

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

МОРФОЛОГИЯ, ЭКОЛОГИЯ И 18S рРНК-ФИЛОГЕНИЯ ЗЕЛЕННЫХ
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПОРЯДКА *PROTOSIPHONALES*
(*CHLOROPHYCEAE*, *CHLOROPHYTA*)

© 2017 г. А. Д. Темралеева^{а,*}, С. В. Москаленко^а, Ю. М. Бачура^б

^аИнститут физико-химических и биологических проблем почвоведения Российской академии наук, Пущино

^бГомельский государственный университет имени Франциска Скорины, Беларусь

*e-mail: temraleeva.anna@gmail.com

Поступила в редакцию 27.07.2016 г.

Рассматривается система зеленых микроводорослей порядка *Protosiphonales* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*), построенная на основе морфологических, экологических и молекулярно-генетических данных. Предлагается разделить порядок (=макрокладу *Stephanosphaerinia*) на четыре группы, три из которых могут соответствовать семействам *Stephanosphaeraceae*, *Chlorococcaceae*, *Protosiphonaceae* и одна имеет неопределенный статус. Обсуждаются диагностические признаки выделенных семейств, родов и видов, а также самостоятельность некоторых таксонов. Дополнены морфологические диагнозы ряда видов. На основании полифазного подхода выделен кандидат в новый род и вид — штамм ACSSI 23.

Ключевые слова: зеленые микроводоросли, морфология, экология, молекулярная филогения, полифазный подход

DOI: 10.7868/S00026365617020203

Молекулярная клада *Stephanosphaera* была выделена внутри класса *Chlorophyceae* (*Chlorophyta*) на основе анализа гена 18S рРНК (Pröschold et al., 2001; Nakada et al., 2008a) и в дальнейшем переименована в кладу *Stephanosphaerinia*, систематика и объем которой в последние годы неоднократно пересматривались (Watanabe et al., 2006; Nakada et al., 2008b; Nakada, Nozaki, 2009; Костиков и соавт., 2012; Buchheim et al., 2013; Skaloud et al., 2013; Kawasaki et al., 2015; Pegg et al., 2015). Данная группа, выделенная без учета морфологических признаков, в целом соответствует порядку *Protosiphonales* Ettl et Komárek sensu Kostikov, Romanenko, Demchenko, Darienko, Mihailuk, Rybchynsky et Solonenko, включая монадных представителей (Костиков та ін., 2001). Порядок объединяет зеленые микроводоросли с монадной, коккоидной, сарциноидной, нитчатой и сифональной организацией таллома, для которых характерно бесполое размножение двужгутиковыми изоконтными голыми либо одетыми в клеточные оболочки зооспорами. Монадные стадии с базальными телами, смещенными по часовой стрелке (1–7 или CW-ориентация). Система микротубулярных жгутиковых корней крестообразная и соответствует формуле 4–2–4–2. Многие водоросли, входящие в данный порядок, способны к гиперсинтезу липидов и вторичных каротиноидов.

Целью работы являлось исследование морфологии, экологии и 18S рРНК-филогении зеленых микроводорослей порядка *Protosiphonales* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) для понимания объема порядка, выделения диагностических признаков групп внутри него и их соотнесения традиционно принятым таксонам (семействам, родам, видам).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изоляция и культивирование штаммов водорослей. Объектами исследования стали шесть аутентичных штаммов зеленых микроводорослей порядка *Protosiphonales*, полученные из Коллекции культур водорослей Киевского национального университета им. Т. Шевченко (Algae Culture Collection of Kyiv University, ACKU) и депонированные нами в Альгологическую коллекцию Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН (ИФХиБПП) (Algal Collection of Soil Science Institute, ACSSI, <http://acssi.org/>): *Chlorococcum citrifforme* Archibald et Bold ACSSI 200, *C. diplobionticum* Herndon ACSSI 202, *C. isabeliense* Archibald et Bold ACSSI 251, *C. oleofaciens* Trainor et Bold ACSSI 208, *C. sphacosum* Archibald et Bold ACSSI 209, *Neospongiococcum gelatinosum* (Archibald et Bold) Ettl et Gärtner ACSSI 217. Кроме того, дополнительно были выделены два диких штамма почвенных зеленых водорослей, ACSSI 23 и ACSSI

Таблица 1. Праймеры и условия амплификации фрагмента гена 18S рРНК (Katana et al., 2001)

Праймер	Последовательность (5'–3')	Условия амплификации
18S F	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	95°C – 5 мин
18S R	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTACG	95°C – 1 мин } 25 циклов 55°C – 1 мин } 72°C – 1 мин } 72°C – 2 мин }

152, которые провизорно отнесены к изучаемой группе. Культивирование штаммов проводили на среде BG11 с азотом (1% агар, pH 7.0) в климатостате (температура 23–25°C, свет 60–75 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, фотопериод 12 ч).

Микроскопия. Изучение морфологии и жизненных циклов восьми перечисленных штаммов зеленых микроводорослей проводили методами световой микроскопии (светлое поле и интерференционный контраст) с помощью микроскопов Leica DM750 (“Leica microsystems”) и Carl Zeiss Axio Scope A1 (“Carl Zeiss Microscopy GmbH”, Германия) в ЦКП ИФХиБПП. Результаты наблюдений документировали рабочими рисунками и фотографиями, снятыми с помощью цветных цифровых камер “Видеозавр” (Россия) и Carl Zeiss MRc 5 (Германия). Для таксономической идентификации проводили несколько прижизненных цитохимических реакций: на крахмал – раствором Люголя; на общие очертания слизи – 1%-ным раствором туши; на структуру слизи – 0.1%-ным раствором метиленового синего. Сроки наблюдения за штаммами составляли от 12 ч до 12 мес. Для видовой идентификации зеленых микроводорослей использовали отечественные и зарубежные определители (Ettl, Gärtner, 1995; Андреева, 1998; The Freshwater..., 2011). Названия таксонов микроводорослей приведены согласно Международной электронной базе данных AlgaeBase (Guiry, Guiry, 2016).

Выделение, амплификация, очистка и секвенирование ДНК. ДНК выделяли из биомассы зеленых микроводорослей с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, США), следуя протоколу производителя. При амплификации использовали готовую смесь для ПЦР Screen Mix-HS (“Евроген”, Россия). Праймеры и условия для амплификации гена 18S рРНК указаны в табл. 1. Детекцию целевых ПЦР-продуктов проводили электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Для дальнейшей очистки ампликонов из геля применяли набор Cleanup Mini (“Евроген”, Россия). Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли на базе ЗАО “Синтол” (Россия).

