



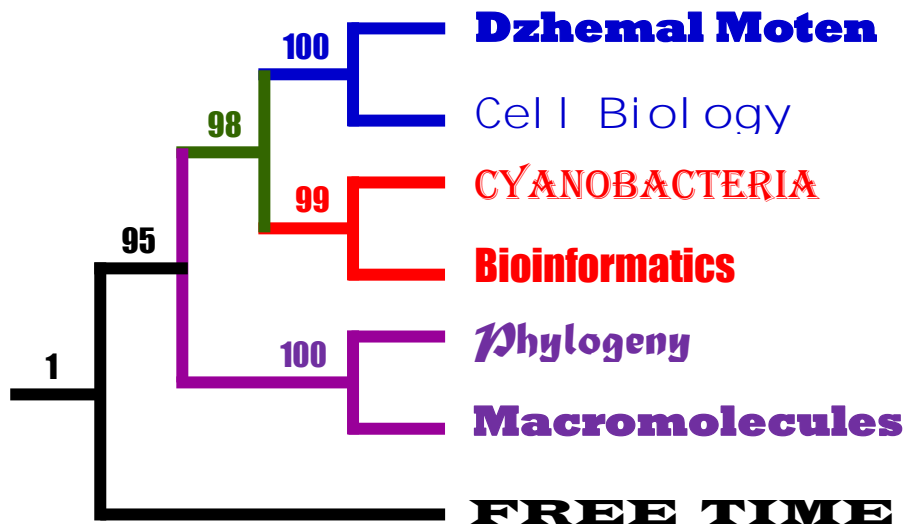
*Джемал Ахмед Мотен*

ИЗПОЛЗВАНЕ НА СПЕЦИФИЧНИ КЛЕТЪЧНИ  
МАКРОМОЛЕКУЛИ ЗА ФИЛОГЕНЕТИЧНО МОДЕЛИРАНЕ  
ПРИ ЦИАНОБАКТЕРИИ

## АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд  
за получаване на образователната и научна степен «доктор»

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика,  
Професионално направление: 4.3 Биологически науки  
научна специалност: Клетъчна биология



Научен ръководител:  
проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов

Пловдив, 2017 г.



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ «ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ»  
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ  
Катедра «Биология на развитието»



*Джемал Ахмед Мотен*

**ИЗПОЛЗВАНЕ НА СПЕЦИФИЧНИ КЛЕТЪЧНИ  
МАКРОМОЛЕКУЛИ ЗА ФИЛОГЕНЕТИЧНО МОДЕЛИРАНЕ  
ПРИ ЦИАНОБАКТЕРИИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд

за получаване на образователната и научна степен «**доктор**»

Област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика,**

Професионално направление: **4.3 Биологически науки**

Научна специалност: **Клетъчна биология**

**Научен ръководител:**

*проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов*

**Пловдив, 2017 г.**

Дисертационният труд съдържа 100 страници, 4 таблици, 31 фигури и 125 литературни източника.

Изследванията са извършени в катедра „Биология на развитието” и катедра „ Ботаника и МОБ“ към Биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски”.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на разширен катедрен съвет на катедра „Биология на развитието“, Биологически факултет, ПУ „П. Хилендарски“ (Протокол № 335 от 16.03.2017 г.).

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 23.05.2017 г. от 12:00 часа в 15 аудитория на Биологически факултет (гр. Пловдив ул. Тодор Самодумов № 2).

Материалите по защитата са предоставени за свободен достъп на интересувашите се в библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски“.

**Научно жури:**

проф. д-р Василий Щерев Ишев, дм  
проф. д-р Румен Димитров Младенов  
проф. д-р Иван Генов Пищийски  
доц. д-р Анелия Веселинова Биволарска, дм  
проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов

**Автор:** Джемал Ахмед Мотен

**Заглавие:** Използване на специфични клетъчни макромолекули за филогенетично моделиране при цианобактерии

*Университетско издателство „Паисий Хилендарски“, 2017 г.*

## 1. Въведение

Представителите на отдел *Cyanobacteria* (*Cyanoprokaryota*) са уникални организми. Те са единствените прокариоти, които имат способността да фотосинтезират. Тази тяхна способност, високата адаптивност и космополитното им разпространение ги прави едни от основните първични продуценти на биомаса на планетата. Освен това, уникална е и способността на някои от тях (притежаващите хетероцисти) да фиксират свободен азот. Затова те са предпочитани симбионти за животни, гъби и висши растения. Еволюцията им, започнала преди около 2.5 билиона години, дава основание на учените да им отредят водеща роля в теорията за ендосимбиозата и да ги свържат с появата на хлоропластите при висшите растения.

Техният дълъг и сложен еволюционен път (съпътствуван от хоризонтален генен трансфер) определя голямото им биологично разнообразие и ги прави трудна за класифициране група. Живеейки при различни условия на околната среда, принудени да преодоляват стресови фактори от биотичен и абиотичен характер, цианобактериите продуцират различни вторични метаболити, които от своя страна имат потенциално приложение в редица области на човешката дейност като хранене, медицина и агрокултури, но едновременно с това някои от тях са и опасни токсини. Цианобактериите имат както положително, така и негативно влияние върху околната среда и човека.

От научна гледна точка, най-проблемните въпроси, свързани с тази група организми засягат еволюционните стратегии, оцеляването и диверсификацията на цианопрокариотите през дългия период от тяхното съществуване, както и оценката на настоящото им разнообразие в природата. Таксономичната класификация е основния метод за оценка на биологичното разнообразие на организмите в контекста на непрекъснато променящите се знания за еволюционните, генетичните и екологични взаимоотношения и фенотипни вариации. Нейните критерии се променят с времето, за да отговорят на нуждите на съвремието. Таксономията в днешно време не е просто система, намираща място на определени морфологично сходни таксони в йерархическата система. Тя има задачата да отразява техните филогенетични и еволюционни взаимовръзки и да разкрива тяхната еволюционна история. Това важи с пълна сила и за цианобактериите. Класификацията на тази група водорасли се основава на две основни номенклатури – Международния кодекс на номенклатурата за водорасли, гъби и растения (МКНВГР) и Международния кодекс на номенклатурата на прокариотите (МКНП). Класифицирането на *Cyanobacteria* съгласно МКНВГР се базира на факта, че тези организми притежават способност да извършват процеса фотосинтеза както при растителните организми. Тяхната прокариотна организация и сходството с бактериалния строеж дава основание на микробиолозите да използват Международния кодекс за номенклатура на прокариотите (МКНП). Причисляването на *Cyanobacteria* към двете класификационни номенклатури се основава на различни принципи и експериментални подходи, което налага намирането на консенсус между ботаници и микробиолози по отношение способа на класифицирането на тези организми. Приетата модерна таксономия на отдел *Cyanobacteria* е основана на полифазния подход. Той комбинира водещата роля на молекулярно-генетичните маркери (рРНК гени, протеин-кодиращи консервативни гени, филогенетични критерии) със стабилни цитоморфологични, ултраструктурни, биохимични и екофизиологични маркери. Понастоящем, методите на полифазната таксономия са считат от повечето учени за най-адекватните и подходящи при таксономичната класификация на отдел *Cyanobacteria*. Класификационната схема, изградена на принципите на полифазната таксономия е компромисен вариант, който изглажда различията между микробиолози и

ботаници. Правилната таксономична позиция и идентификация на цианопрокариотните видове е много важна и за всички бъдещи изследвания, свързани с биологичната активност на цианобактериите, тяхното биотехнологично приложение или при управлението и мониторинга на водите.

С появата на филогенетичните анализи, базирани на молекулярно-генетични данни, цялата класификация на отдел *Cyanobacteria* е в процес на реорганизация и ревизия. От 2000-та година насам са описани повече от 66 нови рода, 16 от които в последните години, както и редица нови видове (Komárek et al., 2014). Оказва се, че това е времето на доста радикално и бързо развитие на систематиката и таксономията на този отдел.

Филогенетичните реконструкции в изследванията с таксономична цел се базират основно на секвенциите на гена за 16S рРНК. Този ген е част от групата на SSU рРНК гените и е в основата на научните изследвания за филогенетичните взаимовръзки при *Cyanobacteria* вече десетилетия наред. Той се оказва ефективен молекулярно-генетичен маркер за изясняване на филогенетични връзки между различните родове в рамките на разредите, но не е много информативен, когато се прилага на по-ниско таксономично ниво, например вид. В последните години, информацията, получена от 16S рРНК се допълва от други гени, смятани за подходящи при родово и видово детерминиране, а именно *rpoC1*, *rpoB*, *gyrB*, *rbcLX*, *cpcBA-IGS* и *16S-23S-ITS*.

Разнообразието от молекулярно-генетични маркери за характеристика на цианобактериите наистина е голямо, но това далеч не означава, че търсенето на подходящи филогенетични маркери трябва да спре. Напротив, по-големият брой генетични маркери би означавал по-точна и прецизна класификация. Въпреки, че в последните години усилено се работи по актуализирането и ревизирането на много полифилетични родове от отдела, които са богати на видове с неясна таксономия (но широко разпространени и важни), все още липсват достатъчно молекулярно-генетични данни. Примери за такива „проблемни“ таксони са родовете *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Chamaesiphon*, *Chroococcus*, *Coelosphaerium*, *Entophysalis*, *Fischerella*, *Gloeocapsa*, *Gloeothece*, *Gomphosphaeria*, *Hydrococcus*, *Merismopedia* (кокоидни), *Hydrocoleum*, *Leibleinia*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Plectonema*, *Schizothrix*, *Spirulina*, *Symploca*, *Tapinothrix* (нишковидни), *Aphanizomenon*, *Calothrix*, *Dichothrix*, *Rivularia*, *Stigonema*, *Tolypothrix* (нишковидни с хетероцисти).

Затова, настоящата дисертация, чиято основна цел е проучването на нови молекулярно-генетични маркери, подходящи както за родово, така и за подродово детерминиране на представители на отдел *Cyanobacteria*, представлява принос към полифазната таксономия и филогения на отдела.

## 2. Литературен обзор

Литературният обзор включва следните основни раздели:

- 2.1. Кратка характеристика на отдел *Cyanobacteria*
- 2.2. Систематика на *Cyanobacteria* – развитие, съвременни аспекти и проблеми
- 2.3. Молекулярни методи в цианобактериалната таксономия. Филогения
- 2.4. Геномна ера – секвениране на цели цианопрокариотни геноми
- 2.5. Размер, организация и пloidия на цианобактериалните геноми

## 3. Цел и задачи

Основна цел на настоящия дисертационен труд е селектиране и валидиране на специфични клетъчни макромолекули, подходящи за филогенетични анализи и таксономична класификация на близкородствени представители на отдел *Cyanobacteria*.

За постигането на поставената цел бяха формулирани следните **задачи**:

(1) Проучване на съществуващите бази данни за геномни и протеинни секвенции на цианопрокариоти;

(2) Анализ на наличните пълни геномни секвенции на цианопрокариоти в различните бази данни;

(3) Подбор на специфични клетъчни макромолекули, подходящи за филогенетично моделиране и определяне таксономичния статус на близки цианобактерии;

(4) Валидиране на селектираните маркери за филогенетично моделиране на близкородствените взаимоотношения между отделни групи цианобактерии чрез използване на различни методи за филогенетични анализи;

(5) Сравнение на новоустановените специфични клетъчни маркери с традиционно използваните 16S рРНК генни секвенции за филогенетичен анализ и таксономия на цианобактерии;

(6) Практическо валидиране на новопредложените маркери чрез използване на цианобактериални щамове от РАСС, поддържана от катедра „Ботаника и МОБ“ към Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“.

## 4. Материали и методи

### 4.1. Цианопрокариотни щамове и култивиране

За провеждане на експерименталната част са използвани три алгологично чисти култури от род *Phormidium*, две от род *Leptolyngbya*, две от род *Phormidesmis*, две от род *Nostoc* и по една от родовете *Synechocystis*, *Pseudanabaena*, *Tolypothrix* и *Anabaena*, съхранявани в алгологичната колекция (РАСС) на катедра „Ботаника и Методика на обучението по биология“ при Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

Таксономичният статус на изследваните видове е определен въз основа на морфологични описания, направени от Komárek & Anagnostidis (2005).

### 4.2. Изолиране на ДНК

Геномната ДНК е екстрахирана от 40 mg прясна цианопрокариотна маса чрез използване на екстракционния ксантогенат-SDS (XS) протокол на Tillet & Neilan (2000) или протеиназа-К. Концентрацията и чистотата на ДНК са измерени с помощта на спектрофотометър NanoDrop 2000 UV-VIS (Thermo Scientific). Екстрахираната ДНК е визуализирана върху агарозен гел с помощта на етидиев бромид и UV трансилюминация (MiniBis Pro гел документираща система, DNR Bio-Imaging Systems Ltd.).

### 4.3. Амплификация и секвениране на 16S рДНК и *srcB-IGS-srcA* локуса на фикоцианиновия оперон (PC-IGS)

За амплифициране на 16S рДНК са използвани праймерите рА (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и В23S (5'-CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT -3'). За амплифициране на IGS-региона и прилежащите флангови кодиращи региони са използвани праймерите РСβF (5'-GGCTGCTTGTTTACGCGACA-3') и РСαR (5'-CCAGTACCACCAGCAACTAA-3') (Neilan et al., 1995). За провеждане на PCR-реакцията е използван кит PuReTaq™ ReadyToGo Beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), включващ 1.5 U *Taq* ДНК полимераза, 10 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTP. Към микса за всяка реакция са добавени 5 pmol

от двата праймера, 100 ng геномна ДНК и DEPC-вода до краен обем 25 µl (за IGS ) или 50 µl (за 16S рДНК). Амплификацията е проведена в TC-412 thermocycler (Techne, Cambridge Ltd., UK) при следните програми:

(1) За 16S рДНК -предварително денатуриране на ДНК за 5 min при 95°C, последвано от 35 цикъла 30 s при 95°C, 30 s при 55°C (хибридизация) и 1.5 min при 72°C (елонгация). Реакцията завършва с елонгираща стъпка от 5 min при 72°C.

(2) За *srcBA-IGS* региона - предварително денатуриране на ДНК за 5 min при 94°C, последвано от 40 цикъла 10 s при 94°C, 30 s при 58°C (хибридизация) и 1 min при 72°C (елонгация). Реакцията завършва с елонгираща стъпка от 5 min при 72°C.

Получените PCR-продукти са анализирани чрез електрофореза в 1.5% агарозен гел в 1x Трис-Ацетат-ЕДТА буфер (ТАЕ). Като позиционен маркер е използван GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas Life Sciences). Геловите са визуализирани с етидиев бромид и UV светлина. След визуализацията, коректните PCR-продукти са изрязани от гела, а изолираната ДНК е пречистена с помощта на DNA Extraction Kit (Fermentas Life Sciences). Пречистените продукти - 16S рДНК и *srcBA-IGS* са изпратени за секвениране (MWG Eurofins Operon, Ebersberg, Германия). При секвенирането са използвани същите праймери, като тези при амплификацията. Секвенциите са депозирани в базата данни на [National Center for Biotechnology Information](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) (NCBI) под номера KF770966 *Nodosilinea bijugata* PACC 8602 (= *Phormidium bijugatum*, = *Leptolyngbya bijugata*), KF770967 *Phormidium molle* PACC 8140 (= *Phormidesmis molle*), KF770968 *Phormidium papyraceum* PACC 8600, KF770969 *Phormidium autumnale* PACC 5522 и KF770970 *Phormidium uncinatum* PACC 8693.

#### **4.4. Амплификация и секвениране на външен мембранен ефлукс протеин (Outer Membrane Efflux Protein, OMEP) и светлинно-инхибиран протеин (Light-Repressed Protein, LRP)**

За амплифициране на OMEP-региона са използвани праймерите OMEP-R (5'-TCTCCGGCTGAATCTCAGGA-3') и OMEP-F (5'-AGGAAGATTGCTCA CAGCCC-3'), а за LRP съответно LRP-R (5'-TTACGTTAACGGGACGGGGTT-3') и LRP-F (5'-CGCTGTCACCGAAGСТАТТСАТ-3'). Дизайнът на праймерите е направен с помощта на опцията Primer-BLAST на NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). За провеждане на PCR-реакцията е използван кит PuReTaq™ ReadyToGo Beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), включващ 1.5 U Taq ДНК полимераза, 10 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP. Към микса за всяка реакция са добавени 10 pmol от двата праймера, 100 ng геномна ДНК и DEPC-вода до краен обем 25 µl. Амплификацията е проведена в TC-412 thermocycler (Techne, Cambridge Ltd., UK) при следната програма: - предварително денатуриране на ДНК за 5 min при 94°C, последвано от 30 цикъла 60 s при 95°C, 60 s при 53°C (хибридизация) и 1 min при 72°C (елонгация). Реакцията завършва с елонгираща стъпка от 2 min при 72°C; Получените PCR-продукти са анализирани чрез електрофореза в 1.5 % агарозен гел в 1x Трис-Ацетат-ЕДТА буфер (ТАЕ). Като позиционен маркер е използван GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas Life Sciences). Геловите са визуализирани с етидиев бромид и UV светлина. След визуализацията коректните PCR-продукти са изрязани от гела, а изолираната ДНК е пречистена с помощта на DNA Extraction Kit (Fermentas Life Sciences). Пречистените продукти са изпратени за секвениране (MWG Eurofins Operon, Ebersberg, Германия). При секвенирането са използвани същите праймери, като тези при амплификацията.

