

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДАННЫХ МОРФОЛОГИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ СИСТЕМАТИКИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ РОДА *CHLOROCOCCUM* И НЕКОТОРЫХ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ТАКСОНОВ

© 2019 г. А. Д. Темралеева<sup>а</sup>, \*, С. В. Москаленко<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пущино, 142290, Россия

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

Поступила в редакцию 25.06.2018 г.

После доработки 28.08.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

Подтверждена полифилия трех родов зеленых микроводорослей – *Chlorococcum*, *Deasonia* и *Neospongiococcum*. Часть видов рода *Chlorococcum* вместе с типовым видом *C. infusionum* вошли в состав макроклады *Moewusinia* и образовали истинную кладу *Chlorococcum*. Ее представители отличались сверхдлинными ITS2 с необычной вторичной структурой. Остальные являются членами макроклады *Stephanosphaerina* и должны быть переименованы. В результате наблюдений за аутентичными штаммами уточнены и дополнены морфологические диагнозы *N. gelatinosum*, *C. diplobionticum*, *C. isabeliense* и *C. sphacosum*. Предложения по номенклатурным изменениям даны на основании морфологического сходства, уровня замен в гене 18S рРНК, наличия компенсаторных замен в консервативных регионах ITS2, различий во вторичной структуре спейсера и в консервативном мотиве III шпильки.

**Ключевые слова:** идентификация, морфология, молекулярная систематика, 18S рРНК, ITS2, зеленые водоросли, *Chlorophyta*

**DOI:** 10.1134/S0026365619010087

Род *Chlorococcum* был впервые описан еще в XIX в. (Meneghini, 1842) и с тех пор неоднократно изменял свой объем (Коршиков, 1953; Silva, Starr, 1953; Trainor, Bold, 1954; Starr, 1955; Deason, Bold, 1960; Chantanachat, Bold, 1962; Bold, Parker, 1962; Trainor, Verses, 1967; McLean, 1968; Brown, McLean, 1969; McGuire, 1969; Archibald, Bold, 1970; Archibald, 1979; Metting, 1980; Ettl, Gärtner, 1987; Archibald, 1988; Chihara et al., 1994). Род характеризовался следующими морфологическими признаками: вегетативные клетки одиночные или во временных скоплениях, эллипсоидной и шаровидной формы, клеточная стенка гладкая, пристенный хлоропласт с отверстием или без него, пиреноид один или несколько, клетки одноядерные или многоядерные непосредственно перед размножением зооспорами, апланоспорами или изогаметами, зооспоры неметаболические, не меняют форму при движении и не округляются после остановки (*Chlamydomonas*-тип), с двумя жгутиками равной длины (Андреева, 1998). По данным AlgaeBase род включает в себя 89 видов (Guiry, Guiry, 2018), описанных из пресноводных, морских и наземно-воздушных местообитаний (Андреева, 1998; Костіков и соавт., 2001; Canter-

Lund, Lund, 1995; John, Tsarenko, 2002; Shubert, 2003).

Использование молекулярно-генетических методов позволило обнаружить полифилию рода и обосновало необходимость его ревизии (Nakayama et al., 1996; Klochkova et al., 2006; Kawasaki et al., 2015). Согласно последним номенклатурным изменениям по данным 18S рРНК-анализа (Watanabe, Lewis, 2017), истинные представители рода – типовой вид *C. infusionum*, *C. costatozygotum*, *C. echinozygotum*, *C. hypnosporum* – вошли в кладу *Chlorococcum*. Также в род *Chlorococcum* была перенесена часть видов родов *Neospongiococcum* и *Tetracystis* – *N. macropyrenoidosum*, *N. vacuolatum*, *T. aerea* и *T. polymorpha*, переименованные в *C. macropyrenoidosum*, *C. vacuolatum*, *C. aerium* и *C. polymorphum* соответственно. *C. dorsiventrale* и *C. littorale* образовали новый род *Alvikia*. Обе перечисленные клады находятся внутри макроклады *Moewusinia*. Виды *C. oleofaciens*, *C. elkhartiense*, *C. minutum* и *C. ellipsoideum* принадлежат макрокладе *Stephanosphaerina* и образуют другой род. Следует отметить, что исследование S. Watanabe и L. Lewis (2017) было сфокусировано на 18S рРНК-филогении только 12 видов рода *Chlorococcum*,

**Таблица 1.** Праймеры и условия амплификации гена 18S рРНК и спейсера ITS2

Локус	Праймер	Последовательность (5'–3')	Условия амплификации
18S рРНК	F	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	95°C – 5 мин;
	R	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTACG	95°C – 1 мин, 55°C – 1 мин, 72°C – 2 мин, 25 циклов; 72°C – 5 мин
ITS2	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	95°C – 3 мин;
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	95°C – 30 с, 57.6°C* – 30 с, 72°C – 1 мин*, 35 циклов*; 72°C – 10 мин

\* Оптимизация условий ПЦР.