Молекулярно-филогенетический анализ. Для молекулярно-филогенетического анализа была

составлена выборка последовательностей гена 18S рРНК штаммов зеленых микроводорослей, относящихся к порядку *Protosiphonales* (=макрокладе *Stephanosphaerina*), которая включала собственные данные и данные GenBank (табл. 2). Объем порядка был сформирован на основе предыдущих работ (Watanabe et al., 2006; Nakada et al., 2008b; Nakada, Nozaki, 2009; Костиков и соавт., 2012; Buchheim et al., 2013; Skaloud et al., 2013; Kawasaki et al., 2015; Pegg et al., 2015). В выборку вошли последовательности длиной не менее 1600 пар нуклеотидов (п.н.). Выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли в программе BioEdit по алгоритму ClustalW. Общая длина анализируемых последовательностей составила 1763 п.н. При наличии интронов в гене 18S рРНК они были удалены из выравнивания (последовательности HE860250, HE860249, HE687020). Для выбора модели нуклеотидных замен использовали программу jModelTest. Оптимальной стала модель GTR + I + G. Реконструкцию филогенетических взаимосвязей осуществляли методом максимального правдоподобия (ML) в программе PhyML. В качестве внешней группы выбрали представителя порядка *Sphaeropleales* – *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrová (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*). Статистическая поддержка топологии дерева была оценена с помощью бутстреп-анализа (1000 повторностей) и указана в узлах ветвей. Вычисление генетических дистанций проводили в программе MEGA 5.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология и экология зеленых микроводорослей порядка *Protosiphonales*. Данные о морфологии и экологии зеленых микроводорослей изучаемой группы были получены и проанализированы из ряда отечественных и зарубежных работ (Herdon, 1958; Pocock, 1960; Bold, MacEntee, 1974; Archibald, 1979; Lewin, 1984; Sluiman, Gärtner, 1990; Nozaki et al., 1995; Friedl, 1996; Андреева, 1998; Watanabe et al., 2006; Borowitzka, Siva, 2007; Kaštovský, 2008; Nakada, Nozaki, 2009; Костиков и соавт., 2012; Buchheim et al., 2013; Skaloud et al., 2013; Болдина и соавт., 2014; Holzinger et al., 2014; Kawasaki et al., 2015). Кроме того, проводились дополнительные наблюдения за морфологией и

Таблица 2. Список штаммов зеленых микроводорослей, использованных в филогенетическом анализе

Таксон	Коллекция, номер штамма	Номер последовательности в GenBank	Среда обитания, место изоляции
<i>Balticola buetschlii</i> (Blochmann) Droop	SAG 9.93	KC196720	Пресноводный, Ирландия
<i>Balticola capensis</i> (Pocock) Droop	UTEX 1023	KC196719	—
<i>Balticola droebakensis</i> (T) (Wollenweber) Droop	UTEX 55 = CCAP 34/2	KC196721	Пресноводный, Швеция
<i>Balticola zimbabwiensis</i> (Pocock) Droop	SAG 26.96 = UTEX 1758	U70797	Почва, Зимбабве
<i>Chlamydomonas applanata</i> Pringsheim	SAG 11-9* = CCAP 11/9; UTEX 225; ATCC 30455	FR865616	Почва, Чехия
<i>Chlamydomonas applanata</i> Pringsheim	CCAP 11/36F	FR865581	Пресноводный, США
<i>Chlamydomonas applanata</i> Pringsheim	CCAP 11/36E	FR865580	Пресноводный, США
<i>Chlamydomonas applanata</i> Pringsheim	CCAP 11/36B	FR865578	Пресноводный, США
<i>Chlamydomonas debaryana</i> Gorozhankin	SAG 11-1* = CCAP11/1; UTEX 231; NIES 2211	FR865523	Пруд, Чехия
<i>Chlamydomonium starrii</i> (Fott) Ettl et Gärtner	SAG 16.87* = CCAP 209/1A; UTEX 111	AB983625	Почвы, ЮАР
<i>Chlamydomonium vacuolatum</i> (Lee et Bold) Ettl et Komárek (= <i>Characium vacuolatum</i> Lee et Bold)	UTEX 2111*	M63001	Почва, Куба
<i>Chlorochytrium lemnae</i> Cohn (T) (= <i>Chlorosphaeropsis lemnae</i> Moewus)	CAUP H6902 = SAG 16.85	HE860249	Эндифит на <i>Lemna minor</i> , р. Червелл, Англия
<i>Chlorochytrium lemnae</i> Cohn (= <i>Chlorosphaeropsis lemnae</i> Moewus)	CAUP H6903* = UTEX LB 2283	HE860250	Эндифит на <i>Lemna</i> , р. Червелл, Англия
<i>Chlorochytrium hypanicus</i> Kostikov, Demchenko, Boyko et Gontcharov	ACKU 222*	HE687020	Из речной тины, Украина
<i>Chlorococcum aquaticum</i> Archibald	UTEX 2222*	AB983622	Озеро, Куба
<i>Chlorococcum citrifforme</i> Archibald et Bold	SAG 62.80* = UTEX 1769; ACKU 535; ACSSI 200	KM020100	Почва торфяников, США
<i>Chlorococcum diplobionticum</i> Herndon	SAG 32.95* = UTEX 950; ACKU 537; ACSSI 202	U70587	Почва кукурузного поля, Ямайка
<i>Chlorococcum ellipsoideum</i> Deason et Bold	UTEX 972*	U70586	Песчаная почва, США

Таблица 2. Продолжение

Таксон	Коллекция, номер штамма	Номер последовательности в GenBank	Среда обитания, место изоляции
<i>Chlorococcum isabeliense</i> Archibald et Bold	SAG 65.80* = UTEX 1774; ACKU 540; ACSSI 251	KM020106	Прибрежный песок, США
<i>Chlorococcum microstigmatum</i> Archibald et Bold	UTEX 1777*	AB983616	Торфяник, США
<i>Chlorococcum minutum</i> Starr	SAG 213-7* = CCAP 213/7; UTEX 117	KM020099	Почва, Индия
<i>Chlorococcum minutum</i> Starr (= <i>Chlorococcum sphacosum</i> Archibald et Bold)	ASIB T50	JN968585	Почва соснового леса, Италия
<i>Chlorococcum nivale</i> Archibald	UTEX 2225*	AB983623	Снег, Словакия
<i>Chlorococcum oleofaciens</i> Trainor et Bold	SAG 213-11* = UTEX 105; ACKU 542; ACSSI 208	AB983608	Почва с поля, США
<i>Chlorococcum robustum</i> Ettl et Gärtner (= <i>Chlamydomonium vacuolatum</i> (Lee et Bold) Ettl et Komárek)	Kr_86_30	AY122332	—
<i>Chlorococcum</i> sp.	SAG 11-52 = CCAP 11/52	FR865591	Снег, США
<i>Chlorococcum</i> sp.	SAG 11-52 = CCAP 11/52	AB983617	Снег, США
<i>Chlorococcum sphacosum</i> Archibald et Bold (= <i>Chlorococcum minutum</i> Starr)	SAG 66.80* = UTEX 1787; ACKU 673; ACSSI 209	JN968580	Почва сфагнового болота, США
<i>Chlorococcum vacuolatum</i> Starr	SAG 213-8* = CCAP 213/8; UTEX 110	KM020107	Почва, ЮАР
<i>Chlorogonium capillatum</i> Nozaki, Watanabe et Aizawa	SAG 12-2e = NIES 748	AJ410442	Пруд, Чехия
<i>Chlorogonium elongatum</i> (Dangeard) Francé	SAG 30.98	KM020108	Пресноводный, США
<i>Chlorogonium euchlorum</i> (Ehrenberg) Ehrenberg (T)	SAG 12-2d	AJ410443	Почва, ЮАР
<i>Chloromonas perforata</i> (Pascher et Jahoda) Gerloff et Ettl	SAG 11-43 = CCAP 11/43	U70794	Пруд, Финляндия
<i>Chlorosarcinopsis aggregata</i> Arce et Bold	UTEX B 779*	AB218695	Почва, Куба
<i>Chlorosarcinopsis bastropiensis</i> Groover et Bold	UTEX B 1698*	DQ009758	Почва, США
<i>Chlorosarcinopsis dissociata</i> Herndon	UTEX LB 948*	AB218702	Почва, Ямайка
<i>Chlorosarcinopsis minor</i> (Gerneck) Herndon (T)	UTEX LB 949*	AB049415	Почва, США
<i>Chlorosphaeropsis alveolata</i> Herndon	UTEX 1235*	AB218708	Почва кукурузного поля, Ямайка

