

УДК 582.251.62

МОРФОЛОГІЧНІ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ФІЛОГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ *SCENEDESMUS RUBESCENS* (CHLOROPHYTA)

Челебієва Е.С.¹, Скребовська С.В.²

¹Інститут біології південних морів імені О.О. Ковалевського НАН України, Севастополь,
Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка ННЦ "Інститут біології",
Київ, Україна

E-mail: elina.chelebieva@gmail.com

На основі аналізу нуклеотидної послідовності 18S рРНК уточнено таксономічне положення штаму IPPAS D-292, реферованого як *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard. Встановлено, що штам IPPAS D-292 є ідентичним штаму ССАР 232/1 *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler, Schafer, Hummer, Kloboucek & Huss.

Ключові слова: мікроводорості, Chlorophyta, таксономія, молекулярна філогенія, кетокаротиноїди.

ВСТУП

Зелена мікроскопічна водорість, реферована в колекції Інституту фізіології рослин ім. К. А. Тімірязєва РАН як мутант *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard (штам IPPAS D-292) [1], потрапила в колекцію IPPAS з Інституту ботаніки АН Узбекистану у 1989 році як камчатський штам Б. В Громова (CALU 449), виділений на березі озера в районі термальних джерел в кінці 1960-х років.

У 2007 році штам IPPAS D-292 був переданий до Інституту біології південних морів ім. О. О. Ковалевського НАН України зі збереженою назвою *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard. Штам характеризувався яскраво вираженою здатністю до накопичення кетокаротиноїдів при дефіциті елементів живлення, що безумовно викликало інтерес для порівняльних досліджень вторинного каротиногенезу у мікроводоростей різної систематичної приналежності й екологічної спеціалізації. Однак, при лабораторному культивуванні водорості було виявлено, що морфологічні характеристики досліджуваного штаму суттєво відрізняються від першоопису *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard, наведеному у 1888 році [2], а також від більш пізніх описів О. А. Коршикова [3] та Х. Еттла [4]. Цей факт може пояснюватися тим, що, на думку О. А. Коршикова та Х. Еттла, вид *Chlamydomonas reinhardtii* є збірним, на що вказує висока мінливість розмірів і форм клітин і розташування клітинних органел в культурах різних штамів [3, 4]. Крім того, не можна виключити і технічну помилку персоналу однієї з колекцій при етикетуванні даного штаму.

У зв'язку з вищесказаним, метою даної роботи було уточнення таксономічного положення штаму IPPAS D-292 за допомогою молекулярно-генетичного методу, заснованому на аналізі нуклеотидної послідовності 18S rDNA.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Штам IPPAS D-292 вирощували на 2% агаризованому та рідкому середовищах 3N BBM [5] при освітленості 2 кЛк і температурі 18-20 °С.

Ідентифікацію морфологічним методом проводили на основі оптичної мікроскопії культур, вік яких становив 2 тижні, 1 місяць 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. Всі спостереження проводили з обов'язковим використанням імерсійних об'єктивів (100^x).

Для з'ясування місця штаму IPPAS D-292 в системі зелених водоростей була використана нуклеотидна послідовність ядерного гену 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) (табл.1).

Таблиця 1
Послідовності праймерів, використаних для ампліфікації та секвенування

Назва праймера	Послідовність
1-F	5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3'
1528-R	5'-CTTCTGCAGGTTACACCTAC-3'
528-F	5'-GCGGTAATTCCAGCTCCAA-3'
1055-R	5'-ACGGCCATGCACCACCACCCA-3'
1055-F	5'-GGTGGTGCATGGCCGTTCTT-3'
536-R	5'-AATTACCGCKGCTGGCA-3'

Об'єм ампліфікаційної суміші становив 50 μ л. Ампліфікацію проводили в термоциклері Techne TC 412.

Встановлювали наступний температурний профіль реакції: 94 °С – 3 хв., (94 °С – 45 с, 54 °С – 1хв, 72 °С – 3 хв.) – 30 циклів, 72 °С – 5 хв., 4 °С – ∞ [6]. Амплікони, отримані в результаті ПЛР, візуалізували методом горизонтального електрофорезу в 1% агарозному гелі в TBE буфері [7].

