

УДК 582.251.62

**МІСЦЕ В СИСТЕМІ CHLOROPHYTA ОДНОКЛІТИННОЇ  
АВТОСПОРОУТВОРЮЮЧОЇ ВОДОРОСТІ  
*PSEUDOSPONGIOCOCCUM PROTOCOCCOIDES***

**Е. Челебієва<sup>1\*</sup>, С. Скрєбовська<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Інститут біології південних морів імені О.О. Ковалевського НАН України  
пр. Нахімова, 2, Севастополь 99011, Україна  
e-mail: elina.chelebieva@gmail.com

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
ННЦ «Інститут біології»  
пр. Глушкова, 2, Київ 03022, Україна  
e-mail: Skribovskaya@ukr.net

Уперше встановлено місце автентичного штаму *Pseudospongiococcum protococcoides* (CALU-221) в системі Chlorophyta на основі аналізу нуклеотидної послідовності 18S rDNA. Показано, що *P. protococcoides* належить до родини Scenedesmaeaceae та входить у молекулярну кладу «Coelastrella».

*Ключові слова:* зелені водорості, таксономія, молекулярна філогенія, кетокаротиноїди.

Зелена одноклітинна мікроскопічна водорість *Pseudospongiococcum protococcoides* Gromov & Mamkaeva була вперше виділена Борисом Васильовичем Громовим у 1962 р. з ґрунтової проби, відібраної поблизу міста Севастополь. Культура за своєю морфологією була подібна до представників роду *Neospongiococcum* Deason, однак клітини *Neospongiococcum* характеризуються утворенням рухомих зооспор [7], яких не спостерігали Б. В. Громов і К. А. Мамкаєва у *P. protococcoides* за різних умов культивування. Водорість відрізнялася і від видів роду *Pseudochlorococcum* Archibald, що також не утворюють зооспор, будовою хлоропласта [4, 11]. У 1974 р. на підставі результатів морфологічних і ультраструктурних досліджень Б. В. Громов і К. А. Мамкаєва запропонували виділити новий рід *Pseudospongiococcum*, номенклатурним типом якого є *Pseudospongiococcum protococcoides* Gromov & Mamkaeva [11].

Кілька десятиліть штам *P. protococcoides* зберігався в колекції водоростей Біологічного інституту Санкт-Петербурзького університету (CALU-221) на агаризованих середовищах і характеризувався вираженою здатністю до накопичення вторинних каротиноїдів (почервоніння старіючих культур). У 2006 р. штам був переданий до Інституту біології південних морів імені О.О. Ковалевського НАН України для проведення експериментальних досліджень із проблеми вторинного каротиногенезу у зелених мікроводоростей різної екологічної спеціалізації й таксономічної приналежності. За результатами попередніх досліджень *P. protococcoides* характеризується високою стійкістю до стрес-впливів, що індукують ВКРГ, і високим відносним вмістом цінних кетокаротиноїдів [3]. Важливою умовою для продовження досліджень даного виду є уточнення його систематичного положення. Приводом для проведення такої роботи стала відсутність *P. protococcoides* у інших світових альгологічних колекціях водоростей і присвячених йому публікацій, за винятком кількох робіт [1, 11].

Отже, з'ясування систематичного положення *Pseudosporoglossum protococcoides* у системі зелених водоростей і визначило мету нашої роботи.

#### Матеріал та методи

Матеріалом досліджень був штам *P. protococcoides* (CALU-221), який вирощували на 2% агаризованому та рідкому середовищах 3N BBM [5] при освітленості 2 клк і температурі 18–20°C.

Ідентифікацію морфологічним методом проводили на основі оптичної мікроскопії культур, вік яких становив 2 тижні, 2 місяці і більше, 6 місяців і більше та 12 місяців. Спостереження проводили на оптичному мікроскопі серії Primo Star (Carl Zeiss, Німеччина). Мікрофотографії виконували на цьому ж мікроскопі за допомогою цифрової камери (DCM 520), з'єднаної з ПК. Усі спостереження проводили з обов'язковим використанням імерсійних об'єктивів (100<sup>x</sup>).

