

***Scotiellopsis levicostata* (Chlorophyta) в системі Scenedesmaceae**

СВІТЛАНА ВІКТОРІВНА СКРЕБОВСЬКА
ІГОР ЮРІЄВИЧ КОСТИКОВ

СКРЕБОВСЬКА С.В., КОСТИКОВ І.Ю., 2012: ***Scotiellopsis levicostata* (Chlorophyta) в системі Scenedesmaceae**. *Чорноморськ. бот. ж.*, Т.8., № 4: 401-412.

Наведено результати морфологічних та молекулярно-генетичних досліджень зеленої водорості *Scotiellopsis levicostata* (Scenedesmaceae, Chlorophyceae), знайденої на території України та введеної в колекцію культур Київського національного університету імені Тараса Шевченка (штам АСКУ 928-10). За частковою нуклеотидною послідовністю ядерного гену 18S rDNA встановлено положення *Scotiellopsis levicostata* в межах клади «Coelastrella». Таксономічний статус виду та його філогенетичні відношення всередині клади «Coelastrella» обговорюються.

Ключові слова: зелені водорості, таксономія, молекулярна філогенія, Chlorophyta, *Scotiellopsis levicostata*

СКРЕБОВСКА S.V., KOSTIKOV I.YU., 2012: ***Scotiellopsis levicostata* (Chlorophyta) in the Scenedesmaceae**. *Chornomors'k. bot. z.*, Vol. 8, №4: 401-412.

The results of morphological and molecular genetic studies of green algae *Scotiellopsis levicostata* (Scenedesmaceae, Chlorophyceae), found on the territory of Ukraine and put into a collection of cultures of Kyiv National Taras Shevchenko University (strain АСКU 928-10) have been represented. For partial nucleotide sequences of nuclear 18S rDNA gene set the position *Scotiellopsis levicostata* within clade «Coelastrella» was set. Taxonomic status of the species and its phylogenetic relationships within the clade «Coelastrella» are discussed.

Keywords: green algae, taxonomy, Chlorophyta, *Scotiellopsis levicostata*

СКРЕБОВСКАЯ С.В., КОСТИКОВ И.Ю., 2012: ***Scotiellopsis levicostata* (Chlorophyta) в системе Scenedesmaceae**. *Черноморск. бот. ж.*, Т. 8., № 4: 401-412.

Приведены результаты морфологических и молекулярно-генетических исследований зеленой водоросли *Scotiellopsis levicostata* (Scenedesmaceae, Chlorophyceae), найденной на территории Украины и введенной в коллекцию культур Киевского национального университета имени Тараса Шевченка, (штамм АСКУ 928-10). По частичной нуклеотидной последовательности ядерного гена 18S rDNA установлено положение *Scotiellopsis levicostata* в пределах клады «Coelastrella». Таксономический статус вида и его филогенетические отношения внутри клады «Coelastrella» обсуждаются.

Ключевые слова: зеленые водоросли, таксономия, молекулярная филогенія, Chlorophyta, *Scotiellopsis levicostata*

Зелена водорість, наразі відома як *Scotiellopsis levicostata*, вперше була знайдена М.М. Голлербахом в 1936 році в накопичувальних культурах водоростей із ґрунтів околиць міст Луги, Слуцьк та Тіхвін Ленінградської області і описана даним автором як *Scotiella levicostata* Hollerbach [ГОЛЛЕРБАХ, 1936]. Під цією назвою вид був включений О.А. Коршиковим у Визначник прісноводних водоростей Української СРСР і розміщений у підродині Chlorelloideae родини Oocystaceae порядку Protococcales [КОРШИКОВ, 1953].

В 1976 році Б. Фотт при перегляді таксономічного статусу роду *Scotiella* Fritsch в зв'язку з закриттям типового виду даного роду – *S. antarctica* Fritsch – запропонував виділити автоспороутворюючі *Scotiella*-подібні водорості з добре розвинутими ребрами в самостійний рід *Scotiello cystis* Fott. Описаний М.М. Голлербахом вид був запропонований в якості номенклатурного типу даного роду як *Scotiello cystis levicostata* (Hollerbach) Fott [FOTT, 1976]. До роду *Scotiello cystis* Б. Фотт відніс ще два види – *Scotiello cystis oocystiformis* (Lund) Fott та *Scotiello cystis terrestris* (Reisigl) Fott, описані раніше як *Scotiella oocystiformis* Lund та *Scotiella terrestris* Reisigl, відповідно [LUND, 1957; REISIGL, 1964]. У цій же статі Б. Фотт, на основі наявності ребер на клітинній оболонці, відмежував рід *Scotiello cystis* від описаного за рік до того морфологічно подібного роду *Scotiello psis* Vinatzer, у якого вид, що представляє номенклатурний тип роду – *Scotiello psis rubescens* Vinatzer – згідно спостереженням його автора, мав гладеньку оболонку, позбавлену ребер [VINATZER, 1975].

При повторному вивченні оригінального штаму Г. Вінатзера чеськими альгологами у *Scotiello psis rubescens* на клітинній оболонці були знайдені тонкі меридіональні ребра, що чітко були помітні як в електронний, так і в оптичний мікроскоп (в останньому випадку – після фарбування клітин нігрозином) [PUNČOCHÁROVÁ, KALINA, 1981]. На основі цих даних М. Пунчохарова та Т. Калина закрили рід *Scotiello cystis* та включили всі раніше запропоновані в його складі види в рід *Scotiello psis*. Крім того, до цього роду був віднесений ще один новий вид – *Scotiello psis reticulata* Punčochárová et Kalina, що має 3-4 тонкі ребра з анастомозами в вигляді сітки [PUNČOCHÁROVÁ, KALINA, 1981].

Отже, в рід *Scotiello psis* увійшли 5 видів – *Scotiello psis rubescens*, *Scotiello psis levicostata*, *Scotiello psis oocystiformis* (Lund) Punčochárová et Kalina, *Scotiello psis terrestris* (Reisigl) Punčochárová et Kalina та *Scotiello psis reticulata*. У такому об'ємі *Scotiello psis* був представлений у визначниках Х. Еттла, Г. Гертнера та ВМ. Андреевої, присвячених наземним водоростям [ETTL, GÄRTNER, 1995; АНДРЕЕВА, 1998]. Наразі у світових публічних колекціях культур водоростей рід *Scotiello psis* представлений штамми всіх видів, за винятком *S. levicostata*. При цьому збереглися автентичні штами, що представляють як номенклатурний тип роду – *Scotiello psis rubescens* (штам ASIB V 195), так і два його види – *Scotiello psis oocystiformis* (SAG 277-1 – автентичний штам Г.Е. Фогга), *Scotiello psis reticulata* (CCALA 474 – автентичний штам Ф. Гіндака HINDAK 1967/40). Ще один вид – *Scotiello psis terrestris* – представлений як мінімум п'ятьма не автентичними штамми, з яких три на морфологічному рівні вивчали М. Пунчохарова та Т. Калина, штамми (HINDAK 1963/59, HINDAK 1963/58, HINDAK 1981/9).