Таблица 2. Продолжение

Таксон	Коллекция, номер штамма	Номер последовательности в GenBank	Среда обитания, место изоляции
<i>Deasonia granata</i> (Starr) Ettl et Komárek	ACSSI 152	—	Городская почва, Беларусь
<i>Deasonia granata</i> (Starr) Ettl et Komárek	SAG 213-1a* = CCAP 213/1A; UTEX 116	KM020105	Почва, Чехия
<i>Deasonia multinucleata</i> (Deason et Bold) Ettl et Komárek	SAG 25.95* = UTEX 2013	KM020098	Садовая почва, Япония
<i>Dunaliella polymorpha</i> Butcher	CCAP 19/7A	KJ756821	Солоноватые воды, Англия
<i>Dunaliella primolecta</i> Butcher	CCAP 11/34* = UTEX 1000; SAG 183.80	KJ756819	Морская, Англия
<i>Dunaliella quartolecta</i> Butcher	CCAP 19/8	KJ756824	Морская, Англия
<i>Dunaliella tertiolecta</i> Butcher	CCAP 19/6B*	KJ756820	Солоноватые воды, Норвегия
<i>Ettlia minuta</i> (Arce et Bold) Komárek (= <i>Chlorococcopsis minuta</i> (Arce et Bold) Watanabe et Floyd)	UTEX 776*	M62996	Пахотная почва под сахарным тростником, Куба
<i>Hamakko caudatus</i> Nakada (T)	NIES 2293*	AB451188	Пресноводный, почвенный, Япония
<i>Macrochloris radiosa</i> Ettl et Gärtner	SAG 213-2a* = CCAP 213/2A	KM020104	Почва, территория бывшей Чехословакии
<i>Macrochloris rubrioleum</i> Yuriko Kawasaki et Nakada	CCCryo 340b-08*	AB983624	Аэрофит, Шпицберген, Норвегия
<i>Macrochloris rubrioleum</i> Yuriko Kawasaki et Nakada	CCCryo 006-99	GU117582	Почва, Шпицберген, Норвегия
<i>Nautococcus solutus</i> Archibald	SAG 76.80* = CCAP 53/2; UTEX 1793	AB360749	Почва возле свинофермы, США
<i>Neosporangiococcum gelatinosum</i> (Archibald et Bold) Ettl et Gärtner	SAG 64.80* = UTEX 1773; ACKU 631; ACSSI 217	KM020103	Почва торфяного болота, США
<i>Neosporangiococcum</i> sp. (= <i>Chlorochytrium lemnae</i> Cohn)	CAUP H6904 = UTEX LB 2284	HE860251	Англия
<i>Neosporangiococcum</i> sp. (= <i>Chlorochytrium</i> sp.)	CAUP H6905 = CCAP 212/1; SAG 212-1	HE860252	Почва, Индия
<i>Pachycladella umbrina</i> (Smith) Silva (T)	SAG 10.85 = UTEX 2450	DQ009775	Пресноводный, Германия
<i>Pleurastrum insigne</i> Chodat (T)	SAG 30.93	Z28972	Насыпь возле ручья, Германия
<i>Protosiphon botryoides</i> (Kützinger) Klebs (T)	UTEX B 2969	JN880459	Почва кукурузного поля, США

Таблица 2. Окончание

Таксон	Коллекция, номер штамма	Номер последовательности в GenBank	Среда обитания, место изоляции
<i>Protosiphon botryoides</i> (Kützinger) Klebs	UTEX B 99	JN880460	Почва, США
<i>Protosiphon botryoides</i> (Kützinger) Klebs	UTEX B 47 = CCAP 731/1A; SAG 731-1a; ATCC 30414	JN880458	Почва, Чехия
<i>Protosiphon botryoides</i> f. <i>parieticola</i>	UTEX 46 = CCAP 731/3; SAG 731-3	JN880457	Почва, Индия
<i>Protosiphon</i> sp.	XLD-M-4	JN086489	Почва пустыни Такла-Макан, Китай
<i>Protosiphon</i> sp.	XLD-M-1	JN086487	Почва пустыни Такла-Макан, Китай
<i>Protosiphon</i> sp.	XLD-M-2	JN086488	Почва пустыни Такла-Макан, Китай
<i>Rhopalosolen saccatus</i> (Filarsky) Fott (= <i>Characium saccatum</i> Filarsky)	SAG 26.95* = UTEX 2159	KM020179	Пресноводный эпизоид на планктонных ракообразных
<i>Spongiochloris spongiosa</i> Starr (T)	SAG 280-2b* = UTEX 1; CCAP 3/1	U63107	Почва, Швейцария
<i>Spongiosarcinopsis terrestris</i> (T)	ACSSI 23*	—	Серая лесная почва, Россия
<i>Stephanosphaera pluvialis</i> Cohn (T)	UTEX 771	KC589697	—
<i>Stephanosphaera</i> sp.	UTEX LB 2409	AB360751	Почва, Китай
<i>Tetracystis tetraspora</i> (Arce et Bold) Brown et Bold	SAG 98.80* = UTEX 780	JN968582	Почва, Куба
<i>Bracteacoccus minor</i> (Chodat) Petrová (в качестве внешней группы)	SAG 221-1* = CCAP 221/1; UTEX 66	KF673367	Почва

Примечание. (T) — типовой вид, * — аутентичный штамм; прочерк означает отсутствие данных.