Для з'ясування місця в системі зелених водоростей була використана нуклеотидна послідовність ядерного гена 18S rDNA. Тотальну ДНК виділяли у відповідності до протоколу ізоляції ДНК із рослин (DNA Microprep Isolation from Plants, (<http://www.scienceboard.net>)). Ампліфікацію послідовності 18S rDNA проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), з використанням пари універсальних евкаріотичних праймерів для 18S rDNA: прямого праймера (1-F) та оберненого – (1528-R).

Об'єм ампліфікаційної суміші становив 50  $\mu$ l. Ампліфікацію проводили в термочеклері Techne TC 412. Встановлювали такий температурний профіль реакції: 94°C – 3 хв, (94°C – 45 с, 54°C – 1 хв, 72°C – 3 хв) – 30 циклів, 72°C – 5 хв, 4°C –  $\infty$ . [13]. Амплікони, отримані в результаті ПЛР, візуалізували методом горизонтального електрофорезу в 1% агарозному гелі в TBE буфері [6].

Секвенування ампліфікованих послідовностей здійснювали з прямими (1-F), (528-F), (1055-F) та оберненими праймерами (1055-R), (536-R), (1528-R) в лабораторії Masrogen Inc. (Нідерланди) (табл.1).

Таблиця 1

Послідовності праймерів, використаних для ампліфікації та секвенування	
Назва праймера	Послідовність
1-F	5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3'
1528-R	5'-CTTCTGCAGGTTACCTAC-3'
528-F	5'-GCGGTAATCCAGCTCCAA-3'
1055-R	5'-ACGGCCATGCACCACCACCA-3'
1055-F	5'-GGTGGTGCATGGCCGTCTT-3'
536-R	5'-AATTACCGCKGCTGGCA-3'

Редагування та складання консенсусної послідовності проводили шляхом візуального зіставлення прямого та зворотного хроматограф-сиквенсів за допомогою програм Chromas (version 1.45). Складання матриці та її вирівнювання здійснювали за допомогою редактора BioEdit та програми CLUSTAL W v 1.75 [12]. Отримана послідовність гена 18S rDNA штаму CALU-221 загальною довжиною 1729 п.н., підготовлена до депонування в базу даних у GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Філогенетичні дерева будували за методом максимальної правдоподібності (Maximal Likelihood, ML), методом найближчих сусідів (Neighborhood – Joining, NJ) та методом максимальної парсимонії (Maximum Parsimony, MP) у філогенетичній програмі PHYLIP 3.69 [9]. Статистичну підтримку філогенетичних дерев у NJ та MP аналізах оцінювали методом бутстрепа, використовуючи 100 бутстреп-реплік [9,10]. Послідовність 18S rDNA штаму CALU-221 була додана до матриці послідовностей 18S rDNA вибірки зелених водо-

ростей, депонованих у NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), схожість яких за результатами BLAST-пошуку, з використанням алгоритму megablast становила 99%. Всього матриця складалася зі 17 послідовностей видів зелених водоростей. Зовнішню групу представляли послідовності *Hydrodictyon reticulatum* (Linnaeus) Bory de Saint-Vincent та *Chlamydomonas applanata* Pringsheim. Повний перелік таксонів, включених до матриці вирівнювання, представлений у табл. 2.