#### **4.5. Филогенетичен анализ за 16S рРНК гена и *srcB-IGS-srcA* локуса на фикоцианиновия оперон (PC-IGS)**

Нуклеотидните секвенции на 16S рРНК гена и *srcB-IGS-srcA* локуса на фикоцианиновия оперон (PC-IGS), получени при ДНК секвенирането са сравнени с други цианопрокаротионни секвенции, налични в базата данни на NCBI чрез BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). За целите на филогенетичния анализ са подбрани секвенции на идентифицирани и определени до вид представители на родовете *Leptolyngbya*, *Nodosilinea*, *Phormidium* и *Lyngbya*. По този начин не са включени в анализа секвенции на онези членове, определени само до родово ниво.

Многократното сравнение на нуклеотидните секвенции на изследваните видове е проведено с помощта на CLUSTAL W, който е част от софтуерния пакет MEGA. Филогенетичните дървета са реконструирани с помощта на софтуерния пакет MEGA, използвайки алгоритмите minimum evolution (ME), maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) и neighbor-joining (NJ). При всички анализи са използвани 1000 bootstrap повторения. Нуклеотидните позиции, съдържащи липсващи бази бяха елиминирани от пакета данни.

*Gloeobacter violaceus* (FR798924) бе използван като външен таксон при конструирането на филогенетичните дървета на базата на 16S рРНК генни секвенции. В PC-IGS дървото като външен таксон бе използван *Cyanobacterium sp.* (AJ401183).

#### **4.6. Филогенетичен анализ на база OMEP, LRP, цианопорин, 5S рРНК и 16S рРНК**

След внимателно оценяване на наличните цианобактериални геноми в NCBI базата данни (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) бяха подбрани няколко протеини, които могат да послужат, като молекулярни маркери за проучване на цианобактериалната филогения.

Филогенетичните анализи бяха извършени чрез използване на аминокиселинните секвенции за OMEP от 82 цианобактериални вида/щама с напълно секвенирани геноми. Размерът на анализирания OMEP цианобактериални секвенции варира между 350 и 792 аминокиселини. Множественото сравняване на аминокиселинните секвенции беше направено чрез ClustalW програмата от филогенетичния софтуер MEGA 7 ([Kumar et al., 2016](#)). Minimum evolution (ME), maximum parsimony (MP), maximum-likelihood (ML), и neighbor-joining (NJ) филогенетичните дървета бяха конструирани използвайки MEGA 7 ([Kumar et al., 2016](#)). Всички алгоритми бяха изпълнени с 1000 bootstrap повторения. Всички позиции, съдържащи липсващи бази и липсващи данни бяха премахнати от набора данни чрез опцията “complete deletion”. Еволюционните дистанции са изчислени използвайки метода Maximum Composite Likelihood. ME дърветата са генерирани чрез алгоритъма Close-Neighbor-Interchange (CNI). MP дърветата са конструирани използвайки метода Tree-Bisectional-Reconnection (TBR) с търсене на ниво 1 и случайно добавено дърво. За ML дърветата беше използван модела General Time Reversible (GTR) със Corrected Invariable Sites (I), Gamma Distribution Shape Parameters (G), и Nearest-Neighbor-Interchange алгоритъм.

В допълнение бяха направени филогенетични анализи на базата на 16S рРНК секвенции от същите 82 цианобактериални вида/щама. Анализите са извършени по същият начин описан по-горе.

Номерата за достъп на всички използвани цианобактериални OMEP и 16S рРНК нуклеотидни секвенции са представени във филогенетичните дървета. *Pseudomonas aeruginosa* беше използван, като външен таксон за рутиране на дърветата.



При филогенетичните анализи на база LRP бяха използвани 35 цианобактериални вида/щамата с напълно секвенирани геноми. Размерът на анализиранияте LRP цианобактериални секвенции варира между 190 и 220 аминокиселини. С цел сравняване на топологията на таксоните, филогенетична реконструкция бе направена и с 16S рРНК нуклеотидните секвенции на същите щамове използване при LRP-филогенетичното дърво. Извършените анализи са проведени както за ОМЕР. Като външна група за рутиране на дърветата бяха използвани LRP и 16S рРНК секвенции от *Streptomyces leeuwenhoekii*.

По подобен начин бяха проведени и филогенетичните анализи на база на аминокиселинните секвенции за цианопорин.

След оценка на наличните пълни цианобактериални геноми в геномната база данни на NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), за филогенетичните реконструкции на база 5S рРНК и 16S рРНК бяха избрани 96 нуклеотидни последователности. Номерата за достъп на използваните от базата данни секвенции са посочени във филогенетичните дървета преди името на цианобактериалния щам. Филогенетичните анализи са проведени по описания вече начин с единствената разлика, че като външна група за рутиране на дърветата се използват 5S рРНК и 16S рРНК секвенции от *Escherichia coli*.

Вторичните структури на 5S рРНК са генерирани с помощта 5S рРНК база данни (<http://www.combio.pl/rna/>) и анализирани ръчно или чрез LocARNA ([http://rna.informatik.uni-freiburg.de /](http://rna.informatik.uni-freiburg.de/)).

## 5. Резултати

### 5.1. Приложение на гена за 16S рРНК и локусът *srcB-IGS-srcA* като молекулярно-генетични маркери за разрешаване таксономичния статус на спорни видове

Едни от най-проблематичните в таксономично отношение нишковидни цианопрокариоти са тези от родовете *Lyngbya*, *Phormidium*, *Plectonema* и *Leptolyngbya*. Те се характеризират с голяма хетерогенност и полифилетичност.

През 1988 година Anagnostidis и Komárek променят таксономията на нишковидните цианобактерии предлагайки отделянето на нов род с име *Leptolyngbya*. Към този род те отнасят представители от *Phormidium* (включително *Phormidium bijugatum*), *Lyngbya* и *Plectonema*.

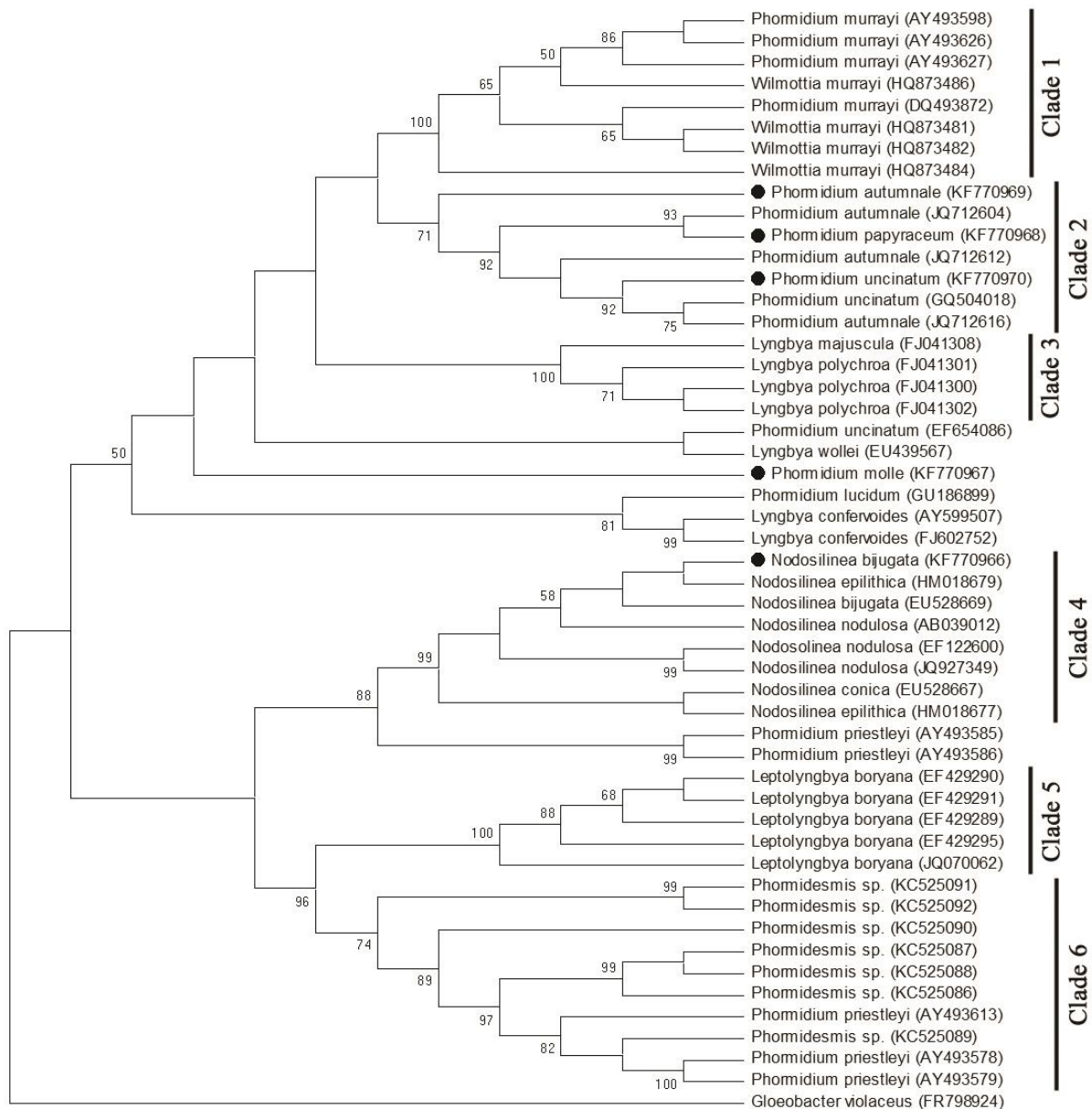
Последните проучвания и за двата рода показват, че генетичното разнообразие в рамките на таксона е по-голямо от морфологичното разнообразие (Casamata et al., 2003; Casamatta et al., 2005; Johansen et al., 2008; Komárek and Anagnostidis, 2005). Въпреки полифилетичността на род *Leptolyngbya*, демонстрирана в редица публикации (Casamata et al., 2005; Castenholz, 2001; Komárek and Anagnostidis, 2005; Taton et al., 2003; Turner, 1997; Wilmotte and Herdman, 2001) по това време от рода не са отделени и описани нови родове. Род *Nodosilinea* е единствения нов род, включващ представители на *Pseudoanabaenaceae* в това число и на род *Leptolyngbya* (Perkerson et al., 2011). В род *Nodosilinea*, под името *Nodosilinea bijugata*, е отнесен и вида *Phormidium bijugatum*, определен през 1988 г от Anagnostidis и Komárek като *Leptolyngbya bijugata*.

За потвърждаване таксономичната позиция на представители на тези спорни родове, налични в колекцията РАСС, като частен случай са анализирани видовете *Nodosilinea bijugata* (= *Phormidium bijugatum* = *Leptolyngbya bijugata*), *Phormidesmis molle* (= *Phormidium molle*) и *Phormidium papyraceum* (сходен с *Wilmottia murrayi*). За потвърждаване на филогенетичната позиция на тези таксони на ниво род като маркер бе използван генът за 16S рРНК. За проверка на надеждността на фикоцианиновия

оперон като молекулярен маркер за разграничаване на близкородствени таксони (подродово ниво) бяха използвани генните секвенции за *srcB-IGS-srcA*. С помощта на четири различни метода (*minimum evolution* /ME/, *maximum parsimony* /MP/, *maximum likelihood* /ML/ и *neighbor-joining* /NJ/) бяха генерирани филогенетични дървета.

Получените в настоящото изследване 5 секвенции за 16S рРНК на представители от нашата колекция (с номера в GenBank KF770966–KF770970) бяха сравнени с 16S рРНК секвенции на добре дефинирани представители на родовете *Phormidium*, *Lyngbya*, *Leptolyngbya*, *Nodosilinea*, *Phormidesmis* и *Wilmottia* налични в GenBank.

Филогенетичното дърво, получено от ML анализа е представено на Фигура 1.



**Фигура 1.** Филогенетично дърво, реконструирано на базата на 16S рРНК гени секвенции на представителни видове от родовете *Phormidium*, *Wilmottia*, *Phormidesmis*, *Leptolyngbya*, *Nodosilinea* и *Lyngbya* чрез използване на **maximum likelihood (ML)** анализ и прилагане на GTR+I+G еволюционен модел. Числата показват bootstrap поддръжката (>50%) от 1000 повторения. Секвенциите, получени в настоящото изследване, са обозначени със запълнени кръгове. За рутиране на дървото е използвана секвенцията на *Gloeobacter violaceus*. GenBank номерата за достъп са дадени в скоби.

Ясно личат шест добре обособени във филогенетичната реконструкция клади (групи), наименовани като Клада 1, Клада 2, Клада 3, Клада 4, Клада 5 и Клада 6.

Първата клата (Clade 1), включва шамове *Phormidium* (100% bootstrap стойност), които наскоро бяха отделени в нов род *Wilmottia*, с един единствен вид *Wilmottia murrayi* (Strunecky et al., 2011). Втората клата (Clade 2) включва типични представители на *Phormidium* и е подкрепена с bootstrap стойност от 71%. Разглежданият от нас *Phormidium papuraceum* се позиционира също в тази група (не в Клада 1), въпреки че някои автори съобщават, че този вид е морфологично близък до *Wilmottia murrayi* и може да бъде отнесен към род *Wilmottia* (Strunecky et al., 2011). Третата клата (Clade 3) обединява типични представители на род *Lyngbya* и тази филогенетична позиция се поддържа от 100% bootstrap стойност. Включените в нашия анализ други видове *Lyngbya* се позиционираха извън тази клата, което потвърждава полифилетичността на този род.

Клада 4 (Clade 4) се състои от група цианобактериални шамове, които наскоро бяха отделени в нов род *Nodosilinea* (Perkerson et al., 2011). Тази клата е подкрепена от bootstrap стойност от 99% (Фигура 1). Нашият щам *Nodosilinea bijugata* (= *Leptolyngbya bijugata*, = *Phormidium bijugatum*) също се позиционира в Клада 4.