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

Редагування та складання консенсусної послідовності проводили шляхом візуального зіставлення прямого та зворотного хроматограф сіквенсів за допомогою програм Chromas (version 1.45). Складання матриці та її вирівнювання здійснювали за допомогою редактора BioEdit та програми CLUSTAL W v 1.75 [8].

Послідовність 18S rDNA штаму IPPAS D-292 була додана до матриці послідовностей 18S rDNA вибірки зелених водоростей, депонованих в NCBI

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), схожість яких за результатами BLAST-пошуку з використанням алгоритму megablast становила 99%. Всього матриця складалася з 27 послідовностей видів зелених водоростей. Зовнішню групу представляла послідовність *Chlamydomonas applanata* Pringsheim. Повний перелік таксонів, включених до матриці вирівнювання, представлений в табл. 2.

Таблиця 2
Перелік таксонів включених в матрицю вирівнювання

Таксон (синонім в NCBI*)	Код доступу в NCBI
<i>Scenedesmus rubescens</i> (Dangeard) Kessler, Schafer, Hummer, Kloboucek & Huss.	X74002.1
<i>Scenedesmus obliquus</i> (Turpin) Kützing (<i>Acutodesmus obliquus</i> (Turpin) Hegewald & Hanagata)	FR865737.1
<i>Scenedesmus obliquus</i> (Turpin) Kützing (<i>Acutodesmus obliquus</i> (Turpin) Hegewald & Hanagata)	FR865719.1
<i>Scenedesmus obliquus</i> (Turpin) Kützing (<i>Acutodesmus obliquus</i> (Turpin) Hegewald & Hanagata)	FR865738.1
<i>Scenedesmus obliquus</i> (Turpin) Kützing (<i>Acutodesmus obliquus</i> (Turpin) Hegewald & Hanagata)	FR865731.1
<i>Scenedesmus bajacalifornicus</i> Lewis & Flechtner	HQ246318.1
<i>Scenedesmus incrassatalus</i> Bohlin	FR865722.1
<i>Tetradesmus wisconsinensis</i> Smith	AB037096.1
<i>Scenedesmus pectinatus</i> var. <i>distendus</i> Holtmann	AB037093.1
<i>Scenedesmus pectinatus</i> Meyen	FR865730.1
<i>Pectinodesmus pectinatus</i> (Meyen) Hegewald, Wolf, Keller, Friedl & Krienitz	AB037092.1
<i>Scenedesmus acuminatus</i> (Lagerheim) Chodat	AB037088.1
<i>Scenedesmus dissociatus</i> (Verses & Trainor) Hegewald & Hanagata (<i>Dactylococcus dissociatus</i> Verses & Trainor)	AB037084.1
<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>Chlorella emersonii</i> Shihira & R.W.Krauss	FR865657.1
<i>Chlorella emersonii</i> Shihira & R.W.Krauss	FR865661.1
<i>Coelastrella saipanensis</i> Hanagata	AB055800.1
<i>Ettlia texensis</i> (Archibald) Komárek	GU292343.1
<i>Scenedesmus costatus</i> Schmidle	AB037090.1
<i>Coelastropsis costata</i> (Korshikov) Fott & Kalina	AB037083.1
<i>Scenedesmus obtusus</i> Meyen	AB037091.1
<i>Scenedesmus regularis</i> Svirengo	FR865732.1
<i>Enallax acutiformis</i> (Schröder) Hindák	AB037089.1
<i>Coelastrum astroideum</i> var. <i>rugosum</i> (Rich) Sodomková	GQ375093.1
<i>Chlamydomonas applanata</i> Pringsheim	FR865570.1

