	thin	thin	thin	thin, sometimes with one-side thickenings
chloroplast	uneven bilobed with lobes and dissections of secondary level	parietal with some lobes	cup-shape, sometimes divided into 2 or more lobes to asteroid	cup-shape, but in mature cells becoming bilobed	from deep-cup-shaped to irregular-lobed
pyrenoid	1, with numerous small starch grains	1, with numerous spindleform starch grains	1, with numerous small starch grains	1–2, with numerous small starch grains	1, with several separated starch grains ²
cytoplasm	nearwall layer granulated	scum-alveolar	with numerous small inclusions	data absent	alveolar
cell arrangement	solitary or in aggregation	solitary	solitary or in aggregation	solitary	solitary or in aggregation, in old culture with gelatinous matrix
Zoospores	size [µm] 4–10 x 1–4 round, drop-like to spindleform dorsiventrally flattened	8–10 x 4–5 spindleform, anteriorly tapered and posteriorly rounded	6–8 x 2–3 ovoid to stretched anteriorly tapered	7–8 x 4–5 from pyriform to drop-like	8–10 x 4–5 spindleform, anteriorly tapered and posteriorly rounded ³
contractile vacuoles	2, anterior	2, anterior	2, anterior	several, equatorial	2, anterior

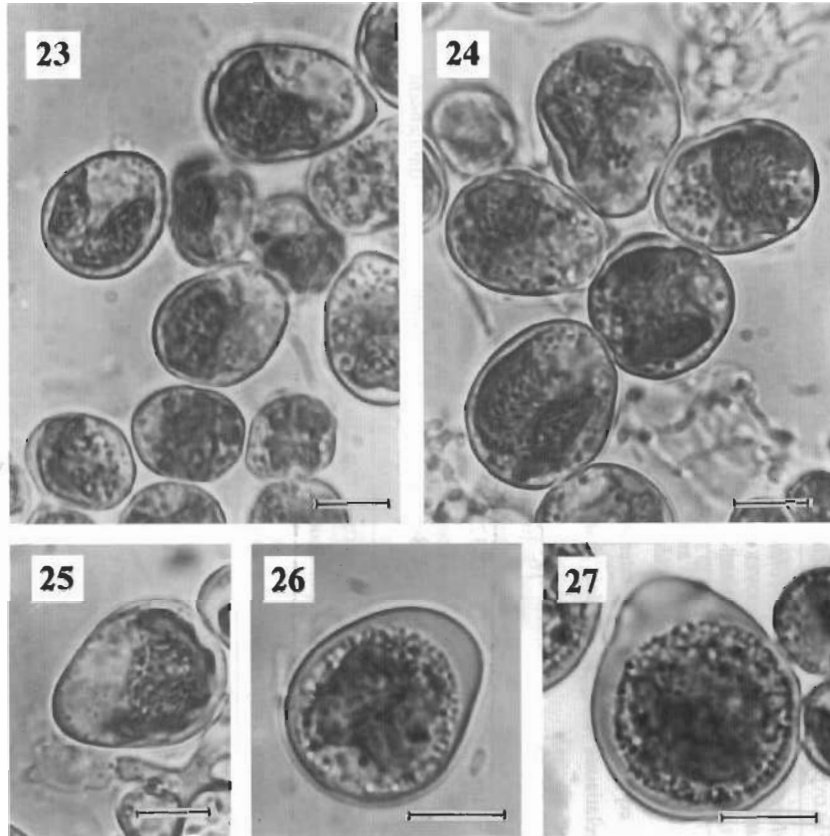
Table 1. A survey of the genus *Parietochloris* WATANABE et FLOYD with main diacritical characters of all the species¹ (continued).

Characters	<i>P. ovoideus</i> MIKHAILYUK et DEMCHENKO sp. nov.	<i>P. alveolaris</i> (BOLD) WATANABE et FLOYD	<i>P. colarens</i> (GROOVER et BOLD) WATANABE et FLOYD	<i>P. bilobata</i> (VINATZER) V. ANDREEVA	<i>P. pseudoalveolaris</i> (DEASON et BOLD) WATANABE et FLOYD
stigma	ellipsoidal flattened equatorial	anterior	small anterior to equatorial	bacilliform, equatorial	anterior
nucleus	equatorial	equatorial	anterior	data absent	anterior
peculiarities of liberation	in gelatinous vesicle	in gelatinous vesicle	data absent	data absent	in gelatinous vesicle
Number of spores	(32)–64–132	16–32	16–32	16–32	8–16
in zoo- sporangium					
in aplano- sporangium	(32)–64–132	4–8–16	16–32	16–32	4–8–16
in auto- sporangium	(4)–8–16	4–8–16	4–8	data absent	data absent

¹ The data are given according to authors' descriptions of species (BOLD 1958, DEASON & BOLD 1960, GROOVER & BOLD 1969, VINATZER 1975).

² According to data of other authors (WATANABE 1983, EITL & GÄRTNER 1995) chloroplast content from 1 to 17 pyrenoids, which are surrounded by numerous small starch grains.

³ According to WATANABE (1983) dorsiventral zoospores were observed only from one strain (TOT-40) of this species.



Figs 23–27. Light micrographs of *Parietochloris ovoideus* in 2-3-week- and 2-3-month-culture.
 23–25 – Groups of mature vegetative cells. 26–27 – Vegetative cells in old culture.
 [Bar: 10 μm .]

which is not typical for the species mentioned. Furthermore, these two species (*P. ovoideus* and *P. pseudoalveolaris*) differ by a number of other characteristics, namely by their chloroplast structure, the number of pyrenoids, the number of zoo- and aplanospores in sporangia, as well as the formation of a gelatinous matrix in old cultures of *P. pseudoalveolaris*.

According to the chloroplast morphology *P. ovoideus* is rather close to *P. bilobata* and to *P. cohaerens* in parts. However the chloroplast of the two last mentioned species is symmetric and with an even margin, *P. ovoideus* is characterised by an uneven lobed chloroplast, the separate lobes of which have uneven thickenings, dissected portions, and lobules of the second level, as well as a small-lobed margin.

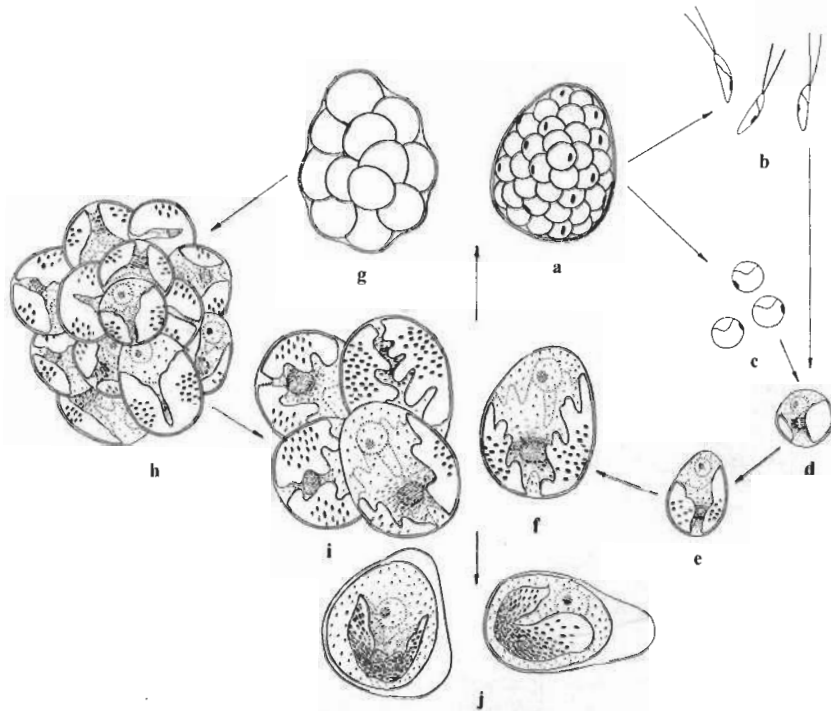


Fig. 28. Life cycle diagram of *Parietochloris ovoideus*.
a – zoo- or aplanosporangium; **b** – zoospores; **c** – aplanospores; **d** – very young vegetative cell roundish shape; **e** – single young vegetative cell ovoid shape; **f** – single mature vegetative cell; **g** – autosporangium; **h** – group of young vegetative cells mainly roundish shape; **i** – group of mature vegetative cells; **j** – old cells.

Acknowledgement

Financial support of the INTAS (Ref. N 97-30778) is deeply acknowledged.

References

- ANDREEVA, V. M. (1998): Pochvennye i aerophilnye zelenye vodorosli (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales) [Terrestrial and aerophilic green algae (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales)] – 351 pp., Nauka, Saint-Petersbourg.
- BISCHOFF H. W. & BOLD, H. C. (1963): Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. – *Phycol. Stud.* **4** (Univ. Texas Publ. N6318): 43–59.
- BOLD, H. C. (1958): Three new chlorophycean algae. – *Amer. J. Bot.* **45**(10): 737–743.
- DEASON, T. R. & BOLD, H. C. (1960): Exploratory studies of Texas soil algae. – *Phycol. Stud.* **1**. (Univ. Texas Publ., N6022): 1–72.
- DEASON, T. R.; SILVA, P. C.; WATANABE, S. & FLOYD, G. L. (1991): Taxonomic status of the species of the green algal genus *Neochloris*. – *Plant Syst. Evol.* **177**(3–4): 213–219.

- DEMCHENKO, E. M. (1998): Gruntovi vodorosti lisiv Ukrainського Polissia [Soil algae of forests of Ukrainian Polissya]. – 20 pp. Thesis for a candidate's degree (PhD), Kyiv.
- ETTL, H. & GÄRTNER, G. (1995): *Syllabus der Boden-, Luft- and Flechtenalgen*. – 721 pp., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- FRIEDMANN, E. I.; LIPKIN, Y. & OCAMPO-PAUS, R. O. (1967): Desert algae of the Negev (Israel). – *Phycologia*, **6**: 185–200.
- GROOVER, R. D. & BOLD, H. C. (1969): The taxonomy and comparative physiology of the Chlorosarcinales and certain other edaphic algae. – *Phycol. Stud.* **8**. (Univ. Texas Publ., N6907): 1–165.
- KOMÁREK, J. (1989): Polynuclearity of vegetative cells in coccal green algae from the family Neochloridaceae. – *Arch. Protistenk.* **137**(3): 255–272.
- KOMÁREK, J. & FOTT, B. (1983): Das Phytoplankton des Süßwassers, 7. Teil: Chlorophyceae (Grünalgen). Ordnung: Chlorococcales. – *Die Binnengewässer*, Bd. **16**, 1044 pp., Stuttgart.
- MIKHAILYUK, T. I.; DARIENKO, T. M. & DEMCHENKO, E. M. (in press): Vodorosli granitnykh obnazheniy regionalnogo landschaftnogo parka "Granitno-Stepnoe Pobuzhie" (Nikolaevskaia obl, Ukraina) [Algae of granite outcrops from Regional Landscape Park "Granite-Steppe Pobuzhzhia" (Mykolaiv obl., Ukraine)]. – *Novitates Systematicae Plantarum non vascularium*.
- MIKHAILYUK, T. I.; TSARENKO, P. M.; NEVO, E. & WASSER, S. P. (2001): Additions to the study of aerophytic algae of Israel. – *Int. J. on Algae*. **3**(3): 19–39.
- STARR, R. C. (1955): A comparative study of *Chlorococcum* MENEGHINI and other spherical, zoospore-producing genera of the Chlorococcales. – *Indiana Univ. Publ. Sci.* **20**: 1–111.
- VINATZER, G. (1955): Neue Bodenalgen aus den Dolomiten. – *Plant. Syst. Evol.* **123**(3): 213–235.
- WATANABE, S. (1983): New and interesting green algae from soils of some Asian and Oceanian regions. – *Arch. Protistenk.* **127**(3): 223–270.
- WATANABE, S. & FLOYD, G. L. (1989): Comparative ultrastructure of the zoospores of nine species of *Neochloris* (Chlorophyta) – *Plant Syst. Evol.* **168**(3–4): 195–219.

Manuscript received February 12, 2002, accepted November 4, 2002.

The authors' addresses:

DR. TATYANA I. MIKHAILYUK,
M. H. Kholodny Institute of Botany,
National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Tereshchenkivska St.,
UA-01601, Kyiv, GSP, Ukraine.
e-mail: t-mikhailyuk@ukr.net

DR. EDUARD M. DEMCHENKO,
Department of Botany,
Taras Shevchenko National University,
64, Volodymyrska St.,
UA-01017 Kyiv, Ukraine.
e-mail: demchenko@univ.kiev.ua

DR. SERGIY YA. KONDRATYUK,
M. H. Kholodny Institute of Botany,
National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Tereshchenkivska St.,
UA-01601 Kyiv, GSP, Ukraine.
e-mail: skondr@botan.kiev.ua

**3.1.2. *Dictyosphaerium*-подібний морфотип серед наземних водоростей:
молекулярна філогенія, таксономія та біологія роду *Xerochlorella*
(Trebouxiophyceae, Chlorophyta)**

DICTYOSPHAERIUM-LIKE MORPHOTYPE IN TERRESTRIAL ALGAE: WHAT IS XEROCHLORELLA (TREBOUXIOPHYCEAE, CHLOROPHYTA)?¹

Tatiana Mikhailyuk

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereshchenkivska Str. 2, Kyiv 01004, Ukraine

Andreas Holzinger² 

Functional Plant Biology, Department of Botany, University of Innsbruck, Sternwartestrasse 15, A-6020 Innsbruck, Austria

Petro Tsarenko

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereshchenkivska Str. 2, Kyiv 01004, Ukraine

Karin Glaser

Applied Ecology and Phycology, Institute of Biological Sciences, University of Rostock, Albert-Einstein-Strasse 3, D-18059 Rostock, Germany

Eduard Demchenko

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereshchenkivska Str. 2, Kyiv 01004, Ukraine

and Ulf Karsten 

Applied Ecology and Phycology, Institute of Biological Sciences, University of Rostock, Albert-Einstein-Strasse 3, D-18059 Rostock, Germany

Several strains of terrestrial algae isolated from biological soil crusts in Germany and Ukraine were identified by morphological methods as the widely distributed species *Dictyosphaerium minutum* (= *Dictyosphaerium chlorelloides*). Investigation of the phylogeny showed their position unexpectedly outside of Chlorellaceae (Trebouxiophyceae) and distantly from *Chlorella chlorelloides*, to which this taxon was attributed after revision of the genus *Chlorella* based on an integrative approach. SSU rRNA phylogeny determined the position of our strains inside a clade recently described as a new genus of the cryptic alga *Xerochlorella olmiae* isolated from desert biological soil crusts in the United States. Investigation of the morphology of the authentic strain of *X. olmiae* showed *Dictyosphaerium*-like morphology, as well as some other characters, common for our strains and morphospecies *D. minutum*. The latter alga was described as terrestrial and subsequently united with the earlier described aquatic representative *D. chlorelloides* because of their similar morphology. The revision of *Chlorella* mentioned above provided only one aquatic strain (*D. chlorelloides*), which determined its position in the genus. But terrestrial strains of the morphospecies were

not investigated phylogenetically. Our study showed that the terrestrial *D. minutum* is not related to the morphologically similar *D. chlorelloides* (= *Chlorella chlorelloides*, Chlorellaceae), and instead represented a separate lineage in the Trebouxiophyceae, recently described as genus *Xerochlorella*. Therefore, revision of *Xerochlorella* is proposed, including nomenclatural combinations, epitypifications, and emendations of two species: *X. minuta* and *X. dichotoma*. New characters of the genus based on investigation of morphology and ultrastructure were determined.

Key index words: Chlorophyta; *Dictyosphaerium*; epitypification; integrative approach; phylogeny; taxonomy; ultrastructure; *Xerochlorella*

Abbreviations: AIC, Akaike information criterion; KW, Herbarium of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine; ML, maximum likelihood; SAG, Culture Collection of Algae at Göttingen University, Germany; UTEX, Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin

¹Received 9 September 2019. Accepted 31 December 2019. First Published Online 28 January 2020. Published Online 16 March 2020, Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

²Author for correspondence: e-mail andreas.holzinger@uibk.ac.at. Editorial Responsibility: T. Mock (Associate Editor)

Development of modern taxonomy of microalgae proceeds on the basis of wide usage of molecular-phylogenetic methods. These methods are powerful tools to determine with high accuracy relationships between organisms, their phylogenetic position

among the numerous groups of algae, and to identify morphologically cryptic taxa (Leliaert et al. 2014). Since many microalgae are organisms with a very limited number of morphological characters for taxonomic purposes (because of simple morphology and life cycle, high adaptive and morphological plasticity, etc.) molecular-phylogenetic methods often are the main or even only tool to delimit taxa. Therefore, algal identification based on molecular markers (including culture independent methods, environmental, and next generation sequencing) represents the current state of the art approach (De Clerck et al. 2013, Leliaert et al. 2014, Zimmermann et al. 2015, Büdel et al. 2016).

Despite fast development of new methods and their wide practical application, the main part of accumulated knowledge of algae of different taxonomic groups, such as their diversity, distribution, ecology is still based on the classical morphological approach developed during the middle of 19th century (Friedl and Rybalka 2012, De Clerck et al. 2013, Ettl and Gärtner 2014, Büdel et al. 2016 etc.). Many algal species were originally described based on field material or algal cultures, both of which were later lost in many cases. The type information of these species was usually preserved as line drawings. Further investigation of lost type material by genetic methods is possible only by designating a reference strain as an epitype, with morphological and ecological characters as well as geographical distribution corresponding as close as possible to the original description of the respective taxon.

The so-called integrative approach (combination of classical algal cultivation and microscopy with new molecular-phylogenetic methods) is a feasible instrument to combine morphological and genetic information, particularly for biodiversity studies (Darienko et al. 2015). There exists now many papers devoted to taxonomic revisions of green, streptophycean, xanthophycean, eustigmatophycean algae, cyanobacteria, etc., using such an integrative approach (Neustupa et al. 2011, Rybalka et al. 2013, Bohunická et al. 2015, Škaloud et al. 2016, Darienko et al. 2017, Kryvenda et al. 2018, Mikhailyuk et al. 2018, Darienko and Pröschold 2019 etc.).

Incompleteness of the algal genetic database sometimes leads to the fact that some newly discovered lineages may be described as new taxa. But in fact these algae were found and described by classical methods many years ago. The reasons for this problem are also the simplicity and plasticity of microalgal morphology. Using an integrative approach including molecular-phylogenetic and follow-up detailed morphological investigations of these taxa may show such disagreements.

An example of such taxonomical disagreement is the recently described desert green algal genus *Xerochlorella* (Fučíková et al. 2014). This is an auto-spore-forming alga with small spherical cells (max 10 µm in diameter) and inconspicuous *Chlorella*-like

morphology. More detailed investigation of an authentic strain of this monotypic genus as well as several newly isolated strains led to the conclusion that *Xerochlorella* is identical to the widely distributed terrestrial species *Dictyosphaerium minutum*, described more than 80 years ago by classical methods (Petersen 1932, Ettl and Gärtner 2014). Therefore, this paper is devoted to the respective taxonomic revision of the genus *Xerochlorella* based on an integrative approach.

METHODS

Strains, culture conditions, light microscopy, ultrastructure. As material for the present study, four unialgal original strains were used. These strains were isolated from terrestrial habitats (biological soil crusts from maritime sand dunes or forest soil) in Europe (Germany and Ukraine). The isolation procedure and culture conditions were described in a previous paper (Schulz et al. 2016). For comparison, an authentic strain of the recently described *Xerochlorella olmiae*, UTEX B 2993 (isolated from desert soil crust [USA]) was used. DNA sequences were compiled from GenBank of other *Dictyosphaerium*-like strains phylogenetically related to *Xerochlorella*. Short information about all strains and sampling sites are provided in Table 1.

Purified unialgal strains were maintained on solid medium (1.5% agar with 3N BBM and vitamins; Starr and Zeikus 1993) at 20°C with 25 µmol photons · m⁻² · s⁻¹ (Osram Lumilux Cool White lamps L36W/840) under a light/dark cycle of 12:12 h light:dark. Morphological examination of these unialgal cultures was performed using Olympus BX51 and Zeiss Axiovert 200 M light microscopes with Nomarski DIC optics. Photomicrographs were taken with digital cameras [Olympus UC30 (Tokyo, Japan) and Zeiss Axiovision (release 4.7, Oberkochen, Germany)] attached to the respective microscopes and processed by software cell Sens Entry and Zeiss Axiovision.

Samples were fixed for transmission electron microscopy (TEM) using a standard chemical fixation protocol (2.5% glutaraldehyde, 1% OsO₄ in 10 mM cacodylate buffer, pH = 6.8) according to Holzinger et al. (2009). Samples were dehydrated in increasing ethanol concentrations, transferred to modified Spurr's resin and heat polymerized. For TEM, ultrathin sections were prepared, counterstained with uranyl acetate and Reynold's lead citrate, and investigated using a Zeiss LIBRA 120 transmission electron microscope at 80 kV. Images were captured with a TRS 2k SSCCD camera and further processed using Adobe Photoshop software (Adobe Systems Inc., San José, CA, USA).

DNA isolation, PCR and sequencing. Genomic DNA of all investigated strains was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences of the SSU rRNA gene together with ITS-1-5.8S-ITS-2 region were amplified using a set of Taq PCR Mastermix Kit (Qiagen GmbH) and a complex of EAF3 and ITS055R as well as algal-specific primers G800R and G500F. PCR reactions were made in a thermocycler T gradient Thermoblock (Biometra, Analytik Jena, Germany) under conditions described in a previous paper (Mikhailyuk et al. 2018). PCR products were cleaned using a Qiagen PCR purification kit (Qiagen GmbH) according to the manufacturer's instructions. Cleaned PCR products were sequenced commercially by Qiagen Company using primers G800R, 536R, 920F, 1400R, 1400F, GF, GR, and ITS2F. Sequences of all primers used in the study with respective references are included in the Table 2. The resulting sequences were assembled and edited using Geneious software (version 8.1.8; Biomatters). They were deposited in GenBank under accession numbers MN267182 – MN267185.

Phylogenetic analyses. DNA sequences of our isolates were compared to those from reference strains at NCBI using

TABLE 1. Summarized information about strains and sequences of *Xerochlorella* used in the present study (newly obtained sequences are marked with Bold)

Original species name	Strain label/culture number	Collection information	Species designation	SSU rRNA	ITS-1–5.8S rRNA–ITS-2
<i>Xerochlorella olmiae</i>	UTEX B 2993	Mojave National Preserve, San Bernardino Co., California, USA, Desert soil crust 35°27.113' N, 115°40.550' W, Louise A. Lewis (2003)	<i>Xerochlorella minuta</i>	MN267184	
<i>Xerochlorella olmiae</i>	BCP-EM3VF21	Mojave National Preserve, San Bernardino Co., California, USA, Desert soil crust 35°27.113' N, 115°40.550' W, Louise A. Lewis (2003)	<i>Xerochlorella minuta</i>	KF693788	–
<i>Dictyosphaerium</i> sp.	UTEX SNO65	Antarctic (?) ^a	<i>Xerochlorella minuta</i>	GQ502290	
<i>Dictyosphaerium</i> sp.	CCAP 222/3	Moss epiphyte, Signy Island, South Orkney Islands, Antarctica, Broady (1975) as <i>Dictyosphaerium chlorelloides</i> (formerly listed as <i>Dictyosphaerium minutum</i>)	<i>Xerochlorella minuta</i>	GQ502289	
<i>Dictyosphaerium minutum</i>	CCAP 222/3	Moss epiphyte, Signy Island, South Orkney Islands, Antarctica, Broady (1975) as <i>Dictyosphaerium chlorelloides</i> (formerly listed as <i>Dictyosphaerium minutum</i>)	<i>Xerochlorella minuta</i>	FR865691	
<i>Dictyosphaerium</i> sp.	CCALA 333	Slovakia, Vysoke Tatry, peat bog, periphyton Ruzicka, 1962, listed as <i>Dictyosphaerium tetrachotomum</i> Printz	<i>Xerochlorella minuta</i>	GQ487247	–
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Us-7-12	Baltic sea coast, sand dunes, soil crust, Zempin, Usedom, Mecklenburg-Vorpommern, Germany, 54°04.172'N; 13°58.035'E, T. Mikhailyuk, 2013	<i>Xerochlorella minuta</i>	MH703761	
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	SEW-9-1	Soil crust, beech forest, Germany, 53°02.674'N; 13°48.617'E, K. Glaser and T. Mikhailyuk, 2014	<i>Xerochlorella minuta</i>	MN267183	
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Prim-17-2	Black Sea coast, sand dunes, Danube Delta Biosphere Reserve, Zhebryanska bay, Kiliya District, Odessa Region, 45.486662736 N; 29.633074533 E, Demchenko and T. Mikhailyuk, 2013	<i>Xerochlorella minuta</i>	MN267182	
<i>Dictyosphaerium dichotomum</i>	Hg-2-3 SAG 2582	Baltic sea coast, sand dunes, soil crust, Heiligendam, Mecklenburg-Vorpommern, Germany, 54.146102096 N, 11.86013389 E, T. Mikhailyuk, 2013	<i>Xerochlorella dichotoma</i>	MN267185	

^aInformation concerning this strain is from NCBI, but the information from UTEX catalogue is different: *Chloromomas rosae*, Litchfield Island, Antarctic, red ice, Collection: B. Bidigare (3/26/90), Isolation: R.W. Hoham.

TABLE 2. List of primers used in the study for amplification and sequencing.

Primer name	Sequence [5'→3']	Reference
EAF3	TCGACAATCTGGTTGATCCTGCCAG	Marin et al. (2003)
ITS05R	CTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG	Marin et al. (1998)
G500F	GAATGAGTACAATCTAAACCCCTTAAC	Darienko et al. (2019)
G800R	CATTACTCCGGTCCCTACAGACCAACAGG	
536R	GWATTACCGCGGCKGCTG	Lane (1991)
920F	GAAACTTAAAKGAATTG	Hoef-Emden and Melkonian (2003)
1400F	CTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTC	
1400R	GGTAGGAGCGACGGGCGGTGTGTAC	Marin et al. (2003)
GF	GGGATCCGTTCGGTAGGTGAACCTGC	Goff and Moon (1993)
GR	GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	
ITS2F	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White et al. (1990)

BLASTn queries (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). For comparison with original strains, we used nucleotide sequences available in GenBank (NCBI) of representatives of the Trebouxiophyceae, with selected Chlorophyceae as the outgroup. Multiple alignment of the nucleotide sequences of the SSU rRNA was made using MAFFT web server (version 7; Katoh and Standley 2013) followed by manually editing in the program BioEdit (version 7.2). Alignment for the phylogeny of the ITS-2 region was performed manually in BioEdit, taking into account the secondary structure of the RNA (see below).

The evolutionary model that is best suited to the database was selected on the basis of the lowest AIC value (Akaike 1974) and calculated in MEGA (version 6; Tamura et al. 2013). Phylogenetic trees were constructed in the program MrBayes 3.2.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003), using an evolutionary model GTR + G + I, with 5,000,000 generations. Gaps were treated as missing character. Two of the four runs of Markov chain Monte Carlo were made simultaneously, with the trees, taken every 500 generations. Split frequencies between runs at the end of calculations were

below 0.01. The trees selected before the likelihood rate reached saturation were subsequently rejected. The reliability of tree topology verified by the maximum likelihood analysis (ML, GTR + I + G) was made using the program GARLI 2.0, and bootstrap support was calculated with 1,000 replicates.

Analysis of the ITS-2 secondary structures, genetic similarity. Models of the secondary structure of ITS-2 together with 5.8S-LSU rRNA stem were predicted for all investigated strains of *Xerochlorella*. Helices were folded with the online software Mfold (Zuker 2003) and visualized in the online tool PseudoViewer (Byun and Han 2009). ITS-2 secondary structure of CCAP 222/3 was predicted based on two published sequences with different length (GQ502289 and FR865691). A part of 5.8S-LSU stem and neighboring core of UTEX SNO65 are unknown (because of short sequence (GQ502290) and therefore could not be analyzed. Compensatory base changes (CBCs and hemi-CBCs) as well as mismatches, deletions, single, or unpaired bases were estimated using recommendations published in Demchenko et al. (2012).

Genetic similarity of SSU and ITS rRNA between investigated strains was calculated in the program MEGA using p-distance and uniform rates, and was expressed in percent.

RESULTS

Molecular phylogeny based on SSU rRNA gene and ITS-2. The phylogenetic analysis of SSU rRNA sequences revealed that the newly sequenced original isolates as well as original sequence of UTEX B 2993 clustered together with the authentic strain of *Xerochlorella olmiae* (BCP-EM3VF21 = UTEX B 2993), as well as with several strains from CCAP, UTEX, and CCALA initially identified as *Dictyosphaerium* species (Fig. 1). All of these strains formed a highly supported *Xerochlorella* clade sister to the clades *Lobosphaera* and *Coccolobrya*, based on similar, almost identical SSU sequences, with exception of Hg-2-3 which formed a separate, highly supported lineage inside the *Xerochlorella* clade. This strain differed also morphologically (see below).

To obtain better resolution within the *Xerochlorella* clade, a phylogenetic analysis of the ITS-2 region of all investigated strains with *Lobosphaera* as outgroup was performed (Fig. 2). The tree confirmed also two main lineages inside the *Xerochlorella* clade: strains designated as *X. minuta* comb. nova (see below) and the morphologically different strain Hg-2-3 identified as *X. dichotoma* comb. nova.

Comparison of ITS-2 secondary structures, p-distance. To evaluate borders between different species inside the *Xerochlorella* clade the secondary structure of ITS-2 of all investigated strains was evaluated. Comparison of ITS-2 secondary structure of strains referred to *X. minuta* (see below) showed generally high similarity (Fig. 3). The most striking differences were localized in helices II and IV, while the 5.8S-LSU rRNA stem was identical in all strains. But many more differences in ITS-2 secondary structure were found between these strains and the strain Hg-2-3 (Fig. 4). All differences were localized in helices

I, II, and IV. Results of analysis of secondary structures of all strains are summarized in Table 3. No compensatory base changes (CBCs) between strains referred to *X. minuta* were found, while differences between these strains varied from 1 to 3 hemi-CBCs, 1–4 mismatches and 2–8 nucleotide differences, all of which were localized in loops or ITS-2 core (Fig. 3, Table 3). Differences between secondary structures of ITS-2 of all *X. minuta* strains and Hg-2-3 were more prominent: 3–4 CBCs, 4–6 hemi-CBCs, 9 deletions, 2–3 mismatches, and 25–28 nucleotide differences in loops or ITS-2 core (Fig. 4, Table 3).

Pairwise comparison of SSU and ITS rRNA sequences of all strains investigated within the *Xerochlorella* clade showed a close similarity among all isolates referred to *X. minuta* (see below; Table 3). The identity of nucleotides of SSU and ITS rRNA of these strains varied from 99.5% to 99.9%. But strain Hg-2-3 considerably differed from those mentioned strains: the identity of nucleotides of the respective region varied from 97.5% to 97.8%.

Morphology and reproduction. The investigated strains represented unicellular green algae. Cells were small, ovoid to wide ellipsoid and almost spherical, (4.3)5.0–6.7(7.5) × (2.5)4.3–6.0(7.0) μm, uninucleate (Fig. 5). Cells of the strain Hg-2-3 were slightly larger, (4.5)6.1–8.1(9.6) × (3.9)5.7–7.8 (8.6) μm. Chloroplasts were single, parietal, cup-shaped, occupied half or 2/3 of the cells inner surface, with smooth or slightly waved margins. Pyrenoids were single, spherical to widely ellipsoid, in the middle of the chloroplast, surrounded by several starch grains. Nuclei were situated opposite the pyrenoid.

Cultures included single cells as well as cells united in colonies (Fig. 5, a and e). Colonies formed due to remnants of mother cell walls, which slightly gelatinized, but preserved in culture (Fig. 5c). Fragments of mother (sporangial) cell wall originated from sporangia with two autospores had semilunar shape (Fig. 5f). Sporangia with four autospores formed cruciform remnants (Fig. 5, b–d). Cells attached to the edges of remnants by their narrow ends. Therefore, semilunar (two-celled) or cruciform (four-celled) *Dictyosphaerium*-like colonies were formed in the cultures (Fig. 5, a–g). A lot of remnants were distributed in culture without any cells, because autospores and young cells usually easily detached from remnants (Fig. 5c). These types of colonies and unicells were observed in the strains Us-7-12, SEW-9-1, Prim-17-2, and the authentic strain of *Xerochlorella olmiae* UTEX B 2993.

Strain Hg-2-3 formed similar colonies (Fig. 5j), but also much bigger cell aggregations especially prominent in older cultures. Large *Dictyosphaerium*-like colonies formed due to tighter attaching cells to the fragments of sporangial walls than in other strains. Cells attached to the remnants formed sporangia and later their daughter cells released, but remained attached to remnants of sporangial walls.

DICTYOSPHAERIUM-LIKE MORPHOTYPE

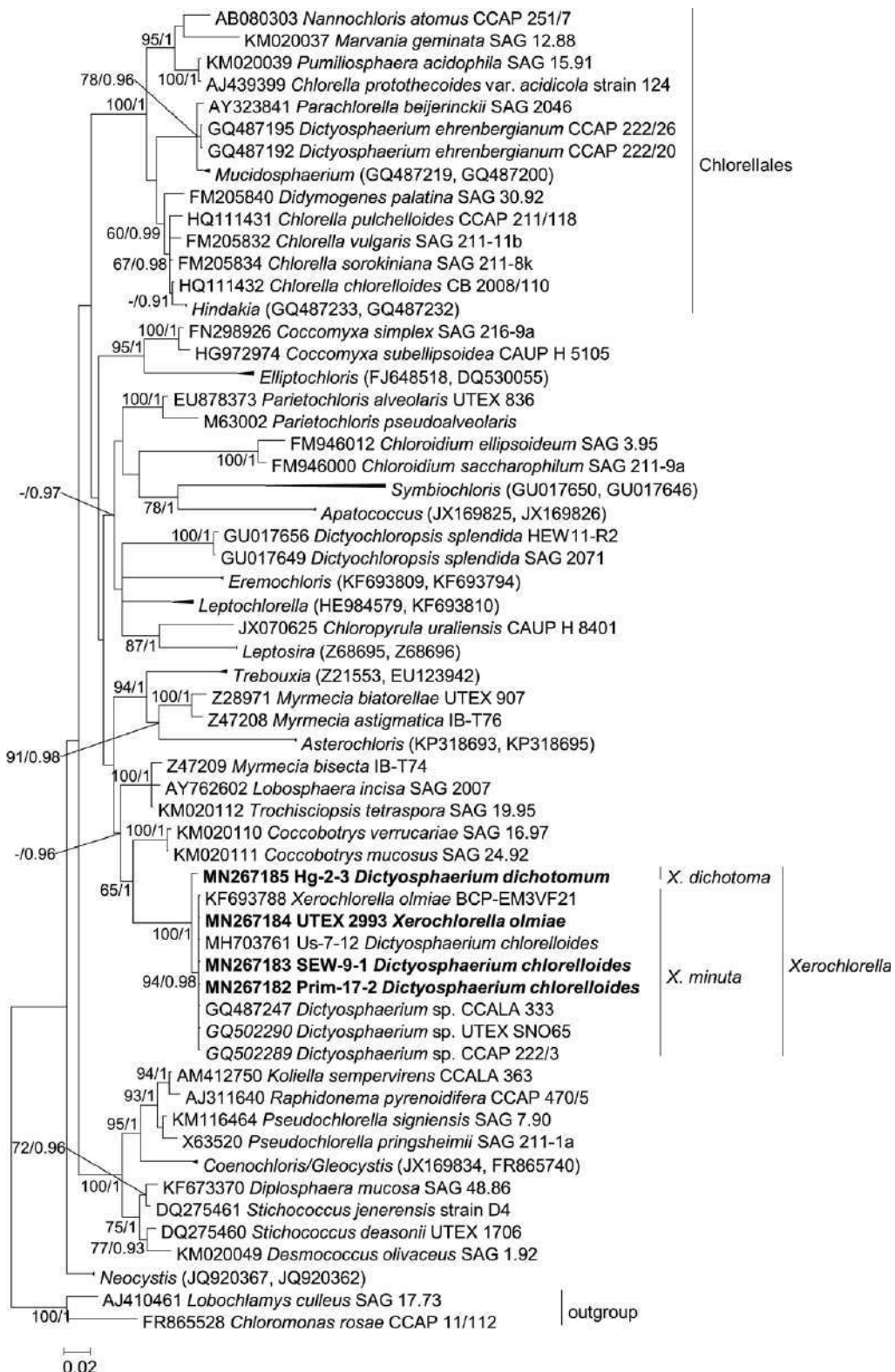


FIG. 1. Molecular phylogeny of Trebouxiophyceae (Chlorophyta) based on the comparison of the nucleotide sequences of the SSU rRNA gene (1776 base pairs). A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP); PP values lower than 0.8 and BP lower than 50% not shown. Strains in bold represent newly sequenced algae. Clades were named according to Fučíková et al. (2014) and Bock et al. (2011b). Scale bar: 0.02 substitutions/site.

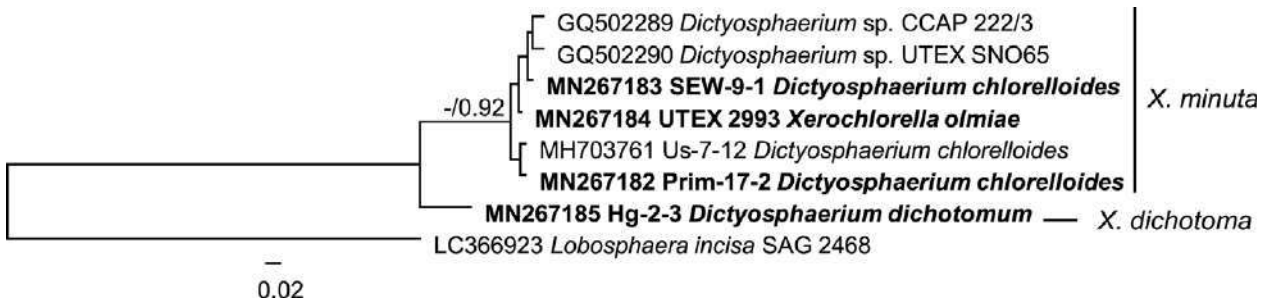


FIG. 2. Molecular phylogeny of *Xerochlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) based on the comparison of the nucleotide sequences of the ITS-2 region (687 base pairs). A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP); PP values lower than 0.8 and BP lower than 50% not shown. Strains in bold represent newly sequenced algae. Scale bar: 0.02 substitutions/site.

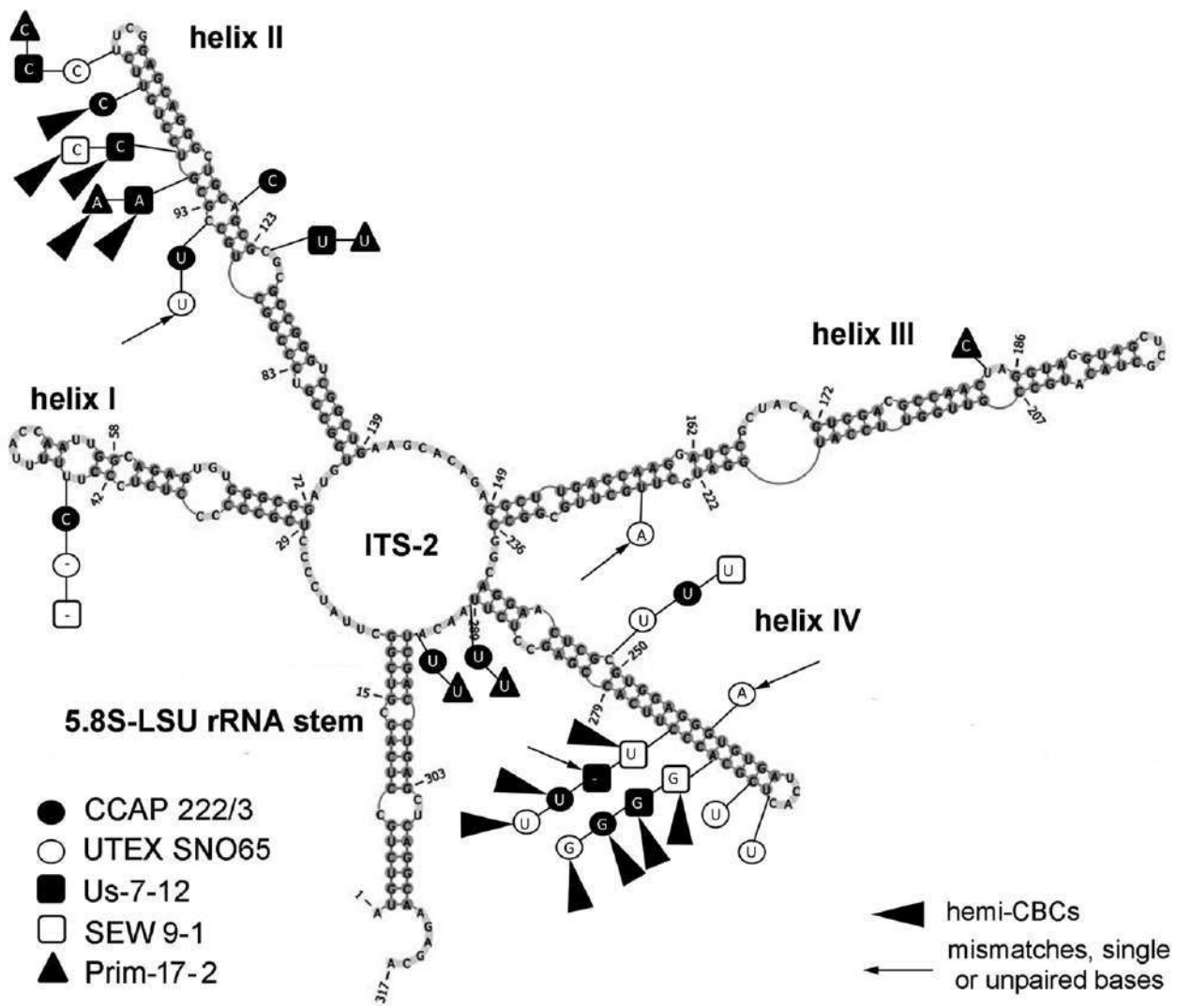


FIG. 3. Comparison of ITS-2 secondary structure of *Xerochlorella minuta* strains. The structure of the reference strain (UTEX B 2993) is presented with the marked differences to other strains of the species. Variable bases or basepairs are shown with circles, boxes, and triangles.

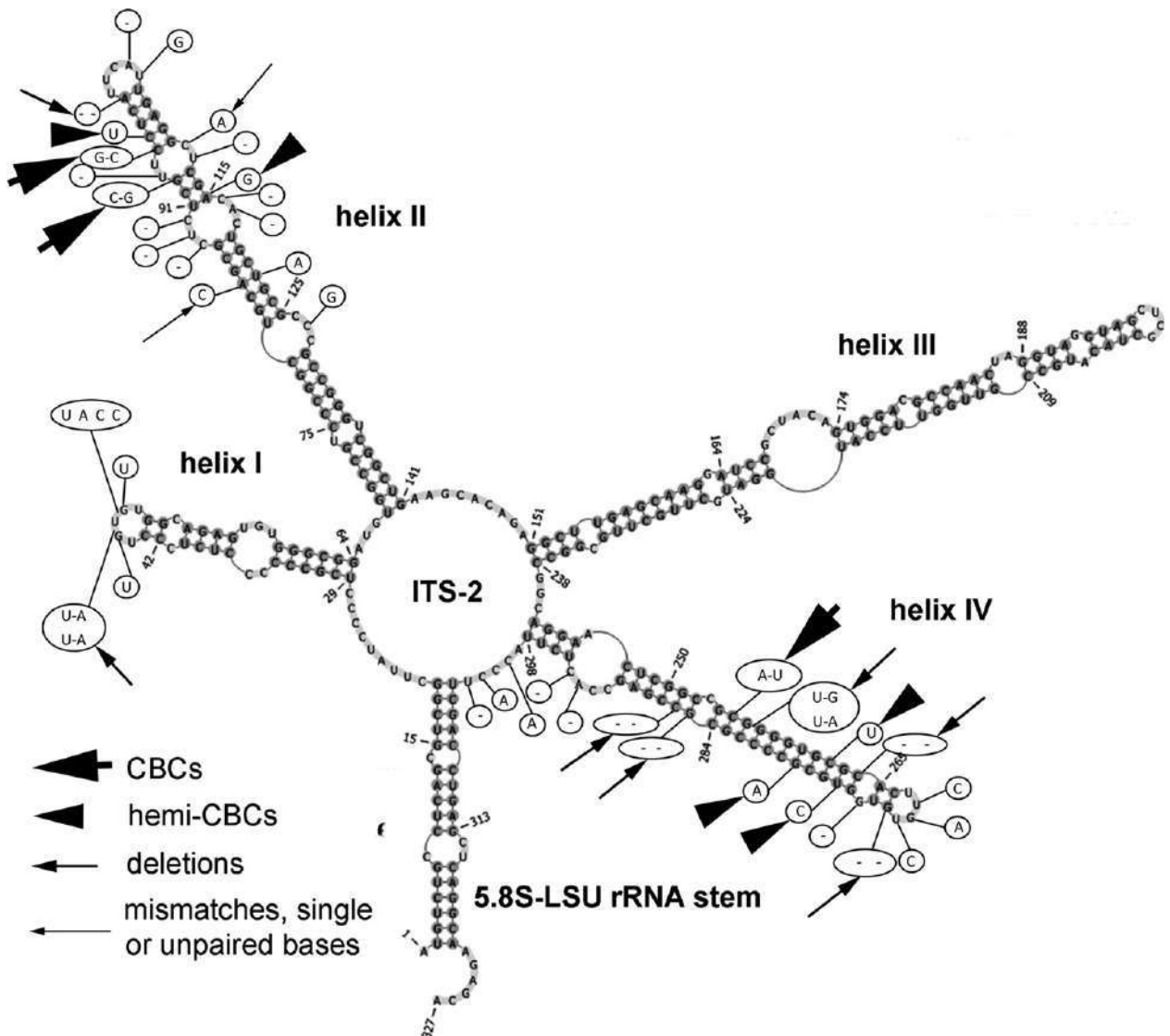


FIG. 4. Comparison of ITS-2 secondary structure of *Xerochlorella* species. The structure of *X. dichotoma* (reference strain Hg-2-3) is presented with the differences to *X. minuta* (reference strain UTEX B 2993). Variable bases or basepairs are shown with circles.

Therefore, subsequent division led to large colonies with cells attached to pseudodichotomous branching remnants of mother walls (Fig. 5, h, i, k-o).

Small and large colonies of all strains were usually surrounded by a delicate layer of mucilage. Mucilage was visible after negative staining with Indian ink. The thickness of mucilage varied from 2.1 to 5.0 μm in the different strains (Fig. 6). Individual mucilages envelopes surrounding cells were also observed (Fig. 6, a-d).

Reproduction by autospores was observed with two or four autospores formed in sporangia. Sporangial walls ruptured, but remained in culture forming semilunar or cruciform remnants. Young cells usually attached to the remnants by their narrow ends, but also often detached and laid separately. The

culture usually represented a mixture of unicells, remnants of mother cell walls and *Dictyosphaerium*-like semilunar, cruciform or pseudodichotomous branching colonies depending on the strain (Fig. 5).

Ultrastructure. The ultrastructure was investigated in strains Us-7-12 and Hg-2-3. Generally it was similar (Fig. 7). The chloroplast was always located at one side of the cell covering half or 2/3 of cells' inner surface and had a smooth or waved edges. The pyrenoid was surrounded by several (5-6) starch grains. The pyrenoid matrix was transversed by two to three thylakoid membranes. The nucleus was located opposite the pyrenoid (Fig. 7, f and j). Several mitochondrial profiles were observed in the cells, they were mostly located close to the

TABLE 3. Comparison of different strains of *Xerochlorella* by CBC approach and genetic similarity of SSU and ITS rRNA

	UTEX B 2993	CCAP 222/3	UTEX SNO65	Us-7-12	SEW-9-1	Prim-17-2	Hg-2-3
UTEX B 2993		-/3/-/-/6	-/3/-/3/4	-/3/-/1/2	-/3/-/-/2	-/1/-/-/5	3/5/9/2/25
CCAP 222/3	99.8		-/2/-/3/3	-/3/-/1/8	-/2/-/-/5	-/4/-/-/7	3/4/9/2/26
UTEX SNO65	99.5	99.6		-/3/-/4/4	-/2/-/3/2	-/4/-/3/5	4/4/9/3/28
Us-7-12	99.8	99.8	99.6		-/1/-/1/4	-/2/-/1/3	4/4/9/3/27
SEW-9-1	99.8	99.8	99.5	99.9		-/4/-/-/7	4/4/9/2/26
Prim-17-2	99.9	99.8	99.5	99.8	99.8		3/6/9/2/28
Hg-2-3	97.7	97.6	97.4	97.7	97.8	97.5	

1: CBCs/hCBCs/deletions/mismatches/differences in loops or ITS-2 core; 2: genetic similarity of SSU and ITS rRNA (%)

chloroplast (Fig. 7, b, e, f, i and j). Cells were surrounded by a cell wall, and a delicate mucilage envelope was visible on some cells (Fig. 7i). A lot of remnants of cell walls were observed in the samples (Fig. 7, a–e).

DISCUSSION

Phylogeny, SSU and ITS rRNA genetic similarity, ITS-2 secondary structure and species delimitation within Xerochlorella. Phylogenetic analysis based on SSU rRNA sequences mostly corresponded with the phylogeny of the Trebouxiophyceae by Fučíková et al. (2014), Darienko et al. (2016), Hodač et al. (2016), Skaloud et al. (2016), and others. All investigated strains formed a highly supported clade assigned to the genus *Xerochlorella* with the closest genera *Coccolobos* and *Lobosphaera* (Fučíková et al. 2014). Therefore, all investigated strains should be identified as *Xerochlorella* species. ITS-2 phylogeny showed that *Xerochlorella* represents two main lineages: strains CCAP 222/3, UTEX SNO65, SEW-9-1, Us-7-12, Prim-17-2 together with the authentic strain UTEX B 2993 corresponded to the type species *X. olmiae* (*X. minuta* comb. nova, see below), while strain Hg-2-3 represented another species identified initially as *Dictyosphaerium dichotomum* (*Xerochlorella dichotoma* comb. nova, see below).

Comparison of ITS-2 secondary structure and pairwise comparison of SSU and ITS rRNA sequences confirmed the presence of two lineages in *Xerochlorella*. All strains corresponding to *X. minuta* are characterized by minor differences (1–3 hemi-CBCs and missing CBCs). Comparison of these strains with Hg-2-3 (*X. dichotoma*) showed conspicuous differences as reflected in 3–4 CBCs and 4–6 hemi-CBCs depending on strain. Therefore, the presence of CBCs in ITS-2, essential differences according SSU and ITS-2 phylogeny as well as in morphology clearly indicate that this genus includes now two species: *X. minuta* and *X. dichotoma*.

Definition of the genus Xerochlorella. *Xerochlorella* is a monotypic genus of green algae (Trebouxiophyceae), which was recently described based on SSU rRNA and *rbcL* phylogenies and morphological investigation of two strains (Fučíková et al. 2014). The alga was found during investigation of desert

biological soil crusts (Mojave National Preserve, San Bernardino Co., California, USA). It is characterized by simple *Chlorella*-like morphology, small spherical or oviform cells and a chloroplast without pyrenoid. The chloroplasts of young cells have smooth margins, later dissects on two lobes and then on several separate chloroplasts. This representative formed a separate lineage in the phylogeny of Trebouxiophyceae. The lineage also included the strain CCAP 222/3, isolated by P.A. Broady from Antarctic soil and deposited in a culture collection under the name *Dictyosphaerium minutum*. But this strain is non-authentic, since the genus *Dictyosphaerium* forms another phylogenetic lineage within Trebouxiophyceae (Chlorellales) and *Dictyosphaerium*-like morphology was not typical for strains isolated from desert soil. Therefore, the new genus *Xerochlorella* was proposed. Fučíková et al. (2014) mentioned in their paper that *X. olmiae* was possibly found earlier and perhaps described based on classical methods. But simple morphology does not allow to determine this taxon using light microscopy. Therefore, "... knowing the limitations of the morphological approach, we prefer to establish a new taxon supported by an authentic strain, even though some of our newly proposed taxa could fit some of the uncertain historical morphogenera" (Fučíková et al. 2014).

The investigated strains (Us-7-12, SEW-9-1 and Prim-17-2) were characterized by *Dictyosphaerium*-like morphology and were preliminary identified as *Dictyosphaerium chlorelloides* (= *Dictyosphaerium minutum*) based on the "Syllabus der Boden-, Luft und Flechtentalgen" (Ettl and Gärtner 2014). This taxon was mentioned as *Chlorella chlorelloides* in some earlier papers (Schulz et al. 2016, Borchhardt et al. 2017a, b) taking into consideration the revision of Bock et al. (2011a), in which *D. chlorelloides* was assigned to the genus *Chlorella*. But molecular-phylogenetic data obtained later indicated that our strains do not belong to *Chlorella* and Chlorellales (Mikhailyuk et al. 2019), instead assignment to *Xerochlorella* was proposed. Prominent *Dictyosphaerium*-like morphology of the here investigated strains and the presence of several other strains preliminary identified as *Dictyosphaerium* in the *Xerochlorella* clade (see Fig. 1) indicated that the generic concept of *Xerochlorella* should be revised.

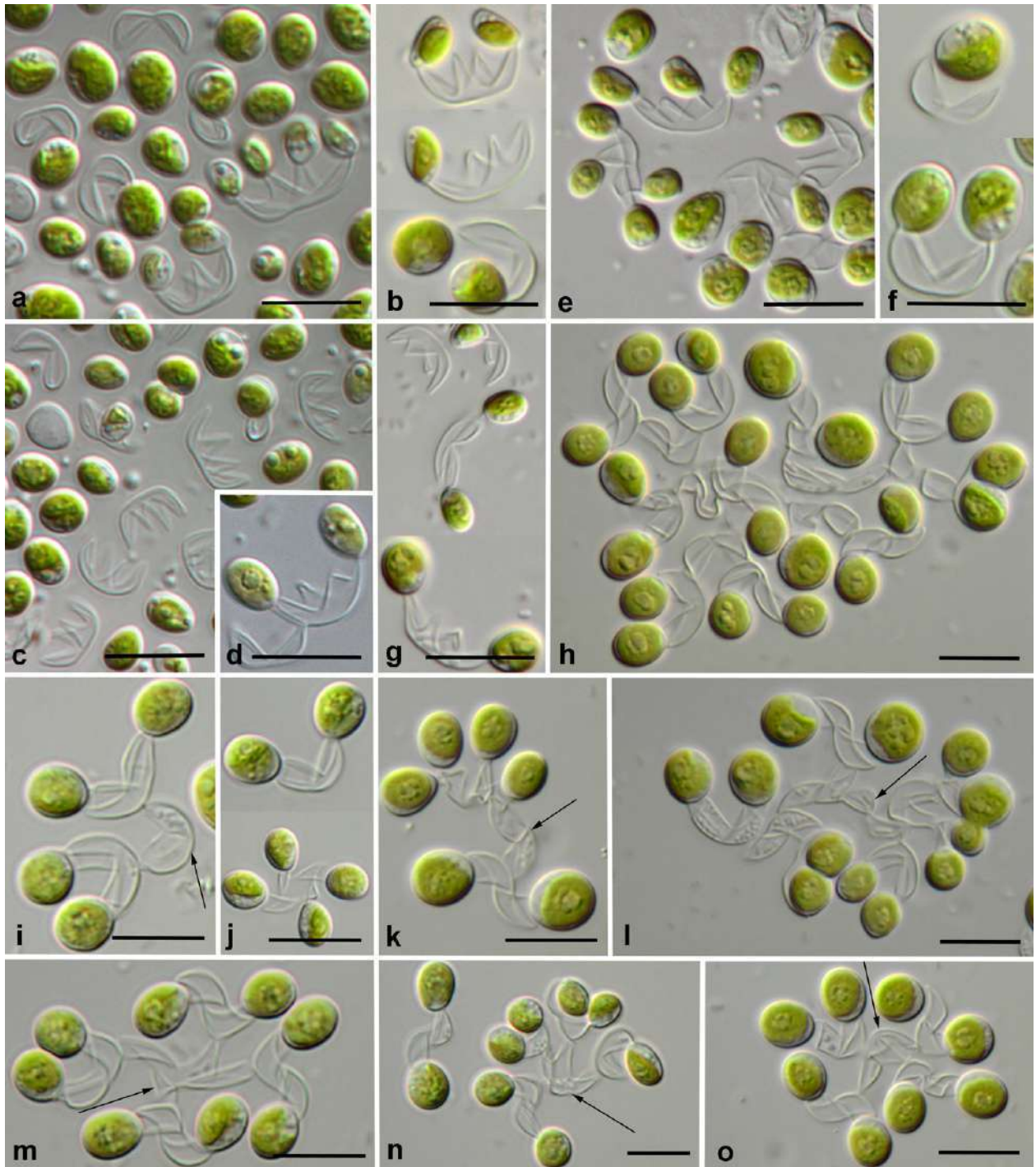


FIG. 5. Morphology of *Xerochlorella* species: (a–g) *X. minuta*: (a–d) UTEX B 2993, (e, f) Us-7-12, (g) Prim-17-2. (h–o) *X. dichotoma*, Hg-2-3. (a, c, e) General view on culture material with small 2-4-celled colonies, fragments of sporangial walls and unicells. (b, f, g, j) Small 2-4-celled colonies. (h, i, k–o) Large colonies originated due to successive cell division from small two-celled (i, k, l) and four-celled colonies (m–o); initial fragments of sporangial walls showed with arrows. Scale bars: 10 μm . [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Dictyosphaerium morphotype among green algae. The genus *Dictyosphaerium* (type species: *Dictyosphaerium ehrenbergianum*) unites mostly aquatic taxa characterized by a specific morphology: small

Chlorella-like cells are attached to variously branched mucilaginous stalks originating from remnants of mother (sporangial) cell walls (Komárek and Perman 1978). As a result colonies of different sizes

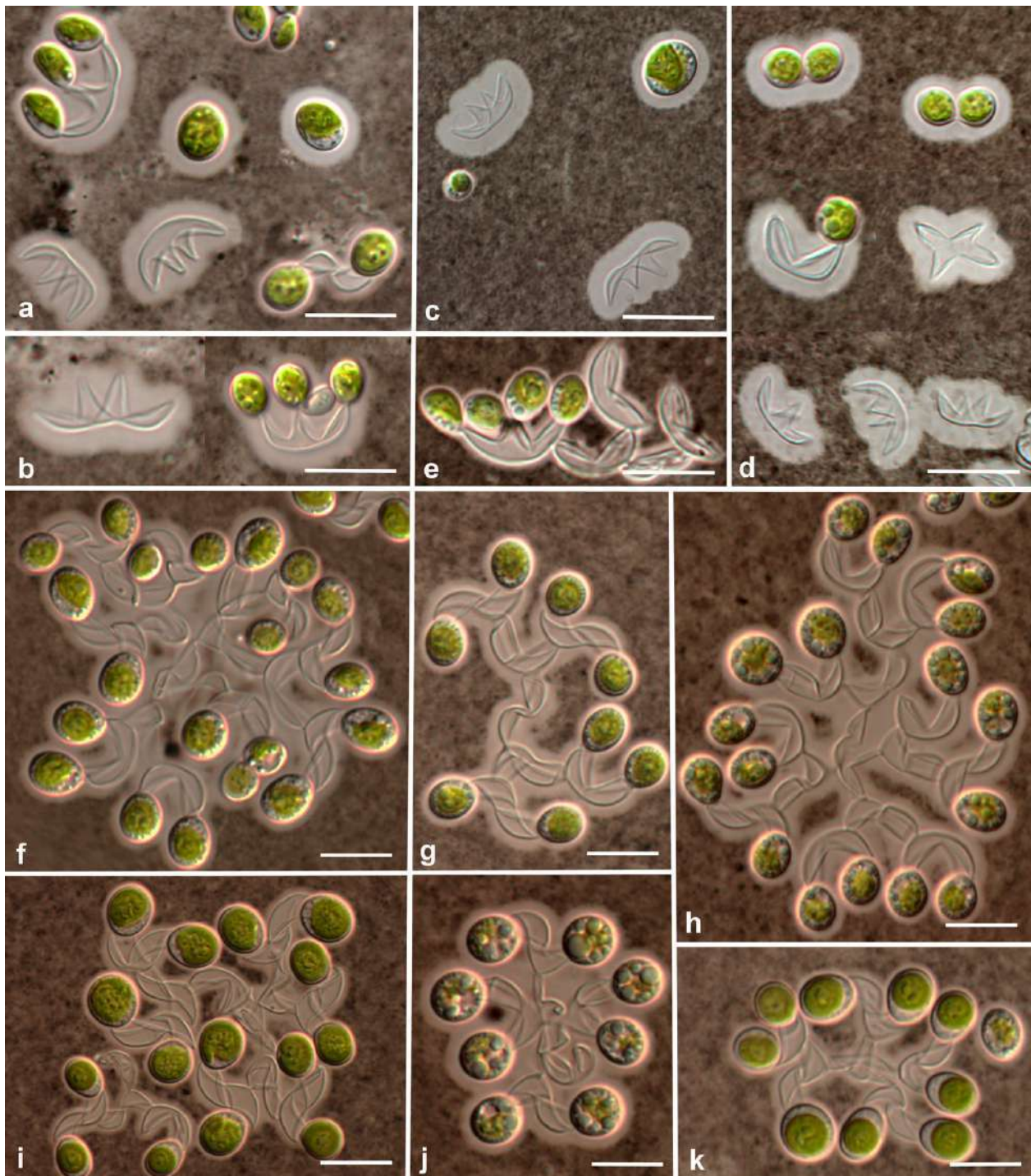


FIG. 6. Negative staining of *Xerochlorella* species: (a–e) *X. minuta*, mucilage envelopes of different thickness around cells, fragments of sporangial walls and small 2-4-celled colonies: (a, b) UTEX B 2993, (c, d) Us-7-12, (e) Prim-17-2. (f–k) *X. dichotoma*, Hg-2-3, mucilage envelopes around colonies. Scale bars: 10 µm. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

surrounded by mucilage are formed. A molecular-phylogenetic investigation of *Dictyosphaerium* showed that the *Dictyosphaerium*-like morphotype is polyphyletic (Krienitz et al. 2010). Therefore, a position

of *Dictyosphaerium* inside *Parachlorella* clade, Chlorellaceae (Bock et al. 2011b) was determined. Many morphospecies of *Dictyosphaerium* and *Pseudodictyosphaerium* were transferred to the genera *Chlorella*

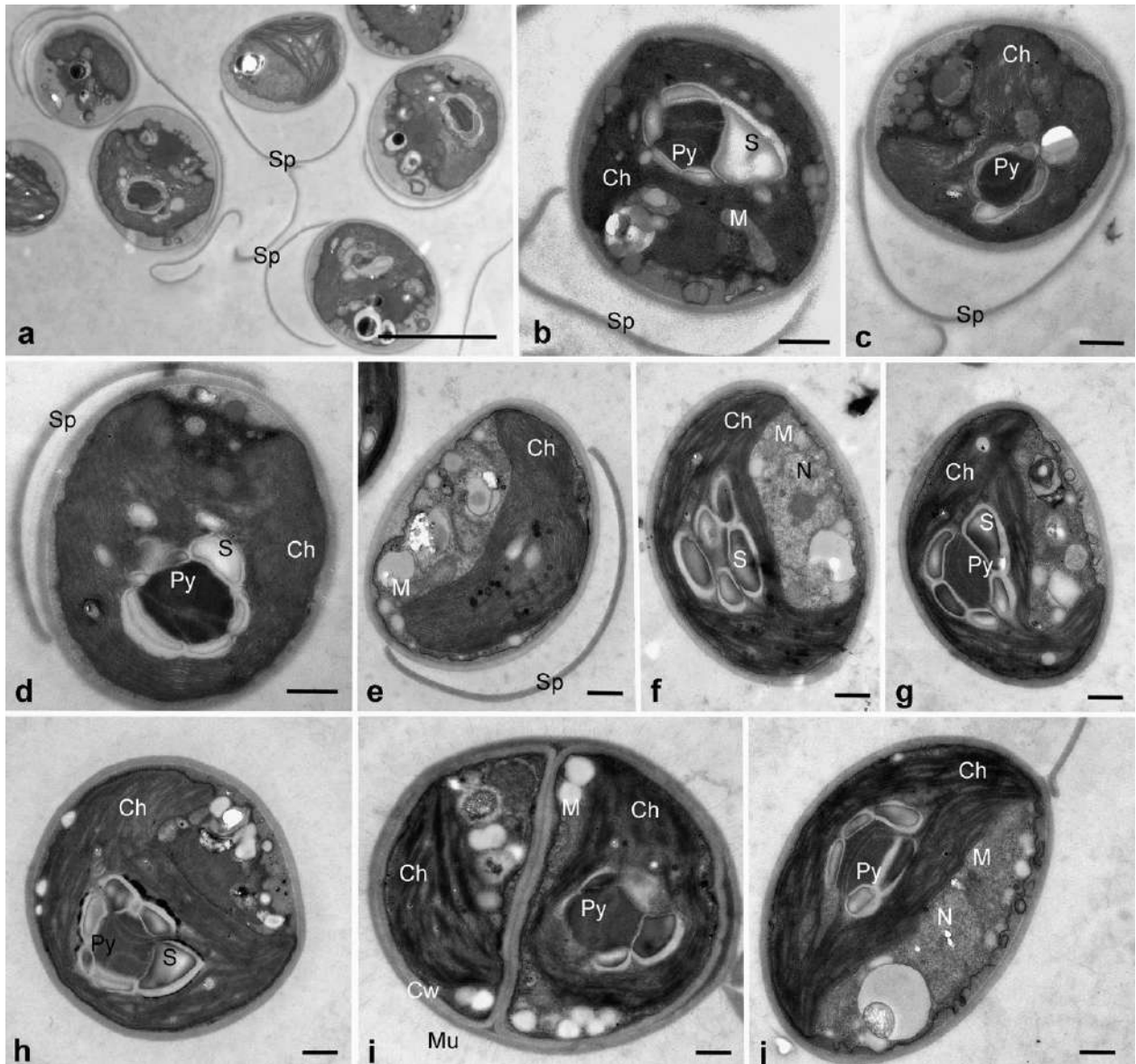


FIG. 7. Transmission electron micrographs of vegetative cells of *Xerochlorella* species: (a–d) *X. minuta*, Us-7-12, (e–j) *X. dichotoma*, Hg-2-3. General view on culture with cells connected by fragments of sporangial walls (a), single cells (b–h, j) and sporangium with delicate mucilage envelope (i). Sp, fragments of sporangial walls, Ch, chloroplast; Py, pyrenoid; S, starch grains; N, nucleus; Cw, cell wall; Mu, mucilage envelope; M, mitochondrion. Scale bars: 5 μm (a) or 1 μm (b–j).