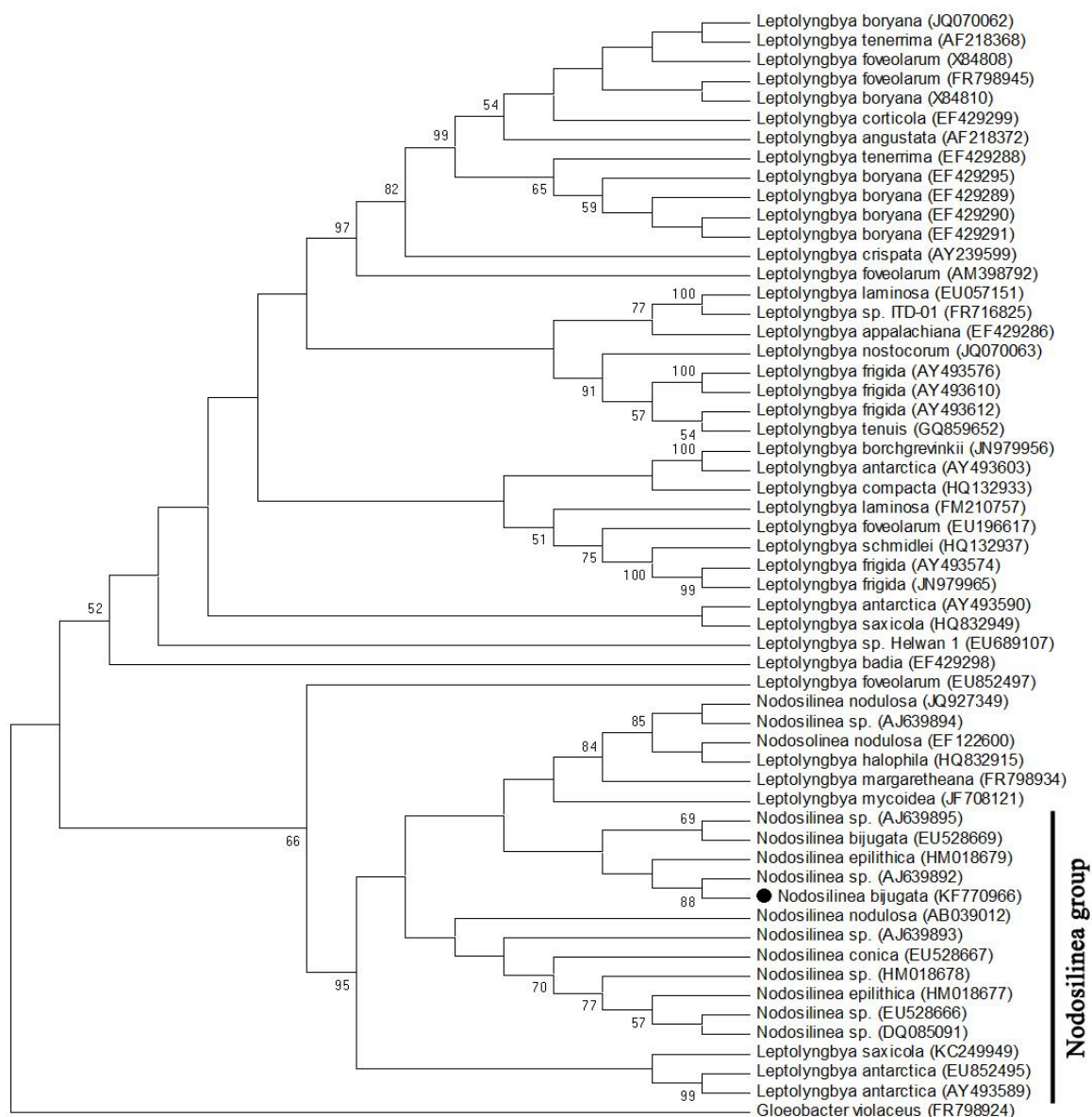
Петата клата (Clade 5), поддържана от 100% bootstrap стойност, включва шамове, идентифицирани като *Leptolyngbya boryana*. Тази клата показва близка връзка с Клада 6 (Clade 6) – 96% bootstrap стойност.

В Клада 6 се включват атлантически видове от *Phormidium priestleyi* и цианобактериални шамове от пустинята Атакама в Чили, идентифицирани като *Phormidesmis sp.* Нашият щам *Phormidesmis molle* (= *Phormidium molle*) е в отделен клон (Фигура 2) и няма специфична филогенетична връзка с шамове от тази клата, оформяща групата *Phormidesmis*. Установява се близка връзка (88% bootstrap стойност) между два атлантически щам на *Phormidium priestleyi* и групата *Nodosilinea* (Clade 4). Анализите показват, че някои шамове идентифицирани, като *Phormidium priestleyi* нямат филогенетична връзка с род *Phormidesmis* (Clade 6).

Филогенетичните реконструкции, генерирани с останалите методи (minimum evolution /ME/, maximum parsimony /MP/ и neighbor joining /NJ/) имат сходен профил и групиране на отделните клади както при maximum likelihood (ML) анализа.

За да потвърдим филогенетичната позиция и отделяне на род *Nodosilinea*, 16S рРНК секвенции от 15 щам на *Nodosilinea* бяха сравнени заедно с наличните в GenBank 16S рРНК генни секвенции от добре характеризирани шамове *Leptolyngbya* (Фигура 2). Щамовете *Nodosilinea* образуват отделна клата, подкрепена от bootstrap стойност от 95%, което показва, че тяхното разделяне от род *Leptolyngbya* и прехвърлянето към нов род (*Nodosilinea*) е уместно (Perkerson et al., 2011). Тази клата, включва и няколко вида от *Leptolyngbya* (*Leptolyngbya antarctica*, *Leptolyngbya saxicola*, *Leptolyngbya mycoidea*, *Leptolyngbya margaretheana*, and *Leptolyngbya halophila*) изолирани от Антарктида, Португалия и Италия.

Анализирана беше и филогенетичната връзка между род *Phormidium* и новоформираните родове *Phormidesmis* и *Wilmottia*, които бяха отделени от род *Phormidium* (Фигура 3). Сравнени бяха всички 16S рРНК генни секвенции от шамове *Phormidesmis*, *Wilmottia* и добре характеризирани представители от *Phormidium*, налични в GenBank, както и 16S рРНК секвенции, получени за шамовете от РАСС. От филограмата (Фигура 3) ясно се вижда, че шамовете *Wilmottia murrayi*. формират отделен клон (Clade 1) подкрепени от bootstrap стойност от 100%.



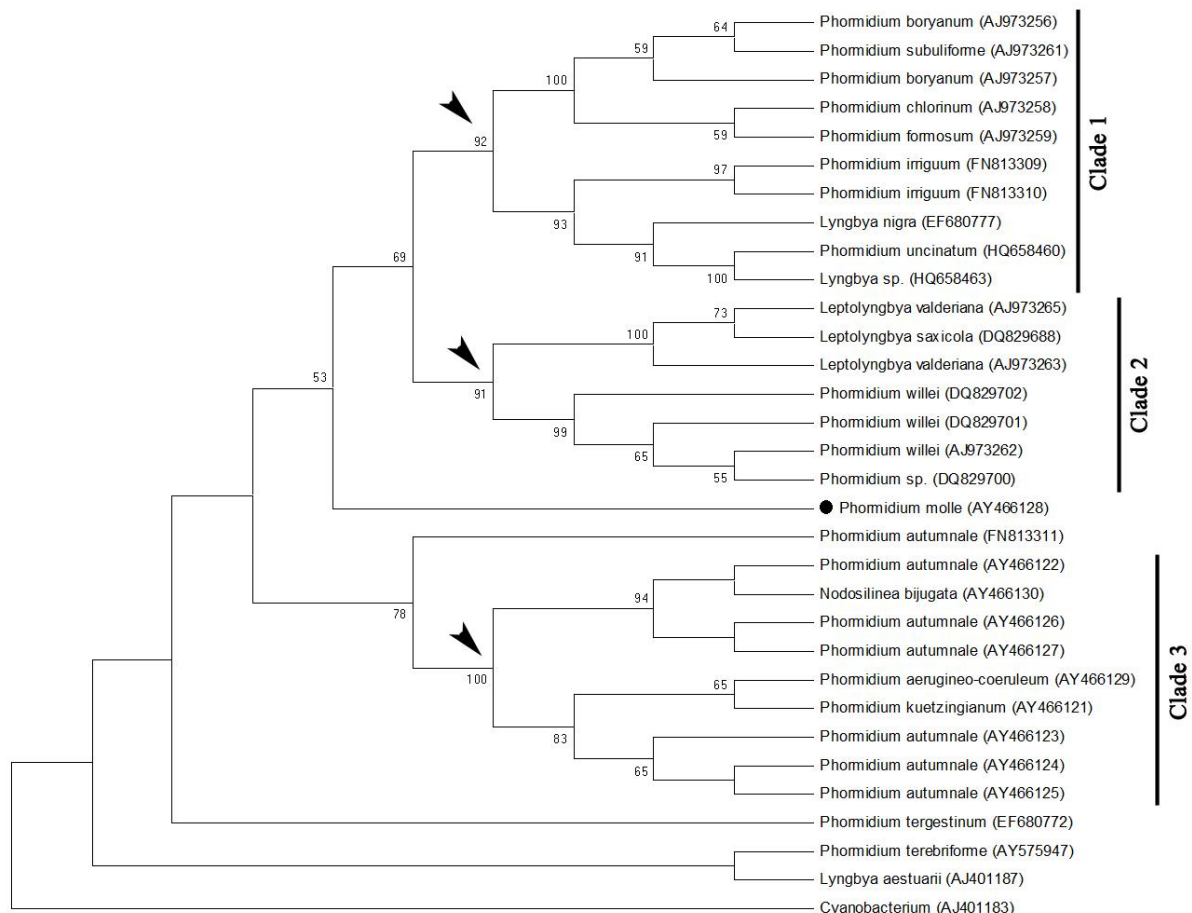
**Фигура 2.** Филогенетично дърво, реконструирано на базата на 16S рРНК генни секвенции на представителни видове от *Leptolyngbya* и *Nodosilinea* чрез използване на ML анализ и прилагане на GTR+I+G еволюционен модел. Числата показват bootstrap поддръжката (>50%) от 1000 повторения. Секвенциите, получени в настоящото изследване, са обозначени със запълнени кръгове. За рутиране на дървото е използвана секвенцията на *Gloeobacter violaceus*. GenBank номерата за достъп са дадени в скоби.

Два щама *Wilmottia/Phormidium murrayi* (с GenBank номера за достъп GQ504024 и EU852498) се групират с други видове *Phormidium* в различни клади. Това вероятно се дължи на некоректна идентификация на тези щамове. Щамовете отнесени към род *Phormidesmis* се групират заедно с няколко щамове *Phormidium priestleyi* и щамове означени като “Antarctic bacterium” (Clade 2), но без висока статистическа подкрепа. Цялата клуда е подкрепена от bootstrap стойност от 82%. Други щамове *Phormidium priestleyi* се групират в Clade 3 с два щамове *Nodosilinea bijugata* и *Phormidium persicinum* с bootstrap стойност от 99%.





Сравняването на достъпните в базата данни *srcB-IGS-srcA* секвенции на шамове от изследваните родове показва формиране на три отделни големи клади (Фигура 4). Първата клада (Clade 1) се състои от две подклади, в които се включват основно типични шамове от род *Phormidium* и два щамове от род *Lyngbya*. Тези подклади са подкрепени съответно от bootstrap стойности от 100% и 93%. Втората клада (Clade 2) също включва две подклади (*Leptolyngbya* и *Phormidium*) подкрепени от 100% и 99% bootstrap стойности. Повечето от публикуваните *srcB-IGS-srcA* секвенции от шамове на РАСС (Teneva et al., 2005), включени също в този анализ са групирани в Клада 3 (Clade 3) с висока bootstrap стойност – 100% (Фигура 4).



**Фигура 4.** Филогенетично дърво, реконструирано въз основа на наличните PC-IGS секвенции на представителни видове от *Phormidium*, *Leptolyngbya*, *Nodosilinea* и *Lyngbya*, чрез използване на ML анализ и прилагане на GTR+I+G еволюционен модел. Числата показват bootstrap поддръжката (>50%) от 1000 повторения. За рутване на дървото е използвана секвенцията на *Cyanobacterium*. GenBank номерата за достъп са дадени в скоби.

Въпреки че тази клада включва членове на род *Phormidium*, нашият щам *Nodosilinea bijugata* (= *Leptolyngbya bijugata*, = *Phormidium bijugatum*) се позиционира тук, но с ниска bootstrap стойност. За съжаление в базата данни не са налични PC-IGS секвенции на шамове *Phormidesmis* и *Wilmottia/Phormidium murrayi*. Нашият щам *Phormidesmis molle* (= *Phormidium molle*) (AY466128) се позиционира отделно извън основните клади. Проведените филогенетични анализи показват, че цианобактериалния вид *Nodosilinea bijugata* (= *Leptolyngbya bijugata*, = *Phormidium bijugatum*) е правилно

отнесен към новосформираният род *Nodosilinea*. Филогенетичните реконструкции, базиращи се на 16S рДНК секвенциите потвърждават отделянето на шамовете *Wilmottia/Phormidium murrayi* от род *Phormidium* в нов род *Wilmottia*.

Въпреки, че *Phormidium papyraceum* е морфологично близък до *Wilmottia murrayi*, той е генетично отделен вид, свързан много по-тясно с типичните шамове *Phormidium*, което означава, че този вид трябва да остане в род *Phormidium*. Филогенетичните анализи показват, че наличните 16S рДНК секвенции на шамовете *Phormidesmis*, както и тези на *Phormidium priestleyi* се позиционират в различни клонове с ниска bootstrap стойност. До момента липсват налични данни за 16S рДНК секвенции на вида *Phormidium molle*. Всичко това предполага, че всички шамове *Phormidesmis* и *Phormidium priestleyi* трябва да бъдат отнесени към род *Phormidium*. Доказателство за това са и данните от извършените анализи на база 16S рДНК и *PC-IGS* секвенциите на изследваният от нас *Phormidesmis molle* (= *Phormidium molle*), които го поставят в отделен клон и не показват филогенетична връзка с другите шамове *Phormidesmis* или *Phormidium priestleyi*.

Освен споменатите по-горе новоотделени родове (*Nodosilinea*, *Phormidesmis* и *Wilmottia*), през последните години от род *Phormidium* и род *Leptolyngbya* бяха отделени още няколко нови рода (Komárek, 2016). За съжаление, потвърждаването на тяхната самостоятелност на база филогенетични анализи с подходящи молекулярно-генетични маркери липсва. Причината за това е, че няма универсални молекулярно-генетични маркери, които могат да бъдат прилагани за всички разрези на отдел *Cyanobacteria* за подродово ниво. Вземайки предвид това, както и факта, че *cpcB-IGS-cpcA* маркера поставя в една клада не толкова близки цианобактериални видове (Фигура 4, Clade 3), и тази топология се поддържа от 100 % bootstrap стойност, ясно личи необходимостта от търсенето на нови и достатъчно надеждни молекулярно-генетични маркери за филогенетично базирана таксономична класификация на отдел *Cyanobacteria* на родово и подродово ниво.

За да отговорим на тази необходимост и в търсене на нови молекулярно-генетични маркери бяха проведени биоинформатични анализи с наличните в базите данни пълни цианобактериални геномни секвенции използвайки софтуерните програми IMG ER, Prodigal, MAFFT и Mesquite. В резултат на тези анализи като кандидати за подходящи молекулярно-генетични маркери бяха селектирани няколко цианобактериални клетъчни протеини – външен мембранен ефлукс протеин (Outer Membrane Efflux Protein, OMEP), светлинно-инхибиран протеин (Light-Repressed Protein, LRP), цианопорин (cyanoporine).

## **5.2. Приложение на външен мембранен ефлукс протеин (Outer Membrane Efflux Protein, OMEP) като нов молекулярно-генетичен маркер**

Данните за структурата и функциите на OMEP протеините в цианобактериите са много оскъдни. Тези протеини образуват тримерни канали, които служат за експорт на различни субстрати. Всеки член на това протеиново семейство се състои от повтарящи се алфа-спирали и бета-листове. Тримерният канал, който образуват е изграден от 12 бета-листа преминаващи през външната мембрана и дълги алфа-спирали преминаващи през периплазматичното пространство (Johnson and Church, 1999).

OMEP протеините участват в транспорта както на различни малки молекули, така и на големи протеини и токсини директно от вътрешността на клетката през двете мембрани към екстрацелуларното пространство (Hahn et al., 2012; Huang et al., 2004). Доказано е, че те са необходими за образуването на хетероцисти (Moslavac et al., 2007).

Ефлукс протеините на външната мембрана при грам-отрицателните бактерии и цианопрокариотите, заедно с тези на цитоплазматичната мембрана (inner membrane

efflux proteins /IEPs/) и периплазматичните ефлукс протеини (periplasmic efflux proteins /PEPs/) участват в изграждането на ефлукс помпи (Johnson and Church, 1999). Периплазматичните ефлукс протеини служат за свързване на протеините на плазмалемата и външната мембрана. Много от тези протеини имат в N-края си участък, изграден от хидрофобни остатъци, с които се свързват към цитоплазмената мембрана (Felmlee et al., 1985).

На базата на аминокиселинни секвенции за ОМЕР и прилагайки отново същите четири метода за филогенетичен анализ (minimum evolution /ME/, maximum parsimony /MP/, maximum-likelihood /ML/ и neighbor-joining /NJ/) бяха анализирани 82 цианобактериални щамове с напълно секвенирани геноми. Филогенетичното дърво, получено с помощта на ML метода е показано на Фигура 5.

Както може да се види от фигурата, повечето цианобактериални видове/щамове принадлежащи към различни родове са групирани в различни клади, подкрепени с високи bootstrap стойности. Пет щамове на *Crocospaera watsonii* са групирани в кладата *Crocospaera watsonii* Clade (Фигура 5, потъмнено), която е подкрепена с bootstrap стойност от 99%. Тази клуда е показана отделно на Фигура 6А. Другите по-големи клади са *Microcystis aeruginosa* Clade и *Prochlorococcus marinus* Clade (Фигура 5, потъмнено). Първата клуда е подкрепена също с 99% bootstrap стойност и съдържа 9 щамове *Microcystis aeruginosa* (Фигура 6В). Втората клуда включва 11 щамове *Prochlorococcus marinus* (66% bootstrap стойност) (Фигура 6С). Разликата между щамовете, групирани във всяка една от двете клади е, че те са изолирани от различни географски райони. Един от щамовете на *Prochlorococcus marinus* (MIT 9313) е позициониран в друга група заедно с един щам *Synechococcus sp.* (RS9916) и 3 други щамове *Prochlorococcus* (MIT 0701, MIT 0701, MIT 0701). Тази топология е подкрепена съответно от 53% и 99% bootstrap стойности (Фигура 5). Важно е да се отбележи, че всички щамове *Synechococcus* са групирани заедно в една клуда (54% bootstrap стойност). Тази клуда включва също и един щам от *Prochlorococcus marinus* (MIT 9303), въпреки че bootstrap стойността не е значима.