другие виды и филогенетические маркеры не были охвачены.

В данной работе впервые для представителей полифилетичного рода *Chlorococcum* были одновременно исследованы морфологические характеристики 19 штаммов, проведен 18S рРНК-анализ и оценена вторичная структура спейсера ITS2.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Изоляция и культивирование штаммов водорослей.** Объектами данного исследования стали аутентичные штаммы рода *Chlorococcum* и некоторые близкородственные таксоны зеленых микроводорослей (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*), 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 (Algal Collection of Soil Science Institute, ACSSI): *Chlorococcum citriforme* ACSSI 200, *C. costatozygotum* ACSSI 201, *C. diplobionicum* ACSSI 202, *C. echinozygotum* ACSSI 203, *C. hypnosporum* ACSSI 205, *C. isabeliense* ACSSI 207, *C. oleofaciens* ACSSI 208, *C. sphacosum* ACSSI 209, *Neospongiococcum gelatinosum* ACSSI 217. Кроме того, дополнительно был изучен дикий штамм *Deasonia granata* ACSSI 152, изолированный к. б. н. Ю.М. Бачура (Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины). Культивирование штаммов проводили на среде BG11 с азотом (1% агар; pH 7.0) в климатостате при температуре 23–25°C, световом потоке 60–75 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup> и фотопериоде 12 ч (Темралеева и соавт., 2014).

**Микроскопия.** Морфологию и жизненные циклы штаммов изучали методами световой микроскопии (светлое поле и интерференционный контраст) с помощью микроскопов Leica DM750 и Carl Zeiss Axio Scope A1 (Германия) в ЦКП ИФХиБПП РАН. Результаты наблюдений документированы рабочими рисунками и фотографи-

ями, снятыми с помощью цветных цифровых камер "Видеозавр" (Россия) и Carl Zeiss MRc 5 (Германия). Сроки наблюдения составляли от 2 недель до 6 месяцев. При морфологической идентификации штаммов зеленых микроводорослей учитывали тип организации таллома, наличие и толщину слизистых оболочек, количество и тип хлоропластов, наличие и структуру пиреноида, форму и размеры клеток, способы размножения и другие характеристики. Названия таксонов приведены согласно Международной электронной базе данных AlgaeBase (Guiry, Guiry, 2018).

**Выделение, амплификация, очистка и секвенирование ДНК.** Суммарную ДНК выделяли с помощью колоночного набора DNeasy Plant Mini Kit ("Qiagen", США) и набора на магнитных частицах ФитоСорб ("Синтол", Россия), следуя протоколам производителей. Для амплификации использовали готовую смесь для ПЦР Screen Mix-HS ("Евроген", Россия). Праймеры для амплификации гена 18S рРНК и спейсера ITS2 были использованы из статей Katana et al. (2001) и White et al. (1990) соответственно, условия при необходимости были оптимизированы (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 филогенетического анализа гена 18S рРНК и спейсера ITS2 штаммов зеленых водорослей был выполнен поиск гомологии нуклеотидных последовательностей по алгоритму BLASTn в GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), составлены наборы из собственных и депонированных в генетические базы данных последовательностей, имеющих максимальную гомологию, длину прочтения и принадлежащих типовым видам и коллекционным аутентичным штаммам (табл. 2). В программе BioEdit по алгоритму ClustalW было выполнено множественное выравнивание (Hall, 1999). Для выбора модели нуклеотидных замен использова-

ли программу jModelTest (Darriba et al., 2012), ориентируясь на наименьший индекс AIC. Реконструкцию филогенетических взаимосвязей осуществляли с помощью метода максимального правдоподобия (ML) в программе PhyML. В качестве внешней группы выбрали представителя класса *Trebouxiophyceae* – *Chlorella vulgaris* (*Chlorophyta*). Статистическая поддержка топологии дерева была оценена с помощью бутстреп-анализа (1000 повторностей) и указана в узлах ветвей в виде процентов. Генетические различия между нуклеотидными последовательностями охарактеризовали с помощью генетических дистанций. Мерой генетических различий являлся процент несовпадений нуклеотидов при попарном сравнении выровненных последовательностей, вычисление которого проводили в программе MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013).