(Bock et al. 2011a) and *Mychonastes*, Chlorophyceae (Krienitz et al. 2011). Numerous new genera inside Chlorellaceae (*Mucidosphaerium*, Bock et al. 2011b; *Heynigia* and *Hindakia*, Bock et al. 2010; *Marasphaerium*, *Compactochlorella*, *Masaia* and *Kalenjinia*, Krienitz et al. 2012) were described based on *Dictyosphaerium*-like algae. Recent investigation of strains with a *Dictyosphaerium*-like morphology from water bodies of China showed high phylogenetic and morphological diversity of these representatives inside *Parachlorella* clade (Chlorellaceae; Song et al. 2018). Perhaps several new genera of

Dictyosphaerium-like algae will be described in the future.

Reports of *Dictyosphaerium* sensu lato in terrestrial habitats are quite limited. The typical aquatic species *Dictyosphaerium pulchellum* (= *Mucidosphaerium pulchellum*) was found in soil occasionally (Ettl and Gärtner 2014). *Dictyosphaerium dichotomum* was described from terrestrial habitats of Antarctica (Ling and Seppelt 1998). The widely distributed *D. chlorelloides* (= *D. minutum*) is typical for aquatic and terrestrial habitats (Komárek and Perman 1978, Tsarenko 2011, Ettl and Gärtner 2014).

Dictyosphaerium terrestre (Fritsch and John 1942) described from soil of Great Britain is a doubtful taxon and perhaps does not belong to autospores forming *Dictyosphaerium* sensu lato (Tsarenko and John 2011), because reproduction by zoospores was found (Ettl and Gärtner 2014).

It should be noted that initially *Dictyosphaerium minutum* was described from soil of Denmark (Petersen 1932). It was later transferred to the earlier described species of the aquatic taxon *Dictyosphaerium chlorelloides* because of a very similar morphology (Komárek and Perman 1978). Later investigation of *Dictyosphaerium* based on an integrative approach (Bock et al. 2011a) showed that an aquatic strain characterized by a morphology typical for *Dictyosphaerium chlorelloides* should be assigned to the genus *Chlorella*, and CB 2008/110 was selected as reference strain of *Chlorella chlorelloides*. But strains from terrestrial habitats identified as *D. chlorelloides*/*D. minutum* were not analyzed in this study (Bock et al. 2011a). The new *Xerochlorella* clade includes several strains determined as species of *Dictyosphaerium* found mostly in terrestrial habitats of Europe and Antarctica (see Fig. 1 and Table. 1).

The morphological investigation of the authentic strain *Xerochlorella olmiae* UTEX B 2993 showed characters typical for *Dictyosphaerium chlorelloides*/*D. minutum*: the presence of remnants of mother cell walls in culture and formation of typical 2–4-celled *Dictyosphaerium*-like colonies as well as the presence of pyrenoid in cup-shaped chloroplast. Dissection of the chloroplast on several parts as noted in Fučíková et al. (2014), is due to early stages of autospore formation. The absence of pyrenoid and remnants of the mother cell walls in culture might be explained by the specific state of the respective culture during their investigation which is visible from published micrographs (Fučíková et al. 2014, fig. 1, a–e).

All other strains presented on our phylogenetic trees and attributed to *Xerochlorella* (CCAP 222/3, CCALA 333, UTEX SNO65) are characterized by *Dictyosphaerium*-like morphology. CCAP 222/3 was initially identified as *Dictyosphaerium minutum* and comprehensively described in Broady (1982). CCALA 333 was identified as another *Dictyosphaerium* species, *D. tetrachotomum*, but a micrograph of the species in the collection catalogue showed four-celled colony typical for *D. minutum* (<http://ccala.butbn.cas.cz/en/dictyosphaerium-tetrachotomum-printz>). UTEX SNO65 is problematic because it is not available or mislabeled (see Table 1), but according to NCBI data this taxon was identified as *Dictyosphaerium* sp. and isolated from Antarctica (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GQ502290>). Based on all of this information, it is clear that the terrestrial species *D. minutum* is not related to the aquatic taxon *D. chlorelloides* despite close morphology. Furthermore, the genus *Xerochlorella* (type species *X. olmiae*) is in fact synonymous to the widely distributed terrestrial species *D. minutum* discovered

more than 80 years ago (Petersen 1932). This taxon is not a species of *Dictyosphaerium* or *Chlorella* (Chlorellaceae), but represents a separate phylogenetic lineage inside the Trebouxiophyceae. Therefore, the validity of the genus *Xerochlorella*, which unites terrestrial *Dictyosphaerium*-like algae, should be accepted. Assuming *Xerochlorella* as a separate genus, we complemented its diagnosis by new data and proposed respective nomenclatural combination, emendation, and epitypification (see below). *Chlorella umbelloidea* described by Tell (1973) from soil of Argentina is morphologically and ecologically very similar to *D. minutum*, as already mentioned by Komárek and Perman (1978). Therefore, we additionally propose to consider this taxon as a synonym of *Xerochlorella minuta*.

The morphologically different strain Hg-2-3 was initially identified as *Dictyosphaerium dichotomum* (Ling and Seppelt 1998, Ettl and Gärtner 2014). Our strain has all characters typical for this representative: formation of large 8-16-32(64)-celled colonies surrounded by mucilage, pseudodichotomous branching of fragments of sporangial walls, typical morphology of single cells. The reproduction of Hg-2-3 is usually realized by two autospores, but occasionally by four autospores, the same as indicated by Ling and Seppelt (1998). Large colonies originated due to successive cell division from small two-celled (Fig. 5, i, k and l) and occasionally four-celled colonies (Fig. 5, m–o). Phylogenetic analysis showed this strain to belong to the *Xerochlorella* clade, but with a separate lineage. Therefore, we assume that this strain represents a separate species of *Xerochlorella*. Thus the respective taxonomic combination and epitypification of this taxon is proposed (see below).

Morphological characters of Xerochlorella. Morphological parallelism is a phenomenon widely distributed among algae. Perhaps morphological similarity of the freshwater *Chlorella chlorelloides* (Chlorellaceae) and the terrestrial *Xerochlorella minuta* (separate lineage in Trebouxiophyceae, Trebouxiophyceae incertae sedis; Guiry and Guiry 2019) is an example of such morphological parallelism. But also some morphological characters specific for each taxon were found. A pyrenoid surrounded by 2(4) starch grains is typical for representatives of Chlorellaceae including *Chlorella chlorelloides* (Bock et al. 2011a, Ettl and Gärtner 2014). TEM micrographs of the investigated *Xerochlorella* strains showed the presence of a pyrenoid surrounded by several (5–6) starch grains (see Fig. 7). Similar structure of pyrenoid with numerous starch grains was also observed by Broady (1982, figs. 66–67) in *Dictyosphaerium minutum* (now *X. minuta*) isolated from Antarctica. A similar pyrenoid structure was found in *D. chlorelloides*, isolated from granite outcrops of the South of Ukraine (Mikhailyuk and Demchenko 2005).

Another typical morphological character of *Xerochlorella* is its specific structure of mother (sporangial) cell wall fragments, which form a *Dictyosphaerium*-like morphology.

Cells of *Dictyosphaerium*-like algae from the Chlorellaceae are connected to thin mucous strands, which originated from mother (sporangial) cell wall fragments (Bock et al. 2011a). Analogical structures of *Xerochlorella* completely maintain the initial semilunar or cruciform shape of ruptured sporangial walls and do not turn to mucous strands. This was already mentioned in the first description of *D. minutum* (Petersen 1932) and during observation of this species by Broady (1982). Ling and Seppelt (1998) also noted as one specific character of *D. dichotomum*: “mother cell wall fragments do not change into mucous strands as is often the case in *Dictyosphaerium*” (p. 59).

The presence of a common mucilage envelope surrounding colonies in *Xerochlorella* is a disputable question. Mucilage envelope and colonies were not observed by Fučíková et al. (2014) in *X. olmiae* strains. Petersen (1932) did also not observe common mucilage envelope in *Dictyosphaerium minutum*, although mentioned slight gelatinization of cell walls. Komárek and Perman (1978), however, noted different development of a mucilage envelope in *D. chlorelloides*: from implicit or slight mucilage to prominent strong envelope sometimes with clear individual envelopes surrounding cells. A common mucilage envelope of 3 µm thickness after negative staining with ink was indicated for *D. dichotomum* (Ling and Seppelt 1998, figs. 13, 20). Our observations showed also different phenotypic expression of a common mucilage envelope in strains of *X. minuta* as well as the presence of individual envelopes surrounding cells (see Fig. 6). Negative staining of strain Hg-2-3 confirmed the presence of a clear common mucilage envelope with a thickness of 2.1–3.0 µm. Therefore, members of *Xerochlorella* have a common mucilage envelope with different thickness depending on environmental conditions. This mucilage envelope is usually thin, delicate, homogeneous, and start to be visible after negative staining by ink.

Ecology and distribution of *Xerochlorella*. Terrestrial *Dictyosphaerium* (*Xerochlorella minuta*) are widely distributed species. Ettl and Gärtner (2014) noted its wide distribution in Europe (Denmark, Great Britain, Iceland, former USSR) and Asia and some findings in Antarctica. This taxon was mentioned in main check-lists and hand books as widely distributed terrestrial alga (Komárek and Fott 1983, Andreyeva 1998, Tsarenko and John 2011). We found it repeatedly as terrestrial alga from granite outcrops of the South of Ukraine (Mikhailyuk and Demchenko 2005, Mikhailyuk et al. 2011) as well as in biological soil crusts from sand dunes of Germany and Ukraine (Mikhailyuk et al. 2019), forests of Germany (Glaser et al. 2018) and polar regions such as the Antarctic Peninsula and Arctic Svalbard (Borchhardt et al. 2017a,b).

Molecular-phylogenetic data were obtained from *Xerochlorella minuta* strains isolated from terrestrial and amphibian (swamp) habitats of Western and Eastern Europe (Germany, Ukraine, Slovakia), North America (USA), and Antarctica (see Table 1). These

data prove that all investigated strains are genetically very close despite distant geographical regions and different ecological conditions (from swamps and moist soils to maritime sand dunes, habitats in hot and cold deserts). All these strains can be considered as representatives of different populations of the same species. Therefore, it is reasonable to assume that *X. minuta*, due to its small cell size and possible high tolerance to temperature and lack of water, can be easily distributed by wind (or other vectors) over long distances which is typical for terrestrial algae (Sharma et al. 2007, Ryšanek et al. 2015). Despite the fact that this species was originally described from Western Europe we propose the American strain (authentic strain of *Xerochlorella olmiae*; see below) as reference strain of *X. minuta*.

The other species of *Xerochlorella*, *X. dichotoma*, was originally described from soils of Antarctica. Cultures were used for species description, but all strains were lost during transportation of the material from Antarctica to Australia (Ling and Seppelt 1998). We do not know other findings of this taxon next to the type locality. Our strain, identified as *X. dichotoma*, was isolated from maritime sand dunes, Germany (Table 1). Despite the fact the type locality of *X. dichotoma* is situated far away from the Baltic Sea, we assume that strains from both regions are representatives of the same species, and hence expect the same cosmopolitan biogeographical distribution as for *X. minuta*. But it is obvious that *X. dichotoma* is a rare species. Based on all this information we propose the here investigated strain as reference of *X. dichotoma*, taking into consideration its complete morphological similarity with the original species description (formation of large colonies surrounded by mucilage, pseudodichotomous branching of fragments of sporangial walls, typical morphology of single cells), close ecological characteristic (sand vs. sandy soils) and cosmopolitan distribution of the genus *Xerochlorella*.

Proposed taxonomic changes. *Xerochlorella* Fučíková, P.O. Lewis & L.A. Lewis (2014). *Phycological Research* 62:304, fig. 1, a–e. emend. Mikhailyuk & P.M. Tsarenko

Emended diagnosis: Cells solitary or in colonies surrounded by delicate mucilage envelopes. Cells ovoid to wide ellipsoid and almost spherical, thin-walled, uninucleate, connected to fragments of mother (sporangial) walls with their narrow ends (*Dictyosphaerium*-like morphology). Chloroplasts single, parietal, cup-shaped, with pyrenoid surrounded by several starch grains. Asexual reproduction via autospores. Autospores released by rupture of sporangial wall and further preservation of fragments with connected cells. Sexual reproduction not observed.

Type species: *Xerochlorella minuta* (J.B. Petersen) Mikhailyuk & P.M. Tsarenko comb. nova

Xerochlorella minuta (J.B. Petersen) Mikhailyuk & P.M. Tsarenko comb. nova (Figs. 5, a–g; 6, a–e; 7, a–d)

Basionym: *Dictyosphaerium minutum* J.B. Petersen (1932) *Bot. Tidskr.* 42:37, fig. 19.

Synonyms: *Chlorella umbelloidea* Tell, *Xerochlorella olmae* Fučíková, P.O. Lewis & L.A. Lewis, as “*olmae*” (according to Art. 60.8 of the ICN [Turland et al. 2018], the original spelling “*olmae*” is corrected to “*olmae*”).

Emended diagnosis: Cells solitary or in small 2-4-celled (sometimes to 16-celled) colonies surrounded by delicate mucilage envelope (2.1–5.0 µm thickness). Cells small, ovoid to wide ellipsoid and almost spherical, (4.3)5.0–6.7(7.5) × (2.5)4.3–6.0(7.0) µm, connected to semilunar or cruciform fragments of mother (sporangial) walls with their narrow ends. Chloroplasts single, parietal, cup-shaped, occupied half or 2/3 of cells inner surface, with pyrenoid surrounded by several (5–6) starch grains. Asexual reproduction via 2–4 autospores released by rupture of sporangial wall. Zoospore formation and sexual reproduction not observed.

Type locality: soil, beech copse, Hammer Bakker, Denmark.

Lectotype (designated here): fig. 19 in Petersen 1932.

Epitype (designated here): culture material of the strain UTEX B 2993 preserved as specimen CONN00178617 (Fučíková et al. 2014) that is supported by the lectotype.

Reference strain: UTEX B 2993

Comments: The reference strain completely corresponds to the diagnosis of *Dictyosphaerium minutum* (Petersen 1932). The species diagnosis was supplemented by the details of pyrenoid structure and refined dimensional ranges for cells. The reference strain was isolated from desert biological soil crust (Mojave National Preserve, San Bernardino Co., California, USA) and represented the authentic strain of *Xerochlorella olmae* (Fučíková et al. 2014). This habitat is ecologically similar, but geographically distant from the type locality (soil, Denmark). But since *Xerochlorella* species are widely distributed over the world, as was shown in the present study, and strain UTEX B 2993 is phylogenetically close to European strains, it is proposed as a reference strain.

Xerochlorella dichotoma (H.P. Ling & R.D. Seppelt) Mikhailyuk & P.M. Tsarenko comb. nova (Figs. 5, h–o; 6, f–k; 7, e–j)

Basionym: *Dictyosphaerium dichotomum* H.P. Ling & R.D. Seppelt (1998). *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 124 (Algol Stud. 89):57, figs. 13–17.

Emended diagnosis: Cells solitary or in large (2-4)-8-16-32-(64)-celled colonies surrounded by delicate mucilage envelope (2.1–3 µm thickness). Cells connected to semilunar or cruciform fragments of mother (sporangial) walls with their narrow ends. Subsequent cell divisions form pseudodichotomous branching. Cells small, ovoid to wide ellipsoid and almost spherical, (4.5)6.1–8.1(9.6) × (3.9)5.7–7.8 (8.6) µm. Chloroplasts single, parietal, cup-shaped,

occupied half or 2/3 of cells inner surface, with pyrenoid surrounded by several (5–6) starch grains. Asexual reproduction mostly via 2, occasionally via 4 autospores, released by rupture of sporangial wall. Zoospore formation and sexual reproduction not observed.

Type locality: sandy soil, Stevenson Cove, Casey, Antarctica.

Lectotype (designated here): figs. 13-17 in Ling & Seppelt (1998).

Epitype (designated here): preserved specimen 160223-7, fixed for TEM embedded material of the strain Hg-2-3 (SAG 2582) (Department of Botany, Innsbruck University). Additionally, KW-A-32502, preserved culture material of reference strain Hg-2-3 (SAG 2582), Algotheca, Herbarium of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine (KW).

Reference strain: Hg-2-3 was deposited in the Sammlung von Algenkulturen, University of Göttingen, Germany, under number SAG 2582.

Comments: The reference strain completely corresponds to the diagnosis of *Dictyosphaerium dichotomum* (Ling and Seppelt 1998). The species diagnosis was supplemented by the details of pyrenoid structure and refined dimensional ranges for cells and colonies. The strain was isolated from biological soil crusts on maritime sand dunes, coast of the Baltic Sea, Heiligendamm, Mecklenburg-Vorpommern, Germany. This habitat is ecologically similar, but geographically distant from the type locality (sandy soil, Antarctica). But since *Xerochlorella* species are widely distributed over the world, as was shown in the present study, the strain from Europe is proposed as reference.

Proposed nomenclatural changes for *Dictyosphaerium chlorelloides*. During this investigation some inaccuracy on the taxon *Dictyosphaerium chlorelloides* (= *Chlorella chlorelloides*) was detected. Taxonomic combination *D. chlorelloides* provided *Brachionococcus chlorelloides* as basionym, published by Naumann in 1919 with figures (holotype), belonging to the work from 1921 (Komárek and Perman 1978, p. 252). Naumann’s work was cited in this reference list as published in 1919. The same information was repeated in the paper that provided taxonomic combination of *Ch. chlorelloides*, without any notion of Naumann’s work in the reference list (Bock et al. 2011a). *Brachionococcus chlorelloides* is mentioned among Internet sources as taxon published in Naumann (1919) together with figures (<http://ucjeps.berkeley.edu/ina/>). However, investigation of the respective literature showed that Naumann’s paper was submitted in 1919, but in fact volume 16(2) of *Arkiv för Botanik* was published in February 1921. The errors in citation of the basionym do not preclude valid publication of new combinations (Art. 41.6 of the ICN; Turland et al. 2018). Therefore, this inaccuracy was corrected and all previous taxonomic combinations of *Brachionococcus chlorelloides* were kept (see below).

Chlorella chlorelloides (Naumann) C. Bock, Krienitz & Pröschold

Basionym: *Brachionococcus chlorelloides* Naumann (1921). *Ark. Bot.* 16(2):15, figs. 8–9.

Synonym: *Dictyosphaerium chlorelloides* (Naumann) Komárek and Perman (1978)

This study was supported by a Georg-Forster research fellowship from the Alexander von Humboldt Foundation (T.M.). The work has been funded by the DFG Priority Program 1374 “Infrastructure-Biodiversity-Exploratories” (subproject Crust-function-KA899/28-1, U.K.), by the Priority Program 1991 Taxonomics (GL 909/1-1, K.G.) and by the FWF grant I 1951-B16, A.H. The study was summarized during a stay of T.M. at the University of Innsbruck, Austria funded by a program to revise the culture collection of alpine algae (ASIB) at the Institute of Botany. We thank the managers of the three Biodiversity Exploratories, Martin Gorke, and all former managers for their work in maintaining the plot and project infrastructure, Christiane Fischer for giving support through the central office, Michael Owonibi for managing the central database, and Markus Fischer, Eduard Linsenmair, Dominik Hessenmöller, Daniel Prati, Ingo Schöning, François Buscot, Ernst-Detlef Schulze, Wolfgang W. Weisser, and the late Elisabeth Kalko for their role in setting up the Biodiversity Exploratories project. Fieldwork permits were issued by the responsible state environmental offices of Brandenburg (according to §72 BbgNatSchG). Our sincere thanks are extended to Sabrina Obwegeser and Beatrix Jungwirth, University of Innsbruck, Austria, for providing help in the TEM investigations. We are grateful to Sergei L. Mosyakin (M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine) for his valuable advices on nomenclatural issues and Dr. Maike Lorenz, University of Göttingen, for help during strain deposition to SAG.

- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Contr.* 19:716–23.
- Andreyeva, V. M. 1998. *Poczvennye i aerophilnye zelyonye vodorosli (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales)*. [Terrestrial and aerophilic green algae (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales)]. Nauka, St. Petersburg, 351 pp. (in Russian)
- Bock, C., Krienitz, L. & Pröschold, T. 2011a. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea* 11:293–312.
- Bock, C., Pröschold, T. & Krienitz, L. 2010. Two new *Dictyosphaerium*-morphotype lineages of the Chlorellaceae (Trebouxiophyceae): *Heynigia* gen. nov. and *Hindakia* gen. nov. *Eur. J. Phycol.* 45:267–77.
- Bock, C., Pröschold, T. & Krienitz, L. 2011b. Updating the genus *Dictyosphaerium* and description of *Mucidosphaerium* gen. nov. (Trebouxiophyceae) based on morphological and molecular data. *J. Phycol.* 47:638–52.
- Bohunická, M., Pietrasiak, N., Johansen, J. R., Gómez, E. B., Hauer, T., Gaysina, L. A. & Lukešová, A. 2015. *Roholtiella*, gen. nov. (Nostocales, Cyanobacteria) – a tapering and branching cyanobacteria of the family Nostocaceae. *Phytotaxa* 109:36–44.
- Borchhardt, N., Baum, C., Mikhailyuk, T. & Karsten, U. 2017a. Biological soil crusts of Arctic Svalbard – water availability as potential controlling factor for microalgal biodiversity. *Front. Microbiol.* 8:1485.
- Borchhardt, N., Schiefelbein, U., Abarca, N., Boy, J., Mikhailyuk, T., Sipman, H. J. M. & Karsten, U. 2017b. Diversity of algae and lichens in biological soil crusts of Ardley and King George Islands, Antarctica. *Antarct. Sci.* 29:229–37.
- Broadly, P. A. 1982. New records of chlorophycean micro-algae cultured from Antarctic terrestrial habitats. *Nova Hedwigia* 36:445–84.

- Büdel, B., Dulić, T., Darienko, T., Rybalka, N. & Friedl, T. 2016. Cyanobacteria and algae of biological soil crusts. In Weber, B., Büdel, B. & Belnap, J. [Eds.] *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. Springer, Berlin, pp. 55–80.
- Byun, Y. & Han, K. 2009. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. *Bioinformatics* 25:1435–7.
- Darienko, T., Gustavs, L., Eggert, A., Wolf, W. & Pröschold, T. 2015. Evaluating the species boundaries of green microalgae (*Coccomyxa*, Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. *PLoS ONE* 10:e0127838.
- Darienko, T., Gustavs, L. & Pröschold, T. 2016. Species concept and nomenclatural changes within the genera *Elliptochloris* and *Pseudochlorella* (Trebouxiophyceae) based on an integrative approach. *J. Phycol.* 52:1125–45.
- Darienko, T., Gustavs, L. & Pröschold, T. 2017. Toward a monograph of non-marine Ulvophyceae using an integrative approach (Molecular phylogeny and systematics of terrestrial Ulvophyceae II). *Phytotaxa* 324:1–41.
- Darienko, T., Kang, W., Orzechowski, A. K. & Pröschold, T. 2019. *Pleurostrosarcina terriformae*, a new species of a rare desert trebouxiophycean alga discovered by an integrative approach. *Extremophiles* 23:573–86.
- Darienko, T. & Pröschold, T. 2019. Reevaluation and discovery of new species of the rare genus *Watanabea* and establishment of *Massjukichlorella* gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using an integrative approach. *J. Phycol.* 55:493–9.
- De Clerck, O., Guiry, M. D., Leliaert, F., Samyn, Y. & Verbruggen, H. 2013. Algal taxonomy: a road to nowhere? *J. Phycol.* 49:215–25.
- Demchenko, E., Mikhailyuk, T., Coleman, A. W. & Pröschold, T. 2012. Generic and species concepts in *Microglena* (previously the *Chlamydomonas monadina* group) revised using an integrative approach. *Eur. J. Phycol.* 47:264–90.
- Ettl, H. & Gärtner, G. 2014. *Syllabus der Boden-, Luft und Flechtentalgen*, 2nd edn. Spektrum Akademischer Verlag, Munich, 773 pp.
- Friedl, T. & Rybalka, N. 2012. Systematics of the green algae: a brief introduction to the current status. *Prog. Bot.* 73:259–80.
- Fritsch, F. E. & John, R. P. 1942. An ecological and taxonomic study of the algae of British soils. II. Consideration of the species observed. *Ann. Bot.* 6:371–95.
- Fučíková, K., Lewis, P. O. & Lewis, L. A. 2014. Widespread desert affiliation of trebouxiophycean algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) including discovery of three new desert genera. *Phycol. Res.* 62:294–305.
- Glaser, K., Baumann, K., Leinweber, P., Mikhailyuk, T. & Karsten, U. 2018. Algal richness in BSCs in forests under different management intensity with some implications for P cycling. *Biogeosciences* 15:4181–92.
- Goff, L. J. & Moon, D. A. 1993. PCR amplification of nuclear and plastid genes from algal herbarium specimens and algal spores. *J. Phycol.* 29:381–4.
- Guiry, M. D. & Guiry, G. M. 2019. *AlgaeBase Worldwide Electronic Publication*. National University, Ireland, Galway <http://www.algaebase.org>.
- Hodač, L., Hallmann, C., Spitzer, K., Elster, J., Faßhauer, F., Brinkmann, N., Lepka, D., Diwan, V. & Friedl, T. 2016. Widespread green algae *Chlorella* and *Stichococcus* exhibit polar-temperate and tropical-temperate biogeography. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92:fiw122.
- Hoef-Emden, K. & Melkonian, M. 2003. Revision of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae): a combination of molecular phylogeny and morphology provides insights into a long-hidden dimorphism. *Protist* 154:371–409.
- Holzinger, A., Roleda, M. Y. & Lütz, C. 2009. The vegetative arctic green alga *Zygnema* is insensitive to experimental UV exposure. *Micron* 40:831–8.
- Katoh, K. & Standley, D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30:772–80.

- Komárek, J. & Fott, B. 1983. Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung: Chlorococcales. Das Phytoplankton des Süßwassers. In Huber-Pestalozzi, G. [Ed.] *Das Phytoplankton des Süßwassers (Die Binnengewässer)* XVI. E. Schweizerbart'sche Verlangsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart, 1044 pp.
- Komárek, J. & Perman, J. 1978. Review of the genus *Dictyosphaerium* (Chlorococcales). *Arch. Hydrobiol. Suppl. 51/Algal Stud.* 20:233–97.
- Krienitz, L., Bock, C., Dadheech, P. K. & Pröschold, T. 2011. Taxonomic reassessment of the genus *Mychonastes* (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species. *Phycologia* 50:89–106.
- Krienitz, L., Bock, C., Kotut, K. & Pröschold, T. 2012. Genotypic diversity of *Dictyosphaerium* morphotypes within Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) in African inland waters, including the description of four new genera. *Fottea* 12:231–53.
- Krienitz, L., Bock, C., Luo, W. & Pröschold, T. 2010. Polyphyletic origin of the *Dictyosphaerium* morphotype within Chlorellaceae (Trebouxiophyceae). *J. Phycol.* 46:559–63.
- Kryvenda, A., Rybalka, N., Wolf, M. & Friedl, T. 2018. Species distinctions among closely related strains of Eustigmatophyceae (Stramenopiles) emphasizing ITS2 sequence-structure data: *Eustigmatos* and *Vischeria*. *Eur. J. Phycol.* 53:471–91.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. [Eds.] *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115–75.
- Leliaert, F., Verbruggen, H., Vanormelingen, P., Steen, F., López-Bautista, J. M., Zuccarello, G. C. & De Clerck, O. 2014. DNA-based species delimitation in algae. *Eur. J. Phycol.* 49:179–96.
- Ling, H. U. & Seppelt, R. D. 1998. Non-marine algae and cyanobacteria of the Windmill Islands region, Antarctica, with descriptions of two new species. *Arch. Hydrobiol. Suppl. 124/Algal Stud.* 89:49–62.
- Marin, B., Klingberg, M. & Melkonian, M. 1998. Phylogenetic relationships among the Cryptophyta: analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences support the monophyly of extant plastid-containing lineages. *Protist* 149:265–76.
- Marin, B., Palm, A., Klingberg, M. & Melkonian, M. 2003. Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing Euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist* 154:99–145.
- Mikhailyuk, T. I. & Demchenko, E. N. 2005. Novye dlya flory i redkie vidy zelenykh vodorosley s granitnykh obnazheniy regionalnogo landshaftnogo parka "Granitno-Stepnoe Pobuzhie" (Nikolaevskaya obl., Ukraina) [New for the flora and rare species of green algae from granite outcrops of Regional Landscape Park "Granite-Steppe Pobuzhzhya" (Mykolaiv obl., Ukraine)]. *Bot. J.* 90:183–96.
- Mikhailyuk, T., Glaser, K., Tsarenko, P., Demchenko, E. & Karsten, U. 2019. Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast, in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria. *Eur. J. Phycol.* 54:263–90.
- Mikhailyuk, T. I., Kondratyuk, S. Y., Nyporko, S. O., Darienko, T. M., Demchenko, E. M. & Voytsekhovich, A. O. 2011. Lyshainyky, mokhy ta nazemni vodorosti granitnykh kanioniv Ukrainy [Lichen-forming fungi, bryophytes and terrestrial algae of granitic canyons of Ukraine]. Alterpress, Kyiv, 398 pp. (in Ukrainian).
- Mikhailyuk, T., Lukešová, A., Glaser, K., Holzinger, A., Obwegeser, S., Nyporko, S., Friedl, T. & Karsten, U. 2018. New taxa of streptophyte algae (Streptophyta) from terrestrial habitats revealed using an integrative approach. *Protist* 169:406–31.
- Naumann, E. 1921. Notizen zur Systematik der Süßwasseralgen. *Ark. Bot.* 16:1–19.
- Neustupa, J., Eliáš, M., Škaloud, P., Némcová, Y. & Šejnohová, L. 2011. *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga. *Phycologia* 50:57–66.
- Petersen, J. B. 1932. The algal vegetation of Hammer Bakker. *Bot. Tidskr. (Lund)* 42:1–48.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–4.
- Rybalka, N., Wolf, M., Andersen, R. A. & Friedl, T. 2013. Congruence of chloroplast- and nuclear-encoded DNA sequence variations used to assess species boundaries in the soil microalga *Heterococcus* (Stramenopiles, Xanthophyceae). *BMC Evol. Biol.* 13:39.
- Ryšánek, D., Hřčková, K. & Škaloud, P. 2015. Global ubiquity and local endemism of free living terrestrial protists: phylogeographic assessment of the streptophyte alga *Klebsormidium*. *Environ. Microbiol.* 17:689–98.
- Schulz, K., Mikhailyuk, T., Dreßler, M., Leinweber, P. & Karsten, U. 2016. Biological soil crusts from coastal dunes at the Baltic Sea: cyanobacterial and algal biodiversity and related soil properties. *Microb. Ecol.* 71:178–93.
- Sharma, N. K., Rai, A. K., Singh, S. & Brown, R. M. 2007. Airborne algae: their present status and relevance. *J. Phycol.* 43:615–27.
- Škaloud, P., Friedl, T., Hallmann, C., Beck, A. & Dal Grande, F. 2016. Taxonomic revision and species delimitation of coccoid green algae currently assigned to the genus *Dictyochloropsis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 52:599–617.
- Song, H., Wang, Q., Liu, X., Hu, Y., Long, J., Liu, G. & Hu, Z. 2018. Phylogenetic diversity and taxonomic problems of the *Dictyosphaerium* morphotype within the *Parachlorella* clade (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *J. Eukaryot. Microbiol.* 65:382–91.
- Starr, R. C. & Zeikus, J. A. 1993. UTEX the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 29 (Suppl):1–106.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725–9.
- Tell, G. 1973. Una nueva especie de Chlorophyceae pata la Argentina. *Physis (Buenos Aires), Secc B* 32:355–8.
- Tsarenko, P. M. 2011. Order Chlorellales. In Tsarenko, P. M., Wasser, S. P. & Nevo, E. [Eds.] *Algae of Ukraine: Diversity, Nomenclature, Taxonomy, Ecology and Geography*, Vol. 3. *Chlorophyta*, Gantner Verlag, Ruggell/Liechtenstein, pp. 61–89.
- Tsarenko, P. M. & John, D. 2011. Order Chlorellales. In John, D. M., Whitton, B. A. & Brook, A. J. [Eds.] *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 475–99.
- Turland, N. J., Wiersema, J. H., Barrie, F. R., Greuter, W., Hawksworth, D. L., Herendeen, P. S., Knapp, S. et al. 2018. *International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (Shenzhen Code) Regnum Vegetabile 159*. Koeltz Botanical Books, Glashütten, 254 pp.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Teylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenomics. In Innis, A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. [Eds.] *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, London, pp. 315–22.
- Zimmermann, J., Glöckner, G., Jahn, R., Enke, N. & Gemeinholzer, B. 2015. Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. *Mol. Ecol. Res.* 15:526–42.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31:3406–16.

3.1.3. Молекулярна філогенія та біологія наземних Xanthophyceae (Ochromphyta) з приморських піщаних місцезростань: роди *Xanthonema*, *Pleurochloris*, *Heterococcus*



Genotypic and phylogenetic diversity of new isolates of terrestrial Xanthophyceae (Stramenopiles) from maritime sandy habitats

NATALIYA RYBALKA ¹, TATIANA MIKHAILYUK ², TATYANA DARIENKO ¹, STEFAN DULTZ³, MATTHIAS BLANKE¹, AND THOMAS FRIEDL ¹

¹Experimental Phycology and Culture Collection of Algae (SAG), Albrecht-von-Haller-Institute for Plant Sciences, Georg August University Göttingen, Nikolausberger Weg 18, Göttingen, 37073, Germany

²M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereshchenkivska Str. 2, Kyiv, 01004, Ukraine

³Institute of Soil Science, Leibniz Universität Hannover, Herrenhäuser Str. 2, Hannover, 30419, Germany

ABSTRACT

Xanthophyceae (Stramenopiles) are common microalgae in soil habitats, but not commonly known from maritime sandy habitats. Here we studied the genetic diversity of nine new isolates of Xanthophyceae from coastal habitats using two chloroplast-encoded markers. The isolates exhibited only three morphotypes. The sequence comparisons uncovered a respectable phylogenetic diversity, including novel infraspecific genotypes, among the isolates. The phylogenetic analyses of full *rbcl* gene sequences identified eight of the isolates to five named species based on monophyletic origins and short genetic distances with defined taxonomic reference strains. One strain, representing a coccoid species, was within a so far unrecognised lineage of Xanthophyceae. In four clades of the *rbcl* phylogeny, the coastal isolates were most closely related to strains from Antarctic soil habitats. Comparisons of the *psbA/rbcl* spacer region sequences, a highly variable molecular marker, uncovered a fine-scale structuring within a species which was consistent with habitat preferences. The new maritime isolates exhibited genotypes distinct from those of the same species from other habitats. It suggests that the environment selects for specific genotypes in these pioneering algae.

ARTICLE HISTORY

Received 06 December 2019
Accepted 27 July 2020
Published online 03
September 2020

KEYWORDS

BSCs (Biological Soil Crusts);
Intraspecific genotypic
variation; Maritime sandy
habitat; Stramenopile algae;
Xanthophyceae

INTRODUCTION

Terrestrial eukaryotic algae are widely distributed at the air/substrate interfaces of various substrates with environmental conditions often challenging for colonisation (Hallmann *et al.* 2013, 2016; Rindi 2011). In the near-surface environment, terrestrial algae contribute considerably to various ecosystem processes as primary producers, mainly as the photoautotrophic drivers of biological soil crusts (Büdel *et al.* 2014). Soil biocrusts (BSCs *sensu* Rodriguez-Caballero *et al.* 2018; Weber *et al.* 2016) are an essential vegetation form worldwide and they are especially notable in arid regions where water availability limits vascular plant growth (Belnap *et al.* 2016). But in temperate areas with more humid conditions, e.g. Europe, biocrusts may have critical ecological functions as well (Büdel *et al.* 2014). Cyanobacteria and green algae dominate BSC algal communities. But diverse stramenopile algae, i.e. Xanthophyceae and diatoms, also inhabit soil biocrusts (Büdel *et al.* 2016). Those BSCs from colder climates such as high alpine regions (Peer *et al.* 2010; Reisinger 1964; Rippin *et al.* 2018a, 2018b) or Antarctic soils (Borchhardt *et al.* 2017; Broady 1976; Cavacini 2001) mostly have various filamentous and coccoid members of Xanthophyceae. Together with some other eukaryotic algae, the Xanthophyceae may belong to the least studied phototrophic component of biocrusts (Büdel *et al.* 2016). The class Xanthophyceae is a group of heterokont algae, phylum Heterokontophyta or Ochrophyta (van den

Hoek *et al.* 1995; Yoon *et al.* 2009). It forms an independent lineage within the Stramenopiles, i.e. the PX-clade within the SI clade of Yang *et al.* (2012). Although Xanthophyceae are a rather common group of terrestrial algae, their diversity and geographic distribution are still poorly known. Xanthophyceae in terrestrial ecosystems are assumed to function as important pioneers in near-surface soil environments that become freshly exposed to colonisation or disturbed by human activities (Ott *et al.* 2015). Previously, filamentous Xanthophyceae from various terrestrial soil surface environments in different geographic regions were the focus of DNA-sequence-based studies that provided a high taxonomic resolution at and below the species level (Rybalka *et al.* 2009, 2013).

Coastal sandy habitats are known for being highly dynamic aeolian landforms, but they are stable when wet, providing voids between the sand grains and surfaces for algal colonisation. Almost devoid of organic matter, the fine quartz-rich sand provides a substrate poor in nutrients. Most of the nutrients derive from seawater or groundwater withdrawals. The sandy habitat also provides environmental stresses by sharp fluctuations in pore water salinity, determined by groundwater discharge, occasional flooding, and sea spray (Martínez *et al.* 2004; Miller *et al.* 2009; Schulz *et al.* 2016). Coastal sandy habitats represent vulnerable ecosystems, which are being rapidly lost and degraded throughout the world

CONTACT Thomas Friedl  tfriedl@uni-goettingen.de

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

© 2020 International Phycological Society

(Martínez *et al.* 2013). Coastal dunes experience multiple natural as well as anthropogenic threats such as sea-level rise, storm surges, storms and hurricanes, invasive plants, artificial stabilisation, nitrogen deposition, human trampling, and vehicle activity (Martínez *et al.* 2013). BSCs are typical for many coastal dunes. In the sandy near-surface environment, terrestrial filamentous algae act as pioneers to stabilise dune blowouts (e.g. Schulz *et al.* 2016; Smith *et al.* 2004). Only recently, Schulz *et al.* (2016) provided the first information about the taxonomic composition of BSCs in coastal habitats, i.e. those of the Baltic Sea coast.

Xanthophytes in the studied coastal habitats represented two growth forms: filaments and coccoid unicells. Those simple growth forms may actually represent a still uncovered phylogenetic diversity. However, Schulz *et al.* (2016) recognised only morphospecies of Xanthophyceae by using identification keys based on morphological features (e.g. Ettl 1978; Ettl & Gärtner 2014). Yet, previous studies have already recovered the extensive plasticity of morphological traits in filamentous and coccoid Xanthophyceae, making them inadequate for distinguishing species (Maistro *et al.* 2007, 2009; Rybalka *et al.* 2009, 2013; Zuccarello & Lokhorst 2005). A recent study assessing phylogenetic diversity of algal isolates originating from coastal BSCs did not treat the Xanthophyceae (Mikhailyuk *et al.* 2019). Therefore, the goal of the current study was to examine the phylogenetic and species diversity of Xanthophyceae from sandy maritime habitats. We investigated the coastal isolates at a high taxonomic resolution for genetic differences with their counterparts of the same species originating from other terrestrial habitats.

MATERIAL AND METHODS

Culture and observation

The nine new isolates of Xanthophyceae studied here were isolated from biocrusts of maritime sandy habitats from five locations on the coast of the Baltic Sea, Germany, and one location on each of the coasts of the North Sea, Netherlands, and the Black Sea, Ukraine (Table 1, Figs S1–S8). The sites at the Baltic Sea, Rügen Island, were the same as those investigated previously (Schulz *et al.* 2016). Filamentous green algae or cyanobacteria dominated in the Baltic Sea and the Black Sea biocrusts. Samples from the North Sea site, i.e. the barrier island Schiermonnikoog, were from the same location as described by Kremer *et al.* (2008), i.e. in front of an artificial sand dike. In this area, flooding by seawater is occasional, resulting in a marked salinity. Groundwater discharge from the island aquifer provides constant water saturation and stabilises the fine sands against wind erosion. Vegetation emerges in a zone 200–400 m in front of the sand dike (Bakker *et al.* 2005). The procedure for isolating and maintaining the algae was as previously described (Rybalka *et al.* 2009). Briefly, air-dried biocrust material was re-wetted with water or liquid culture medium. Liquid medium with ampicillin (100 mg l⁻¹) and amphotericin B (2.5 mg l⁻¹) was applied to suppress growth of cyanobacteria. Algal colonies started from small pieces of biocrust (c. 2 × 2 mm) sprinkled onto Petri dishes containing agar and enriched with mineral

nutrients. The nine new coastal biocrust isolates are publicly available from the SAG culture collection (*Sammlung von Algenkulturen at Göttingen* University, Germany, www.epsag.uni-goettingen.de) with strain numbers listed in Table 1.

An Olympus BX60 microscope (Tokyo, Japan) with Nomarski DIC optics equipped with a ProgRes® C14^{Plus} digital camera (JENOPTIK Optical Systems, Jena, Germany) was used for microscopy of the cultured algae (see Figs 1–3). They were from cultures 3–4 weeks old.

Molecular marker analyses

Full-length sequences of the chloroplast-encoded *rbcl* gene and the *psbA/rbcl* spacer were amplified in one piece using a modification of the PCR approach of Andersen & Bailey (2002), i.e. with PCR primers and cycling parameters as described in Rybalka *et al.* (2009). The spacer lies upstream of the *rbcl* gene, i.e. between the *psbA* and *rbcl* genes. After purification with the MSB Spin PCRapace Kit (Stratagene, Berlin, Germany), sequencing of amplicons was performed with primers as described previously (Andersen & Bailey 2002; Rybalka *et al.* 2009, 2013). Sequencing reactions were separated using an Applied Biosystems 3500 Genetic Analyser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Assembling sequences into contigs was done with the SeqAssem software (Hepperle 2004). Newly determined sequences are available from DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession numbers MK792446 – MK792452, and MK804166 – MK804170. In course of this study, several reference sequences for coccoid Xanthophyceae were also established under accession numbers MK909754 – MK909757, MK909573, and MK909574.

For calculating phylogenies, the newly determined full *rbcl* sequences, extracted with the editor AliView (Larsson 2014), were added to a dataset comprising full-length *rbcl* sequences representing all major clades of Xanthophyceae (Maistro *et al.* 2009). Alignment was performed with the online version of MAFFT v7 (Katoh *et al.* 2017), with manual refinements in AliView. Two sequences from Phaeophyceae (Stramenopiles), i.e. *Fucus vesiculosus* Linnaeus NC016735 and *Ectocarpus* sp. AY372978, were employed as the outgroup. The final dataset used for phylogenetic analyses comprised of 83 *rbcl* gene sequences was 1341 nucleotides long and had 524/453 variable/parsimony informative sites. The maximum likelihood (ML) phylogeny in Fig. 4 was the basis for discussion of phylogenetic relationships of the new isolates. Phylogeny was inferred with the ML approach using IQ-TREE (Nguyen *et al.* 2015) with branch support assessed from standard nonparametric bootstrap (500 replicates). Additional branch support was assessed with the ultrafast bootstrap approximation (2000 replicates; Hoang *et al.* 2017) implemented in IQ-TREE. The GTR + F + I + G4 model was selected by IQ-TREE to describe the best substitution pattern. Additional support for internal nodes was assessed with the ML approach using RAXML v8.2.12 (Stamatakis 2014), as available from CIPRES Science Gateway (Miller *et al.* 2010), and minimum evolution distance approach (ME; Zhetsky & Nei 1992) using MEGA X (Kumar *et al.* 2018; Stecher *et al.* 2020). In RAXML

Table 1. The nine new coastal Xanthophyceae isolates, marked by an asterisk (*) and their closest relatives, their morphotype, species identification, strain number, habitat, and geographic origin.

Morphotype	Species	strain	Habitat	Geographic Origin
filamentous, unbranched	<i>Xanthonema exile</i>	SAG 2573*	sand dune	Baltic Sea, Rügen Island, Baabe (Germany; 54.3625 N, 13.715833 E)
		SAG 2578*	sand dune	Baltic Sea, Riedensee (Germany; 54.142778 N, 11.668889 E)
		SAG 2286 ^e	lagoon mudflat	Baltic Sea, Rügen Island, Vitter Bodden (Germany; 54.56629 N, 13.126545 E)
	<i>X. bristolianum</i>	SAG 2185	soil surface	Antarctica, Prinzess Elizabeth Land, Vestfold Hills (68.575107 S, 77.97843 E)
		SAG 2186	soil surface	Antarctica, Ross Island, Cape Bird (77.52474 S, 166.960313 E)
		SAG 2570*	sand dune	Baltic Sea, Rügen Island, Baabe (Germany; 54.3625 N, 13.715833 E)
		SAG 2285 ^e	snow detritus	High Tatra mountains (Slovakia; 49.2666 N, 20.250199 E)
		CCAP 836/5	terrestrial	Switzerland (?)
		SAG 2180	soil surface	Rivne (Ukraine; 50.620281 N, 26.251087 E)
		SAG 2576	soil surface	Holosiivskiy National Park, Kyiv (Ukraine; 50.390542 N, 30.507408 E)
<i>X. mucicola</i>	SAG 2577	soil surface	Mühlhausen (Germany; 51.130242 N, 10.381150 E)	
	SAG 2579	soil surface	Tractemyriv landscape park, Kyiv (Ukraine; 49.924444 N, 31.336389 E)	
	SAG 2568*	slack dune	North Sea, Schiermonnikoog Island (The Netherlands; 53.4859 N, 6.1356 E)	
	SAG 60.94	soil surface	Potsdam, Güterfelde (Germany; 52.364280 N, 13.185689 E)	
	CCALA 518	freshwater	Baltic Sea, Darss peninsula, forest ditch (Germany)	
	SAG 2192	soil surface	Antarctica, King Georg Island (62.168908 S, 58.463538 W)	
	SAG 2194	soil surface	Antarctica, Southern Victoria Land (76.184995 S, 157.133787 E)	
	A14	snow detritus	Alps, Antelao glacier (Italy; 46.463889 N, 12.273611 E)	
pseudofilamentous, sarcinoid	<i>Heterococcus leptosiroides</i>	SAG 2572*	sand dune	Baltic Sea, Darss peninsula, Prerow (Germany; 54.459722 N, 12.541667 E)
coccoid, unicellular	<i>Pleurochloris meiringensis</i>	SAG 2420 ^e	soil surface	Antarctica, Gneiss Point (77.399095 S, 163.745499 E)
		SAG 2571*	sand dune	Baltic Sea, Rügen Island, Glowe (Germany; 54.570000 N, 13.458056 E)
		SAG 2574*	sand dune	Black Sea, Danube Biosphere Reserve (Ukraine; 45.491530 N, 29.624146 E)
		SAG 2575*	sand dune	Baltic Sea, Rügen Island, Prora (Germany, 54.475278 N, 13.572778 E)
		SAG 860–3 ^a	rock surface	Alps, Aare Valley (Switzerland; 46.721329 N, 8.1817284 E)
		SAG 813–1	soil surface	Alps, Stabelchod (Switzerland; 46.659018 N, 10.238201 E)
	unidentified xanthophyte	SAG 2569	slack dune	North Sea, Schiermonnikoog Island (The Netherlands; 53.4859 N, 6.1356 E)
	SAG 5.90	soil surface	Antarctica, Cape Bird, Ross Island (77.530240 S, 166.990356 E)	

^eepitype strain; ^aauthentic strain

runs, rapid bootstrap analysis used 450 replicates. For the ME distance approach, the GTR+G + I model best described the substitution pattern, and bootstrap approximation was assessed using 1000 replications in MEGA X. Phylogenies and bootstrap support on internal nodes were visualised using the ITOL online tool (Letunic & Bork 2019). The highly variable *psbA/rbcL* spacer sequences were aligned using MAFFT v7 (Kato et al. 2017) with manual refinements using the sequence editor BioEdit v7.2.6 (Hall 1999) and in PAUP* 4.0a167 (Swofford 2003). Variable sites in the spacer alignment (Fig. 5) were visualised using PAUP* 4.0a167.

RESULTS

Microscopic observation

The nine new xanthophyte isolates from sandy coastal habitats exhibited three morphotypes (Figs 1–3, Table 1). Unbranched filaments with cylindrical vegetative cells and bipartite cell walls, which yielded H-shaped pieces, were the characteristic features shared by four isolates (Table 1). Their filaments readily disintegrated into shorter filaments or unicells. The features defined the strains as members of the morpho-genus *Xanthonema* (Fig. 1). Sarcinoid or pseudofilamentous arrangement of vegetative cells, as typical for

Heterococcus Chodat, characterised one more isolate (Fig. 2, Table 1). Unicellular coccoid vegetative cells of spherical shape defined four more isolates (Table 1). A mucilage envelope which varied in thickness depending on the age of the culture surrounded those cells (Fig. 3). No clear assignment to a morpho-genus of coccoid Xanthophyceae was possible for the four isolates. Three strains frequently produced zoospores (SAG 2571, SAG 2574, and SAG 2575), but not strain SAG 2569 under the same culture conditions. Thus, the latter coccoid isolate presumably represented a species different from the former isolates.

Phylogenetic position and species identification

Phylogenetic analyses assigned the three morphotypes to five independent clades in the Xanthophyceae *rbcL* gene phylogeny (Fig. 4). Strains of the morpho-genus *Xanthonema* P.C.Silva belonged to two independent well-supported clades, *Xanthonema* and *Xanthonema 2* (Fig. 4). These clades correspond to two separate genera. In phylogenetic analyses, the morpho-genus *Xanthonema* is split into three independent clades, out of which only the *Xanthonema* clade represents the genus because it includes the epitype strain of the type species, *X. exile* (Klebs) P.C.



Figs 1-3. The three morphotypes of new isolates of Xanthophyceae from maritime sandy habitats. Scales = 10 μ m.

Fig. 1. Unbranched filaments of *Xanthonema bristolianum* strain SAG 2570.

Fig. 2. Sarcinoid pseudofilaments of *Heterococcus leptosiroides* strain SAG 2572.

Fig. 3. Coccoid unicells of *Pleurochloris meiringensis* strain SAG 2574. Note thin envelope of mucilage surrounding cells, two autosporangia in the left half of the image.

Silva SAG 2286 (Rybalka *et al.* 2009). Strain SAG 2181, positioned between the *Xanthonema* and *Xanthonema* 2 clades in the phylogenetic analyses (Fig. 4), is a member of the *Xanthonema* 3 clade of Rybalka *et al.* (2009). The coccoid strains were also in two clades distant from each other. The one clade represented *Pleurochloris meiringensis* Vischer because it included the authentic strain of *P. meiringensis* SAG 860-3 (Fig. 4), and clade monophyly was well supported. The other coccoid isolate, strain SAG 2569; however, shared a monophyletic origin with strain SAG 5.90 assigned to *Chlorellidium tetrabotrys* Vischer & Pascher (Fig. 4). The new isolate of the morphology typical for *Heterococcus* Chodat, strain SAG 2572, was placed into a clade representing strains and species of *Heterococcus*. It shared a sister-group relationship with the clade of coccoid xanthophytes that included *Chlorellidium* strains which, however, received only insignificant bootstrap support (Fig. 4).

The presence of short internal branch lengths in the *rbcL* phylogeny of the new isolates with defined reference strains, congruent with the highly supported monophyly of isolates and references, provided species identifications for the coastal isolates. The monophyletic origin of the two strains, SAG 2573 and SAG 2578, with epitype strain SAG 2286, identified the former as *Xanthonema exile* (Fig. 4, Table 1). Both strains shared full *rbcL* gene sequences (1467 nucleotides long) that were identical to the epitype strain except for a single position. The coastal isolate SAG 2570 was in another monophyletic clade that included epitype strain SAG 2285 which represents *X. bristolianum* (Pascher) P.C.Silva. (Fig. 4, Table 1). The coastal isolate had its full *rbcL* gene sequence identical with that of the epitype strain. Therefore, it was identified as that species. The coastal isolate SAG 2568 shared a monophyletic origin with reference strain SAG 60.94 *X. mucicola* within *Xanthonema* 2, and this was identified as a new isolate of the same species (Fig. 4). The coastal isolate shared a full *rbcL* gene sequence identical to the reference strain except for

two positions. The name '*X. mucicola*' has previously been suggested for the latter strain, to replace the invalid combination *Heterothrix mucicola* Ettl. However, the combination *X. mucicola* has not been formally described (Rybalka *et al.* 2009). We refer to the new coastal isolate as *X. mucicola*. Interestingly, the so-far unidentified strain A14 of Tartari & Forlani (2008) shared an identical *rbcL* sequence with reference strain SAG 60.94 over its entire length. Therefore, it is identified as *X. mucicola* (Table 1). Because its available sequence (accession number AJ874708) is only partial, it has not been included in the phylogenetic analyses here. Within the *Heterococcus* clade, monophyletic origin of coastal isolate SAG 2572 with authentic strain SAG 2420 of *H. leptosiroides* Pitschmann was well supported (Fig. 4). Therefore, the isolate was identified as *H. leptosiroides*. The three new coccoid isolates, strains SAG 2571, SAG 2574, and SAG 2575, with identical *rbcL* sequences, shared a highly supported monophyletic origin with authentic strain SAG 860-3 of *P. meiringensis* (Fig. 4). Consequently, species identity of the three coastal isolates is *P. meiringensis*. There were no more than nine *rbcL* sequence differences with the authentic strain. The other coccoid isolate, SAG 2569, was the only coastal isolate which had no well supported monophyletic origin with a defined reference strain. Its closest relative, strain SAG 5.90 (Fig. 4), has been assigned to *C. tetrabotrys* Vischer & Pascher based only on morphology. However, both strains were separated by a relatively large internal branch length from authentic strain SAG 811-1 of *C. tetrabotrys* (Fig. 4). The common origin of those three strains received only low support (Fig. 4); consequently, neither strain represents *C. tetrabotrys*, and are still unidentified.