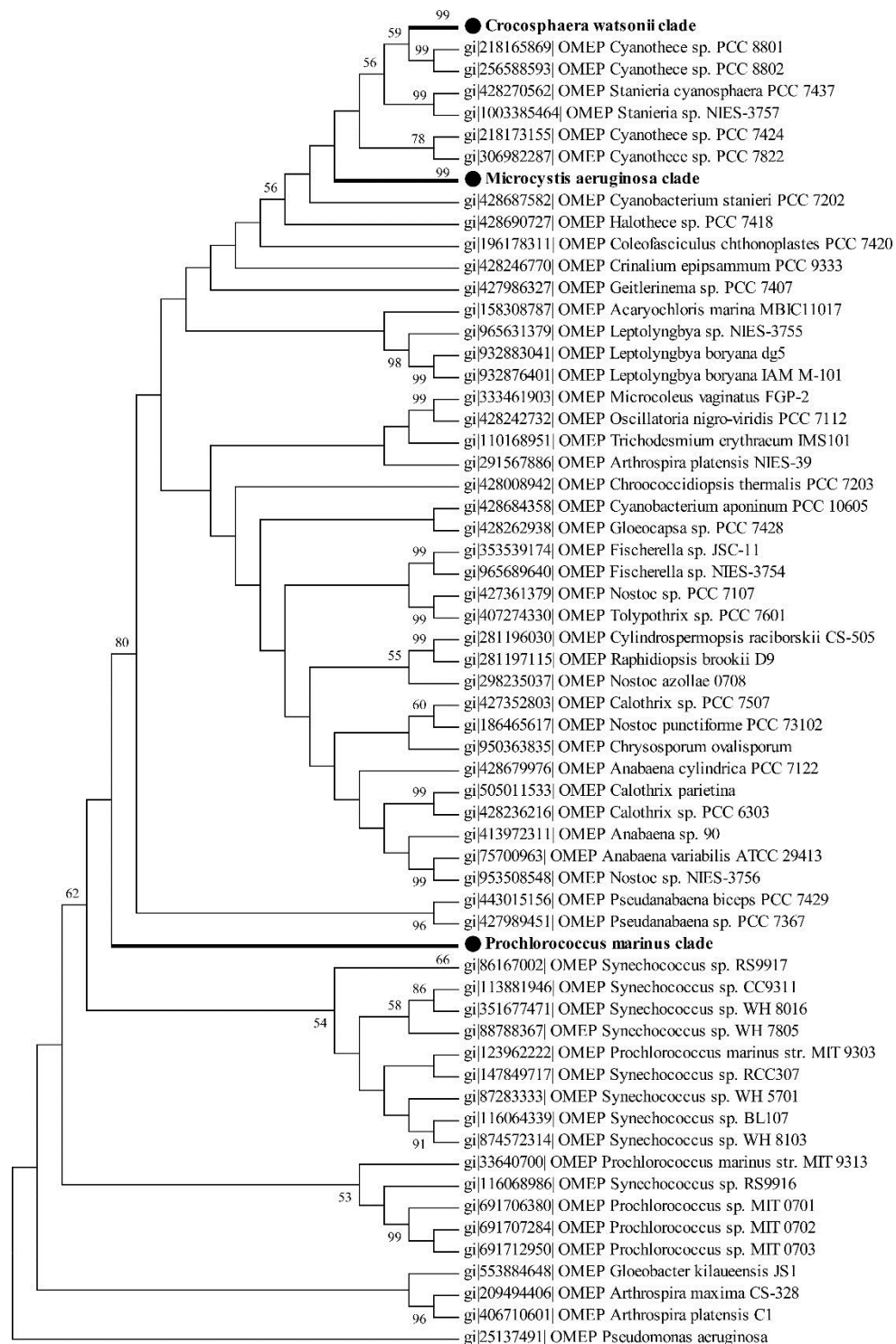
Другите цианобактериални видове/щамове (с малко изключения) са също групирани според тяхната таксономична принадлежност към съответния род. Например *Stanieria* (99% bootstrap), *Leptolyngbya* (98% bootstrap), *Fischerella* (99% bootstrap), *Calothrix* (99% bootstrap), *Pseudanabaena* (96% bootstrap), *Arthrospira* (96% bootstrap). Четири щамове *Cyanothece* са групирани в две отделни клади с bootstrap стойност от 99% и 78%. Видовете от тези две клади имат различно географско разпространение.

Някои от цианобактериалните видове, които принадлежат към различни родове са групирани заедно. Тази топология се поддържа от висока bootstrap стойност (99%): *Microcoleus vaginatus* FGP-2 и *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7112, *Nostoc sp.* PCC 7107 и *Tolypothrix sp.* PCC 760, *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 и *Raphidiopsis brookii* D9, *Anabaena variabilis* ATCC 29413 и *Nostoc sp.* NIES-3756. Възможно е някои от тези щамове да са погрешно идентифицирани на базата на тяхната морфология.

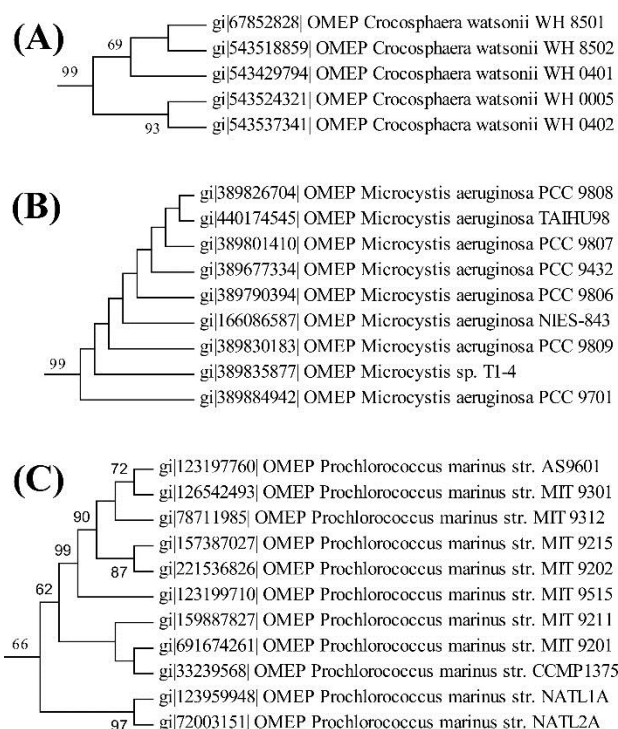
За *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 и *Raphidiopsis brookii* D9 е доказано, че тези два вида имат различна морфология, различно географско разпространение (Австралия и Бразилия), произвеждат различни цианотоксини, но имат много подобни геноми и образуват монофилетична група (Stucken et al., 2010). Обяснението е, че техните геноми са много малки (3.9 Mb за *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 и 3.2 Mb за *Raphidiopsis brookii* D9) в сравнение с други нишковидни видове и вероятно способността на *Raphidiopsis brookii* D9 да формира същински хетероцисти е вторично загубена заедно със способността за N<sub>2</sub>-фиксация (Stucken et al., 2010).



Използвайки neighbor-joining (NJ) метода за филогенетичен анализ, базиран на същите OMEP секвенции, се получиха сходни резултати. Сходни са и филогенетичните дървета, получени чрез методите minimum evolution (ME) и maximum parsimony (MP).



**Фигура 5.** Филогенетичен анализ, проведен на базата на OMEP аминокиселинни секвенции чрез прилагането на метода Maximum-Likelihood (ML) и еволюционния модел GTR+I+G. Числата показват bootstrap поддръжката (> 50%) от 1000 повторения. За рутиране на дървото като външна група е използвана OMEP секвенцията за *Pseudomonas aeruginosa*. Номерата за достъп в GenBank са дадени преди името на вида. Анализът включва 83 аминокиселинни секвенции.

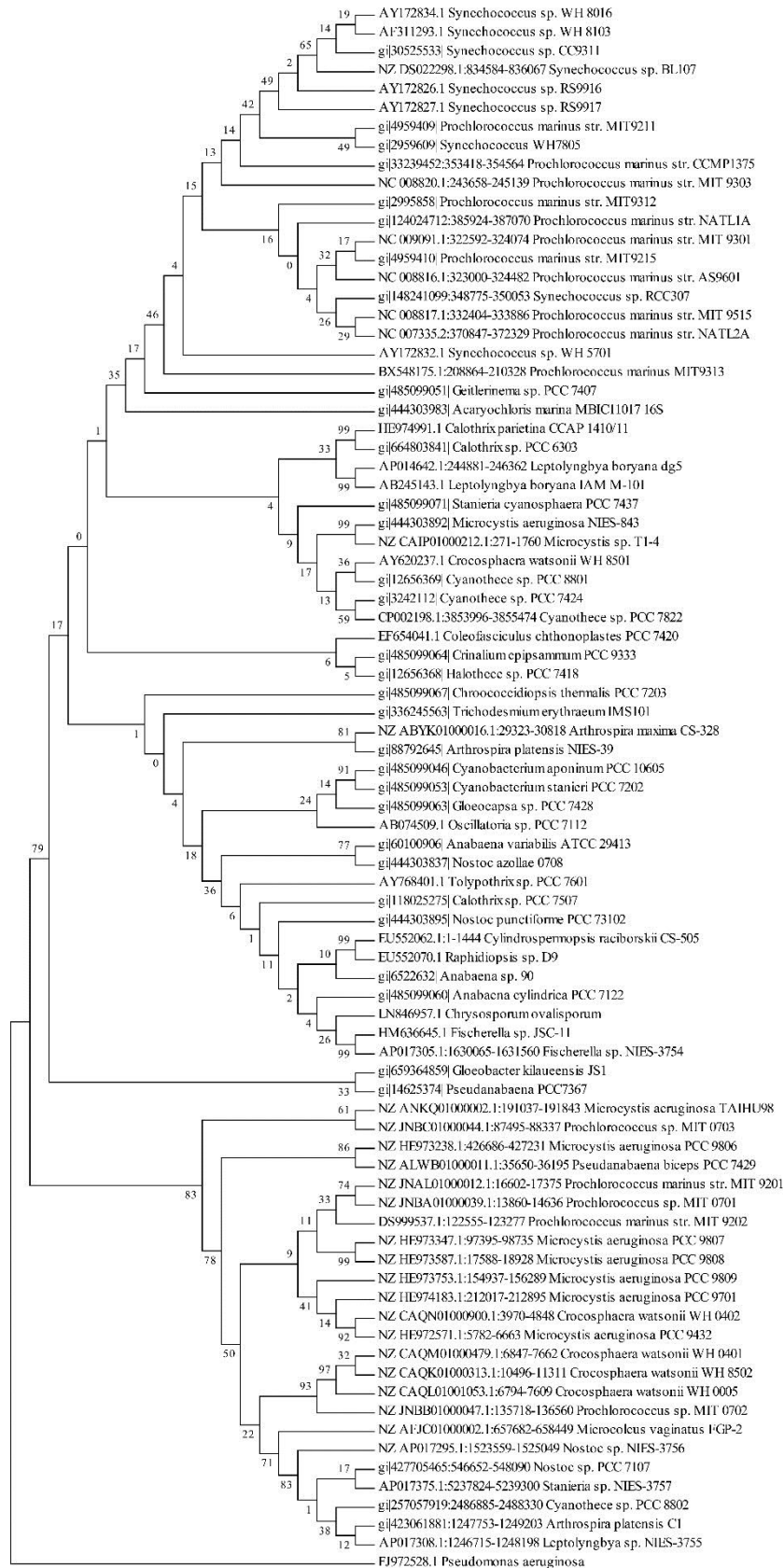


**Фигура 6.** Експортирани поддървета от основното филогенетично дърво, получено чрез **Maximum-Likelihood (ML)** анализ на базата на ОМЕР аминокиселинни секвенции (Фигура 4). (A) - *Crocosphaera watsonii* clade; (B) - *Microcystis aeruginosa* clade; (C) - *Prochlorococcus marinus*.

Тъй като секвенцията за 16S рРНК е най-често използвания молекулярен маркер за изясняване на цианобактериалната филогения и таксономична класификация на щамове с неизяснен статус, ние конструирахме филогенетични дървета, базирани на 16S рРНК секвенции, получени от същите цианобактериални геноми, използвани за ОМЕР филогенетичните анализи прилагайки същите методи.

На Фигура 7 е показано ML филогенетичното дърво базирано на 16S рРНК секвенции за анализираниите цианобактериални видове/щамове. Тъй като филогенетичните дървета, получени при прилагане на другите методи (ME, MP, NJ) показват подобно групиране, те не са представени. Подобно на дърветата, получени на базата на ОМЕР секвенции, представителите на родовете *Synechococcus* и *Prochlorococcus* формират големи сестрински клади, но с много ниски bootstrap стойности (Фигура 7). За разлика от филогенетичните дървета, генерирани от ОМЕР секвенциите, тук кладите *Microcystis aeruginosa* и *Crocosphaera watsonii* не са позиционирани в отделни клонове (Фигура 7). Те са смесени с други цианобактериални видове.

Другите клади включват различни цианобактериални видове с ниски стойности на статистическа подкрепа. Сравнявайки двете филогенетични реконструкции на база ОМЕР с филогенетичното дърво, генерирано на база 16S е ясно, че ОМЕР е подходящ маркер за изясняване на филогенетичните връзки при цианобактериите на родово и видово ниво, отколкото консервативните 16S рРНК генни секвенции.

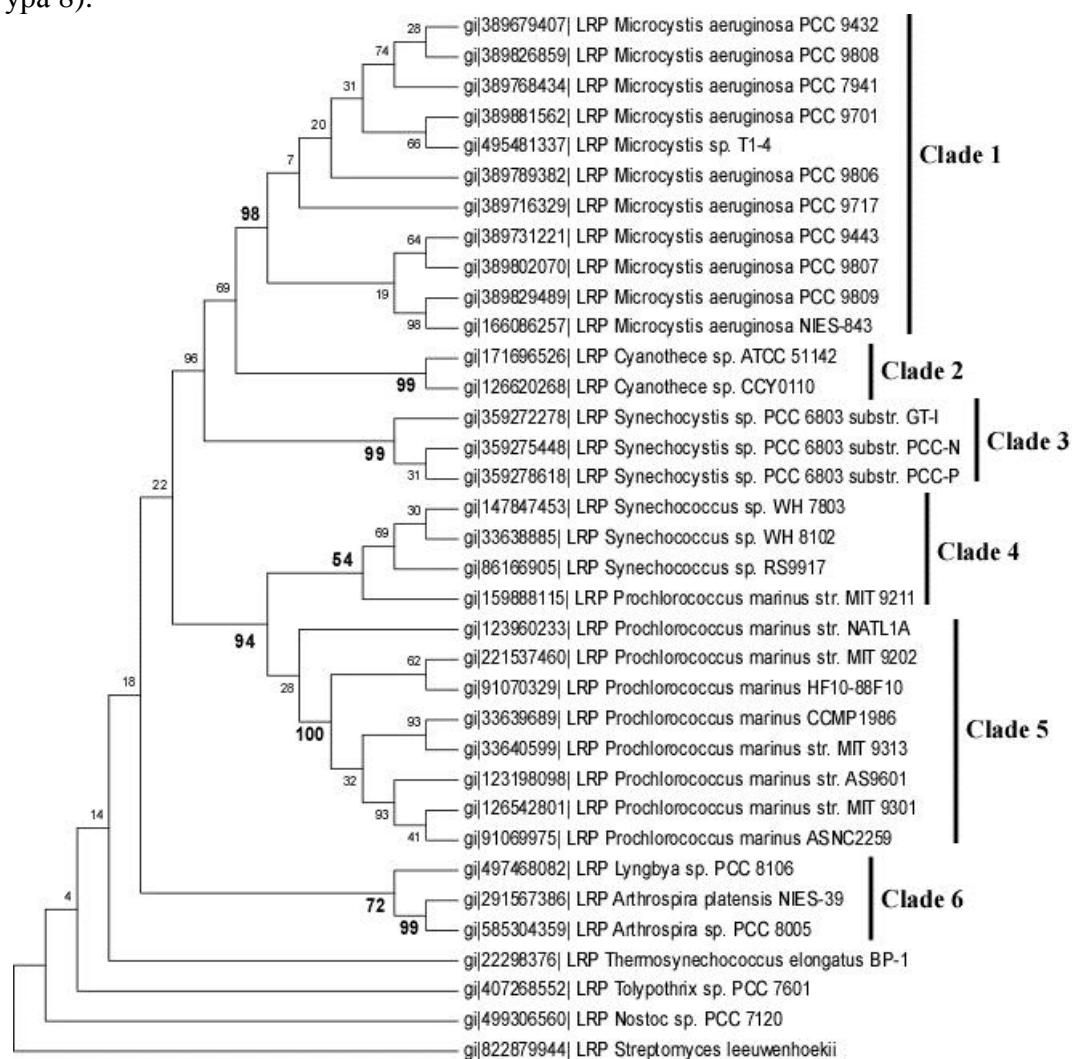


**Фигура 7.** Maximum-Likelihood (ML) филогенетично дърво конструирано на базата на 16S rRNA гени секвенции. Дървото е генерирано чрез прилагане на еволюционния модел GTR+I+G. Анализът включва 83 нуклеотидни секвенции за същите видове/щамове както на Фигура 5.