жизненными циклами аутентичных и диких штаммов, принадлежащих порядку *Protosiphonales*: *Chlorococcum citrifforme* ACSSI 200 (рис. 1а), *C. diplobionticum* ACSSI 202 (рис. 1б), *C. isabeliense* ACSSI 251 (рис. 1в), *C. oleofaciens* ACSSI 208 (рис. 1г), *C. sphacosum* ACSSI 209 (рис. 1д), *Deasonia granata* ACSSI 152 (Starr) Ettl et Komárek (рис. 1е), *Neospongiococcum gelatinosum* ACSSI 217 (рис. 1ж) и штамм ACSSI 23 (рис. 1з). Большинство штаммов соответствовали первоначальному описанию, однако для части были отмечены некоторые дополнения или расхождения с диагнозами. Так, по нашим наблюдениям, в 1-месячной культуре *C. diplobionticum* встречались не только

одиночные клетки, но и комплексы из 4-х и более клеток; *C. sphacosum* имел полый шаровидный хлоропласт с отверстием и сохранял зеленый цвет при длительном культивировании (3 мес.); хлоропласт *N. gelatinosum* в 3-х месячной культуре оставался пристенным полым шаровидным, а не губчатым, что типично для водорослей рода *Chlorococcum* Meneghini.

Для микроводорослей порядка *Protosiphonales* характерны следующие признаки:

1) монадный, коккоидный или сарциноидный тип морфологической организации таллома (нитчатый или сифональный типы редки, встре-

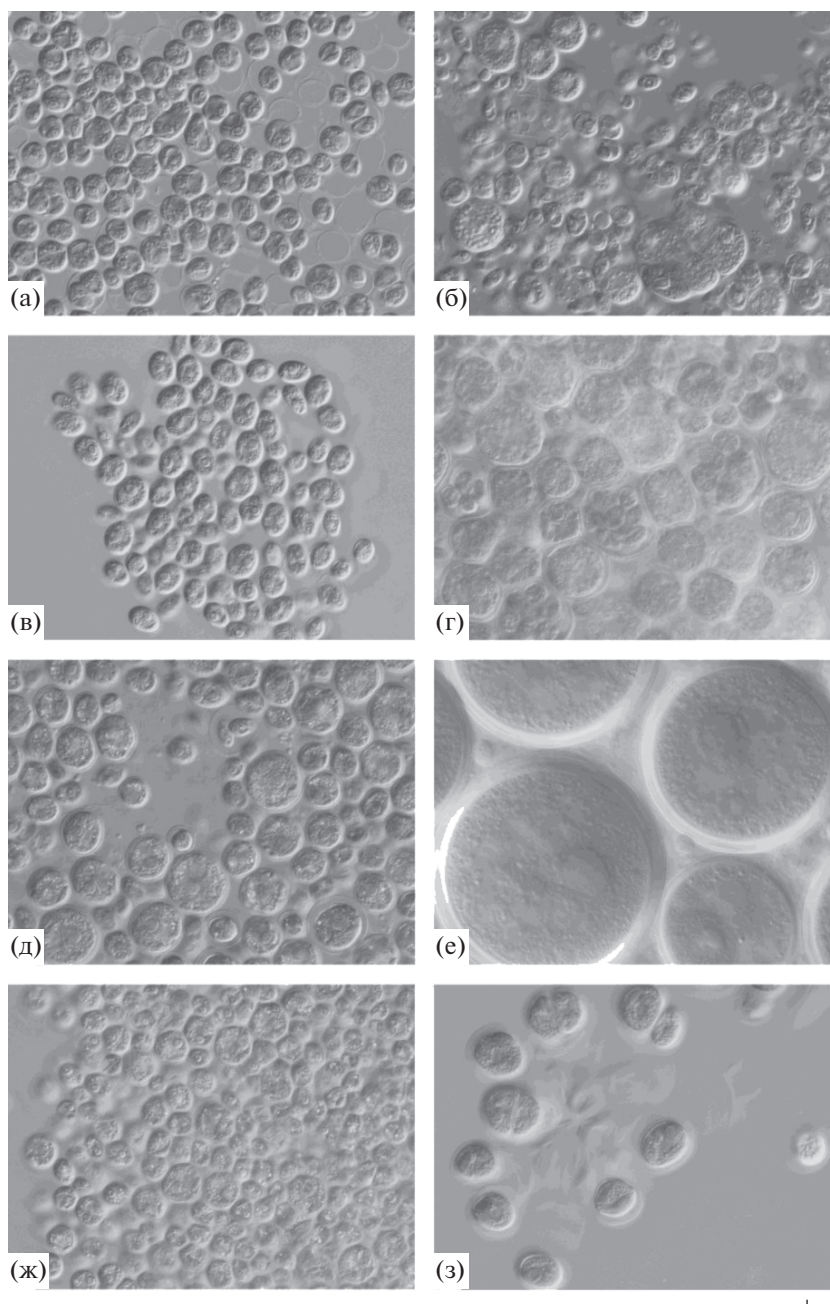


Рис. 1. Фотографии штаммов зеленых микроводорослей порядка *Protosiphonales*, дополнительно исследованные в работе: а – *Chlorococcum citrifforme* ACSSI 200 (=SAG 62.80*); б – *Chlorococcum diplobionticum* ACSSI 202 (=SAG 32.95*); в – *Chlorococcum isabeliense* ACSSI 251 (=SAG 65.80*); г – *Chlorococcum oleofaciens* ACSSI 208 (=SAG 213-11*); д – *Chlorococcum sphacosum* ACSSI 209 (=SAG 66.80*); е – *Deasonia granata* ACSSI 152; ж – *Neospongiococcum gelatinosum* ACSSI 217 (=SAG 64.80*); з – ACSSI 23*. Звездочкой отмечены аутентичные штаммы. Шкала 10 мкм.

чаются только у родов *Pleurastrum* Chodat и *Protosiphon* Klebs соответственно);

2) бесполое размножение двужгутиковыми изоконтными зооспорами, которые могут быть либо голыми, либо одетыми в клеточные оболочки;

3) способность к гиперсинтезу липидов и вторичных каротиноидов;

4) свободноживущий образ жизни в наземных и водных экосистемах в виде одиночных форм (колониальный образ жизни характерен только для представителей рода *Stephanosphaera* Cohn, эндофитный – для *Chlorochytrium* Cohn).

На основе анализа морфологических признаков таксонов, вошедших в кладу *Stephanosphaerina*, можно заключить, что группа соответствует