Intraspecific structuring

rbcL phylogeny resolved closer relationships of the new coastal isolates to strains that originated from other habitats. Remarkably, in four clades the closest relatives to the coastal isolates were strains isolated from Antarctic soil habitats (Fig. 4, Table 1). In

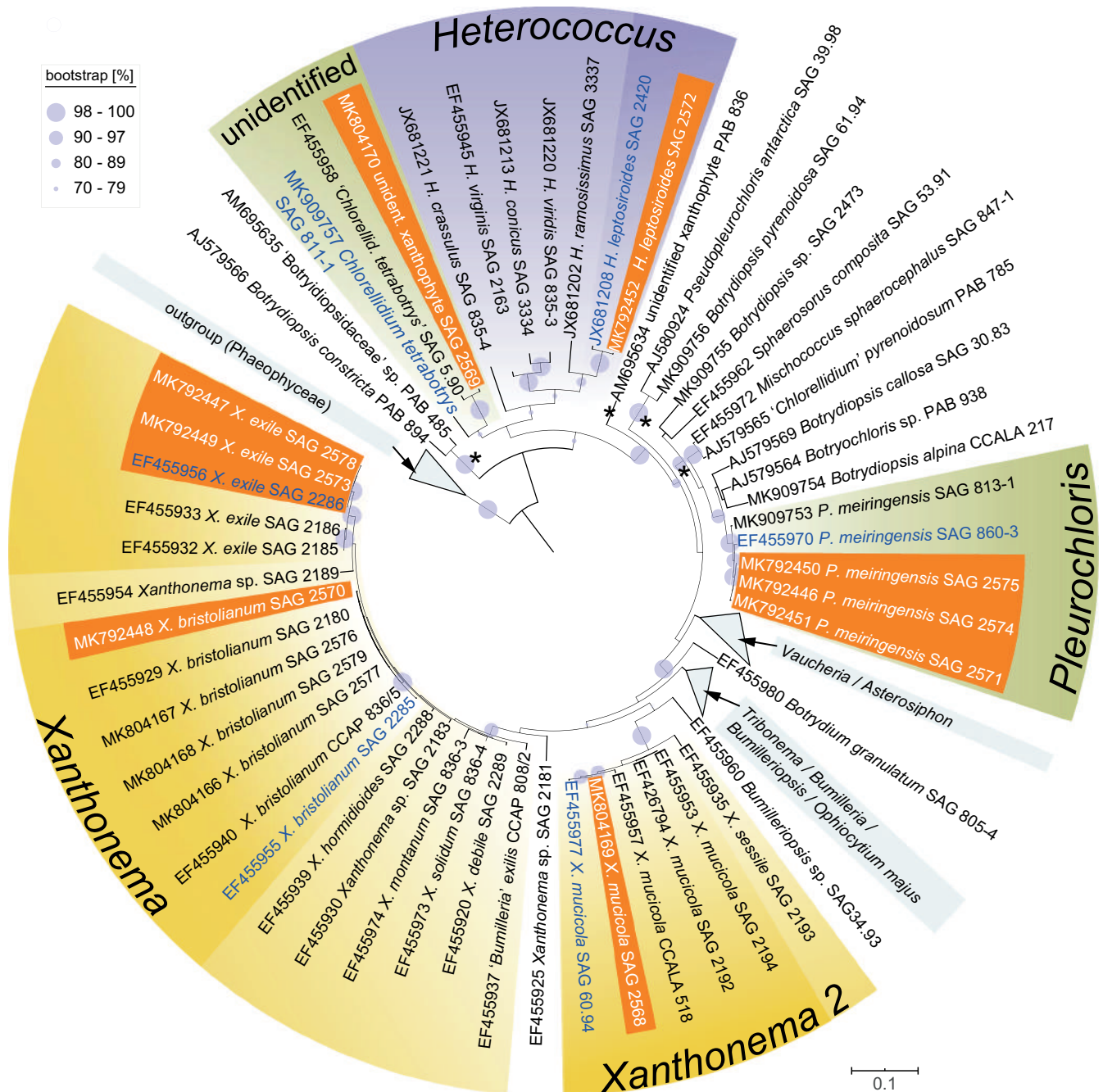


Fig. 4. Maximum-likelihood phylogeny of full *rbcL* gene sequences from the nine new coastal isolates and other members of Xanthophyceae. An orange background marks strains of maritime origins. Highlighted phylogenetic clades are those which encompass the new isolates, their closest relatives, and their closest taxonomic reference strains (marked in blue letters). Different coloured clades indicate different morphotypes, i.e. filamentous unbranched (yellow-brown), pseudofilamentous-sarcinoid (violet), and coccoid unicellular (green). A background of darker colour marks strains that belong to the same species within the clades; they represent five named species. Asterisks (*) indicate the independent origins of coccoid Xanthophyceae. Collapsed into triangles are those clades of Xanthophyceae to which the new coastal isolates are not closely related. Taxa represented by triangles are listed in Table S1.

Xanthonema, closest relatives of the three *X. exile* strains from coastal habitats was a pair of *X. exile* strains that originated from ice-free soil surfaces in Antarctica. In *Xanthonema 2*, i.e. within *X. mucicola*, the coastal isolate also had a pair of strains originating from Antarctica as closest relatives (Fig. 4, Table 1). Also, in *Heterococcus* the coastal isolate of *H. leptosiroides* and a strain from Antarctic soil surface were closest relatives. Finally, also in

the coccoid strains' clade with *Chlorellidium*, the coastal isolate had a strain from a soil surface in Antarctica as its closest relative (Fig. 4, Table 1). In contrast, the new coastal isolates of *X. bristolianum*, *X. mucicola*, and *P. meiringensis* were closest relatives of strains originating from habitats of temperate regions, i.e. soil or rock surfaces, snow detritus, and a coastal freshwater habitat in Central Europe (Fig. 4, Table 1). To further investigate

<i>X. exile</i>			<i>X. mucicola</i>		
	111222	33		11111122	22 222222234
	134456	579012	34	24555699	23 4556667882
strain	682339	865906	81	066789938	817967156 48 9260498341

SAG 2578	ACCCGG-----GTAGAG--CG	(385)		SAG 2568	ATTCGAGT(i26)CGG-GAAGC-----CA--TTAGTTATT (491)
SAG 2573	(385)		SAG 2192	.A...T.C-----T..AA.-ACAATTCAATAGTTTAA.A...A.C (476)
*SAG 2286	(385)		SAG 2194	.A...T.C-----T..AA.-ACAATTCAATAGTTTAA.A...A.C (476)
SAG 2185	GTTTAA(i64)ACGTCAAGTA	(451)		*SAG 60.94	..CGAA... (126) ...A...C----- (492)
SAG 2186	GTTTAA(i64)ACGTCAAGTA	(451)		CCALA 518	C.....AC-----TAAA.G.ATATTCGATGGT--..GAAGGAA. (475)
<i>X. bristolianum</i>			<i>H. leptosiroides</i>		
	12344		111	11111	
	35323		9000	14889	
strain	09816		2128	32280	

SAG 2570	GAAAA	(450)	SAG 2572	AGTA--TCCCA	(275)
SAG 2576	.T..	(449)	*SAG 2420	GAGGAAGTGA-	(276)
SAG 2579	.T.-	(449)			
SAG 2577	.T..	(450)			
SAG 2180	.T..	(450)			
CCAP 836/5	.T.C..	(450)			
*SAG 2285	CT.-C	(449)			
			<i>P. meiringensis</i>		
				1111111111222222222233333334444444446	
				800111223479112334445682455678801235555683	
strain				167689013416051940472028274642652564567585	

SAG 2571	T--CAAAACTTACAGTTTTAGGGAAACGCCAGACGAGCAGCC	(702)			
SAG 2574	(702)			
SAG 2575	(702)			
SAG 813-1	C-...C.T..GAGAG..GG.A.G..TAGTC..GAGA.CAT.	(702)			
*SAG 860-3	CCTTTTTC-AAAGGTACGGCGCA-GTGCTCATGGGGTAGCT	(630P)			

Fig. 5. Comparisons of the highly variable *psbA/rbcL* spacers of the five species of Xanthophyceae to which the new coastal isolates were assigned. Only differences from the first sequence, which is from a coastal isolate, are shown. Numbers above the first sequence indicate the positions of the differences ordered to the un-gapped first sequence. Strains from coastal habitats are on a grey background, those from Antarctic soils on a blue background. Boxed are strains from temperate soils. Asterisks (*) mark taxonomic reference strains. Numbers in parentheses () are spacer lengths. P, 3'-partial sequence.

the relationships of the new coastal isolates at higher resolution, comparisons of the highly variable *psbA/rbcL* spacer sequences were employed. Though the coastal isolates' spacer aligned well with those of strains from other habitats, they were also clearly distinct from them (Fig. 5, Table 1). In *X. exile*, *X. mucicola* and *H. leptosiroides* the spacer comparisons confirmed that the coastal strains had their next closest relatives from Antarctica (Fig. 5). Moreover, sequence comparisons discerned groups of strains with identical spacer sequences which were related to habitats. In both *P. meiringensis* and *X. exile* the coastal habitat strains exhibited identical spacers (Fig. 5). *X. exile* and *X. mucicola*, there was a pair of strains from Antarctic soil surfaces with identical spacers. In *X. bristolianum* there was a group of four strains with identical spacers that originated from soil surfaces in Central Europe (Fig. 5). Remarkably, those groups of identical sequences were independent of geographic distance. The coastal habitat strains were from locations as distant as the Baltic Sea and the Black Sea coast (Table 1, Fig. S8). The Antarctic strains originated from localities over 6000 km apart and separated by a large ice shield. The Central European soil surface strains originated from various locations across Europe corresponding to a geographic distance of about 2500 km (Fig. S8).

DISCUSSION

Studies of terrestrial algae do not commonly link the Xanthophyceae to maritime environments. In this study, however, new culture isolates of terrestrial xanthophytes from sandy habitats along the coasts of Central Europe, i.e. the Baltic Sea, the barrier island Schiermonnikoog in the North Sea, and a site at the Black Sea coast, were studied. Already, a relatively small selection of just nine xanthophycean strains from coastal habitats exhibited a respectable phylogenetic diversity, including novel infraspecific genotypes. Previous culture-based studies of environmental material may have

overlooked xanthophytes or mistaken them for green algae due to their similar colour (Ott *et al.* 2015). Examples may be the xanthophyte strains SAG 2568 and SAG 2569 from the barrier island Schiermonnikoog. Previous studies employing various methods have focused on microbial mats on the beaches of Schiermonnikoog (Bolhuis *et al.* 2013; Dijkman *et al.* 2010; Kremer *et al.* 2008). However, no microscopic xanthophycean algae other than species of *Vaucheria* forming macroscopic aggregations were reported (e.g. *V. birostris* J.Simons; Simons 1974). Additional culture efforts are needed to re-evaluate habitat preferences and distribution patterns of xanthophytes. Culture-independent deep sequencing using markers capable of resolving species should complement the culture efforts (e.g. ITS2 rDNA; Rybalka *et al.* 2013). There are only a few culture-independent studies for the Xanthophyceae; none of them identified distinct species but identified the group as a whole because the markers used were not variable enough (Beraldi-Campesi *et al.* 2012; Lawley *et al.* 2004; Simon *et al.* 2015). In the Xanthophyceae, an adaptation to maritime habitats may be more common than has been assumed. Previously, strain A14 of *X. mucicola*, isolated from an alpine snowfield, had considerable tolerance to higher salt (NaCl; Tartari & Forlani 2008). The new coastal isolate *X. mucicola* SAG 2568 was a close relative of the former strain. Investigations into ecophysiology of Xanthophyceae and other terrestrial microalgae are essential for better understanding of microalgal distributional patterns, but they have been almost entirely lacking for Xanthophyceae.

Our *psbA/rbcL* spacer sequence comparisons uncovered a fine-scale infraspecific structuring (within a species) consistent with habitat preferences. The new xanthophyte isolates from maritime habitats in five species had genotypes distinct from those of the same species from other habitats (Fig. 5, Table 1). We suggest that the particular (harsh) environment selects for specific genotypes of the pioneering algae that can cope with the

particular conditions of coastal habitats. Instability of the sandy substrate, exposure to strong UV radiation, desiccation by wind at the substrate surface, rapidly fluctuating osmotic effects of salt spray, and submergence in seawater or rainwater, certainly provide challenging conditions for algal life in those maritime habitats. Adaptation to such conditions, combined with rather simple morphology, may also facilitate successful dispersal of live xanthophyte cells over long distances, e.g. by wind currents with cells attached (glued) to sand grains. This explains the same genotype occurring across vast distances (Fig. 5, Fig. S8). In a previous study, four strains of an unidentified *Xanthonema* species originating from Antarctica (SAG 2183, SAG 2184, SAG2190, and SAG 2191) shared almost identical *psbA/rbcL* spacers (except for a single nucleotide position), with strain CCAP 808/3 from an Alaskan snowfield (Rybalka et al. 2009). Here we report three more examples of identical *psbA/rbcL* spacers in widely disjunct Xanthophyceae, i.e. for *Pleurochloris meiringensis* and *Xanthonema bristolianum* in Europe, as well as *X. exile* and *X. mucicola* in Antarctica (Table 1, Fig. S8). Thus, even a vast distance over an extended ice plain was not a significant dispersal barrier for these xanthophytes. Environmental conditions may determine the genotypic fine-scale structuring of pioneering terrestrial xanthophytes in the absence of significant dispersal limits.

For species identification, the highly variable *psbA/rbcL* spacer sequences provided much resolution where the *rbcL* phylogenetic analyses supported the close relationships among xanthophyte strains (Rybalka et al. 2009). Spacers of coastal strains aligned well with the corresponding sequences of defined taxonomic reference strains (Fig. 5). This substantiated species assignment for eight of the nine new isolates to five species of Xanthophyceae (Fig. 5, Table 1). However, there was no significant alignment possible between the spacers of the coccoid coastal isolate SAG 2569 and its closest relative, strain SAG 5.90. Following the molecular phylogenetic species concept as outlined in Rybalka et al. (2009), both strains cannot represent the same species. They remain unnamed because the next closest taxonomic reference, authentic strain *C. tetrabotrys* SAG 811-1, was not even close to the former two in the *rbcL* phylogeny (Fig. 4). Likely, both strains represent two species of coccoid Xanthophyceae which have not been formally described. To provide meaningful species and generic taxonomic descriptions, other coccoid Xanthophyceae have to be assessed for their phylogenetic positions, but this is beyond the scope of our study. Presently, phylogenetic analyses resolve four major clades of independent origins for coccoid xanthophytes (Fig. 4; Maistro et al. 2009). For example, coccoid forms exhibiting a *Botrydiopsis*-like morphology, and thus assigned to *Botrydiopsis*, represent an assemblage of unrelated strains. The phylogenetic analyses distributed them over five lineages which likely represent distinct genera (Fig. 4). A clarification of the taxonomy of coccoid Xanthophyceae with newly defined genera and species is urgently needed.

To conclude, our findings support the view that Xanthophyceae in terrestrial habitats (e.g. soil surfaces) may be phylogenetically more diverse and also more commonly distributed than previously assumed. Xanthophyceae may serve as pioneering colonisers that help to stabilise initial and still dynamic terrestrial habitats. They can adapt to a broader range of adverse terrestrial habitats, including

those with a maritime influence. Ecological conditions mean essential drivers of species diversification in these microalgae.

ACKNOWLEDGEMENTS

TM acknowledges the *Alexander von Humboldt Foundation* for financial support (Georg-Forster research fellowship at the University of Rostock) and Ulf Karsten for provision of laboratory facilities and his support of collecting samples from the Baltic Sea coast. We thank Maïke Lorenz for provision of well-curated algal strains from the SAG culture collection and accession of the new Xanthophyte isolates. Henrike Ledel and Hella Timmermann are acknowledged for the purification of Xanthophyceae strains, and Gabriele Curdt-Hollmann for assistance in sequencing strains of Xanthophyceae. We thank Ladislav Hodač for provision of an isolate of *Xanthonema* from soil, and the Culture Collection of Algae and Cyanobacteria at the Institute of Botany, Třeboň, Czech Republic, for provision of strain CCALA 518.

FUNDING

This work has been funded by the German Science Foundation (DFG) Priority Program 1991 ‘Taxon-OMICS’ (Project RY 173/1-1, extended to NR).

ORCID

Nataliya Rybalka  <http://orcid.org/0000-0002-3250-3679>
 Tatiana Mikhailyuk  <http://orcid.org/0000-0002-7769-2848>
 Tatyana Darienko  <http://orcid.org/0000-0002-1957-0076>
 Thomas Friedl  <http://orcid.org/0000-0002-4070-776X>

REFERENCES

- Andersen R.A. & Bailey J.C. 2002. Phylogenetic analysis of 32 strains of *Vaucheria* (Xanthophyceae) using the *rbcL* gene and its two flanking spacer regions. *Journal of Phycology* 38: 583–592. DOI: [10.1046/j.1529-8817.2002.t01-1-01144.x](https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.t01-1-01144.x).
- Bakker J.P., Veeneklaas R.M., Jansen A. & Samwel A. 2005. A new green beach on Schiermonnikoog. *De Levende Natuur* 106: 151–155. [in Dutch].
- Belnap J., Weber B. & Büdel B. 2016. Biological soil crusts as an organizing principle in drylands. In: *Biological soil crusts: an organizing principle in drylands* (Ed. by B. Weber, B. Büdel & J. Belnap), pp. 3–13. Springer, Cham, Switzerland. DOI: [10.1007/978-3-319-30214-0_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-30214-0_1).
- Beraldi-Campesi H., Arenas-Abad C., Garcia-Pichel F., Arellano-Aguilar O., Auqué L., Vázquez-Urbez M., Sancho C., Osácar C. & Ruiz-Velasco S. 2012. Benthic bacterial diversity from freshwater tufas of the Iberian Range (Spain). *FEMS Microbiology Ecology* 80: 363–379. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2012.01303.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01303.x).
- Bolhuis H., Fillinger L. & Stal L.J. 2013. Coastal microbial mat diversity along a natural salinity gradient. *PLOS One* 8: e63166. DOI: [10.1371/journal.pone.0063166](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063166).
- Borchhardt N., Schiefelbein U., Abarca N., Boy J., Mikhailyuk T., Sipman H.J.M. & Karsten U. 2017. Diversity of algae and lichens in biological soil crusts of Ardley and King George Islands, Antarctica. *Antarctic Science* 29: 229–237. DOI: [10.1017/S0954102016000638](https://doi.org/10.1017/S0954102016000638).
- Broady P.A. 1976. Six new species of terrestrial algae from Signy Island, South Orkney Islands, Antarctica. *British Phycological Journal* 11: 387–405. DOI: [10.1080/00071617600650451](https://doi.org/10.1080/00071617600650451).
- Büdel B., Colesie C., Green T.G.A., Grube M., Lázaro Suau R., Loewen-Schneider K., Maier S., Peer T., Pintado A., Raggio J. et al. 2014. Improved appreciation of the functioning and importance of biological soil crusts in Europe: the Soil Crust International Project (SCIN). *Biodiversity and Conservation* 23: 1639–1658. DOI: [10.1007/s10531-014-0645-2](https://doi.org/10.1007/s10531-014-0645-2).
- Büdel B., Dulić T., Darienko T., Rybalka N. & Friedl T. 2016. Cyanobacteria and algae of biological soil crusts. In: *Biological soil crusts: an organizing principle in drylands* (Ed. by B. Weber, B. Büdel

- & J. Belnap), pp. 55–80. Springer International Publishing, Cham, Switzerland. DOI: [10.1007/978-3-319-30214-0_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-30214-0_4).
- Cavacini P. 2001. Soil algae from northern Victoria Land (Antarctica). *Polar Bioscience* 14: 45–60.
- Dijkman N.A., Boschker H.T.S., Stal L.J. & Kromkamp J.C. 2010. Composition and heterogeneity of the microbial community in a coastal microbial mat as revealed by the analysis of pigments and phospholipid-derived fatty acids. *Journal of Sea Research* 63: 62–70. DOI: [10.1016/j.seares.2009.10.002](https://doi.org/10.1016/j.seares.2009.10.002).
- Ettl H. 1978. Bd. 03: xanthophyceae. 1. Teil/Part 1. In: *Süßwasserflora von Mitteleuropa* (Ed. by H. Ettl, J. Gerloff & H. Heynig), pp. 530. Springer Spektrum, Stuttgart, Germany. ISBN 978-3-8274-2137-1.
- Ettl H. & Gärtner G. 2014. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. 2. Auflage*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg. DOI: [10.1007/978-3-642-39462-1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39462-1).
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hallmann C., Hoppert M., Mudimu O. & Friedl T. 2016. Biodiversity of green algae covering artificial hard substrate surfaces in a suburban environment: a case study using molecular approaches. *Journal of Phycology* 52: 732–744. DOI: [10.1111/jpy.12437](https://doi.org/10.1111/jpy.12437).
- Hallmann C., Stanek L., Fritzl D., Hause-Reitner D., Friedl T. & Hoppert M. 2013. Molecular diversity of phototrophic biofilms on building stone. *FEMS Microbiology Ecology* 84: 355–372. DOI: [10.1111/1574-6941.12065](https://doi.org/10.1111/1574-6941.12065).
- Hepperle D. 2004. SeqAssem. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. Distributed by the author at <http://www.sequentix.de/>.
- Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q. & Vinh L.S. 2017. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution* 35: 518–522. DOI: [10.1093/molbev/msx281](https://doi.org/10.1093/molbev/msx281).
- Katoh K., Rozewicki J. & Yamada K.D. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20: 1160–1166. DOI: [10.1093/bib/bbx108](https://doi.org/10.1093/bib/bbx108).
- Kremer B., Kazmierczak J. & Stal L.J. 2008. Calcium carbonate precipitation in cyanobacterial mats from sandy tidal flats of the North Sea. *Geobiology* 6: 46–56. DOI: [10.1111/j.1472-4669.2007.00128.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2007.00128.x).
- Kumar S., Stecher G., Li M., Nkay C. & Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547–1549. DOI: [10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096).
- Larsson A. 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30: 3276–3278. DOI: [10.1093/bioinformatics/btu531](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531).
- Lawley B., Ripley S., Bridge P. & Convey P. 2004. Molecular analysis of geographic patterns of eukaryotic diversity in Antarctic soils. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5963–5972. DOI: [10.1128/AEM.70.10.5963-5972.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5963-5972.2004).
- Letunic I. & Bork P. 2019. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research* 47: W256–W259. DOI: [10.1093/nar/gkz239](https://doi.org/10.1093/nar/gkz239).
- Maistro S., Broady P.A., Andreoli C. & Negrisol E. 2007. Molecular phylogeny and evolution of the order Tribonematales (Heterokontophyta, Xanthophyceae) based on analysis of plastidial genes *rbcL* and *psaA*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 407–417. DOI: [10.1016/j.ympev.2007.02.014](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.02.014).
- Maistro S., Broady P.A., Andreoli C. & Negrisol E. 2009. Phylogeny and taxonomy of Xanthophyceae (Stramenopiles, Chromalveolata). *Protist* 160: 412–426. DOI: [10.1016/j.protis.2009.02.002](https://doi.org/10.1016/j.protis.2009.02.002).
- Martínez M.L., Hesp P.A. & Gallego-Fernández J.B. 2013. Coastal dune restoration: trends and perspectives. In: *Restoration of coastal dunes* (Ed. by M.L. Martínez, J.B. Gallego-Fernández & P.A. Hesp), pp. 323–339. Springer, Berlin, Germany. DOI: [10.1007/978-3-642-33445-0_20](https://doi.org/10.1007/978-3-642-33445-0_20).
- Martínez M.L., Psuty N.P. & Lubke R.A. 2004. A perspective on coastal dunes. In: *Coastal dunes: ecology and conservation* (Ed. by M. L. Martínez & N.P. Psuty), pp. 3–10. Springer, Berlin, Germany. DOI: [10.1007/978-3-540-74002-5_1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-74002-5_1).
- Mikhailyuk T., Glaser K., Tsarenko P., Demchenko E. & Karsten U. 2019. Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria. *European Journal of Phycology* 54: 263–290. DOI: [10.1080/09670262.2018.1557257](https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1557257).
- Miller M.A., Pfeiffer W. & Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. 1–8. DOI: [10.1109/GCE.2010.5676129](https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129).
- Miller T.E., Gornish E.S. & Buckley H.L. 2009. Climate and coastal dune vegetation: disturbance, recovery, and succession. *Plant Ecology* 206: 97. DOI: [10.1007/s11258-009-9626-z](https://doi.org/10.1007/s11258-009-9626-z).
- Nguyen L.-T., Schmidt H.A., von Haeseler A. & Minh B.Q. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32: 268–274. DOI: [10.1093/molbev/msu300](https://doi.org/10.1093/molbev/msu300).
- Ott D.W., Oldham-Ott C.K., Rybalka N. & Friedl T. 2015. Chapter 11 - Xanthophyte, eustigmatophyte, and raphidophyte algae. In: *Freshwater algae of North America*, 2nd ed. (Ed. by J.D. Wehr, R. G. Sheath & J.P. Kociolek), pp. 485–536. Academic Press, Boston, Massachusetts, USA. DOI: [10.1016/B978-0-12-385876-4.00011-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385876-4.00011-6).
- Peer T., Türk R., Gruber J.P. & Tschaikner A. 2010. Species composition and pedological characteristics of biological soil crusts in a high alpine ecosystem, Hohe Tauern, Austria. *eco.mont* 2: 23–30. DOI: [10.1553/eco.mont-2-1s23](https://doi.org/10.1553/eco.mont-2-1s23).
- Reisigl H. 1964. Zur Systematik und Ökologie alpiner Bodenalgeln. *Österreichische Botanische Zeitschrift* 111: 402–499. DOI: [10.1007/bf01372910](https://doi.org/10.1007/bf01372910).
- Rindi F. 2011. Terrestrial green algae: systematics, biogeography and expected responses to climate change. In: *Climate change, ecology and systematics* (Ed. by J.A.N. Parnell, M.B. Jones, S. Waldren & T. R. Hodgkinson), pp. 201–228. Cambridge University Press, Cambridge, UK. DOI: [10.1017/CBO9780511974540.010](https://doi.org/10.1017/CBO9780511974540.010).
- Rippin M., Borchhardt N., Williams L., Colesie C., Jung P., Büdel B., Karsten U. & Becker B. 2018a. Genus richness of microalgae and cyanobacteria in biological soil crusts from Svalbard and Livingston Island: morphological versus molecular approaches. *Polar Biology* 41: 909–923. DOI: [10.1007/s00300-018-2252-2](https://doi.org/10.1007/s00300-018-2252-2).
- Rippin M., Lange S., Sausen N. & Becker B. 2018b. Biodiversity of biological soil crusts from the polar regions revealed by metabarcoding. *FEMS Microbiology Ecology* 94: fty036–fty036. DOI: [10.1093/femsec/fty036](https://doi.org/10.1093/femsec/fty036).
- Rodríguez-Caballero E., Belnap J., Büdel B., Crutzen P.J., Andreae M.O., Pöschl U. & Weber B. 2018. Dryland photoautotrophic soil surface communities endangered by global change. *Nature Geoscience* 11: 185–189. DOI: [10.1038/s41561-018-0072-1](https://doi.org/10.1038/s41561-018-0072-1).
- Rybalka N., Andersen R.A., Kostikov I., Mohr K.I., Massalski A., Olech M. & Friedl T. 2009. Testing for endemism, genotypic diversity and species concepts in Antarctic terrestrial microalgae of the Tribonemataceae (Stramenopiles, Xanthophyceae). *Environmental Microbiology* 11: 554–565. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2008.01787.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01787.x).
- Rybalka N., Wolf M., Andersen R.A. & Friedl T. 2013. Congruence of chloroplast- and nuclear-encoded DNA sequence variations used to assess species boundaries in the soil microalga *Heterococcus* (Stramenopiles, Xanthophyceae). *BMC Evolutionary Biology* 13: 39. DOI: [10.1186/1471-2148-13-39](https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-39).
- Rzhetsky A. & Nei M. 1992. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Molecular Biology and Evolution* 9: 945. DOI: [10.1093/oxfordjournals.molbev.a040771](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040771).
- Schulz K., Mikhailyuk T., Drefßler M., Leinweber P. & Karsten U. 2016. Biological soil crusts from coastal dunes at the Baltic Sea: cyanobacterial and algal biodiversity and related soil properties. *Microbial Ecology* 71: 178–193. DOI: [10.1007/s00248-015-0691-7](https://doi.org/10.1007/s00248-015-0691-7).
- Simon M., Jardillier L., Deschamps P., Moreira D., Restoux G., Bertolino P. & López-García P. 2015. Complex communities of small protists and unexpected occurrence of typical marine lineages in sDOIw freshwater systems. *Environmental Microbiology* 17: 3610–3627. DOI: [10.1111/1462-2920.12591](https://doi.org/10.1111/1462-2920.12591).

- Simons J. 1974. *Vaucheria birostris* n.sp. and some further remarks on the genus *Vaucheria* in the Netherlands. *Acta Botanica Neerlandica* 23: 399–413. DOI: [10.1111/j.1438-8677.1974.tb00958.x](https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1974.tb00958.x).
- Smith S.M., Abed R.M.M. & Garcia-Pichel F. 2004. Biological soil crusts of sand dunes in Cape Cod National Seashore, Massachusetts, USA. *Microbial Ecology* 48: 200–208. DOI: [10.1007/s00248-004-0254-9](https://doi.org/10.1007/s00248-004-0254-9).
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312–1313. DOI: [10.1093/bioinformatics/btu033](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033).
- Stecher G., Tamura K. & Kumar S. 2020. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution* 37: 1237–1239. DOI: [10.1093/molbev/msz312](https://doi.org/10.1093/molbev/msz312).
- Swofford D.L. 2003. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Tartari A. & Forlani G. 2008. Osmotic adjustments in a psychrophilic alga, *Xanthonema* sp. (Xanthophyceae). *Environmental and Experimental Botany* 63: 342–350. DOI: [10.1016/j.envexpbot.2007.11.009](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.11.009).
- van den Hoek C., Mann D.G. & Jahns H.M. 1995. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. DOI: [10.1017/S0025315400030794](https://doi.org/10.1017/S0025315400030794).
- Weber B., Büdel B. & Belnap J. (eds.). 2016. *Biological soil crusts: an organizing principle in drylands*. Springer, Cham, Switzerland. DOI: [10.1007/978-3-319-30214-0](https://doi.org/10.1007/978-3-319-30214-0).
- Yang E.C., Boo G.H., Kim H.J., Cho S.M., Boo S.M., Andersen R.A. & Yoon H.S. 2012. Supermatrix data highlight the phylogenetic relationships of photosynthetic Stramenopiles. *Protist* 163: 217–231. DOI: [10.1016/j.protis.2011.08.001](https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.08.001).
- Yoon H.S., Andersen R.A., Boo S.M. & Bhattacharya D. 2009. Stramenopiles. In: *Encyclopedia of microbiology*, 3rd ed. (Ed. by M. Schaechter), pp. 721–731. Academic Press, Oxford, UK. DOI: [10.1016/B978-012373944-5.00253-4](https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00253-4).
- Zuccarello G.C. & Lokhorst G.M. 2005. Molecular phylogeny of the genus *Tribonema* (Xanthophyceae) using *rbcL* gene sequence data: monophyly of morphologically simple algal species. *Phycologia* 44: 384–392. DOI: [10.2216/0031-8884\(2005\)44\[384:MPOTGT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2216/0031-8884(2005)44[384:MPOTGT]2.0.CO;2).

3.2. Рідкісні ціанобактерії в біокірочках: філогенія, таксономія, екологія

3.2.1. Нові види з родів *Cyanocohniella*, *Aliterella* та *Oculatella* (Cyanobacteria)



SHIFTING BOUNDARIES: ECOLOGICAL AND GEOGRAPHICAL RANGE EXTENSION BASED ON THREE NEW SPECIES IN THE CYANOBACTERIAL GENERA *CYANOCOHNIELLA*, *OCULATELLA*, AND *ALITERELLA*¹

Patrick Jung ²

University of Applied Sciences Kaiserslautern, Carl-Schurz-Str. 10-16, 66953 Pirmasens, Germany

Tatiana Mikhailyuk

G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereshchenkivska Str. 2, Kyiv 01004, Ukraine

Dina Emrich

Faculty of Environment and Natural Resources, Chair of Applied Vegetation Ecology, University of Freiburg, Tennenbacher Str. 4, 79106 Freiburg, Germany

Karen Baumann

Faculty of Agricultural and Environmental Science, University of Rostock, Soil Science, Justus-von-Liebig-Weg 6, 18051 Rostock, Germany

Stefan Dultz

Institute of Soil Science, Leibniz Universität Hannover, Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover, Germany

and Burkhard Büdel

Plant Ecology and Systematics, University of Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Str. 13, 67663 Kaiserslautern, Germany

The polyphasic approach has been widely applied in cyanobacterial taxonomy, which frequently led to additions to the species inventory. Increasing our knowledge about species and the habitats they were isolated from enables new insights into the ecology of newly established genera and species allowing speculations about the ecological niche of taxa. Here, we are describing three new species belonging to three genera that broadens the ecological amplitude and the geographical range of each of the three genera. *Cyanocohniella crotaloides* sp. nov. is described from sandy beach mats of the temperate island Schiermonnikoog, Netherlands, *Oculatella crustae-formantes* sp. nov. was isolated from biological soil crusts of the Arctic Spitsbergen, Norway, and *Aliterella chasmolithica* originated from granitic stones of the arid Atacama Desert, Chile. All three species could be separated from related species using molecular sequencing of the 16S rRNA gene and 16S–23S ITS gene region, the resulting secondary structures as well as p-distance analyses of the 16S–23S ITS and various microscopic techniques. The novel taxa described in

this study contribute to a better understanding of the diversity of the genera *Cyanocohniella*, *Oculatella*, and *Aliterella* in different habitats.

Key index words: 16-23S ITS; Atacama Desert; polyphasic approach; Schiermonnikoog; Spitsbergen

Abbreviations: a.s.l, above sea level

Cyanobacteria are considered the most ancient and ecologically important group of oxygenic photosynthetic microorganisms that has significantly influenced the history of the Earth (Whitton 2012). Nevertheless, their taxonomic resolution has been historically challenging due to taxonomically uninformative characteristics and the nescience about their ecological niche. For example, the sole use of micromorphological features obtained by microscopy as applied in the past is currently considered insufficient for the definition of genera and species (Taton et al. 2003, Komárek 2006, Engene et al. 2010). Instead, phylogenies based on the 16S rRNA gene and 16S–23S ITS region, including secondary structures, are currently widely used for generic definitions as they are more reliable (Komárek et al. 2014). Recently, the p-distances between aligned ITS sequences were used as additional evidence for species recognition and this has been so far

¹Received 23 August 2019. Accepted 28 March 2020. Published Online 27 June 2020, Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

²Author for correspondence: e-mail patrick_jung90@web.de.

Editorial Responsibility: J. Collier (Associate Editor)

consistent with recognition of near-cryptic to cryptic taxa (e.g., Shalygin et al. 2019, Vázquez-Martínez et al. 2018, González-Resendiz et al. 2019). Therefore, cyanobacterial taxonomy is now combining molecular, ecological, and morphological data, thus forming the so-called ‘polyphasic approach’ (Johansen and Casamatta 2005). This approach has widely been established leading to an extensive revision of the classification system during the last decade (Komárek et al. 2014).

In 2012, for example, based on phylogenetic and morphological evidences, Zammit et al. (2012) separated the genus *Oculatella* from the filamentous, non-heterocytous genus *Leptolyngbya*, one of the morphologically most poorly defined genera due to their faintly differentiated trichome morphology. The morphotype of the genus *Oculatella* was first reported in 1988 by Albertano and Grilli-Caiola and later described as *Leptolyngbya* ‘Albertano/Kováčik-red’ (Komárek and Anagnostidis 2005). This seems surprising since the *Leptolyngbya* isolate is actually unique compared to other *Leptolyngbya* species, based on the rhodopsin-like reddish inclusion at the tip of mature apical cells (Albertano et al. 2000), a feature that has now become the main characteristic of the whole genus *Oculatella* (Zammit et al. 2012). Only a few other species within the genus *Oculatella* have been described since the first description (Osorio-Santos et al. 2014, Vinogradova et al. 2017).

The type species *Oculatella subterranea* has been reported from caves in the Mediterranean region, including Italy, Spain, Malta, and Israel (Albertano and Grilli Caiola 1988, Zammit et al. 2008a,b, 2011, 2012, Martinez and Asencio 2010, Osorio-Santos et al. 2014). Subsequent species were described from arid soils in Greece, the Atacama Desert, and the Mojave Desert (*O. neakameniensis*, *O. atacamensis*, *O. mojaviensis*, *O. coburnii*), a waterfall in Utah (*O. cataractarum*), a German lake (*O. hafneriensis*; see Osorio-Santos et al. 2014 for these species), a sea cave in Kauai (*O. kauaiensis*; Miscoe et al. 2016), and maritime sand dunes (*O. kazantipica*, *O. ucrainica*; Vinogradova et al. 2017). The wide variety of habitats leads to the question of the ecological range of the genus *Oculatella*.

A comparable situation is found in the recently established genus *Cyanocohniella* within the family of the filamentous and heterocytous *Aphanizomenonaceae* with *C. calida* as the only species (Kaštovský et al. 2014). This species was isolated already in 1863 from thermal springs of Karlovy Vary (Carlsbad), Czech Republic, and was initially described as *Mastigocladus laminosus* f. *nostocoides*. Later, the strain got lost and was re-isolated and finally described as *C. calida* (Kaštovský et al. 2014). Due to its origin from thermal water >55°C, the species and potentially the whole genus was considered thermophilic (Kaštovský et al. 2014). Interestingly, the species shows one of the most complex life

cycles known for cyanobacteria, ranging from a *Pseudanabaena/Leptolyngbya*-like stage over a *Nostoc*-like stage to a *Chlorogloeopsis*-like stage causing problems during microscopic investigations of environmental samples.

In contrast to morphologically distinct heterocytous cyanobacteria, coccoid unicellular species such as the recently established genus *Aliterella* lack even more morphological characters (Rigonato et al. 2016). This genus comprises the three aquatic species *A. atlantica*, isolated from the water column of the Atlantic close to south-east Brazil, *A. antarctica*, found in a green turf alga from coastal Antarctica (Rigonato et al. 2016), and finally *A. shaanxiensis* isolated from water samples of a freshwater inland lake in Shaanxi, China (Zhang et al. 2018).

Trying to determine whether a cyanobacterial species is strictly assigned to a specific habitat and/or geographical range is part of understanding its ecology. However, in the past this could only be questionably achieved for a specific species as it was possible that it might also be found in a completely different geographic location or habitat which just had not been investigated yet. Recently, the supposed endemicity for originally geographically isolated species such as the Antarctic species *Wilmottia murrayi* (Strunecký et al. 2011) has been challenged based on sequences of the genus with high 16S rRNA genetic identities (99–100%) from China, USA, Spain, Bolivia, New Zealand, and Ireland (Pessi et al. 2018). In contrast, for other species such as *Kastovskya adunca* (Mühlsteinová et al. 2014) from soils of the Atacama Desert the concept of endemicity and even substrate specificity can still be applied.

Aiming for a better understanding of the three cyanobacterial genera *Aliterella* (unicellular, aquatic), *Oculatella* (filamentous, non-heterocytous, mostly terrestrial or subaerial habitats), and *Cyanocohniella* (filamentous, heterocytous, thermophilic), the present study reports and describes a new species for each of the three genera, extending their ecological and geographical range. Using molecular sequencing of the 16S rRNA gene and 16S–23S ITS gene region, the resulting secondary structures and p-distance analyses of the 16S–23S ITS as well as various microscopic techniques, we describe three new species: *Aliterella chasmolithica* sp. nov. from chasmolithic biofilms of the Atacama Desert, *Cyanocohniella crotaloides* sp. nov. from algal mats occurring in front of the dune dyke at the North Sea barrier island Schiermonnikoog and *Oculatella crustaeformantes* sp. nov. from biological soil crusts from the Arctic Spitsbergen.

MATERIALS AND METHODS

Sampling sites. Spitsbergen: Soil samples of the top centimeter were taken by Laura Briegel-Williams during August 2014 at Arctic Spitsbergen (Fig. 1A) within an area called Geopol

(78°56'58.38" N, 11°28'35.64" E) where polygon formation dominates skeletal soils. The biome is polar tundra with 4.5°C as the average temperature and 471 mm average precipitation occurring mainly from October to May when the snow cover is complete (based on data from the Norwegian Meteorological Institute). High coverage rates of cryptogams dominated by cyanobacteria were reported for this location (Williams et al. 2017) with *Leptolyngbya antarctica*, *Microcoleus vaginatus*, and several *Nostoc* species as well as the *Oculatella* strain PJ S28 (Jung et al. 2019a) described here.

Barrier Island Schiermonnikoog. Samples were collected in May 2018 at mats from the lowest part of the supratidal to the upper part of the intertidal zone of the sandy beaches (53°28'23.62" N, 6°8'32.47" E) of the North Sea barrier island Schiermonnikoog (Fig. 1B). The beach has a typical hydrological zonation with an upper saline plume, terrestrial groundwater discharge from the island aquifer, and a saltwater wedge (Robinson et al. 2007). The climate can be described as warm temperate with 8.6°C as the mean average temperature and 806 mm average precipitation (based on Climate-Data.org). The sandy tidal sediments located at the north-western part of the island are well-sorted grains between 100 and 200 μm diameter and consists mainly of quartz, feldspars, heavy minerals, and <1% carbonates arising from seashells; they are infested by microbial mats that cover an area of more than 7 km² (Kremer et al. 2008). Among the ephemeral seasonal microbial community, phototrophic organisms such as *Coleofasciculus chtonoplastes*, *Leptolyngbya aestuarii*, *Spirulina* sp., *Phormidium* sp., and several *Nodularia* species were found to be the most dominant organisms (Bauersachs et al. 2011). The mats are influenced by seawater during high tide as well as by rain, storms, floods, upwelling freshwater, and ice covers. They sporadically lead to the destruction of the microbial mats that form throughout the year.

Atacama Desert. The National Park Pan de Azúcar is situated in the northern part of the Atacama Desert, Chile (Fig. 1C), and represents a fog oasis. The climate can be considered as arid with 16.2°C as the mean average temperature and 14.7 mm of mean average precipitation (Baumann et al. 2018) with fog and dew as the main regular water sources (Lehnert et al. 2018). The samples were taken in July 2017, 15 km away from the coast (26°06'39.62" S, 70°32'54.51" W) where no vegetation was observed as described in Jung et al. (2019b). From this area, only a few cyanobacteria such as *Kastovskya adunca*, *Pleurocapsa minor*, *Chroococciopsis* sp., *Pseudophormidium* sp., *Nostoc* sp., and others have been reported to appear in the desert soil or aridisol and as hypolithic and chasmoendolithic biofilms attached to exposed granitic and quartz boulders (Jung et al. 2019b). The chasmoendolithic *Aliterella* strain PJ S15 discussed here was isolated from granite boulders (Jung et al. 2019b).

Culture conditions. The three strains *Cyanocohniella* sp. PJ S45, *Oculatella* sp. PJ S28, and *Aliterella* sp. PJ S15 were isolated by the procedure described in detail by Jung et al. (2019a). In short, solidified Bold's Basal Medium (BBM; Bischof and Bold 1963) was used for enrichment cultures which were incubated in a culture cabinet at 15–17°C under a light:dark regime of 14:10 h at a light intensity of about 20–50 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ for at least 4 weeks as described in Langhans et al. (2009). The cultures were inspected several times a week for the appearance of cyanobacteria and colonies were transferred with a sterile metal needle to BG11 medium agar plates (Stanier et al. 1971). This was repeated until unialgal cultures were achieved. Subcultures were generated by further serial transfers under sterile conditions to exclude contamination with other cyanobacteria, green algae, or fungi until unialgal isolates could be established.

Morphological characterization. The morphology of the three isolates was checked weekly using light microscopy with oil

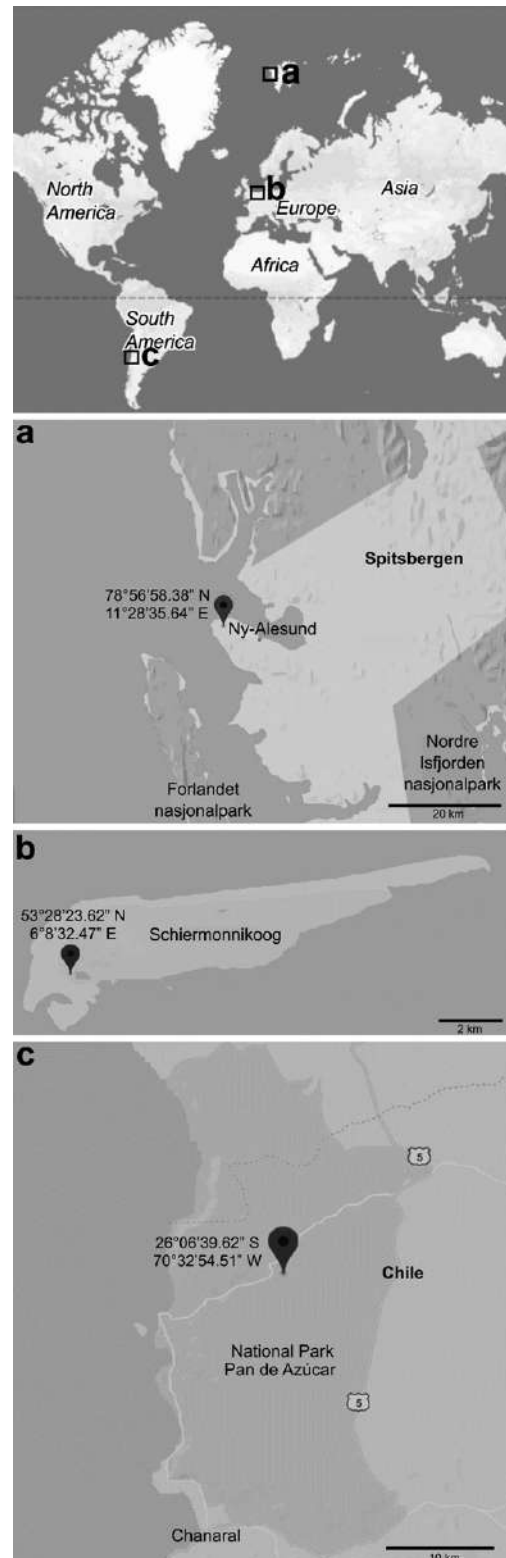


FIG. 1. Overview map of sampling sites. (a) Geopol at Spitsbergen in the Arctic. (b) the Dutch North Sea with barrier island Schiermonnikoog. (c) National Park Pan de Azúcar within the Atacama Desert of Chile. Maps were created using snazzy maps.com.

immersion and a 630-fold magnification (Axioskop; Carl Zeiss) and AxioVision software (Carl Zeiss).

Fifty images were taken from each strain and trichome diameters as well as the length and widths of the cells were measured for 100 cells with ImageJ 1.47v. In the case of *Cyanocohniella* sp., cell sizes are given for the *Nostoc*-like stage because this represents the dominant growth form of the strain. The percentage of apical cells with a red tip from *Oculatella* sp. PJ S28 was determined using presence or absence of a red tip.

In addition, confocal laser scanning microscopy (CLSM) was applied to investigate the position of the thylakoids. For this, small portions of the isolates were transferred to a drop of water on an objective slide before inspected with a CLSM microscope (LSM 700; Carl Zeiss). The CLSM was equipped with diode lasers and photomultiplier parameters were adjusted to achieve the maximum signal from the autofluorescence using beams of 639 nm wavelengths, oil immersion, and a 630-fold magnification. Emitted wavelengths were collected using a band-pass filter 530/30. Cyanobacterial natural fluorescence was collected using a 590-nm-long pass filter. Stack series comprising 30 single images with a distance of 1 μ m were scanned through the samples of the cross sections and their maximum projection was converted into 2-D pictures using ImageJ 1.47v software.

DNA extraction, amplification, and sequencing. Genomic DNA of each strain was extracted from unialgal cultures as described by Jung et al. (2019b). Nucleotide sequences of the 16S rRNA gene together with the 16S–23S ITS region (1,700–2,300 bases) were amplified as described by Marin et al. (2005) using the primers SSU-4-forw and ptLSU C-D-rev. The PCR products were cleaned using the NucleSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) following the DNA and PCR clean up protocol. The cleaned PCR products were sent to Seq-It GmbH & Co. KG (Pfaffplatz 10, 67655 Kaiserslautern, Germany) for Sanger sequencing with the primers SSU-4-for, Wil 6, Wil 12, Wil 14, Wil 5, Wil 9, Wil 16, and ptLSU C-D-rev (Wilmotte et al. 1993, Marin et al. 2005, Mikhailyuk et al. 2016). The generated sequences were assembled and manually edited where appropriate using the software Mega X (version 10.0.5; Kumar et al. 2018). The sequences were submitted at NCBI GenBank and can be found under the accession numbers MN243147 (*Oculatella crustae-formantes* PJ S28), MN243143 (*Cyanocohniella crotaloides* PJ S45), and MN243145 (*Aliterella chasmolithica* PJ S15).

Molecular characterization. The sequences were BLASTed against the GenBank database in order to find the most similar sequences which were subsequently incorporated into each alignment. One alignment for each strain with *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 as root was prepared applying the ClustalW algorithm for all alignments in Mega X. Finally, 110 nucleotide sequences for the phylogenetic comparison of *Oculatella* sp. PJ S28 (1,164 bp), 52 for *Cyanocohniella* sp. PJ S45 (1,264 bp), and 54 for *Aliterella* sp. PJ S15 (1,285 bp) were used. Ambiguous regions within each alignment were adjusted or removed manually allowing smaller final blocks and gap positions within the final blocks. The evolutionary model that was best suited to the used database was selected on the basis of the lowest AIC value and calculated in Mega X. Phylogenetic trees were constructed with Mega X using the evolutionary model GTR+G+I model of nucleotide substitutions for the alignment which was previously determined as best model calculated by Mega X for each alignment. The Maximum Likelihood method (ML) with 1,000 bootstrap replications was calculated for each alignment with Mega X as well as Bayesian phylogenetic analyses with two runs of eight Markov chains were executed for one million generations with default parameters with Mr. Bayes 3.2.1 (Ronquist and Huelsenbeck 2003).

In some cases, the 16S phylogeny of cyanobacteria can appear ambiguous for differentiating species, which was recently demonstrated for, for example, the genus *Desertifilum* (González-Resendiz et al. 2019). As an additional concept, percent dissimilarity among aligned 16S–23S ITS regions was displayed by calculating $100 \times$ uncorrected p-distance in Mega X (Erwin and Thacker 2008, Shalygin et al. 2019, González-Resendiz et al. 2019). The idea behind that is to have a discontinuity between percent dissimilarity of populations in the same species (average \sim 1.0% or less, all pair-wise comparisons $<$ 3% dissimilarity) and populations representing separate species ($>$ 7% dissimilarity; González-Resendiz et al. 2019). When differences are between 3% and 7%, the cut-off is not clear and a decision can be based on the other criteria such as 16S phylogeny or morphology.

Models of the secondary structure of 16S–23S ITS region of *Oculatella* sp. PJ S28 (D1-D1', Box-B, V2, and V3 helices), *Cyanocohniella* sp. PJ S45 (D1-D1', Box-B, and V3 helices), and *Aliterella* sp. PJ S15 (D1-D1' and Box-B helices) in comparison with several known species were built according to the models proposed in respective papers (Osorio-Santos et al. 2014, Kaštovský et al. 2014, Vinogradova et al. 2017, Zhang et al. 2018). Helices were folded with the online software Mfold (Zuker 2003) and visualized in the online tool PseudoViewer (Byun and Han 2009).

Toxin characterization. Extracted genomic DNA of the three strains was used to test potential ability of the cyanobacteria to synthesize microcystin and nodularin. The primer pair HEPF/R targeting the *mcyE/ndaF* gene was used (Jungblut and Neilan 2006) as described by Gehringer et al. 2012.

Strains, herbarium specimens, and accession numbers. The three cyanobacterial strains were deposited at the German Collection for Microorganisms and Cell Cultures DSMZ Braunschweig, Germany, as well as the culture collection SAG of Göttingen, Germany. The generated sequences were deposited in GenBank and can be found under the accession numbers MN243147 (*Oculatella crustae-formantes* PJ S28), MN243143 (*Cyanocohniella crotaloides* PJ S45), and MN243145 (*Aliterella chasmolithica* PJ S15). From the cultures, herbarium specimens were prepared. Species were described following the rules and requirements of the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Turland et al. 2018). Furthermore young (3 weeks old) cultures were preserved in 4% formaldehyde, in 15-mL glass bottles. Preserved material was then deposited in the Herbarium Hamburgense, Hamburg, Germany.

RESULTS

Each of the three investigated cyanobacterial strains was found to be unique based on its ecology, morphology, distribution, phylogeny, p-distance analysis of the 16S–23S ITS, and secondary structures. Because the combination of diacritical features associated with these species did not correspond with any described species of each of the three genera, we here named the three strains as the new species *Aliterella chasmolithica* sp. nov., *Oculatella crustae-formantes* sp. nov., and *Cyanocohniella crotaloides* sp. nov.

***Cyanocohniella crotaloides* P. Jung, Mikhailyuk, Emrich, Dultz et Büdel sp. nov. (Fig. 2, Table 1).**

Description: Populations of *Cyanocohniella crotaloides* sp. nov. show a polymorphic life cycle. The adult and main form resembles those of *Nostoc*-like

thallus structures with curved, constricted filaments that are embedded in a nonlamellated, fine and colorless sheath. The cells are round to spherical, 2.1–3.7 μm in diameter, with parietal thylakoids, and rarely with intercalary oval to spherical heterocysts. Young filaments or motile hormogonia show a *Pseudanabaena/Leptolyngbya*-like morphology with constricted cells that are cylindrical and 1.5–3.1 μm wide. The apical cells of these filaments are longer than wide, 1.5–3.1 μm , and oval to conical. Mature filaments resemble a *Chlorogloeopsis*-like morphology with cells of different sizes in one trichome formed by cell division in two planes. The cells are spherical, oval, or irregularly shaped and vary from 2.6 to 5 μm . The filaments are ensheathed in a visible, firm, and colorless sheath with apical and multiple intercalary hormocysts. Akinetes are formed in this stage and stayed attached to the filaments as single cells or in series with a brownish color. The cells are spherical to oval, 2.8–6.3 μm in diameter. The species tested negatively for nodularin/microcystin genes.

Habitat: Beach mats.

Etymology: '*Crotaloides*' according to the rattlesnake-like habit of the *Chlorogloeopsis*-like stage where variable cell types and cell sizes are combined and look like a rattle.

Type locality: -NETHERLANDS. Schiermonnikoog island, North Sea: beach mats formed of fine sands, elev. 2 m, 53°28'23.62" N, 6°8'32.472" E, collected on 24.05.2018, and isolated by P. Jung.

Holotype: The preserved holotype specimen is available via the Herbarium Hamburgense, Hamburg, Germany (HBG024670). It was prepared from the living strain which was the source of 16S, ITS, and 23S rRNA gene sequence deposited as GenBank accession number MN243143.

Reference strain: The reference strain is available via the culture collection DSMZ Braunschweig (DSM 109255) and the culture collection SAG of Göttingen, Germany (SAG 2592).

Phylogenetic relations and secondary structure of the 16S–23S ITS: A total of 52 sequences of representative taxa were included in the phylogenetic analyses to assess the placement of the *Cyanocohniella* clade in the Cyanobacteria (Fig. 2A). ML and Bayesian inference analyses produced similar tree topologies in our phylogenies. *Cyanocohniella crotaloides* sp. nov. is highly related to *C. calida* (99.9%) with one nucleotide difference in the 16S rRNA (Table S1 in the Supporting Information), but shows great differences (12.7%) in the p-distance of 16-23S ITS rRNA gene (Table S2 in the Supporting Information). The species shows major differences

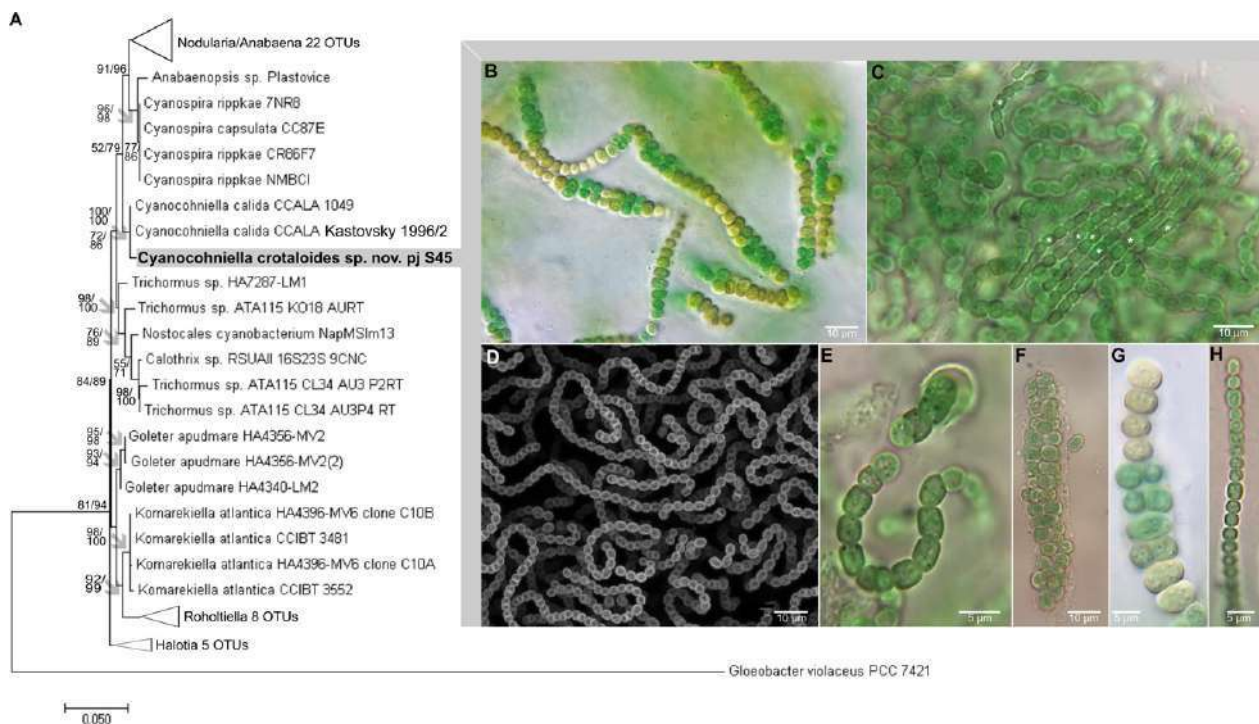


FIG. 2. Phylogenetic tree and micrographs of *Cyanocohniella crotaloides* sp. nov. (A) Phylogenetic position of *Cyanocohniella crotaloides* sp. nov. based on the 16S rRNA gene sequence data rooted to *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. Numbers at nodes represent first the ML bootstrap support (values $\geq 50\%$) and second the posterior probabilities from the Bayesian analysis (values $\geq 50\%$). The scale indicates the numbers of substitutions per site. (B) *Chlorogloeopsis*-like stage with brownish akinetes and different cell sizes in one trichome and multiple branching. (C) *Nostoc*-like stage with *Pseudanabaena/Leptolyngbya*-like hormogonia that are marked with an Asterisk. (D) CLSM image showing the *Nostoc*-like stage. (E) germination of akinetes. (F) *Chlorogloeopsis*-like stage. (G) *Chlorogloeopsis*-like stage with brownish akinetes. (H) *Pseudanabaena/Leptolyngbya*-like motile hormogonia. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

TABLE 1. Morphological comparison of *Cyanocohniella* species.

			<i>Cyanocohniella calida</i>	<i>Cyanocohniella crotaloides</i> sp. nov.
Color			Blue-green	Blue-green
Filaments			Hypervariable, mainly <i>Nostoc</i> -like, rarely with heterocytes	Hypervariable, mainly <i>Nostoc</i> -like, rarely with heterocytes
Hormogonia			<i>Pseudanabaena/Leptolyngbya</i> -like, motile	<i>Pseudanabaena/Leptolyngbya</i> -like, motile
Akinetes			Single or in series, spherical to oval, often with yellowish cell walls, 4–8(10) μm in diameter	Single or in series attached to <i>Chlorogloeopsis</i> -like filaments, spherical to oval, often yellowish, 2.8–6.3 μm in diameter
Necridia			Absent	Absent
Development:	Young filaments	Cell form	<i>Pseudanabaena/Leptolyngbya</i> -like, cylindrical, (1) 1.5(2) μm wide, with intercalary cells (1) 1.5–2.5 μm long	<i>Pseudanabaena/Leptolyngbya</i> -like, cylindrical, 1.5–3.1 μm wide
		Constriction	None or slightly at cross walls	Marked
	Adult filaments	Sheath	None or fine, colorless to yellowish	None or fine, colorless
		Apical cells	Longer than wide 1.5–2.5 μm , oval to conical, no calyptra	Longer than wide 1.5–3.1 μm , oval to slightly conical, no calyptra
	Mature filaments	Cell form	<i>Nostoc</i> -like, oval to spherical (2) 3.0–4.5(5) μm in diameter, intercalary oval to spherical heterocytes 5–6(7) μm , one- to two-celled apical hormocytes	<i>Nostoc</i> -like, round to spherical 2.1–3.7 μm in diameter,
		Constriction	Marked, attenuated toward apices	Marked
		Sheath	Unlamellated, slightly attenuated toward apices	None or fine, colorless
		Apical cells	Similar in form to common cells	Similar in form to common cells
		Cell form	<i>Chlorogloeopsis</i> -like, cells spherical, oval, or irregularly shaped, 2–7(8) μm in diameter, with cells irregularly arranged in ensheathed filaments, sometimes evidencing cell division in two planes, partly biseriate, with heterocytes rarely present, one- to two-celled apical hormocytes	<i>Chlorogloeopsis</i> -like, cells spherical, oval, or irregularly shaped, 2.6–5 μm in diameter, with cells irregularly arranged in ensheathed filaments, sometimes evidencing cell division in two planes, partly biseriate, with heterocytes rarely present, apical, and intercalary hormocytes
		Sheath	Colorless to slightly yellow, usually thin, unlamellated	Colorless, usually thin, unlamellated
Habitat	Apical cells	Similar in form to common cells	similar in form to common cells	
		Thermal water (47°C), Karlovy Vary, Czech Republic	Beach mat, Schiermonnikoog, Netherlands	

in the secondary structures (Fig. 3) with three helices that are quite similar, especially D-D1' and Box B. Main differences are in the loops, but there are also several in paired regions (D1-D1' and V3). The V3 helix is shorter than in *C. calida*.