Для анализа вторичной структуры ITS2 была выполнена аннотация спейсера в ITS2-DataBase (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>), его фолдинг с помощью веб-сервера Mfold (<http://unafold.rna.albany.edu>) и визуализация посредством программы PseudoViewer3 (Byun, Han, 2009). Сравнение вторичной структуры между штаммами, поиск консервативных мотивов и компенсаторных замен осуществляли в программе 4SALE (Seibel et al., 2006). В качестве инструмента разделения видов был использован подход, предложенный A. Coleman (2000, 2009), которая показала, что наличие хотя бы одной компенсаторной замены в консервативных регионах ITS2 (10 пар нуклеотидов для II шпильки и 18 пар для III шпильки) у двух водорослей коррелирует с их полной половой несовместимостью. Напротив, замены в менее консервативных регионах (I и IV шпильки), а также полукompенсаторные замены в консервативных регионах не были связаны со способностью скрещиваться. На основе мета-анализа большого числа данных Müller et al. (2007) установили, что наличие даже одной компенсаторной замены в 93% исследованных случаев указывает на принадлежность организмов к разным видам. При оценке правильности фолдинга ITS2 зеленых водорослей ориентировались на работу Caisová et al. (2013).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Световая микроскопия.** Длительное наблюдение за морфологией и размножением перечисленных коллекционных штаммов, а также изучение литературных источников и первоописаний показало, что виды, традиционно относимые к роду *Chlorococcum*, имеют существенные различия в таких признаках как количество ядер, тип хлоропласта, структура крахмальной обертки пиреноида и др. (Андреева, 1998). Так в изученной выборке все виды рода *Chlorococcum*, кроме

*C. aquaticum* и *C. nivale*, имеют одно ядро. Большинство имеют полый шаровидный хлоропласт (рис. 1а, 1в, 1г, 1ж, 1з, 1л, 1м), за исключением *C. costatozygotum* с глубоководным и трещиноватым хлоропластом (рис. 1к) и *C. nivale* с лопастным хлоропластом (согласно рисунку Андреевой, 1998).

По строению крахмальной обертки пиреноида можно выделить 2 группы: виды со сплошной оберткой – *C. aquaticum*, *C. sphacosum* (рис. 1а), *C. citriforme* (рис. 1в), *C. elkhartiense*, *C. ellipsoideum*, *C. isabeliense* (рис. 1ж), *C. microstigmatum*, *C. minutum*, *C. nivale*, *C. oleofaciens* (рис. 1г), *C. rugosum*, *C. vacuolatum*, а также виды с сегментированной оберткой – *C. chlorococcoides*, *C. diplobionticum* (рис. 1з), *C. costatozygotum* (рис. 1к), *C. hypnosporum* (рис. 1л), *C. echinozygotum* (рис. 1м), *C. infusionum*, *C. polymorphum*. Кроме того, при наблюдении за аутентичными штаммами был выявлен ряд несоответствий их первоначальным морфологическим диагнозам. Так, например, у аутентичного штамма *C. diplobionticum* ACSSI 202 мы наблюдали сегментированную, а не сплошную крахмальную обертку пиреноида (рис. 1з) и способность к образованию комплексов клеток (рис. 1и), что ранее описано не было (Archibald, Bold, 1970). Однако в более раннем исследовании W. Herndon, открывшего данный вид, несмотря на отсутствие описания структуры крахмальной обертки пиреноида, по рисункам исследователя можно заключить, что она ближе к прерывистой (Herndon, 1958).