Таблиця 2

## Перелік таксонів, включених у матрицю вирівнювання

Таксон (синонім в NCBI*)	Код доступу в NCBI
<i>Graesiella emersonii</i> (Shihira & Krauss) Nozaki ( <i>Chlorella emersonii</i> Shihira & Krauss)	FR865687.1
<i>Graesiella vacuolata</i> (Shihira & Krauss) Kalina & Puncochárová	FR865685.1
<i>Scenedesmus vacuolatus</i> Shihira & Krauss	X56104.1
<i>Chlorella emersonii</i> Shihira & Krauss	FR865661.1
<i>Asterarcys quadricellulare</i> (Behre) Hegewald & Schmidt	AF388375.1
<i>Coelastrum saipanensis</i> Hanagata	AB055800.1
<i>Ettlia texensis</i> (Archibald) Komárek	GU292343.1
<i>Coelastrum morus</i> West & West	AF388374.1
<i>Scenedesmus costatus</i> Schmidle	AB037090.1
<i>Scenedesmus pectinatus</i> Meyen	FR865730.1
<i>Pectinodesmus pectinatus</i> (Meyen) Hegewald, Wolf, Keller, Friedl & Krienitz	AB037092.1
<i>Scenedesmus pectinatus</i> Meyen	FR865723.1
<i>Scenedesmus obliquus</i> (Turpin) Kützing ( <i>Acutodesmus obliquus</i> (Turpin) Hegewald & Hanagata)	FR865738.1
<i>Scenedesmus regularis</i> Svirenko	FR865732.1
<i>Chlamydomonas applanata</i> Pringsheim	FR865570.1
<i>Hydrodictyon reticulatum</i> (Linnaeus) Bory de Saint-Vincent	AY779858.1

**Примітка.** \* В дужках наведена назва таксону, під якою послідовність депонована в NCBI у разі розбіжностей назв.

## Результати і їхнє обговорення

**Морфологічний аналіз** штаму CALU-221 показав, що морфотип останнього відповідає першоопису *P. protococcoides*, наведеному Б. В. Громовим і К. А. Мамкаєвою у 1974 р. На агаризованому середовищі 3N BBM клітини утворюють темно-зелені щільно упаковані колонії. Старіючі культури мають помаранчевий колір, унаслідок накопичення вторинних каротиноїдів (рис. 1).

При культивуванні на рідкому середовищі 3N BBM без повітряної продувки культура водорості схильна до агрегації, але при перемішуванні знову стає гомогенною. Молоді клітини еліпсоїдні, з віком набувають сферичної форми. Клітинна оболонка товста, з подвійним контуром. Хлоропласт губчастий або сітчастий (залежно від розмірів і віку клітини). Більшість клітин мають один, рідше два піреноїди, добре помітні у світловому мікроскопі. Розмноження відбувається за допомогою автоспор, які утворюються по 2 або 4. Мінімальний діапазон довжини молодих еліпсоїдних клітин становив 6–8 мкм, ширини – 4–6 мкм, максимальний – 10–12 та 6–8 мкм відповідно. Діаметр автоспор 12–19 мкм (рис. 1).

**Молекулярно-філогенетичний аналіз.** Пошук в GenBank послідовностей, подібних до отриманої нами послідовності 18S rDNA, проведений з використанням megablast алгоритму, показав, що сиквенс *P. protococcoides* (CALU-221) на 100% не збігається з жодним секвенованим видом зелених водоростей, представленим у базі даних NCBI. Проте