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

Отримана послідовність гену 18S rDNA штаму IPPAS D-292 загальною довжиною 1713 п.н., підготовлена до депонування в базу даних в 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 в NJ и MP аналізах оцінювали методом бутстрепа, використовуючи 100 бутстреп-реплік [10].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Морфологічний аналіз штаму IPPAS D-292 показав, що морфотип останнього не відповідає морфотипу *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard, наведеному у літературі [2, 3, 4]. Особливістю культури *C. reinhardtii* є монадний морфотип та складний життєвий цикл. Молоді клітини *C. reinhardtii* злегка яйцевидні, вегетативні клітини мають сферичну форму, з тонкою оболонкою, без носика, піреноїд лежить майже у центрі хроматофору, дві пульсуючі вакуолі, ядро над піреноїдом, півкуляста стигма знаходиться в передній третині клітини, джгутики в 1,5 рази довші від клітини, розмір вегетативних клітин 14-22 мкм, гамет – 8-12 мкм [3]. Проте при лабораторному культивуванні штаму IPPAS D-292 на різних живильних середовищах протягом декілька років його культури складались тільки з нерухомих кокоїдних клітин. Вегетативні клітини сферичної форми, діаметром 10-18 мкм, молоді еліпсоїдні – 5-8 мкм (рис.1).

Клітинні стінки гладкі, в основному двошарові. На полюсах клітинна оболонка має потовщення. Хлоропласт один, розсічений на лопасті, піреноїд знаходиться у боковому (латеральному) потовщенні хлоропласту. Розмноження шляхом утворення автоспор, 2-4-8 клітини в спорангії, що випускаються після розриву материнської клітинної стінки. Джгутикових стадій і статевого розмноження не спостерігалось. На агаризованих поживних середовищах клітини утворюють темно-зелені колонії, старіючі культури помаранчевого чи цегляно-червоного кольору, що свідчить про накопичення каротиноїдів.

Молекулярно-філогенетичний аналіз.

Пошук в GenBank послідовностей, подібних до отриманої нами послідовності 18S rDNA, проведений з використанням megablast алгоритму, показав, що сіквенс IPPAS D-292 на 100% співпадає з секвенованим штамом CCAP 232/1 *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler, Schafer, Hummer, Kloboucek & Huss [11].

Крім того, отримана послідовність 18S rDNA штаму IPPAS D-292 була схожа на 99.0-99.9% з 25 послідовностями зелених водоростей, що представляють різні молекулярні клади родини Scenedesmaceae. Найвищою після штаму *Scenedesmus rubescens* (CCAP 232/1) на 99.90% є схожість з не ідентифікованим до виду штамом Tow 9/21 P-1w, наведеним як Scenedesmaceae sp. (код доступу AY197641.1).

На третьому місці (99.80%) розташовується штам UTEX 1537, наведений як *Dactylococcus dissociates* Verses & Trainor (код доступу AB037084.1). У літературі для виду *Dactylococcus dissociatus* наводиться інші синонімічні назви *Scenedesmus dissociates* (Verses & Trainor) Hegewald & Hanagata [12] та *Keratococcus dissociates*

(Verses & Trainor) Ettl & Gärtner. Вид потрапляє у кладу *Acutodesmus* в сучасній інтерпретації зарубіжних авторів [13].