### 5.3. Приложение на светлинно-инхибиран протеин (Light-Repressed Protein, LRP) като нов молекулярно-генетичен маркер

Светлинно-инхибираният протеин (Light-Repressed Protein, LRP) е известен още като RaiA (Ribosome-associated inhibitor A), протеин Y (PY), YfiA или SpotY. Този протеин е слабо проучен и на този етап за него се знае, че функцията му е свързана с реакциите на стрес от ниски температури при цианобактериите. Свързва се с голямата рибозомна субчастица и блокира процеса на транслация като взаимодейства с аминоксил-тРНК свързващ участък (А-участък) на рибозомата (Agafonov and Spirin, 2004; Fujisawa et al., 2010; Tan et al., 1994). Счита се, че по този начин протеина съдейства за намаляване на грешките при транслация (Agafonov and Spirin, 2004). Структурно, LRP наподобява на двойно-верижен РНК-свързващ участък (dsRBD).

Филогенетичното дърво генерирано на база LRP секвенции с помощта на ML метода показва групиране на цианобактериалните щамове в шест основни клади (Фигура 8).



**Фигура 8.** Филогенетичен анализ, проведен на базата на LRP аминокиселинни секвенции чрез прилагането на метода **Maximum-Likelihood (ML)** и еволюционния модел GTR+I+G. Числата показват bootstrap поддръжката от 1000 повторения. За рутиране на дървото е използвана LRP секвенцията за *Streptomyces leeuwenhoekii*. Номерата за достъп в GenBank са дадени преди името на вида. Анализът включва 35 аминокиселинни секвенции.

Клада 1 (Clade 1) обединява шамове *Microcystis* с основен представител *Microcystis aeruginosa* и се поддържа от 98% bootstrap стойност. Два шاما *Cyanothece* оформят Клада 2 (Clade 2). Това позициониране има висока статистическа подкрепа от 99%. В Клада 3, поддържана от 99% bootstrap стойност се групират шамове *Synechocystis*. Клада 4 (Clade 4) и Клада 5 (Clade 5), обединяващи съответно шамове *Synechococcus* и шамове *Prochlorococcus* са сестрински групи. Тази топология, поддържана от 94% bootstrap стойност е резонна, предвид принадлежността на род *Synechococcus* и род *Prochlorococcus* към разред Synechococcales. Клада 6 (Clade 6) включва представители на род *Lyngbya* и род *Arthrospira*, и двата отнасящи се към разред Oscillatoriales. Статистическата поддръжка на това позициониране е 72% за кладата и 99% за шамовете *Arthrospira*. Сравнително ниската поддръжка на кладата вероятно отразява принадлежността на двата рода към различни семейства.

Филогенетичното дърво получено с помощта на NJ метода показва много сходна топология с ML дървото. Единствената по-съществена разлика е оформянето на още една кллада (Clade 7), в която се групират *Thermosynechococcus elongatus*, *Tolypothrix sp.* и *Nostoc sp.* Статистическата поддръжка на кладата е 79%, а тази между *Tolypothrix sp.* и *Nostoc sp.* - 99%, което би могло да означава или голямо сходство в секвенциите, или неправилна идентификация на шамовете. При филогенетичната реконструкция на база LRP секвенциите впечатление прави монофилетичността и изчистената топология на всички шамове в рамките на кладата, както и ясното отдиференциране на кладите, съставени предимно от представители на определен род от отдел Cyanobacteria. Това ни дава основание да предложим LRP като подходящ молекулярно-генетичен маркер както за родово, така и за подродово ниво.

Близки са и филогенетичните реконструкции, получени на база LRP секвенциите чрез прилагане на другите два филогенетични методи за анализ – minimum evolution (ME) и maximum parsimony (MP).

При филогенетичната реконструкция на база 16S рНК генни секвенции (Фигура 9) на същите представители, използвани за генериране на LRP дърветата и при използване на ML метода, впечатление прави групирането на шамове от род *Prochlorococcus* заедно с шамове от род *Synechococcus* със статистическа поддръжка от 97%. Представителите на род *Cyanothece* (разред Oscillatoriales) пък се групират заедно с шамове *Microcystis aeruginosa*.

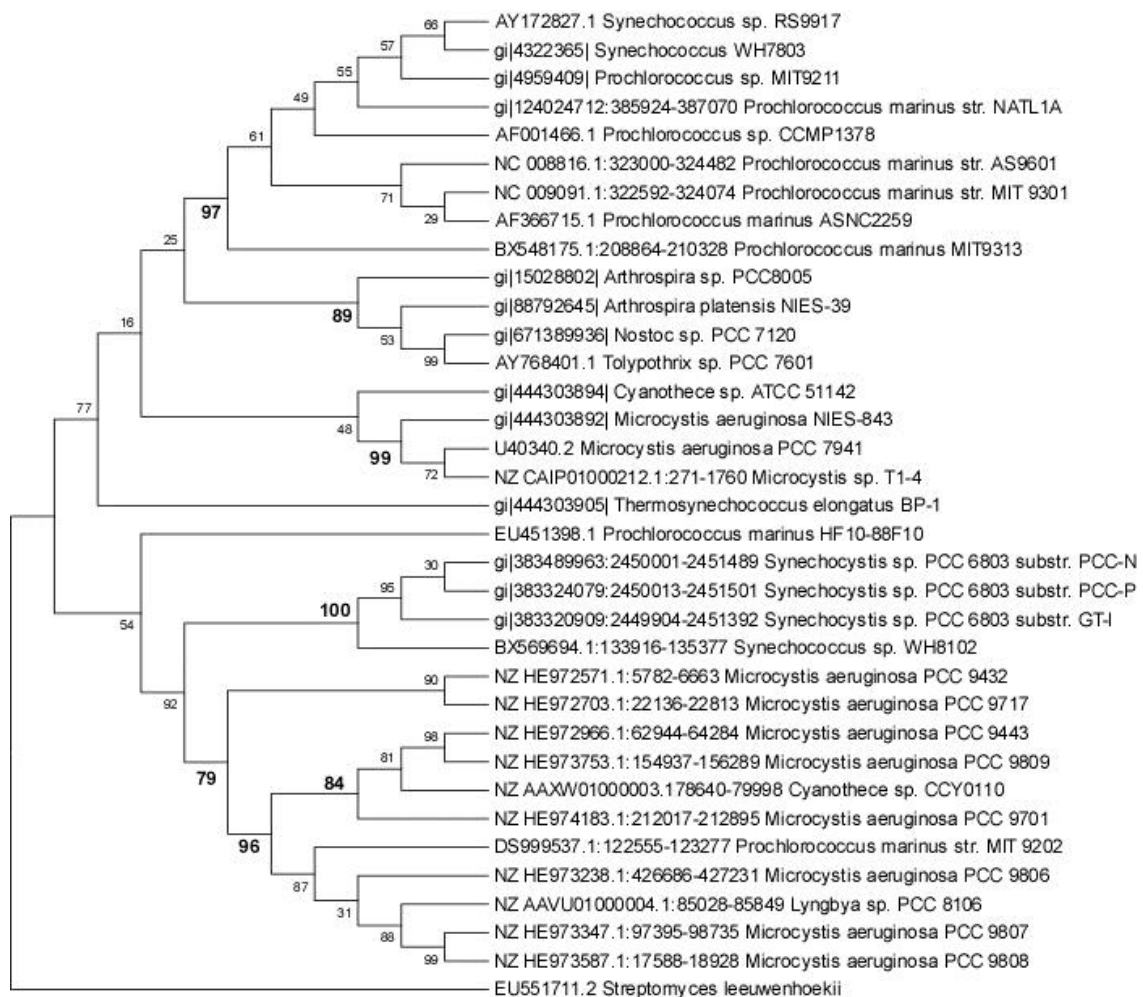
От друга страна, шамовете *Microcystis aeruginosa*, които при използване на LRP секвенциите се групират в ясна монофилетична кллада (Фигура 8), в 16S рНК филогенетичното дърво са позиционирани в няколко различни кледи (Фигура 9). При това сравнение се налага изводът, че позиционирането на цианопрокариотните шамове е по-ясно и изчистено при използване на LRP като филогенетичен маркер отколкото 16S рНК.

#### **5.4. Приложение на протеина цианопорин като нов молекулярно-генетичен маркер**

Порините при Грам-негативните бактерии са изградени от 3 субединици (хомотримерни), като всяка субединица има молекулна маса от 30 - 40 kDa. За разлика от тях, цианобактериалните порини (цианопорини) са по-големи и са изградени само от една мономерна единица с молекулна маса 50–70 kDa.

Цианопорините се характеризират със силно консервативен N-краен участък, изграден от 120 аминокиселини, известен като SLH (surface layer homolog). С помощта на консервативния SLH участък, тези протеини се свързват с пептидогликаните или други полимери на вторичната клетъчна стена, като по този начин стабилизират клетъчната стена. Предполага се, че функцията на цианопорините е да осигуряват

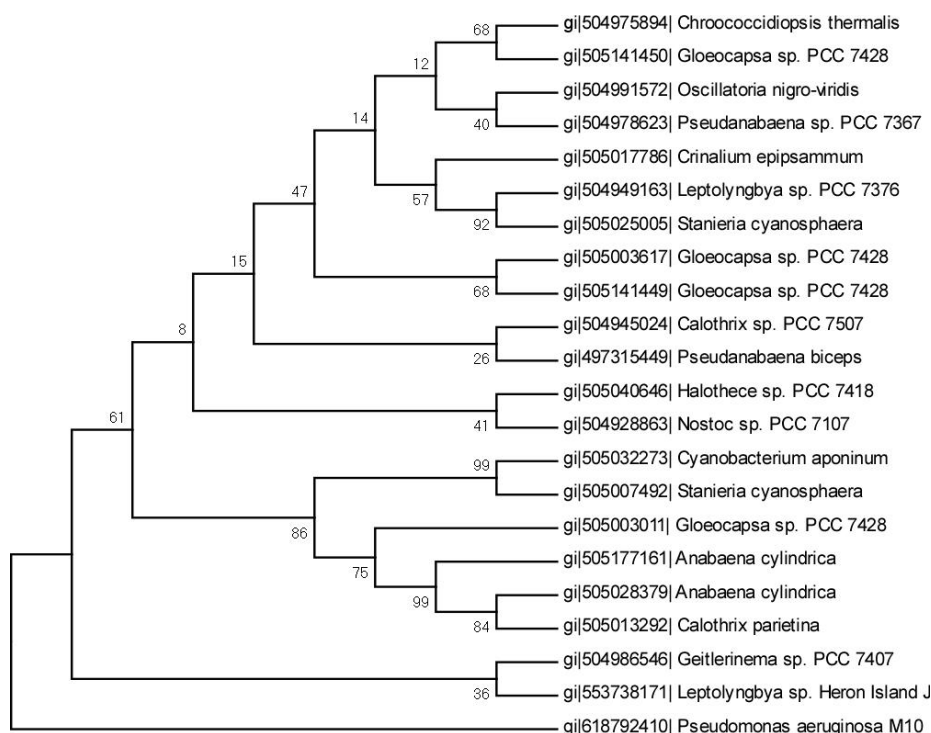
транспорта на малки молекули и захари от околната среда към интрацелуларното пространство. Най-добре са характеризирани цианопорините от генома на *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 – *SomA* и *SomB* (Nakamura et al., 1998; Huang et al., 2004).



**Фигура 9.** Maximum-Likelihood (ML) филогенетично дърво конструирано на базата на 16S rRNA генни секвенции. Дървото е генерирано чрез прилагане на еволюционния модел GTR+I+G. Анализът включва 35 нуклеотидни секвенции за същите видове/щамове както на Фигура 8.

Проведените филогенетични анализи на базата на наличните аминокиселинни секвенции в базите данни за цианопорин, показаха липса на ясно отдиференцирани клади и смесване на представители от различни родове и разрези в общи клади.

На Фигура 10 е представено филогенетичното дърво, генерирано на база на аминокиселинни секвенции за цианопорин чрез метода Maximum-Likelihood (ML). От дървото се вижда, че представители на един и същи род се отнасят към различни клади, както и че представители на различни цианобактериални родове се поддържат с високи bootstrap стойности – например *Leptolyngbya* и *Stanieria* (92%), *Cyanobacterium* и *Stanieria* (99%), *Anabaena* и *Calothrix* (84%). Сходни са и дърветата, генерирани от другите методи за филогенетични анализи – ME, MP и NJ (данните не са представени).



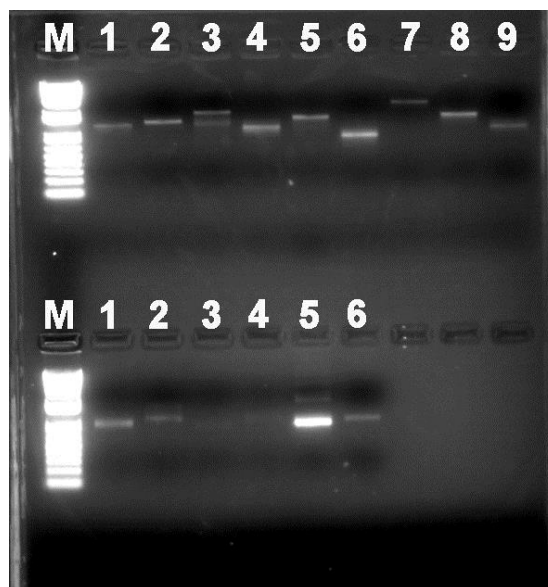
**Фигура 10.** Филогенетичен анализ, проведен на базата на аминокиселинни секвенции за цианопорин чрез прилагането на метода **Maximum-Likelihood (ML)** и еволюционния модел GTR+I+G. Числата показват bootstrap поддръжката от 1000 повторения. За рутиране на дървото е използвана секвенцията на порин за *Pseudomonas aeruginosa*. Номерата за достъп в GenBank са дадени преди името на вида. Анализът включва 22 аминокиселинни секвенции.

### 5.5. Практическо валидиране на новопредложените молекулярно-генетични маркери чрез използване на цианобактериални щамове от РАСС

За да се тества приложимостта на селектираните нови молекулярно-генетични маркери бяха направени специфични PCR праймери за амплификация на генните участъци, кодиращи OMEP и LRP.

За целта беше изолирана ДНК от няколко цианопрокариотни щамове, принадлежащи към различни родове на отдела. Използваните цианобактериални щамове са от водорасловата колекцията на Пловдивски университет (РАСС). При условията, описани в раздел „Материали и методи“, бяха амплифицирани изследваните участъци. Проведена бе гел-електрофореза с цел визуализиране на PCR-продукта. Резултатите са показани на Фигура 11. От фигурата се вижда, че маркерите работят и могат успешно да се използват за подобни анализи. Дължината на амплифицирания участък за OMEP е около 1200-1600 bp и варира според родовата принадлежност, а за LRP около 500-600 bp, което съответства на теоретично очакваното.

Някои от PCR-продуктите бяха изолирани от гела и изпратени за секвениране. При директно секвениране на PCR-продукт бе получена LRP секвенцията на *Nostoc linkia* РАСС 5085. Получената секвенция беше добавена към филогенетичния анализ, за да се провери таксономичната позиция на щамове. От Фигура 12 се вижда, че *Nostoc linkia* РАСС 5085 се позиционира извън оформените клади поради принадлежността му към род *Nostoc*, който род не е представен в дървото с други щамове заради липса на такива секвенции в базите данни.