Differentiation against other species: The newly isolated strain *Cyanocohniella crotaloides* PJ S45 has smaller cells than *Cyanocohniella calida* during almost all life stages. Also, the apical cells of the *Leptolyngbya/Pseudanabaena*-like stage are only slightly conical in contrast to the conical tips of *C. calida*. Akinetes mainly stay attached in uni- to multiseriate strings to the *Chlorogloeopsis*-like filaments and are only rarely found singularly, whereas those of *C. calida* are detached from the main filaments as cell rows or single units. It can also be separated from *Komarekiella atlantica* because the latter forms rounded macrocolonies, abundant heterocytes, and quadratic cells during the hormogonium stage.

***Oculatella crustae-formantes*, P. Jung, Briegel-Williams, Mikhailyuk et Büdel sp. nov. (Fig. 4, Table 2).**

Description: The species has single filaments without false branching that are 0.8–1.6 μm wide with a firm sheath. The trichomes and single cells are 0.5–1.1 μm wide (0.7 μm in average)/1.2–2.9 μm long, frequently granulated, and constricted at the cross walls with a parietal organization of the thylakoids. Apical cells are longer than broad, 0.6–2.5 μm wide/1.5–7.7(9.5) μm long with the typical orange 'eye-spot' in the very tip of the apical cells of mature filaments. The species tested positively for nodularin/microcystin genes.

Habitat: Biological soil crusts

Etymology: '*crustae-formantes*' after the presence of the species among a cyanobacterial-dominated biological soil crust

Type locality: -NORWAY. Arctic, Spitsbergen, Geopol, elev. 64 m, 78°56'58.38" N, 11°28'35.64" E,

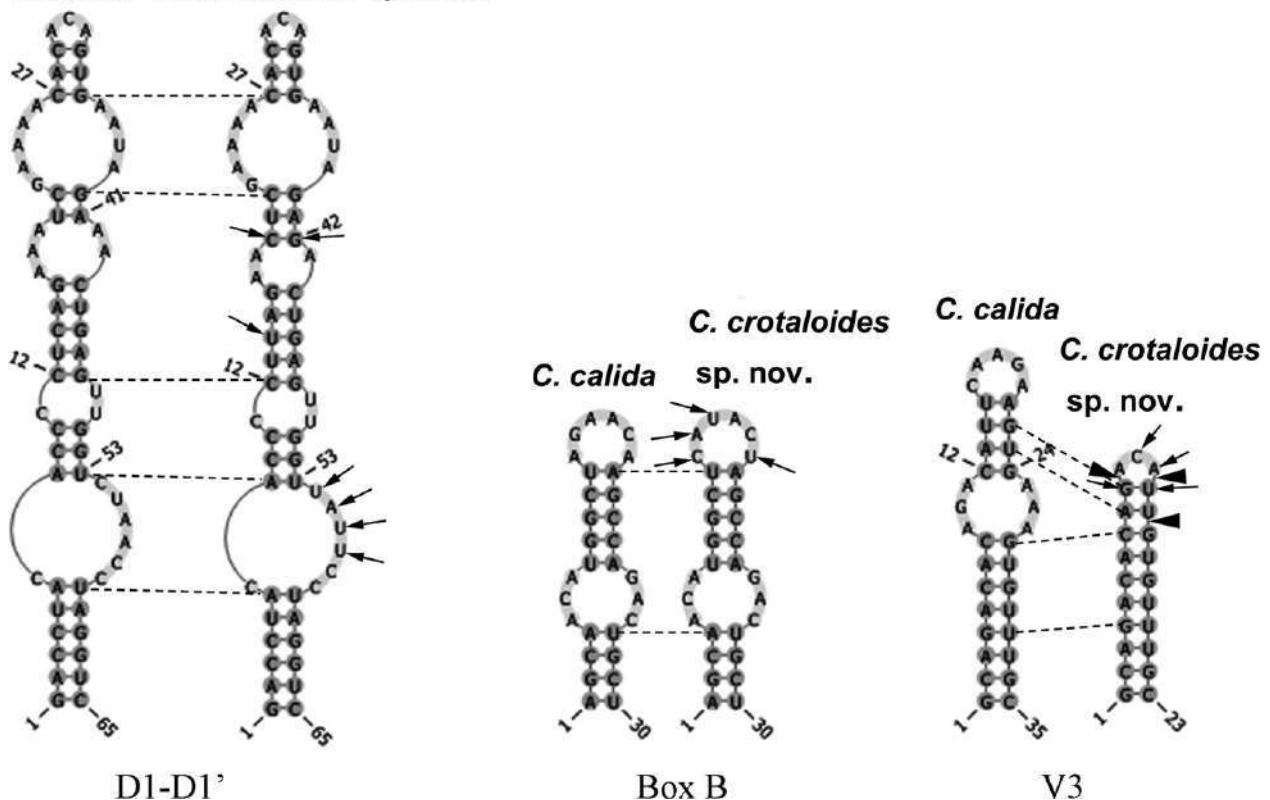
***C. calida* *C. crotaloides* sp. nov.**

FIG. 3. Secondary structure of the main informative helices of region 16S–23S ITS of *Cyanocohniella* species. All differences between strains are presented in comparison to the authentic strain of *C. calida* (CCALA 1049). Variable bases are shown with arrows, places of insertions/deletions of base pairs are marked with arrowheads, homologous base pairs among both species are indicated by dotted lines.

collected by L. Briegel-Williams in 2015, and isolated by P. Jung.

Holotype: The preserved holotype specimen is available via Herbarium Hamburgense, Hamburg, Germany (HBG024671). It was prepared from the living strain which was the source of 16S, ITS, and 23S rRNA gene sequence deposited as GenBank accession number MN243147.

Reference strain: The reference strain is available via the culture collection DSMZ Braunschweig (DSM 109267) and the culture collection SAG of Göttingen, Germany (SAG 2593).

Phylogenetic relations and secondary structure of the 16S–23S ITS: A total of 111 sequences of representative taxa were included in the phylogenetic analyses to assess the placement of the *Oculatella* clade in the cyanobacteria (Fig. 4A). The ML and Bayesian inference analyses produced similar tree topologies in our phylogenies. *Oculatella crustae-formantes* sp. nov. falls within the *Oculatella* clade (95.6%–98.8%) at a separated position (Fig. 4A, Table S3 in the Supporting Information). Additionally, dissimilarity of >16.2% could be detected among the 16S–23S ITS genes of all tested *Oculatella* species (Table S4 in the Supporting Information). Secondary structures of main informative helices of

16S–23S ITS showed general similarity with known species, but also some variability (Fig. 5): multiple differences in paired regions and loops of D1–D1', Box B, and V2 helices. The V3 helix is longer than in known species and characterized by multiple insertions of base pairs in the middle part.

Differentiation against other species: *Oculatella crustae-formantes* sp. nov. differs by having smaller minimum widths (0.7 μm in average) than all other known species (minimum widths varying from 0.8 to 1.6 μm) and never shows false branching or multiple filaments in one sheath.

***Aliterella chasmolithica*, P. Jung, Schermer, Mikhailuk et Büdel sp. nov. (Fig. 6, Table 3).**

Description: Microscopic irregular or rounded colonies with variable number of cells (up to 32–64 cells or more), usually aggregated into irregular, extended, compact multicolonial groups, sometimes solitary cells. Mucilage unstratified, colorless, and firm surrounding cells and colonies. Cells mostly irregular to rounded, 1.5–3.2 μm long, 1.5–2.4 μm in diameter with parietal thylakoids. Cell contents blue-green, slightly granulated, or sometimes homogeneous. Thylakoids parietal. Reproduction by simple binary cell division in three or more planes. The

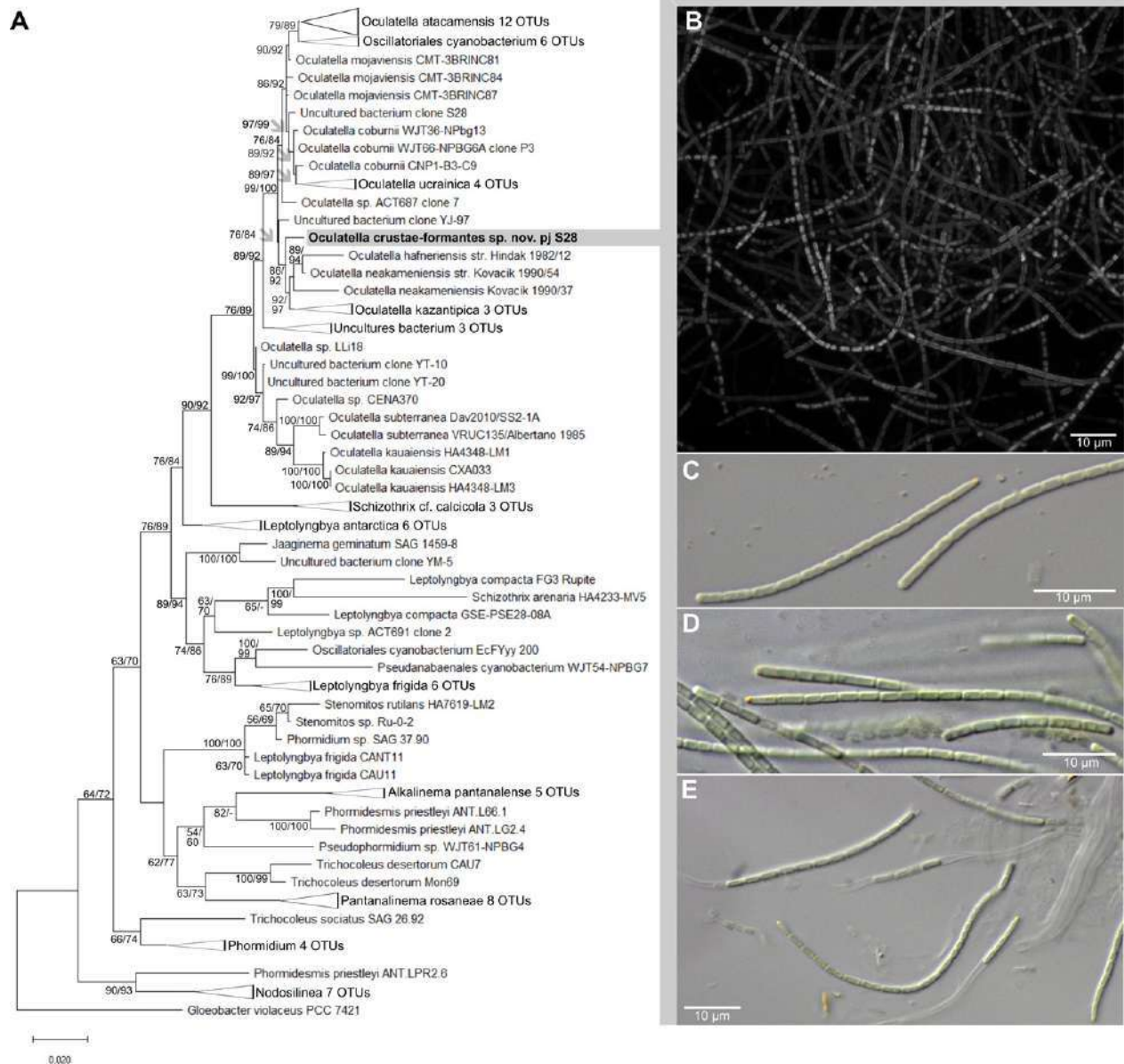


Fig. 4. Phylogenetic tree and micrographs of *Oculatella crustae-formantes* sp. nov. (A) phylogenetic position of *Oculatella crustae-formantes* sp. nov. based on the 16S rRNA gene sequence data rooted to *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. Numbers at nodes represent first the ML bootstrap support (values $\geq 50\%$) and second the posterior probabilities from the Bayesian analysis (values $\geq 50\%$). The scale indicates the numbers of substitutions per site. (B) CLSM image, (C–E) filaments with sheaths and yellow ‘eye-spot’ at the tip of mature filaments. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

species tested negatively for nodularin/microcystin genes.

Habitat: Chasmolithic in boulders of granite.

Etymology: ‘chasmolithica’ after the chasmolithic occurrence of the species within fissures and cracks of granite stones and rocks.

Type locality: -CHILE. Atacama Desert: Pan de Azúcar National Park, elev. 409 m, 26°06'39.62" S; 70°32'54.51" W, collected on July 23, 2017, and isolated by P. Jung.

Holotype: The preserved holotype specimen is available via Herbarium Hamburgense, Hamburg, Germany (HBG024669). This was prepared from the living strain which was the source of 16S, ITS, and 23S rRNA gene sequence deposited as GenBank accession number MN243145.

Reference strain: The reference strain is available via the culture collection DSMZ Braunschweig (DSM 109265) and the culture collection SAG of

TABLE 2. Morphological comparison of *Oculatella* species.

	<i>O. atacamensis</i>	<i>O. coburnii</i>	<i>O. mojaviensis</i>	<i>O. neohamamensis</i>	<i>O. kazantipica</i>	<i>O. ukrainica</i>	<i>O. cataractarum</i>	<i>O. hufneriensis</i>	<i>O. kauaiensis</i>	<i>O. subterranea</i>	<i>O. crustaceoformans</i> sp. nov.
Filament width, µm	1.8–4.1	1.7–2.8	2.0–2.6	1.2–4.1	(1.3) 1.5–5–7.5	(1.5) 2.5–(3.0)	1.3–1.7	1.4–2.4	1.2–1.7	1–2	0.8–1.6
Sheath	Common	Common	Common	Common	Common	Common	Rare	Common	Common	Common	Common
False branching	Rare	Rare	Rare	Absent	Rare	Rare	Rare	Absent	Absent	Rare	Absent
Trichome/cell	1.5–2.3	1.4–4.8	1.6–2.2	1.2–1.7	1.1–1.3–1.7	(1.3)–1.7–2.5	0.8–1.3–(1.7)	1.1–1.9	0.9–1.4	ND	0.5–1.1
width, µm											
Constrictions	Weak	Absent/weak	Absent/weak	Absent/weak	Absent/weak	Clear	Absent/weak	Absent/weak	Absent/weak	Abundant	Abundant
Granulation at cross walls	Sometimes	Absent	Sometimes	Sometimes	Sometimes	Sometimes	Frequently	Sometimes	Absent	Absent	Frequently
Necridia											
Cell length, µm	1.5–7.4	1.8–4.8	1.5–5.0	1.5–5.4	(2)2.3–4.7 (7.5)	(1.3)1.7–3.7(4.7)	(1.4)–1.6–6.8–(8.7)	1.0–4.4	1.0–4.4	1.5–3	1.2–2.9
Apical cells, width/length, µm	1.4–2.1/2.5–9.9	1.4–1.8/2.4–5.4	1.4–2.0/2.4–6.8	1.1–1.7/2.3–7.7	1.3–1.5/(4)5–7 (8.7)	1.3–1.7 (2.3)/3.3–6.7(7.7)	/2.1–7.7–(12.8)	1.0–1.7/2.0–5.8	0.9–1.5/1.3–7.8	ND	0.6–2.5/1.5–7.7(9.5)
Habitat	Soils and under quartz rocks, Atacama Desert	Ganitic soil in hot desert, Mojave USA	Dolomitic soil, Mojave Desert, USA	Semi-arid volcanic soil, Nea Kameni Island, Greece	Conquina beach, Ukraine	Chalk outcrops, Conquina beach, Ukraine	Dripping sandstone rocks, Calif creek falls, USA	Lake benthos Hafnersee, Austria	Sea cave Island of Kauai, USA	Hypogea, Catacombs, Rome, Italy	Soils,

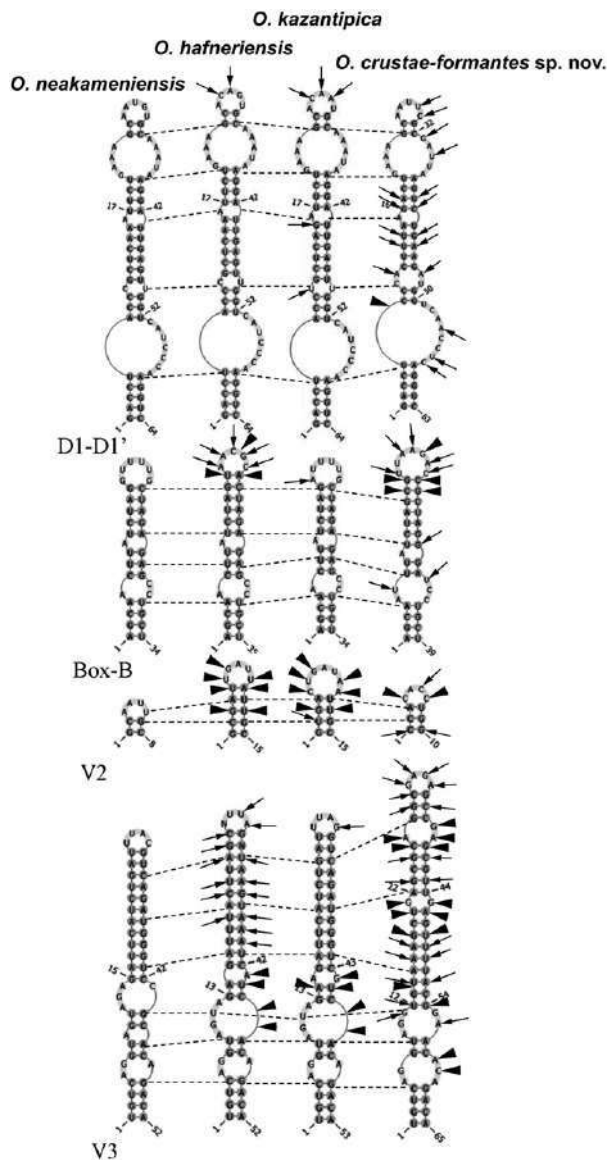


FIG. 5. Secondary structure of the main informative helices of region 16S–23S ITS of some terrestrial *Oculatella* species. All differences between strains are presented in comparison to the authentic strain of *O. neakameniensis* (Kovacik 1990/54). Variable bases are shown with arrows, places of insertions/deletions of base pairs are marked with arrowheads, homologous base pairs among different species are indicated by dotted lines.

Göttingen, Germany (temporary strain number SAG NA2019.003).

Phylogenetic relations and secondary structure of the 16S–23S ITS: A total of 54 sequences of representative taxa were included in the phylogenetic analyses to assess the placement of the *Aliterella* clade in the Cyanobacteria (Fig. 6A). The ML and Bayesian inference analyses produced similar tree topologies in our phylogenies. *A. chasmolithica* sp. nov. joins a clade of uncultured bacterial OTUs (97.6–98.8% similarity) in close vicinity to the three

known *Aliterella* species: *A. atlantica* (93.7%), *A. antarctica* (96.5%) and *A. shaanxiensis* (97.2%; Fig. 6A, Table S5 in the Supporting Information). Furthermore, dissimilation of >12.8% could be observed within the 16S–23S ITS genes of *Aliterella* strains during p-distance calculations (Table S6 in the Supporting Information). The secondary structure of the main informative helices of 16S–23S ITS (Fig. 7) shows some differences in paired regions and loops of the upper part of D1–D1' helix as well as lower and upper part of Box B helix.

Differentiation against other species: The described species *Aliterella chasmolithica* can be distinguished from *A. atlantica*, *A. antarctica*, and *A. shaanxiensis* by a smaller cell size. It can further be distinguished from *A. shaanxiensis* by more rounded cells.

DISCUSSION

According to the polyphasic approach, the concept of cyanobacterial genera and especially species descriptions should comprise a unique phylogenetic position, distinct morphological separation, as well as related ecological factors (Komárek et al. 2014). Nowadays, genera are rather unambiguously defined as a collection of species that forms a monophyletic clade (e.g., González-Resendiz et al. 2019). However, the discussion about ‘what constitutes a species?’ based on genetics started even before Stackebrandt and Goebel (1994) suggested that strains with <97.5% 16S rRNA sequence similarity should be considered as separate species, while those with less than 95% similarity should likely be considered as separate genera.

Stackebrandt (2006) changed the cut-off points to higher values which was even more strictly supported by the cut-offs proposed in Yarza et al. (2014; 98.7% for species, 94.5% for genera). Many recent studies have shown that cyanobacterial species have distinct morphological features even above a similarity level of 97.5% (Osorio-Santos et al. 2014, González-Resendiz et al., 2019, Konstantinou et al. 2019) and some authors even suggest a cut-off level for, for example, genera within the *Nostocales* of 98% similarity and for species of <99% (Kaštovský et al. 2014). An additional and recent example for comparable cut-off levels in pleurocapsalean cyanobacterial species is the newly described cyanobacterium *Odorella bentonica* that shows 99.92% similarity to *Pleurocapsa minor* JQ070059 and is separated by striking morphological and ecological differences (Shalygin et al. 2019). For these reasons the p-distance dissimilarity analysis of the ITS appears as a valuable addition to the molecular setup that has been applied since a few years at least for cryptic taxa (e.g., González-Resendiz et al. 2019). Nevertheless, similarity cut-off levels always represent only a part of the evidence to separate genera or species.

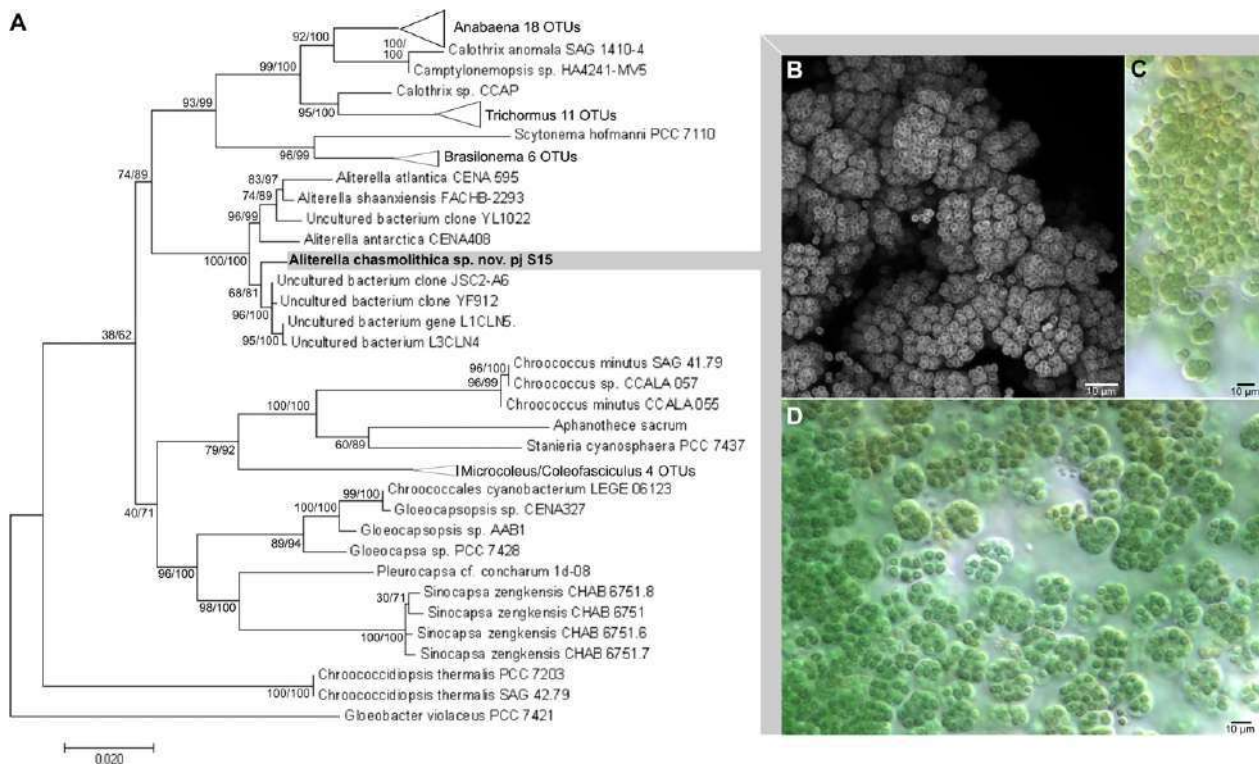


FIG. 6. Phylogenetic tree and micrographs of *Aliterella chasmolithica* sp. nov. (A) Phylogenetic position of *Aliterella chasmolithica* sp. nov. based on the 16S rRNA gene sequence data rooted to *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. Numbers at nodes represent first the ML bootstrap support (values $\geq 50\%$) and second the posterior probabilities from the Bayesian analysis (values $\geq 50\%$). The scale indicates the numbers of substitutions per site. (B) CLSM image of *Aliterella* sp. nov. (C) and (D) compact and irregular thallus composed of numerous colonies or solitary cells with colorless and firm mucilaginous envelope. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

The assignment of such a new species or genus to a specific ecological niche or substrate can be seen as an extension of the polyphasic approach, but it will remain not more than a careful assumption in most cases. Nevertheless, the idea of a distinct habitat or substrate specificity developed from well-known cases of a number of genera can clearly show restrictions to marine, thermic, or even terrestrial locations. For example, some freshwater aquatic genera such as *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, and *Woronichinia* were not found outside the freshwater habitat niche. There is also a series of species such as the subarctic *Komarekiella atlantica* that are restricted to the tropics (Hentschke et al 2017). This might be linked to their inability to survive freezing (Neustupa and Škaloud 2008) or to the knowledge that other strains prefer or even exclusively occur under arid conditions such as *Gloeocapsopsis* sp. AAB1 (Azua-Bustos et al. 2014) or *Spirirestris rafaensis* (Flechtner et al. 2002). This is still challenging even for already established genera and species and should be stated carefully because the inventory of cyanobacterial species is by far not complete as this study demonstrates. Especially genera that comprise only one or a few species with a putative ecology could hold

some surprises because future studies will easily be able to add further species to a genus that might be from opposing habitats.

Cyanocohniella. Kaštovský et al. (2014), for example, already considered an unresolved ecology of the genus *Cyanocohniella* by pointing out that *C. calida* might be found all over the world, analog to *Mastigocladus laminosus* (Petersen 1923, Miller et al. 2007, Finsinger et al. 2008), since both species are sharing the same type of habitat, namely, thermal springs. Our finding of *C. crotaloides* sp. nov. as a highly related species from the North Sea demonstrates that the genus does not seem to be a purely thermophilic clade. However, a certain thermotolerance would probably still be given also in *C. crotaloides* sp. nov. because it appears in algal beach mats which are regularly exposed to the sun. Quartz sand in combination with reflections from water puddles could easily reach temperatures beyond 50°C at least during the summer months. It remains speculative whether this assumed thermotolerance gives *C. crotaloides* sp. nov. a competitive advantage over other taxa within microbial mats described as highly diverse (Bauersachs et al. 2011). Testing this hypothesis might be challenging since *C. crotaloides* sp. nov. is very unstable in its morphology, with a

TABLE 3. Morphological comparison of *Aliterella* species.

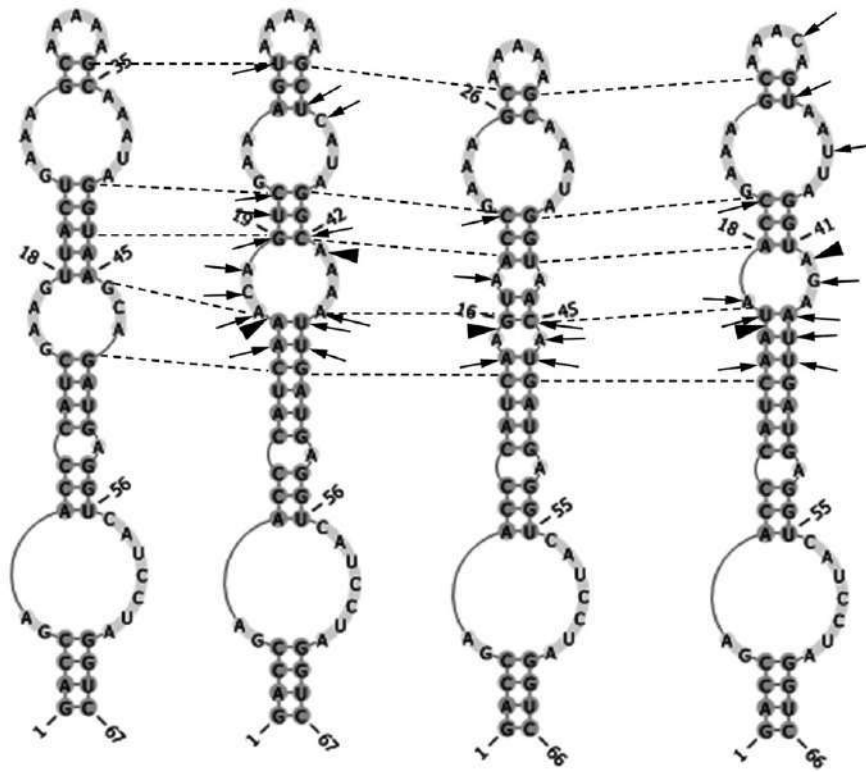
	<i>A. atlantica</i>	<i>A. antarctica</i>	<i>A. shaanxiensis</i>	<i>A. chasmolithica</i> sp. nov.
Thallus	Extended, compact, irregularly shaped, composed of numerous colonies or isolated ensheathed cells	Extended, compact, irregularly shaped, composed of numerous colonies or isolated ensheathed cells	Extended, compact, irregularly shaped, composed of numerous colonies or isolated ensheathed cells	Extended, compact, irregularly shaped, composed of numerous colonies or rarely isolated ensheathed cells
Colony shape	Mostly irregular, sometimes rounded	Mostly irregular, sometimes rounded	Mostly irregular, sometimes rounded	Mostly irregular, sometimes rounded
Number of cells in colony	Variable (up to 32–64 cells or more)	Variable (up to 32–64 cells or more)	Variable (up to 32–64 cells or more)	Variable (up to 32–64 cells or more)
Mucilage	Firm surrounding cells and colonies, colorless	Firm surrounding the cells and colonies, colorless to brownish	Firm surrounding cells and colonies, colorless	Firm surrounding the cells and colonies, colorless to brownish
Cell size	3.0–4.8 μm long (mean = 3.7 μm), 2.0–3.3 μm diameter (mean = 2.7 μm)	3.4–5.8 μm long (mean = 4.5 μm), 2.5–4.6 μm in diameter (mean = 3.5 μm)	2.8–3.7 μm long (mean = 3.3 \pm 0.3 μm , n = 40), 2.0–2.7 μm in diameter (mean = 2.2 \pm 0.2 μm , n = 40)	1.5–3.2 μm long (mean = 2.6 \pm 0.4), 1.5–2.4 μm in diameter (mean = 1.9 \pm 0.2)
Length/Diameter	1.1–2 (mean = 1.4)	1.0–1.7 (mean = 1.3)	1.3–1.7 (mean = 1.5)	0.7–2.0 (mean = 1.3 \pm 0.2)
Cell shape	Cylindrical with rounded ends, sometimes irregular	Cylindrical with rounded ends or, less frequently, near spherical, or irregular	Cylindrical with rounded ends	Cylindrical with rounded ends or, less frequently, near spherical, or irregular
Cell content	Granulated, sometimes homogeneous	Granulated, sometimes homogeneous	Slightly granulated, sometimes homogeneous	Granulated, sometimes homogeneous
Color	Blue-green	Blue-green	Blue-green	Blue-green
Thylakoids	Irregular with a higher concentration in the cell periphery	Irregular with a higher concentration in the cell periphery	Parietal	Parietal
Reproduction	Simple binary cell division in three or more planes	Simple binary cell division in three or more planes	Simple binary cell division in three or more planes	Simple binary cell division in three or more planes
Habitat	Marine planktonic, Atlantic Ocean	On polar coastal ormithogenic soil, Antarctica	Freshwater planktonic, China	Chasmoendolithic in granite, Atacama Desert

life cycle (Fig. 2, B–H) that is among the most complex ones observed in all of the cyanobacteria which makes the taxon difficult to identify especially in environmental samples. The various stages of both *Cyanocohniella* species can easily be mixed up with *Pseudanabaena*, *Nostoc*, and *Chlorogloeopsis* species. In contrast, *Cyanocohniella crotaloides* sp. nov. can easily be distinguished from *C. calida* by its multiseriate brownish akinetes that remain attached to the *Chlorogloeopsis*-like filament and contribute to the rattle-like appearance (Fig. 2B). The morphologically similar cyanobacterium *Komarekiella atlantica* was described in 2017 by Hentschke et al. It grew on the bark of trees, wood, and concrete in the Brazilian Atlantic rainforest and Hawaii and shares the complex life cycle. This species differs from *C. calida* and *C. crotaloides* by its rounded macrocolonies, abundant heterocytes, and the quadratic cells during the hormogonium stage. Interestingly, *K. atlantica* is phylogenetically more related to *Goleter* and *Roholtiella* than to *Cyanocohniella* (Fig. 2), although the two genera are morphologically alike. In contrast, both *Cyanocohniella* species are rather closely related (Table S1; 99.9%) with only one nucleotide

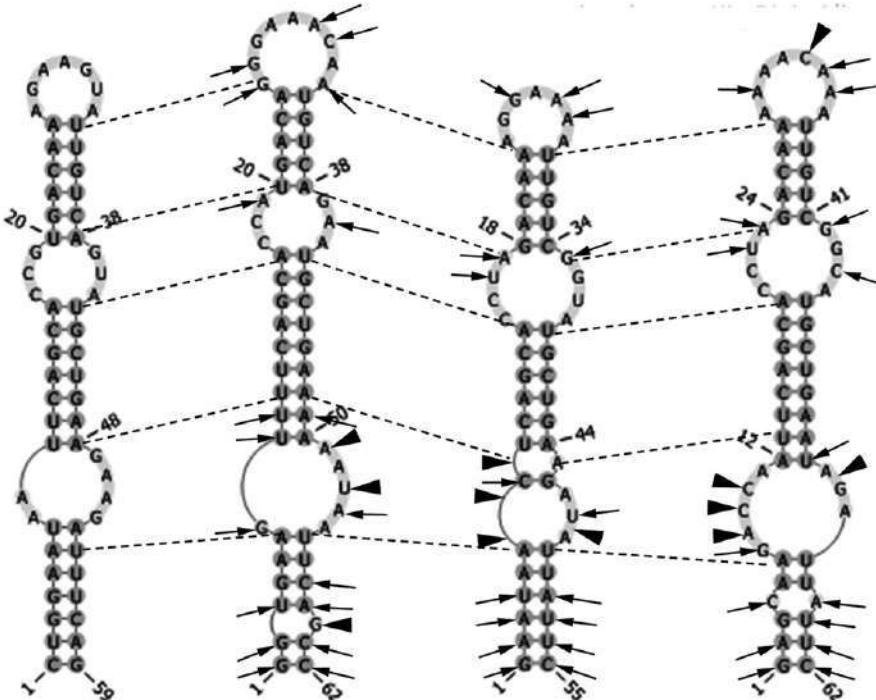
difference in the 16S rRNA and large dissimilarities within the 16S–23S ITS regions as demonstrated by p-distance calculations (Table S2; 12.7%). Furthermore, the secondary structures (Fig. 3) such as several different bases in the paired region of the D1–D1' and V3 helices as well as a shorter V3 helix in comparison to *C. calida* support the definition of *C. crotaloides* sp. nov. as a new species within the genus.

Oculatella. Since its separation from the Lep-*tolynbyaceae* in 2012 by Zammit et al. (2012) until today, 11 species have been described belonging to the genus *Oculatella*. Although the morphological characteristics, which allow a differentiation between the species, are rather cryptic, the 16S rRNA enables further distinction (e.g., Osorio-Santos et al. 2014). The single *Oculatella* species is worth taxonomic recognition and a further split, as it allows insights into its pattern of speciation, a rare exception regarding investigations of the biogeography within one cyanobacterial genus. The genus comprises very rare if not endemic species such as *O. atacamensis*, *O. kauaiensis*, *O. cataractarum*, and *O. hafneriensis* (Osorio-Santos et al. 2014), besides others that are

A. atlantica *A. antarctica* *A. shaanxiensis* *A. chasmolithica* sp. nov.



D1-D1'



Box-B

FIG. 7. Secondary structure of the main informative helices of region 16S–23S ITS of *Aliterella* species. All differences between strains are presented in comparison to the authentic strain of *A. atlantica* (CENA 595). Variable bases are shown with arrows, places of insertions/deletions of base pairs are marked with arrowheads, homologous base pairs among different species are indicated by dotted lines.

more frequently occurring with a broader geographical extension such as *O. subterranea* (Komárek and Anagnostidis 2005, Zammit et al. 2012). However, the newly described *O. crustae-formantes* sp. nov. is the first report of an *Oculatella* species from a considerable cold habitat in the high Arctic. This demonstrates that the movement of propagules of *Oculatella* species across great distances (via e.g., water, wind, migratory birds), which subsequently leads to speciation seems to be not as rare as speculated by Osorio-Santos et al. (2014). Besides its remote origin and ecology, *O. crustae-formantes* sp. nov. can be separated from all other species within the genus by its small cell size with filament widths that rarely exceed 1.6 μm (Fig. 4, B–E; Table 2). Phylogenetically it forms a separate lineage in *Oculatella*, with highest similarity of 16S rRNA to *O. ucrainica* (Table S3, 98.8%). Separation of this strain is also supported by high dissimilarity values of the 16S–23S ITS gene region (Table S4). P-distance analysis also indicates that the initial species concept within the genus *Oculatella* might be too narrow since the dissimilarity percentage among *O. kazantipica*, *O. ucrainica*, *O. atacamensis*, *O. coburnii*, and *O. neakameniensis* are below the threshold of 3%. The secondary structure of informative helices of 16S–23S ITS (Fig. 5) shows differences in paired regions and loops of D1–D1', Box-B, and V2 helices and multiple insertions of base pairs in the middle part of V3 helix.

Aliterella. The presence of an *Aliterella* species within naturally occurring cracks and fissures of granite boulders from the Atacama Desert clearly points to the fact that the genus is not strictly aquatic. During the phylogenetic analysis, *A. chasmolithica* sp. nov. showed highest similarities to the uncultured bacterium YF912 (Table S5; 89.8%) which was isolated from a natural carbonate surface in the Yunnan stone forest of China. Our strain clusters together with the latter and a few other uncultured bacterial strains in distance to the described species *A. shannxiensis*, *A. antarctica*, and *A. atlantica* which could indicate a split in the genus between aquatic and terrestrial/lithophilous species. Rigonato et al. (2016) as well as Zhang et al. (2018) already stated that it is likely that the genus could have a broad ecological amplitude which might be clarified during future discoveries of further species that belong to this genus. However, both author teams proposed the new monotypic family *Aliterellaceae* within the order *Chroococcidiopsidales* to accommodate this genus, which is supported by our data. This can be compared to the novel and highly related *Sinocapsaceae* which was suggested incertae sedis recently, with *Sinocapsa zengkensis* CHAB 6571 (*Aliterella antarctica* CENA 408 had the maximum similarity with 94%; Fig. 6) as the only member since the order *Chroococcidiopsidales* is currently not monophyletic (Wang et al. 2019). Besides its ecology, *A. chasmolithica* sp. nov. also differs from the three described

species mainly by a smaller cell size (Fig. 6, B–D; Table 3). The secondary structure of the main informative helices of 16S–23S ITS (Fig. 7) shows some differences in paired regions and loops of D1–D1' and Box B helices.

CONCLUSIONS

The three new cyanobacterial species *Cyanocohniella crotaloides* (Schiermonnikoog Island, Netherlands), *Oculatella crustae-formantes* (Spitsbergen, Arctic), and *Aliterella chasmolithica* (Atacama Desert, Chile) described here contribute to the overall understanding of the three recently established genera and are broadening the ecological amplitude of each of them. The new species allow new insights into the identities of several uncultured cyanobacterial sequences available in the GenBank database, which are likely belonging to these three genera. We would like to encourage future descriptions of even cryptic taxa that lack well-developed morphological characteristics by comparing also the p-distance dissimilarity as a holistic approach since this helps to aim for a more complete species inventory and to understand the ecology as well as the biogeography of cyanobacterial genera.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Michelle Gehringer for support during the toxin screening and Arianna Gallo for her help during the phylogenetic analysis and Wolf-Rüdiger Arendholz for support with the Latin names of the new species. We also would like to thank Anne Thyssen for her support during the CLSM analyses. PJ, BB, and KB have been supported by the German Research Foundation (projects BU 666/17, 18, 19; LE 903/14). TM thanks Alexander von Humboldt Foundation (Germany) for financial support.

- Albertano, P., Barsanti, L., Passarelli, V. & Gualtieri, P. 2000. A complex photoreceptive structure in the cyanobacterium *Lepidolyngbya* sp. *Micron* 31:27–34.
- Albertano, P. & Grilli Caiola, M. 1988. Structural and ultrastructural characters of a red biodeteriorating *Lyngbya* sp. in culture. *Arch. Hydrobiol. Supplement* Volumes: 55–57.
- Azua-Bustos, A., Zúñiga, J., Arenas-Fajardo, C., Orellana, M., Salas, L. & Rafael, V. 2014. *Gloeocapsopsis* AAB1, an extremely desiccation-tolerant cyanobacterium isolated from the Atacama Desert. *Extremophiles* 18:61–74.
- Bauersachs, T., Compaoré, J., Severin, I., Hopmans, E. C., Schouten, S., Stal, L. J. & Sinninghe Damsté, J. S. 2011. Diazotrophic microbial community of coastal microbial mats of the southern North Sea. *Geobiol.* 9:349–59.
- Baumann, K., Jung, P., Samolov, E., Lehnert, L. W., Büdel, B., Karsten, U., Bendix, J. et al. 2018. Biological soil crusts along a climatic gradient in Chile: richness and imprints of phototrophic microorganisms in phosphorus biogeochemical cycling. *Soil Biol. Biochem.* 127:286–300.
- Bischof, H. & Bold, H. 1963. *Some Soil Algae From Enchanted Rock and Related Algal Species*. University of Texas Publications, Austin, TX, USA. 6318:1–95.
- Byun, Y. & Han, K. 2009. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. *Bioinformatics* 25:1435–7.

- Engene, N., Cameron Coates, R. & Gerwick, W. H. 2010. 16S rRNA gene heterogeneity in the filamentous marine cyanobacterial genus *Lyngbya*. *J. Phycol.* 46:591–601.
- Erwin, P. M. & Thacker, R. W. 2008. Cryptic diversity of the symbiotic cyanobacterium *Synechococcus spongiarum* among sponge hosts. *Mol. Ecol.* 17:2937–47.
- Finsinger, K., Scholz, I., Serrano, A., Morales, S., Uribe-Lorio, L., Mora, M., Sittenfeld, A., Weckesser, J. & Hess, W. R. 2008. Characterization of true-branching cyanobacteria from geothermal sites and hot springs of Costa Rica. *Env. Mic.* 10:460–73.
- Flechtner, V. R., Boyer, S. L., Johansen, J. R. & DeNoble, M. L. 2002. *Spirivestis rafaelsensis* gen. et sp. nov. (Cyanophyceae), a new cyanobacterial genus from arid soils. *Nova Hedwigia* 74:1–24.
- Gehring, M. M., Adler, L., Roberts, A. A., Moffitt, M. C., Mihali, T. K., Mills, T. J., Fieker, C. & Neilan, B. A. 2012. Nodularin, a cyanobacterial toxin, is synthesized in planta by symbiotic *Nostoc* sp. *ISME J.* 6:1834.
- González-Resendiz, L., Johansen, J. R., León-Tejera, H., Sánchez, L., Segal-Kischinevsky, C., Escobar-Sánchez, V. & Morales, M. 2019. A bridge too far in naming species: a total evidence approach does not support recognition of four species in *Desertifilum* (Cyanobacteria). *J. Phycol.* 55:898–911.
- Hentschke, G. S., Johansen, J. R., Pietrasiak, N., Rigonato, J., Fiore, M. F. & Santanna, C. L. 2017. *Komarekiella atlantica* gen. et sp. nov. (Nostocaceae, Cyanobacteria): a new sub-aerial taxon from the Atlantic Rainforest and Kauai, Hawaii. *Fottea* 17:178–90.
- Johansen, J. R. & Casamatta, D. A. (2005). Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm. *Algological studies* 117:71–93.
- Jung, P., Briegel-Williams, L., Schermer, M. & Büdel, B. 2019a. Strong in combination: polyphasic approach enhances arguments for cold-assigned cyanobacterial endemism. *MicrobiologyOpen* 8:e00729.
- Jung, P., Schermer, M., Briegel-Williams, L., Baumann, K., Leinweber, P., Karsten, U., Lehnert, L., Achilles, S., Bendix, J. & Büdel, B. 2019b. Water availability shapes edaphic and lithic cyanobacterial communities in the Atacama Desert. *J. Phycol.* 55:1306–18.
- Jungblut, A. D. & Neilan, B. A. 2006. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 185:107–14.
- Kaštovský, J., Gomez, E. B., Hladil, J. & Johansen, J. R. 2014. *Cyanocohmiella calida* gen. et sp. nov. (Cyanobacteria: Aphani-zomenonaceae) a new cyanobacterium from the thermal springs from Karlovy Vary, Czech Republic. *Phytotaxa* 181:279–92.
- Komárek, J. 2006. Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae* 21:349–75.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. 2005. Süßwasserflora von Mitteleuropa, bd. 19/2: Cyanoprokaryota: Oscillatoriales. *Spektrum Akademischer Verlag*. 19:1–759.
- Komárek, J., Kastovsky, J., Mares, J. & Johansen, J. R. 2014. Taxonomic classification of Cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86:295–335.
- Konstantinou, D., Voultsiadou, E., Panteris, E., Zervou, S. K., Hiskia, A. & Gkelis, S. 2019. *Leptothoe*, a new genus of marine cyanobacteria (Synechococcales) and three new species associated with sponges from the Aegean Sea. *J. Phycol.* 55:882–97.
- Kremer, B., Kazmierczak, J. & Stal, L. J. 2008. Calcium carbonate precipitation in cyanobacterial mats from sandy tidal flats of the North Sea. *Geobiol.* 6:46–56.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Niyaz, C. & Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35:1547–9.
- Langhans, T. M., Storm, C. & Schwabe, A. 2009. Community assembly of biological soil crusts of different successional stages in a temperate sand ecosystem, as assessed by direct determination and enrichment techniques. *Microb. Ecol.* 58:394–407.
- Lehnert, L. W., Thies, B., Trachte, K., Achilles, S., Osses, P., Baumann, K., Schmidt, J. et al. 2018. A case study on fog/low stratus occurrence at Las Lomitas, Atacama Desert (Chile) as a water source for biological soil crusts. *Aerosol Air Qual. Res.* 18:254–69.
- Marin, B., Nowack, E. C. & Melkonian, M. 2005. A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist* 156:425–32.
- Martinez, A. & Asencio, A. D. 2010. Distribution of cyanobacteria at the Galeda cave (Spain) by physical parameters. *J. Caves Karst Stud.* 72:11–20.
- Mikhailyuk, T. I., Vinogradova, O. N., Glaser, K. & Karsten, U. 2016. New taxa for the flora of Ukraine, in the context of modern approaches to taxonomy of Cyanoprokaryota/Cyanobacteria. *Int. J. Algae* 18:301–20.
- Miller, S. R., Castenholz, R. W. & Pedersen, D. 2007. Phylogeography of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *J. App. Environ. Microbiol.* 73:4751–9.
- Miscoe, L. H., Johansen, J. R., Kociolek, J. P., Lowe, R. L., Vaccarino, M. A., Pietrasiak, N. & Sherwood, A. R. 2016. The diatom flora and cyanobacteria from caves on Kauai, Hawaii. *Acta Bot. Hungarica* 58:3–4.
- Mühlsteinová, R., Johansen, J. R., Pietrasiak, N. & Martin, M. P. 2014. Polyphasic characterization of *Kastovskya adunca* gen. nov. et comb. nov. (Cyanobacteria: Oscillatoriales), from desert soils of the Atacama Desert, Chile. *Phytotaxa* 163:216–28.
- Neustupa, J. & Škaloud, P. 2008. Diversity of subaerial algae and cyanobacteria on tree bark in tropical mountain habitats. *Biologia* 63:806–12.
- Osoño-Santos, K., Pietrasiak, N., Bohunická, M., Miscoe, L. H., Kováčik, L., Martin, M. P. & Johansen, J. R. 2014. Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification. *Eur. J. Phycol.* 49:450–70.
- Pessi, I. S., Lara, Y., Durieu, B., Maalouf, P. D. C., Verleyen, E. & Wilmotte, A. 2018. Community structure and distribution of benthic cyanobacteria in Antarctic lacustrine microbial mats. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94:fiy042.
- Petersen, J. B. 1923. Freshwater *Cyanophyceae* of Iceland. *Botany of Iceland* 2:249–324.
- Rigonato, J., Gama, W. A., Alvarenga, D. O., Branco, L. H. Z., Brandini, F. P., Genuario, D. B. & Fiore, M. F. 2016. *Aliterella atlantica* gen. nov., sp. nov., and *Aliterella antarctica* sp. nov., novel members of coccoid Cyanobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66:2853–61.
- Robinson, C., Gibbes, B., Carey, H. & Li, L. 2007. Salt-freshwater dynamics in a subterranean estuary over a spring-neap tidal cycle. *J. Geophys. Res. Oceans Atmos.* 112:1–15.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–4.
- Shalygin, S., Huang, I. S., Allen, E. H., Burkholder, J. M. & Zimba, P. V. 2019. *Odorella benthonica* gen. & sp. nov. (Pleurocapsales, Cyanobacteria): an odor and prolific toxin producer isolated from a California aqueduct. *J. Phycol.* 55:509–20.
- Stackebrandt, E. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today* 33:152–5.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 44:846–9.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order *Chroococcales*). *Bacteriol. Rev.* 35:171–205.
- Strunecký, O., Elster, J. & Komárek, J. 2011. Taxonomic revision of the freshwater cyanobacterium “*Phormidium*” *murrayi* = *Wilmottia murrayi*. *Fottea* 11:57–71.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Wit, R. & Wilmotte, A. 2003. Cyanobacterial diversity in natural and artificial

- microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *App. Environ. Microbiol.* 69:5157–69.
- Turland, N. J., Wiersema, J. H., Barrie, F. R., Greuter, W., Hawksworth, D. L., Herendeen, P. S., Knapp, S. et al. 2018. *International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (Shenzhen Code) Adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017. Regnum Vegetabile 159.* Koeltz Botanical Books, Glashütten, Germany. DOI: <https://doi.org/10.12705/Code.2018>.
- Vinogradova, O., Mikhailyuk, T., Glaser, K., Holzinger, A. & Karsten, U. 2017. New species of *Oculatella* (Synechococcales, Cyanobacteria) from terrestrial habitats of Ukraine. *Ukr. Bot. J.* 74:509–20.
- Vazquez-Martinez, J., GUTIERREZ-VILLAGOMEZ, J. M., Fonseca-García, C., Ramirez-Chavez, E., MONDRAGÓN-SÁNCHEZ, M. L., Partida-Martinez, L., ... & Molina-Torres, J. (2018). *Nodosilinea chupicuarensis* sp. nov. (Leptolyngbyaceae, Synechococcales) a subaerial cyanobacterium isolated from a stone monument in central Mexico. *Phytotaxa* 334:167–182.
- Wang, Y., Cai, F., Jia, N. & Li, R. 2019. Description of a novel coccoid cyanobacterial genus and species *Sinocapsa zenghensis* gen. nov. sp. nov. (Sinocapsaceae, incertae sedis), with taxonomic notes on genera in Chroococciopsidales. *Phytotaxa* 409:146–60.
- Whitton, B. A. 2012. *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time.* Springer Science & Business Media, pp. 90–127.
- Williams, L., Borchardt, N., Colesie, C., Baum, C., Komsic-Buchmann, K., Ripplin, M., Becker, B., Karsten, U. & Büdel, B. 2017. Biological soil crusts of Arctic Svalbard and of Livingston Island, Antarctica. *Polar Biol.* 40:399–411.
- Wilmotte, A., Van der Auwera, G. & De Wachter, R. 1993. Structure of the 16 S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (“*Mastigocladus laminosus* HTF”) strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Lett.* 317:96–100.
- Zammit, G., Billi, D. & Albertano, P. 2012. The subaerophytic cyanobacterium *Oculatella subterranea* (Oscillatoriales, Cyanophyceae) gen. et sp. nov.: a cytomorphological and molecular description. *Eur. J. Phycol.* 47:341–54.
- Zammit, G., Billi, D., Shubert, E., Kaštovský, J. & Albertano, P. 2011. The biodiversity of subaerophytic phototrophic biofilms from Maltese hypogea. *Fottea* 11:187–201.
- Zammit, G., De Leo, F., Albertano, P. & Urzi, C. 2008a. A preliminary comparative study of microbial communities colonizing ochre-decorated chambers at the Hal Saflieni Hypogeum at Paola, Malta. In *Proceedings of the 11th International Congress on Stone Deterioration Nicolaus Copernicus University Press, Torun*, pp. 555–562.
- Zammit, G., Psaila, P. & Albertano, P. 2008b. An investigation into biodeterioration caused by microbial communities colonising artworks in three maltese palaeo-christian catacombs. In *Proceedings of the 9th International Conference on NDT of Art, Jerusalem*, pp. 25–30.
- Zhang, Q., Zheng, L., Li, T., Li, R. & Song, L. 2018. *Aliterella shaanxiensis* (Aliterellaceae), a new coccoid cyanobacterial species from China. *Phytotaxa* 374:211–20.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* 31:3406–3415.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher’s web site:

Table S1. 16S rRNA gene sequence similarities among *Cyanocohniella* strains.

Table S2. Percent dissimilarity ($100 \times$ uncorrected p-distance) among aligned 16S–23S ITS regions of *Cyanocohniella* species.

Table S3. 16S rRNA gene sequence similarities among *Oculatella* strains.

Table S4. Percent dissimilarity ($100 \times$ uncorrected p-distance) among aligned 16S–23S ITS regions of *Oculatella* species.

Table S5. 16S rRNA gene sequence similarities among four *Aliterella* strains and their relatives.

Table S6. Percent dissimilarity ($100 \times$ uncorrected p-distance) among aligned 16S–23S ITS regions of *Aliterella* species.

3.2.2. Нові види роду *Oculatella* (Synecococcales, Cyanobacteria) з наземних місцезростань України



doi: 10.15407/ukrbotj74.06.509

New species of *Oculatella* (*Synechococcales*, *Cyanobacteria*) from terrestrial habitats of Ukraine

Oxana VINOGRADOVA¹, Tatiana MIKHAILYUK¹, Karin GLASER²,
Andreas HOLZINGER³, Ulf KARSTEN²

¹ M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine
2, Tereshchenkivska St., Kyiv 01004, Ukraine

² University of Rostock, Institute of Biol. Sci., Department of Appl. Ecology and Phycology
3, Albert-Einstein-Strasse, Rostock D-18057, Germany

³ University of Innsbruck, Department of Botany, Functional Plant Biology
Sternwartestrasse 15, Innsbruck A-6020, Austria

Vinogradova O., Mikhailyuk T., Glaser K., Holzinger A., Karsten U. **New species of *Oculatella* (*Synechococcales*, *Cyanobacteria*) from terrestrial habitats of Ukraine.** Ukr. Bot. J., 2017, 74(6): 509–520.

Abstract. Here we describe two new species of *Oculatella* Zammit, Billi & Albertano from terrestrial habitats of Ukraine: *O. ucrainica* sp. nov. and *O. kazantipica* sp. nov. The strains were isolated from biological crusts collected at the Sea of Azov conqina beach, and both clay slopes and chalk outcrops in the Kharkiv Region. Five strains evaluated in this study phenotypically and phylogenetically differed both among each other and from other species of this genus. On the phylogenetic tree based on 16S *r*RNA gene sequence comparison, original strains joined already known species of *Oculatella* forming isolated lineages, one of which joined the group of drought-resistant terrestrial species (*O. ucrainica*), while another (*O. kazantipica*) grouped together with terrestrial *O. neakameniensis* Kováčik et Johansen and aquatic *O. hafneriensis* Kováčik et Johansen. The phylogeny based on the 16S *r*RNA gene concatenated with the 16S–23S ITS region, as well as secondary structures of the most informative helices of the 16S–23S ITS confirmed new species designation. Filaments of *O. ucrainica* are narrower (1.5–3.0 μm), and trichomes are wider (1.3–2.7 μm) comparing to *O. kazantipica* (its filaments are 1.3–7.5 μm wide, trichomes 1.1–1.7 μm wide). The new species also differ from one another in sheath morphogenesis, appearance of trichomes, and cell length. *Oculatella ucrainica* morphologically and phylogenetically is close to desert species *O. coburnii* Pietrasiak et Johansen, differing in the higher degree of sheath formation, wider trichomes, apical cells without irregular outgrowth, and by composition and secondary structure of 16S–23S ITS region. *O. kazantipica* is similar to *O. hafneriensis* and *O. neakameniensis*, from which it differs in more abundant sheath, false branching, granulations at cross walls, longer intercalary cells, and by composition and secondary structure of its 16S–23S ITS region.

Keywords: *Synechococcales*, *Oculatella ucrainica*, *Oculatella kazantipica*, new species, biological crusts, Ukraine, molecular sequencing, 16S *r*RNA, 16S–23S ITS, secondary structure

Supplementary Material. Electronic Supplement (Table E1, p. e1) is available in the online version of this article at: <https://ukrbotj.co.ua/archive/74/6/509>

Introduction

The genus *Oculatella* Zammit, Billi & Albertano, which is morphologically similar to the genus *Leptolyngbya* Anagnostidis & Komárek, was separated from the latter on the basis of differences in sequence of the 16S *r*RNA gene and the secondary structure of the 16S–23S ITS region (Zammit et al., 2012; Osorio-Santos et al., 2014). The name of the genus is due to the photosensitive reddish eyespot (oculus) at the tip of mature apical cells, clearly visible in a light microscope. Recently, we reported the discovery on the Sea of Azov coast morphotypes of thin filamentous cyanobacteria possessing mentioned

autapomorph and with nucleotide sequence of the 16S *r*RNA gene completely corresponding to *Oculatella* (Mikhailyuk et al., 2016). A new detailed analysis of these strains, based on the phylogeny of the 16S *r*RNA gene concatenated with the 16S–23S ITS region, as well as secondary structures of the most informative helices of the 16S–23S ITS, showed that our strains differ from all known *Oculatella* species. Further morphological observations and molecular study of the isolated strains revealed that in the crusts of seaside habitats, in fact, there are two species, each having a number of differences from known representatives of this genus. In parallel, studying samples of cyanobacterial crusts from several areas of the cretaceous outcrops in Kharkiv Region, we also found morphotypes of *Oculatella*,

© O. VINOGRADOVA, T. MIKHAILYUK, K. GLASER,
A. HOLZINGER, U. KARSTEN, 2017

which we managed to isolate into culture. It turned out that one of these strains morphologically, as well as by a number of molecular markers, completely coincides with the three strains from the seacoast.

The paper reports on two new species of *Oculatella* from the terrestrial environments of Ukraine described using combined molecular and morphological data.

Materials and methods

Isolation of the strains, culture conditions, light and transmission electron microscopy

The strains in this study were isolated from the samples of biological soil crusts collected on the coast of the Sea of Azov in Kazantip Nature Reserve (Leninsky District, the Crimea) and at the chalk outcrops in Dvorichansky District of Kharkiv Region (Table 1). Sampling and processing of collected material were described in details in our previous paper (Mikhailyuk et al., 2016).

All strains were maintained on 1N BBM (Bischoff and Bold, 1963) and BG-11 (Stanier et al., 1971) agarized media at 12 : 12 light : dark photoperiod at $+20 \pm 5^\circ\text{C}$. Morphological examinations of cultures of cyanobacteria starting from 2 weeks and up to 6 months of cultivation were performed using Olympus BX51 light microscope with Nomarski DIC optics. Photomicrographs were taken from live material with digital camera Olympus UC30 attached to the microscope and processed by software cellSens Entry.

Reference cultures of newly described species (KZ-5-4-1 and KZ-19-s-2) were deposited in the culture collection of University of Göttingen, Germany (SAG 2563, 2567). All other *Oculatella* strains are maintained in the algal culture collection at University of Rostock, Germany. For each newly described *Oculatella* species, a herbarium accession was prepared. Young (3–4 weeks) cultures of reference strains were preserved in 4% formaldehyde in a 15 mL glass bottle. The preserved material was then deposited in the Herbarium of the M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine (KW-A 32375-32376).