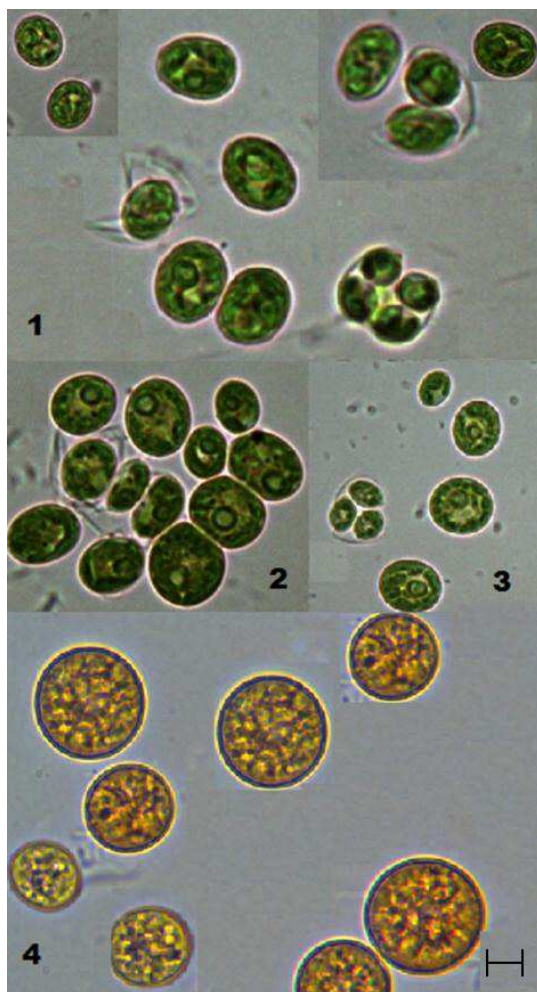


Рис. 1. *Scenedesmus rubescens* (штам IPPAS D-292) на рідкому (фото 1-3) та на агаризованому (фото 4) середовищі середовищі 3NBVM (1 – вегетативні клітини, оболонки материнських клітин після звільнення апланоспор, вік 2 тижні, 2-3 – вегетативні клітини, вік 1 місяць, 4 – апланоспори, вік 12 місяців). Шкала 10мкм.

Філогенетичні дерева були побудовані NJ, MP та ML-методами для матриці, що включала штам IPPAS D-292. Клади, для яких бутстреп-підтримка була помірною та високою, позначені на філогенетичному дереві, побудованому ML-методами (рис 2). На всіх варіантах філогенетичних дерев штам IPPAS D-292 потрапляв в надкладу, що відповідає родині *Scenedesmaceae*, а в її межах – у кладу, що об'єднала види *Scenedesmus rubescens* та *Dactylococcus dissociatus*.