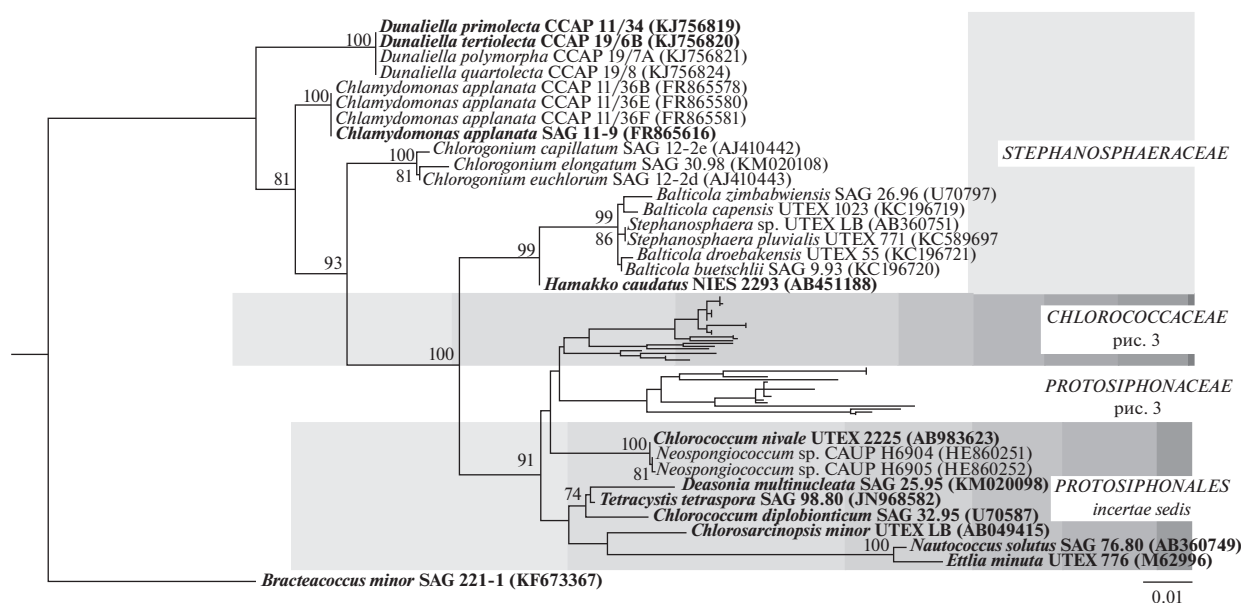


Рис. 2. Укорененное филогенетическое дерево зеленых микроводорослей порядка *Protosiphonales*, построенное методом максимального правдоподобия (ML), на основе последовательностей гена 18S рРНК (1763 п.н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны бутстреп-значения ML; значения <70% не показаны. Модель нуклеотидных замен: GTR + I + G. Жирным шрифтом выделены аутентичные штаммы.

предложенному ранее порядку *Protosiphonales* (Костиков та ин., 2001) и включает, в основном, почвенные зеленые микроводоросли родов *Chlorococcum*, *Macrochloris* Korshikov, *Deasonia* Ettl et Komárek, *Chlamydomonium* Ettl et Komárek, *Chlorochytrium*, *Protosiphon*, *Chlorosphaeropsis* Vischer, *Sporiochloris* Starr, *Chlorosarcinopsis* Herndon, *Neosporioccum* Deason, *Pleurastrum*, штамм ACSSI 23. Исключение составляют пресноводные и морские водоросли с монадным типом морфологической организации таллома родов *Dunaliella* Teodoresco, *Chlamydomonas* Ehrenberg, *Chlorogonium* Ehrenberg, *Balticola* Droop, *Stephanosphaera* и *Hamakko* Nakada.

Система порядка *Protosiphonales*. Трудности построения системы зеленых микроводорослей порядка *Protosiphonales* связаны с тем, что в генетических базах данных не представлены нуклеотидные последовательности гена 18S рРНК — главного молекулярно-филогенетического маркера номенклатурных типов родов, например, *Macrochloris dissecta* Korshikov, *Deasonia prolifera* (Deason) Ettl et Komárek, *Chlamydomonium pluricoccum* (Korshikov) Ettl et Komárek, *Nautococcus pyriformis* Korshikov. Кроме того, возникают сложности в ситуации, когда, некоторые виды рода не кластеризуются с остальными его представителями (т.е. имеет место полифилия), как в случае родов *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Chlorogonium*, *Chlorococcum*, *Chlorosarcinopsis*, *Ettlia* Komárek, *Neosporioccum*, *Deasonia*, *Tetracystis* Brown et Bold и *Pleurastrum*. На филогенетическом дереве макроклады *Stepha-*

nosphaerina можно выделить четыре группы, три из которых могут соответствовать семействам и одна имеет неопределенный статус (рис. 2). Статистические поддержки групп составляют от 71 до 100%. Ниже мы предлагаем расширенную систему макроклады в понимании Костикова и соавт. (2012) с нашими дополнениями. Все приведенные ниже морфологические, физиологические и экологические признаки относятся к штаммам, нуклеотидные последовательности которых были использованы для реконструкции 18S рРНК-филогении. Сравнительная характеристика первых трех групп приведена в табл. 3.

Группа 1 — семейство *Stephanosphaeraceae* (рис. 2), в которое входят:

- зеленые микроводоросли рода *Dunaliella* секция *Tertiolectae* Massyuk (1972), представители которой являются морскими и эстуарными видами с оптимальной соленостью 2–4% NaCl; клетки радиально симметричные с чашевидными хлоропластами, стигма одна, цвет всегда зеленый (Borowitzka, Siva, 2007): *Dunaliella polymorpha* Butcher, *D. primolecta* Butcher, *D. quartolecta* Butcher и *D. tertiolecta* Butcher;

- *Chlamydomonas applanata* Pringsheim, в том числе аутентичный штамм SAG 11-9;

- водоросли веретеновидной формы *Chlorogonium capillatum* Nozaki, Watanabe et Aizawa, *C. elongatum* (Dangeard) Francé и типовой вид *C. euchlorum* (Ehrenberg) Ehrenberg;

Таблица 3. Сравнительная характеристика зеленых микроводорослей семейств *Stephanosphaeraceae*, *Chlorococcaceae*, *Protosiphonaceae*

Признак	<i>Stephanosphaeraceae</i>	<i>Chlorococcaceae</i>	<i>Protosiphonaceae</i>
Тип организации таллома	Монадный	Преимущественно коккоидный	Коккоидный, сарциноидный, сифональный
Тип хлоропласта	Пристенный	Пристенный и центральный	
Количество ядер	1	1 или много	
Количество пиреноидов	Обычно 1–2, редко до 4–6 и более	1	1 или несколько
Зооспоры	С оболочкой, неметаболические		Без оболочки, метаболические
Экология	Свободноживущие пресноводные и морские виды	Свободноживущие почвенные виды	Свободноживущие и эндофитные пресноводные и почвенные виды

– *Balticola buetschlii* (Blochmann) Droop, *B. capensis* (Pocock) Droop, типовой вид *B. droebakensis* (Wollenweber) Droop и *B. zimbabwiensis* (Pocock) Droop;

– колониальные водоросли *Stephanosphaera* sp. и типовой вид *Stephanosphaera pluvialis* Cohn;

– водоросль веретеновидной формы *Hamakko caudatus* Nakada (типовой вид).

Все члены группы отличаются монадным типом организации таллома и обитанием в морских или пресных водах. Ядро одно, пиреноид обычно 1 или 2, но может быть до 4–6 и более. Межвидовые различия нуклеотидных последовательностей составляют от 0 до 0.6%, межродовые – от 1 до 1.8%.

На наш взгляд определение данной группы как семейства *Haematococcaceae* (Guiry, Guiry, 2016) является неудачным, так как род *Haematococcus* Flotow был признан полифилетичным, и типовой вид *Haematococcus pluvialis* Flotow вошел в кладу *Chlorogonia*, а не *Stephanosphaeria* (Buchheim et al., 2013).