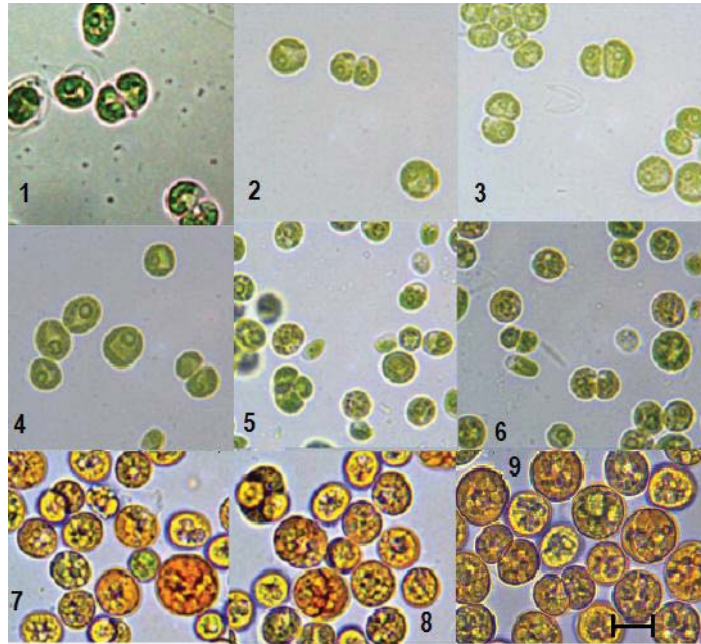


Рис. 1. *P. protococcoides* (штам CALU-221) на рідкому (фото 1-6) й агаризованому (фото 7-9) середовищах 3NBVM: 1-4 – вегетативні клітини, вік 2 тижні; 5-6 – вегетативні клітини, двоспорові спорангії та порожні оболонки материнських клітин після звільнення апланоспор, вік 2 місяці; 7-9 – апланоспори, вік 12 місяців. Шкала 10 мкм.

46 послідовностей були схожі зі штамом CALU-221 на 99–99,99%. Водорості, яким належать ці послідовності, представляють різні молекулярні клади родини Scenedesmaceae. Найвищою є схожість з видами роду *Graesiella* Kalina & Puncochárová та *Scenedesmus* Meyen. На першому місці (99,90%) є схожість зі штамом “CCAP 211/8P”, наведеним як *Graesiella emersonii* (Shihira & Krauss) Nozaki (код доступу FR865687.1), синонім *Chlorella emersonii* Shihira & Krauss. На другому місці (99,80%) розташовуються види: *G. vacuolata* (Shihira & Krauss) Kalina & Puncocharova (штам “CCAP 211/8C”, код доступу FR865685.1), *C. emersonii* Shihira & Krauss (штам “CCAP 211/15”, код доступу FR865661.1), *C. emersonii* Shihira & Krauss (штам “CCAP 211/11M”, код доступу FR865657.1).

Були побудовані філогенетичні дерева NJ, MP та ML методами для матриці, що складалася з 15 послідовностей, зовнішньої групи та включала сиквенс штаму *P. protococcoides* (CALU-221). На всіх варіантах філогенетичних дерев штам CALU-221 потрапляв у надкладу, що відповідає родині Scenedesmaceae, а в її межах – у кладу «Coelastrella». Ця клада об'єднала такі секвенсовані за 18S rDNA операційні таксономічні одиниці (ОТО) як *Graesiella emersonii*, *G. vacuolata*, а також *Scenedesmus vacuolatus*, *Asterarcys quadricellulare* та *C. emersonii* (рис. 2). Ці види за топологією добре узгоджувалися з тими, що наводяться в літературі для родини Scenedesmaceae у її сучасній інтерпретації [2, 8]. Таким чином, штам *P. protococcoides* (CALU-221) виявився представником клади «Coelastrella», спорідненим зі секвенсованими за 18S rDNA видами роду *Graesiella* та з деякими видами родів *Scenedesmus* та *Asterarcys*.

Отже, результати, отримані при молекулярно-філогенетичному аналізі, показали, що генотип *P. protococcoides* є унікальним та не є ідентичним до жодного зі секвенсованих

видів зелених водоростей, та вказали на положення штаму у межах родини Scenedesmaceae, класи «Coelastrella».