**Фигура 11.** Амплифицирани PCR-продукти и визуализирани с етидиев бромид в 1.5% агарозен гел.

**Първи ред – OMEP PCR-продукт:** М – маркер, 1 – *Phormidesmis molle* PACC 8140, 2 – *Tolypothrix tenuis* PACC 5497, 3 – *Phormidium uncinatum* PACC 8693, 4 – *Phormidium autumnale* PACC 5527, 5 – *Anabaena bornetiana* PACC 8775, 6 – *Nostoc linckia* PACC 5085, 7 – *Pseudanabaena galeata* PACC 5411, 8 – *Nostoc punctiforme* PACC 8646, 9 – *Phormidium autumnale* PACC 5527.

**Втори ред – LRP PCR-продукт:** М – маркер, 1 – *Leptolyngbya nostocorum* PACC 5476, 2 – *Nostoc punctiforme* PACC 8646, 3 – *Nostoc linckia* PACC 5085, 4 – *Pseudanabaena galeata* PACC 5411, 5 – *Synechocystis parvula* PACC 8627, 6 – *Phormidesmis molle* PACC 5088.

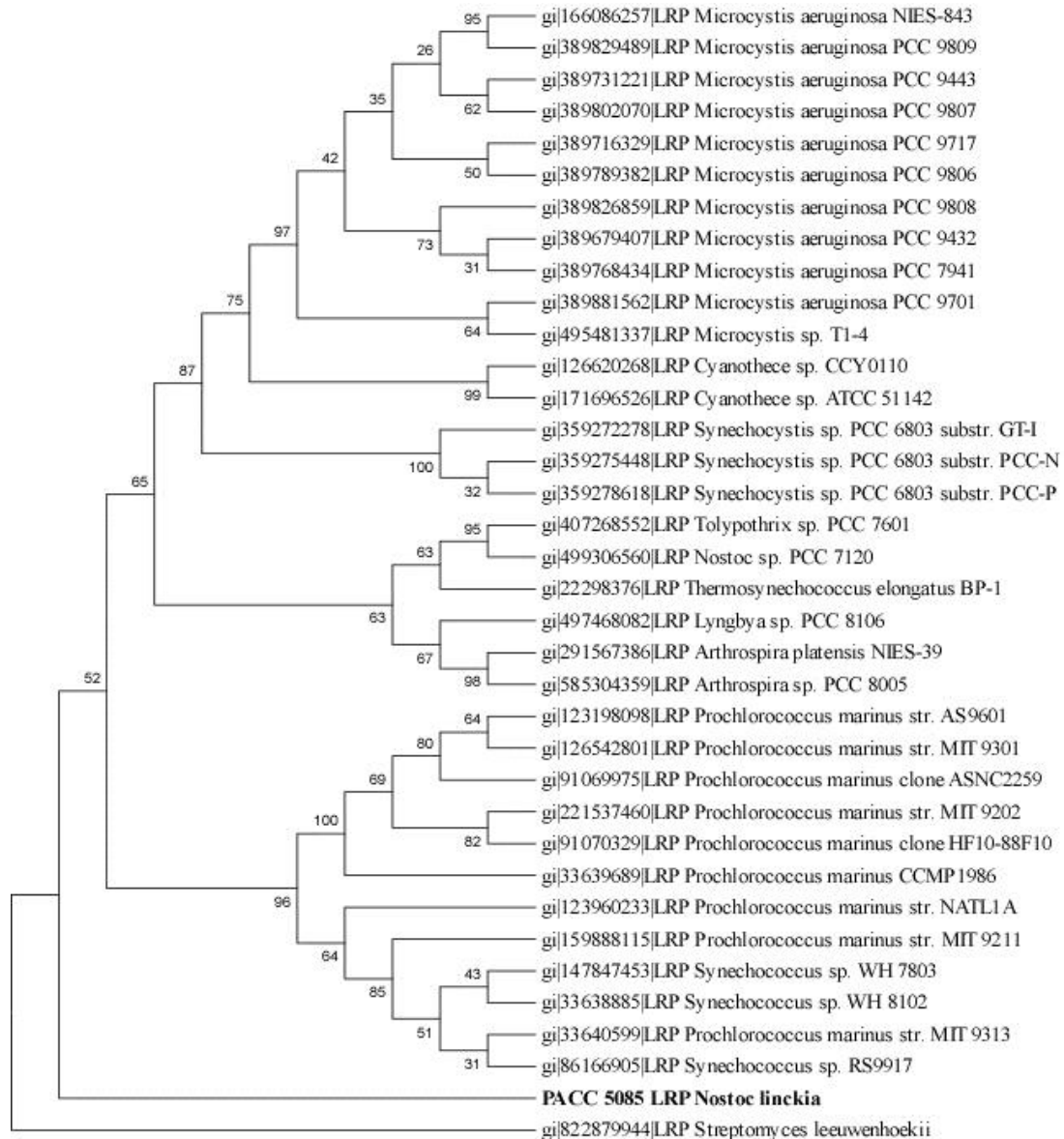
За провеждането на по-задълбочени филогенетични анализи на базата на новопредложените маркери е необходимо да има достатъчен брой секвенции за тези протеини (FMEP и LRP) в базите данни. За съжаление, на този етап такива секвенции могат да бъдат взети само за цианопрокариотните щамове, чиито геноми са напълно секвенирани. Другата възможност е в бъдеще да се секвенират специфично тези участъци от генома, както се прави за останалите маркери, които се използват за филогенетични анализи.

### **5.6. Приложение на 5S рРНК и нейната вторична структура за филогенетични анализи на цианопрокариотни представители**

Всички еукариотни и прокариотни рибозоми са изградени от рибозомални рибонуклеинови киселини и рибозомални протеини (Van et al., 2000). Бактериалните рибозоми (70S), в това число и на цианобактериите, се състоят от голяма и малка рибозомна субединица. Малката рибозомна субединица (30S) е изградена от 16S рРНК (1542 нуклеотида) и 21 рибозомални протеина. Голямата рибозомна субединица (50S) съдържа 34 различни протеини (L1-L34), 23S рРНК (2904 нуклеотида) и 5S рРНК (Van et al., 1999; Clemons et al., 1999). 5S рРНК има дължина от около 120 нуклеотида и молекулно тегло от около 40000 Да и е структурен и функционален елемент на голямата рибозомна субединица. Тя е високо консервативна. В прокариотните рибозоми, 5S рРНК се свързва към няколко рибозомални протеина – L5, L18 и L25.



При прокариотите, тя се синтезира като част от единичен дълъг транскрипт заедно с 16S и 23S рибозомните РНК-и и взаимодейства с рибозомалните протеини (Barciszewska et al., 2001). През годините, проучванията свързани с 5S рРНК се фокусират върху анализите на секвенции и тяхното приложение за решаване на проблеми от молекулярната еволюция. Размерът и разпространението на 5S рРНК, позволяват лесно секвениране, което я прави идеален кандидат за филогенетичен маркер. Това води до бързото акумулиране на голям брой секвенции от различни организми, принадлежащи към различни таксономични групи. Въпреки многото години проучвания, много малко се знае в детайли за структурата и функциите на 5S рРНК.



**Фигура 12.** Филогенетичен анализ на базата на LRP аминокиселинни секвенции чрез прилагането на метода Maximum-Likelihood (ML) и еволюционния модел GTR+I+G. Видът от PACC (*Nostoc linckia*), чиято LRP-секвенция беше получена чрез директно секвениране е представен с потъмнен шрифт във филогенетичното дърво. Числата показват bootstrap поддръжката от 1000 повторения. За рутиране на дървото е използвана LRP секвенцията за *Streptomyces leeuwenhoekii*. Номерата за достъп в GenBank са дадени преди името на вида.

Досега, генът за 5S рРНК не е използван за филогенетични анализи на цианобактерии. С цел да установим възможността за използване на 5S рРНК като допълнителен молекулярен маркер за филогенетични анализи на цианобактерии, ние конструирахме филогенетични дървета за 96 цианобактериални щамове. Тези филогенетични реконструкции са на база 5S рРНК и 16S рРНК секвенции, извлечени от наличните цели геномни цианобактериални секвенции чрез използване на maximum-likelihood (ML) и neighbor-joining (NJ) алгоритми.

Тъй като ML и NJ филогенетичните дървета са много сходни, тук са представени само ML дърветата. Фигура 13 показва рутираното ML дърво конструирано на базата на генни секвенции за 5S рРНК. Както може да се види от фигурата, цианобактериалните щамове са групирани в 10 по-големи клади. Клада 1 (обозначена като клада *Prochlorococcus/Synechococcus*) включва 13 щамове *Prochlorococcus* и 6 щамове *Synechococcus*. В дървото те са представени по този начин за да се опрости и да се намалят показаните щамове на фигурата, тъй като тази клада се състои само от няколко щамове *Prochlorococcus marinus* и *Synechococcus* с висока bootstrap стойност от 59%.

Други основни клади (клада 2 и клада 10) са съставени от различни цианобактериални родове - *Microcystis*, *Cyanothece*, *Synechocystis*, *Cyanobacterium*, *Leptolyngbya*, *Spirulina*, *Stanieria* и др., които принадлежат към различни разрези (Chroococcales, Oscillatoriales, Synechococcales, Pleurocapsales).

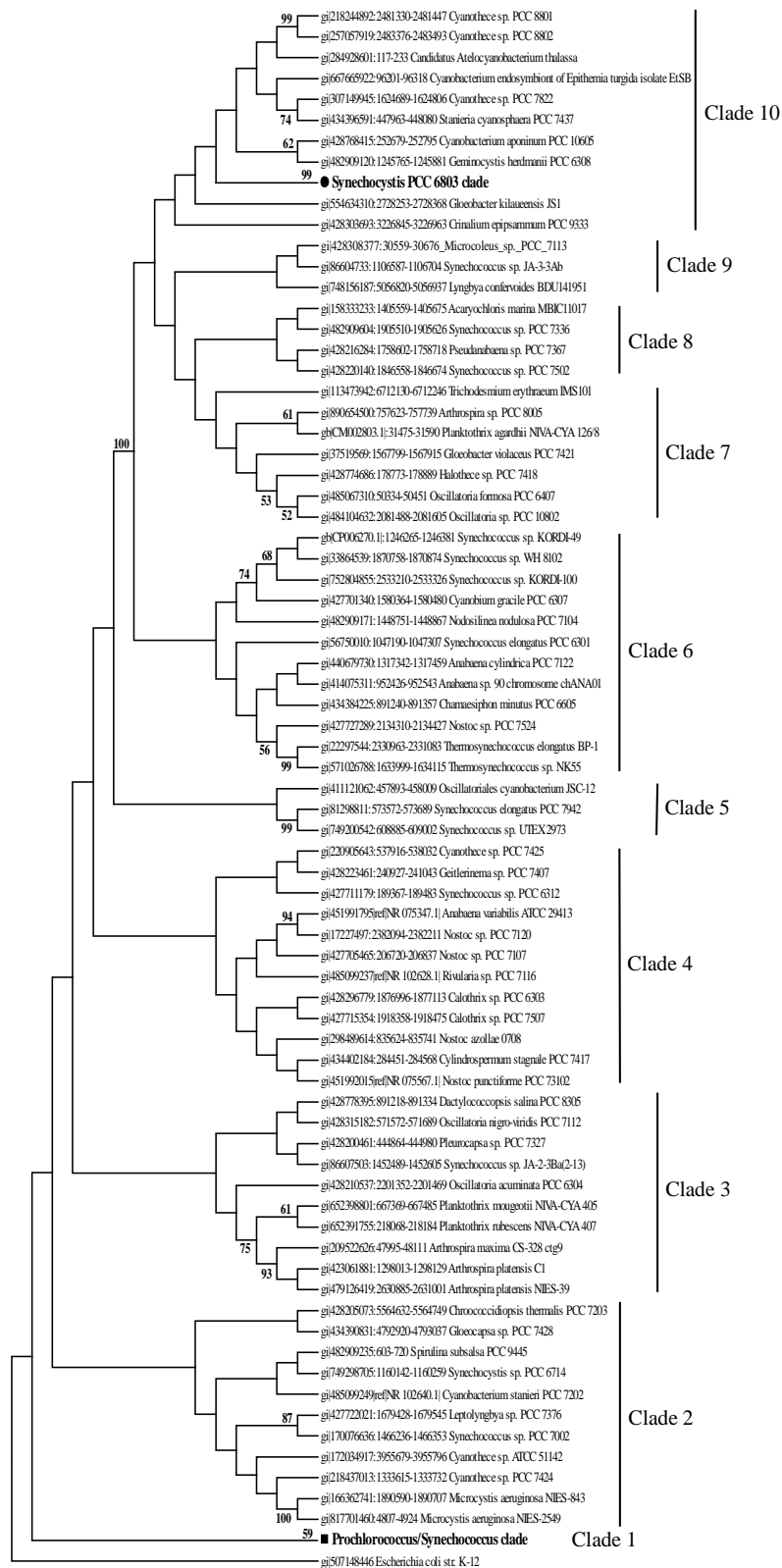
В тези клади само няколко щамове се поддържат от високи bootstrap стойности. Тук се включват два щамове *Microcystis aeruginosa*, два щамове *Cyanothece* и 5 щамове *Synechocystis* PCC 6803, представени на Фигура 13 като клада *Synechocystis* PCC 6803. Представителите на Oscillatoriales са групирани в 2 отделни клади (Клада 3 и Клада 7).

Клада 4 включва щамове, които принадлежат към разред Nostocales. Щамовете Synechococcales са групирани в Клада 5 и Клада 6 смесени с някои Nostocales. Останалите малки клади (Клади 8 и 9) включват различни цианобактерии, които може би се нуждаят от ревизия.

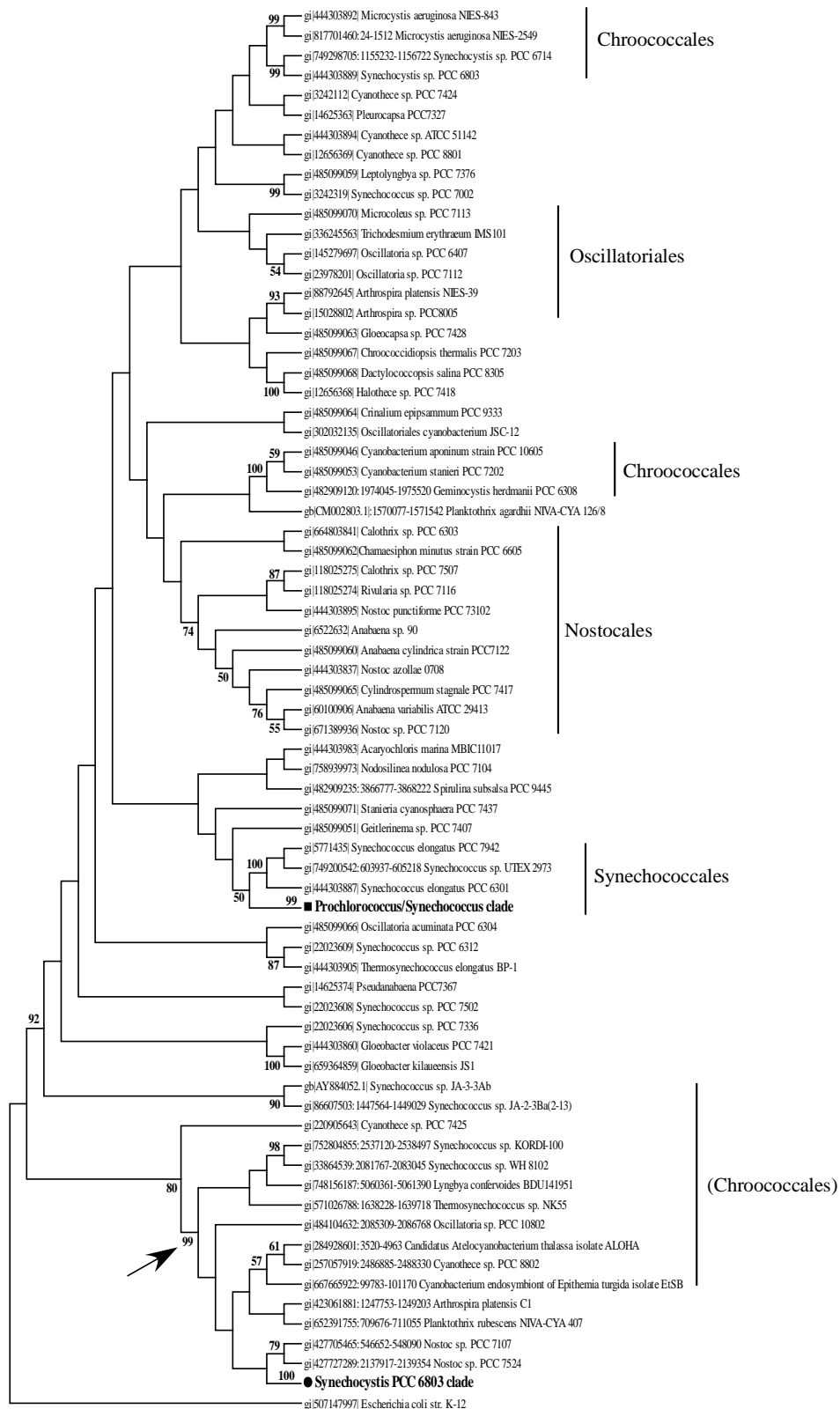
За сравнение, Фигура 14 показва рутирано ML дърво, направено на базата на 16S рРНК секвенции за същите цианобактериални щамове, като във Фигура 13. 16S рРНК е приета като водещ маркер в таксономията на прокариотите на ниво род и надрод. Това е причината да сравним филогенетичните реконструкции на база 5S рРНК и 16S рРНК. Между тези две дървета има подобие, но те не са еднакви (Фигура 13, Фигура 14). Сходството се свързва с клади *Prochlorococcus/Synechococcus* (99% bootstrap стойност) и *Synechocystis* PCC 6803 (100% bootstrap стойност), които включват подщамове на тези цианобактерии, както и за Nostocales (Клада 4), които са групирани в отделна клада, поддържана от bootstrap стойност 74% (Фигура 14).