Samples were fixed for transmission electron microscopy (TEM) using a standard chemical fixation protocol (2.5% glutaraldehyde, 1% OsO₄ in 10 mM cacodylate buffer, pH 6.8) according to Holzinger et al. (2009). Samples were dehydrated in increasing ethanol concentrations, transferred to modified Spurr's resin and heat polymerized. For TEM, ultrathin sections were prepared, counterstained with uranyl acetate and Reynold's lead citrate, and investigated by a Zeiss

LIBRA 120 transmission electron microscopes at 80 kV. Images were captured with a TRS 2k SSCCD camera and further processed using Adobe Photoshop software (Adobe Systems Inc., San José, California, USA).

DNA isolation, PCR, sequencing and phylogenetic analysis

DNA of the cyanobacterial strains was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences of the 16S rRNA gene together with 16S-23S ITS region were amplified using Taq PCR Mastermix Kit (Qiagen GmbH) and primers SSU-4-forw and ptLSU C-D-rev (Marin et al., 2005) in a thermocycler Tgradient Thermoblock (Biometra, Germany) under the conditions described in our previous paper (Mikhailyuk et al., 2016). PCR products were cleaned using a Qiagen PCR purification kit (Qiagen GmbH) according to the manufacturer's instructions. Cleaned PCR products were sequenced commercially by Qiagen Company using primers SSU-4-forw, Wil 6, Wil 12, Wil 14, Wil 5, Wil 9, Wil 16 and ptLSU C-D-rev (Wilmotte et al., 1993; Marin et al., 2005). The resulting sequences were assembled and edited using Geneious software (version 8.1.8; Biomatters). They were deposited in GenBank under the accession numbers MG652616-MG652620.

For comparison with five original strains, we used 63 nucleotide sequences of representatives of the order *Synechococcales* available in GenBank (NCBI*). Sequence of *Oculatella hafneriensis* Kováčik et Johansen used in the study was provided by Jeffrey R. Johansen (John Carroll University, University Heights, USA) during personal communication and deposited by us in GenBank under the accession number and authorship of mentioned person. Sequence of *O. hafneriensis* previously deposited in GenBank (DQ085093) has some doubtful parts and lacking the 16S-23S ITS region.

Multiple alignment of the nucleotide sequences for phylogeny based on the 16S rRNA gene was made using Mafft web server (version 7, Katoh and Standley, 2013) followed by manual editing in the program BioEdit (version 7.2). Alignment for the phylogeny of the 16S-23S ITS region was performed manually in BioEdit, taking into account the secondary structure of the RNA in the region. The evolutionary model that is best suited to the used database was selected on the basis of the lowest AIC value (Akaike, 1974) calculated in MEGA (version 6, Tamura et al., 2013). Phylogenetic

* See the Electronic Supplement in the online version of the article: <https://ukrbotj.co.ua/archive/74/6/509>

Table 1. Sampling sites for the *Oculatella* strains reported in this study

Strain ID	Location	GPS-coordinates	Sampling date	Site description
KZ-5-4-1	The coast of the Sea of Azov, vicinities of Kazantip Nature Reserve, spit of Aqtash Lake	45°43'85" N 35°85'25" E	08.08.2012	Coquina beach, 10 m from the water's edge, cyanobacterial-algal crusts with dominance of <i>Nostoc edaphicum</i> Kondrat.
KZ-7-1-4	The coast of the Sea of Azov, vicinities of Kazantip Nature Reserve, spit of Aqtash Lake	45°43'85" N 35°85'25" E	08.08.2012	Coquina beach, 10 m from the water's edge, cyanobacterial-algal crusts with dominance of <i>Nostoc edaphicum</i> and <i>Hassalia</i> sp.
KZ-12-1	The coast of the Sea of Azov, Kazantip Nature Reserve, Sharabay Bay	45°46'76" N 35°84'04" E	10.08.2012	Clay slope with sparse steppe vegetation, hypolithic under quartz fragments together with other cyanobacteria and algae
KZ-19-s-2	The coast of the Sea of Azov, Kazantip Nature Reserve, Shyrokaya Bay	45°47'04" N 35°85'47" E	07.08.2012	Coquina beach, cyanobacterial-algal crusts with dominance of <i>Microcoleus vaginatus</i> Gomont ex Gomont
Vin-4-4-1	Vicinity of village Petro-Ivanivka, the Verkhnia Dvorichna River right bank, steep chalk slopes, 121 m above sea level	49°55'32" N 37°40'45" E	28.05.2012	The middle part of the slope, growths on the soil with mosses, cyanobacterial-algal crusts with dominance of <i>Hassalia</i> sp. and <i>Nostoc</i> sp.

trees were constructed in the program MrBayes 3.2.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003), using an evolutionary model GTR + G + I, with 5,000,000 generations. Two of the four runs of Markov chain Monte Carlo were made simultaneously, with the trees, taken every 500 generations. Split frequencies between runs at the end of calculations were below 0.01. The trees selected before the likelihood rate reached saturation were subsequently rejected. The reliability of tree topology verified by the maximum likelihood analysis (ML) were made using the program GARLI 2.1. Models of the secondary structure of 16S-23S ITS region of the original strains were built according to published data (Osorio-Santos et al., 2014). Helices were folded with the online software mfold (Zuker, 2003) and visualized in the online tool Pseudoviewer (Byun, Han, 2009).

Results and discussion

The study of enrichment cultures of the samples of biological crusts from the coast of the Sea of Azov and chalk outcrops in Kharkiv Region revealed that thin filaments with reddish eyespot in mature apical cells occur quite common: we found them in 57% of the samples from the sea coast and 69% from chalks. Morphological evaluation of selected original strains (Table 2) confirmed taxonomical designation into the genus *Oculatella*. Phylogenetic analysis based on 16S *r*RNA gene sequence comparison supported this matching. Our strains, morphologically attributed to genus *Oculatella*, on the phylogenetic tree joined already known species of this genus, forming an isolated

clade (Fig. 1). More detailed phylogenetic analysis on the base of 16S *r*RNA gene sequence concatenated with the 16S-23S ITS region reflected differences in gene identities of the original strains. One of the seaside strains (KZ-19-s-2) grouped in subclade with *O. hafneriensis* Kováčik et Johansen and *O. neakameniensis* Kováčik et Johansen, while the other three together with "chalky" strain joined the group of drought-resistant terrestrial species of *Oculatella* inhabiting arid to semi-arid desert soils: *O. atacamensis* Osorio-Santos et Johansen, *O. mojaviensis* Pietrasiak et Johansen and *O. coburnii* Pietrasiak et Johansen (Osorio-Santos et al., 2014). The four strains (KZ-5-4-1, KZ-7-1-4, KZ-12-1 and Vin-4-4-1) represent a new species *O. ucrainica* sp. nov. (see below); the fifth strain (KZ-19-s-2) despite closeness to *O. neakameniensis* and *O. hafneriensis* formed a highly supported separate lineage which corresponded to another new species described here as *O. kazantipica* sp. nov. (see below).

Comparison of the main helices of 16S-23S ITS secondary structure of our isolates and phylogenetically close species (Fig. 3) showed general similarity of all *Oculatella* strains especially in structure of D1-D1' and Box-B helices. Our newly described species differ from close known taxa by one unique base in D1-D1' and Box-B helices (*O. ucrainica*) and by two unique bases in D1-D1' helix and one unique base in Box-B helix (*O. kazantipica*). V-3 helix is quite similar in all compared taxa, but has the most unique base composition in *O. hafneriensis* (15 unique bases). *O. neakameniensis* differs as well by unique structure

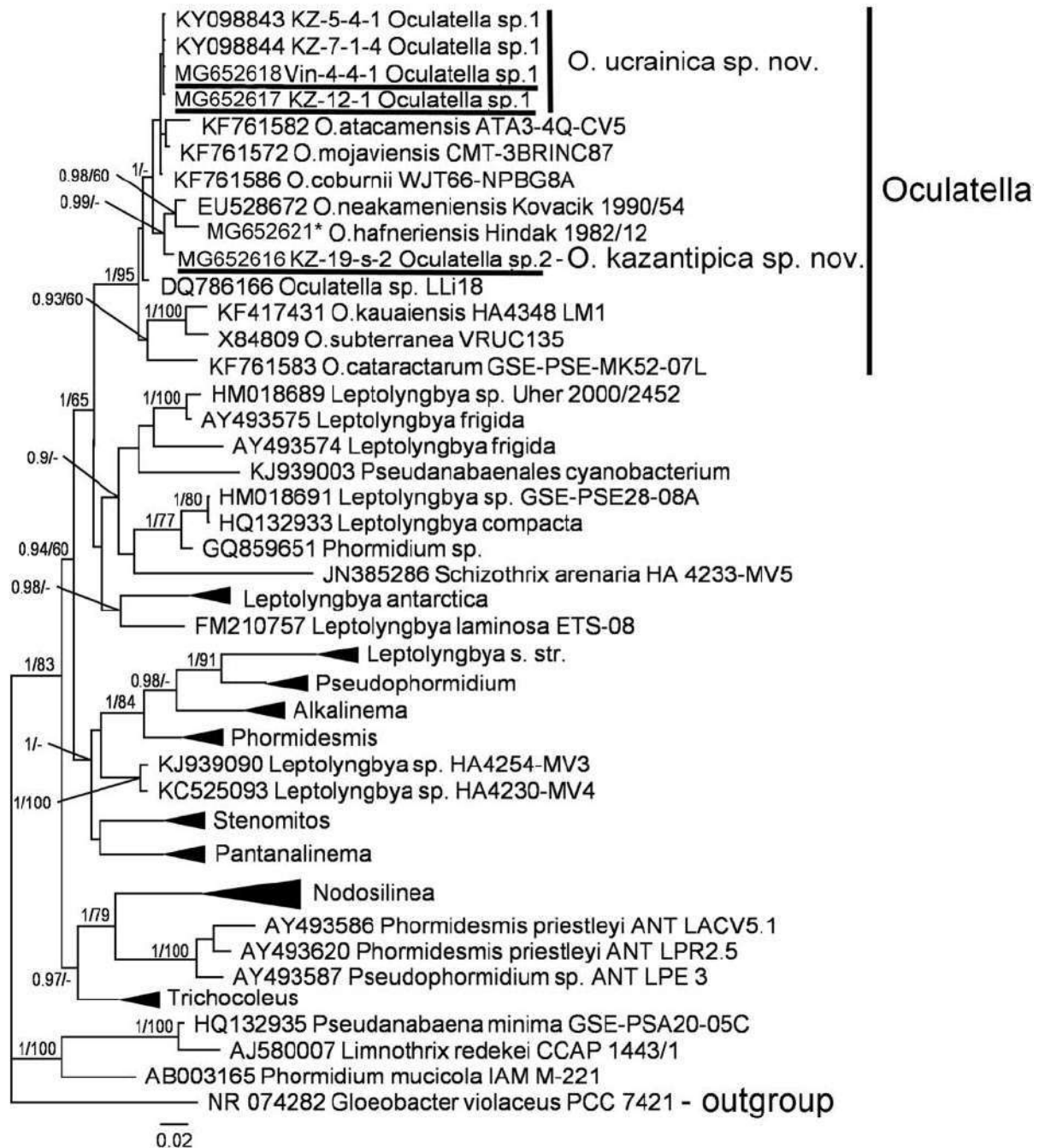


Fig. 1. Molecular phylogeny of *Synechococcales* based on 16S *r*RNA sequence comparisons. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP) indicated at nodes. From left to right, support values correspond to Bayesian PP and Maximum Likelihood BP; BP values lower than 50% and PP lower than 0.8 not shown. Strains marked with underline are newly sequenced cyanobacteria. Clade designations follow Osorio-Santos et al., 2014 and Miscoe et al., 2016

* Sequence of *Oculatella hafneriensis* used in the study was provided by Jeffrey R. Johansen (John Carroll University, University Heights, USA) via personal communication.

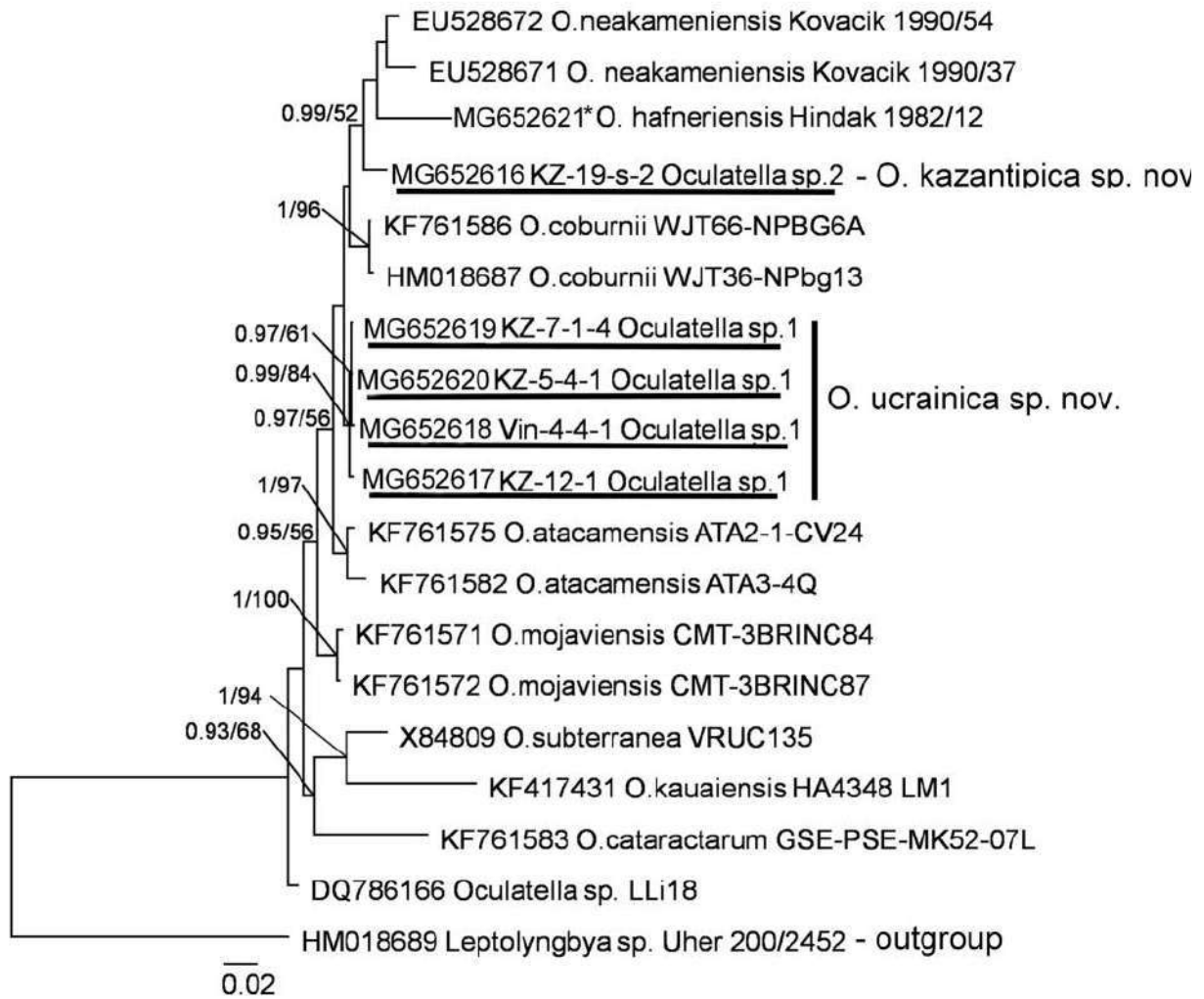


Fig. 2. Molecular phylogeny of genus *Oculatella* based on 16S-23S ITS sequence comparisons. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP) indicated at nodes. From left to right, support values correspond to Bayesian PP and Maximum Likelihood BP; BP values lower than 50% and PP lower than 0.8 not shown. Strains marked with underline are newly sequenced cyanobacteria

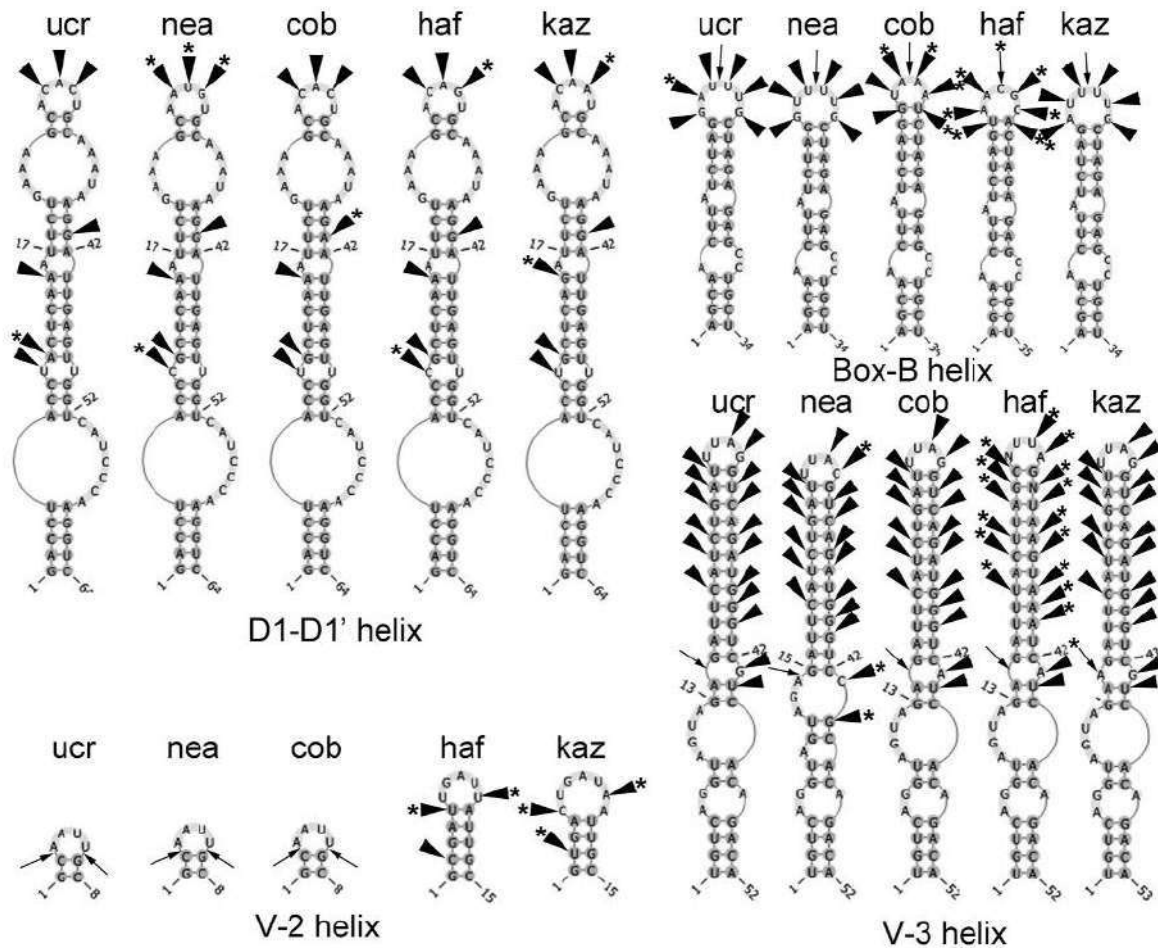


Fig. 3. Secondary structure of the main informative helices of region 16S-23S ITS of newly described species (*Oculatella ucrainica* (ucr) and *O. kazantipica* (kaz)) and comparison with the most close known species of *Oculatella* (*O. neakameniensis* (nea), *O. coburnii* (cob) and *O. hafneriensis* (haf)). Variable bases are shown with arrowheads, places of insertions/deletions of base pairs are marked with arrows, unique bases are indicated with asterisk

of V-3 helix in the base part due to one unique base difference. Our new species have V-3 helices similar to *O. coburnii*, but differed by one base in the basal loop (*O. ucrainica* and *O. kazantipica*) and by one unique insertion (*O. kazantipica*). V-2 helix of *O. ucrainica* was identical with the helices of all terrestrial species of *Oculatella*. *O. kazantipica* had V-2 helix similar to *O. hafneriensis* but differed by 3 unique bases.

Revealed morphotypes differ both among the two new species and from other species of *Oculatella* (Table 2, Figs 4, 5). As can be seen from the table and figures, the width range of the filaments in *O. kazantipica* (1.3–7.5 µm) is significantly higher than that of *O. ucrainica* (1.5–3.0 µm); it relates to the different nature of the sheath formation in these species. In old cultures of both

species, the sheath became broader and stronger, but in *O. ucrainica* the extension of the filament is because the sheath somewhat retreated from the trichome, whereas in *O. kazantipica* the sheath gradually expanded, sometimes becoming lamellar. The new species also differ one another in appearance and trichome width. Trichomes of *O. ucrainica* are broader (1.3–2.7 µm), clearly constricted and rarely with granulations at cross walls. In contrast, *O. kazantipica* trichomes unconstricted or weakly constricted but usually with granulations at crosswalls; the width of the trichome (1.1–1.7 µm) is smaller, but the length of the cells (4.7–7.5 µm) exceeds that of the first species (Table 2).

From the type species *O. subterranea* Zammit, Billi et Albertano both new species differ by the blue-green

Table 2. Morphological comparison of *Oculatella ucrainica* sp. nov. and *O. kazantipica* sp. nov. with known* *Oculatella* species**

Species	Filament width, μm	Sheath	False branching	Trichome width, μm	Constrictions	Granulations at crosswalls	Necridia	Cell length, μm	Apical cells width / length, μm	Habitat
<i>O. atacamensis</i>	1.8–4.1	common	rare	1.5–2.3	weak	sometimes	–	1.5–7.4	1.4–2.1 / 2.5–9.9	Soils and under quartz rocks in desert
<i>O. coburnii</i>	1.7–2.8	common	rare	1.4–1.8	clear	absent	–	1.8–4.8	1.4–1.8 / 2.4–5.4	Granitic soil in hot desert
<i>O. mojaviensis</i>	2.0–2.6	common	rare	1.6–2.2	absent/weak	sometimes	+	1.5–5.0	1.4–2.0 / 2.4–6.8	Dolomitic soil in hot desert
<i>O. neakameniensis</i>	1.2–4.1	common	absent	1.2–1.7	absent/weak	sometimes	–	1.5–5.4	1.1–1.7 / 2.3–7.7	Semi-arid volcanic soil
<i>O. kazantipica</i>	(1.3)1.5–5–7.5	common	rare	1.1–1.3–1.7	absent/weak	frequently	–	(2)–2.3–4.7(7.5)	1.3–1.5 / (4)5–7(8.7)	Conquina beach
<i>O. ucrainica</i>	(1.5)2.5–(3.0)	common	rare	(1.3)–1.7–2.5 (3.0)	clear	sometimes	–	(1.3)1.7–3.7(4.7)	1.3–1.7 (2.3)/(2.3) 3.3–6.7 (7.7)	Conquina beach, chalk outcrops
<i>O. cataractarum</i>	1.3–1.7	rare	rare	0.8–1.3–(1.7)	absent/weak	frequently	–	(1.4)–1.6–6.8–(8.7)	/2.1–7.7–(12.8)	Dripping sandstone rocks
<i>O. hafneriensis</i>	1.4–2.4	common	absent	1.1–1.9	absent/weak	sometimes	–	1.0–4.4	1.0–1.7 / 2.0–5.8	Lake benthos
<i>O. kauaiensis</i>	1.2–1.7	common	absent	0.9–1.4	absent/weak	absent	–	1.0–4.4	0.9–1.5 / 1.3–7.8	Sea cave

* We did not include *O. subterranea* in the comparative table because of obvious morphological and ecological differences with our strains. ** After Osorio-Santos et al., 2014.

color, much longer intercalary cells, and the shape and dimensions of apical cells. Ukrainian species also differ from already known representatives of the genus by the appearance and width of trichomes, the length of intercalary and apical cells.

In their ecology, both new species are terrestrial xerophytes. On the marine beach, where they were initially revealed, the biota is exposed to high solar radiation and salinity of the environment; water stress is mitigated by the proximity of the sea. For chalk outcrops, where *O. ucrainica* is common, the main limiting factor is the lack of moisture. It is logical to assume that morphologically and in molecular features Ukrainian species would be closer to the "desert" group of *Oculatella* (*O. atacamensis*, *O. coburnii*, *O. mojaviensis*, *O. neakameniensis*) than to species from aquatic habitats (*O. cataractarum* Bohunická et Johansen, *O. hafneriensis*, *O. kauaiensis* Miscoe et Johansen). A comparative analysis of the main morphological features of *Oculatella* species (Table 2) shows that the width of the filaments of *O. ucrainica* is indeed similar to the "desert" and differs from

"aquatic" species, but in the trichome width it exceeds all known species of genus *Oculatella*. Morphologically *O. ucrainica* is the most similar to *O. coburnii*: common features are constrictions at cross walls and length of intercalary cells. It is interesting that *O. ucrainica* represents the sister lineage to *O. coburnii* in 16S-23S ITS phylogeny (Fig. 2) and shows most similarities in the secondary structure of 16S-23S ITS region (Fig. 3). TEM investigation of *O. ucrainica* strains showed 4–6 parietal thylakoids in vegetative cells and dark granules near cross walls (Fig. 6). The ultrastructure with parietal arrangement of thylakoids are typical for both other species of *Oculatella* (Zammit et al., 2012; Osorio-Santos et al., 2014) and representatives of *Synechococcales*.

The appearance and dimensional features of *O. kazantipica* differ from other species of this genus to a lesser degree: the distinctive characters are the upper limit of the filament width, and the clearly visible granulations at cell walls; they are also present in *O. cataractarum*. Morphologically *O. kazantipica* is most similar to *O. hafneriensis* and *O. neakameniensis*:

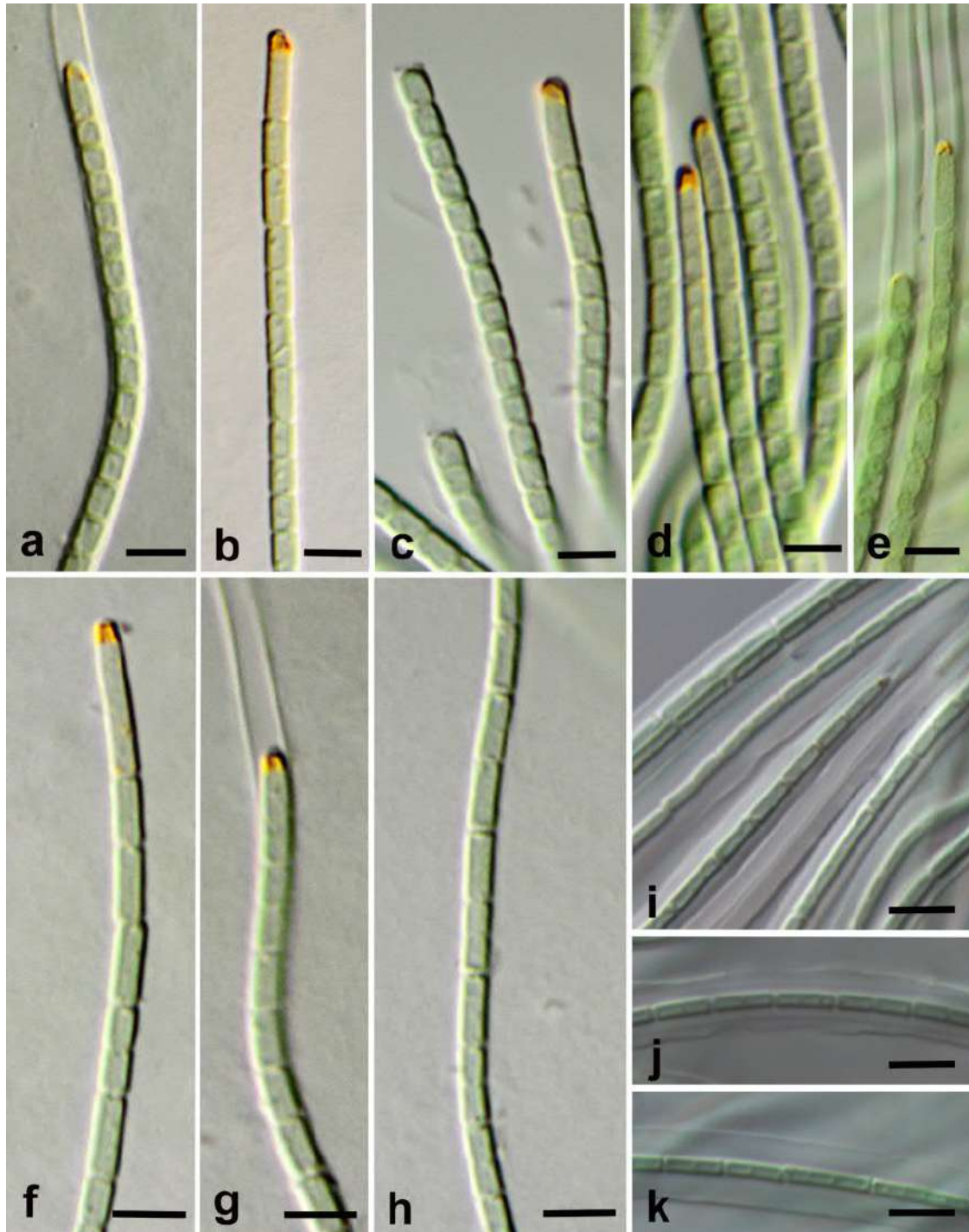


Fig. 4. Micrographs of new species of *Oculatella*; *O. ucrainica* sp. nov.: *a–d* – young filaments of strains KZ-5-4-1 (*a–c*) and KZ-12-1 (*d*) with clear photosensitive granules in terminal cells, *e* – old filament with narrow sheath (KZ-5-4-1); *O. kazantipica* sp. nov. (KZ-19-s-2): *f–h* – young filaments with clear photosensitive granules in terminal cells and narrow sheath (*g*), *i–k* – old filaments with wide and slightly lamellar sheaths. Scale 5 μ m

Fig. 5. Drawings of new species of *Oculatella*. *O. ucrainica* sp. nov. (KZ-5-4-1): *a* – young filaments, *b* – old filament; *O. kazantipica* sp. nov. (KZ-19-s-2): *c* – young filaments, *d* – old filament. Scale 5 μ m

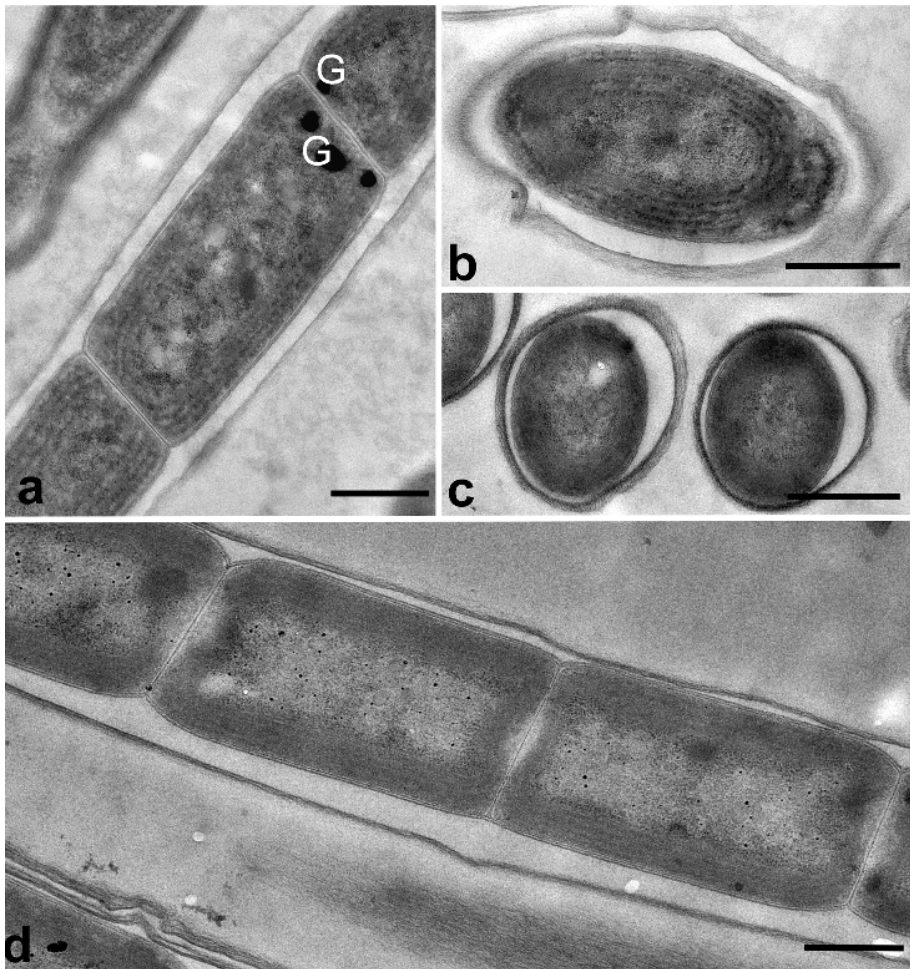
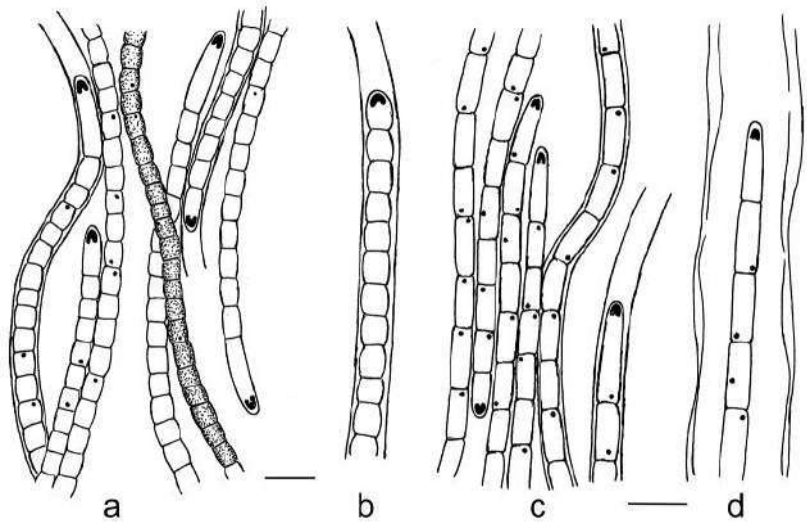


Fig. 6. Transmission electron micrographs of *Oculatella ucrainica*: *a*, *d* – longitudinal section of filaments, *b*, *c* – cross sections of filaments; *a*–*c* – strain KZ-5-4-1, *d* – strain KZ-12-1. Strains are characterized by parietal thylakoids and the presence of granules (marked G). Scale 1 μ m

common features are trichome width, lack of constrictions at cross walls, shape and dimensions of apical cells. *O. kazantipica* phylogenetically is close to both mentioned above species (Fig. 2) and represents similar secondary structure of 16S-23S ITS region, especially close to unique V-2 helix of *O. hafneriensis* (Fig. 3). *O. neakameniensis* is a terrestrial species isolated from semiarid volcanic soil (Greece) and therefore ecologically similar to our isolate. The phylogenetic position of *O. hafneriensis* between terrestrial species is surprising because this species is inhabiting fresh waters and occupies basic phylogenetic position among other aquatic representatives in Osorio-Santos et al. (2014). But *O. neakameniensis*, *O. hafneriensis* and our isolate KZ-19-s-2 are close biogeographically because were isolated in Europe and differ from other known species found from tropical islands, North and South America. *O. hafneriensis* were originally described from benthos of a temperate lake in Austria (Osorio-Santos et al., 2014).

Taxonomic descriptions

Oculatella ucrainica O.M. Vynogr. et Mikhailyuk sp. nov.

Diagnosis: Morphologically and phylogenetically is the most similar to *O. coburnii*, from which differs in the higher degree of sheath formation, wider trichomes, apical cells without irregular outgrowth and by composition and secondary structure of 16S-23S ITS region.

Thallus flat, thin, spreading diffusely from the center, penetrating into the agar, blue-green. Filaments flexuous, (1.5)1.9–2.5(3.0) μm wide, mostly unbranched. Sheath very common, nearly obligate in older cultures, thin and tightly attached when young, later distinctly widened, colorless. Trichomes motile only in young state, olive-green, (1.3)1.7–2.3(2.7) μm wide, clearly constricted at cross walls (especially in young cultures) and sometimes with granules, lacking necridia, not attenuated to the end. Cells isodiametric to longer than wide, (1.3)1.7–3.7(4.7) μm , with nongranular cytoplasm and parietal thylakoids clearly visible in the light microscope. Mature apical cells bluntly conical, longer than vegetative cells, 1.3–1.7(2.3) μm wide, (2.3)3.3–6.7 (7.7) μm long, with a reddish-orange spot in the apex of the cell. D1-D1' helix of the 16S-23S ITS region 64 nucleotides long, with a large subterminal bilateral bulge of 9 nucleotides. V2 helix with only 8 nucleotides. Box-B with 34 nucleotides, with 6 nucleotides in the terminal loop. V3 helix with 52 nucleotides, with a unilateral bulge on the 5' side of the helix.

Habitat: isolated from biological crusts dominated by *Nostoc edaphicum* and *Hassalia* sp. on the surface

of coquina, clay and chalk outcrops, and hypolitically under pieces of quartz.

Type locality: The coast of the Sea of Azov, vicinities of Kazantip Nature Reserve, Aqtash Lake spit.

Iconotype: Figs 4 a–c, e, 5 a, b.

Holotype here designated: *KW-A* 32375, Herbarium of M.G. Kholodny Institute of Botany of NAS of Ukraine.

Reference strain: KZ-5-4-1 (*SAG* 2563).

Additional strains: KZ-7-1-4, KZ-12-1, Vin-4-4-1.

Additional sampling localities: the coast of the Sea of Azov, Kazantip Nature Reserve, Sharabay Bay. Kharkiv Region, Dvorichansky District, vicinities of Petro-Ivanivka village.

Etymology: *ucrainica* = from Ukraine.

Oculatella kazantipica O.M. Vynogr. et Mikhailyuk sp. nov.

Diagnosis: Morphologically and phylogenetically it is the most similar to *O. hafneriensis* and *O. neakameniensis*, from which differs in higher degree of sheath formation, false branching, granulations at cross walls and longer intercalary cells, and by composition and secondary structure of 16S-23S ITS region.

Thallus a thin film penetrating into the agar, spreading diffusely from the center of thallus, blue-green. Filaments weakly waved, rarely with false branching or more than one trichome in common sheath. Sheath nearly obligate, first thin and tightly attached, (1.3)1.5–1.9 μm wide, in old cultures firm, gradually expanded, sometimes lamellate, 5–7.5 μm wide, colorless. Trichomes olive-green, (1.1)1.3–1.7 μm wide, unconstricted to slightly constricted at the cross walls (especially in young cultures) often flanking with granules, lacking necridia, not attenuated to the end. Cells consistently longer than wide, with nongranular cytoplasm, with parietal thylakoids clearly visible in the light microscope, (2)2.3–4.7(5) μm long, in old cultures up to 7.5 μm long. Mature apical cells elongated-conical, longer than vegetative cells, 1.3–1.5 μm wide, (4.0)5.0–7.0(8.7) μm long, with a reddish-orange spot in the apex of the cell. D1-D1' helix of the 16S-23S ITS region 64 nucleotides long, with a large subterminal bilateral bulge of 9 nucleotides. V2 helix 15 nucleotides long, with a terminal loop of 7 nucleotides. Box-B with 34 nucleotides, with 6 nucleotides in the terminal loop. V3 helix region with 53 nucleotides, with a unilateral bulge on the 5' side of the helix at nucleotides.

Habitat: coquina beach exposed to direct sunlight, in biological crusts with dominance of *Microcoleus vaginatus* at seaside.

Type locality: The coast of the Sea of Azov, Kazantip Nature Reserve, Shyrokaya Bay.

Iconotype: Figs 4*f–k*, 5*c, d*.

Holotype here designated: *KW-A* 32376, Herbarium of M.G. Kholodny Institute of Botany of NAS of Ukraine.

Reference strain: KZ-19-s-2 (*SAG* 2567).

Etymology: *kazantipica* = from the Cape Kazantip.

In contrast to previous studies, which reported *Oculatella* as a rare genus (Osorio-Santos et al., 2014), we found this genus in over half of our soil crust samples from the Sea of Azov coast and chalk outcrops in Kharkiv Region. Recent studies suggest that *Oculatella* might be even more widely distributed as it was found in biological soil crust in Iran (Dulić et al., 2017). From the isolated strains, we described two new species after detailed investigations of their morphology, phylogeny, and ultrastructure. Both, the morphological and phylogenetic characteristics, indicate that the new strains represent new species. This is strengthened by the ecology and biogeography of the new strains, both different to the previously described *Oculatella* species. It is interesting that type populations of these new species were found on small territory of Kazantip Nature Reserve and vicinities similar to the earlier described species *O. coburnii* and *O. mojaviensis* found also on a limited territory, in desert soils of California, USA. Moreover, the terrestrial species *O. kazantipica* is morphologically and genetically close to the freshwater European taxon *O. hafneriensis*.

Acknowledgements

The research was supported by a Georg-Forster Fellowship of the Alexander von Humboldt Foundation (Alexander von Humboldt Stiftung) to the second author. We are grateful to Dr. Alla B. Gromakova, V.N. Karazin National University, Ukraine, for the samples of biological crusts collected in Kharkiv Region. We thank Sabrina Obwegeser, Beatrix Jungwirth and Lisa Obwegs, University of Innsbruck, Austria, for providing help in the TEM investigations, Jeffrey R. Johansen, John Carroll University, University Heights, USA, for providing original sequence of *Oculatella hafneriensis*, Dr. Maike Lorenz, University of Göttingen, Germany, for help during strain deposition to *SAG*, as well as Eduard Demchenko, M.G. Kholodny Institute of Botany of NASU, for help during cultivation of *Oculatella* strains.

REFERENCES

- Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Contr.*, 1974, 19(6): 716–723.
- Bischoff H.W., Bold H.C. Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Univ. Texas Publ.*, 1963, 6318: 1–95.
- Byun Y., Han K. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1435–1437.
- Dulić T., Meriluoto J., Malešević T.P., Gajić V., Važić T., Tokodi N., Obreht I., Kostić B., Kosijer P., Khormali F., Svirčev Z. Cyanobacterial diversity and toxicity of biocrusts from the Caspian Lowland loess deposits, North Iran. *Quat. Int.*, 2017, 429: 74–85.
- Holzinger A., Roleda M.Y., Lütz C. The vegetative arctic green alga *Zygnema* is insensitive to experimental UV exposure. *Micron*, 2009, 40: 831–838.
- Katoh K., Standley D.M. MAFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. and Evol.*, 2013, 30(4): 772–780.
- Marin B., Nowack E.C.M., Melkonian M. A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist*, 2005, 156: 425–432.
- Mikhailyuk T.I., Vinogradova O.N., Glaser K., Karsten U. New taxa for the flora of Ukraine, in the context of modern approaches to taxonomy of *Cyanoprokaryota/Cyanobacteria*. *Int. J. on Algae*, 2016, 18(4): 301–320.
- Osorio-Santos K., Pietrasiak N., Bohunická M., Miscoe L.H., Kováčik L., Martin M.P., Johansen J.R. Seven new species of *Oculatella* (*Pseudanabaenales, Cyanobacteria*): taxonomically recognizing cryptic diversification. *Eur. J. Phycol.*, 2014, 49(4): 450–470.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.R. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic interference under mixed models. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572–1574.
- Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol. Rev.*, 1971, 35: 171–205.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A. MEGA6: molecular evolutionary analysis version 6.0. *Mol. Biol. and Evol.*, 2013, 30(12): 2725–2729.
- Wilmotte A., Van der Auwera G., De Wachter R. Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC75 18, and phylogenetic analysis. *FEBS Lett.*, 1993, 317(1–2): 96–100.
- Zammit G., Billi D., Albertano P. The subaerophytic cyanobacterium *Oculatella subterranea* (*Oscillatoriales, Cyanophyceae*) gen. et sp. nov.: a cytological and molecular description. *Eur. J. Phycol.*, 2012, 47: 341–354.
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl. Acid Res.*, 2003, 31(13): 3406–3415.

Recommended for publication by P.M. Tsarenko Submitted 01.07.2017

Виноградова О.М.¹, Михайлюк Т.І.¹, Глазер К.², Хольцингер А.³, Карстен У.² **Нові види роду *Oculatella* (*Synechococcales*, *Cyanobacteria*) з наземних місцезростань України.** Укр. бот. журн., 2017, 74(6): 509–520.

¹ Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України вул. Терещенківська, 2, Київ 01004, Україна

² Університет м. Росток, Інститут біологічних наук Альберт Ейнштейн штрассе, 3, Росток D-18057, Німеччина

³ Університет м. Інсбрук, кафедра ботаніки Штернвартештрассе, 15, Інсбрук А-6020, Австрія

Описані нові для науки види з роду *Oculatella* Zammit, Billi & Albertano: *O. ucrainica* sp. nov. та *O. kazantipica* sp. nov., виділені з біологічних кірочок, відібраних на ракушняковому пляжі біля Азовського моря (АР Крим), а також на крейдяних та глинистих схилах у Харківській області. Комплексне дослідження п'яти отриманих штамів *Oculatella* показало, що фенотипично та філогенетично вони відрізняються від усіх відомих видів цього роду. На філогенетичному дереві, побудованому на основі порівняння послідовностей генів 16S рРНК, штамми нових видів приєдналися до вже відомих видів *Oculatella*, які утворювали окремі лінії, при цьому один з них (*O. ucrainica*) увійшов до групи засухоустійких наземних видів, а інший (*O. kazantipica*) потрапив до однієї кладі з терестріальним видом *O. neakameniensis* Kováčik et Johansen та озерним *O. hafneriensis* Kováčik & Johansen. Філогенетичний аналіз за ділянкою 16S рРНК, зв'язаною з регіоном 16S-23S ITS, а також вторинні структури найінформативніших хеліксів 16S-23S ITS підтвердили виділення нових видів, які морфологічно також чітко відрізняються. Нитки *O. ucrainica* вужчі (1,5–3,0 мкм), а трихоми ширші (1,3–2,7 мкм), ніж у *O. kazantipica* (нитки 1,3–7,5 мкм шир., трихоми 1,1–1,7 мкм шир.), є відмінності у морфогенезі піхов, перетягнутості трихомів та довжині клітин. *Oculatella ucrainica* найбільш подібний до пустельного виду *O. coburnii* Pietrasiak & Johansen, від якого відрізняється інтенсивністю формування піхов, ширшими трихомами, відсутністю неправильного виросту на кінцевих клітинах, а також конфігурацією вторинної структури регіону 16S-23S ITS. *Oculatella kazantipica* близька до *O. hafneriensis* та *O. neakameniensis*, від яких відрізняється за морфологією піхов, наявністю несправжнього галуження, грануляціями біля поперечних перегородок, більшою довжиною інтеркалярних клітин, та деталями будови вторинної структури регіону 16S-23S ITS.

Ключові слова: *Synechococcales*, *Oculatella ucrainica*, *O. kazantipica*, нові види, біологічні кірочки, Україна, молекулярна філогенія, 16S рРНК, 16S-23S ITS, вторинна структура

Виноградова О.Н.¹, Михайлюк Т.И.¹, Глазер К.², Хольцингер А.³, Карстен У.² **Новые виды рода *Oculatella* (*Synechococcales*, *Cyanobacteria*) из наземных местообитаний Украины.** Укр. бот. журн., 2017, 74(6): 509–520.

¹ Інститут ботаніки ім. Н.Г. Холодного НАН України вул. Терещенковская, 2, Киев 01004, Украина

² Університет г. Росток, Інститут біологічних наук Альберт Эйнштейн штрассе, 3, Росток D-18057, Германия

³ Університет г. Инсбрук, кафедра ботаники Штернвартештрассе, 15, Инсбрук А-6020, Австрия

Описаны новые для науки виды из рода *Oculatella* Zammit, Billi & Albertano: *O. ucrainica* sp. nov. и *O. kazantipica* sp. nov., выделенные из биологических корочек, отобранных на ракушечниковом пляже у Азовского моря (АР Крым), а также на меловых и глинистых склонах в Харьковской обл. Комплексное исследование пяти полученных штаммов *Oculatella* показало, что фенотипически и филогенетически они отличаются от всех известных видов этого рода. На филогенетическом дереве, построенном на основе сравнения последовательностей генов 16S рРНК, штаммы новых видов присоединялись к уже известным видам *Oculatella*, образующим отдельные линии, при этом один из них (*O. ucrainica*) вошел в группу засухоустойчивых наземных видов, а другой (*O. kazantipica*) попал в одну кладу с наземным видом *O. neakameniensis* Kováčik et Johansen и водным *O. hafneriensis* Kováčik & Johansen. Филогенетический анализ по участку 16S рРНК, связанному с регионом 16S-23S ITS, а также вторичные структуры наиболее информативных хеликсов 16S-23S ITS подтвердили выделение новых видов, которые морфологически также хорошо различимы между собой. Нити *O. ucrainica* уже (1,5–3,0 мкм), а трихоми шире (1,3–2,7 мкм), чем у *O. kazantipica* (нити 1,3–7,5 мкм шир., трихоми 1,1–1,7 мкм шир.), отличия также касаются морфогенеза влагища, перешнурованности трихомов и длины клеток. *Oculatella ucrainica* наиболее сходен с пустынным видом *O. coburnii* Pietrasiak & Johansen, от которого отличается интенсивностью формирования влагища, более широкими трихомами, отсутствием неправильного выроста на конечных клетках, а также конфигурацией вторичной структуры региона 16S-23S ITS. *Oculatella kazantipica* близка к *O. hafneriensis* и *O. neakameniensis*, от которых отличается морфологией влагища, наличием ложного ветвления, грануляциями у поперечных перегородок, большей длиной интеркалярных клеток и деталями строения вторичной структуры региона 16S-23S ITS.

Ключевые слова: *Synechococcales*, *Oculatella ucrainica*, *O. kazantipica*, новые виды, биологические корочки, Украина, молекулярная филогенія, 16S рРНК, 16S-23S ITS, вторичная структура

Table E1. List of species and strains used for the 16S rRNA and 16S-23S ITS sequence comparisons

Species	Strain	Accession number ¹	
		16S rRNA	16S-23S ITS region
<i>Oculatella ucrainica</i> sp. nov.	KZ-5-4-1, SAG 2563	KY098843	MG652620
<i>Oculatella ucrainica</i> sp. nov.	KZ-7-1-4	KY098844	MG652619
<i>Oculatella ucrainica</i> sp. nov.	Vin-4-4-1	MG652618	
<i>Oculatella ucrainica</i> sp. nov.	KZ-12-1	MG652617	
<i>Oculatella kazantipica</i> sp. nov.	KZ-19-s-2, SAG 2567	MG652616	
<i>Oculatella hafneriensis</i>	Hindak 1982/12	MG652621 ²	
<i>Oculatella atacamensis</i>	ATA3-4Q-CV5	KF761582	
<i>Oculatella atacamensis</i>	ATA2-1-CV24	–	KF761575
<i>Oculatella mojaviensis</i>	CMT-3BRINC87	KF761572	
<i>Oculatella mojaviensis</i>	CMT-3BRINC84	–	KF761571
<i>Oculatella coburnii</i>	WJT66-NPBG6A	KF761586	
<i>Oculatella coburnii</i>	WJT36-NPbg13	–	HM018687
<i>Oculatella neakameniensis</i>	Kovacik 1990/54	EU528672	
<i>Oculatella neakameniensis</i>	Kovacik 1990/37	–	EU528671
<i>Oculatella</i> sp.	LLi18	DQ786166	
<i>Oculatella kauaiensis</i>	HA4348 LM1	KF417431	
<i>Oculatella subterranea</i>	VRUC135	X84809	
<i>Oculatella cataractarum</i>	GSE-PSE-MK52-07L	KF761583	
<i>Leptolyngbya</i> sp.	Uher 2000/2452	HM018689	
<i>Leptolyngbya frigida</i>	ANT.L52.2	AY493575	–
<i>Leptolyngbya frigida</i>	ANT.L70.1	AY493574	–
<i>Pseudanabaena cyanobacterium</i>	WJT40-NPBG3	KJ939003	–
<i>Leptolyngbya</i> sp.	GSE-PSE28-08A	HM018691	–
<i>Leptolyngbya compacta</i>	GSE-PSE28-08A	HQ132933	–
<i>Phormidium</i> sp.	PMC301.07	GQ859651	–
<i>Schizothrix arenaria</i>	HA4233-MV5	JN385286	–
<i>Leptolyngbya antarctica</i>	ANT.LG2.5	AY493603	–
<i>Leptolyngbya antarctica</i>	ANT.L18.1	AY493607	–
<i>Leptolyngbya antarctica</i>	ANT.L67.1	AY493572	–
<i>Leptolyngbya laminosa</i>	ETS-08	FM210757	–
<i>Leptolyngbya tenerima</i>	AF218368	UTCC 77	–
<i>Leptolyngbya boryana</i>	PCC 6306	EF429289	–
<i>Leptolyngbya boryana</i>	CCAP 1446/2	HF678483	–
<i>Leptolyngbya foveolarum</i>	VP1-08	FR798945	–
<i>Leptolyngbya</i> sp.	HA4236-MV8	KJ939018	–
<i>Pseudophormidium</i> sp.	WJT71-NPBG25	KJ939062	–
<i>Pseudophormidium</i> sp.	ATA5-5-1-KO9	KC311902	–
<i>Alkaline mapantanalense</i>	CENA531	KF246497	–
<i>Alkaline mapantanalense</i>	CENA530	KF246496	–
<i>Phormidesmis priestleyi</i>	ANT.L66.1	AY493581	–
<i>Phormidesmis priestleyi</i>	ANT.LG2.4	AY493580	–
<i>Phormidesmis</i> sp.	WJT36-NPBG15	KJ939033	–
<i>Leptolyngbya</i> sp.	HA4254-MV3	KJ939090	–
<i>Leptolyngbya</i> sp.	HA4230-MV4	KC525093	–
<i>Leptolyngbya frigida</i>	ANT.L52B.3	AY493612	–
<i>Leptolyngbya frigida</i>	ANT.L64B.1	AY493577	–
<i>Leptolyngbya tenuis</i>	PMC304.07	GQ859652	–
<i>Pseudanabaena tremula</i>	UTCC 471	AF218371	–
<i>Pantanaline marosanaeae</i>	CENA539	KF246503	–
<i>Pantanaline marosanaeae</i>	CENA521	KF246488	–
<i>Nodosilinea epilithica</i>	Kovacik 1998/7	HM018677	–
<i>Nodosilinea epilithica</i>	Kovacik 1990/52	HM018679	–
<i>Leptolyngbya margaretheana</i>	IT12	FR798934	–
<i>Nodosilinea nodulosa</i>	UTEX 2910	KF307598	–
<i>Nodosilinea conica</i>	SEV4-5-c1	EU528667	–
<i>Nodosilinea</i> sp.	Prim-5-5	KY098847	–
<i>Nodosilinea bijugata</i>	Kovacik 1986/5a	EU528669	–
<i>Oscillatoria neglecta</i>	AM M-82	AB003168	–
<i>Leptolyngbya subtilissima</i>	EcFYyy700	KC463197	–
<i>Phormidesmis priestleyi</i>	ANT.LACV5.1	AY493586	–
<i>Phormidesmis priestleyi</i>	ANT.LPR2.5	AY493620	–
<i>Pseudophormidium</i> sp.	ANT.LPE.3	AY493587	–
<i>Trichocoleus desertorum</i>	ATA4-8-CV2	KF307604	–
<i>Trichocoleus badius</i>	CRS-1	EF429297	–
<i>Pseudanabaena minima</i>	GSE-PSE20-05C	HQ132935	–
<i>Limnothrix redekei</i>	CCAP 1443/1	AJ580007	–
<i>Phormidium mucicola</i>	IAM M-221	AB003165	–
<i>Gloeobacter violaceus</i>	PCC 7421	NR074282	–

¹Accession numbers marked with Bold are newly sequenced cyanobacteria.²Sequence of *Oculatella hafneriensis* used in the study was provided by Jeffrey R. Johansen (John Carroll University, University Heights, USA) via personal communication and submitted by us to NCBI.

3.2.3. Знахідка рідкісної ціанобактерії роду *Crinalium* з піщаних дюн узбережжя Балтійського моря (Німеччина)



<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.400.3.4>

New record of the rare genus *Crinalium* Crow (Oscillatoriales, Cyanobacteria) from sand dunes of the Baltic Sea, Germany: epitypification and emendation of *Crinalium magnum* Fritsch et John based on an integrative approach

TATIANA MIKHAILYUK^{1,2,3*}, OKSANA VINOGRADOVA¹, ANDREAS HOLZINGER², KARIN GLASER³, ELENA SAMOLOV³ & ULF KARSTEN³

¹M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Tereshchenkivska Str. 2, Kyiv 01004, Ukraine

²Department of Botany, Functional Plant Biology, University of Innsbruck, Sternwartestrasse 15, A-6020, Innsbruck, Austria

³University of Rostock, Institute of Biological Sciences, Department of Applied Ecology and Phycology, Albert-Einstein-Strasse 3, Rostock, D-18057, Germany

* Corresponding author (t-mikhailyuk@ukr.net)

Abstract

Representatives of the Gomontiellaceae (Oscillatoriales) are rare and hence unstudied cyanobacteria with unusual morphology, distributed in terrestrial and aquatic habitats all over the world. Investigation of the group based on an integrative approach is only beginning, and to understand the actual biodiversity and ecology, a greater number of cultivated strains is necessary. However, some ecological traits of these cyanobacteria (e.g. low population densities, the absence of conspicuous growth in nature) led to methodological difficulties during isolation in culture. One species in the family Gomontiellaceae, *Crinalium magnum* Fritsch et John, is characterized by prominent wide and flattened trichomes, and represented by the non-authentic strain SAG 34.87. Detailed previous investigation of this strain clearly showed its morphological discrepancy with the original description of *C. magnum* and the genus *Crinalium* in general. The new isolate from maritime sand dunes of the Baltic Sea coast (Germany), however, revealed morphological characters completely corresponding with the diagnosis of *C. magnum*. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequences indicated a position of the new strain inside Gomontiellaceae. Both morphology and ultrastructure of the strain are congruous with characters of the family. Epitypification and emendation of *C. magnum* are proposed since the ecology and habitat of the original strain are congruent with the type locality of this rare species (sand, Irish Sea coast, North Wales, UK). We expanded the description of *C. magnum* by details of the filament development and specified dimensional ranges for trichomes and cells, as well as by new data about the transversely striated structure of mucilaginous sheath.

Key words: *Crinalium magnum*, epitypification, Gomontiellaceae, integrative approach, mucilaginous sheath, 16S rRNA, 16S-23S ITS, phylogeny, TEM

Introduction

The morphologically peculiar cyanobacterial genus *Crinalium* Crow is still poorly known. It belongs to the family Gomontiellaceae, with all the morphological features characteristic for its members: an unusual form of trichomes in the cross-section, very short cells, and a peculiar arrangement of thylakoids (Komárek & Anagnostidis 2005). Its main diacritical features are flattened trichomes, oval in cross-section. The genus (with type species *C. endophyticum* Crow) was described from mucilaginous colonies of *Aphanocapsa* Nägeli inhabiting wet rocks on a river-bank in North Wales (Crow 1927). Currently, *Crinalium* is represented by four species (Guiry & Guiry 2019), which are all free-living except the endogloecic *C. endophyticum*. *Crinalium glaciale* Broady et Kibblewhite (1991) was recorded in cryoconite pools on Antarctic glaciers. Two species described from biological soil crusts covering coastal sand dunes include *C. magnum* Fritsch et John (1942) from the Irish Sea coast in Great Britain and *C. epipsammum* Winder, Stal et Mur (1990) from the Northern Sea coast in the Netherlands. The latter is the only representative of the genus, which was comprehensively described based not only on morphological, but also on ultrastructural, biochemical and genetic data (Winder *et al.* 1990).

In spite of its characteristic appearance and a rather large dimension for a cyanobacterium, *Crinalium* is a rarely occurring genus. Documented records of *C. endophyticum*, *C. epipsammum* and *C. glaciale* mainly relate to their type localities. Recent records of *C. endophyticum* in periphyton of highly polluted river in Israel (Barinova *et al.* 2004) and epiedaphic colonies on a margin of a drying pond in India (Jaiswal 2017) seem doubtful. Findings of *C. magnum* are more diverse in terms of ecological range and geographical distribution, but also quite infrequent. Information about its occurrence in modern compendiums and electronic databases is surprisingly incomplete. For example, in both editions of the “Freshwater algal flora of the British Isles” (Whitton *et al.* 2003: 61; John *et al.* 2011: 81) the genus *Crinalium* is only represented by *C. endophyticum* and, unconfirmed, *C. epipsammum* (“Several samples from the east coast of England and Scotland appear to be similar but detailed studies are needed.”). For inexplicable reasons, *C. magnum* was not included in the flora, although this taxon was described from the vicinity of Llandudno in North Wales (John 1942), which is 20 miles away from the type locality of *C. endophyticum* (Crow 1927). In the “Süßwasserflora von Mitteleuropa” *C. magnum* was mistakenly related to a “species outside Europe” as “known from India and Argentina” (Komárek & Anagnostidis 2005: 569).