Группа 2 – семейство *Chlorococcaceae* (рис. 3), в которое входят:

– водоросли полифилетичного рода *Chlorococcum* (*C. robustum* Ettl et Gärtner, *C. microstigmatum* Archibald et Bold, *C. citrifforme*, *C. oleofaciens*, *C. sphacosum*, *C. vacuolatum* Starr, *C. isabeliense*, *C. minutum* Starr, *C. ellipsoideum* Deason et Bold и *C. aquaticum* Archibald) за исключением номенклатурного типа – *C. infusionum* (Schrank) Meneghini;

– многоядерные водоросли *Macrochloris radiosa* Ettl et Gärtner и *M. rubrioleum* Kawasaki et Nakada, в том числе их аутентичные штаммы;

– аутентичный штамм *Deasonia granata*, который не имеет различий в гене 18S рРНК с *M. ra-*

diosa и, по-видимому, может быть переименован в *M. granata*;

– аутентичные штаммы *Chlamydomodium starrii* (Fott) Ettl et Gärtner и *C. vacuolatum* (Lee et Bold) Ettl et Komárek;

– аутентичный штамм *Rhopalosolen saccatus* (Filarsky) Fott, различия в гене 18S рРНК которого от *Chlamydomodium starrii* составляют 0.1%, что может свидетельствовать о принадлежности к одному виду;

– *Neospongiococcum gelatinosum*, уровень различий в гене 18S рРНК которого не превышает 0.1% при сравнении с *C. robustum*, *C. microstigmatum*, *C. citrifforme*, *C. oleofaciens* и *C. sphacosum*;

– неаутентичные штаммы нитчатой водоросли *Pleurastrum insigne* Chodat и монадной водоросли *Chloromonas perforata* (Pascher et Jahoda) Gerloff et Ettl, которые следует дополнительно валидировать для уточнения правильности таксономической идентификации;

– аутентичный штамм *Chlamydomonas debaryana* Gorozhankin.

Все члены данной группы характеризуются преимущественно коккоидной организацией таллома, одним пристенным или центральным хлоропластом, одним или многими ядрами. Пиреноид один со сплошной крахмальной оберткой. Зооспоры с оболочкой, неметаболические, после остановки не округляются. Оболочка клеток способна утолщаться с возрастом культуры, приобретать концентрическую слоистость, у некоторых видов образует слизистую ножку. В основном почвенные обитатели, способные к гиперсинтезу липидов и вторичных каротиноидов. Межвидовые различия нуклеотидных последовательностей составляют от 0 до 0.4%, межродовые – от 0.7 до 3.0%.

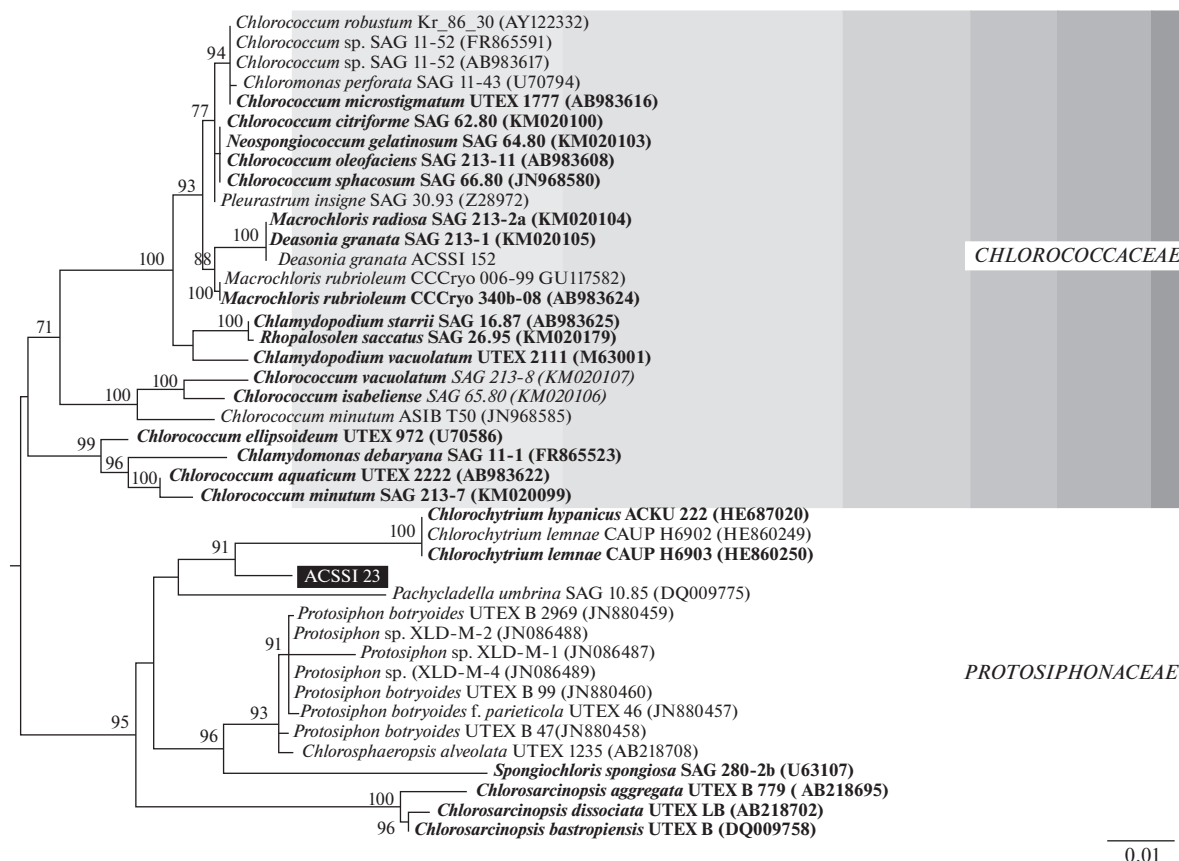


Рис. 3. Фрагмент укорененного филогенетического дерева зеленых микроводорослей семейств *Chlorococcaceae* и *Protosiphonaceae*, построенного методом максимального правдоподобия (ML), на основе последовательностей гена 18S рРНК (1763 п.н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны бутстреп-значения ML; значения <70% не показаны. Модель нуклеотидных замен: GTR + I + G. Жирным шрифтом выделены аутентичные штаммы.

По нашему мнению определение данной группы как семейства *Chlorococcaceae* (в данной работе) или *Neosporogiococcaceae* (Костиков и соавт., 2012) является временным, так как типовые виды *C. infusionum* и *N. alabamense* (Deason) Deason не вошли в состав группы. Следовательно, группы морфовидов *Chlorococcum* и *N. gelatinosum* должны быть отнесены к нескольким новым родам и переименованы.