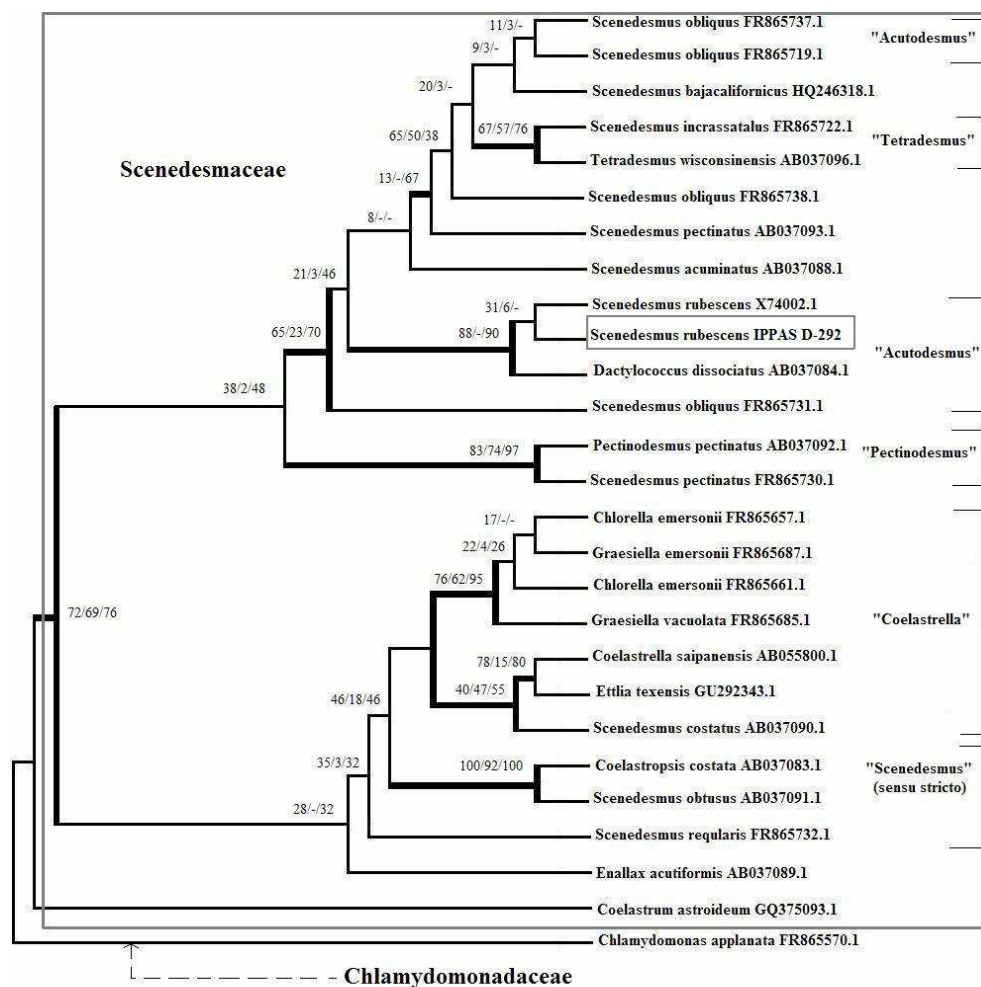


Рис 2. Положення штаму *Scenedesmus rubescens* (IPPAS D-292) в системі Scenedesmaceae за результатами аналізу послідовностей 18S рДНК (філогенетичне дерево, що побудовано за ML- методом; на гілках – значення бутстрепа для ML/MP/NJ дерев. Гілки, які хоча б за одним методом мають підтримку вищу за 50%, виділені товстими лініями).

Scenedesmus rubescens спочатку був описаний як *Halochlorella rubescens* Dangeard у 1966 році та пізніше перейменований у *Chlorella fusca* var. *rubescens* Dangeard, Kessler, Czygan, Fott and Nováková, приймаючи за діаκριтичні ознаки здатність автоспор затримуватися у спорангії і утворювати сарциноїдні пакети, накопичення каротиноїдів у старих культурах [14].

У 1975 році ряд авторів дає іншу синонімічну назву виду – *Chlorella emersonii* var. *rubescens* (Dangeard) Fott, Lohead, Clemenson. Однак, Т. Калина та М. Пунхочарова у 1987 році виявили ребра в клітинній оболонці *Chlorella fusca* var.

rubescens та знов перенесли вид у рід *Halochlorella* [14], котрий розмістили в під родині Scotiellocoystoideae Fott, для якої ця ознака є типовою [15]. У 1997 році Kessler разом з рядом авторів перенесли вид до роду *Scenedesmus* на підставі філогенетичного аналізу, який показав монофілетичність *Chlorella fusca* var. *rubescens* з *Scenedesmus obliquus* та *S. bacillaris* [11].

Отже, за комплексом фенотипних ознак штам IPPAS D-292 показав повну морфологічну відповідність виду *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler, Schafer, Hummer, Kloboucek & Huss. Результати молекулярно-філогенетичного аналізу узгоджуються з висновками, що отримані на основі морфологічних спостережень. За нуклеотидною послідовністю ядерного гену 18S rDNA встановлено положення штаму в межах родини Scenedesmaceae, класи «Acutodesmus».

ВИСНОВКИ

1. Морфологічний аналіз штаму IPPAS D-292 показав його повну відповідність штаму *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler, Schafer, Hummer, Kloboucek & Huss.
2. Результати молекулярно-філогенетичного аналізу послідовності ядерного гену 18S rDNA показали на положення *Scenedesmus rubescens* IPPAS D-292 в межах родини Scenedesmaceae, класи «Acutodesmus».

ПОДЯКИ

Автори щиро вдячні завідувачу відділом внутрішньоклітинної регуляції та біотехнології фотоавтотрофних біосинтезів Інституту фізіології рослин ім. К.А. Тімірязєва РАН д.б.н., проф. Д.А. Лосю за надання штаму IPPAS D-292, а також завідувачу кафедри ботаніки Київського національного університету імені Тараса Шевченка д.б.н., проф. І.Ю. Костікову за поради та рекомендації при підготовці даної статті.