Някои от другите цианобактериални видове са групирани в по-малки отделни клади, представляващи разрези Oscillatoriales, Synechococcales или Chroococcales (Фигура 14), но не както се групират във филогенетичното дърво на база 5S рРНК (Фигура 13).

Сравнявайки топологията на 5S рРНК и 16S рРНК дърветата, може да се види, че кладите в 5S рРНК дървото са групирани много по-добре от тези в 16S рРНК дървото. Трябва да се отбележи, че в 16S рРНК дървото различните цианобактериални щамове, които принадлежат към различни разрези (Synechococcales, Oscillatoriales, Chroococcales) са групирани в една клада с bootstrap стойност 99% (Фигура 14, стрелка).

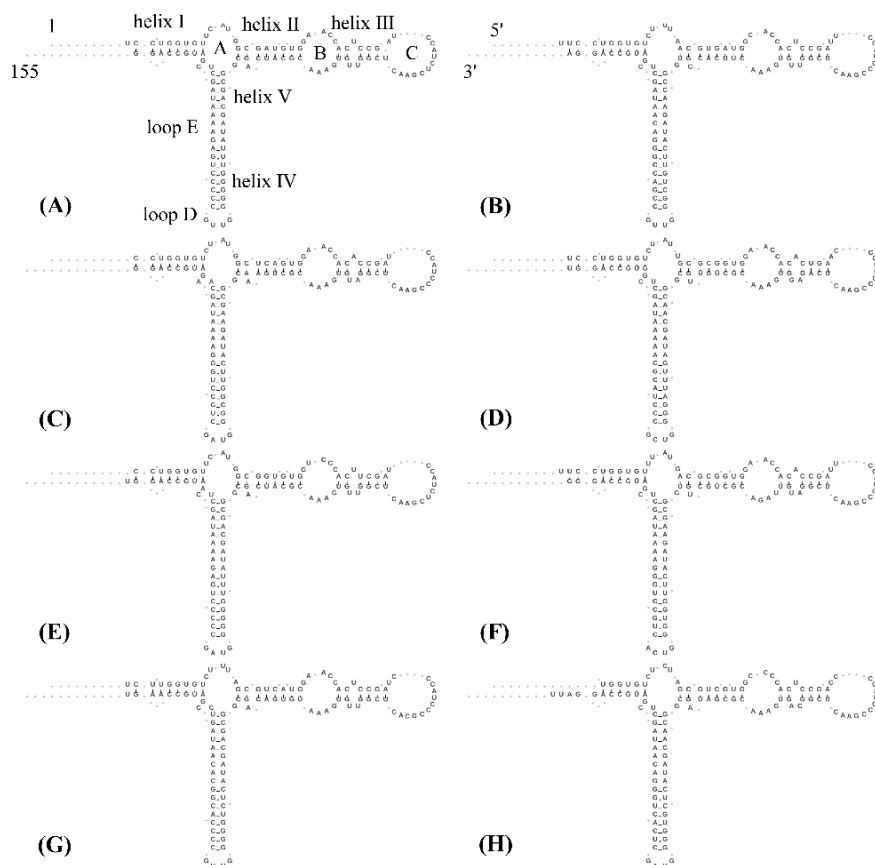


**Фигура 13.** Филогенетичен анализ на базата на 5S рРНК гени секвенции проведен чрез метода Maximum-Likelihood (ML). Филогенетичното дърво е генерирано чрез прилагане на еволюционния модел GTR+I+G. Числата показват статистическата bootstrap поддръжка (> 50%) от 1000 повторения. За рутиране на дървото е използвана 5S рРНК секвенция на *Escherichia coli* K-12. Номерата за достъп в GenBank са дадени преди името на всеки шам. В анализът са включени 96 нуклеотидни секвенции.



**Фигура 14.** Филогенетичен анализ на базата на 16S рРНК генни секвенции проведен чрез метода Maximum-Likelihood (ML). Филогенетичното дърво е генерирано чрез прилагане на еволюционния модел GTR+I+G. Числата показват статистическата bootstrap поддръжка (> 50%) от 1000 повторения. За рутиране на дървото е използвана 5S рРНК секвенция на *Escherichia coli* K-12. Номерата за достъп в GenBank са дадени преди името на всеки шам. В анализът са включени 96 нуклеотидни секвенции.

Допълнително бяха анализирани вторичните структури на използваните 5S рРНК. На Фигура 15 са показани 5S вторичните структури на цианобактериални щамове от основните кледи, които са характерни за дадените групи. По-голямата част от 5S РНК структурите, генерирани със софтуера съдържат 155 нуклеотиди (Фигура 15). Анализирайки няколко вторични структури от щамове *Prochlorococcus* (Клада 1, Фигура 13) ние установихме, че позиция U<sub>20</sub> (loop A), двойките A<sub>31</sub>-U<sub>84</sub> и U<sub>32</sub>-A<sub>83</sub> (helix II), U<sub>60</sub> (loop C) и двойката U<sub>101</sub>-A<sub>122</sub> (helix IV) са специфични за род *Prochlorococcus* (Фигура 15A), като повечето от тях (с изключение на двойката A<sub>31</sub>-U<sub>84</sub>) са споделени с род *Synechococcus* (Клада 1 и Клада 6, Фигура 13). Също така, в допълнение на тези специфични особености, род *Synechococcus* има специфична позиция A<sub>112</sub> в loop D (Фигура 15E). Родовете *Microcystis* (Фигура 15B, Клада 2, Фигура 13) и *Synechocystis* (Фигура 15G, Клада 10, Фигура 13) имат общи специфични нуклеотиди в loop A (U<sub>23</sub>), helix II (двойките U<sub>31</sub>-A<sub>84</sub> и A<sub>33</sub>-U<sub>82</sub>) и helix IV (U<sub>104</sub>-A<sub>119</sub>). Щамовете *Synechocystis* имат една по-специфична позиция (C<sub>63</sub>) в loop C (Фигура 15G). Въпреки, че *Arthrospira platensis* (Клада 3, Фигура 13) и *Oscillatoria formosa* (Клада 7, Фигура 13) са групирани в две различни кледи (Фигура 13), те се отнасят към Oscillatoriales и имат подобни вторични структури за 5S РНК (Фигура 15C и Фигура 15F). Техните общи специфични позиции са A<sub>44</sub>, A<sub>71</sub> (в helix III) и двойката A<sub>96</sub>-A<sub>127</sub> (в helix V).



**Фигура 15.** Предполагаеми вторични структури на 5S рРНК-и. (A) *Prochlorococcus marinus*, (B) *Microcystis aeruginosa*, (C) *Arthrospira platensis*, (D) *Nostoc punctiforme*, (E) *Synechococcus* sp. WH 8102, (F) *Oscillatoria formosa* PCC 6407, (G) *Synechocystis* sp. PCC 6803 и (H) *Cyanothece* sp. PCC 8801.

Позициите C<sub>112</sub> и A<sub>113</sub> в loop D са специфични само за род *Oscillatoria* (Фигура 15F). Цианобактериите от род *Nostoc* (Клада 4, Фигура 13) са имат специфични позиции A<sub>71</sub> и G<sub>72</sub> (Фигура 13D), докато щамовете *Cyanothece* (Клада 10, Фигура 13) имат специфични нуклеотиди в loop B (C<sub>37</sub>), helix III (C<sub>71</sub> и A<sub>72</sub>) и helix IV (двойката U<sub>105</sub>-A<sub>118</sub>) (Фигура 15H).

Тези данни показват, че специфичните позиции във вторичните структури на 5S рНК може да бъдат използвани като допълнителни маркери за разграничаване на цианобактериални щамове на родово и надродово ниво.

## 6. Дискусия

В настоящето изследване, ние направихме филогенетични анализи на базата на 16S рНК гена и *cpb-IGS-cpcA* региона на фикоцианиновия оперон на някои нишковидни цианобактерии със спорна таксономия. Тези анализи бяха проведени с цел проучване на приложимостта на *cpb-IGS-cpcA* като молекулярно-генетичен маркер за родово и подродово детерминиране на проблемни таксони. Правилното определяне на отделни видове изисква генетични, морфологични и екологични връзки. Нашите филогенетични анализи подкрепят таксономичното разделяне на род *Nodosilinea* от полифилетичния род *Leptolyngbya* (Perkerson et al., 2011). Изследваните щамове *Nodosilinea* винаги формират тясно свързани генетични групи, подкрепени с висока bootstrap стойност. На базата на морфологични и ултраструктурни характеристики *Lyngbya bijugata* (= *P. bijugatum*) беше прехвърлен в род *Nodosilinea* (*Nodosilinea bijugata*) въпреки, че изследвания щам е различен от другите щамове *Nodosilinea* по отношение на 16S-23S генните секвенции и вторичната структура (Perkerson et al., 2011). Въз основа на 16S рНК секвенции, бе потвърдено, че този вид принадлежи към род *Nodosilinea*.

В групата *Nodosilinea* се позиционират някои щамове *Leptolyngbya* (изолирани от Италия и Португалия), включително *L. margaretheana*, *L. mycoidea* и *L. halophila* (Фигура 1). Perkerson и колеги предполагат, че *L. margaretheana* също трябва да бъде отнесен към *Nodosilinea* (Perkerson et al., 2011). Към тези видове в групата се позиционират още *L. antarctica* и *L. saxicola*. Всички щамове *Leptolyngbya*, групирани в кладата *Nodosilinea* споделят 98% подобие по отношение на гена за 16S рНК. Може би в бъдеще, тези видове ще бъдат класифицирани като видове *Nodosilinea*.

Проведените филогенетични анализи потвърдиха монофилетичността на групата *Wilmottia*, което е в съответствие с други изследвания (Strunecky et al., 2011). Всички щамове *Wilmottia/Phormidium murrayi* се групират в една кллада със статистическа поддръжка от 100% (Clade 1, Фигури 1 и 3). Strunecky et al. отбелязват, че *Phormidium rapyraceum* е морфологично подобен на *Wilmottia murrayi* и може да бъде генетично идентичен с *Wilmottia* (Strunecky et al., 2011). Филогенетичните анализи показаха, че този вид е включен в групата на *Phormidium* заедно с няколко щамове *Phormidium autumnale* и *Phormidium uncinatum* (Фигури 1 и 3). Заключение от тази филогения, е че *Phormidium rapyraceum* не принадлежи към род *Wilmottia*.

Род *Phormidesmis* беше отделен от род *Phormidium* на базата на комбинирани молекулярни (16S рНК генни секвенции) и фенотипни анализи на тропически видове *Phormidium molle* (Turicchia et al., 2009). За съжаление, използваната 16S рНК секвенция на типовия вид включен във филогенетичните анализи, проведени от авторите не е налична в публичните бази данни. В проведените от нас филогенетични анализи бяха включени всички налични 16S рНК генни секвенции от щамове означени като *Phormidesmis* и в допълнение 16S рНК секвенция от нашия щам, идентифициран като *Phormidium molle*. Резултатите показват, че щамовете

*Phormidesmis* и някои щамове *Phormidium priestleyi* формират отделна кллада, различна от типичните видове *Phormidium*, но без висока bootstrap стойност (Фигури 1 и 3). От друга страна, тези щамове *Phormidesmis* се групират в сестринска кллада до *Leptolyngbya* (Фигура 1). Тази топология се поддържа от 96% bootstrap стойност.

Въпреки, че няколко щамове *Phormidium priestleyi* се групират заедно с *Phormidesmis*, нашите филогенетични анализи показват, че други щамове на *Phormidium priestleyi* са смесени с *Phormidium* и *Nodosilinea*. Освен щамове *Phormidium priestleyi*, на базата на морфологични белези няколко щамове *Phormidium* също са отнесени към род *Phormidesmis*, включително *Phormidium macedonicum* Čhodo 1959 (Komárek et al., 2009). За този вид е дадено, че по морфологини белези е сходен на *Wilmottia murrayi* (Strunecky et al., 2011).

Във всички проведени филогенетични анализи, нашият щам *Phormidesmis molle* (= *Phormidium molle*) се групира отделно от щамове *Phormidium* или *Phormidesmis*. От друга страна, морфологичният анализ показва, че този щам има всички морфологични характеристики (според описанието на Komárek and Anagnostidis, 2005) да бъде класифициран като *Phormidium molle*. Съгласно тези данни, *Phormidium molle* трябва да бъде определен като криптичен вид (Komárek, 2006; Komárek, 2010; Johansen & Casamatta, 2005). Странно е, че когато се сравни неговата 16S рРНК секвенция с всички налични секвенции в GenBank, анализът показва 98% подобие с *Tolypothrix* sp. (Nostocales). От друга страна, секвенцията за *cpb-IGS-cpcA* има 85% подобие с фикоцианиновия оперон на *Tolypothrix* sp. и 100% подобие с щамове на *Phormidium autumnale*. Тъй като не се наблюдават фалшиви разклонения и хетероцисти (характерни за *Nostocales*), възможно обяснение на този феномен е хоризонтален обмен на генетична информация (Rudi et al., 1998). Тъй като на този етап броят на наличните 16S рРНК секвенции за щамове *Phormidesmis* е ограничен и техните генетични връзки са все още неясни, според нас е твърде рано да се отделият в отделен род (*Phormidesmis*) на базата на морфологични и ултраструктурни белези, които могат да варират в зависимост от факторите на средата.

В търсенето на нови маркери, ние проверихме приложимостта на три клетъчни протеина (OMEP, LRP и цианопорин) като молекулярни маркери за анализиране на еволюционните връзки и таксономична класификация на цианобактериите. Сравнявайки филогенетични дървета, базирани на OMEP и LRP аминокиселинни секвенции, и 16S рДНК нуклеотидни секвенции чрез четири филогенетични методи (ME, MP, ML и NJ) за различни цианобактериални вида/щамове, доказахме, че OMEP и LRP могат да бъдат полезни молекулярни маркери за изясняване на цианобактериалната филогения и за таксономична идентификация на цианобактериални родове и видове. Анализите показаха, че протеина цианопорин не е подходящ за изследване на родствените взаимоотношения между цианобактериални представители или за тяхната таксономична класификация.

Въпреки, че понастоящем 16S рДНК е основният ген, който се използва в прокариотната систематика, той представлява само една малка част от цианобактериалната филогения и много често различни организми, имащи много подобни или дори идентични 16S рДНК секвенции, могат да имат много повече разлики в останалата част на генома (Kampfer and Glaeser, 2012; Swingley et al., 2008). С увеличаване на броя на напълно секвенираните цианобактериални геноми, все по-често за филогенетични анализи се използва метода на конкатенация (обединяване на секвенциите за няколко гена/протеина). Наскоро бяха конструирани няколко филогенетични дървета на базата на обединени секвенции за няколко консервативни протеини (Gupta and Mathews, 2010; Howard-Azzeh et al., 2014; Shih et al., 2013). По този начин бяха определени специфични маркерни протеини за повечето големи

цианобактериални клади (Gupta and Mathews, 2010). За съжаление, по-голямата част от тези маркерни протеини са с неизвестни функции. Освен това, метода на конкатенация може да доведе до “свр̀хинтерпретация” на филогенетичното диференциране на близкородствени видове и следователно до статистическо противоречие (Kampfer and Glaeser, 2012). По този начин, използването на подобраните гени/протеини трябва да бъдат доказвани за всеки нов изследван таксон, тъй като някои от цианобактериалните видове може да не съдържат тези гени/протеини. Ето защо, за определянето на филогенетичните връзки и таксономичната класификация на близкородствени организми на родово и видово ниво за предпочитане е използването на индивидуалния подход, базиран на един специфичен протеин или на няколко протеина, а не метода на конкатенация. В настоящия дисертационен труд, ние доказахме, че OMEP и LRP са много полезни маркери за такива анализи.