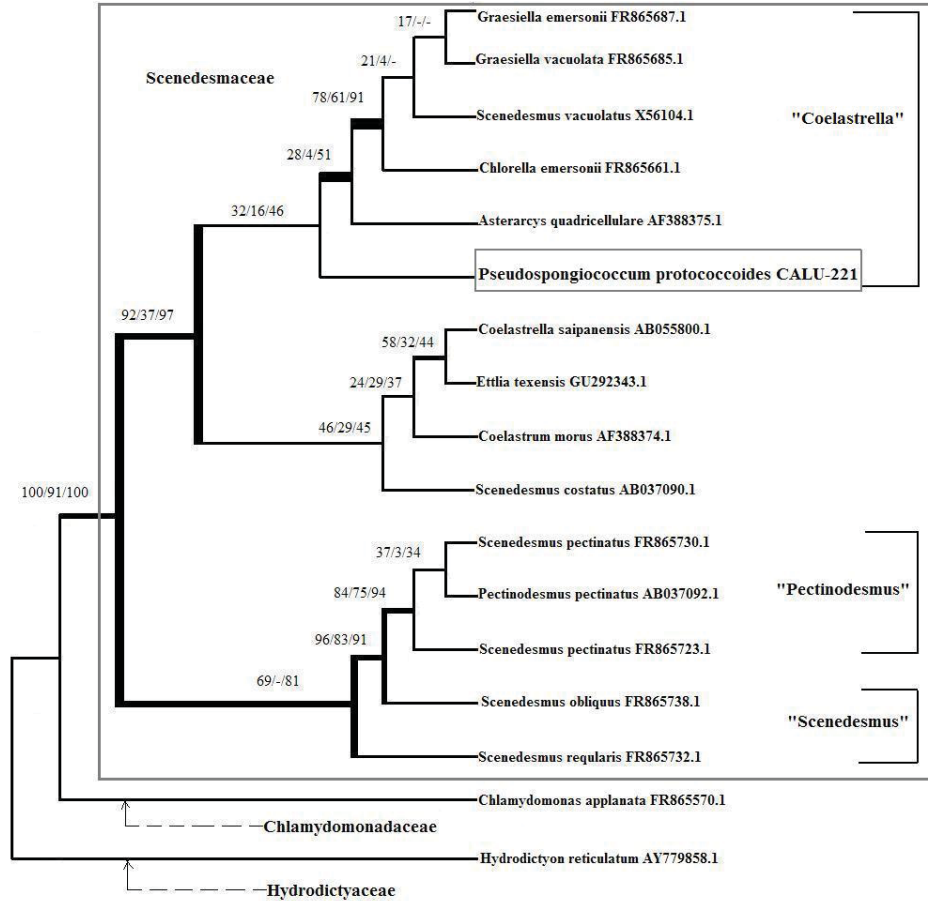


Рис. 2. Місце *Pseudospongiococcum protococcoides* (CALU-221) в системі Scenedesmaceae за результатами аналізу послідовностей 18S rDNA (філогенетичне дерево, що побудоване за методом максимальної правдоподібності; на гілках - значення бутстрепа для ML/MP/NJ дерев. Гілки, які хоча б за одним методом мають підтримку, вищу за 50%, виділені товстими лініями).

Автори щиро вдячні директорів музею культур мікроорганізмів Біологічного НДІ СПБДУ д.б.н., проф. О. В. Піневичу за надання штаму CALU-221, а також завідувачеві кафедри ботаніки Київського національного університету імені Тараса Шевченка д.б.н., проф. І.Ю. Костікову за поради та рекомендації при підготовці даної статті.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Громов Б. В., Титова Н. Н. Коллекция культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института Ленинградского университета (CALU). «Коллекции микроводорослей в СССР (список культур)». АН СССР, Пушино, 1988. С. 52–91.
2. Скребовська С. В., Костіков І. Ю. *Scotiellopsis levicostata* (Chlorophyta) в системі Scenedesmaceae // Чорноморський ботан. журнал. 2012. Т. 8. № 4. 2012. С. 401–412.