Группа 3 – семейство *Protosiphonaceae* (рис. 3), в которое входят:

– почвенные зеленые водоросли с сифональной (*Protosiphon botryoides* (Kützinger) Klebs), сарциноидной (*Chlorosphaeropsis alveolata* Herndon) и коккоидной (*Spongiocloris spongiosa* (Vischer) Starr) организацией таллома, центральными хлоропластом и многочисленными ядрами;

– водные сарциноидные водоросли *Chlorochytrium lemnae* Cohn и *C. hypanicus* Kostikov, Demchenko, Boyko et Gontcharov, ведущие эндофитный и свободноживущий образ жизни соответственно;

– почвенный штамм ACSI 23;

– почвенные сарциноидные водоросли *Chlorosarcinopsis aggregata* Arce et Bold, *C. dissociata* Herndon, *C. bastropiensis* Groover et Bold;

– редкая водная водоросль *Pachycladella umbrina* (Smith) Silva, имеющая шипы на поверхности клеточной оболочки.

Основной отличительной чертой зеленых водорослей, принадлежащих группе 3, является наличие голых зооспор. Пиреноиды от одного до нескольких с крахмальной оберткой, которая способна к фрагментации в зрелых клетках. Внутри группы водоросли отличаются по типу морфологической организации таллома, типу хлоропласта, количеству ядер, свободноживущим или эндофитным образом жизни, обитанием в почвах или пресных водах. Большая часть представителей семейства способна к гиперсинтезу вторичных каротиноидов, окрашивающих старые культуры в оранжевый цвет. Межвидовые различия нуклеотидных последовательностей составляют от 0 до 1.1%, межродовые – от 2.1 до 4.3%.

Группа 4 — *Protosiphonales incertae sedis* (рис. 2), в которую входят:

- номенклатурный тип рода *Chlorosarcinopsis* — *C. minor* (Gerneck) Herndon;
- зеленые водоросли с губчатым хлоропластом рода *Neosporangiococcum*;
- многоядерные виды *Deasonia multinucleata* (Deason et Bold) Ettl et Komárek и *Chlorococcum nivale* Archibald;
- сарциноидная водоросль с массивным хлоропластом *Tetracystis tetrastroma* (Arce et Bold) Brown et Bold;
- коккоидная водоросль *Chlorococcum diplobionticum*;
- коккоидные водоросли с массивным хлоропластом *Nautococcus solutus* Archibald и *Ettlia minuta* (Arce et Bold) Komárek.

Данную группу образуют водоросли с различными морфологическими признаками. Общей чертой может являться размножение зооспорами с тонкой оболочкой и преимущественно почвенный образ жизни. Пиреноид один с крахмальной оберткой из нескольких отдельных скорлупок, которые могут лежать отдельно или плотно смыкаться друг с другом. Старые культуры, как правило, сохраняют зеленый цвет. Межвидовые различия нуклеотидных последовательностей составляют от 0 до 0.8%, а межродовые от 1.0 до 4.1%.

Поскольку номенклатурные типы родов *Dunaliella* (*D. salina* (Dunal) Teodoresco), *Chlamydomonas* (*C. reinhardtii* Dangeard), *Chlorosarcinopsis* (*C. minor*), *Chlorococcum* (*C. infusionum*), *Ettlia* (*E. carotinsa* Komárek), *Neosporangiococcum* (*N. alabamense*) и *Tetracystis* (*T. aerea* Brown et Bold) не входят в упомянутые выше группы видов, то, по видимому, последние могут быть выделены в отдельные самостоятельные роды.

Кандидат в новый род и вид — штамм ACSSI 23. Согласно полифазному подходу свидетельствовать о реальности существования таксона, входящего в кладу *Stephanosphaerina* (порядок *Protosiphonales*), и его самостоятельности могут следующие характеристики:

1) уникальное филогенетическое положение и генетические различия от 0 до 0.4–1.1% для разных видов и от 0.7–1 до 1.8–4.3% для разных родов по данным 18S рРНК-анализа;

2) наличие отличных от ближайших родственников морфологических признаков, например, для разграничений на уровне рода — тип морфологической организации таллома, тип хлоропласта, количество ядер, на уровне вида — размеры вегетативных клеток и зооспор;

3) собственная экологическая ниша и образ жизни.

При изучении альгофлоры серой лесной почвы Московской области (Россия) нами была обнаружена и изолирована сарциноидная зеленая водоросль, которая по некоторым морфологическим признакам была близка к родам *Chlorosphaeropsis*, *Chlorochytrium*, *Chlorosarcinopsis sensu lato*, но не идентична ни одному из них (рис. 1з). Данный штамм отличался от ближайшего родственника, рода *Chlorochytrium*, наличием губчатого хлоропласта и почвенным местообитанием. Молекулярно-генетический анализ на основе гена 18S рРНК подтвердил таксономическую самостоятельность ACSSI 23: формирование отдельной филогенетической линии, генетические различия с сестринской кладой *Chlorochytrium* — 2.1% и отсутствие в гене 18S рРНК интрона. На основе экологии и наблюдений за морфологией и жизненным циклом штамма, а также молекулярно-филогенетического анализа, штамм ACSSI 23 может быть определен как новый род *Sporiosarcinopsis* с типовым видом *S. terrestris*. Валидное описание исследуемого штамма на основе подробных данных о его морфологии, ультраструктуре, а также мультигенного анализа готовится к публикации.

Таким образом, на основании комплекса морфологических, экологических и ультраструктурных характеристик, а также по данным 18S рРНК-анализа предлагается разделить макрокладу *Stephanosphaerina*, таксономически принятую как порядок *Protosiphonales*, на четыре группы. Три из них могут соответствовать семействам *Stephanosphaeraceae*, *Chlorococcaceae*, *Protosiphonaceae*, и одна имеет неопределенный статус (*Protosiphonales incertae sedis*) и требует дальнейших исследований.

В настоящее время малый объем выборки таксонов зеленых микроводорослей, принадлежащих порядку *Protosiphonales*, отсутствие депонированных нуклеотидных последовательностей номенклатурных типов родов и аутентичных штаммов в генетических базах данных создают сложности в построении надежной системы порядка. Следует учесть, что топология филогенетического дерева может существенно меняться по мере описания новых видов и родов водорослей класса *Chlorophyceae*.

Главный молекулярно-филогенетический маркер для эукариотических организмов — ядерный ген 18S рРНК — достаточно консервативен и надежно разграничивает таксоны на уровне классов, порядков, семейств и родов. Но не всегда позволяет успешно разделять виды порядка *Protosiphonales*, что подтверждается и другими работами по систематике и филогении зеленых водорослей (Fawley et al., 2006). Следовательно, для установления видовых границ внутри родов требуется привлечение более вариабельных молекулярных маркеров, например, пластидных генов *rbcL*, *tufA*,

второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2), а также других морфологических, физиологических, экологических признаков.

На основе экологии, наблюдений за морфологией и жизненным циклом штамма ACSS1 23, а также молекулярно-филогенетического анализа, он был определен как кандидат в новый род и вид порядка *Protosiphonales*.