Наприкінці XX ст. у двох видів *Scotiello psis* (*Scotiello psis oocystiformis* та *Scotiello psis terrestris*) була секвенована послідовність ядерного гену, який кодує малу субодиницю рибосомальної РНК (18S rDNA), і результати секвенування були використані при перших розробках молекулярно-філогенетичної системи Scenedesmus-подібних водоростей [HANAGATA, 1998]. На основі висновків про філогенетичну близькість цих видів різним представникам роду *Scenedesmus* Meyen, Н. Ханата запропонував розглядати *Scotiello psis oocystiformis* та *Scotiello psis terrestris* в системі роду *Scenedesmus* як *Scenedesmus oocystiformis* (Lund) Hanagata та *Scenedesmus TERRESTRIS* (Reisigl) Hanagata [HANAGATA, 1998; HANAGATA, 2001].

При наступній обробці Scenedesmus-подібних водоростей за результатами аналізу послідовностей 18S rDNA було встановлено істотну схожість *Scenedesmus oocystiformis* та *Scenedesmus terrestris* з деякими видами роду *Coelastrella* Chodat, в склад якого ці два види були включені як *Coelastrella oocystiformis* (Lund) Hegewald & Hanagata та *Coelastrella terrestris* (Reisigl) Hegewald & Hanagata [HEGEWALD, HANAGATA, 2000].

Пізнiшi фiлогенетичнi реконструкцiї, здiйсненi на основi аналізу послiдовностей кластеру ядерних рибосомальних генiв, пiдтвердили, з одного боку, положення *Coelastrella oocystiformis* та *Coelastrella terrestris* в межах уособленої стiйкої клади, до якої увiйшли й деякi iншi види роду *Coelastrella* (*Coelastrella corcontica*, *C. multistriata*, *C. saipanensis*, *C. vacuolata*), а також *Coelastrum morus* West & West, *Scenedesmus costatus* Schmidle та *Asterarcys quadricellulare* (Behre) Hegewald & Schmidt. Для цiєї клади була запропонована назва «*Coelastrella*» [ELIAS et al., 2010]. З iншого боку, обидва секвенованi види, якi ранiше розглядались в системi роду *Scotiellopsis* (*Coelastrella oocystiformis* та *C. terrestris*), утворили уособлену субкладу в межах клади «*Coelastrella*» [ELIAS et al., 2010; HEGEWALD, 2010].

На жаль, об'єм та статус субклади, в яку увiйшли два вивчених на молекулярно-фiлогенетичному рiвнi види колишнiх *Scotiellopsis* (*S. oocystiformis* та *S. terrestris*), залишився нез'ясованим, оскiльки три iншi види даного роду – *Scotiellopsis rubescens*, *Scotiellopsis levicostata*, *Scotiellopsis reticulata* (включаючи номенклатурний тип роду – *Scotiellopsis rubescens*), молекулярно-фiлогенетичними методами не вивчались. Крім того, правомiрнiсть вiднесення *S. oocystiformis* та *S. terrestris* до роду *Coelastrella* залишилась дискусiйною, оскiльки номенклатурний тип даного роду – *Coelastrella striolata* Chodat – молекулярно-фiлогенетичними методами не досліджувався, i його мiсце у системi зелених водоростей, так само, як i номенклатурних типiв родiв *Scotiellopsis* (*S. rubescens*) та *Scotiellopsis* (*S. levicostata*), чиї нетиповi види утворюють кладу «*Coelastrella*», залишається не визначеним. Таким чином, статус та номенклатура всiєї клади «*Coelastrella*» наразi залежить вiд з'ясування мiсця у системi сценедесмальних водоростей трьох видiв, якi представляють номенклатурнi типи трьох родiв – *Coelastrella*, *Scotiellopsis* та *Scotiellopsis*.

При дослідженнi водоростей наземних бiотопiв Українського Причорномор'я нами був знайдений та видiлений в культуру один з видiв, що входить до перелiку можливих номенклатурних типiв клади «*Coelastrella*», а саме *Scotiellopsis levicostata* (Hollerbach) Punčochárová et Kalina (basionym: *Scotiella levicostata* Hollerbach; synonym: *Scotiellopsis levicostata* (Hollerbach) Fott). Ця культура наразi є єдиним депонованим у свiтових колекцiях штамом *Scotiellopsis levicostata*. З'ясування питання щодо самостiйностi цього виду та його фiлогенетичних вiдношень з iншими сценедесмальними водоростями (в першу чергу, з клади «*Coelastrella*»), становило мету нашої роботи.

Матерiал та методи дослідження

Матерiалом досліджень був штам АСКУ 928-10 iз колекцiї культур Киiвського національного унiверситету iменi Тараса Шевченка, iдентифiкований як *Scotiellopsis levicostata*. Даний штам був iзольований iз проби слабкозасоленого ґрунту, зiбраної 01.05.2010 р. на так званому «Орхiдному полi» – пам'ятки природи на територiї рiгiонального ландшафтного парку «Кiнбурнська коса», де об'єктом охорони є лучний фiтоценоз з абсолютним домiнуванням занесеного до Червоної книги України виду орхiдей - *Orchis picta* Loisel. Ця пам'ятка природи розташована в окол. с. Покровка Очакiвського р-ну Миколаiвської обл. України (N 46°28'15.1", E 31°40'28.4").

Штам АСКУ 928-10 вирощували на 1,5% агаризованому середовищах «К» [KUHNL, LORENZEN, 1964] та 3N BBM [BISHOFF, BOLD, 1963] на освiтлювальнiй установцi при iнтенсивностi освiтлення 2.100-3.000 люкс з 12-годинним чергуванням свiтлової i темної фаз та температурою 16-18° С.

Iдентифiкацiю морфологiчним методом проводили на основi оптичної мiкроскопiї культур, вiк яких становив 2 тижнi (рання логарифмiчна фаза росту), 2 мiсяцi i бiльше (пiзня логарифмiчна фаза росту), 3 та 6 мiсяцiв (стацiонарна фаза) та 12 мiсяцiв (фаза вiдмирання). Спостереження проводили на оптичному мiкроскопi серiї Primo Star (Carl Zeiss, Нiмеччина) та на мiкроскопi Olympus BX60 (Tokyo, Japan) (останнiй оснащений диференцiйно-iнтерференцiйною контрастуючою оптичною

системою Nomarski DIC). Мікрофотографії виконували на цих же мікроскопах за допомогою цифрових камер, з'єднаних з ПК. Всі спостереження проводили з обов'язковим використанням імерсійних об'єктивів 100x.