3. Чубчикова И. Н., Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Данцюк Н. В. Хлорококковые микроводоросли как потенциальный источник природных кетокаротиноидов // Экология моря. 2009. № 77. С. 77–83.
4. Archibald P. A. Pseudochlorococcum, a new Chlorococcalean genus // Phycologia. 1970. Vol. 6. N 2. P. 127–132.
5. Bishoff H. W., Bold H. C. Phycological Studies. IV. Some algae from enchanted rock and related algae species // Univ. Texas Publ. 1963. N 6318. P. 1–95.
6. Brody J. R., Kern S. E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis // Anal Biochem. 2004. N 333(1). P. 1–13.
7. Deason T. R., Cox E. R. The genera Spongiococcum and Neospongiococcum. II. Species of Neospongiococcum with liable wals // Phycologia. 1971. Vol. 10 (2/3). P. 255–262.
8. Eliás M., Nemcova Y., Skaloud P. et al. Hylodesmus singaporensis gen. et sp. nov., a new autosporic subaerial green alga (Scenedesmaceae, Chlorophyta) from Singapore // International J. Systematic and Evolutionary Microbiol. 2010. Vol. 60. P. 1–12.
9. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach // Mol Evol. 1981. Vol. 17. P. 368–376.
10. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. Vol. 39. P. 783–791.
11. Gromov B. M., Mamkaeva K. A. Morphology and ultrastructure of some chlorococcae algae from the collection of algae strain in Leningrad University // Arch. Hydrobiol. Suppl. 46. Algol. stud. 1974. Vol. 10. P. 1–9.
12. Thompson J., Higgins D., Gibson T. Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Research. 1994. Vol. 22. P. 4673–4680.
13. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications / Eds Innis M.A., Geifand D.H., Snisky J.J., White T.J. San Diego (CA). 1990. P. 315–322.

Стаття: надійшла до редакції 26.02.13

прийнята до друку 17.05.13

**UNICELLULAR SPORE-FORMING ALGA  
PSEUDOSPONGIOCOCCUM PROTOCOCCOIDES POSITION DETECTION  
IN THE SYSTEM CHLOROPHYTA**

**E. Chelebieva<sup>1</sup>, S. Skrebovskaya<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Biology of the Southern Seas behalf of Sciences of the NAS of  
Ukraine*

*2, Nakhimov Ave., Sevastopol 99011, Ukraine  
e-mail: elina.chelebieva@gmail.com*

<sup>2</sup>*Taras Shevchenko National University of Kyiv  
ESC "Institute of Biology"*

*2, Acad. Glushkov Ave., Kyiv 03022, Ukraine  
e-mail: Skrebovskaya@ukr.net*

For first time the place of authentic strain *Pseudospongiococcum protococcoides* (CALU-221) was determined on the basis of nucleic sequence analysis 18S rDNA. It has

been shown that *P. protococcoides* attributes to Scenedesmaceae family and is a part of molecular clade «Coelastrella».

*Keywords:* green algae, taxonomy, molecular phylogeny, ketokarotinoids.

**МЕСТО В СИСТЕМЕ CHLOROPHYTA ОДНОКЛЕТОЧНОЙ  
СПОРООБРАЗУЮЩЕЙ ВОДРОСЛИ  
*PSEUDOSPONGIOCOCCUM PROTOCCOIDES***

**Э. Челебиева<sup>1</sup>, С. Скребовская<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского НАН Украины  
пр. Нахимова, 2, Севастополь 99011, Украина  
e-mail: elina.chelebieva@gmail.com*

<sup>2</sup>*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, УНЦ  
«Институт биологии», пр. Акад. Глушкова, 2, Киев 03022, Украина  
e-mail: Skribovskaya@ukr.net*

Впервые установлено место аутентичного штамма *Pseudospongiococcum protococcoides* (CALU-221) в системе Chlorophyta на основе анализа нуклеотидной последовательности 18S rDNA. Показано, что *P. protococcoides* относится к семейству Scenedesmaceae и входит в молекулярную кладу «Coelastrella».

*Ключевые слова:* зеленые водоросли, таксономия, молекулярная филогения, кетокаротиноиды.