Авторы благодарят зав. кафедрой ботаники Учебно-научного центра “Институт биологии” Киевского национального университета им. Т. Шевченко, д.б.н., проф. И.Ю. Костикова за предоставление аутентичных штаммов зеленых микроводорослей и ценные консультации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-54-04002 бел_мол_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). СПб., 1998. 351 с.
- Болдина О.Н., Уланова А.А., Чунаев А.С. *Stephanosphaera pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) — редкий пресноводный вид северо-запада России // Новости сист. низш. раст. 2014. Т. 48. С. 27–37.
- Костіков І.Ю., Романенко П.О., Демченко Е.М., Дарієнко Т.М., Михайлюк Т.І., Рибчинський О.В., Солоненко А.М. Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, конспект флори). Київ, 2001. 300 с.
- Костиков И.Ю., Демченко Э.Н., Бойко В.Р., Гончаров А.А. *Chlorochytrium hyranicus* sp. nov. (Chlorophyceae) и его место в системе Protosiphonales // Альгология. 2012. Т. 22. № 3. С. 227–251.
- Archibald P. Descriptions of new edaphic and aquatic species of *Chlorococcum* Meneghini (Chlorococcales) // Br. Phycol. J. 1979. V. 14. P. 305–312.
- Bold H.C., MacEntee F.J. Phycological notes. III. Two new saccate unicellular chlorophyceae // J. Phycol. 1974. V. 10. P. 189–193.
- Borowitzka M.J., Siva C.J. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species // J. Appl. Phycol. 2007. V. 19. P. 567–590.
- Buchheim M.A., Sutherland D.M., Buchheim J.A., Wolf M. The blood alga: phylogeny of *Haematococcus* (Chlorophyceae) inferred from ribosomal RNA gene sequence data // Eur. J. Phycol. 2013. V. 48. P. 318–329.
- Ettl H., Gärtner G. Syllabus der boden-, luft- und flechtenalgen. 2 auflage. Stuttgart, 1995. 718 p.
- Fawley M.W., Dean M.L., Dimmer S.K., Fawley K.P. Evaluating the morphospecies concept in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta) // J. Phycol. 2006. V. 42. P. 142–154.
- Friedl T. Evolution of the polyphyletic genus *Pleurastrum* (Chlorophyta): inferences from nuclear-encoded ribosomal DNA sequences and motile cell ultrastructure // Phycol. 1996. V. 35. P. 456–469.
- Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 2016. <http://www.algaebase.org>
- Herndon W. Studies on chlorosphaeracean algae from soil // Amer. J. Bot. 1958. V. 45. P. 298–308.
- Holzinger A., Dablander A., Gärtner G. Investigating of cell morphology and reproduction in *Macrochloris radiosa* Ettl & Gärtner (Stephanosphaerina, Chlorophyta) by light- and transmission electron microscopy // Algol. Stud. 2014. V. 144. P. 95–104.
- Kaštovský J. A report of *Stephanosphaera pluvialis* Cohn 1852 (Chlorophyta, Chlamydomyceae) // Fottea. 2008. V. 8. P. 109–110.
- Katana A., Kwiatowski J., Spalik K., Zakryś B., Szalacha E., Szymańska H. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA // J. Phycol. 2001. V. 37. P. 443–451.
- Kawasaki Y., Nakada T., Tomita M. Taxonomic revision of oil-producing green algae, *Chlorococcum oleofaciens* (Volvocales, Chlorophyceae) and its relatives // J. Phycol. 2015. V. 51. P. 1000–1016.
- Lewin R.A. Culture and taxonomic status of *Chlorochytrium lemnae*, a green algal endophyte // Brit. Phycol. J. 1984. V. 19. P. 107–116.
- Nakada T., Nozaki H., Pröschold T. Molecular phylogeny, ultrastructure, and taxonomic revision of *Chlorogonium* (Chlorophyta): emendation of *Chlorogonium* and description of *Gungnir* gen. nov. and *Rusalka* gen. nov. // J. Phycol. 2008a. V. 44. P. 751–760.
- Nakada T., Misawa K., Nozaki H. Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses // Mol. Phylog. Evol. 2008b. V. 48. P. 281–291.
- Nakada T., Nozaki H. Taxonomic study of two new genera of fusiform green flagellates, *Tabris* gen. nov. and *Hamakko* gen. nov. (Volvocales, Chlorophyceae) // J. Phycol. 2009. V. 45. P. 482–492.
- Nozaki H., Watanabe M.M., Aizawa K. Morphology and paedogamous sexual reproduction in *Chlorogonium capillatum* sp. nov. (Volvocales, Chlorophyta) // J. Phycol. 1995. V. 31. P. 655–663.
- Pegg C., Wolf M., Alanagreh L.A., Portman R., Buchheim M.A. Morphological diversity masks phylogenetic similarity of *Ettlia* and *Haematococcus* (Chlorophyceae) // Phycol. 2015. V. 54. P. 385–397.
- Pocock M.A. *Haematococcus* in southern Africa // Trans. Royal Soc. South Africa. 1960. V. 36. P. 5–55.
- Pröschold T., Marin B., Schlösser U.W., Melkonian M. Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas Ehrenberg* and *Chloromonas Gobi*, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. // Protist. 2001. V. 152. P. 265–300.

Skaloud P., Kalina T., Nemjová K., De Clerck O., Leliaert F. Morphology and phylogenetic position of the freshwater green microalgae *Chlorochytrium* (Chlorophyceae) and *Scotinosphaera* (Skotinosphaerales, ord. nov., Ulvophyceae) // J. Phycol. 2013. V. 49. P. 115–129.

Sluiman H.J., Gärtner G. Taxonomic studies on the genus *Pleurastrum* (Pleurastrales, Chlorophyta). 1. The type species, *P. insigne*, rediscovered and isolated from soil // Phycol. 1990. V. 29. P. 133–138.

The Freshwater Algal Flora of the British Isles: An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae. New York, 2011. 878 p.

Watanabe S., Mitsui K., Nakayama T., Inouye I. Phylogenetic relationships and taxonomy of sarcinoid green algae: *Chlorosarcinopsis*, *Desmotetra*, *Sarcinochlamys* gen. nov., *Neochlorosarcina*, and *Chlorosphaeropsis* (Chlorophyceae, Chlorophyta) // J. Phycol. 2006. V. 42. P. 679–695.

Morphology, Ecology, and 18S rRNA Phylogeny of the Green Microalgal Order *Protosiphonales* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*)

A. D. Temraleeva^{1,*}, S. V. Moskalenko¹, and Yu. M. Bachura²

¹*Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

²*Francysk Skaryna Gomel State University, Gomel, Belarus*

*e-mail: temraleeva.anna@gmail.com

Received July 27, 2016

Abstract—The system of the green microalgal order *Protosiphonales* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) constructed based on morphological, ecological, and molecular genetic data is considered. Subdivision of the order (=macroclade *Stephanosphaerinia*) into four groups is proposed, with three probably corresponding to the families *Stephanosphaeraceae*, *Chlorococcaceae*, and *Protosiphonaceae* and the fourth having an indefinite status. The diagnostic characteristics of the families, genera, and species are discussed, as well as the independent rank of some taxa. Morphological descriptions of a number of species are supplemented. Based on polyphasic approach, strain ACSSI 23 is proposed as a candidate for a new genus and species.

Keywords: green microalgae, morphology, ecology, molecular phylogeny, polyphasic approach