Нашите анализи показват, че OMEP и LRP са подходящи маркери за новата филогенетично-базирана система за таксономия и класификация на цианобактерии на родово и видово ниво, защото топологията на филогенетичните дървета представя монофилетични таксони с относително малко на брой видове и високи bootstrap стойности. Не е за пренебрегване и факта, че всички цианобактерии притежават тези протеини.

В допълнение на клетъчните протеини OMEP и LRP, нашите анализи ясно демонстрират, че 5S рРНК също може да бъде използвана като допълнителен молекулярно-генетичен маркер за изясняване на филогенетични връзки в рамките на отдел Cyanobacteria. От представените филогенетични дървета за 5S рРНК и 16S рРНК (Фигури 13 и 14) се вижда, че близкородствени цианобактериални щамове от един род/вид, например *Microcystis aeruginosa*, *Synechocystis sp.*, *Synechococcus sp.* или *Arthrospira sp* винаги се групират заедно подкрепени с високи bootstrap стойности. Подоброто групиране на близкородствени щамове при използване на 5S рРНК в сравнение с 16S рРНК и факта, че във филогенетичното дърво (построено на база 16S рРНК) в една клуда (Фигура 14, стрелка) се групират представители от различни разрези (Synechococcales, Oscillatoriales, Chroococcales) с висока статистическа подкрепа (99%), поставя въпроса дали новата класификация предложена от Komárek et al. (2014) е уместна. Ако вземем предвид по-старата класификация на цианобактериите (преди ревизията направена от Komárek et al., 2014), повечето от тези видове се отнасят към разред Chroococcales.

Въпреки демонстрираното приложение на 5S рРНК като добър молекулярно-генетичен маркер за цианопрокариотите, неговото практическо използване на този етап е все още ограничено поради факта, че много трудно могат да се направят универсални праймери за амплификация на този участък, които да са приложими за всички цианопрокариоти. Затова ние го предлагаме като допълнителен молекулярен маркер за филогенетични анализи на цианобактерии с напълно секвенирани геноми.

Проблемът с повечето налични цианобактериални геноми е, че много от секвенираните щамове не са идентифицирани до видово ниво и те са подбрани случайно на базата на различни критерии (икономическо значение, достъпни като култура/изолати, роля за околната среда и т.н.). За правилната класификация и систематика на цианобактериите, от съществено значение е да бъдат секвенирани геномите на типовите видове за отделните родове, които могат да бъдат използвани като референтни секвенции при полифазната таксономия. За съжаление, в днешно време малко геномни проекти са базирани и фокусирани вър̀ху този подход. С увеличаване броя на напълно секвенираните геноми за типови цианобактериални видове, проблемите с тяхната таксономична позиция и еволюционни връзки ще бъдат решени.



## 7. ИЗВОДИ

Въз основа на обобщение на резултатите от проведените изследвания могат да се направят следните по-важни изводи:

1. Проведените филогенетични анализи на базата на 16S рДНК секвенции потвърждават, че отделянето на род *Nodosilinea* от полифилетичния род *Leptolyngbya* и род *Wilmottia* от полифилетичния род *Phormidium* е уместно.
2. Филогенетичните реконструкции, направени на база на *cpbB-IGS-cpcA* локуса на фикоцианиновия оперон и генния участък за 16S рРНК потвърждават принадлежността на вида *Leptolyngbya bijugata* (= *Phormidium bijugatum*) към новоотделения род *Nodosilinea* (*Nodosilinea bijugata*).
3. Настоящото изследване показва, че въпреки морфологичното сходство на *Phormidium papyraceum* с *Wilmottia murrayi*, тези видове значително се различават в генетично отношение и следователно на този етап *Phormidium papyraceum* трябва да запази своята принадлежност към род *Phormidium*.
4. Позиционирането на *Phormidesmis molle* (= *Phormidium molle*) в отделен клон без родствена връзка с другите щамове *Phormidesmis* и *Phormidium priestley* доказва, че този вид трябва да остане към род *Phormidium*.
5. Външният мембранен ефлукс протеин (ОМЕР) е подходящ нов молекулярно-генетичен маркер за изясняване на филогенетичните връзки при цианобактериите на родово и видово ниво.
6. Светлинно-инхибиращият протеин (LRP) също е подходящ молекулярно-генетичен маркер за филогенетични анализи и таксономия при цианопрокариотите както за родово, така и за подродово ниво.
7. Цианопоринът не е подходящ маркер за филогенетични анализи и таксономия на цианопрокариотни представители.
8. Генът за 5S рРНК може да бъде използван като допълнителен молекулярен маркер за филогенетични анализи на цианобактерии с напълно секвенирани геноми.
9. Специфичните позиции във вторичните структури на 5S РНК може да бъдат използвани като допълнителни маркери за разграничаване на цианобактериални щамове на родово и надродово ниво.

## 8. Литература, цитирана в автореферата

- Agafonov, D.E., and A.S. Spirin. 2004. The ribosome-associated inhibitor A reduces translation errors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320:354-358.
- Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, M. Capel, P.B. Moore, and T.A. Steitz. 1999. Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature.* 400:841-847.
- Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P.B. Moore, and T.A. Steitz. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science.* 289:905-920.
- Barciszewska, M. Z., M. Szymanski, V. A. Erdmann, and J. Barciszewski. 2001. Structure and functions of 5S rRNA. *Acta Biochimica Polonica*, 48(1): 191-198.
- Casamata, D.A., J.R. Johansen, M.L. Vis, and S.T. Broadwater. 2005. Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). *J. Phycol.* 41:421-438.
- Casamata, D.A., M.L. Vis, and R.G. Sheat. 2003. Cryptic species in cyanobacterial systematics: a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. *Aquatic Botany.* 77 (4):295-309.
- Castenholz, R.W. 2001. Oxygenic photosynthetic bacteria. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. D.R. Boone and R.W. Castenholz, editors. Springer-Verlag, New York. 473-600.
- Clemons, W.M., Jr., J.L. May, B.T. Wimberly, J.P. McCutcheon, M.S. Capel, and V. Ramakrishnan. 1999. Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature.* 400:833-840.

- Felmlee, T., S. Pellett, and R.A. Welch. 1985. Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *Journal of bacteriology*. 163:94-105.
- Fujisawa, T., R. Narikawa, S. Okamoto, S. Ehira, H. Yoshimura, I. Suzuki, T. Masuda, M. Mochimaru, S. Takaichi, K. Awai, M. Sekine, H. Horikawa, I. Yashiro, S. Omata, H. Takarada, Y. Katano, H. Kosugi, S. Tanikawa, K. Ohmori, N. Sato, M. Ikeuchi, N. Fujita, and M. Ohmori. 2010. Genomic structure of an economically important cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. *DNA Res.* 17:85-103.
- Gupta, R.S., and D.W. Mathews. 2010. Signature proteins for the major clades of Cyanobacteria. *BMC Evol. Biol.* 10:24.
- Hahn, A., M. Stevanovic, O. Mirus, and E. Schleiff. 2012. The TolC-like protein HgdD of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 is involved in secondary metabolite export and antibiotic resistance. *J. Biol. Chem.* 287:41126-41138.
- Howard-Azzeh, M., L. Shamseer, H.E. Schellhorn, and R.S. Gupta. 2014. Phylogenetic analysis and molecular signatures defining a monophyletic clade of heterocystous cyanobacteria and identifying its closest relatives. *Photosynth. Res.* 122:171-185.
- Huang, F., E. Hedman, C. Funk, T. Kieselbach, W.P. Schroder, and B. Norling. 2004. Isolation of outer membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its proteomic characterization. *Mol. Cell. Proteomics.* 3:586-595.
- Johansen, J.R., Casamatta, D.A. 2005. Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm. *Algol. Stud.* 117:71-93.
- Johansen, J.R., O. C.E., R.L. Lowe, K. Flucikova, and D.A. Casamata. 2008. *Leptolyngbya* species from selected seep walls in the Great Smoky Mountains National Park. *Algological Studies.* 126:21-36.
- Johnson, J.M., and G.M. Church. 1999. Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *Journal of molecular biology.* 287:695-715.
- Kampfer, P., and S.P. Glaeser. 2012. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era--the polyphasic approach revisited. *Environ. Microbiol.* 14:291-317.
- Komárek, J., and K. Anagnostidis. 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4. Nostocales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 82: 247-345.
- Komárek, J., and J. Anagnostidis. 2005. *Cyanoprokaryota -2. Tiel/2nd Part: Oscillatoriales.* Elsevier/Spektrum, Heidelberg.
- Komárek, J. 2006. Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae.* 21:349-375.
- Komárek, K.J., Mares J, and J. JR. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014 using a polyphasic approach. *Preslia.* 86: 295-335.
- Moslavac, S., K. Nicolaisen, O. Mirus, F. Al Dehni, R. Pernil, E. Flores, I. Maldener, and E. Schleiff. 2007. A TolC-like protein is required for heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of bacteriology.* 189:7887-7895.
- Nakamura, Y., T. Kaneko, M. Hirose, N. Myajima, and S. Tabata. 1998. Cyanobase, a www database containing the complete nucleotide sequence of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Nucleic Acids Res.* 26:63-67.
- Perkerson, R.B., J.R. Johansen, L. Kovacic, J. Brand, J. Kastovsky, and D.A. Casamatta. 2011. A Unique Pseudanabaenalean (Cyanobacteria) Genus *Nodosilinea* Gen. Nov Based on Morphological and Molecular Data. *J. Phycol.* 47:1397-1412.
- Rudi, K., O.M. Skulberg, and K.S. Jakobsen. 1998. Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phylogenetically related strains. *J. Bacteriol.* 180:3453-3461.
- Shih, P.M., D. Wu, A. Latifi, S.D. Axen, D.P. Fewer, E. Talla, A. Calteau, F. Cai, N. Tandeau de Marsac, R. Rippka, M. Herdman, K. Sivonen, T. Coursin, T. Laurent, L. Goodwin, M. Nolan, K.W. Davenport, C.S. Han, E.M. Rubin, J.A. Eisen, T. Woyke, M. Gugger, and C.A. Kerfeld. 2013. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 110:1053-1058.
- Strunecky, O., J. Elster, and J. Komarek. 2011. Taxonomic revision of the freshwater cyanobacterium "Phormidium" *murrayi* = *Wilmottia murrayi*. *Fottea.* 11:57-71.
- Stucken, K., U. John, A. Cembella, A.A. Murillo, K. Soto-Liebe, J.J. Fuentes-Valdes, M. Friedel, A.M. Plominsky, M. Vasquez, and G. Glockner. 2010. The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. *PLoS One.* 5:e9235.
- Swingley, W.D., R.E. Blankenship, and J. Raymond. 2008. Integrating Markov clustering and molecular phylogenetics to reconstruct the cyanobacterial species tree from conserved protein families. *Mol. Biol. Evol.* 25:643-654.

- Tan, X., M. Varughese, and W.R. Widger. 1994. A light-repressed transcript found in *Synechococcus* PCC 7002 is similar to a chloroplast-specific small subunit ribosomal protein and to a transcription modulator protein associated with sigma 54. *J. Biol. Chem.* 269:20905-20912.
- Taton, A., S. Grubisic, E. Brambilla, R. De Wit, and A. Wilmotte. 2003. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5157-5169.
- Teneva, I., B. Dzhambazov, R. Mladenov, and K. Schirmer. 2005. Molecular and phylogenetic characterization of *Phormidium* species (Cyanoprokaryota) using the *cpcB-IGS-cpcA* locus. *Journal of Phycology.* 41:188-194.
- Turicchia, S., S. Ventura, J. Komarkova, and J. Komarek. 2009. Taxonomic evaluation of cyanobacterial microflora from alkaline marshes of northern Belize. 2. Diversity of oscillatorialean genera. *Nova Hedwigia.* 89:165-200.
- Turner, S. 1997. Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. *Plant Syst. Evol. Suppl.* 11:13-52.
- Wilmotte, A., and M. Herdman. 2001. Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. G.M. Garrity, D.R. Boone, and R.W. Castenholz, editors. Springer-Verlag, New York. 487-599.

## Приноси на дисертационния труд

### Оригинални научни приноси

- За първи път са проведени филогенетични анализи при цианопрокариоти на базата на **външния мембранен ефлуks протеин (ОМЕР)** и се демонстрира, че този протеин може да се използва като **нов молекулярно-генетичен маркер** за изясняване на филогенетичните връзки при цианобактериите на родово и видово ниво.
- За първи път са проведени филогенетични анализи при цианопрокариоти на базата на **светлинно-инхибираният протеин (LRP)** и този протеин също се предлага като **нов подходящ молекулярно-генетичен маркер** за полифазна таксономия на цианобактериите на родово и подродово ниво.
- За първи път се използва **генът за 5S рРНК** като **маркер за филогенетични анализи** при цианопрокариоти и се доказва неговото приложение като допълнителен молекулярен маркер за полифазна таксономия на цианобактерии с напълно секвенирани геноми.
- За първи път е установено, че **специфичните позиции във вторичните структури на 5S РНК** могат да бъдат използвани като допълнителни **маркери** за разграничаване на цианобактериални щамове на родово и надродово ниво.

### Научни приноси с потвърдителен характер

- Проведените изследвания потвърждават, че отделянето на род *Nodosilinea* и род *Wilmottia* от полифилетичните родове *Leptolyngbya* и *Phormidium* е коректно.
- Проведените филогенетични изследвания на база на *cpcB-IGS-cpcA* локуса на фикоцианиновия оперон и генния участък за 16S рРНК потвърждават принадлежността на вида *Leptolyngbya bijugata* (= *Phormidium bijugatum*) към новоотделения род *Nodosilinea* (*Nodosilinea bijugata*).
- Потвърдена е самостоятелността на вида *Phormidium papyraceum*, като се доказва, че в генетично отношение той се различава от *Wilmottia murrayi* въпреки морфологичното сходство на двата вида.

- Филогенетичните анализи потвърждават принадлежността на *Phormidesmis molle* PACC 8140 (= *Phormidium molle* PACC 8140) към род *Phormidium*.

### Научно-приложни приноси

- Направено е **практическо валидиране на OMEP и LRP като работещи молекулярно-генетични маркери**, които могат да се използват за филогенетични анализи и полифазна таксономия при цианобактерии.
- Предложено е **използването на специфични позиции във вторичните структури на 5S РНК** като допълнителни маркери за **разграничаване на цианобактериални щамове** на родово и надродово ниво.

### Списък на научните публикации, свързани с дисертацията

- Stoyanov P, **Moten D**, Mladenov R, Dzhambazov B, Teneva I. 2014. Phylogenetic relationships of some filamentous cyanoprokaryotic species. – *Evolutionary Bioinformatics*, 10: 39-49. (импакт фактор - 1.452)
- Moten D**, Basheva D, Mladenov R, Dzhambazov B, Teneva I. 2017. Utility of the 5S rRNA sequence and its secondary structure for phylogenetic analyses and recognition of cyanobacterial strains. – *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 70: in press. (импакт фактор за 2015 г. - 0.233)
- Moten D**, Batsalova T, Basheva D, Mladenov R, Dzhambazov B, Teneva I. 2017. Outer Membrane Efflux Protein (OMEP) is a suitable molecular marker for resolving the phylogeny and taxonomic status of closely related Cyanobacteria. – *Phycological Research* (accepted)

## ***Благодарности***

*На първо място изказвам най-искрени благодарности на научния си ръководител проф. д-р Балик Джамбазов за гласуваното ми доверие, предоставената възможност, вдъхновяващ пример и за непрекъснатата му подкрепа в професионалното ми развитие!*

*Сърдечно благодаря на доц. д-р Иванка Тенева-Джамбазова за оказаното съдействие при провеждането на част от експериментите.*

*Изказвам специални благодарности за професионалната подкрепа на гл. ас. д-р Цветелина Бацалова, както и на всички колеги от катедра Биология на развитието към Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“, които по един или друг начин съдействаха за реализацията на настоящата работа.*

*Запазвам края, за да благодаря на моето семейство, което винаги ме подкрепя във всичките ми начинания!*

***Посвещавам този труд на баща ми д-р Ахмед Мотен!***