Таблиця 1

Перелік таксонів, включених в матрицю вирівнювання

Table 1

List of taxa included in the alignment matrix

Таксон (синонім в NCBI*)	Код доступу в NCBI
Scotiellopsis levicostata (Gollerbach [Hollerbach]) Puncocharova & Kalina	JX960572 **
Scotiellopsis terrestris (Reisigl) Puncocharova & Kalina (Coelastrella terrestris (Reisigl) Hegewald & Hanagata)	AB012847.1
Coelastrella oocystiformis (Lund) Hegewald & Hanagata (Scotiellopsis oocystiformis (Lund) Fott, Scotiellopsis oocystiformis, (Lund) Fott, Scenedesmus oocystiformis (Lund) Hanagata)	AB012848.2
Coelastrella multistriata var. corcontica Kalina & Puncochárová	AB037082.1
Coelastrella multistriata (Trenkwalder) Kalina & Puncochárová (Coelastrella striolata var. multistriata (Trenkwalder) Kalina & Puncochárová)	AB012846.1
Coelastrum morus West & West (Coelastrum verrucosum (Reinsch) Reinsch)	AF388374.1
Coelastrella saipanensis Hanagata	AB055800.1
Scenedesmus costatus Schmidle (Enallax costatus (Schmidle) Pascher)	AB037090.1
Asterarcys quadricellulare (Behre) Hegewald & Schmidt (Asterarcys cubensis Comas Gonzales)	AF388375
Asterarcys quadricellulare (Behre) Hegewald & Schmidt (Asterarcys cubensis Comas Gonzales)	JQ043183.1
Ettlia texensis (Archibald) Komárek	GU292343.1
Scenedesmus regularis Svirenko (Pectinodesmus regularis (Svirenko) Hegewald, Wolf, Keller, Friedl & Krienitz)	AB037095.1
Scenedesmus regularis Svirenko (Pectinodesmus regularis (Svirenko) Hegewald, Wolf, Keller, Friedl & Krienitz)	FR865732.1
Graesiella emersonii (Shihira & Krauss) Nozaki (Chlorella emersonii Shihira & Krauss)	FR865687.1
Graesiella vacuolata (Shihira & Krauss) Kalina & Puncochárová (Chlorella emersonii var. globosa Shihira & Kraus)	FR865685.1
Tetradesmus wisconsinensis Smith (Scenedesmus wisconsinensis (Smith) Chodat)	AB037097.1
Scenedesmus obtusus Meyen	AB037091.1
Coelastropsis costata (Korshikov) Fott & Kalina (Coelastrum costatum Korshikov)	AB037083.1
Pectinodesmus pectinatus (Meyen) Hegewald, Wolf, Keller, Friedl & Krienitz (Scenedesmus pectinatus Meyen)	AB037092.1
Acutodesmus obliquus (Turpin) Hegewald & Hanagata (Scenedesmus obliquus (Turpin) Kützing)	FR865731.1
Westella botryoides (West) De Wildeman (Tetracoccus botryoides West)	
Enallax acutiformis (Schröder) Hindák (Scenedesmus acutiformis Schröder)	AB037089.1
Keratococcus dissociatus (Verses & Trainor) Ettl & Gärtner (Dactylococcus dissociatus Verses & Trainor)	AB037084.1
Coelastrum sphaericum Nägeli	AF388376.1
Neodesmus danubialis Hindák	AB037086.1
Desmodesmus costato-granulatus (Skuja) Hegewald (Scenedesmus costato-granulatus Skuja)	X91265.1
Scenedesmus obliquus (Turpin) Kützing (Acutodesmus obliquus (Turpin) Hegewald & Hanagata)	AJ249515.1
Scenedesmus producto-capitatus Schmula	X91266.1
Scenedesmus ovalternus Chodat	X81966.1
Hydrodictyon reticulatum (Linnaeus) Bory de Saint-Vincent	AY779858.1
Lobochlamys culleus (Ettl) Pröschold, Marin, Schlösser & Melkonian (Chlamydomonas culleus Ettl).	AJ410463.1

(* в дужках наведена назва таксону, під якою послідовність депонована в NCBI у випадку розбіжностей назв; ** - оригінальні дані).

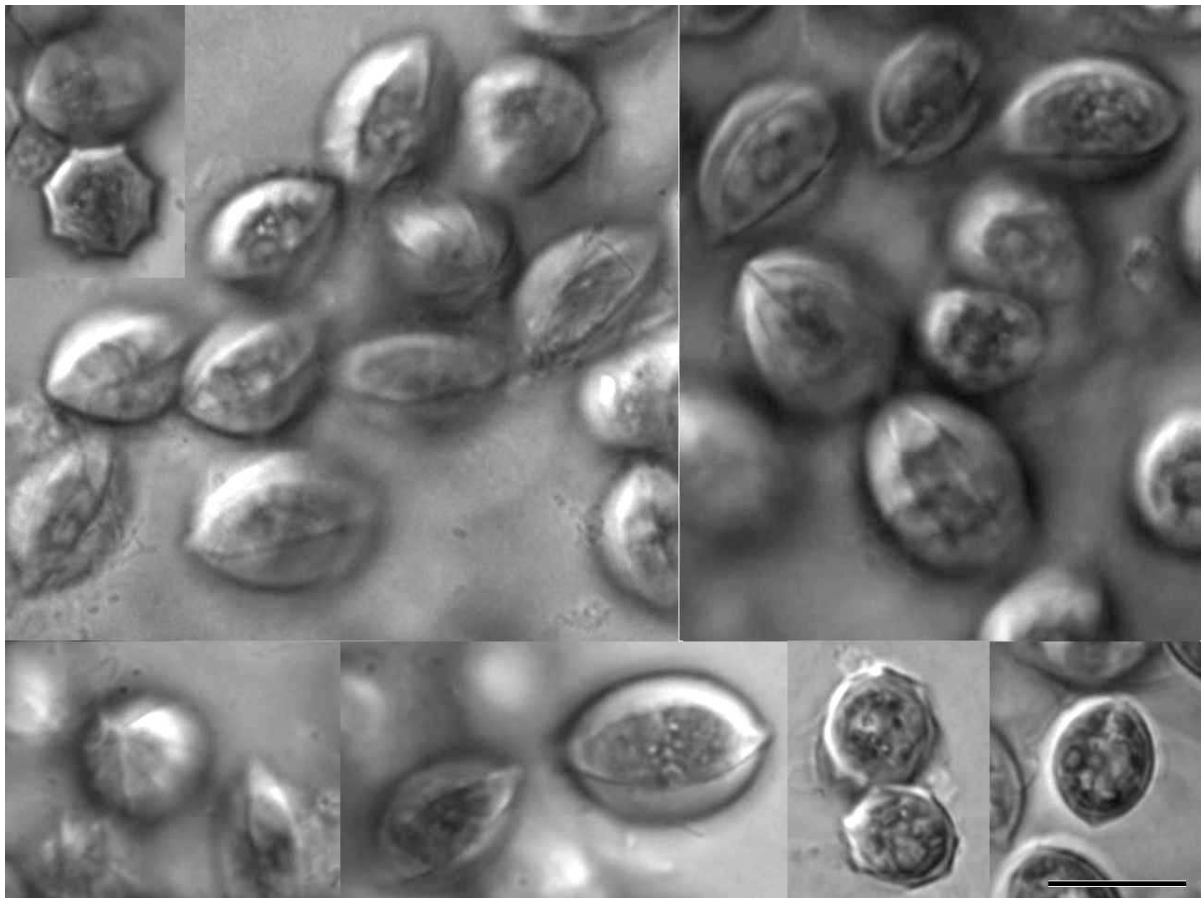


Рис.1. *Scotiellopsis levicostata* (штам ACKU 928-10) в культурі на агаризованому середовищі 3N BBM, вік якої становить 1 рік. Шкала 10 мкм.