In AlgaeBase (Guiry & Guiry 2019) information about the biogeographical distribution of *C. magnum* is incomplete. Type locality of this species is not given. In the section “Detailed distribution with sources”, the following is indicated: “Europe” (from Winder *et al.* 1990, which is a mistake since the paper describes *C. epipsammum*), South America: Argentina (Tell 1985), Brazil (De-Lamonica-Freire & Heckman 1996), South West Asia: India (Gupta 2012”).

The description of *C. magnum* was based on the observations from a soil culture (Fritsch & John 1942), but the type material was not preserved. The strain SAG 34.87 is the only known cultured representative of this species. However, according to Bohunická *et al.* (2015) a comprehensive analysis of members of the family Gomontiellaceae, including information of cell dimensions, filament length and circular shape in cross-section testify that the strain SAG 34.87 does not correspond to either the original diagnosis of *C. magnum* (Fritsch & John 1942) or to the genus *Crinalium* in general (see below). It could be possible that the strain SAG 34.87 belongs to *Hormoscilla* Anagnostidis et Komárek species rather than *Crinalium*.

During the investigation of biological soils crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast (Germany) that yield several interesting taxa (Mikhailyuk *et al.* 2019), a cyanobacterium was discovered that was characterized by wide, flattened, ribbon-like trichomes and very short cells, which morphologically corresponding to *Crinalium magnum*. This new strain was isolated in culture and conducted a complex investigation, including the morphology of trichomes, the ultrastructure of cells, and molecular-phylogenetic analysis. The obtained material allowed us to improve the description of the species and to conduct its epitypification. Since the type species was unavailable for genetic analysis, the strain Hg-6-6 was selected as the epitype supported by molecular phylogenetic data.

Materials and methods

Strain isolation and culture conditions

The strain mentioned in the study was isolated from the samples of biological soil crusts collected from the coastal sand dunes in Heiligendamm (Mecklenburg-Vorpommern, Germany, GPS data: 54.14486164 N, 11.8534391 E). The material was collected 25.10.2013; the strain was isolated in December 2013. The crust was dominated by *Klebsormidium crenulatum* (Kützing) Lokhorst. Fragments of the crust (approximately 6 × 6 cm in size) were collected by cutting the soil crust and transferred into a Petri dish; the samples were air-dried and stored in the dark.

A small amount of crust was placed in Petri dishes with Bold Basal agarized (1.5%) medium (1N BBM; Bischoff & Bold 1963). Cultures were grown under fluorescent light (25 μmol photons • m⁻² • s⁻¹) with a 12:12 light: dark photoperiod at +20 ± 5 °C. An unicyanobacterial culture was obtained using the stereomicroscope Olympus ZS40 (Tokyo, Japan), and purified from other organisms by multiple transfers. The purified strain was maintained under the same conditions on agarized (1.5%) BG-11 medium (SigmaAldrich; Stanier *et al.* 1971). Additionally purification of the strain from fungal contamination was performed using fungicide cycloheximide (100 mg/L of BG-11 medium) with following transferring on pure agarized BG-11 medium.

The isolated culture (Hg-6-6) is kept in the algal culture collection at the University of Rostock, Germany; the strain was also deposited in SAG, University of Göttingen, Germany (SAG 2581) and culture collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine (IBASU-A-693). From the culture, a herbarium specimens were prepared—a young (3 weeks old) culture was preserved in 2% and 4% formaldehyde, in a 15 ml glass bottles. Preserved material was then deposited in the Algotheca of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine (AKW-32501).

Light and transmission electron microscopy

Morphological examinations started with 2 week-old cultures and continued during the 6 months of cultivation; old cultures (aged 8 months and more) were also studied to provide details on the development of the filaments. The study was performed using an Olympus BX51 light microscope with Nomarski DIC optics. Photomicrographs of living material were taken with digital camera Olympus UC30 attached to the microscope, and processed by software cellSens Entry. Average values of the dimensional measurements (x_a) were calculated using Microsoft Excel. Mucilage was stained with both drawing ink and an aqueous solution of methylene blue.

Samples were fixed for transmission electron microscopy (TEM) using a standard chemical fixation protocol (2.5% glutaraldehyde, 1% OsO₄ in 10 mM cacodylate buffer, pH=6.8) according to Holzinger *et al.* (2009). Samples were dehydrated in increasing ethanol concentrations, transferred to modified Spurr's resin and heat polymerized. For TEM ultrathin sections were prepared, counterstained with uranyl acetate and Reynold's lead citrate, and investigated in Zeiss LIBRA 120 transmission electron microscope at 80 kV. Images were captured with a TRS 2k SSCCD camera and further processed using Adobe Photoshop software (Adobe Systems Inc., San José, California, USA).

DNA isolation, PCR, sequencing and phylogenetic analysis, secondary structure of RNA

DNA of the cyanobacterial strain was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences of the 16S rRNA gene together with 16S-23S ITS region were amplified using Taq PCR Mastermix Kit (Qiagen GmbH), and primers SSU-4-forw and ptLSU C-D-rev (Marin *et al.* 2005) in a thermocycler Tgradient Thermoblock (Biometra, Germany) under the conditions described in a previous paper (Mikhailyuk *et al.* 2016). PCR products were cleaned using a Qiagen PCR purification kit (Qiagen GmbH) according to the manufacturer's instructions. Cleaned PCR products were sequenced commercially by Qiagen Company using primers SSU-4-forw, Wil 6, Wil 12, Wil 14, Wil 5, Wil 9, Wil 16, and ptLSU C-D-rev (Wilmotte *et al.* 1993; Marin *et al.* 2005). The resulting sequence (16S rRNA gene, partial sequence; 16S-23S ITS region, complete sequence; and 23S rRNA gene, partial sequence) was assembled and edited using Geneious software (version 8.1.8; Biomatters); it was deposited in GenBank under the accession number MK211234.

In order to find the closest relative to our strain, nucleotide sequences of the Synechococcales and Oscillatoriales representatives available in GenBank, as well as the BLASTn queries (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) were used. Multiple alignment of the 16S rRNA gene nucleotide sequences were made using MAFFT web server (version 7, Katoh & Standley 2013), followed by the manual editing in program BioEdit (version 7.2). The evolutionary model that fitted best to the used dataset was selected based on the lowest AIC value (Akaike 1974) calculated in MEGA (version 6, Tamura *et al.* 2013).

The phylogenetic tree based on the Bayesian inference analysis was computed in MrBayes 3.2.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) using an evolutionary model GTR + G + I with 5,000,000 generations. For the Bayesian analysis two runs of the four Markov Chain Monte Carlo were made simultaneously, with the trees taken every 500 generations. Split frequencies between runs were below 0.01 at the end of calculations. The trees selected before the likelihood rate reached saturation were subsequently rejected. The tree topology was verified by the maximum likelihood analysis (ML) made with the program GARLI 2.1., and the neighbor-joining analysis (NJ) based on sequence differences with uniform rates in 1,000 bootstrap replications, calculated with MEGA (version 6, Tamura *et al.* 2013). Genetic distances inside the family Gomontiellaceae were calculated in the program MEGA using uniform rates.

Models of the secondary structure of 16S-23S ITS region of the cultured strains of *Crinalium* and *Hormoscilla* were built according to the model proposed in Hašler *et al.* 2014. Helices were folded with the online software Mfold (Zuker 2003) and visualized in the online tool PseudoViewer (Byun & Han 2009).

Results

Molecular phylogeny and secondary structure of 16S-23S ITS region

Phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequence comparison showed that the investigated original strain Hg-6-6 joined the clade of the family Gomontiellaceae (Fig. 1). All members of this clade including several environmental sequences showed close similarity and formed a separate highly supported lineage within Oscillatoriales. The isolate Hg-6-6 represented a separate lineage within Gomontiellaceae, among other strains of the genera *Hormoscilla* and *Crinalium*. Pairwise comparison of 16S rRNA gene sequences of different Gomontiellaceae strains, *Hormoscilla*, *Crinalium*, and *Starria* Lang, as well as outgroup taxon *Komvophoron hindakii* Hašler et Poulíčková, showed a close similarity of representatives of the family (Table 1). The identity of nucleotides of 16S rRNA gene of the two related genera strains *Hormoscilla* and *Crinalium* varied from 99.0 to 100%.

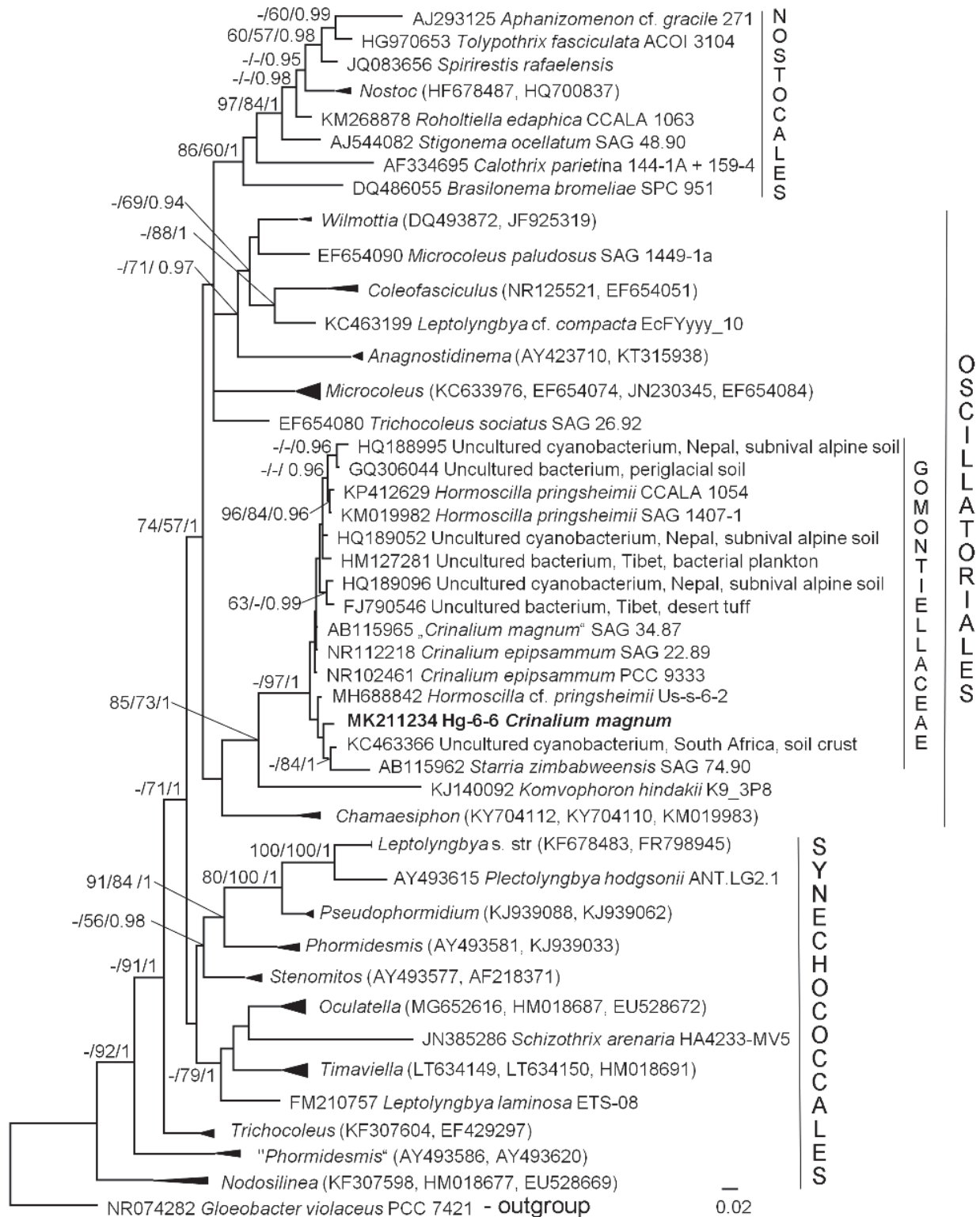


FIGURE 1. Molecular phylogeny of Synechococcales and Oscillatoriales based on 16S rRNA sequence comparisons. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP), Maximum Likelihood and Neighbor Joining bootstrap support (BP). From left to right, support values correspond to Neighbor Joining, Maximum Likelihood BP and Bayesian PP; BP values lower than 50% and PP lower than 0.8 not shown. Strain in bold represents newly sequenced cyanobacteria. Clade designations follow Osorio-Santos *et al.* (2014) and Bohunická *et al.* (2015).

Secondary structures of the main informative helices (D1-D1', Box-B and V-3) of region 16S-23S ITS of newly sequenced strain Hg-6-6 and publically available sequences of strains *Hormoscilla pringsheimii* (SAG 1407-1 (KJ140105), CCALA 1054 (KP412629) and Us-s-6-2 (MH688842)) and *Crinalium epipsammum* (PCC 9333(CP003620)) showed general similarity especially prominent among *Hormoscilla* strains (Fig. 2). Helices of *Crinalium* strains were characterized by increase of internal (V-3) and terminal loops (Box-B) and elongation/shortening of the upper part of helix D1-D1' due to numerous insertions or deletions of base pairs.

TABLE 1. Percent identity of the 16S rRNA gene (1053 positions) of the cultured representatives of the family Gomontiellaceae in comparison with the closest relative.

Taxa, strains	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>Crinalium magnum</i> Hg-6-6								
2 “ <i>Crinalium magnum</i> ” SAG 34.87	99.3							
3 <i>Crinalium epipsammum</i> SAG 22.89	99.3	100						
4 <i>Crinalium epipsammum</i> PCC 9333	99.2	99.9	99.9					
5 <i>Hormoscilla pringsheimii</i> SAG 1407-1	99.3	99.2	99.2	99.1				
6 <i>Hormoscilla pringsheimii</i> CCALA 1054	99.1	99.1	99.1	99.0	99.9			
7 <i>Hormoscilla</i> cf. <i>pringsheimii</i> Us-s-6-2	99.2	99.7	99.7	99.6	99.1	99.0		
8 <i>Starria zimbabwensis</i> SAG 74.90	96.4	96.6	96.6	96.5	96.7	96.7	96.7	
9 <i>Komvophoron hindakii</i> clone K9 3P8	91.1	91.5	91.5	91.5	91	90.8	91.2	90.5

Morphological observations

Thick filaments in a colorless sheath were found in an enrichment culture of the sand dune biological soil crust. The cyanobacteria formed bright blue-green spots, several millimeters in diameter on the agar surface. Preliminarily identified as a species of *Lyngbya* Agardh ex Gomont, closer examination revealed the flattened shape of the trichomes, oval in cross-section. Therefore, this isolate was identified as a representative of the genus *Crinalium*. Comparison of morphological features of our strain with known taxa of this genus showed close similarity to *C. magnum* (see below). Morphological characters of the investigated strain, in comparison to the other species of the genus, were summarized in Table 2.

Due to the isolation of the *C. magnum* strain Hg-6-6, the possibility to study the characteristics of the development of filaments and the details of cell morphology was given. Single filaments, developing on the surface of the agar, gradually formed irregular clusters and bright blue-green colonies with a smooth surface. Depending on the age, the length of the trichomes varied from several tens to hundreds of microns (Figs 3 A, B, H–K). In young cultures they were relatively long; with aging trichomes disintegrated into either fragments containing a small number of cells or even single cells. Filaments were straight or bent, strap-shaped (Figs 3 C–E), and oval in cross-section (Fig. 3 I). Trichomes were bright blue-green, flattened from the sides, slightly constricted at the non-granulated cell walls, not getting narrow at the ends, 5–7 μm thick ($x_a = 6.37\mu\text{m}$), (9.5) 10–16 (18) μm wide ($x_a = 13.76$). Cells were always shorter than the trichome width, 2–4 μm long ($x_a = 2.86 \mu\text{m}$). Terminal cells were rounded, sometimes with slightly thickened cell wall (Figs 3 F, G).

Mucilaginous sheath appeared colorless, poorly visible without staining (Figs 3 J, K). After staining with drawing ink it became apparent as 5–8 μm thick envelope, with uneven but distinct margins (Figs 4 A–C). Staining with an aqueous solution of methylene blue showed a distinctive structure: exopolysaccharide (EPS) layer around the trichomes formed wide, transversely striated envelope (Figs 4 D–I). The EPS envelope completely covered the trichomes, and its striped appearance was not due to the folded surface of the sheath. Mucous microfibrils radiated from the cell wall, perpendicular to the trichome plane (Fig. 4 E), and were arranged in rows closely associated with the cross cell walls (Fig. 4 I).

Ultrastructure

TEM of the strain Hg-6-6 revealed thylakoids arranged both peripheral and parallel to the cell wall, organized as helically twisted tangles in the cytoplasm (Figs 5 A–F). The cell wall had an uneven surface and contained rows of junctional pores. They were located circumferentially and closely associated with the cross walls from both sides (Fig. 5 C). Inclusions observed in the cells were identified as carboxysomes and cyanophycine granules (Figs 5 B, D–F).

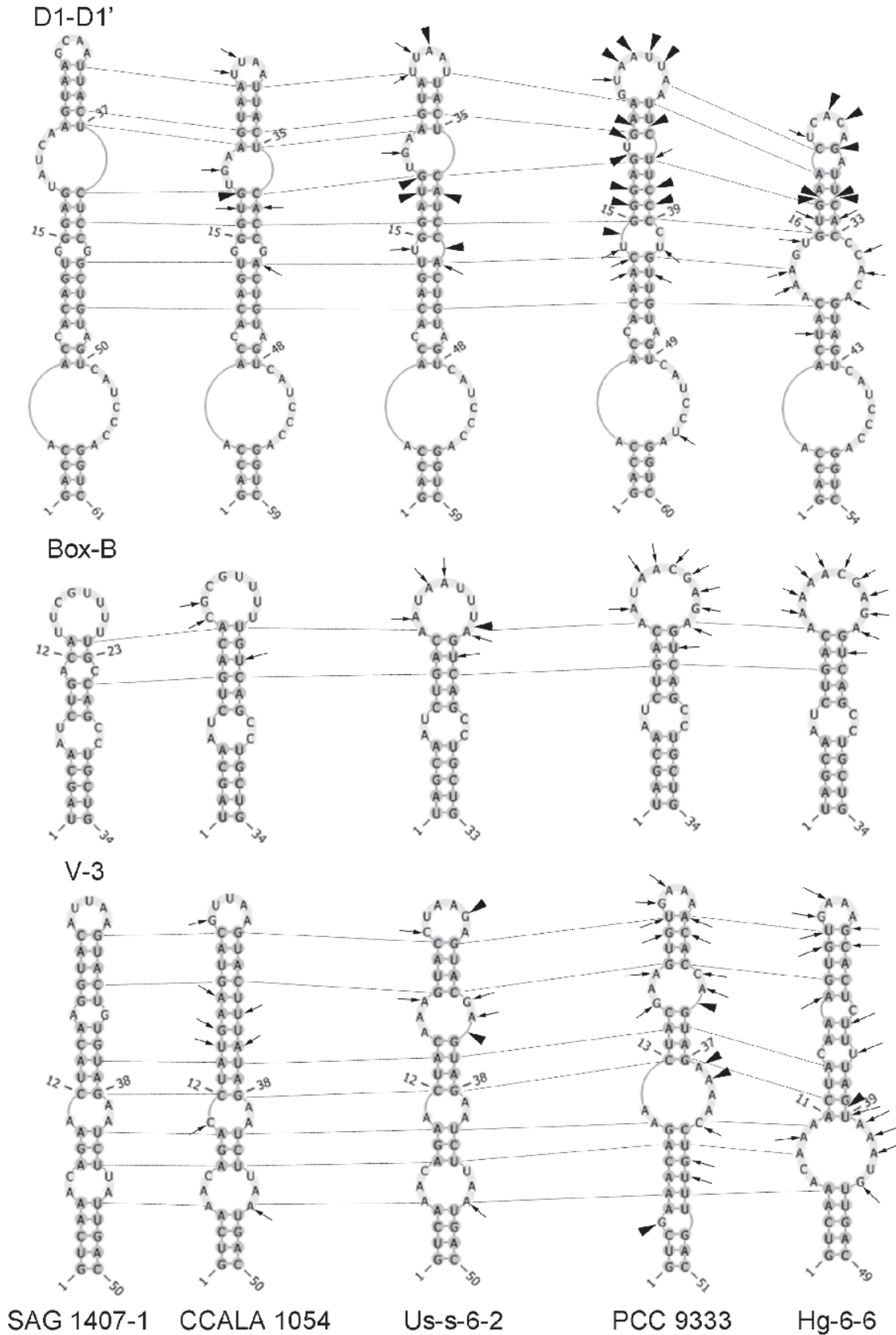


FIGURE 2. Secondary structure of the main informative helices of region 16S-23S ITS of cultured strains of *Hormosclira* and *Crinalium*. All differences between strains are presented in comparison with authentic strain of *H. pringsheimii* (SAG 1407-1). Variable bases are shown with arrows, places of insertions/deletions of base pairs are marked with arrowheads, homologous base pairs among different strains are indicated with dotted lines.

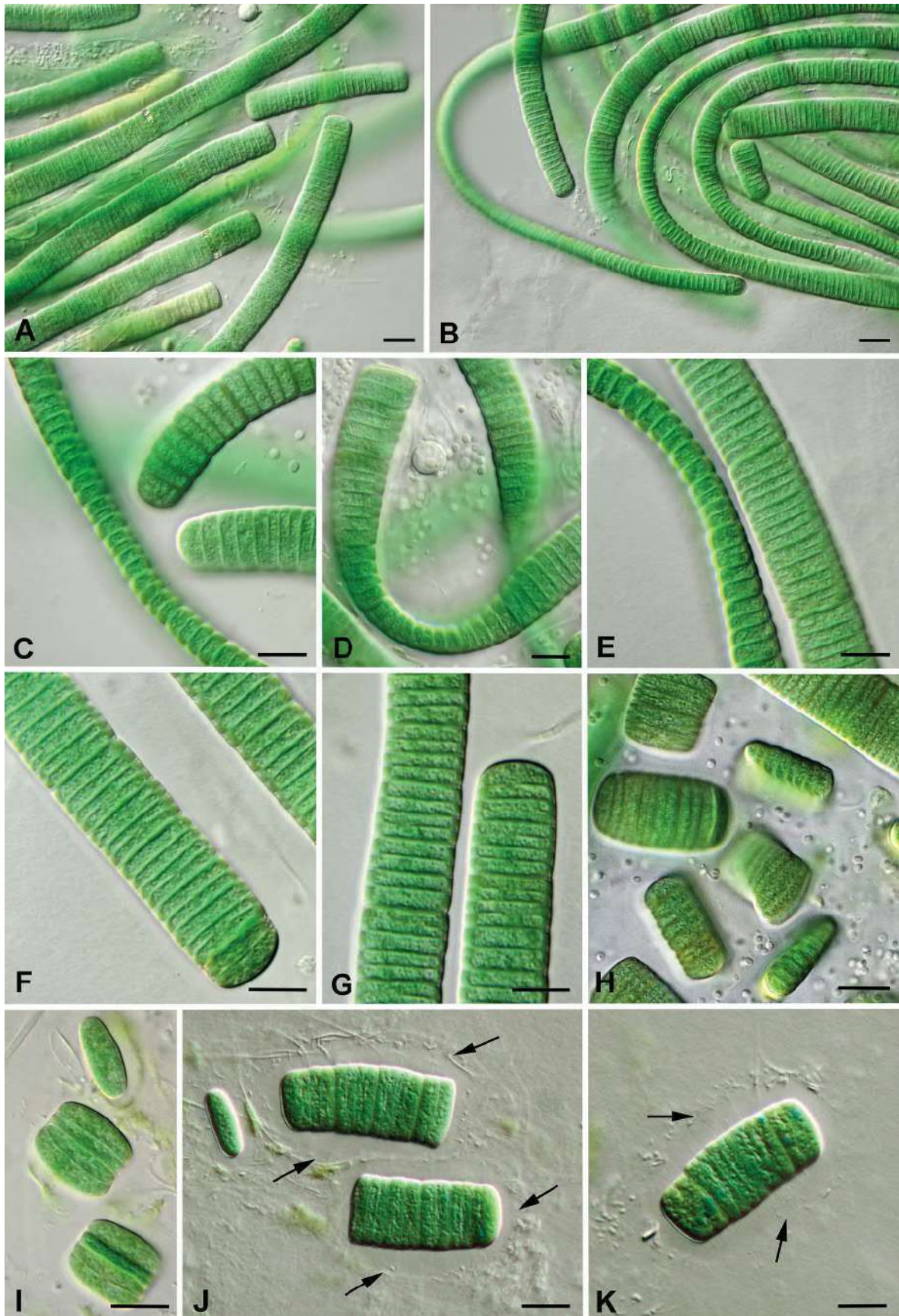


FIGURE 3. Light micrographs showing an overview of living filaments of *Crinalium magnum* strain Hg-6-6. A, B. Irregular clusters with trichomes varying in length. C–E. Trichomes lying in two planes. F, G. Details of trichomes and terminal cells with a thickened outer margin. H–K. Fragmentation of trichomes in old cultures (6 and more months). Arrows mark the sheath. Scale bars: 10 μ m

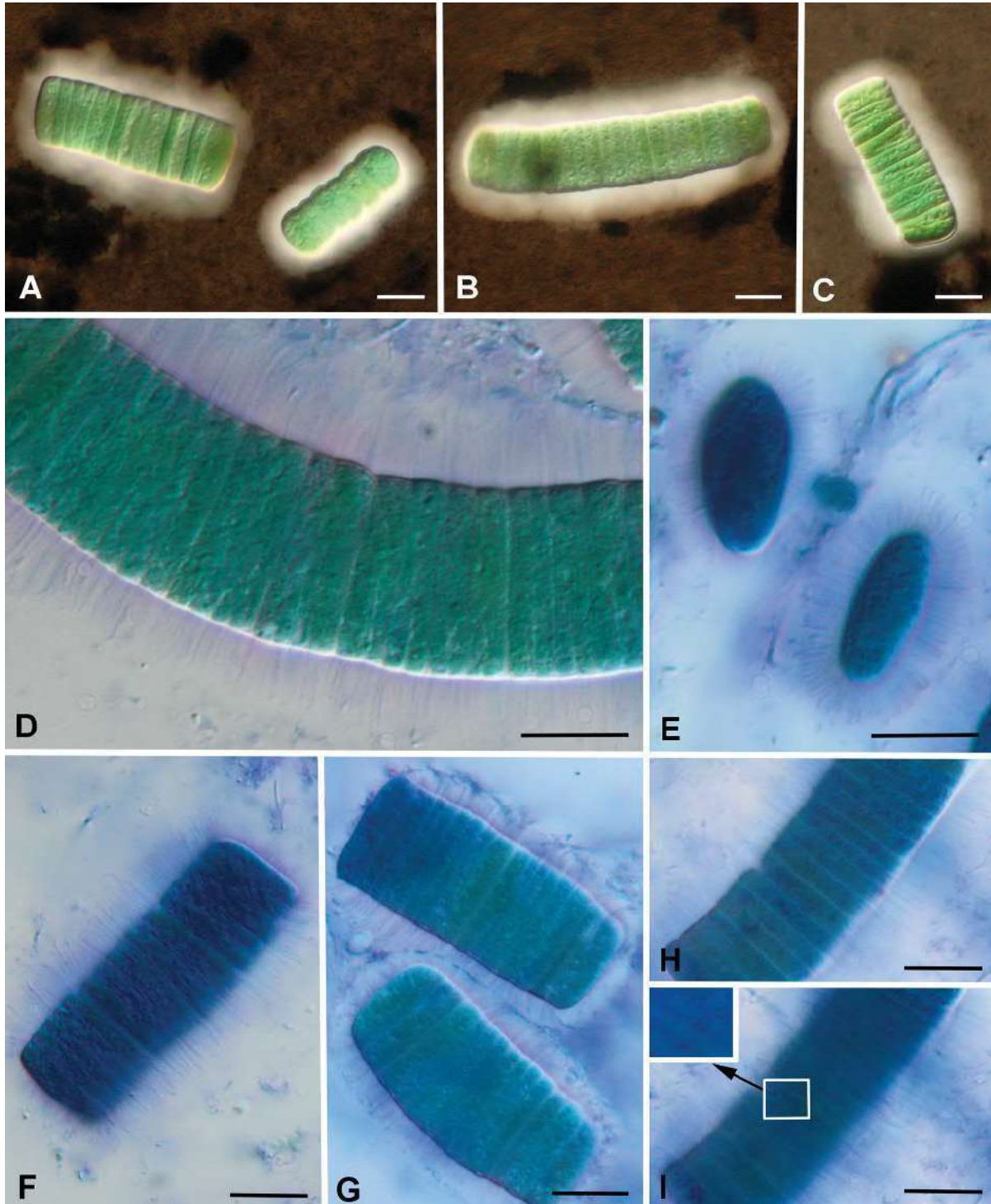


FIGURE 4. Staining of mucilage envelope of *Crinalium magnum* Hg-6-6. A–C. Staining with drawing ink showed diffuent mucilage envelope. D–I. Staining with methylene blue showed striated structure of mucilage. E. Separate cells in lateral position with mucous microfibrils radiated from the cell wall. H, I Trichome in optical section (H) and in surface view (I) with increased portion showed mucous microfibrils arranged by rows along cross cell walls. Scale bars: 10 μ m

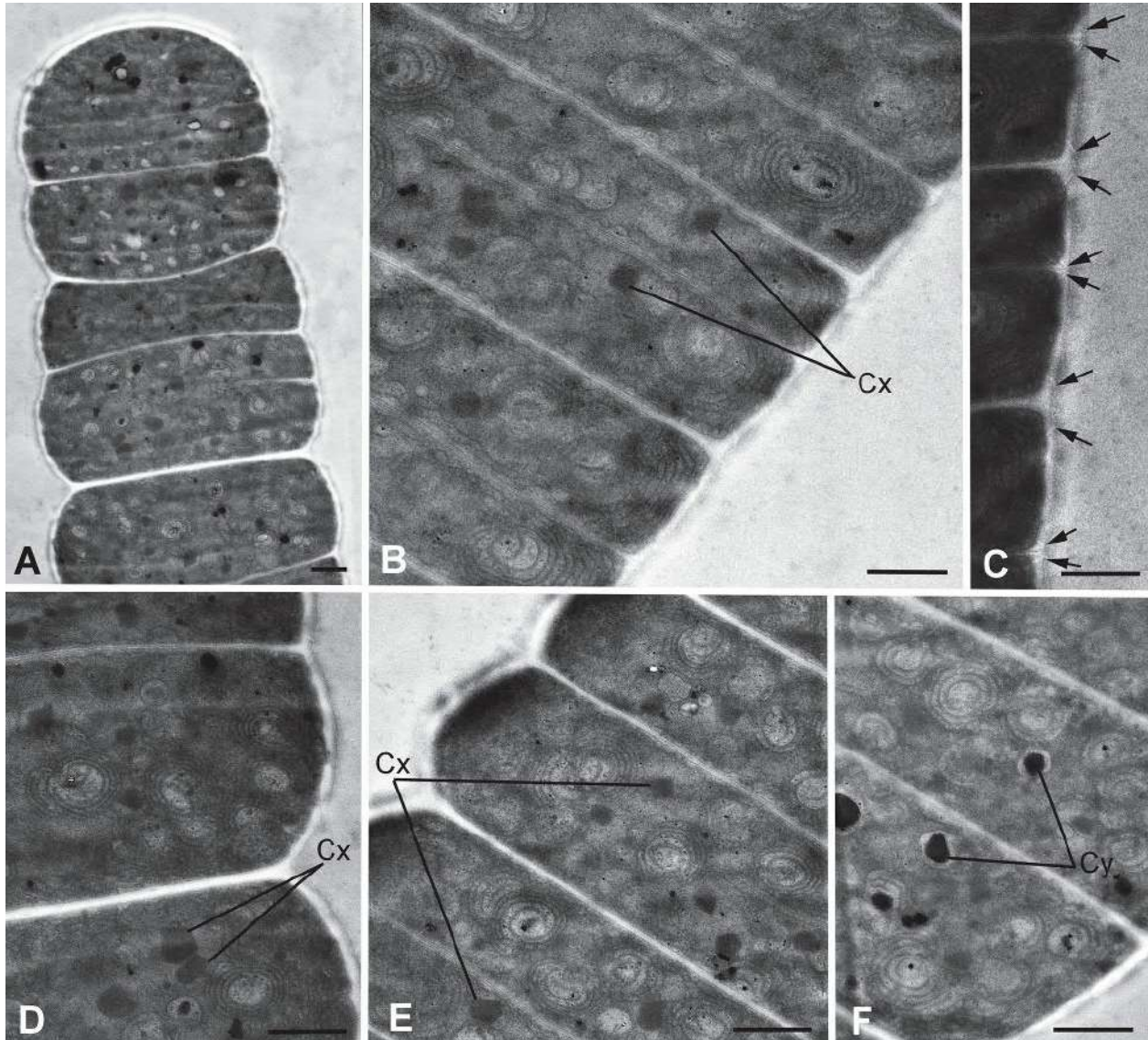


FIGURE 5. Ultrastructure of *C. magnum* strain Hg-6-6. A. Longitudinal section of the trichome showing its general organization. B, D–F. Portions of filaments showing typical arrangement of helically twisted, swirl-like thylakoids and cell inclusions. C. Junctional pores (arrows) closely associated with the cross walls. Cx, carboxysomes; Cy, cyanophycin granules. Scale bars: 1 µm

Discussion

Placement of Crinalium magnum in the molecular phylogeny of Gomontiellaceae

Molecular phylogenetic analyses based on the 16S rRNA gene revealed close relationship of the strain Hg-6-6 to the other representatives of the family Gomontiellaceae. It once again confirmed the monophyly of this family, with the genus *Komvophoron* as a sister group and its placement inside Oscillatoriales (Hašler *et al.* 2014; Bohunická *et al.* 2015, see Fig. 1). Recently it was also found that representatives of the Gomontiellaceae are closely related with *Chamaesiphon* Braun (Kurmayer *et al.* 2017) that was also shown on our phylogenetic tree (see Fig. 1).

However, the position of *Crinalium* strains on the phylogenetic tree raises a question of relationship between the genera (namely *Crinalium* and *Hormoscilla*). In our research, the original strain of *C. magnum* Hg-6-6 forms a separate lineage and is nested among strains of both genera. Bohunická *et al.* (2015) also noted a high molecular similarity of the mentioned genera despite clear morphological differences (flattened versus non-flattened trichomes). The pair-wise nucleotide identity of the 16S rRNA gene of *Crinalium* strains SAG 34.87, SAG 22.89 and Us-s-6-2, and *Hormoscilla* strains SAG 1407-1 and CCALA 1054 was 99%. Strains SAG 34.87 and SAG 22.89, representing “*Crinalium magnum*”

and *C. epipsammum*, showed 100% similarity (Bohunická *et al.* 2015; Table S3). Despite the fact that calculated levels of pairwise similarity are much higher than that required for the separation of genera (Stackebrandt & Goebel 1994), the authors came to the conclusion that clear morphological and ecological differences between *Hormoscilla* and *Crinalium* “provide a solid basis for retaining their taxonomic resolution in the framework of a polyphasic approach” (Bohunická *et al.* 2015: 1045). The inclusion of Hg-6-6 here confirmed that the strains of both genera are closely related (see Table 1). Therefore, generic borders inside Gomontiellaceae are still unclear and perhaps generic concept should be clarified in future with more strains included in the analysis. On the other hand perhaps 16S rRNA is not sufficient marker for some closely related cyanobacterial taxa, therefore other genetic markers should be used in order to resolve relationships within Gomontiellaceae.

For better resolution secondary structures of the main informative helices of 16S-23S ITS region of *Hormoscilla* and *Crinalium* were used (see Fig. 2). These structures are also characterized by similarity. Although some differences are visible among representatives of two genera, *Hormoscilla* and *Crinalium*, due to numerous insertions/deletions of base pairs in the last genus. Unfortunately secondary structure of RNA of authentic strain of *Crinalium epipsammum* (SAG 22.89) was not analyzed since 16S-23S ITS fragment is not publically available. Therefore perhaps analysis of secondary structure of 16S-23S ITS region of all available strains of Gomontiellaceae will give more information for better understanding generic borders of two genera.

Hg-6-6 is genetically (and morphologically, see below) distant from the strain SAG 34.87, which was previously identified as *C. magnum* (see Fig. 1). Some doubts concerning morphological and genetic data regarding the strain SAG 34.87 were already expressed in Bohunická *et al.* (2015) and discussed below.

Morphology and ultrastructure of *Crinalium magnum*

The morphological characters of strain Hg-6-6 completely correspond with the diagnosis of *C. magnum* (Fritsch & John 1942; see Table 2). They share the same cell dimensions, characteristics of the filaments (both short and long, ensheathed, sheath closed at the apices) and trichomes (not narrowed at the ends, slightly constricted at the ungranulated cell walls, terminal cells with slightly thickened outer margin). Morphology of the strain SAG 34.87 previously identified as *C. magnum* essentially differs from the species description, in terms of the cell size and shape, and morphologically resembles a *Hormoscilla* species (Bohunická *et al.* 2015). However, genetically this strain is close to *Crinalium epipsammum*, which contradicts the morphological data (e.g. non-flattened trichomes) (see Fig. 1, Bohunická *et al.* 2015). Anyway, strain SAG 34.87 is genetically distant from Hg-6-6, hence it represents another taxon which is not related (morphologically or genetically) to *Crinalium magnum*.

Morphological observations of *C. magnum* Hg-6-6 supplemented the description of this species by details of the filament development and refined dimensional ranges for the trichomes and cells (see Table 2). The present study provides new information concerning the EPS envelope, which is also interesting in the context of the genus as a whole: the presence of the sheath in *Crinalium* was doubted since the publication of Crow (1927). Indeed, the protologue described very briefly: “Trichomes ... vaginate, sheath thin...” (Crow 1927, p. 165). However, in the cited paper one can find additional details concerning the sheath: “... each filament consists in the adult state of trichome and sheath ... the sheath is thin but clearly defined, membranous, slightly brownish... the thickness of the sheath being less than 1 µm” (Crow 1927: 161–162). Unfortunately, the quality of the figure with a “... portion of filament with trichome broken, showing sheath” (Crow 1927: 164, Fig. 2 B) is extremely poor. This was the reason both Geitler (1932: 981) and Elenkin (1949: 1847) doubted the presence of a sheath in *Crinalium*. The description of *Crinalium* given in “Süsswasserflora” (Komárek & Anagnostidis, 2005: 568) also states: “Sheaths lacking, or form very fine and diffluent gelatinous layer enveloping the trichome”. At the same time, in the description of *C. magnum* var. *colloncurensis* Guarrera (also cited in *Süsswasserflora*) filaments in mucilaginous envelopes which formed mucous masses on rocks are described (“Filamentos... unidos por contacto de las vainas individuales formando masas gelatinosas...”) (Guarrera *et al.*, 1995: 290).

Actually, three from the four known species of the genus have ensheathed filaments (see Table 2). In protologues of *C. magnum* and *C. glaciale* it was noted that the sheath was visible only after staining. In both cases, drawing ink was used for the visualization of sheath. In this study we observed the presence of EPS layer around trichomes (similar to the ones shown in Fig. 8 (A) in Fritsch & John 1942) even without staining. As seen from the micrographs, the sheath of filaments both unstained (Figs 3 J, K) and stained with drawing ink (Figs 4 A–C) look homogenous. Staining with methylene blue revealed a thick and transversely striated sheath in *C. magnum* (Figs 4 D–I). It is known that sheath with microfibrils radiating from the cell wall surface is typical for immotile trichomes (Komárek & Anagnostidis 2005: 27). The sheath structure of *C. magnum* strain Hg-6-6, and the fact that no signs of motility in the material studied here suggests immotility of this species. However, Fritsch & John (1942: 393) claimed the opposite: “the isolated threads being usually buried in the sand of the moist culture”; so further study is necessary.

TABLE 2. Comparison of morphological features of the strain Hg-6-6 with species of the genus *Crinalium* Crow based on their protologues (a dash indicates the absence of data).

Character	<i>C. endophyticum</i> Crow 1927	<i>C. epipsammum</i> Winder, Stal et Mur 1990	<i>C. epipsammum</i> Broadly et Kibblewhite 1991	<i>C. magnummagnum</i> Fritch et John 1942	<i>C. magnum</i> var. <i>colloncurense</i> Guarrera in Guarrera <i>et al.</i> 1995	<i>C. magnummagnum</i> Hg-6-6
Filaments	doubled by means of a bend about their middle, often coiled in a lax spiral, have the form of a hairpin	straight or irregularly wavy	single, not aggregating to form a visible plant mass, straight, never hooked	straight, never spirally twisted or bent	single or connected by mucous envelopes, forming gelatinous masses of uncertain morphology Present	single or in irregular clusters, straight or bent
Sheath	thin but clearly defined, membranous, slightly brownish	absent	completely surrounding the trichomes including the apices, homogeneous, colourless, up to 4 µm thick	narrow, diffluent, closed at the ends and visible only after staining		colorless, 5–8 µm thick, after staining looks transversely striated
Trichome length	40–250 µm	varies with culture conditions,	10–200 µm, mostly 40–110 µm	reaches a length of 0.5 mm, although most of them are shorter	–	varies from several tens to hundreds of microns, starts to be shorter with aging of culture 5–7 µm
Trichome thickness	–	200–400 (1000) µm	7.5–9 µm	–	–	–
Attenuation to the ends	slightly attenuated	not attenuated	not attenuated	not attenuated	–	not attenuated
Constrictions	not constricted	slightly constricted	distinctly constricted	slightly constricted	slightly constricted	slightly constricted
Cell width	2–3(4) µm	5–7 µm	13–26 µm,	up to 18 µm	12 µm	13–18 µm
Cell length	–	1.0–1.5 µm	mostly 18–22 µm, 1.5–3.5 µm	1.5–3 µm	2.5–4.5	2–4 µm
End cells	conical-rounded	not different in morphology from intercalary cells	rounded to broadly conical, usually slightly longer than intercalary cells, up to 5 µm long	slightly longer than the others, with a convex and slightly thickened outer margin on the surface of the	convex and longer, with or without thickening on the outer wall	rounded, sometimes with slightly thickened cell wall
Occurrence	endogloecic in mucilage of <i>Aphanocapsa fonticola</i>	surface layer of sandy soil of coastal dunes of the Northern Sea, the Netherlands	amongst sediments in cryoconite ponds on glaciers in southern Victoria Land, Antarctica	seaside sand-dunes, coast of the Irish Sea, North Wales, UK	epilithic, Kollon Kura River, Argentina	in biological soil crusts on the sand dunes, coast of the Baltic Sea, Heiligendamm, Mecklenburg-Vorpommern, Germany

TEM of the strain Hg-6-6 revealed ultrastructural pattern typical for representatives of the family Gomontiellaceae, mostly because of specific helically twisted, swirl-like thylakoids (Komárek *et al.* 2014; Bohunická *et al.* 2015). We also found junctional pores closely associated with the cross walls, their organization into multiple parallel rows is a unique feature of the family (Bohunická *et al.* 2015). TEM micrographs from this article (Bohunická *et al.* 2015, Figs 2 e, f) also showed EPS excretion from the cells of *Hormosilla pringsheimii* Anagnostidis et Komárek to some extent similar to the striated sheath of *C. magnum* Hg-6-6 observed by us on LM level (see Figs 4 D–I). As can be seen from these figures, mucous microfibrils radiate from the cell wall perpendicularly to trichome plane, and they are arranged in rows closely associated with cell cross walls (see Fig. 4 I). Thus, it is possible to assume that junctional pores may be responsible for the EPS excretion and formation of the striated sheath. Function of junctional pores is still a disputable question (Bohunická *et al.* 2015). Observations via light microscopy of the secretion process in two species of Oscillatoriales and Nostocales provided direct evidence that the junctional pore complex is the actual site of mucilage secretion (Hoiczky & Baumeister 1998). As was recently shown using TEM phylogenetically related to Gomontiellaceae species of *Chamaesiphon* are also characterized by presence of numerous pores in cell wall excreting mucilage (Kurmayer *et al.* 2017).

Ecology and distribution of *Crinalium magnum*

Initially, *C. magnum* was characterized as a species confined to sandy soils (John 1942); the following findings strongly expanded its ecological range. *C. magnum* was cited from India where it was recorded in red soil (Mitra 1951), rice fields (Sanyal *et al.* 2012), thermal springs (Pathan 2014), stagnant water (Jaiswal 2017), and even in the soil of cyanide damps where it occurred as an abundantly growing taxon (Karthikeyan 2016). This species was also found in the phytoplankton of a shallow lake in Argentina (Guarrera *et al.* 1972) and in a rain pool in Brazil (Heckman 1998). In Antarctica, *C. magnum* was reported from mineral soils and growing epiphytically on mosses of the Victoria Land (Broady 1986). At first glance, these data show a species with wide ranges of both ecological tolerance and geographical distribution. Unfortunately, most findings of *C. magnum* in the mentioned papers are limited to its name and did not provide any descriptions, figures or molecular data, therefore it is impossible to assess their reliability.

Our record of this species fully complies with the type locality of *C. magnum* characterizing it as an inhabitant of epipsammon. Our finding is quite close to the type locality, ecologically and geographically since *C. magnum* was described from marine coastal sand dunes in North Wales, UK (John 1942).

The introduction of molecular analyzes in the practice of studies of cyanobacterial diversity will help to accurately identify the limits of ecological tolerance of this species. Recent molecular investigation of Gomontiellaceae showed that different taxa of the group are quite common in environmental samples from terrestrial habitats all over the world (Bohunická *et al.* 2015). On the other hand, they are characterized by low population densities and usually do not produce high biomass in nature, therefore they are frequently overlooked on a morphological level. The same reasons cause technical difficulties during the isolation of these species and the establishment of cultures. Moreover, cultivated strains of the genera *Crinalium* and *Hormosilla* are quite sensitive and slow-growing, which makes Gomontiellaceae rare and challenging cyanobacteria to study.

Proposed taxonomic treatment

Crinalium magnum Fritsch et John 1942, *Annals of Botany*, New Series 6 (23): 371–395, Fig. 8 (A), Emend. O.M. Vynogr. et Mikhailiyuk (Figs 3–5)

Emended diagnosis: Filaments solitary or in irregular clusters, straight or curved, band-shaped. Sheath hyaline, colorless, poorly visible without staining, thick, closed at the apex, with an uneven edge, 5–8 µm wide, transversely striated due to mucous microfibrils radiating from the cell wall perpendicular to trichome plane (visible after staining with methylene blue). Trichomes bright blue-green, flattened from the sides, oval in cross-section, vary in length from 20–40 µm up to 300–500 µm, (9.5) 10–16 (18) µm wide, 5–7 µm thick, not attenuated at the ends, slightly constricted at the cross-walls. Cells always shorter than wide, 1/4–1/9 times as long as wide, 2–4 µm long ($x_a = 2.86$ µm). Apical cells rounded, sometimes with a slightly thickened cell wall. Thylakoids partly arranged parietally also form helically twisted tangles in the whole cytoplasm.

Type locality: in firm sand, with or without a certain amount of humus; sand dunes on the coast of the Irish Sea near Llandudno, North Wales, UK.

Lectotype (designated here): Fig. 8 (A) in Fritsch et John 1942.

Epitype (designated here): AKW-32501, culture material of epitype strain Hg-6-6 (IBASU-A-693) preserved in 4% and 2% formaldehyde, Algotheca of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Epitype strain: Hg-6-6 was deposited in SAG, University of Göttingen, Germany, under number SAG 2581 and in the Culture Collection of the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine under number IBASU-A-693.

Comments: The epitype strain completely corresponds to the diagnosis of *Crinalium magnum* (Fritsch & John 1942). The species diagnosis was supplemented by the details of filament development and refined dimensional ranges for trichomes and cells, as well as new information concerning mucilaginous sheath structure. The epitype strain was isolated from biological soil crusts on maritime sand dunes, coast of the Baltic Sea, Heiligendamm, Mecklenburg-Vorpommern, Germany. This habitat is ecologically very similar to the type locality and is part of the same geographical region (Europe).

Acknowledgements

This study was supported by a Georg-Forster research fellowship from the Alexander von Humboldt Foundation (T.M.). The study was summarized during a stay of T.M. at the University of Innsbruck, Austria funded by a program to revise the culture collection of algae (ASIB) at the Department of Botany. U.K. thanks the Deutsche Forschungsgemeinschaft for financial support (KA899/16). The study was supported by FWF grant I 1951-B16 to A.H. K.G. gratefully acknowledges funding through the DFG, as part of the Priority Program 1991 Taxonomics (GL 909/1-1). We thank Sabrina Obwegeser, Beatrix Jungwirth and Lisa Obwegs, University of Innsbruck, Austria, for providing help in the TEM investigations. We are grateful to Sergei L. Mosyakin (M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine) for his valuable advices on nomenclatural issues and Dr. Maike Lorenz, University of Göttingen, for help during strain deposition to SAG.

References

- Akaike, H. (1974) A new look at the statistical model identification. *Automatic Control, IEEE Transactions on Automatic Control* 19: 716–723.
<https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>
- Barinova, S., Anissimova, O.V., Nevo, E., Jarygin, M.M. & Wasser, S.P. (2004) Diversity and ecology of algae from the Nahal Qishon river, northern Israel. *Plant Biosystems* 138: 245–259.
<https://doi.org/10.1080/11263500400006985>
- Bischoff, H.W. & Bold, H.C. (1963) *Phycological studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species*. University of Texas Publications 6318, Austin, 95 pp.
- Bohunická, M., Mareš, J., Hrouzek, P., Urajová, P., Lukeš, M., Šmarda, J., Komárek, J., Gaysina, L.A. & Strunecký, O. (2015) A combined morphological, ultrastructural, molecular, and biochemical study of the peculiar family Gomontiellaceae (Oscillatoriales) reveals a new cylindrospermopsin-producing clade of cyanobacteria. *Journal of Phycology* 51: 1040–1054.
<https://doi.org/10.1111/jpy.12354>
- Broady, P.A. (1986) Ecology and taxonomy of the terrestrial algae of the Vestfold Hills. In: Pickard, J. (Ed.) *Antarctic Oasis*. Academic Press, Sydney, 165–202.
- Broady, P.A. & Kibblewhite, A.L. (1991) Morphological characterization of Oscillatoriales (Cyanobacteria) from Ross Island and southern Victoria Land, Antarctica. *Antarctic Science* 3: 35–45.
<https://doi.org/10.1017/S095410209100007X>
- Byun, Y. & Han, K. (2009) PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. *Bioinformatics* 25 (11): 1435–1437.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp252>
- Crow, W.B. (1927) *Crinalium*, a new genus of Cyanophyceae, and its bearing on the morphology of the group. *Annals of Botany* 41: 161–166.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a090061>
- De-Lamonica-Freire, E.M. & Heckman, C.W. (1996) The seasonal succession of biotic communities in wetlands of the tropical wet-and-dry Climatic Zone: III. The algal communities in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil, with a comprehensive list of the known species and revision of two desmid taxa. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie* 81: 253–280.
<https://doi.org/10.1002/iroh.19960810209>

- Elenkin, A.A. (1949) *Sinezelenye vodorosli SSSR. Specialnaya (sistematicheskaya) chast (Blue-green algae of USSR. Special (taxonomic) part)*. Issue 2. AN SSSR Press, Moscow & Leningrad, 985–1908 pp. [in Russian]
- Fritsch, F.E. & John, R.P. (1942) An ecological and taxonomic study of the algae of British soils. II. Consideration of the species observed. *Annals of Botany, New Series* 6: 371–395.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088412>
- Geitler, L. (1932) Cyanophyceae. In: Rabenhorst, L. (Ed.) *Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. Akad. Verlag, Leipzig, 1196 pp.
- Guarrera, S.A., Malacalza, L. & Lopez, F.P. (1972) Fitoplancton de las aguas superficiales de la Provincia de Buenos Aires. II. Complejo lagunar Salada Grande; encadenadas del oeste y encadenadas del sur. *Revista del Museo de La Plata, Nueva Serie (Bot.)* 12 (67): 161–235.
- Guarrera, S.A., Echenique, R.O., Casco, M.A. & Labollita, H.A. (1995) Las algas del sistema del Rio Limay (Republica Argentina). 1–Cyanophyta: 2–Hormogonales (I). *Revista del Museo de La Plata, Nueva Serie (Bot.)* 14 (101): 269–305.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2019) AlgaeBase Worldwide electronic publication, Nat. Univ. Ireland, Galway. Available from: <http://www.algaebase.org> (accessed 5 April 2019)
- Gupta, P. (2012) *Algae of India Volume I. A checklist of Cyanoprokaryota (Cyanophyceae)*. Botanical Survey of India, Ministry of Environment & Forests, Salt Lake, Kolkata, pp. [i]–xii, [1]–160, 8 pls.
- Hašler, P., Dvořák, P. & Pouličková, A. (2014) A new genus of filamentous epilithic cyanobacteria, *Johansenia*. *Preslia* 86: 81–94.
- Heckman, C.W. (1998) *The Pantanal of Poconé: Biota and Ecology in the Northern Section of the World's Largest Pristine Wetland. Monographie Biologicae*, v. 77. Springer Science + Business Media, Dordrecht, 624 pp.
- Hoiczyk, E. & Baumeister, W. (1998) The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria. *Current Biology* 8: 1161–1168.
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(07\)00487-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(07)00487-3)
- Holzinger, A., Roleda, M.Y. & Lütz, C. (2009) The vegetative arctic green alga *Zygnema* is insensitive to experimental UV exposure. *Micron* 40: 831–838.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.06.008>
- Jaiswal, A.G. (2017) Genus *Arthrospira*, *Spirulina*, *Oscillatoria*, *Crinalium* and *Phormidium* of Nostocales from Sakri and Navapur, Maharashtra (India), *International Journal of Engineering Technology Science and Research* 4 (7): 129–141.
- John, R.P. (1942) An ecological and taxonomic study of the algae of British soils I. The distribution of the surface-growing algae. *Annals of Botany, New Series* 3: 323–349.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088410>
- John, D.M., Whitton, B.A. & Brook, A.J. (Eds.) (2011) *The freshwater algal flora of the British Isles*. An identification guide to freshwater and terrestrial algae. Second edition. Cambridge University Press, Cambridge, pp. i–xvii, [1]–878.
- Karthikeyan, A. (2016) Role of algae in reclamation of soil in cyanide dumps of KGF, Kolar district, Karnataka state. 12th Euro Biotechnology Congress, November 7–9, 2016 Alicante, Spain. Available from: <https://www.omicsonline.org/speaker/karthikeyan-a-kgf-first-grade-college-india/> (accessed 5 April 2019)
- Katoh, K. & Standley, D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. (2005) Cyanoprokaryota. 2. Oscillatoriales. In: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd 19/2. Elsevier Spectrum, München, 759 pp.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. & Johansen, J.R. (2014) Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014 using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295–335.
- Kurmayer, R., Christiansen, G., Holzinger, A. & Rott, E. (2017) Single colony genetic analysis of epilithic stream algae of the genus *Chamaesiphon* ssp. *Hydrobiologia* 881: 61–75.
- Marin, B., Nowack, E.C.M. & Melkonian, M. (2005) A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist* 156: 425–432.
<https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.09.001>
- Mikhailiuk, T.I., Vinogradova, O.N., Glaser, K. & Karsten, U. (2016) New taxa for the flora of Ukraine, in the context of modern approaches to taxonomy of Cyanoprokaryota / Cyanobacteria. *International Journal on Algae* 18 (4): 301–320.
<https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v18.i4.10>
- Mikhailiuk, T., Glaser, K., Tsarenko, P., Demchenko, E. & Karsten, U. (2019) Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria. *European Journal of Phycology*.
- Mitra, A.K. (1951) The algal flora of certain Indian soils. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 21: 357–373.

- Osorio-Santos, K., Pietrasiak, N., Bohunická, M., Miscoe, L.H., Kováčik, L., Martin, M.P. & Johansen, J.R. (2014) Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification. *European Journal of Phycology*, 49: 450–470.
<https://doi.org/10.1080/09670262.2014.976843>
- Pathan, A.A.A.R. (2014) Limnological and biodiversity studies of algal flora of thermal springs of Konkan Region of Maharashtra, India. *PhD Thesis*.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Sanyal A.K., Alfred, J.R.B., Venkataraman, K., Tiwari, S.K. & Mitra, S. (2012) *Status of Biodiversity of West Bengal*. Published by the Director, Zool. Surv. India, Kolkata, pp. 1–969 + 35 Plates.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B.M. (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 846–849.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* 35: 171–205.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tell, G. (1985) Catálogo de las algas de agua dulce de la República Argentina. *Bibliotheca Phycologica* 70: [i–vi], 1–283.
- Wilmotte, A., Van der Auwera, G. & De Wachter, R. (1993) Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF') strain PCC75 18, and phylogenetic analysis. *FEBS Letters* 317 (1–2): 96–100.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81499-P](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81499-P)
- Winder, B. de, Stal, L.J. & Mur, L.R. (1990) *Crinalium epipsammum* sp. nov.: a filamentous cyanobacterium with trichomes composed of elliptical cells and containing poly- β -(1,4) glucan (cellulose). *Journal of General Microbiology* 136: 1645–1653.
<https://doi.org/10.1099/00221287-136-8-1645>
- Whitton, B.A., John, D.M., Kelly, M.G. & Haworth, E.Y. (2003) *A coded list of freshwater algae of the British Isles*. Second Edition. World-wide Web electronic publication.
- Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3406–3415.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

3.2.4. Нові таксони для флори України в контексті сучасного підходу до таксономії ціанобактерій: роди *Oculatella*, *Nodosilinea* та *Roholtiella*

New Taxa for the Flora of Ukraine, in the Context of Modern Approaches to Taxonomy of *Cyanoprokaryota/Cyanobacteria**

Mikhailyuk T.I.,¹ Vinogradova O.N.¹, Glaser K.² & Karsten U.²

¹ *N.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine,*

2, Tereshchenkivskaya St., Kiev 01004, Ukraine

² *University of Rostock, Institute of Biol. Sci., Department of Appl. Ecology and Phycology,*

3, Albert-Einstein-Strasse, Rostock D-18057, Germany

t-mikhailyuk@ukr.net

ABSTRACT: In biological soil crusts from coastal sites of Ukraine a number of interesting cyanobacterial morphotypes were recorded. Characterization of seven original strains using molecular, morphological, and ecological information revealed that they belong to newly described genera of the orders *Synechococcales* (*Oculatella* Zammit, Billi et Albertano and *Nodosilinea* Perkerson et Casamatta) and *Nostocales* (*Roholtiella* M. Bohunická, Pietrasiak et Johansen). In phylogenetic analyses using sequences of the 16S *rRNA* gene, all Ukrainian strains could be assigned to clades of the corresponding genera with a high degree of support in the Bayesian and Maximum Likelihood analyses. However, their species-level identification has been successful only for one strain of the genus *Roholtiella*. The phylogeny based on the 16S *rRNA* gene concatenated with the 16S-23S ITS region of the original strain and 12 published strains of *Roholtiella* showed that the Ukrainian strain is closely related to *R. edaphica* Bohunická et Lukešová. Its *rRNA* secondary structure of the Box-B and V3 helices of the 16S-23S ITS region, and of nucleotide sequences flanking them, in main features correspond to *R. edaphica*. Original strains of genera *Oculatella* and *Nodosilinea* were quite similar to each other by the nucleotide sequences of the 16S *rRNA* gene. But, phylogenetic trees based on the 16S-23S ITS region of both original and published strains of these genera indicated that our isolates might represent new species as they form highly supported distinct clades. The findings of three new genera for the flora of Ukraine demonstrate the importance of using modern approaches for the assessment of real diversity of cyanobacteria in nature.

KEY WORDS: *Cyanobacteria*, new records, Ukraine, *Oculatella*, *Nodosilinea*, *Roholtiella*, 16S *rRNA*, 16S-23S ITS, secondary structure.

* Originally published in *Algologia*, 2016, 26(4), pp. 347–371

INTRODUCTION

Phycofloristic studies in Ukraine, covering the representatives of all taxonomic groups of algae, have been going on for over a century, accumulating a substantial amount of data concerning their species diversity, taxonomic composition, habitat, and geographical distribution (Algae ..., 2006, 2009, 2011, 2014). As for the cyanobacteria, they have been subjects of numerous floristic, taxonomic, and hydrobiological studies carried out in all natural botanical areas of the country in a wide range of habitats (inland water bodies and soils, Ukrainian sectors of the Black Sea and the Sea of Azov). A total of 64 taxa (33 species and 31 varieties and forms) new to science were described from the territory of Ukraine. Due to the efforts of the well-known Ukrainian cyanophycologist N.V. Kondratyeva and her colleagues, high-quality identification manuals of *Cyanophyta* of Ukraine were published (Kondratyeva, 1968; Kondratyeva et al., 1984) promoting further versatile research of this group in Ukraine. By 2005, 626 species (781 infraspecific taxa) of cyanobacteria from 77 genera were recorded. These data are undoubtedly very valuable and may be considered as a worthy result of the "botanical" period in the study of blue-green algae in Ukraine. However, now we must follow the new paradigm of cyanobacterial systematics and use new methods and approaches for the study of their diversity in the nature.