Список літератури

1. Kohan D.E. Biology of endothelin receptors in the collecting duct / D.E. Kohan // *Kidney International*. – 2009. – Vol. 76. – P.481–486.
2. Семенов В. С. Каталог культур сред микроводорослей в коллекциях СССР // 1991.- Москва: ИФР РАН. – С. 226.
3. Dangeard P.A. Recherches sur les algues inférieures / P.A. Dangeard // *Annales des sciences naturelles*. – 1888. – Bot. série.7. – P. 105-175.
4. Коршіков О.А. Volvocineae / О.А. Коршіков // *Визначник прісноводних водоростей УРСР*.- 1938. - Вип. 5. – К.: Вид-во АН УРСР. – 184 с.
5. Ettl, H. Beitrag zur Kenntnis der Morphologie der Gattung Chlamydomonas Ehrenberg. / H. Ettl. // *Archiv für Protistenkunde*. – 1965. – Vol. 108.-P. 271-420.
6. Bishoff H.W. Phycological Studies. IV. Some algae from enchanted rock and related algae species/ H.W. Bishoff., H.C. Bold // *Univ. Texas Publ.* – 1963. – № 6318. – P. 1-95.
7. White T.J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T.J. White, T. Bruns, S. Lee, [et al.] // *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.
8. Brody, J.R. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis / J.R. Brody, S.E. Kern. // *Anal Biochem*. 2004. № 333(1). P. 1-13.

9. Thompson J. Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice/ J. Thompson, D. Higgins, T. Gibson // Nucleic Acids Research. – 1994. – Vol. 22. – P. 4673-4680.
10. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach / J. Felsenstein // Mol Evol. – 1981. – Vol. 17. – P. 368–376.
11. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // Evolution. – 1985. – Vol. 39. – P. 783-791.
12. Kessler E. Physiological, biochemical, and molecular characters for the taxonomy of the subgenera of Scenedesmus (Chlorococcales, Chlorophyta) / E. Kessler, M. Schafer, C. Hummer [et al.] // Botanica Acta. – 1997. – Vol. 110. – P. 244-250.
13. Hegewald E. ITS2 sequence-structure phylogeny in the Scenedesmaceae with special reference to Coelastrum (Chlorophyta, Chlorophyceae), including the new genera Comasiella and Pectinodesmus / E. Hegewald, M. Wolf, A. Keller [et al.] // Phycologia. – 2010. – Vol. 49, N4. – P. 325-335.
14. Eliás M. Hylodesmus singaporensis gen. et sp. nov., a new asexual subaerial green alga (Scenedesmaceae, Chlorophyta) from Singapore/ M. Eliás, Y. Nemcova, P. Skaloud [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2010. – Vol. 60. – P. 1-12.
15. Kerfinand W. Physiological and biochemical contribution to the taxonomy of the genus Chlorella / W. Kerfinand, E. Kessler // Arch. Microbiol. – 1978. – Vol. 116. – P. 97-103.
16. Kalina T. Taxonomy of the subfamily Scotiellocoystoideae Fott 1976 (Chlorellaceae, Chlorophyceae)/ T. Kalina, M. Puncochářová // Arch. Hydrobiol. Suppl. – 1987. – Vol. 73, №4 (Algological Studies, 45). – P. 473-521/

Челебієва Э.С. Морфологические и молекулярно-филогенетические исследования *Scenedesmus rubescens* (Chlorophyta) / Э.С. Челебієва, С.В. Скребовская // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т. 26 (65), № 2. – С.189-196.

На основе анализа нуклеотидной последовательности 18S рРНК уточнено таксономическое положение штамма IPPAS D-292, реферируемого как *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. Установлено, что штамм IPPAS D-292 идентичен штамму CCAP 232/1 *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler, Schafer, Hummer, Kloboucek & Huss.

Ключевые слова: микроводоросли, Chlorophyta, таксономия, молекулярная филогения, кетокаротиноиды.

Chelebieva E.S. *Scenedesmus rubescens* (Chlorophyta) morphological and molecular phylogenetic studies / E.S. Chelebieva, S.V. Skrebovskaya // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2013. – Vol. 26 (65), No. 2. – P. 189-196.

Based of the of nucleic sequence analysis 18S rDNA the taxonomic status *Chlamydomonas reinhardtii* Dang (IPPAS D-292) is corrected. It is found that the strain IPPAS D-292 is identical to the strain CCAP 232/1 *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler, Schafer, Hummer, Kloboucek & Huss.

Keywords: microalgae, Chlorophyta, taxonomy, molecular phylogeny, ketocarotenoids.

Поступила в редакцию 15.04.2013 г.