Fig.1. *Scotiellopsis levicostata* (strain ACKU 928-10) on agar culture medium 3N BBM, in age of 1 year. Scale 10 μ .

Філогенетичні відношення штаму ACKU 928-10 з іншими зеленими водоростями з'ясували на основі молекулярно-філогенетичного аналізу послідовності нуклеотидів ядерного гену, що кодує малу субодиницю рибосомальної РНК (SSU, або 18S rDNA). Тотальну ДНК виділяли у відповідності до протоколу ізоляції ДНК із рослин (DNA Microprep Isolation from Plants, <http://www.scienceboard.net>). Ампліфікацію послідовності SSU проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням пари універсальних евкаріотичних праймерів для 18S rDNA: прямого праймера 1-F (5'-AACSTGGTTGATCCTGCCAGTA-3') та оберненого – 1528-R (5'-СТТСТGCAGGTTСАССТАС-3'). Амплікони, отримані в результаті ПЛР, візуалізували методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі, очищали та секвенували з обох боків за допомогою тих же самих праймерів (1-F та 1528-R). Очищення та секвенування ампліконів здійснено на комерційній основі компанією MACROGEN (Нідерланди).

Редагування послідовності здійснювали шляхом візуальної перевірки хроматограм сіквенсів за допомогою програми Chromas (version 1.45). Отримана послідовність частини гену 18S rDNA штаму ACKU 928-10, загальною довжиною 1047 п.н., була депонована в GenBank (код доступу JX960572).

Послідовність SSU штаму ACKU 928-10 була додана до матриці послідовностей 18S rDNA вибірки сценедесмальних водоростей, депонованих в NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). До цієї матриці були включені всі сіквенси представників класу «Coelastrella», наведені у роботі М. Еліаса зі співавторами [ELIAS et al., 2010], а також від однієї до трьох послідовностей представників родини Scenedesmaceae з тих молекулярних клад, у яких схожість послідовності 18S rDNA з АСКУ 928-10 за результатами BLAST-пошуку з використанням алгоритму megablast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) становила 99%, а саме: з «*Scenedesmus* (s.s.)», «*Acutodesmus*», «*Desmodesmus*», «*Neodesmus*», «*Coelastrum*». Зовнішню групу представляли послідовності *Hydrodictyon reticulatum* (Linnaeus) Bory de Saint-Vincent та *Lobochlamys culleus* (Ettl) Pröschold, Marin, Schlösser & Melkonian. Повний перелік послідовностей, включених до матриці вирівнювання, представлений в табл.1.

Результати

Морфологічний аналіз штаму АСКУ 928-10 показав його повну відповідність першоопису *Scotiellopsis levicostata*, наведеному М.М. Голлербахом у 1936 році. Зокрема, у штаму АСКУ 928-10 простежується головна діагностична ознака, яка відрізняє *Scotiellopsis levicostata* від усіх інших морфологічно близьких видів – наявність 6-8 добре помітних в оптичний мікроскоп невисоких меридіональних ребер, які у місці з'єднання на полюсах клітини утворюють сосочкоподібні потовщення клітинної оболонки (рис.1).

Кількість ребер та їх висота (відповідно й чіткість їх зображення при оптичній мікроскопії) в незначному ступені варіюють залежно від віку культури та типу середовища - рідке чи агаризоване (рис.2).

Так, в молодих культурах (до 2-х місяців) на агаризованих середовищах у всіх клітин наявні полярні потовщення оболонки. Проте ребра добре помітні лише у автоспор та молодих клітин; у дорослих клітин ребра розрізняються погано. Кількість ребер зазвичай дорівнює 7-ми або 8-ми, проте зрідка спостерігаються також окремі клітини з 9-ма та 10-ма ребрами. В культурах в стаціонарній фазі та фазі відмирання (3 місяці та старше) кількість ребер не перевищує 8-ми. Таким чином, з віком кількість ребер у клітин у незначному ступені зменшується, проте їх висота та товщина дещо зростають. В культурах на рідких поживних середовищах полярні потовщення оболонки розрізняються дуже добре, проте ребра у більшості клітин майже непомітні, за винятком залишків порожніх оболонок спорангіїв, у яких кількість ребер становить 7 або 8.

На рідких та агаризованих поживних середовищах вегетативні клітини залишаються поодинокими, ценобіїв або клітинних груп не утворюють. Молоді клітини містять один широкий пояскоподібний хлоропласт, перфорований однією-двома щілинами. З віком кількість перфорацій у хлоропласті збільшується, і у дорослих клітин хлоропласт розділяється на численні дисковидні сегменти. Піреноїд один, злегка зміщений до одного з полюсів клітини, розташовується у латеральному потовщенні хлоропласту, трохи стиснутий у поздовжньому напрямку і облямований двома крохмальними шкаралупками; у фронтальному положенні форма піреноїду наближується до сферичної, а крохмальна обкладка здається суцільною. Перед трансформацією клітини у спорангій крохмальна обкладка піреноїду фрагментується і на початку поділу протопласту зникає. Розмноження відбувається за допомогою автоспор, які утворюються по 2, 4 або 8. В молодих культурах (вік до 2-х місяців) переважають спорангії з 4-ма автоспорами, проте трапляються також спорангії з 2 та 8-ма автоспорами. В старіших культурах також переважають спорангії з 4-ма автоспорами, зрідка трапляються двоспорові спорангії; спорангії з 8-ма автоспорами відсутні. Автоспори звільняються через бічний розрив оболонки спорангіїв.