The combination of the polyphasic approach, new molecular markers, and monophyletic species concept promoted a breakthrough in the taxonomy of cyanobacteria that resulted in the description of a significant number of new taxa (Nübel et al., 2000; Abed et al., 2002; Taton et al., 2003; Gugger et al., 2005; Rajaniemi et al., 2005; Casamatta et al., 2006; Siegesmund et al., 2008; Bohunická et al., 2011; Zammit et al., 2012, and others). It causes dramatic changes in taxonomic structure of cyanoprocaroytes and paves the way for a new classification system, a preliminary version of which has recently been published (Komárek et al., 2014). To date, about 50 new genera of cyanobacteria were described using methods of molecular phylogeny (www.algaebase.org). Many of them include species that changed their generic affiliation because of new taxonomic combinations; in other words, these genera have been already known for the flora of Ukraine. For example, the genus *Coleofasciculus* Siegesmund, Johansen et Friedl was described as a result of a complex study and revision of the genus *Microcoleus* Gomont (Siegesmund et al., 2008). Its type species *C. chthonoplastes* (Gomont) Siegesmund, Johansen et Friedl is common in hyperhaline environments of Ukraine (Vinogradova, 2012). However, there are a number of genera and species not previously known to science. These include, among others, the genera *Nodosilinea* Perkinson et Casamatta 2011, *Oculatella* Zammit, Billi et Albertano 2012, and *Roholtiella* Bohunická, Pietrasiak et Johansen 2015. Conducting research on biological soil crusts distributed in seaside ecotopes of Ukraine and Germany, we revealed representatives of these genera at the coast of the Azov and Black Seas. In the present paper we describe our findings.

MATERIALS AND METHODS

Strains used in this study were isolated from the samples of biological soil crusts collected on the coast of the Sea of Azov near Kazantip Nature Reserve (Leninsky District, the Crimea) and the Black Sea near the Danube Delta Biosphere Reserve (Kiliya District, Odessa Region). In addition, for comparison, we used the original strains isolated from the biological soil crusts collected in dunes along the Baltic Sea coast in Germany (Mecklenburg-Vorpommern) (Table 1).

TABLE 1: Sampling sites for the strains reported in this study

Strain	Site description	Date
<i>Nodosilinea</i> morphotype		
Prim-5-5	The Black Sea coast, sand dunes above the beach area, sparse herbaceous vegetation, tender greenish crust formed by cyanobacteria with minor share of eukaryotic algae	01.09.2013
Ru-6-11	The coast of the Baltic Sea, island of Rügen, sand dunes, sparse herbaceous vegetation, well-developed biological soil crusts dominated by <i>Microcoleus vaginatus</i> Gomont ex Gomont and <i>Klebsormidium flaccidum</i> (Kütz.) P.C. Silva, K.R. Mattox et W.H. Blackwell	08.10.2013
WD-4-2	The coast of the Baltic Sea, Warnemünde, sand dunes above the beach area, sparse herbaceous vegetation, biological crust with the dominance of mosses	05.03.2013
Us-2-1	The coast of the Baltic Sea, Usedom Island, sand dunes, sparse herbaceous vegetation, dense dark blue-green crusts with the dominance of <i>Cyanobacteria</i>	08.10.2013
<i>Oculatella</i> morphotype		
KZ-5-4-1	The coast of the Sea of Azov, vicinities of Kazantip Nature Reserve, spit of Aqtas Lake, coquina beach, 10 m from the water's edge, cyanobacterial-algal crusts with dominance of <i>Nostoc edaphicum</i> Kondrat.	08.08.2012
KZ-7-1-4	The coast of the Sea of Azov, vicinities of Kazantip Nature Reserve, spit of Aqtas Lake, coquina beach, 10 m from the water's edge, cyanobacterial-algal crusts with dominance of <i>Nostoc edaphicum</i> and <i>Hassalia</i> sp.	08.08.2012
<i>Roholtiella</i> morphotype		
KZ-5-4-5	The coast of the Sea of Azov, vicinities of Kazantip Nature Reserve, spit of Aqtas Lake, coquina beach, 10 m from the water's edge, dense crusts with dominance of <i>Nostoc edaphicum</i>	08.08.2012

Biological soil crusts fragments (approximately 6 × 6 cm in size) were collected as intact as possible with a scalpel and transferred to a paper box or a petri dish. In the laboratory, samples were dried and stored in the dark. Further processing of samples, including cultural, morphological and molecular phylogenetic studies, were conducted in the Laboratory of Applied Ecology and Phycology, University of Rostock (Germany).

Isolation of the strains, culture conditions, and light microscopy. A small amount of crust was placed in Petri dishes with Bold (1N BBM) agarized medium (Bischoff and Bold, 1963). Cultures were grown under fluorescent lights (25 μmol photons • m⁻² • s⁻¹) with a 12 : 12 light : dark photoperiod at +20 ± 5 °C. Unialgal cultures were obtained using the stereomicroscope Olympus ZS40 (Tokyo, Japan), and purified from other organisms through multiple passages. Purified strains were maintained under the same conditions in media 1N BBM and BG-11 (SigmaAldrich, Stanier et al., 1971). Morphological examinations of young (2–4 weeks) and old (2–6 months) cultures of cyanobacteria were performed using Olympus IX70 and BX51 light microscopes with Nomarski DIC optics. Photomicrographs were taken with digital cameras ColorView II and Olympus UC30 attached to microscopes, and processed by software analySIS and cellSens Entry.

DNA extraction, PCR, and sequencing. Genomic DNA of the cyanobacterial strains was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences of the 16S *r*RNA gene together with 16S-23S ITS region (1700 to 2300 bases) were amplified using a set of Taq PCR Mastermix Kit (Qiagen GmbH) and primers SSU-4-forw and ptLSU C-D-rev (Marin et al., 2005) in a thermocycler T gradient Thermoblock (Biometra, Germany). The PCR comprised 30 cycles: initial denaturation at 96 °C for 3 min, the cyclic repeating denaturation 1 min at 96 °C, annealing 2 min at 55 °C, elongation fragment – 3 min at 68 °C, followed by a final elongation of the fragment – 7 min at 68 °C. PCR products were cleaned using a Qiagen PCR purification kit (Qiagen GmbH) according to the manufacturer's instructions. Cleaned PCR products were sequenced commercially by Qiagen Company using primers SSU-4-forw, Wil 6, Wil 12, Wil 14, Wil 5, Wil 9, Wil 16 and ptLSU C-D-rev (Wilmotte et al., 1993; Marin et al., 2005). Nucleotide sequences of used primers and appropriate references are presented in Table 2. The resulting sequences were assembled and edited using Geneious software (version 8.1.8; Biomatters). They were deposited in GenBank.

Phylogenetic analysis. For comparison with original strains, we used 58 nucleotide sequences of representatives of the order *Synechococcales* and 67 of *Nostocales* available in GenBank (NCBI). Multiple alignment of the nucleotide sequences of the 16S *r*RNA gene was made using Mafft web server (version 7, Katoh and Standley, 2013) followed by manually editing in the program BioEdit (version 7.2). Alignment for the phylogeny of the 16S-23S ITS region was performed manually in BioEdit, taking into account the secondary

structure of the RNA in the region. The evolutionary model that is best suited to the used database was selected on the basis of the lowest AIC value (Akaike, 1974) and calculated in MEGA (version 6, Tamura et al., 2013). Phylogenetic trees were constructed in the program MrBayes 3.2.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003), using an evolutionary model GTR + G + I, with 5,000,000 generations. Two of the four runs of Markov chain Monte Carlo were made simultaneously, with the trees, taken every 500 generations. Split frequencies between runs at the end of calculations were below 0.01. The trees selected before the likelihood rate reached saturation were subsequently rejected. The reliability of tree topology verified by the maximum likelihood analysis (ML) were made using the program GARLI 2.1 (March, 2011).

TABLE 2: Nucleotide sequences of used primers

Primer name	Sequence	References
SSU-4-forw	GATCCTKGCTCAGGATKAACGCTGGC	Marin et al., 2005
ptLSU C-D-rev	GCCGGCTCATTCTTCAAC	Marin et al., 2005
Wil 6	GCCAGCAGCCGCGGTAA	Wilmotte et al., 1993
Wil 12	GYAACGAGCGCAACCC	Wilmotte et al., 1993
Wil 14	TGTACACACCGCCCGTC	Wilmotte et al., 1993
Wil 5	CTGCTGCCTYCCGTA	Wilmotte et al., 1993
Wil 9	GGGGTATCTAATCCC	Wilmotte et al., 1993
Wil 16	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	Wilmotte et al., 1993

Construction of rRNA secondary structure. The model of the secondary structure of 16S-23S ITS region of the original strain of *Roholtiella* was built according to published data (Bohunická et al., 2015). Helices were folded with the online software Mfold (Zuker, 2003) and visualized in the online tool Pseudoviewer (Byun and Han, 2009).

RESULTS AND DISCUSSION

A morphological study of isolated strains allowed us to assume that they refer to the three recently described genera of the orders *Synechococcales* (*Oculatella* and *Nodosilinea*) and *Nostocales* (*Roholtiella*) studied by the polyphasic approach (Fig. 1). Each genus has distinct generic apomorphies which could also be confirmed our strains. Next we will discuss our findings of new genera in details.

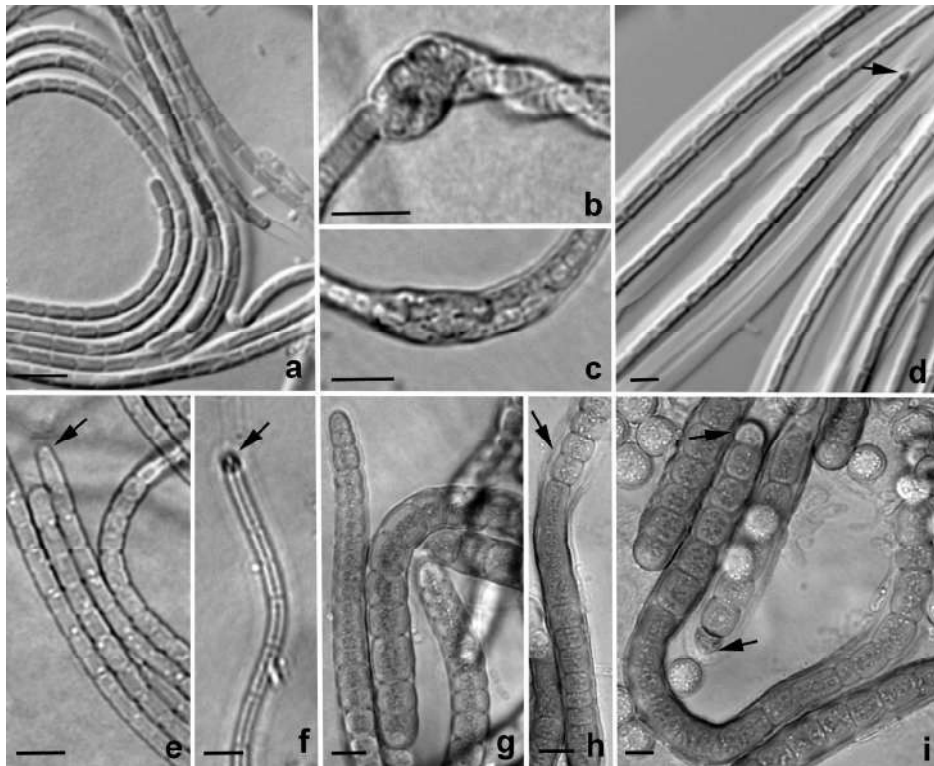


FIG. 1: Micrographs of investigated strains representing cyanobacterial genera new for flora of the Ukraine. *Nodosilinea* sp.: *a* – general view of filaments, *b*, *c* – nodules appeared due to cell division in several planes; *Oculatella* sp.: *d* – mature filaments with clearly visible sheaths, *e*, *f* – filaments from young culture with granulations at cross-walls, arrows note red photosensitive inclusion; *Roholtiella edaphica*: *g* – general view of filaments, *h* – formation of arthrospores at the end of trichome (arrow), *i* – heteropolar trichomes with heterocytes (arrow). Scale 5 μ m

Genus *Nodosilinea* Perkerson et Casamatta 2011 (Fig. 1, *a–c*)

This genus was described on the basis of phylogenetic studies of the order *Synechococcales* (Perkerson et al., 2011). The group of strains morphologically identified as *Leptolyngbya* but phylogenetically distinct formed strongly supported clade within *Synechococcales*. All of these strains had common morphological synapomorphy: the ability to form nodules along the length of the filament. Such a feature was known only in the recently described marine species *Leptolyngbya nodulosa* Z. Li et J. Brand 2007; this species was chosen as a type species of *Nodosilinea* (Perkerson et al., 2011). At present, four species are assigned to the genus including two species formerly known as representatives of *Leptolyngbya* (*N. nodulosa* (Z. Li et J. Brand) Perkerson et Casamatta and *N. bijugata* (Kong.) Perkerson et Kováčik), and two newly described species.

We revealed similar nodule-forming morphotypes in biological soil crusts from the seashore of the Black and Baltic Seas. Their description is given below.

Thallus blue-green, form a thin mat diffusely spreading from the center of dish and penetrating deep into agar. Filaments tortuous, usually unbranched, sometimes with false branching, in low-light conditions form nodules. Sheath is always present, delicate, colorless, attached to trichomes. Trichomes cylindrical, immotile, (1.1)1.3–1.7(2.1) μm wide, slightly constricted at the cross-walls, without necridia, without meristematic zones, with cells dividing over the entire length of the trichome, on nodules portions cells apparently divide more that in one plane. Hormogonia form frequently. Cells round-cylindrical, with peripheral thylakoids, without granulation, isodiametric to longer then wide, 1.7–2.6 μm long, usually shorter, their length is usually equal to or greater than the width. End cells rounded.

In the cultures of original strains we observed morphological features peculiar to the genus *Nodosilinea*: formation of nodules and cell division in several planes. Their generic status has been confirmed also by phylogenetic analysis based on the 16S *rRNA* gene sequence (Fig. 2). In general, the resulting tree of the order *Synechococcales* corresponds to the results of other authors who have studied phylogenetic relationships within the order (Perkerson et al., 2011; Muhlsteinova et al., 2014; Osorio-Santos et al., 2014; Patzelt et al., 2014, and others).

Our strains, morphologically attributed to genus *Nodosilinea*, on the phylogenetic tree joined already known strains and species of this genus, forming an isolated clade (Fig. 2). As can be seen from the figure, the original strains of *Nodosilinea*, both Ukrainian and German, were quite close to each other in the nucleotide sequence of 16S *rRNA*.

Species identification of this Ukrainian strain has not yet been completed. Morphologically, it differs from the known species of *Nodosilinea*. We failed to resolve this problem by phylogenetic analysis of the 16S-23S ITS region because the resulting nucleotide sequence of the Ukrainian strain was too short and did not include most of the analyzed region.

Genus *Oculatella* Zammit, Billi et Albertano 2012 (Fig. 1, *d–f*)

The genus was described as a result of a polyphasic study of subaerophytic strains of similar morphology isolated from ancient hypogea in Italy and Malta. Molecular and phylogenetic analyses based on 16S *rRNA* nucleotide sequences revealed a cluster, separated on a generic level; all investigated strains had a high level of genetic similarity (99% or more). Genus *Oculatella* has three autapomorphies distinguishing it from all other genera: purple-red coloration of the cells and trichomes, the obligatory presence of the orange photosensitive structure at the tip of the mature end cells of the trichome, and subaerophytic mode of life in low-illuminated subterranean environments (Zammit et al., 2012). Holotype of the genus, *Oculatella subterranea* Zammit, Billi et Albertano, was previously known as *Leptolyngbya* «Albertano/Kovacik red» 1997 (Komarek, 2005).

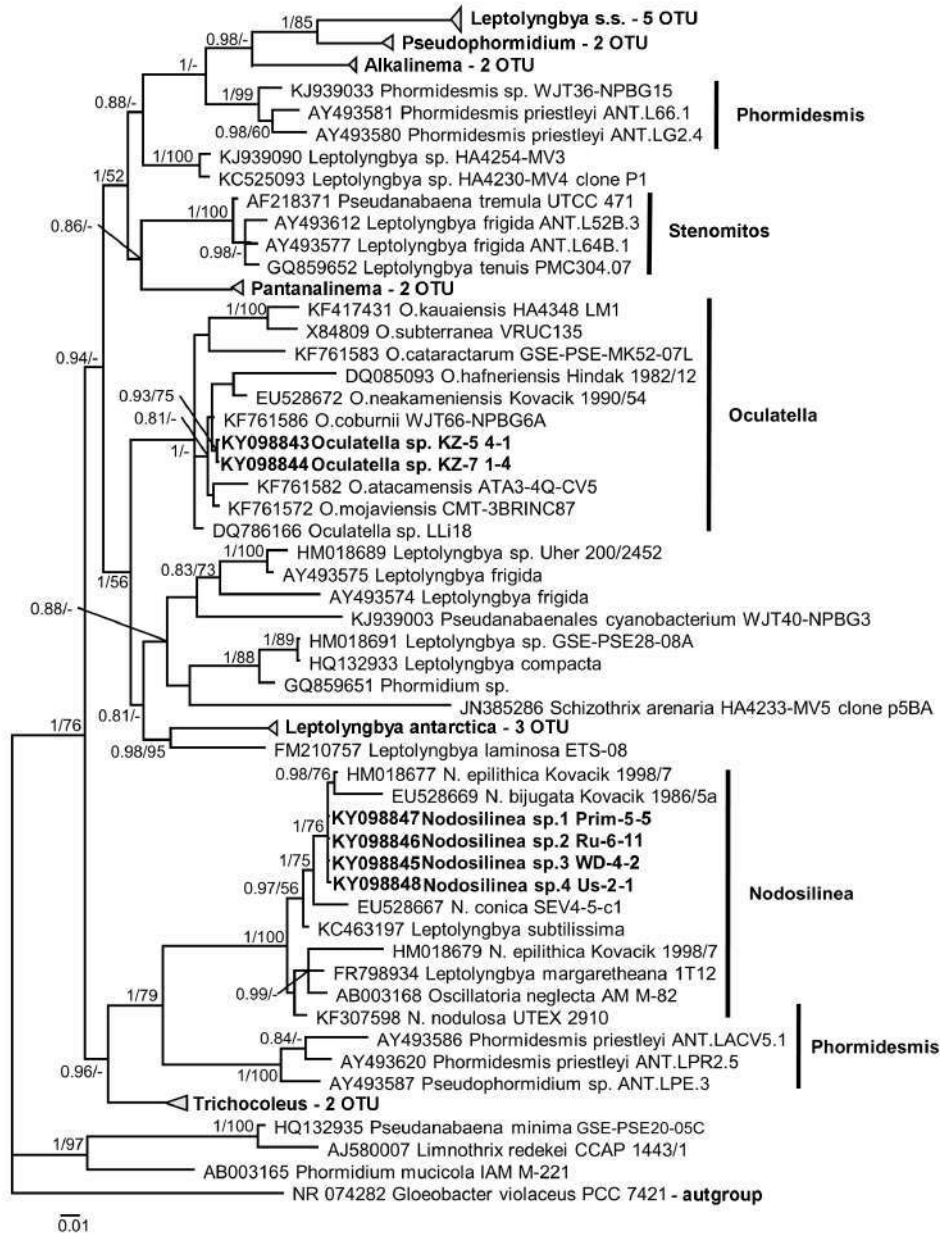


FIG. 2: Molecular phylogeny of *Synechococcales* based on 16S *r*RNA sequence comparisons. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP) indicated at nodes. From left to right, support values correspond to Bayesian PP and Maximum Likelihood BP; BP values lower than 50% and PP lower than 0.8 not shown. Strains marked in bold are newly sequenced cyanobacteria. Clade designations follow Osorio-Santos et al., 2014 and Miscoe et al., 2016

Thus, at first, genus *Oculatella* was positioned as a representative of hypogean biota of the Mediterranean. However, its narrow ecological specialization was refuted by a comprehensive study of 37 strains genetically related to *Oculatella* but lacking red-purple coloration and isolated from diverse aquatic and terrestrial habitats of three continents and a Pacific island (Osorio-Santos et al., 2014). Based on a monotypic species concept, authors described seven new species of *Oculatella*, including four species inhabiting desert soil, and three from more humid environments. Thus, at the present time, the unique feature of genus *Oculatella* remains a reddish photosensitive spot at the end of the trichome. Precisely, this trait was revealed in the strains isolated from the biological soil crusts from the Sea of Azov coast. Their description is below.

Thallus blue-green, as a thin film on the surface agar. Filaments wavy, unbranched, (3.0)4.3–6.5 μm wide. Sheaths occur frequently, especially in old cultures, relatively wide, sometimes with more than one trichome. Trichomes blue-green, not attenuated to the end, 1.1–1.8(2.5) μm wide, slightly constricted (in young cultures) or unconstructed, sometimes with granulations. Necridia absent. Cell length exceeds width (in young cultures – very little) (2.5)3.0–6.5 μm , cytoplasm homogenous, thylakoids clear, parietal, visible under light microscope. Young trichomes weakly motile. Mature end cells conical, 3.2–7.1 μm long, with a reddish-orange spot in the apex of the cell.

Morphologically and phylogenetically (in 16S *r*RNA, Fig. 2), our strains completely correspond to genus *Oculatella* (Zammit et al., 2012; Osorio-Santos et al., 2014). Original strains of *Oculatella* became identical in nucleotide sequence of the gene 16S *r*RNA; they joined the already known species of this genus, forming an isolated single clade with high support. Morphologically and in the sequence of the 16S-23S ITS region (not shown), Ukrainian strains differ from all known species of this genus, probably representing a new species of *Oculatella*. Nevertheless, a detailed description of potential new *Oculatella* species is beyond the scope of the current manuscript.

Genus *Roholtiella* Bohunická, Pietrasiak et Johansen 2015 (Fig. 1, *g–i*)

The genus was described after a complex study of 16 strains of morphologically, clearly separated heterocytous cyanobacteria from various habitats in the Czech Republic, Russia, and the USA. This extremely interesting genus combines the features, which traditionally were used for delimitation of the families of *Nostocales*. They include abundant mucilage around the colonies, clearly constricted trichomes and formation of the chains of arthrospores without connection to heterocytes (*Nostocaceae*), trichomes with cylindrical cells and false branching (*Scytonemataceae*) and heteropolar trichomes tapering to the end (*Rivulariaceae*). After the introduction of molecular methods in taxonomical studies of cyanobacteria, the strains possessing the above features sometimes appeared on a

phylogenetic tree in one clade (Rajaniemi et al., 2005; Johansen et al., 2014). These are often perceived as the result of wrong identification of the strains whose sequences were placed in Genbank. The problem was recognized but only the discovery of heteropolar filaments with false branching phylogenetically close not to *Calothrix* C. Agardh but to *Tolypothrix* Kütz., and description of the genus *Calochaete* Hauer, Bohunická et Mühlsteinová 2013 confirm that in nature genotypes do exist, morphologically unexpected for traditional cyanotaxonomy (Bohunická et al., 2015). We isolated heteropolar false branched specimens of cyanobacteria from the biological crusts occurring at coquina beach at the Sea of Azov. Morphological description of the original strain of *Roholtiella* follows.

In culture thallus olive-green to brownish-green and reddish brown, flat, grows in the agar, sometimes stains it brown or brown-red color, sometimes with erect bundles of filaments; in old cultures its uneven surface resembles *Nostoc* thalli. Filaments short to moderately long, usually with a single false branching, izopolar or heteropolar. Sheath thin, sometimes extended, closed at the ends or diffluent, open when releasing arthrospores, colorless to reddish or reddish-brown. Trichomes constricted at the cell walls, distinctly and gradually tapering towards the end, slightly swollen at the base, at the widest point cells are 5.3–7.1(8.9) µm wide. Cells barrel-shaped up to nearly spherical or spherical compressed, cell content homogenous or granulated, olive-green to reddish, usually short, sometimes isodiametric or somewhat elongated, 2.9–6.4(7.9) µm long. End cells round conical or rounded, 2.9–6.4 µm wide, 3.6–7.5 µm long. Heterocytes were observed only terminal, hemispherical, with pale-yellow content, 4.3–5.3 µm wide, 3.6–4.3 µm long. Hormogonia short, with cells 5.3–6.4 µm wide, 3.6–5.7 µm long. Arthrospores in chains, 5.3–6.8 µm wide, 4.3–5.3 µm long, released from the end of filament by dissociation.

Comparison of original strain with published species of the genus *Roholtiella* (Table 3) shows its filaments by appearance, structure and coloring of the sheath; dimensional ranges are most similar to type species of *Roholtiella*: *R. edaphica* Bohunická et Lukešová.

Strains of this species have been isolated from a variety of soils (including soil of dump recultivating after coal mining, and steppe and forest soils) of Europe (Czech Republic), Asia (Russia: Bashkortostan) and North America (USA). According to the protologue, *R. edaphica* differs from all other species of the genus by a marked swelling of the trichome near the basal heterocyte; this feature was rarely recorded in our cultures. A similar feature is also listed in the description of *R. mojaviensis* Pietrasiak et Johansen (“trichomes ... *Calothrix*-like with basal heterocyte at the slightly widened base” (Bohunická et al., 2015, p. 93). However, *R. mojaviensis* is characterized by a bright blue-green coloration of the thallus, shorter, narrower, and more consistently tapering trichomes differing it from both all other species and original strain. The last differs from all known

TABLE 3: Morphology and ecology of original strain KZ-5-4-5 and known species of *Roholtiella* (Bohunická et al., 2015)

Species	Morphology and cell dimensions (width/length, μm)					Ecology
	Sheath	Cells	End cells	Heterocytes	Arthrospores	
<i>Roholtiella</i> KZ-5-4-5	Colorless to reddish or reddish-brown	Barrel-shaped to spherical compressed, 5.3–7.1(8.9)/2.9–6.4(7.9)	Round-conical or rounded, 2.9–6.4/3.6–7.5	Terminal hemispherical, 4.3–5.3/3.6–4.5	Spherical compressed, 5.3–6.8/4.3–5.3	Coquina beach on the seashore
<i>R. edaphica</i> Bohunická et Lukešová	Colorless, slightly pinkish, orange, red to red-brown	Barrel-shaped to spherical compressed, 6.2–12.3/1.6–8.2(9.0)	Conical, round-conical to rounded, 4.1–4.9/3.2–5.5	Terminal spherical, hemispherical or elongated rounded, intercalary shortly-barrel-shaped, 4.8–8.0(10)/2.8–7.5	6.1–11.1/4.6–9.3	Temperate climate soil
<i>R. mojavensis</i> Pietrasiak et Johansen	Colorless to slightly pinkish	Cylindrical, barrel-shaped or spherical compressed, 5.7–9.6/1.6–7.3	Round-conical or conical, 2.8–5.2/3.2–6.4	Terminal hemispherical or slightly conical, intercalary shortly-barrel-shaped, 4.7–7.4/3.2–6.8	Nearly spherical, 5.6–7.9/4.1–9.0	Sandy, gravelly soil in desert
<i>R. bashkirorum</i> Gaisina et Bohunická	Colorless	Barrel-shaped to spherical, 6.6–9.8/2.1–8.5	Round-conical, 3.3–6.9/3.6–7.2	Terminal hemispherical, intercalary cylindrical, 4.1–8.2/2.5–7.4	Spherical compressed to nearly spherical, 6.2–10.5/4.9–9.0	Soil on the bank of river
<i>R. fluvialis</i> Johansen et Gaisina	Colorless, orange to reddish	Barrel-shaped, 7.9–9.8/2.8–10.8	Spherical or conical, 3.9–6.9/4.1–6.4	Terminal hemispherical, intercalary round-cylindrical, 4.7–7.4/3.2–6.8	Spherical compressed to nearly spherical, 6.1–10.4/3.9–10.0	In small streams or in hydro-terrestrial communities on their edge

species of *Roholtiella* in ecology of the habitat. All known strains of *Roholtiella* were isolated from environments with low salinity (Table 3), and our strain originates from the biological crust found at a conquina beach exposed to sea waves and sharp seasonal fluctuations of the surf line. The final resolution to the question of taxonomic status of the original strain needs a molecular phylogenetic study.

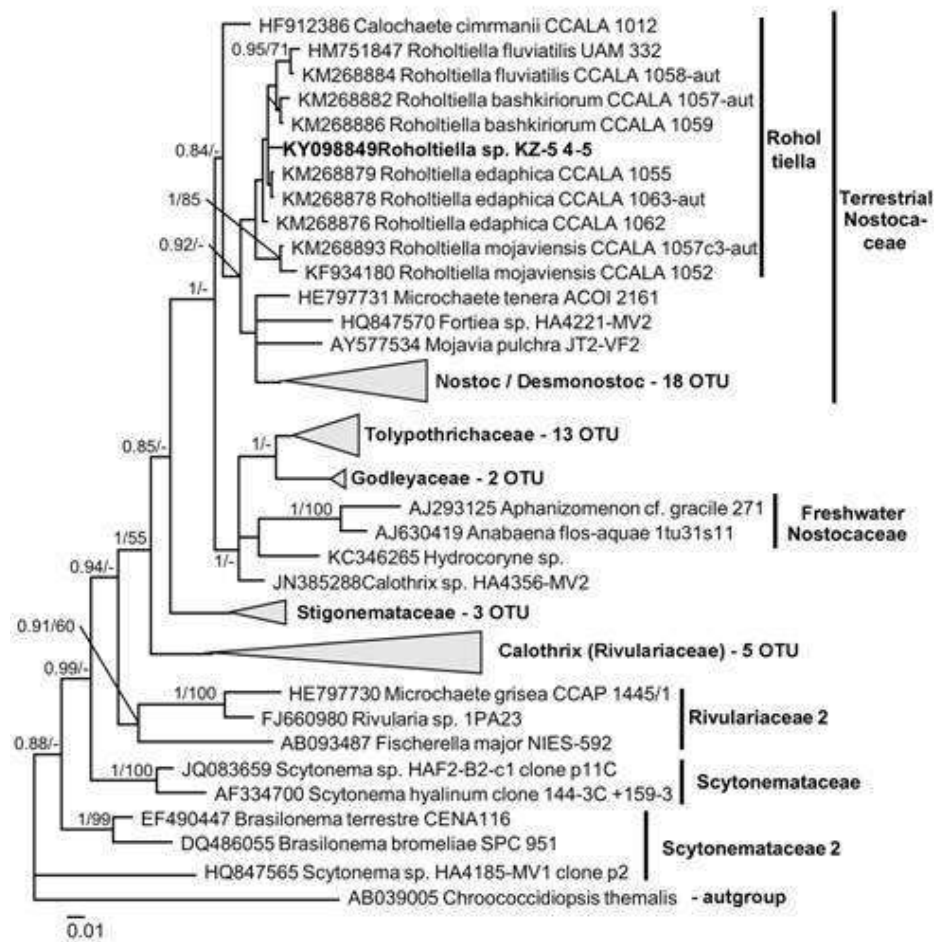


FIG. 3: Molecular phylogeny of *Nostocales* based on 16S *rRNA* sequence comparisons. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP) indicated at nodes. From left to right, support values correspond to Bayesian PP and Maximum Likelihood BP; BP values lower than 50% and PP lower than 0.8 not shown. Strain marked in bold is newly sequenced cyanobacterium. Clade designations follow Hauer et al., 2013, 2014

Phylogenetic analysis of heterocytous cyanoprocarvates of order *Nostocales* based on the 16S *rRNA* gene nucleotide sequence (Fig. 3), which includes our original data, is generally consistent with the phylogeny of the order (Casamatta et al., 2006; Hauer et al., 2013, 2014; Bohunická et al., 2015; Berrendero et al., 2016, etc). Our strain, morphologically corresponding to genus *Roholtiella*, joined the clade of this genus. This clade is part of a larger clade uniting terrestrial species of *Nostocaceae*, as was also shown by Bohunická et al. (2015). Thus, phylogenetic analysis confirmed generic affiliation of the original strain.

For species identification of this strain, we used data on the 16S *rRNA* gene sequence concatenated with the 16S-23S ITS region. This fragment is considered more informative than just a sequence of 16S *rRNA* gene; it allows distinguishing clades, which are morphologically and ecologically different but have a level of 16S *rRNA* similarity over 97.5% (Osorio-Santos et al., 2014).

As is known, in bacteriology, when comparing the sequences of 16S *rRNA*, a level of similarity below 97.5% means another species, and all above this threshold is considered uninformative (Johansen and Casamatta, 2005).

However, as has been shown in the study of intrageneric phylogenetic relationships among different groups of cyanobacteria, in certain cases, the level of similarity in 16S *rRNA* may be higher than this threshold but the clades with clear differences are considered as separate species (Řeháková et al., 2007; Osorio-Santos et al., 2014; Bohunická et al., 2015). For example, strains of *Roholtiella* had over 97.9% similarity, which did not prevent the description of four new species. Their autapomorphies include differences in the structure of some conservative areas of the 16S-23S ITS region (Bohunická et al., 2015).

The nucleotide sequence of the 16S-23S ITS region of the original strain of *Roholtiella* contained operons without *tRNA* genes. It is possible to obtain the nucleotide sequence having operons containing either two *tRNA* genes or no *tRNA* genes within the same strain of genus *Roholtiella* (Bohunická et al., 2015). Therefore, in the molecular sequence analysis of the 16S-23S ITS region we used only lacking *tRNA* genes sequences of the known species of *Roholtiella*. Phylogenetic analysis based on the 16S *rRNA* gene sequence concatenated with the 16S-23S ITS region of the original and 12 published strains of *Roholtiella* (Fig. 4) revealed that the Ukrainian strain joins the cluster corresponding to the species *R. edaphica* and is a sister taxon to the reference strain CCALA 1063.

We performed the analysis of the secondary structure of the informative helices of the 16S-23S ITS region (operon without *tRNA* gene) for original strain KZ-5-4-5 and three strains of *R. edaphica*: CCALA 1063 (USA, reference strain), CCALA 1060 (Russia), and CCALA 1062 (Czech Republic).

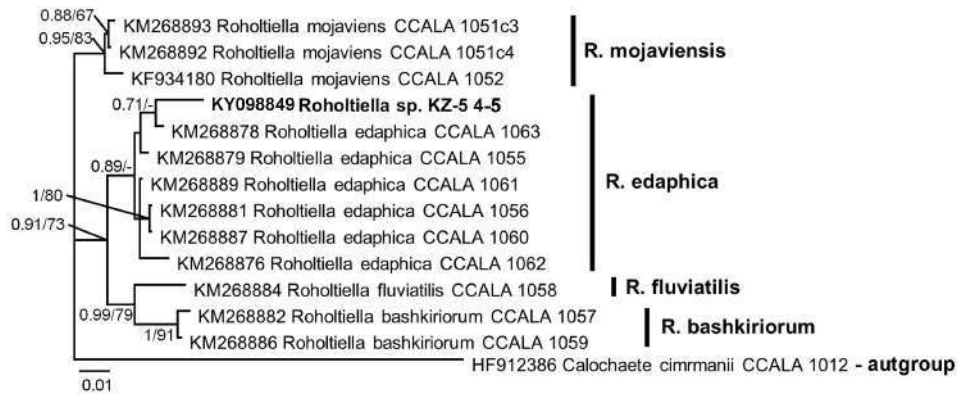


FIG. 4: Molecular phylogeny of genus *Roholtiella* based on 16S-23S ITS sequence comparisons. A phylogenetic tree was inferred by the Bayesian method with Bayesian Posterior Probabilities (PP) and Maximum Likelihood bootstrap support (BP) indicated at nodes. From left to right, support values correspond to Bayesian PP and Maximum Likelihood BP; BP values lower than 50% and PP lower than 0.8 not shown. Strain marked in bold is newly sequenced cyanobacterium. Clade designations follow Bohunická et al., 2015

The configuration of the Box-B helix of the Ukrainian strain is very similar to all other strains; they differ in only two nucleotides in the internal and terminal loops (Fig. 5). Strain CCALA 1062 is also significantly different from the others in having a larger size of the inner loop of the Box-B helix. The secondary structure of the V3 helix of *R. edaphica* is quite variable (Fig. 5). The V3 helix of the original strain is identical to those of the reference strain of *R. edaphica* (CCALA 1063). But the V3 structure of CCALA 1063 is similar to other strains only at the bottom and is fundamentally different in the upper part in number and composition of the nucleotides. Unfortunately, Bohunická et al. (2015) did not show the secondary structure of the 16S-23S ITS region of reference strain CCALA 1063 and did not discuss this feature.

Therefore, we can only state the fact of high variability of 16S-23S ITS region within *R. edaphica*. Authors wrote that all four species of *Roholtiella* are easily identified by the nucleotide sequence of the flanking regions of Box-B and V3 helices of the 16S-23S ITS: their structure is unique in each of the species, playing the role of genetic autapomorphia. The sequences of these regions for different strains of *R. bashkiriorum* and *R. mojaviensis* were constant, but for strains of *R. edaphica* were slightly variable (Bohunická et al., 2015, Fig. 5): sequences for strains CCALA 1055-1060 and CCALA 1062 differ in two nucleotides in positions 133 and 345 (Table 3).

A comparison of the variable fragments of flanking regions of the Box-B and V3 helices of original strain with published data shows that *Roholtiella* KZ-5-4-5 is most similar to the strains of *R. edaphica*.

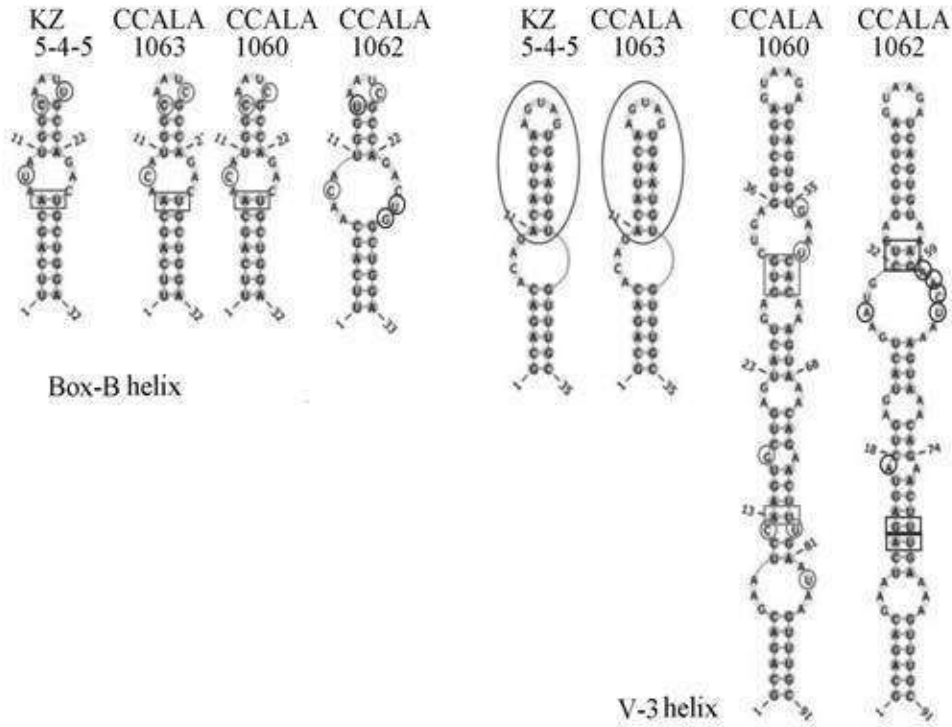


FIG. 5: Secondary structure of the main informative helices of region 16S-23S ITS of Ukrainian strain *Roholtiella* (KZ-5-4) in comparison with strains of the most similar species *R. edaphica*. Marked bases (by circles) and base pairs (by boxes) are variable

From 11 variable sequences 6 are identical, but in 5 positions (129, 144, 186, 228 and 345) we found differences in 7 nucleotides. Our strain has also some similarities with *R. mojaviensis*: five full matches, the differences in eight nucleotides of the six positions. Interestingly, the species from more humid habitats, *R. fluviatilis* and *R. bashkiriolum*, differ from *Roholtiella* KZ-5-4-5 in 10 of the 11 studied fragments (Table 4).

Thus, according to morphological features and results of phylogenetic analysis based on the 16S *r*RNA gene concatenated with the 16S-23S ITS region, the Ukrainian strain of *Roholtiella* can be identified as *R. edaphica*. A comparison of the variable fragments of flanking regions of the Box-B and V3 helices of 16S-23S ITS from original and published strains of this species revealed some discrepancies. Variability of the original strain perhaps lies in the range of variability of *R. edaphica* (in accordance with its present concept), but actually it is the “border case” which must be resolved in future studies.

TABLE 4: Short variable fragments or separate nucleotides of flanking regions of the Box-B and V3 helices of 16S-23S ITS for original strain KZ-5-4-5 and known species of *Roholtiella*

Species, strains	Position number of aligning variable fragments *										
	129	133	136	141	144	148	155	186	228	339	345
<i>R. fluviatilis</i> , CCALA 1058	T	C	TAC	G	TT	A	AA	TTAT-	-AA	-	TTGTTTAA
<i>R. bashkiriolum</i> , CCALA 1057, 1059	G	C	CAA	G	CA	G	AC	AGAA-	AAA	-	-TGAATT
<i>R. mojaviensis</i> , CCALA 1055, 1056	C	C	ARA	C	CT	G	G-	TAATR	-AA	-	T-TGTTTA
<i>R. edaphica</i> , CCALA 1055- 1060	A	C	AAA	C	CT	G	G-	TATTG	TTT	C	A-TGTATW
<i>R. edaphica</i> , CCALA 1062	A	G	AAA	C	CT	G	G-	TATTG	TTT	C	A-TGTATT
<i>R. edaphica</i> , KZ- 5-4-5	<u>C</u>	C	AAA	C	<u>TT</u>	G	G-	TATT <u>T</u>	<u>AAA</u>	C	A-TGTAT <u>A</u>

*According to Bohunická et al., 2015, fig. 5, p. 94. Differences between original data and published variable sequences of *R. edaphica* are shown in bold and underlined.

CONCLUSIONS

A complex study of cyanobacterial strains isolated from biological soil crusts collected at the seashore of the Black Sea and the Sea of Azov reveals three genera from orders *Synechococcales* (*Oculatella* Zammit, Billi et Albertano, *Nodosilinea* Perkerson et Casamatta) and *Nostocales* (*Roholtiella* Bohunická, Pietrasiak et Johansen) first cited for the Ukraine. In phylogenetic analyses using sequences of the 16S *r*RNA gene, all Ukrainian strains joined the clades of the corresponding genera with a high degree of support in the Bayesian and Maximum Likelihood analyses. However, their species-level identification has been successful only for one strain of the genus *Roholtiella*. The phylogeny based on

the 16S *r*RNA gene concatenated with the 16S-23S ITS region of the original strain and 12 published strains of *Roholtiella* showed that the Ukrainian strain was closely related to *R. edaphica* Bohunická et Lukešová. Its secondary structure of Box-B and V3 helices of the 16S-23S ITS region, and the nucleotide sequences flanking of them, corresponds to *R. edaphica* in main features. Original strains of genera *Oculatella* and *Nodosilinea* were quite similar to each other by the nucleotide sequences the 16S *r*RNA gene. But, phylogenetic trees based on the 16S-23S ITS region of both original and published strains of these genera indicated that the newly described strains might represent new species as they form highly supported distinct clades. Additional investigation of morphology as well as sequence and secondary structure of 16S-23S ITS are necessary for description of these strains as new species. Finding three new genera for flora of the Ukraine using methods of molecular phylogeny demonstrates the importance of modern approaches for the assessment of the real diversity of cyanobacteria in nature.

ACKNOWLEDGMENTS

The research was supported by a Georg-Forster Fellowship of the Alexander von Humboldt Foundation (Alexander von Humboldt Stiftung) to the first author.

REFERENCES

- Abed R.M.M., Garcia-Pichel F., and Hernández-Mariné M., Polyphasic characterization of benthic, moderately halophilic, moderately thermophilic cyanobacteria with very thin trichomes and the proposal of *Halomicronema excentricum* gen. nov., sp. nov., *Arch. Microbiol.*, 177: 361–370, 2002.
- Akaike H., A new look at the statistical model identification, *IEEE Trans. Automat. Contr.*, 19(6): 716–723, 1974.
- Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography*, Vol. 1, P.M. Tsarenko, S.P. Wasser, E. Nevo (Eds), A.R.A. Gantner Verlag K.-G., Ruggell, 2006; Vol. 2, 2009; Vol. 3, 2011; Vol. 4, 2014.
- Berrendero Gómez E., Johansen J.R., Kaštovský J., Bohunická M., and Čapková K., *Macrochaete* gen. nov. (*Nostocales*, *Cyanobacteria*), a taxon morphologically and molecularly distinct from *Calothrix*, *J. Phycol.*, 52(4): 638–655, 2016.
- Bischoff H.W. and Bold H.C., Phycological studies, IV, Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species, *Univ. Texas Publ.*, (6318): 1–95, 1963.
- Bohunická M., Johansen J.R., and Fučíková K., *Tapinothrix clintonii* sp. nov. (*Pseudana-baenaceae*, *Cyanobacteria*), a new species at the nexus of five genera, *Fottea*, 11(1): 127–140, 2011.
- Bohunická M., Pietrasiak N., Johansen J.R., Gómez E.B., Hauer T., Gaysina L.A., and Lukešová A., *Roholtiella*, gen. nov. (*Nostocales*, *Cyanobacteria*) – a tapering and branching cyanobacteria of the family *Nostocaceae*, *Phytotaxa*, 109(1): 36–44, 2015.

- Boyer S.L., Johansen J.R., and Flechtner V.R., Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (*Cyanophyceae*) species based on sequence analysis of the 16S *r*RNA gene and associated 16S-23S ITS region, *J. Phycol.*, 38: 1222–1235, 2002.
- Byun Y. and Han K., PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots, *Bioinformatics*, 25(11): 1435–1437, 2009.
- Casamatta D.A., Gomez S.R., and Johansen J.R., *Rexia erecta* gen. et sp. nov. and *Capsosira lowei* sp. nov., two newly described cyanobacterial taxa from the Great Smoky Mountains National Park (USA), *Hydrobiologia*, 561: 13–26, 2006.
- Casamatta D.A., Vis M.L., and Sheath R.G., Cryptic species in cyanobacterial systematics: a case study of *Phormidium retzii* (*Oscillatoriales*) using RAPD molecular markers and 16S *r*DNA sequence data, *Aquat. Bot.*, 77(4): 295–309, 2003.
- Donoghue M.J., A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative, *The Bryologist*, 88: 2–181, 1985.
- Dvořák P., Pouličková A., Hašler P., Belli M., Casamatta D.A., and Papini A., Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification, *Biodiver. and Conservat.*, 24(4): 739–757, 2015.
- Gugger M., Molica R., Le Berre B., Dufour P., Bernard C., and Humbert J.F., Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (*Cyanobacteria*) isolated from four continents, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 71(2): 1097–1100, 2005.
- Hauer T., Bohunická M., and Mühlsteinová R., *Calochaete* gen. nov. (*Cyanobacteria*, *Nostocales*), a new cyanobacterial type from “paramo” zone in Costa Rica, *Phytotaxa*, 109(1): 36–44, 2013.
- Hauer T., Bohunická M., Johansen J.R., Mares J., and Berrendero-Gomez E. Reassessment of the cyanobacterial family *Microchaetaceae* and establishment of new families *Tolypothrichaceae* and *Godleyaceae*, *J. Phycol.*, 50(6): 1089–110, 2014.
- Johansen J.R. and Casamatta D.A., Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm, *Arch. Hydrobiol. Algol. Stud.*, 117: 71–93, 2005.
- Johansen J.R., Bohunická M., Lukesová A., Hrcková K., Vaccarino M.A., and Chesarino N.M., Morphological and molecular characterization within 26 strains of the genus *Cylindrospermum* (*Nostocaceae*, *Cyanobacteria*), with descriptions of three new species, *J. Phycol.*, 50(1): 187–202, 2014.
- Katoh K. and Standley D.M., MAFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: improvements in performance and usability, *Mol. Biol. and Evol.*, 30(4): 772–780, 2013
- Komárek J., *Cyanoprokaryota*. Teil 2: *Oscillatoriales*, J. Komárek, K. Anagnostidis (Eds), in: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd 19/2, Elsevier, Jena, etc., 2005.
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., and Johansen J.R., Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014 using a polyphasic approach, *Preslia*, 86(4): 295–235, 2014.
- Kondratyeva N.V., *Class Hormogoniophyceae. Identification manual of freshwater algae of Ukrainian SSR*, 1, pt 2, Nauk. Dumka Press, Kyiv, 1968. [Ukr.]

- Kondratyeva N.V., Kovalenko O.V., and Prikhodkova L.P., in: *Identification manual of freshwater algae of Ukrainian SSR*, 1, pt 1, Nauk. Dumka Press, Kyiv, 1984. [Ukr]
- Lawrence J.G. and Retchless A.C., The interplay of homologous recombination and horizontal gene transfer in bacterial speciation, *Meth. Mol. Biol.*, 532: 29–53, 2009.
- Marin B., Nowack E.C.M., and Melkonian M., A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis, *Protist*, 156: 425–432, 2005.
- Miscoe L.H., Johansen J.R., Vaccarino M.A., Pietrasiak N., and Sherwood A.R., Novel cyanobacteria from caves on Kauai, Hawaii, *Bibl. Phycol.*, 120: 75–152, 2016.
- Mühlsteinová R., Johansen J.R., Pietrasiak N., Martin M.P., Osorio-Santos K., and Warren S.D., Polyphasic characterization of *Trichocoleus desertorum* sp. nov. (*Pseudanabaenales*, *Cyanobacteria*) from desert soils and phylogenetic placement of the genus *Trichocoleus*, *Phytotaxa*, 163(5): 241–261, 2014.
- Nübel U., Garcia-Pichel F., and Muyzer G., The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina* Turpin) and the description of *Halospirulina tapeticola* gen. nov., sp. nov., *Int. J. Syst. and Evol. Microbiol.*, 50(3): 1265–1277, 2000.
- Osorio-Santos K., Pietrasiak N., Bohunická M., Miscoe L.H., Kováčik L., Martin M.P., and Johansen J.R., Seven new species of *Oculatella* (*Pseudanabaenales*, *Cyanobacteria*): taxonomically recognizing cryptic diversification, *Eur. J. Phycol.*, 49(4): 450–470, 2014.
- Patzelt D.J., Hodač L., Friedl T., Pietrasiak N., and Johansen J.R., Biodiversity of soil cyanobacteria in the hyper-arid Atacama Desert, Chile, *J. Phycol.*, 50(4): 698–710, 2014.
- Perkerson R.B. III, Johansen J.R., Kováčik L., Brand J., Kastovsky J., and Casamatta D.A., A unique pseudanabaenalean (*Cyanobacteria*) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data, *J. Phycol.*, 47(6): 1397–1412, 2011.
- Polz M.F., Alm E.J., and Hanage W.P., Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure, *Trends in Genet.*, 29(3): 170–175, 2013.
- Rajaniemi P., Hrouzek P., Kaštovská K., Willame R., Rantala A., Hoffmann L., Komárek J., and Sivonen K., Phylogenetic and morphological evaluation of genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (*Nostocales*, *Cyanobacteria*), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 11–26, 2005.
- Řeháková K., Johansen J.R., Casamatta D.A., Xuesong L., and Vincent J., Morphological and molecular characterization of selected desert soil cyanobacteria: three species new to science including *Mojavia pulchra* gen. et sp. nov., *Phycologia*, 46: 481–502, 2007.
- Ronquist F. and Huelsenbeck J.R., MrBayes 3: Bayesian phylogenetic interference under mixed models, *Bioinformatics*, 19(12): 1572–1574, 2003.
- Sogge H., Rohrlack T., Rounge T.B., Sønstebo J.H., Tooming-Klunderud A., Kristensen T., and Jakobsen K.S., Gene flow, recombination and selection in *Cyanobacteria*: population structure of geographically related *Planktothrix* freshwater strains, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 79(2): 508–515, 2013.

- Siegesmund M.A., Johansen J.R., Karsten U., and Friedl T., *Coleofasciculus* gen. nov. (Cyanobacteria): morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont, *J. Phycol.*, 44: 1572–1585, 2008.
- Sogge H., Rohrlack T., Rounge T.B., Sønstebo J.H., Tooming-Klunderud A., Kristensen T., and Jakobsen K.S., Gene flow, recombination and selection in *Cyanobacteria*: population structure of geographically related *Planktothrix* freshwater strains, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 79(2): 508–515, 2013.
- Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., and Cohen-Bazire G., Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*), *Bacteriol. Rev.*, 35: 171–205, 1971.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., and Filipski A., MEGA6: molecular evolutionary analysis version 6.0, *Mol. Biol. and Evol.*, 30(12): 2725–2729, 2013.
- Taton A., Grubisic S., Brambilla E., De Wit R., and Wilmotte A., Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 69(9): 5157–5169, 2003.
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbet D.S., and Fisher M.C., Phylogenetic species recognition and species concept in fungi, *Fung. Gen. Biol.*, 31(1): 21–32, 2000.
- Vinogradova O.M., *Cyanoprokaryota in hyperhaline environments of Ukraine*, Alterpress, Kyiv, 2012. [Ukr.]
- Wheeler Q.D. and Meier R., *Species concepts and phylogenetic theory: a debate*, Columb. Univ. Press, New York, 2000.
- Wilmotte A., Van der Auwera G., and De Wachter R., Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF') strain PCC75 18, and phylogenetic analysis, *FEBS Lett.*, 317(1–2): 96–100, 1993.
- Zammit G., Billi D., and Albertano P., The subaerophytic cyanobacterium *Oculatella subterranea* (*Oscillatoriales*, *Cyanophyceae*) gen. et sp. nov.: a cytomorphological and molecular description, *Eur. J. Phycol.*, 47: 341–354, 2012.
- Zuker M., Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucl. Acid Res.*, 31(13): 3406–3415, 2003.

**3.2.5. Таксономія та номенклатура деяких наземних ціанобактерій
роду *Plectonema* s.l.**

On the Taxonomy and Nomenclature of Some Terrestrial Taxa of *Plectonema* s. l. (Cyanophyceae).

1. The Case of *Plectonema edaphicum**

Vinogradova O.N. & Mikhailyuk T.I.

*N.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine,
2 Tereshchenkivska Str., Kiev 01004, Ukraine
o.vinogradova@gmail.com*

ABSTRACT: The paper aims to solve some of the confusions in modern interpretations and generic affiliation of two terrestrial cyanobacteria originally described as *Plectonema puteale* f. *edaphicum* Elenkin and *P. boryanum* f. *hollerbachianum* Elenkin. The first taxon was recombined soon after its validation as *Plectonema edaphicum* (Elenkin) Vaulina. Many authors recorded this taxon from various soils, sometimes as a dominant in xerophytic algal communities. It was also found in two caves near Haifa. We discuss here the nomenclatural history of the genus *Plectonema* s.l., with special reference to its above-mentioned representatives, and provide a comparison of their morphological characteristics based on published sources. It is demonstrated that, in the process of the taxonomic revision of the order *Oscillatoriales* and resulting nomenclatural changes, a discrepancy arose between the “classical” interpretation of these taxa and their interpretation in the *Süsswasserflora von Mitteleuropa* (Komárek and Anagnostidis, 2005). Based on the analysis of literature data and original research, authors argued that both taxa described by Elenkin are found in nature. These ecologically similar terrestrial cyanobacteria have clearly expressed morphological features, which help in their identification. Phylogenetic analysis using sequences of the 16S *rRNA* gene of original strains of these taxa made it possible to clarify their taxonomic affiliations. Strains isolated from biological crusts and identified by morphological features as *Pseudophormidium hollerbachianum* (*Oscillatoriothycidae*) and *Leptolyngbya edaphica* (*Synechococcophycidae*) in phylogenetic reconstruction both clustered in the clade of the *Leptolyngbyaceae*. According to SSU *rRNA* phylogeny, the strain Ru-1-5, morphologically identified as *P. hollerbachianum*, is a representative of the clade *Leptolyngbya* and is closely related to *L. boryana*. Therefore, the name *Leptolyngbya hollerbachiana* (Elenkin) Anagnostidis et Komárek 1988 (instead of *P. hollerbachianum*) better corresponds to the phylogeny of this phenotype. The sequences of *L. edaphica* strains isolated from terrestrial habitats joined a well-supported clade of the newly

* Originally published in *Algologia*, 2018, 28(3), pp. 237–254

described genus *Timaviella* Sciuto et Moro (Sciuto et al., 2017). Based on this finding, we propose a new nomenclatural combination: *Timaviella edaphica* (Elenkin) O.M. Vynogr. et Mikhailiuk comb. nov.

KEY WORDS: terrestrial cyanobacteria, *Plectonema*, *Leptolyngbya*, *Pseudophormidium*, taxonomy, nomenclature, SSU rRNA phylogeny, new combination, *Timaviella edaphica*

INTRODUCTION

In recent decades, cyanobacterial taxonomy and systematics have undergone radical revision affecting taxa of all ranks (Komárek, 2010; Komárek et al., 2014). Now, due to the application of a polyphasic approach combining molecular phylogenetic analysis, phenotypic characterization, and nomenclatural checking, the revisions cover a wide range of taxa. This forces field phycologists to be in constant readiness to revise their ideas about the system of cyanoprokaryotes. Most of the classic genera of cyanobacteria were recognized as polyphyletic and were divided into several (more often many) new genera; hundreds of species and forms changed their names and position in the classification system (Komárek and Anagnostidis, 1988, 1989, 1990, 1995; Anagnostidis, 2001). In many cases, the understanding of their diacritical features has also changed. These changes were included in the issues of the “*Süsswasserflora von Mitteleuropa*” devoted to *Cyanoprokaryota* (Komárek and Anagnostidis, 1999, 2005; Komárek, 2013). However, during the processing of such a large array of taxa of species and infraspecific rank, it is impossible to avoid inaccuracies and even errors, leading to nomenclatural confusion. We propose to consider the case of such a misunderstanding, discovered when we tried to clarify situation with some terrestrial representatives of the genus *Plectonema* s. l.

Background

The genus *Plectonema* (with a false branching as main diacritical character) was established by Thuret in 1875. Gomont (1892) in his monograph on *Oscillatoriaceae* revised this genus, at that time included eight recognized species mainly from aquatic habitats, and referred it to the tribe *Lyngbyeae* (filaments with one trichome). Now, *Plectonema* Thuret ex Gomont (in somewhat modified interpretation) is accepted in the modern system of cyanobacterial genera (Komárek et al., 2014). Since the revision of Gomont, species composition of this genus underwent significant changes. Geitler (1932) compiled the descriptions of 29 species of this genus, including 10 tropical and 5 marine. Elenkin (1949) implemented the most profound intrageneric revision of *Plectonema* critically analyzing all available data on European species. The author described a number

of forms, which later were recognized as separate species. An important contribution of Elenkin in the knowledge of the ecological range of this genus was the involvement of data of his student Hollerbach, who performed a special study of soil algae as a PhD thesis. In particular, Hollerbach isolated from the soil representatives of five species of *Plectonema* previously known from aquatic habitats. In three cases (*P. phormidioides*, *P. notatum*, and *P. gracillimum*) cultural material mostly corresponded to the protologues. Describing the morphotypes similar to *P. puteale* and *P. boryanum*, Hollerbach made a number of observations but did not draw nomenclatural conclusions. Elenkin used his observations for describing new infraspecific taxa: *P. puteale* f. *edaphicum* Elenkin and *P. boryanum* f. *hollerbachianum* Elenkin. Both of them differed from the typical forms of these species by smaller dimensions and habitat (soil). They also differed sharply from each other both morphologically and by the mode of growth in aquatic cultures (Fig. 1, Table). *Plectonema puteale* f. *edaphicum* "... formed on the glass walls of the flasks above the cultural medium level thin felt films dirty blue-green to dark brown in color" (Elenkin, 1949, p. 1784). *Plectonema boryanum* "... developed ... almost exclusively on the walls of the flasks below the level of the solution in the form of dense films, dull dark blue-green or slightly olive in color" (Ibid., p. 1788). As for the false branching, which differ in the mentioned species (filaments of *Plectonema puteale* "rarely pseudobranching, pseudobranches short", and in *P. boryanum* "richly pseudobranching, pseudobranches long, geminate), we can assume that the new forms do not have deviations from the type since Elenkin did not say anything about it. The drawings of Hollerbach given by Elenkin confirm this conclusion (Fig. 1).

Descriptions of the new terrestrial forms were included in the "Identification Manual of the Freshwater Algae of the USSR. Blue-Green Algae" (Hollerbach, 1953). Later, they entered identification manuals of *Cyanophyta* of Poland (Starmach, 1966) and Ukraine (Kondratyeva, 1968) but in a different taxonomic status: f. *hollerbachianum* Elenkin remained the infraspecific taxon of *P. boryanum*, for the f. *edaphicum* a new nomenclature combination of species rank was proposed.