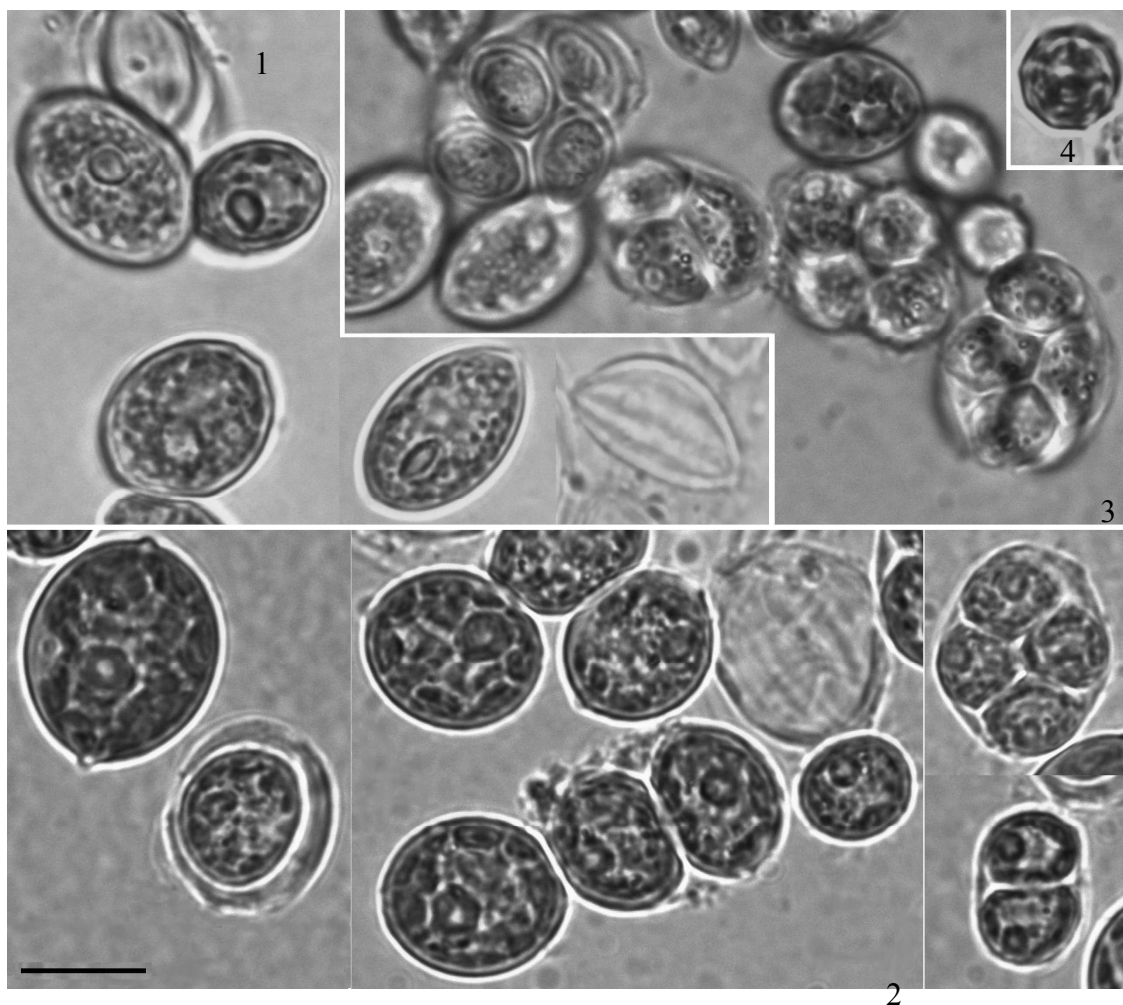


Рис.2. Морфологічна мінливість *Scotiellopsis levicostata* (штам АСКУ 928-10) в культурах різного віку за різних умов вирощування: 1, 2 – на рідкому середовищі (1 – вегетативні клітини та порожні оболонки спорангіїв, вік два тижні, середовище 3N BBM; 2 – вегетативні клітини, спорангії з двома та чотирма автоспорами, клітина з потовщеною оболонкою, залишок оболонки спорангію; вік два місяці, середовище «К»); 3, 4 – на агаризованому середовищі «К» (3 – вегетативні клітини з погано помітними ребрами, спорангії з 4-ма автоспорами, молода клітина та автоспори з добре помітними ребрами; вік два місяці, 4 – вегетативна клітина в оптичному перерізі при вигляді з полюсу; вік три місяці). Шкала 10 мкм.

Fig.2. Morphological variation *Scotiellopsis levicostata* (strain ACKU 928-10) in cultures of different ages under different growing conditions: 1, 2 - liquid medium (1 - vegetative cells and empty shell sporangium, two weeks age, 3N BBM medium; 2 - vegetative cells, sporangia with two and fourth autospores, with thickened cell wall, tire shell sporangium, two months age, "K" medium), 3, 4 - at the agar medium "K" (3 - vegetative cells with poorly visible ribs sporangia with 4th autospores, young cell and autospores with conspicuous ribs, two months age, 4 - vegetative cell in the optical section at the sight of the pole, three months age). Scale 10 μ .

У культурах віком понад 6 місяців у деяких клітин хлоропласт може набувати жовтувато-зелених або коричневатозелених відтінків. В окремих клітинах також спостерігається до 3-5 невеличких крапель червоної олії. Червоні акінети або акінетоподібні клітини не виявлені. Утворення в цитоплазмі великих вакуолей або накопичення великих краплин олії не спостерігається. Розростання на агаризованому середовищі навіть у дуже старих культурах залишаються зеленими.

Діапазони розмірів клітин є сталими і практично однакові як в культурах різного віку, так і на різних типах (рідких або агаризованих) обох застосованих поживних середовищах - «К» та 3N BBM. Відміни верхніх та нижніх лімітів розмірів клітин в усіх досліджених варіантах культур не перевищували 0.6 мкм. Максимальний діапазон довжини вегетативних клітин становив 9.1-19.0 мкм, ширини - 6.5-15.1 мкм.

Максимальна довжина спорангіїв складала 19.3 мкм, ширина – 15.2 мкм. Мінімальна довжина автоспор становила 9.1 мкм, ширина - 5.7 мкм. Ці розміри практично повністю відповідали наведеним в авторському діагнозі М.М. Голлербаха (1936): довжина клітин 10-19.6 мкм, ширина – 5.8-14.0 мкм.

Молекулярно-філогенетичний аналіз. Пошук в GenBank послідовностей, подібних до отриманої нами часткової послідовності SSU, проведений з використанням megablast алгоритму, показав, що сіквенс АСКУ 928-10 на 100% ідентичний чотирьом послідовностям (коди доступу EF023879.1, EF023828.1, EF023123.1, EF023419.1). Ці послідовності були отримані шляхом клонування евкаріот-специфічних ампліконів 18S rDNA зразків тотальної ДНК, виділеної з ґрунту ризосфери *Populus tremuloides* експериментального полігону Rhinelander штату Вісконсін (США) [LESAULNIER et al., 2008]. Види, до яких належать дані послідовності, фенотипними методами не вивчались і залишились не встановленими. В NCBI вони наведені як клони «Uncultured Scenedesmaceae».

Пошук з виключенням метагеномних сіквенсів показав, що штам АСКУ 928-10 за секвенованим фрагментом SSU унікальний, і не є ідентичним до жодного ідентифікованого виду. Проте 31 послідовність була схожа з АСКУ 928-10 на 99.0-99.9%. Водорості, яким належать ці послідовності, представляють різні молекулярні клади родини Scenedesmaceae. Найвищою (99.90%) є схожість з не ідентифікованим до виду штамом KGU-Y002, наведеним як *Scenedesmus sp.* (код доступу AB742453.1). На другому місці (99.80%) розташовуються два види: *Scotiellopsis terrestris*, штам ССАР 279-1, ізольований та ідентифікований П. Броді [BROADY, 1984] та *Scenedesmus COSTATUS*, ідентифікований Е. Хегевальдом [HEGEWALD, HANAGATA, 2000]. Схожість з іншими видами – 99.60% і нижче.

У *Scotiellopsis levicostata* не виявлено інтрону I групи, який наявний у *S. oocystiformis* (довжина 615-842; 1453-1665 п.н). Цей інтрон відсутній також у *S. terrestris*, проте наявний у *C. multistriata* (довжина 564-753; 1357-1723 п.н).

Філогенетичні дерева, побудовані NJ, MP та ML-методами для матриці, до якої був включений АСКУ 928-10, за топологією добре узгоджувались з тими, що наводяться в літературі для родини Scenedesmaceae в її сучасній інтерпретації [ELIÁS et al., 2010; HEGEWALD et al., 2010; FAWLEY et al., 2011]. Бутстреп-підтримка всіх клад на деревах, які побудовані нами за частковим сіквенсом SSU, була нижчою, ніж та, що наводиться в літературі для дерев, побудованих за повними сіквенсами даного гену [ELIÁS et al., 2010]. Клади, для яких бутстреп-підтримка була помірною та високою, принаймі за одним з методів аналізу (NJ, MP та ML), позначені товстою лінією на філогенетичному дереві, побудованому ML-методом (рис.3).

На всіх варіантах філогенетичних дерев АСКУ 928-10 потрапляв у надкладу, що відповідає родині Scenedesmaceae, а в її межах – у кладу «Coelastrella». Ця клад об'єднала ті секвеновані за SSU операційні таксономічні одиниці (ОТО), які М. Пунчохарова та Т. Калина [PUNČOCHÁŘOVÁ, KALINA, 1981] приймали як види роду *Scotiellopsis*: *Coelastrella oocystiformis* (= *Scotiellopsis oocystiformis*) та *Scotiellopsis TERRESTRIS*, а також два види роду *Coelastrella* (*C. multistriata* та *C. corcontica*). Проте деякі види, включені в систему роду *Coelastrella*, до молекулярної клади «Coelastrella» не потрапили. Так, *C. saipanensis* об'єдналась у помірно стійку кладу з *Ettlia texensis*, а *C. vacuolata* (syn. *Graesiella vacuolata*, syn. *Chlorella fusca* var. *vacuolata*) утворила уособлену кладу з *Graesiella emersonii* (syn. *Chlorella emersoinii*, syn. *Chlorella fusca* var. *EMERSONII*). На NJ та MP-деревах бутстреп-підтримка клади «Coelastrella» була достатньою, але менш переконливою на ML-дереві. Таким чином, АСКУ 928-10 виявився представником клади «Coelastrella», спорідненим зі всіма секвенованими за SSU видами роду *Scotiellopsis* в його класичному розумінні та з деякими (проте не всіма) видами роду *Coelastrella*.

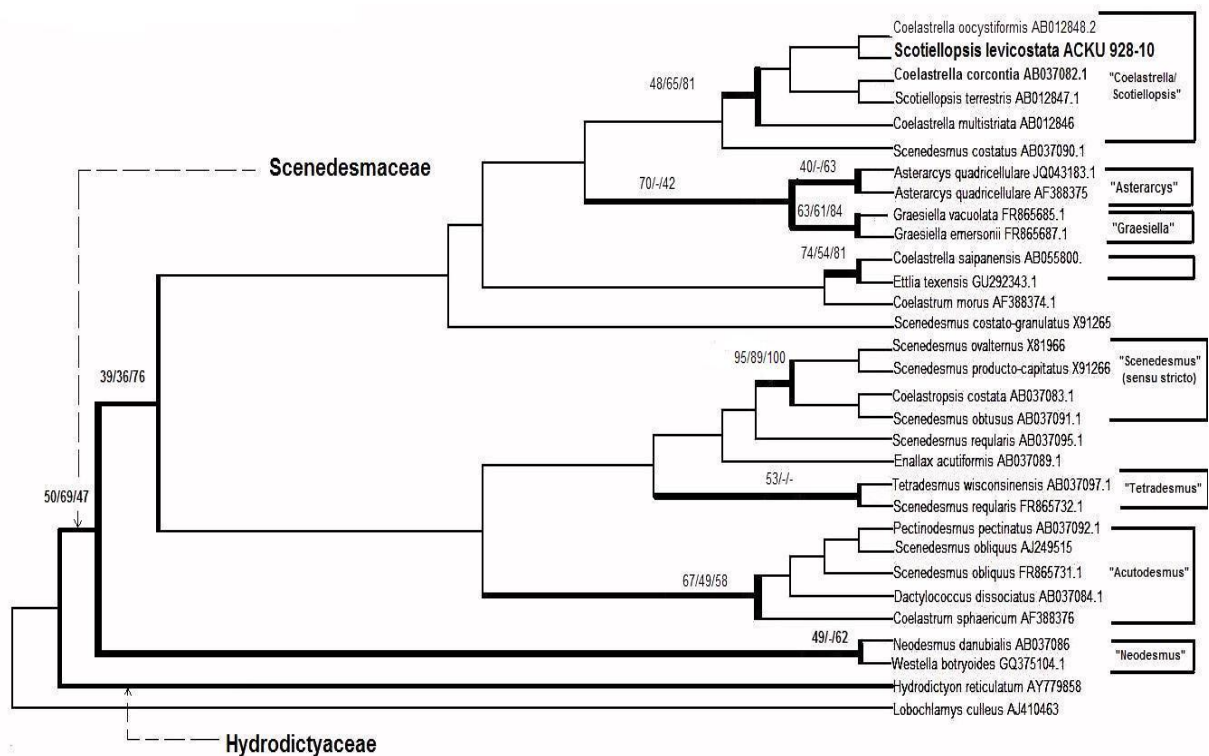


Рис 3. Місце *Scotiellopsis levicostata* (штам ACKU 928-10) в системі Scenedesmaceae за результатами аналізу послідовностей 18S рДНК (філогенетичне дерево, що побудовано за ML- методом; на гілках - значення бутстрепа для ML/MP/NJ дерев. Гілки, які хоча б за одним методом мають підтримку вищу за 50%, виділені товстими лініями).

Fig 3. Place *Scotiellopsis levicostata* (strain ACKU 928-10) in the Scenedesmaceae on the analysis of 18S rDNA sequences (phylogenetic tree constructed by ML-method, on the branches – Bootstrap values for ML / MP / NJ trees. Branches that are at least one by having support greater than 50% isolated thick lines).

В межах класу «Coelastrella» характер філогенетичних відносин між ОТО залишається не з'ясованим. Хоча за топологією ACKU 928-10 здається найближчим до *Coelastrella oocystiformis*, проте за значеннями бутстрепа це припущення не може вважатися доведеним. Окрім того, *Scotiellopsis levicostata* відрізняється від *C. OOCYSTIFORMIS* відсутністю у межах секвенованої послідовності інтрону I-ї групи. Цей інтрон відсутній також у *S. terrestris*. Сестринським таксоном до класу «Coelastrella» на дереві, побудованому ML-методом, виступає *Scenedesmus costatus*, проте його близькість до даної класу також не має істотної бутстрепа-підтримки.