Plectonema puteale f. *edaphicum* quite often occurred in various soils; this fact contributed to a better knowledge of its morphology and biology. Vaulina, the PhD student of Hollerbach, working on the study of soil algae of Belarus repeatedly found representatives of this taxon in soils of different types, which enabled her to study them in detail in culture. Based on her own observations, and referring to the opinion of Shtina (1955, p. 441; cit. from Vaulina, 1959), who studied this form in the soils of the Kirov Region of Russia, the author proposed a new nomenclature combination *Plectonema edaphicum* (Elenkin) Vaulina. The paper (Vaulina, 1959) contains a brief Latin diagnosis and a much more expanded and detailed description in Russian illustrated by drawings both of Hollerbach from Elenkin, 1949 (Fig. 1, A) and Vaulina (Fig. 2).

TABLE: Morphological features of the taxa of «*Plectonema edaphicum*» cluster from literature (a dash indicates the absence of data)

Feature	Literature sources and taxa				
	Elenkin, 1949 after Hollerbach	Vaulina, 1959	Kondratyeva, 1968	Anagnostidis and Komárek, 2005	
	<i>Plectonema puteale</i> f. <i>edaphicum</i> Elenkin	<i>Plectonema edaphicum</i> (Elenkin) Vaulina (basionym <i>P. puteale</i> f. <i>edaphicum</i> Elenkin)	<i>Plectonema edaphicum</i> (Hollerbach) Vaulina (basionym <i>P. puteale</i> f. <i>edaphicum</i> Elenkin)	<i>Lepolyngva edaphica</i> (Hollerbach ex Elenkin) Anagnostidis et Komárek (basionym <i>P. puteale</i> f. <i>edaphicum</i> Elenkin)	<i>Pseudophormidium hollerbachianum</i> (Elenkin) Anagnostidis (basionym <i>P. boryanum</i> f. <i>hollerbachianum</i> Elenkin) <i>Plectonema edaphicum</i> (Elenkin) Vaulina 1959 sensu Vaulina
Thallus	Thin felt films, dirty blue-green to dark brown in color	Dirty gray-blue-green to dark-brown films, thin, felted, consisted of densely entangled filaments, gray, gray-brown to dark-brown in color	–	Solitary filaments or (usually) in thick compact dirty blue-green to blackish thallus	Gelatinous, thin, dark brown-green or bright olive-green
Width of filament	2.5–5.0 µm	–	2.5–5.0 µm	2.5–5.0 µm	(2)2.5–3.6 µm
False branching	Rarely	Rarely, but in aquatic cultures may be plentiful	Very rare	Very rare	Richly pseudobranchied, pseudobranches single or geminate
Sheath	In young filaments thin, dull gray, later thickened, sometimes swollen, dense, gray-brown to dark brown, with sharply outlined, almost black-brown outer layer	Sheath of various thickness, from very thin, barely visible to fairly thick, often with uneven thickenings, colorless	First thin, dull gray, later thickened and sometimes swollen, dense, gray-brown to dark brown, with sharply outlined, almost black-brown outer layer	Firstly thin, colorless, later thick, slightly to intensely brownish to blackish	Colorless, smooth, thin, slightly widened at the points where the formation of hormogonia takes place
Trichome: color, constrictions at cross-walls	Weakly constricted	Strongly constricted	Weakly constricted	Pale blue-green, constricted at cross-walls	Mostly markedly constricted
Width of trichome	1.7–2.5 µm	1.4–2.6 µm, often 2 µm, rarely 3 µm	2–4 µm	1.7–4.0 µm	1.4–2.7(4) µm
Cell's shape and length	Isodiametric or elongated, 2.5–3.0 µm	Barrel-shaped to shortly elliptic, 1–2 µm	Cylindrical, (0.9)1.5–6.0 µm	(0.9)1.5–6.0 µm	Moniforme, usually shorter than wide, disk-shaped or isodiametric, (0.8)1.0–1.5 (6.2) µm
Apical cells	Rounded-cylindrical	Hemispherical	Rounded-cylindrical	Cylindrical, rounded at the top	Rounded

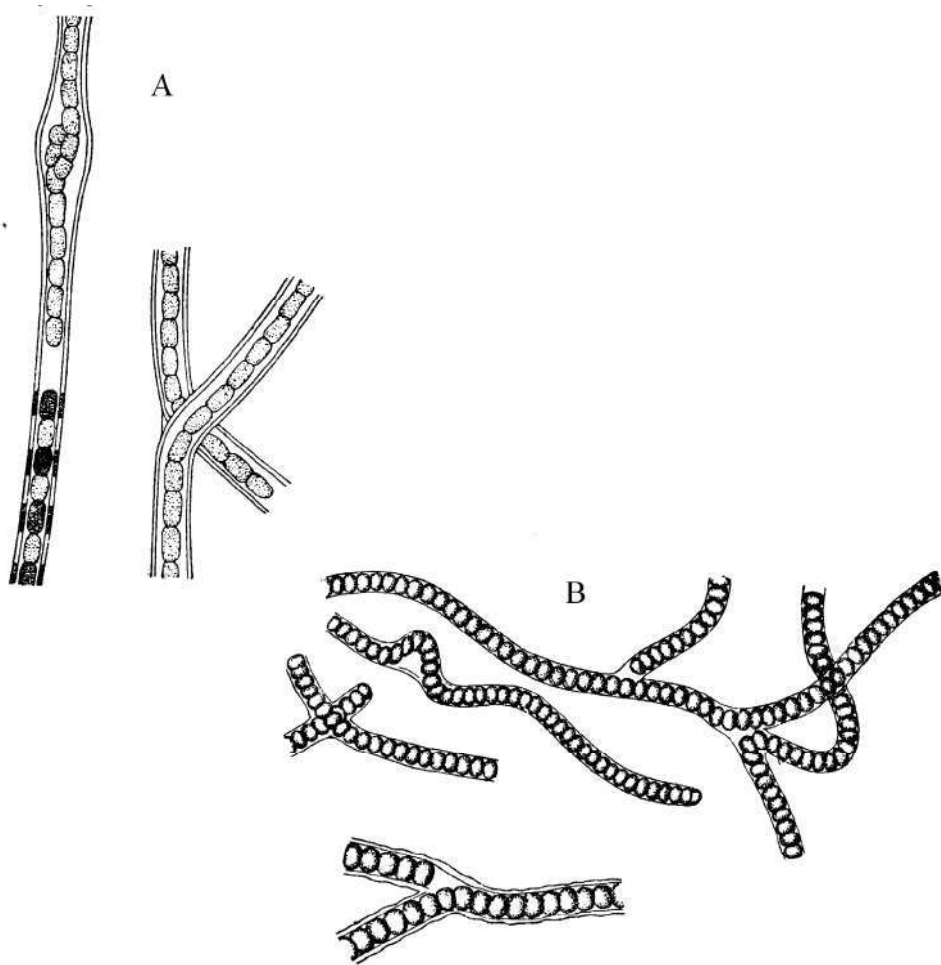


FIG. 1: Original drawings of Hollerbach from Elenkin, 1949: *A* – *Plectonema puteale* f. *edaphicum* Elenkin; *B* – *Plectonema boryanum* f. *hollerbachianum* Elenkin

The description of the new species largely coincides with the original description of Hollerbach (Elenkin, 1949, p. 1784). However, there are some differences, obviously because Vaulina worked with both liquid and soil cultures. The author expanded the range of the cell width and length, and described how pseudobranches arise in cultures of different types (Vaulina, 1959, p. 20): “filaments ... with a rare false branching, which is mostly expressed by rupture of trichomes, bloating of the sheath and approaching the opposite ends of trichomes for each other” (Fig. 2, 1–5). “However, in filaments immersed in liquid medium at the bottom of the flask, branching can be quite abundant” (Fig. 2, 6–8). Unfortunately, these details were given only in Russian, which later, obviously, led to a distorted interpretation of this species (see below).

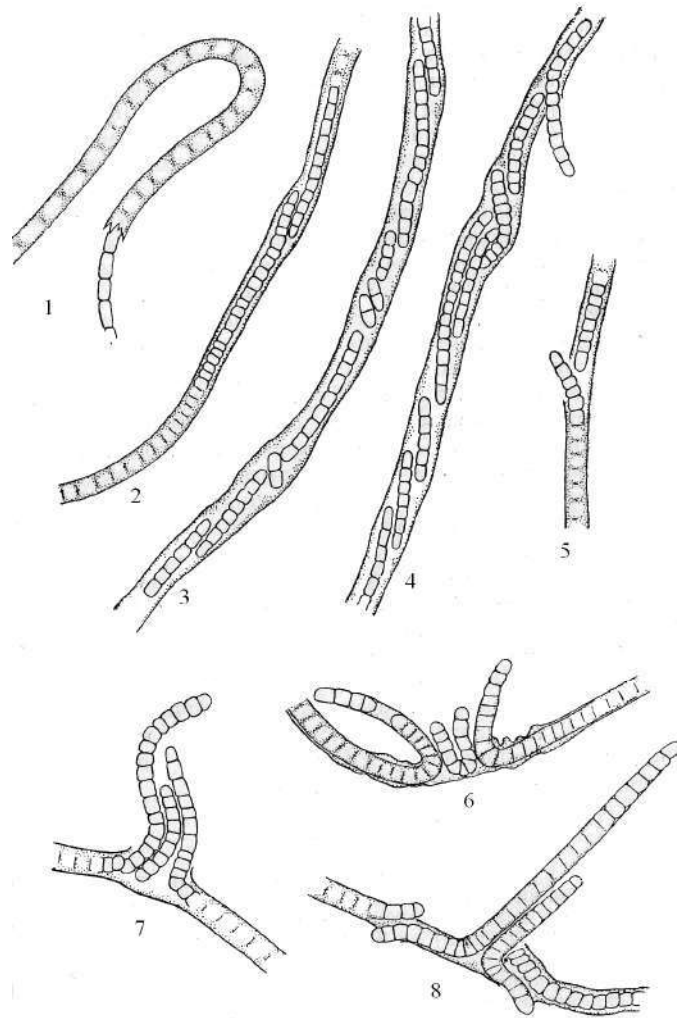


FIG. 2: *Plectonema edaphicum* (Elenkin) Vaulina: 1–5 – filaments from soil culture; 6–8 – false branching in liquid culture (after Vaulina, 1959)

The most characteristic feature of the new species is the appearance of the sheath: thin and light gray in young filaments, in old they become thick, dark gray, or gray-brown to dark brown, with a sharply outlined almost black-brown outer layer, sometimes swollen. Both Hollerbach and Vaulina noted that trichomes inside the sheath are almost invisible. The color of the sheath determines the peculiar brownish shade of the *P. edaphicum* thallus.

Starmach (1966, p. 695, fig. 1022) took the description and drawings of *P. edaphicum* from Vaulina, 1959. Kondratyeva supplemented the protologue with width of the filaments, and used drawings of both Hollerbach and Vaulina (Kondratyeva, 1968, p. 224, fig. 116, 1, 2). She noted that this species was not recorded in Ukraine but can be found.

Due to the edaphic mode of life and characteristic appearance of the filaments, *P. edaphicum* is fairly well revealed in cultures. The mention in the popular identification manual of Kondratyeva also contributed to its “recognizability”. In Ukraine this species was recorded in various soils of the Forest-Steppe (Massjuk et al., 1983; Mikhailyuk, 2000), and especially, of the Steppe zone including solonets (Prihodkova and Vinogradova, 1988; Prihodkova, 1992; Kostikov et al., 2001). In Mountain Crimea *P. edaphicum* also occurred in terrestrial habitats; in particular, it was among dominants of gray-brown gravelly soil (Vinogradova, 1989). In other republics of the former Soviet Union, this taxon was found in soils of various types, including as the dominant in xerophytic algal communities (Melnikova, 1975; Basova, 1978); outside the USSR, it was poorly known. Novichkova-Ivanova (1980) cited *P. edaphicum* for the sand desert of Tar in Sindh province (Pakistan). Vinogradova repeatedly found it in the cultures from numerous terrestrial habitats of Israel ranging from rendzina in the Upper Galilee to the loess of the Central Negev and the rocky outcrops of the Makhtesh Ramon and Timna in the south (Vinogradova et al., 2000, 2004). The species was also found on the walls of two caves near Haifa, both on dry and wet sites (Vinogradova, 1999). Based on the literature data and our experience of soil phycologists, we can assert that morphospecies *P. edaphicum* occurs in diverse terrestrial ecotopes, including under conditions of excessive solar radiation, water deficiency, increased salinity, and extremely lowlight intensity.

It should be noted that in some publications one could find a “corrected” spelling version of the name *Plectonema edaphicum*, which is given as “*Plectonema edaphica*”. The authors, who “corrected” the grammatical gender of the epithet, in contrast to Elenkin who received the classical education obviously did not know that compound words of Greek origin ending in *-ceras*, *-dendron*, *-nema*, *-stigma*, and *-stoma* (and some others) are not feminine but neuter. This is also enshrined in Art. 62.2 (c) of the ICN (Turland et al., 2018). For this reason, the name *Plectonema* is neuter and needs epithets in the form of the neuter gender (for example, *edaphicum*).

Unfortunately, most of the data on species diversity and the distribution of soil algae, accumulated during the Soviet period, remained almost unknown to foreign colleagues. For example, in AlgaeBase the general distribution of *P. edaphicum* is limited to Israel (Vinogradova et al., 2000). Taxonomic publications of Soviet algologists are better known; many of the taxa described by them are included in European compendiums and, then, in electronic databases. However, in the case of *P. puteale* f. *edaphicum* there was a certain nomenclature collision: in AlgaeBase it is indicated as a basionym for three taxa

(*Plectonema edaphicum*, *Pseudophormidium edaphicum*, and *Leptolyngbya edaphica*) of which the latter two are designated as taxonomically recognized. Since, according to Principle IV of the ICN (Turland et al., 2018), a taxonomic group of a certain volume, taxonomic position, and rank can bear only one correct name, the situation described above (two taken names of the same rank based on a single basionym) is impossible from a nomenclature point of view. It seems to be an obvious confusion; so we tried to figure out how it happened.

Nomenclature history of *Plectonema edaphicum*

As is known, the accumulation of taxonomically important information on ultrastructural, genetic, biochemical, ecophysiological features of cyanoprokaryotes required a revision of the classical system of *Cyanophyta*. The most successful attempt of such revision was undertaken in preparation for a new edition of the *Süßwasserflora von Mitteleuropa* (Anagnostidis and Komárek, 1985, 1988; Komárek and Anagnostidis, 1986, 1989). In particular, a revised system of *Oscillatoriales* included 43 genera classified into six families (Anagnostidis and Komárek, 1988). Taxa, previously membering *Plectonema* s.l., after revision were placed into four genera from three families. Genus *Plectonema* Thuret ex Gomont, representing a newly established subfamily *Plectonematoideae* of the family *Oscillatoriaceae*, included five species with wide obligatory and richly pseudobranching filaments, trichomes 8–25 µm wide, and discoid cells. Three species were included to genus *Pseudoscytonema*, subfamily *Ammatoideoideae* of the same family. Another group of species (12) was identified as genus *Pseudophormidium* (Forti) Anagnostidis et Komárek (basionym *Plectonema* section *Pseudophormidium* Forti). The main diacritical feature of the new genus is obligatory and common false branching of filaments; in other characters, it is similar with *Phormidium* and other genera of family *Phormidiaceae* (Anagnostidis and Komárek, 1988, p. 409). *Plectonema puteale* f. *edaphicum* became the basionym of *Pseudophormidium edaphicum* (Elenkin) Anagnostidis et Komárek. Nomenclature references include Elenkin, 1949 and Kondratyeva, 1968. This directly links the new combination with *Plectonema edaphicum* (Elenkin) Vaulina. Nineteen former *Plectonema* taxa (including *P. boryanum* f. *hollerbachianum* as *Leptolyngbya hollerbachiana*) were referred to a newly established genus *Leptolyngbya* Anagnostidis et Komárek (subfamily *Leptolyngbyoideae*).

In the decade following the revision of 1988, new molecular, ultrastructural, and ecophysiological data appeared entailing a revision of the systematic position of many taxa. At the final stage of preparation of the second issue of volume 19 of the “*Süßwasserflora ...*”, devoted to *Oscillatoriales*, the valid publication of nomenclatural transfers of species and generic names was done. Two hundred and eight nomenclatural combinations were published (Anagnostidis, 2001). Among them were the taxa we discussed here. *Leptolyngbya hollerbachiana* was newly recombined in *Pseudophormidium holler-*

bachianum (Elenkin) Anagnostidis (basionym *P. boryanum* f. *hollerbachianum*). *Pseudophormidium edaphicum* became *Leptolyngbya edaphica* (Elenkin) Anagnostidis et Komárek (basionym *Plectonema puteale* f. *edaphicum* Elenkin). These recombinations had no taxonomic explanations or descriptions; the latter are given only for new taxa of species rank.

The *Oscillatoriales* issue of the *Süßwasserflora* was published in four years (Komárek and Anagnostidis, 2005). In this book, nomenclature of the abovementioned species follows Anagnostidis, 2001. However, their descriptions and interpretation sharply differed from basionyms, although the names of Hollerbach and Elenkin are cited among authors of taxa.

We read (Komárek and Anagnostidis, 2005, p. 222):

“*Leptolyngbya edaphica* (Hollerbach ex Elenkin) Anagnostidis et Komárek in Anagnostidis 2001 (fig. 274)

Plectonema puteale (Kirchner) Hansgirg f. *edaphicum* Elenkin 1949; *Lyngbya lagerheimii* f. *edaphica* (Hollerbach) Elenkin 1949 incl.; *Leptolyngbya hollerbachiana* Anagnostidis et Komárek sensu auct. post. (Albertano et al., 1991); **non *Plectonema edaphicum* (Hollerbach) Vulina 1959 sensu Vulina**”.

Bold text corresponds to the standard nomenclature citation of a misapplied name: “*Plectonema edaphicum* (Hollerbach) Vulina, *excl. pl.*” In other words, from the cited remark, we can conclude that Anagnostis and Komárek believed that Vulina (the author of a combination of species rank) erroneously attributed representatives of a different species to this taxon. According to the Article 7.3. of the ICN (Turland et al., 2018), a new combination is typified by the type of the basionym, so the combination of Vulina is homotypic with the name *Leptolyngbya edaphica*, regardless of the understanding of this taxon by Vulina. It should also be noted that the incorporation of *Lyngbya lagerheimii* f. *edaphica* (Hollerbach) Elenkin in *L. edaphica*, because of morphological characters, seems somewhat doubtful: its unstricted trichomes in colorless narrow sheaths are very different from the species under discussion and, by the way, these features did not correspond the description cited above.

Also not clear is the mention of *L. hollerbachiana* from Albertano et al., 1991. The paper discusses the effect of light on the ultrastructure of several strains of cyanobacteria isolated from the hypogeous. TEM images of the strain designated as *L. hollerbachiana* demonstrate parietal thylakoids, the central polyphosphate body, carboxysomes, necridia, and weak constrictions at cell walls. In the paper, we did not find the data on the morphology of this strain, except for the constant presence of sheath.

So, what happened to the *P. edaphicum* sensu Vulina excluded from *L. edaphica*? Continue to read the *Süßwasserflora* (Komárek and Anagnostidis, 2005, p. 380):

“*Pseudophormidium hollerbachianum* (Elenkin) Anagnostidis 2001 (fig. 535).

Plectonema boryanum f. *hollerbachianum* Elenkin 1949; ***Plectonema edaphicum* (Elenkin) Vulina 1959 sensu Vulina; not Elenkin nec Hollerbach**; *Leptolyngbya hollerbachiana* (Elenkin) Anagnostidis et Komárek 1988.”

As we understood, the text in boldface corresponds to the standard nomenclatural citation “*Plectonema edaphicum* sensu Vulina, non (Hollerbach) Vulina, excl. typo”, implying that Vulina mistakenly applied the basionym (basionyms?) of Elenkin and Hollerbach to the samples she had studied that actually belonged to *Pseudophormidium hollerbachianum* (Elenkin) Anagnostidis (= *Plectonema boryanum* f. *hollerbachianum* Elenkin).

Thus, the Hollerbach-Elenkin *forma edaphicum* and the species recombined from it by Vulina (the PhD student of Hollerbach) are declared different taxa. It is curious that illustrations of *Leptolyngbya edaphica* (Komárek and Anagnostidis, 2005, p. 221, fig. 274) were taken after Hollerbach from Kondratyeva (1968, sub *Plectonema edaphicum*). Figures of *P. hollerbachianum* were given after Vulina (1959) and Starmach and Sieminska (1979), with the note that in both cases the authors cited it as *P. edaphicum* (Ibid., p. 380, Fig. 535). As mentioned above, Starmach (1966) included in his monograph **both taxa** we discussed here, so he could hardly make a mistake signing the figure. Original drawings of Hollerbach from Elenkin (1949) illustrated *P. boryanum* f. *hollerbachianum*, the basionym of *P. hollerbachianum*, were ignored in Komárek and Anagnostidis, 2005.

We tried to understand the reasons for revising two well-known terrestrial taxa described by one author. Since the new interpretation concerns morphological features, we compared them according to published data taking protologues from Elenkin, 1949 as a starting point (Table). As can be seen from the table, for most of the characters (the appearance of the sheath, the width of the filament, rarely occurring false branching, the weak constrictions of the trichome, the shape and length of the cells) the descriptions of *P. puteale* f. *edaphicum* by Hollerbach, *P. edaphicum* by Vulina and *L. edaphica* by Anagnostidis and Komárek coincide. The last taxon differs from that given by Hollerbach and Vulina (which are almost identical to each other) in the appearance of the thallus, and from *P. edaphicum* in somewhat smaller upper limits of the length and width of the cells (Table).

But if we compare the descriptions of *P. hollerbachianum*, its basionym and “*P. edaphicum* (Elenkin) Vulina 1959 sensu Vulina”, which is referred to *P. hollerbachianum*, the differences between *P. edaphicum* and the other two taxa are obvious. They concern the color and structure of the sheath, the frequency and appearance of pseudobranches, the degree of trichome constriction, and the shape and length of intercalary cells (Table). Regarding the latter, we do not understand how the cylindrical (according to protologue) cells of *P. edaphicum* correspond to the monoliform cells from the description of *P. hollerbachianum*; by the way, the original drawing of Hollerbach (Fig. 1, B) demonstrates them very clearly.

In our opinion, the analysis of the table indicates the erroneous nature of the statement a) about a different interpretation of *P. puteale* f. *edaphicum* by Hollerbach and Vulina, and b) about the identity of *P. hollerbachianum* and *P. edaphicum* (Elenkin) Vulina. We have no doubt, that in nature there are two separate taxa which Elenkin described on the

basis of Hollerbach's observations. These ecologically close inhabitants of edaphon and lithophyton have clearly expressed morphological features enabling both to identify each of them in nature and culture, and to distinguish them between each other. Our assumptions were recently supported by convincing proof.

In the study of biological soil crusts from coastal ecotopes (Schulz et al., 2016; Mikhailiuk et al., in press), we had the opportunity to conduct a comprehensive study of the taxa under discussion, which were among the most common in the studied habitats. They were isolated in culture and, since the strains Ru-1-5 and Us-6-3 corresponded well to the descriptions of *P. hollerbachianum* and *L. edaphica* in Komárek and Anagnostidis, 2005 they were identified as these species. However, the results of SSU *rRNA* phylogeny (Fig. 1 in Mikhailiuk et al., in press) did not confirm their taxonomic affiliations. The analysis showed that both strains belong to the subclass *Synechococcophycideae*.

First, this means that the use of the name *Pseudophormidium* for this morphotype is incorrect in principle, since this genus belongs to the family *Microcoleaceae* of the subclass *Oscillatoriophyycideae*. According to SSU *rRNA* phylogeny, the strain Ru-1-5, morphologically identified as *P. hollerbachianum* is representative of the clade *Leptolyngbya*: on the phylogenetic tree it formed highly supported clade with the strains *Leptolyngbya foveolarum* VP1-08 and *L. boryana* UTEX D 488 (Ibid., Fig. 1). It should be noted that in phylogenetic reconstructions of other authors (Osario-Santos et al., 2014; Miscoe et al., 2016; Sciuto et al., 2017), the strains designated as *Pseudophormidium* also clustered in the clade *Leptolyngbyaceae*, so the question of the taxonomic affiliation of this genus needs revision. Before this question will be answered, we propose to use the name *Leptolyngbya hollerbachiana* (Elenkin) Anagnostidis et Komárek 1988 (basionym *Plectonema boryanum* f. *hollerbachianum* Elenkin) instead of *Pseudophormidium hollerbachianum*.

The strain Us-6-3, phenotypically corresponding to *L. edaphica*, as well as to other original strains of this morphospecies from various terrestrial habitats, join the clade of the newly described genus *Timaviella* Sciuto et Moro (Sciuto et al., 2017), although it does not belong to the *T. karstica* Sciuto et Moro and *T. circinata* Sciuto et Moro (Fig. 1 in Mikhailiuk et al., in press). On the basis of the foregoing discussion, we propose a new nomenclature combination:

Timaviella edaphica (Elenkin) O.M. Vynogr. et Mikhailiuk comb. nov.

Basionym: *Plectonema puteale* (Kirchner) Hansgirg f. *edaphicum* Elenkin 1949. Monogr. Alg. Cyanoph., Pars. Spec. 2: 1783, fig. 541.

Synonyms: *Plectonema edaphicum* (Elenkin) Vulina 1959; *Plectonema edaphicum* (Hollerbach) Vulina in Kondratyeva, 1968; *Pseudophormidium edaphicum* (Elenkin) Anagnostidis et Komárek 1988; non *Leptolyngbya edaphica* (Hollerbach ex Elenkin) Anagnostidis et Komárek 2005).

CONCLUSIONS

Analysis of the nomenclatural history, morphological characters and results of SSU *r*RNA phylogeny of two representatives of terrestrial false-branching cyanobacteria initially described as *Plectonema puteale* f. *edaphicum* Elenkin and *P. boryanum* f. *hollerbachianum* Elenkin made it possible to clarify their taxonomic affiliations. It is demonstrated that, in the process of the taxonomic revision of the order *Oscillatoriales* and resulting nomenclatural changes, a discrepancy arose between the “classical” interpretation of these taxa and their interpretation in the *Süßwasserflora von Mitteleuropa* (Komárek and Anagnostidis, 2005). The analyses using sequences of the 16S *r*RNA gene provide evidence that original strains identified by morphological features as *Pseudophormidium hollerbachianum* (*Oscillatoriothycidae*) and *Leptolyngbya edaphica* (*Synechococcosphyceae*), in phylogenetic reconstruction both clustered in the clade of the *Leptolyngbyaceae*. According to SSU *r*RNA phylogeny, the strain Ru-1-5, morphologically identified as *P. hollerbachianum* is representative of the clade *Leptolyngbya* and is closely related to *L. boryana*. Therefore, the name *Leptolyngbya hollerbachiana* (Elenkin) Anagnostidis et Komárek 1988 instead of *P. hollerbachianum* better corresponds to the phylogeny of this phenotype. The sequences of *L. edaphicum* strains isolated from terrestrial habitats joined a well-supported clade of the newly described genus *Timaviella* Sciuto et Moro. Based on this finding, a new nomenclatural combination, *Timaviella edaphica* (Elenkin) O.M. Vynogr. et Mikhailyuk comb. nov. is proposed.

ACKNOWLEDGMENTS

We express sincere gratitude to Prof. Sergei L. Mosyakin for valuable advice on nomenclature issues. The research was partially supported by a Georg-Forster Fellowship of the Alexander von Humboldt Foundation (Alexander von Humboldt Stiftung).

REFERENCES

- Albertano P., Luongo L., and Grilli-Caiola M., Observations on cell structure of microorganisms of an epilithic phototrophic community competing for light, *Nova Hedw.*, 53: 369–381, 1991.
- Anagnostidis K. and Komárek J., Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1. Introduction, *Algol. Stud.*, 38–39: 291–302, 1985.
- Anagnostidis K. and Komárek J., Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. *Oscillatoriales*, *Algol. Stud.*, 50–53: 327–472, 1988.
- Anagnostidis K., Nomenclatural changes in cyanoprokaryotic order *Oscillatoriales*, *Preslia* (Praha), 73: 359–376, 2001.
- Bazova A.G., *Soil algae of the Pamir highlands*, Donish, Dushanbe, 1978. [Rus.]

- Elenkin A.A., *Monographia Algarum Cyanophycearum Aquidulcium et Terrestrium in finibus URSS inventarum*, Spec. pt 2, AN USSR Press, Moscow; Leningrad, 1949. [Rus.]
- Geitler L., *Cyanophyceae*, in: *Rabenhorst's Kryptogamenflora*, Bd. 14, Acad. Verlag, Leipzig, 1932.
- Gomont M.M., Monographie des *Oscillariées (Nostocacées homocystées)*, *Ann. Sci. Nat. Bot., Sér. 7*(15): 263–368; (16): 91–294, 1892.
- Guiry M.D. and Guiry G.M., *AlgaeBase*, World-wide electronic publication, Nat. Univ. Ireland, Galway, 2018. <http://www.algaebase.org>
- Hollerbach M.M., Blue-Green Algae, in: *Identification manual of freshwater algae of the USSR*, Vol. 2, Sov. Nauka Press, Moscow, 1953. [Rus.]
- Komárek J. and Anagnostidis K., *Cyanoprokaryota. 1. Chroococcales*, in: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd 19/1, G. Fisher, Jena, etc., 1999.
- Komárek J. and Anagnostidis K., *Cyanoprokaryota. 2. Oscillatoriales*, in: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd 19/2, Elsevier Spectr., München, 2005.
- Komárek J. and Anagnostidis K., Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2. *Chroococcales*, *Algol. Stud.*, 43: 151–226, 1986.
- Komárek J. and Anagnostidis K., Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4. *Nostocales*, *Algol. Stud.*, 56: 247–435, 1989.
- Komárek J., *Cyanoprokaryota*, 3rd pt, *Heterocytous Genera*, in: *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd 19/3, Elsevier, Berlin; Heidelberg, 2013.
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., and Johansen J.R., Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014 using a polyphasic approach, *Preslia (Praha)*, 86(4): 295–235, 2014.
- Komárek, J., Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept), *Hydrobiologia*, 639: 245–59, 2010.
- Kondratyeva N.V., *Class Hormogoniophyceae*, in: *Identification manual of freshwater algae of Ukrainian SSR*, Vol. 1, pt 2, Naukova Dumka Press, Kyiv, 1968. [Ukr.]
- Kostikov I.Yu., Romanenko P.O., Demchenko E.M., Darienko T. M., and Mikhailuk T.I., *Algae of Ukrainian soils (history and methods of research, system, checklist of flora)*, Phytosociocenter, Kyiv, 2001. [Ukr.]
- Massjuk N.P., Guk L.S., Kostikov I.Yu., and Scherbak O.N., Blue-green algae of Kaniv Reserve and its environs, *Probl. Obsch. Mol. Biol.*, 2: 76–85, 1983.
- Melnikova V.V., *Soil and rock algae of the south of Central Asia*, Donish Press, Dushanbe, 1975. [Rus.]
- Mikhailiyuk T.I., *Algae of Kaniv Nature Reserve*, Abstr. Ph.D. (Biol.), Thesis, Kiev, 2000. [Ukr.]
- Mikhailiyuk T.I., Glaser K., Tsarenko P., Demchenko E.M., and Karsten U., Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast in the context of an integrative approach for the taxonomy of microalgae and cyanobacteria, *Eur. J. Phycol.* (in press).
- Miscoe L.H., Johansen J.R., Vaccarino M.A., Pietrasiak N., and Sherwood A.R., The diatom flora and cyanobacteria from caves on Kauai, Hawaii. II. Novel cyanobacteria from caves on Kauai, Hawaii, *Bibl. Phycol.*, 123: 75–152, 2016.

- Novichkova-Ivanova L.N., *Soil algae of phytocenoses of the Sahara-Gobi desert region*, Nauka Press, Leningrad, 1980. [Rus.]
- Osorio-Santos K., Pietrasiak N., Bohunická M., Miscoe L.H., Kováčik L., Martin M.P., and Johansen J.R., Seven new species of *Oculatella* (*Pseudanabaenales*, *Cyanobacteria*): taxonomically recognizing cryptic diversification, *Eur. J. Phycol.*, 49(4): 450–470, 2014.
- Prikhodkova L.P. and Vinogradova O.N., Blue-green algae of the soils of Chernomorsky Nature Reserve, *Ukr. Bot. J.*, 45(5): 41–45, 1988.
- Prikhodkova L.P., *Blue-green algae of the soils of Steppe zone of Ukraine*, Naukova Dumka Press, Kiev, 1992. [Rus.]
- Schulz K., Mikhailiuk T., Dreßler M., Leinweber P., and Karsten U., Biological soil crusts from coastal dunes at the Baltic Sea: cyanobacterial and algal biodiversity and related soil properties, *Microbiol. Ecol.*, 71: 178–193, 2016.
- Sciuto K., Moschin E., and Moro I., Cryptic cyanobacterial diversity in the Giant Cave (Trieste, Italy): a new genus *Timaviella* (*Leptolyngbyaceae*), *Cryptogam. Algol.*, 38(4): 285–323, 2017.
- Starmach K. and Sieminska J., Blue-green algae from soil samples at various places in Europe, *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 56, *Algol. Stud.*, 22: 1–23, 1979.
- Starmach K., *Cyanophyta – Sinice. Glaukophyta – Glaykofity*, in: *Flora słodkowodna Polski*, T. 2, Panstw. Wydaw. Nauk., Warszawa, 1966.
- Turland N.J., Wiersema J.H., Barrie F.R., Greuter W., Hawksworth D.L., Herendeen P.S., Knapp S., Kusber W.-H., Li D.-Z., Marhold K., May T.W., McNeill J., Monro A.M., Prado J., Price M.J., and Smith G.F., *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017*, Reg. Veget. 159, Koeltz Bot. Books, Glashütten, 2018. <https://doi.org/10.12705/Code.2018>
- Vaulina E.N., On the systematic position of the soil form *Plectonema puteale* (Kirchn.) Hansg., *Bot. Mat. Dept. Spore Plants*, 12: 19–22, 1959.
- Vinogradova O.N., Blue-green algae of the soils of Karadag Nature Reserve, *Ukr. Bot. J.*, 46(1): 40–45, 1989.
- Vinogradova O.N., *Cyanoprokaryota in hyperhaline environments of Ukraine*, Alterpress, Kyiv, 2012. [Ukr.]
- Vinogradova O.N., Kovalenko O.V., Levanets A.A., Wasser S.P., and Nevo E., Epilithic algal communities of dry rocks of the Negev Desert, Israel, *Ukr. Bot. J.*, 61(2): 7–20, 2004.
- Vinogradova O.N., On the ecology of *Plectonema edaphicum* (Elenk.) Vaul. (*P. edaphicum* (Elenk.) Anagn. et Kom.), *Oscillatoriales, Cyanophyceae, Algologia*, 9(2): 25–26, 1999.
- Vinogradova O.N., Wasser S.P., and Nevo E., *Cyanoprokaryota*, in: *Cyanoprocaryotes and Algae of continental Israel (Biodiversity of cyanoprocaryotes, algae and fungi of Israel)*, Koeltz. Sci. Books, Königstein, pp. 32–142, 2000.
- Vinogradova, O., Kovalenko, O.V., Wasser, S.P., Nevo E., and Weinstein-Evron M., Species diversity gradient to darkness stress in blue-green algae/cyanobacteria: a microscale test in a prehistoric cave, Mount Carmel, Israel, *Isr. J. Plant Sci.*, 46(3): 366–378, 1998.

ВИСНОВКИ

Отримані у процесі дослідження результати поповнили відомості щодо видового різноманіття водоростей та ціанобактерій біокірочок недостатньо вивчених та різноманітних за кліматичними і екологічними умовами регіонів світу. Застосування інтегративного підходу до вивчення біорізноманіття дозволило отримати достовірні дані щодо поширення окремих таксонів у біокірочках, їх екологічної причетності, виявити рідкісні види та описати нових представників, провести таксономічні ревізії недостатньо вивчених груп водоростей і ціанобактерій.

Ці результати дають підстави сформулювати наступні висновки.

1. Загалом, у біокірочках окремих регіонів та екосистем, виявлено 313 видів водоростей і ціанобактерій (Chlorophyta – 160 видів, Streptophyta – 30, Ochrophyta – 48 (Xanthophyceae – 26, Eustigmatophyceae – 4 та Bacillariophyceae – 18), Cyanobacteria – 75): на балтійських дюнах – 86 видів, чорноморських дюнах – 60, приморських екосистемах Азовського моря – 54, у лісах Німеччини – 52, штучних гіпергалінних екосистемах Німеччини – 30, у пустелях, напівпустелях та лісах Чилі – 86, тундрових екосистемах Свальбарду та Антарктичних островів – 82 і 49 видів відповідно.
2. В ході дослідження було описано 2 роди – *Streptosarcina* і *Streptofilum* (Streptophyta), 18 видів і 2 різновидності зелених водоростей та ціанобактерій (з родів *Parietochloris*, *Tetradesmus* (Chlorophyta), *Klebsormidium*, *Interfilum*, *Streptosarcina*, *Streptofilum* (Streptophyta), *Aliterella*, *Oculatella*, *Cyanocohniella* (Cyanobacteria)), здійснено емендацію та епітипіфікацію 16 видів (*Actinochloris*, *Eremochloris*, *Xerochlorella* (Chlorophyta), *Klebsormidium*, *Interfilum*, *Hormidiella* (Streptophyta), *Crinalium* (Cyanobacteria)) та запропоновано 6 номенклатурних комбінацій (*Heterochlamydomonas*, *Xerochlorella* (Chlorophyta),

Klebsormidium, *Interfilum*, (Streptophyta), *Timaviella* (Cyanobacteria).
Виявлено 15 нових для флори України видів.

3. Виявлено переважання зелених водоростей при значній ролі ціанобактерій у біокірочках балтійських та чорноморських дюн, ціанобактерій – приморських екосистем Азовського моря, зелених водоростей при майже повній відсутності ціанобактерій – лісів Німеччини, зелених ульвофіцієвих водоростей, витривалих до засолення – штучних гіпергалінних екосистем Німеччини, присутність унікальних представників *Klebsormidium* – у біокірочках напівпустель та лісів Чилі, значне різноманіття жовтозелених водоростей – полярних регіонів.
4. На прикладі приморських екосистем України та Німеччини встановлено, що основними факторами, які впливають на видовий склад та структуру угруповань водоростей і ціанобактерій біокірочок дюн, є текстура піску (за гранулометричним аналізом), а також його хімічний склад (електропровідність, рН, вміст карбонатів і фосфору), крім того, кліматичні особливості регіону.
5. Застосування інтегративного підходу значно уточнює інформацію стосовно видового складу водоростей та ціанобактерій біокірочок. На прикладі балтійських дюн показано уточнення видової ідентифікації для 15% списку, отриманого на основі морфологічних методів, та можливість виявлення цілої низки рідкісних і нових таксонів, попередня ідентифікація яких вказувала на звичайні види. Завдяки інтегративному підходу виявлено 18 нових філогенетичних ліній серед водоростей і ціанобактерій біокірочок гіпергалінних відвалів Німеччини.
6. На основі інтегративного підходу доведено, що рід *Interfilum* є представником Klebsormidiophyceae (Streptophyta), а також описано новий рід *Streptosarcina*. Таким чином, окреслено загальну філогенію класу, що нині включає 5 родів: *Klebsormidium*, *Interfilum*, *Hormidiella*, *Streptosarcina* та *Entransia*, а також таксони як з нитчастою сланню, так і з пакетоподібною та розгалуженою. Центральну філогенетичну лінію класу

розділено на 7 основних суперклад (A, B, C, D, E, F, G), що відповідають роду *Interfilum* (суперклада A) та різним філогенетичним лініям *Klebsormidium* (решта суперклад).

7. Відкрита нова філогенетична лінія роду *Klebsormidium* – суперклада G, що включає переважно представників, поширених у Південній Африці та Чилі. *Klebsormidium* з суперклади G характеризуються специфічною морфологією та віддаленим філогенетичним положенням щодо інших ліній даного роду. На основі ревізії групи описано 7 нових видів та 2 різновидності, які були виділені з біокірочок чотирьох континентів (Європи, Африки, Південної та Північної Америки). Виявлено, що ці таксони є типовими водоростями у ґрунтах Південної півкулі та рідкісними представниками у Північній півкулі, що змушує переглянути уявлення про *Klebsormidium* як водорість-космополіта, для поширення якої не існує географічних бар'єрів.
8. На основі аналізу морфологічних та ультратонких ознак особливостей ділення клітин представників класу Klebsormidiophyceae (Streptophyta) доведено, що ділення відбувається за спільним механізмом, близьким до споруляції. Формування різних морфотипів у даних водоростей залежить від особливостей закладання поперечної клітинної стінки в одній чи кількох площинах, що пов'язано з формою клітин, текстурою клітинної оболонки, механічними взаємозв'язками клітин та впливом оточуючого середовища.
9. Виявлено нову філогенетичну лінію серед Streptophyta, що характеризується унікальним клітинним покривом (субмікроскопічні органічні лусочки своєїрідної волоскоподібної будови), яку описано як рід *Streptofilum*. Враховуючи відокремлене філогенетичне положення та унікальність клітинної будови, дана лінія може претендувати на ранг нового класу серед Streptophyta.
10. Молекулярно-філогенетичними методами показано широке, ймовірно космополітичне, поширення в межах обох півкуль видів родів

Bracteacoccus, *Watanabea*, *Elliptochloris*, *Edaphochlorella*, *Xerochlorella*, *Pleurastrosarcina*, *Interfilum*. З іншого боку, поширення кількох видів *Klebsormidium* з філогенетичної суперклади G, на основі наших даних, переважно відбувається в межах Південної півкулі.

**СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА
ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ**

*Основні наукові результати дисертації опубліковані у фахових виданнях,
віднесених до першого і другого квартилів (Q1 і Q2), відповідно до
класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports*

1. **Mikhailyuk T.**, Sluiman H., Massalski A., Mudimu O., Demchenko E., Kondratyuk S., Friedl T. (2008). New streptophyte green algae from terrestrial habitats and an assessment of the genus *Interfilum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *J. Phycol.*, 44, 1586–1603. doi:10.1111/j.1529-8817.2008.00606.x (Ідея та концепція роботи належить здобувачеві, здобувачем проведено культивування штамів, визначення, морфологічне опрацювання, аналіз і узагальнення результатів (частково), написано текстову частину (частково)).
2. Rindi F., **Mikhailyuk T.**, Sluiman H.J., Friedl T., López-Bautista J.M. (2011). Phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Mol. Phyl. Evol.*, 58(2), 218–231. doi:10.1016/j.ympev.2010.11.030 (Ідея та концепція роботи належить здобувачеві (частково), здобувачем проведено культивування штамів, визначення, морфологічне опрацювання, молекулярно-філогенетичні дослідження (частково), взято участь у обговоренні результатів та написанні роботи (частково)).
3. **Mikhailyuk T.**, Holzinger A., Massalski A., Karsten U. (2014). Morphology and ultrastructure of *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Streptophyta) with special reference to cell division and thallus formation. *Eur. J. Phycol.*, 49(4), 395–412. doi:10.1080/09670262.2014.949308 (Здобувачем проведено культивування штамів, визначення, морфологічне опрацювання, аналіз і узагальнення результатів, написано текстову частину роботи та оформлено матеріали для публікації).

4. **Mikhailyuk T.**, Glaser K., Holzinger A., Karsten U. (2015). Biodiversity of *Klebsormidium* (Streptophyta) from alpine biological soil crusts (Alps, Tyrol, Austria, and Italy). *J. Phycol.*, 51(4), 750–767. doi:10.1111/jpy.12316 (Ідея та концепція роботи належить здобувачеві, здобувачем проведено культивування штамів, визначення, морфологічне опрацювання, молекулярно-філогенетичні дослідження (частково), аналіз і узагальнення результатів, написано текстову частину та оформлено матеріали для публікації).
5. Schulz K., **Mikhailyuk T.**, Dreßler M., Leinweber P., Karsten U. (2016). Biological soil crusts from coastal dunes at the Baltic Sea: cyanobacterial and algal biodiversity and related soil properties. *Microb. Ecol.*, 71, 178–193. doi:10.1007/s00248-015-0691-7 (Здобувачем взято участь у зборі зразків, виконано їх культивування, морфологічне визначення, виділення штамів, аналіз і узагальнення результатів (частково), взято участь у їх обговоренні, написанні текстової частини (частково)).
6. Borchhardt N., Baum C., **Mikhailyuk T.**, Karsten U. (2017). Biological Soil Crusts of Arctic Svalbard – Water Availability as Potential Controlling Factor for Microalgal Biodiversity. *Frontiers in Microbiology*, 8, Article 1485. doi:10.3389/fmicb.2017.01485 (Здобувачем проведено визначення та морфологічне опрацювання матеріалу (частково), взято участь в узагальненні результатів, їх обговоренні, редагуванні текстової частини).
7. Borchhardt N., Schiefelbein U., Abarca N., Boy J., **Mikhailyuk T.**, Sipman H.J.M., Karsten U. (2017). Diversity of algae and lichens in biological soil crusts of Ardley and King George islands, Antarctica. *Antarctic Science*, 29(3), 229–237. doi:10.1017/S0954102016000638 (Здобувачем проведено визначення та морфологічне опрацювання матеріалу (частково), взято участь в узагальненні результатів, їх обговоренні та редагуванні текстової частини).
8. Glaser K., Donner A., Albrecht M., **Mikhailyuk T.**, Karsten U. (2017). Habitat-specific composition of morphotypes with low genetic diversity in the green algal genus *Klebsormidium* (Streptophyta) isolated from biological soil crusts in Central European grasslands and forests. *Eur. J. Phycol.*, 52(2), 188–199. doi:

- 10.1080/09670262.2016.1235730 (Здобувачем проведено визначення та морфологічне опрацювання матеріалу (частково), молекулярно-філогенетичні дослідження (частково), взято участь у проведенні аналізу і узагальненні результатів, їх обговоренні та редагуванні текстової частини).
9. Glaser K., Baumann K., Leinweber P., **Mikhailyuk T.**, Karsten U. (2018). Algal richness in BSCs in forests under different management intensity with some implications for P cycling. *Biogeosciences*. 15(13), 4181–4192. doi:10.5194/bg-15-4181-2018 (Здобувачем проведено визначення та морфологічне опрацювання матеріалу (частково), взято участь в узагальненні результатів, їх обговоренні, редагуванні текстової частини).
10. **Mikhailyuk T.**, Lukešová A., Glaser K., Holzinger A., Obwegeser S., Nyporko S., Friedl T., Karsten U. (2018). New taxa of Streptophyte algae (Streptophyta) from terrestrial habitats revealed using an integrative approach. *Protist*, 169(3), 406–431. doi:10.1016/j.protis.2018.03.002 (Ідея та концепція роботи належить здобувачеві, здобувачем проведено культивування штамів, визначення, морфологічне опрацювання, молекулярно-філогенетичні дослідження (частково) і підготовку зразків для ТЕМ (частково), аналіз і узагальнення результатів, написано текстову частину та оформлено матеріали для публікації).
11. **Mikhailyuk T.**, Glaser K., Tsarenko P., Demchenko E., Karsten U. (2019). Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast, in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria. *Eur. J. Phycol.* 54(3), 263–290. doi:abs/10.1080/09670262.2018.1557257 (Ідея та концепція роботи належить здобувачеві, здобувачем проведено збір зразків, їх культивування, виділення штамів, визначення, морфологічне опрацювання, молекулярно-філогенетичні дослідження (частково), аналіз і узагальнення результатів, написання текстової частини та оформлено матеріали для публікації).
12. Samolov E., **Mikhailyuk T.**, Lukešová A., Glaser K., Büdel B., Karsten U. (2019). Usual alga from unusual habitats: biodiversity of *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) from the phylogenetic superclade G isolated

- from biological soil crusts. *Mol. Phyl. Evol.*, 133, 236–255. doi:org/10.1016/j.ympev.2018.12.018 (Здобувачем проведено культивування штамів (частково), визначення, морфологічне опрацювання, молекулярно-філогенетичні дослідження (частково), аналіз і узагальнення результатів, написано текстову частину).
13. Jung P., **Mikhailyuk T.**, Emrich D., Baumann K., Dultz S., Büdel B. (2020). Shifting Boundaries: ecological and geographical range extension based on three new species in the cyanobacterial genera *Aliterella*, *Cyanocohniella* and *Oculatella*. *J. Phycol.*, 56(5), 1216–1231. doi:10.1111/jpy.13025-19-170 (Здобувачем проведено аналітичну частину молекулярно-філогенетичних досліджень (частково), аналіз і узагальнення результатів (частково), взято участь у обговоренні результатів та редагуванні текстової частини).
14. **Mikhailyuk T.**, Holzinger A., Tsarenko P., Glaser K., Demchenko E., Karsten U. (2020): *Dictyosphaerium*-like morphotype in terrestrial algae: what is *Xerochlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)? *J. Phycol.*, 56(3), 671–686. doi:10.1111/jpy.12974-19-186 (Ідея та концепція роботи належить здобувачеві, здобувачем проведено виділення та культивування штамів, визначення, морфологічне опрацювання, молекулярно-філогенетичні дослідження (частково) та підготовку зразків для ТЕМ (частково), аналіз і узагальнення результатів, написано текстову частину та оформлено матеріали для публікації).
15. Rybalka N., **Mikhailyuk T.**, Darienko T., Dultz S., Blanke M., Friedl. T. (2020). Genotypic and phylogenetic diversity of new isolates of terrestrial Xanthophyceae (Stramenopiles) from maritime sandy habitats. *Phycologia*, 59(6), 506–514. doi:org/10.1080/00318884.2020.1802950 (Здобувачем проведено виділення та культивування частини штамів, визначення, морфологічне опрацювання, молекулярно-філогенетичні дослідження (частково), взято участь у аналізі і узагальненні результатів, їх обговоренні та редагуванні текстової частини).

**Статті у інших виданнях, індексованих у міжнародних наукометричних
базах даних**

1. **Mikhailyuk T.**, Demchenko E.M., Kondratyuk S.Ya. (2003). *Parietochloris ovoideus* sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a new aerophyte alga from Ukraine. *Algol. Stud.*, 110, 1–16. (Ідея та концепція роботи належить здобувачеві, здобувачем проведено культивування штаму, визначення, морфологічне опрацювання, аналіз і узагальнення результатів, написано текстову частину (частково) та оформлено матеріали для публікації).
2. **Mikhailyuk T.**, Vinogradova O.N., Glaser K., Karsten U. (2016). New Taxa for the Flora of Ukraine, in the Context of Modern Approaches to Taxonomy of Cyanoprokaryota / Cyanobacteria. *Intern. J. Algae*, 18(4), 301–320. (Ідея та концепція роботи належить здобувачеві, здобувачем проведено виділення та культивування штамів, визначення, морфологічне опрацювання, молекулярно-філогенетичні дослідження (частково), аналіз і узагальнення результатів, взято участь у редагуванні текстової частини).
3. **Mikhailyuk T.**, Vinogradova O.N., Glaser K., Demchenko E., Karsten U. (2018). Diversity of Terrestrial Algae of Cape Kazantip (the Sea of Azov, Ukraine) and Some Remarks on their Phylogeny and Ecology. *Intern. J. Algae*, 20(4), 313–338. (Ідея та концепція роботи належить здобувачеві, здобувачем проведено збір зразків, їх культивування, виділення штамів, визначення та морфологічне опрацювання, молекулярно-філогенетичні дослідження (частково), аналіз і узагальнення результатів, редагування текстової частини).
4. Vinogradova O.N., **Mikhailyuk T.I.** (2018). On the taxonomy and nomenclature of some terrestrial taxa of *Plectonema* s.l. (Cyanophyceae). 1. The case of *Plectonema edaphicum*. *Intern. J. Algae*, 20(3), 211–224. (Здобувачем проведено виділення та культивування штамів, визначення та морфологічне опрацювання, взято участь у аналізі і узагальненні результатів, у редагуванні текстової частини).
5. Vinogradova O.N., **Mikhailyuk T.**, Glaser K., Holzinger A., Karsten U. (2018). New species of *Oculatella* (Synechococcales, Cyanobacteria) from terrestrial habitats of Ukraine. *Укр. ботан. журн.*, 75(2), 149–159. doi:10.15407/ukrbotj74.06.509 (Здобувачем виділено штами, проведено їх

- культивування, визначення, морфологічне опрацювання, молекулярно-філогенетичні дослідження (частково), взято участь у аналізі і узагальненні результатів, їх обговоренні, редагуванні текстової частини).
6. **Mikhailyuk T.**, Vinogradova O.N., Holzinger A., Glaser K., Samolov E., Karsten U. (2019). New record of the rare genus *Crinalium* Crow (Oscillatoriales, Cyanobacteria) from sand dunes of the Baltic Sea, Germany: epytification and emendation of *Crinalium magnum* Fritsch et John based on an integrative approach. *Phytotaxa*, 400(3), 165–179. doi:org/10.11646/phytotaxa.400.3.4 (Ідея та концепція роботи належить здобувачеві, здобувачем проведено виділення та культивування штаму, визначення, морфологічне опрацювання, молекулярно-філогенетичні дослідження (частково) та підготовку зразків для ТЕМ (частково), аналіз і узагальнення результатів, взято участь у редагуванні текстової частини, оформлено матеріали для публікації).
7. Samolov E., Baumann K., Büdel B., Jung P., Leinweber P., **Mikhailyuk T.**, Karsten U., Glaser K. (2020). Biodiversity of algae and cyanobacteria in biological soil crusts collected along a climatic gradient in Chile using an integrative approach. *Microorganisms*, 8(7), 1047. doi:10.3390/microorganisms8071047 (Здобувачем проведено визначення та морфологічне опрацювання матеріалу (частково), молекулярно-філогенетичні дослідження (частково), взято участь у аналізі і узагальненні результатів, їх обговоренні, редагуванні текстової частини).
8. Sommer V., **Mikhailyuk T.**, Glaser K., Karsten U. (2020). Uncovering Unique Green Algae and Cyanobacteria Isolated From Biocrusts in Highly Saline Potash Tailing Pile Habitats, Using an Integrative Approach. *Microorganisms*, 8(11), 1667. doi: 10.3390/microorganisms8111667 (Здобувачем проведено визначення штамів та морфологічне опрацювання (частково), молекулярно-філогенетичні дослідження (частково), взято участь у аналізі і узагальненні результатів, їх обговоренні, редагуванні текстової частини).

Розділ у монографії

1. **Михайлюк Т.І.**, Лукешова А., Массальський А., Фрідл Т. (2013). Молекулярна філогенія, таксономія і біологія наземних водоростей порядку Klebsormidiales (Klebsormidiophyceae, Streptophyta)). В кн.: Молекулярна філогенія і сучасна таксономія наземних спорових рослин / Відп. ред. Кондратюк С.Я. К: Наук. думка, 2013, 95–145. *(Ідея та концепція роботи належить здобувачеві, здобувачем проведено культивування штамів, визначення, морфологічне опрацювання, молекулярно-філогенетичні дослідження (частково), аналіз і узагальнення результатів, написано текстову частину, оформлено матеріали для публікації).*

Наукові праці, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. **Mikhailyuk T.**, Demchenko E.M., Kondratyuk S.Ya. Algae of granitic outcrops from the left bank of Pivdennyi Bug River (Ukraine). *Biology and Taxonomy of Green Algae IV: Intern. Symposium*, Smolenice-Castl, Slovakia, June 24-28, 2002, 63. *Публікація тез, постерна доповідь.*
2. **Mikhailyuk T.**, Kondratyuk S.Ya. Epiphytic algae of some lichen species. *XVII Intern. Botanical Congress*, Vienna, Austria, 17-23 July 2005, 445. *Публікація тез, постерна доповідь.*
3. **Mikhailyuk T.**, Demchenko E.M., Massalski A.-K. *Massjukia* gen. nov. (Chlorophyta, Charophyceae), a new aerophytic algae from granite outcrops (Ukraine). *Algae in terrestrial ecosystems: Intern. Confer.*, Kaniv, 27-30 September 2005, 52. *Публікація тез, постерна доповідь.*
4. **Mikhailyuk T.**, Sluiman H., Massalski A., Mudimu O., Demchenko E., Kondratyuk S., Friedl T. New streptophyte green algae from terrestrial habitats and an assessment of the genus *Interfilum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Biology and Taxonomy of green algae V: Intern. Symposium*, Smolenice-castle, Slovakia, June 25-29, 2007, 46. *Публікація тез, постерна доповідь.*
5. Sluiman H., **Mikhailyuk T.**, Friedl T., Beck A. Phylogenetic analysis of the 516 and 1506 group I introns of the Klebsormidiales (Klebsormidiaceae, Streptophyta). *Biology and Taxonomy of green algae V: Intern. Symposium*, Smolenice-castle, Slovakia, June 25-29, 2007, 67–68. *Публікація тез, постерна доповідь.*

6. **Mikhailyuk T.**, Sluiman H.J., Rindi F., Massalski A.K., Mudimu O., Friedl T. *Interfilum* and *Klebsormidium* are closely related streptophycean algae. *Algal Culture Collections 2008*, 9-10 June 2008, Oban, UK, 22. *Публікація тез, усна доповідь.*
7. Rindi F., **Mikhailyuk T.**, Sluiman H.J., Friedl T., Lopes-Bautista J.M. Shedding light into green chaos: a reassessment of the classification of the Klebsormidiales (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) based on molecular evidence. *9-th Intern. Phycol. Congress, Informal Workshop "Freshwater green algal systematics"*, Tokyo, Japan, 2-8 August 2009, 5. *Публікація тез, постерна доповідь.*
8. **Mikhailyuk T.**, Pröschold, T., Holzinger, A., Karsten, U. Biodiversity of *Klebsormidium* from highland soil crusts (Alps, Tyrol, Austria). *Advances in modern phycology: V Intern. Confer.*, 23-25 May 2012, Kyiv, Ukraine, 374–375. *Публікація тез, усна доповідь.*
9. **Mikhailyuk T.** Biological soil crusts from sand dunes of maritime ecosystems. *Network Meeting of the Alexander von Humboldt Foundation. Conference Volume.* 20-22 March 2013, Hannover, 183–184. *Публікація тез, постерна та усна доповіді.*
10. **Mikhailyuk T.**, Pröschold T., Holzinger A., Karsten U. Biodiversity of *Klebsormidium* from highland soil crusts (Alps, Tyrol, Austria) *BioSyst. EU 2013. Global Systematics!*, 18-22 February 2013, Vienna, Austria, 141. *Публікація тез, постерна доповідь.*
11. **Mikhailyuk T.**, Schulz K., Karsten U. Algal and cyanobacterial component of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic sea coast (Germany). *15-th Scien. Confer. of the section Phycology of the German Botanical Society*, 23-26 February 2014, Stralsund, Germany, 54. *Публікація тез, усна доповідь.*
12. Glaser K., Borchhardt N., Schulz K., Baumann K., Leinweber P., **Mikhailyuk T.**, Karsten U. Linking biological soil crust diversity to ecological functions. *European Geosciences Union. General Assembly 2016.* Vienna, Austria, 17-22 April 2016. *Geophysical Research Abstracts*, 2016, 18. Abstract number 5790. *Публікація тез, постерна доповідь.*

13. Виноградова О.М., Михайлюк Т.І., Громакова А.Б. До вивчення ціанобактеріальних кірочок крейдяних відслонень Харківської області. *XIV з'їзд Українського Ботанічного Товариства*, 25-26 квітня 2017 р. *Публікація тез, постерна доповідь*.
14. Samolov E., Glaser K., Baumann K., Leinweber P., Jung P., Büdel B., **Mikhailyuk T.**, Karsten U. Biological soil crusts in Chile along a precipitation gradient. *European Geosciences Union. General Assembly 2017*, 23–28 April 2017, Vienna, Austria, Geophysical Research Abstracts, 2017, 19, Abstract number 1368. *Публікація тез, постерна доповідь*.
15. **Mikhailyuk T.**, Lukešová A., Glaser K., Holzinger A., Obwegeser S., Nyporko S., Friedl T., Karsten U. New lineages of streptophyte algae (Streptophyta) from terrestrial habitats revealed by an integrative approach. *17-th Scien. Confer. of the Phycology Section of the German Botanical Society*, March 11–14, 2018, Berchtesgaden, Germany, 63. *Публікація тез, усна доповідь*.
16. **Mikhailyuk T.** New and rare taxa of algae and cyanobacteria from biological soil crusts revealed using an integrative approach. *9-th Bonn Humboldt Award Winners' Forum "Frontiers in Biogeography, Ecology, Anthropology, and Evolution. Humboldt and the 'Cosmos' revisited in the 21st Century"*. 16–20 October 2019, Bonn, Germany, 305–306. *Публікація тез, постерна доповідь*.
17. **Mikhailyuk T.**, Tsarenko P., Glaser K., Holzinger A., Demchenko E., Karsten U. *Dictyosphaerium*-like morphotype in terrestrial algae: what is *Xerochlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)? *Advances in modern phycology: VI Intern. Confer.*, 15-17 May 2019, Kyiv, Ukraine, 69–70. *Публікація тез, усна доповідь*.
18. Vynogradova O.M., **Mikhailyuk T.**, Gromakova A.B. New and interesting records of cyanobacteria in biological soil crusts from chalk outcrops of Kharkiv region (Ukraine). *Advances in modern phycology: VI Intern. Confer.*, 15-17 May 2019, Kyiv, Ukraine, 122–123. *Публікація тез, постерна доповідь*.