Обговорення

За комплексом фенотипних ознак штам ACKU 928-10 показав повну морфологічну відповідність виду, описаному М.М. Голлербахом (1936) як *Scotiella levicostata*, який за таксономічною концепцією М. Пунчохарової та Т. Калини [PUNČOŠÁŘOVÁ, KALINA, 1981] був визначений базонімом нової номенклатурної комбінації - *Scotiellopsis levicostata*. У світових колекціях культур водоростей наразі немає жодного штаму, реферованого як *Scotiellopsis levicostata*, на відміну від інших видів даного роду. Більш того, єдине опубліковане графічне зображення даного виду – це рисунок М. М. Голлербаха, що представляє іконотип *Scotiella levicostata*.

Відсутність штамів даного виду та будь-якої таксономічної інформації, окрім тієї, що містить першоопис виду, різко контрастує з численними повідомленнями

флористичного характеру, які свідчать про дуже значне поширення *Scotiellopsis levicostata* у ґрунтах. Так, у опублікованій частині картотеки проф. Е.А. Штіної містяться дані про понад 60 випадків знаходження *S. levicostata* на території колишнього СРСР, переважно – у ґрунтах тундрової та лісових зон [ШТИНА, АНТИПИНА, КОЗЛОВСКАЯ, 1981; АЛЕКСАХИНА, ШТИНА, 1984]. У чек-лісті ґрунтових водоростей України цей вид наводиться для 34 локалітетів, розташованих на території Українського Полісся, лісостепової зони та в Українських Карпатах [КОСТИКОВ та ін., 2001]. Таким чином, за літературними даними флористичного характеру *S. levicostata* може вважатися східноєвропейським аркто-бореальним видом. Проте штам АСКУ 928-10, який ідентифікований як *S. levicostata*, був виділений з ґрунту лучного фітоценозу степової зони, яка розташована у суббореальному поясі.

Ми вважаємо, що штам АСКУ 928-10 може бути визначений як *S. levicostata*, незважаючи на невідповідність локалітету, з якого він виділений, флористичним даним щодо поширення цього виду. Наявність в GenBank сіквенсів неідентифікованих сценедесмових водоростей, ідентичних до АСКУ 928-10, отриманих з тотальної ДНК ґрунту лісового фітоценозу штату Вісконсін [LESALNIER et al., 2008], може бути непрямим свідченням більш широкої екологічної амплітуди та більш широкого географічного поширення *S. levicostata*.

Морфотип, притаманний АСКУ 928-10, за наявністю помітних в оптичний мікроскоп ребер та за їх кількістю, демонструє перехідні риси між *Scotiellopsis oocystiformis* та *Scotiellopsis terrestris*. В логарифмічній фазі росту в культурах на агаризованих середовищах водночас наявні клітини, схожі як на *S. oocystiformis* (дорослі клітини, у яких ребра майже непомітні), так і на *S. terrestris* (автоспори та молоді клітини, у яких помітно 6-10 ребер). В культурах на рідких середовищах АСКУ 928-10 більше схожий на *S. oocystiformis*. Наявність добре помітних ребер у автоспор АСКУ 928-10 відрізняє *S. levicostata* від обох морфологічно близьких видів, які мають автоспори з непомітними при оптичній мікроскопії ребрами. При цьому у *S. terrestris* добре помітні ребра розвиваються у дорослих клітин, тоді як у *S. oocystiformis* вони залишаються майже непомітними у клітин всіх вікових станів. У старих культурах *S. levicostata* однозначно відрізняється від обох близьких видів: від *S. oocystiformis* - наявністю добре помітних ребер, від *S. terrestris* - відсутністю здатності утворювати велетенські сферичні акінетоподібні клітини, виповнені вторинними каротиноїдами.

Таким чином, штам АСКУ 928-10 не лише відповідає діагнозу *Scotiellopsis levicostata*, але й відрізняється від морфологічно близьких до нього *S. oocystiformis* та *S. terrestris*.

Результати молекулярно-філогенетичного аналізу узгоджуються з висновками, отриманими на основі морфологічних спостережень. Зокрема, навіть неповний сіквенс SSU, з одного боку, свідчить, що генотип АСКУ 928-10 унікальний і не є ідентичним до жодного з ідентифікованих видів, з іншого – вказує на положення АСКУ 928-10 в межах клади «*Coelastrella*». Ця клада включає обидва секвенсовані за SSU види, які до 1998 р. розглядалися в системі роду *Scotiellopsis* (*S. oocystiformis* та *S. terrestris*), а також деякі види роду *Coelastrella*.

Наразі таксономічно обґрунтоване рішення щодо номенклатурного статусу як *Scotiellopsis levicostata*, так і клади «*Coelastrella*» в цілому, відсутнє. Представники, що входять до даної клади, за різними концепціями відносили до чотирьох різних родів – *Scenedesmus* Meyen 1829, *Coelastrella* Chodat 1922, *Scotiellopsis* Vinatzer 1975, *Scotiellopocystis* Fott 1976. Проте положення видів, що представляють номенклатурні типи цих родів, встановлено тільки для *Scenedesmus* (*S. obtusus* входить до однойменної клади) та для *Scotiellopocystis* (*Scotiellopocystis levicostata* (базионім – *Scotiella levicostata*, синонім – *Scotiellopsis levicostata*) входить у кладу «*Coelastrella*»). Місце номенклатурних типів родів *Coelastrella* та *Scotiellopsis* (*Coelastrella striolata* та

Scotiellopsis rubescens) в системі зелених водоростей молекулярно-генетичними методами не встановлено, а їх належність до клади «Coelastrella» наразі не доведена. Якщо *Coelastrella striolata* та *Scotiellopsis rubescens* не є представниками клади «Coelastrella», то класа має розглядатися як рід *Scotiellopocystis* з номенклатурним типом *Scotiellopocystis levicostata*. Якщо у класу «Coelastrella» увійде *Scotiellopsis rubescens*, але не *Coelastrella striolata*, то вся класа «Coelastrella» має розглядатися як рід *Scotiellopsis*. У випадку входження *Coelastrella striolata* до «Coelastrella», *Scotiellopsis levicostata* (а також і *Scotiellopsis terrestris*) має бути перенесеним у рід *Coelastrella*.

Висновки

1. На сьогодні штам *Scotiellopsis levicostata* (АСКУ 928-10), введений в колекцію культур Київського національного університету імені Тараса Шевченка, є єдиним депонованим штамом цього виду.

2. Морфологічний аналіз штаму (АСКУ 928-10) показав його повну відповідність першоопису, наведеному М.М. Голлербахом у 1936 році як *Scotiella levicostata*, який за таксономічною концепцією М. Пунчохарової та Т. Калини був визначений базіонімом нової номенклатурної комбінації *Scotiellopsis levicostata*.

3. Результати молекулярно-філогенетичного аналізу послідовності ядерного гену 18S rDNA *Scotiellopsis levicostata* показали, по-перше, що штам за секвенованим фрагментом SSU унікальний та не є ідентичним до жодного з ідентифікованих видів, по-друге, вказали на положення цього виду в межах клади «Coelastrella», яка включає всі раніше описані види роду *Scotiellopsis*.

Список літератури

- АЛЕКСАХИНА Т.И., ШТИНА Э.А. Почвенные водоросли лесных биоценозов. – М.: Наука, 1984. – 149 с.
- АНДРЕЕВА В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). – Спб.: Наука, 1998. – 351 с.
- ГОЛЛЕРБАХ М.М. К вопросу о составе и распространении водорослей в почвах // Тр. БИН АН СССР. Сер.2. Споровые растения. – 1936. – Вып.3. – С. 99-302.
- КОРШИКОВ О.А. Підклас Протококові (Protococcineae) // Визначник прісноводних водоростей Укр. РСР. Вип. 5. – К.: Вид-во АН УРСР, 1953. – 440 с.
- КОСТИКОВ І.Ю., РОМАНЕНКО П.О., ДЕМЧЕНКО Е.М., ДАРИЄНКО Т.М., МИХАЙЛЮК Т.І., РИБЧИНСЬКИЙ О.В., СОЛОНЕНКО А.М. Водорості ґрунтів України (Історія та методи дослідження, система, конспект флори). – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 300 с.
- ШТИНА Э.А., АНТИПИНА Г.С., КОЗЛОВСКАЯ Л.С. Альгофлора болот Карелии и ее динамика. – М.: Наука, 1981. – 269 с.
- BISHOFF H.W., BOLD H.C. Phycological Studies. IV. Some algae from enchanted rock and related algae species // Univ. Texas Publ. – 1963. – № 6318. – P. 1-95.
- BROADY P.A. Taxonomic and ecological investigations of algae on steam-warmed soils on Mt Erebus, Ross Island, Antarctica // Phycologia. – 1984. – Vol. 23, N3. – P. 257-271.
- ELIÁS M, NEMCOVA Y, SKALOUD P, NEUSTUPA J, KAUFNEROVA V, SEJNOHOVA L. Hylodesmus singaporensis gen. et sp. nov., a new autosporic subaerial green alga (Scenedesmaceae, Chlorophyta) from Singapore // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2010. – Vol. 60. – P. 1-12.
- ETTL H., GÄRTNER G. Syllabus der Boden-, Luft und Flechtenalgen. - Stuttgart, etc.: Fischer, 1995. – 721p.
- FAWLEY M.W., FAWLEY K.P. and HEGEWALD E. Taxonomy of Desmodesmus serratus (Chlorophyceae, Chlorophyta) and related taxa on the basis of morphological and DNA sequence data // Phycologia. – 2011. – Vol. 50, N 1. – P. 23-56.
- FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. – 1985. – Vol. 39. – P. 783-791
- FOTT B. Scotiellopsis, eine neue Gattung aus der gleichnamigen Unterfamilie Scotiellopsioidea (Oocystaceae, Chlorococcales), nebst Bemerkungen zu den verwandten Gattungen // Preslia, Praha. – 1976. – Vol. 48. – P. 289-298.
- HALL T.A. Bio-Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT // Nucl. Acids. Symp. – 1999. – Ser. 41. – P. 95-98.
- HANAGATA N. Phylogeny of the subfamily Scotiellopocystoideae (Chlorophyceae, Chlorophyta) and related taxa inferred from 18S ribosomal RNA gene sequence data // Phycologia. – 1998. – Vol. 34. – P. 1049-1054.

- HANAGATA N. New species of Coelastrella and Scenedesmus (Chlorophyceae, Chlorophyta) // Journal of Japanese Botany. – 2001. – Vol. 76. – P. 129-136.
- HEGEWALD E., HANAGATA N. Phylogenetic Studies on Scenedesmaceae (Chlorophyta) // Algol. Stud. – 2000. – V. 100. – P. 29-49.
- HEGEWALD E., WOLF M., KELLER A., FRIEDL T and KRIENITZ L. ITS2 sequence-structure phylogeny in the Scenedesmaceae with special reference to Coelastrum (Chlorophyta, Chlorophyceae), including the new genera Comasiella and Pectinodesmus // Phycologia. – 2010. – Vol. 49, N4. – P. 325-335.
- KUHL A. Handling and culturing of chlorella / A. Kuhl, H. Lorenzen // (In: D.M. Prescott, ed., Methods in cell physiology) Academic Press, New York and London. – 1964. - Vol. 1. – P. 152-187.
- LUND J.W.G. Four new green algae // Revue Algologique, nouvelle serie. – 1957. – Vol. 3. – P. 26-44.
- LESANLIER C., PAPAMICHAIL D., MCCORKLE S., OLLIVIER B., SKIENA S., TAGHAVI S., ZAK D. and VAN DER LELIE D. Elevated atmospheric CO₂ affects soil microbial diversity associated with trembling aspen // Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 10, N4. – P. 926-941.
- NEUSTUPA J., ELIÁS M., ŠEJNOHOVÁ L. A taxonomic study of two Stichococcus species (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) with a starch-enveloped pyrenoid // Nova Hedwigia. –2007. – Vol.84. – P. 51-63.
- NOZAKI H, KATAGIRI M, NAKAGAWA M, AIZAWA and WATANABE M. Taxonomic re-examination of the two strains labeled Chlorella in the Microbial Culture Collection at the National Institute for Environmental Studies (NIES-Collection) // Microbiol. Cult. Coll. –1995. – Vol. 11. – P. 11-18.
- PUNČOCHAŘOVÁ M and KALINA T. Taxonomy of the genus Scotiellopsis Vinatzer (Chlorococcales, Chlorophyta) // Arch. Hydrobiol. Suppl. 60, Algolog. Stud. – 1981. – 27. – P. 119–47.
- VINATZER G. Neue Bodenalgen aus den Dolomiten // Plant Syst. Evol. – 1975. – Vol. 123. – P. 213-235.
- REISIGL H. Zur Systematik und Ökologie alpiner Bodenalgen // Österreich Botanische Zeitschrift. – 1964. – Vol. 116. – P. 492-506.

Рекомендує до друку
Бойко М.Ф.

Отримано 29.10. 2012 р.

Адреса авторів:

*C.B. Скребовська
I.Ю. Костіков
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка
ННЦ «Інститут біології»
пр. Акад. Глушкова, 2
м. Київ, 03022
Україна
e-mail: Skribovskaya@ukr.net
e-mail: kost@univ.kiev.ua*

Authors' address:

*S.S. Skrebovska,
I.Yu. Kostikov
National Taras Shevchenko
University of Kyiv
ESC "Institute of Biology"
2, Acad. Glushkov Avenue
Kyiv, 03022
Ukraine
e-mail: Skribovskaya@ukr.net
e-mail: kost@univ.kiev.ua*