Согласно первоописаниям, *C. isabeliense* и *C. sphacosum* имеют массивные хлоропласты (Archibald, Bold, 1970). Однако при изучении аутентичных штаммов ACSSI 207 и ACSSI 209, соответственно, мы охарактеризовали хлоропласт как полый шаровидный, слегка рассеченный по краям в первом случае (рис. 1ж) и полый шаровидный с отверстием (рис. 1а) во втором. Кроме того, мы обратили внимание на морфологическую близость некоторых видов рода *Chlorococcum* с *Neosporangiococcum gelatinosum* ACSSI 217 (рис. 1б), который имел пристенный полый шаровидный хлоропласт, нетипичный для представителей рода *Neosporangiococcum* (Deason, 1971). Кроме того, наши дальнейшие наблюдения показали, что штамм ACSSI 152, идентифицированный и переданный в коллекцию к. б. н. Ю.М. Бачура как *Deasonia granata*, имел характерные признаки рода *Macrochloris* (Андреева, 1998) – центральный асимметричный хлоропласт (рис. 1д), несколько пиреноидов в зрелых клетках (рис. 1е).

**18S рРНК-анализ.** Морфологическую гетерогенность рода *Chlorococcum* подтвердил молекулярно-генетический анализ. Так, на 18S рРНК-дереве виды рода *Chlorococcum* не образовали единой клады, что подтверждает его полифилетичность

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

Вид	Авторское название штамма	Коллекционный штамм	Идентификационный номер GenBank		Местообитание
			18S рРНК	ITS2	
<i>Chlamydomodium starrii</i>	—	SAG 16.87*	AB983625	AB983644	Почва, Южная Африка
<i>Chlorococcum aquaticum</i>	64/88	UTEX 2222*	AB983622	KX147374	Озеро, Куба
<i>Chlorococcum chlorococcoides</i>	—	NIES-155	AB936287	—	Почва, Япония
<i>Chlorococcum citriforme</i>	E6B	ACSSI 200* (SAG 62.80)	<b>MG491514</b>	<b>MG582214</b>	Почва торфяников, США
<i>Chlorococcum costatozygotum</i>	T 51	ACSSI 201* (SAG 20.95)	<b>MG491515</b>	—	Почва соснового леса, Италия
<i>Chlorococcum diplobionticum</i>	—	ACSSI 202* (SAG 32.95)	<b>MG491512</b>	<b>MG582213</b>	Почва кукурузного поля, Ямайка
<i>Chlorococcum echinozygotum</i>	—	ACSSI 203* (SAG 213-5)	<b>MG491509</b>	—	Почва, Филиппины
<i>Chlorococcum elkhartiense</i>	15T3A	UTEX 1772*	AB936286	—	Почва торфяного болота, Индия
<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	T-1-3	UTEX 972*	U70586	—	Песчаная почва, США
<i>Chlorococcum hypnosporum</i>	F35-1	ACSSI 205* (SAG 213-6)	<b>MG491508</b>	—	Почва, США
<i>Chlorococcum infusionum</i> (T)	A 91	SAG 10.86	AB936281	—	Пресные воды, терр. бывш. Чехословакии
<i>Chlorococcum isabeliense</i>	P. I. 92	ACSSI 207* (SAG 65.80)	<b>MG491510</b>	<b>MG582211</b>	Прибрежный песок, США
<i>Chlorococcum microstigmatum</i>	18T2A	UTEX 1777*	AB983616	KX147360	Торфяное болото, США
<i>Chlorococcum minutum</i>	W7-2	SAG 213-7* (UTEX 117)	KR607490	KX147343	Почва, Индия
<i>Chlorococcum nivale</i>	—	UTEX 2225*	AB983623	AB983641	Снег, горы Высокие Татры, Словакия
<i>Chlorococcum oleofaciens</i>	FRT-2	ACSSI 208* (SAG 213-11)	<b>MG491516</b>	<b>MG582215</b>	Почва с поля, США
<i>Chlorococcum polymorphum</i>	—	UTEX 1242	AB936279	—	—
<i>Chlorococcum rugosum</i>	P.I.7-3	UTEX 1785*	AB983621	AB983639	Прибрежный песок, США
<i>Chlorococcum sphacosum</i>	W1D2	ACSSI 209* (UTEX 1787; SAG 66.80)	<b>MG491513</b>	KX147369	Почва сфагнового болота, США
<i>Chlorococcum vacuolatum</i>	—	SAG 213-8*	KF144189	KX147342	Почва, Южная Африка
<i>Chlorosarcinopsis minor</i> (T)	—	UTEX 949*	AB049415	—	—

Таблица 2. Окончание

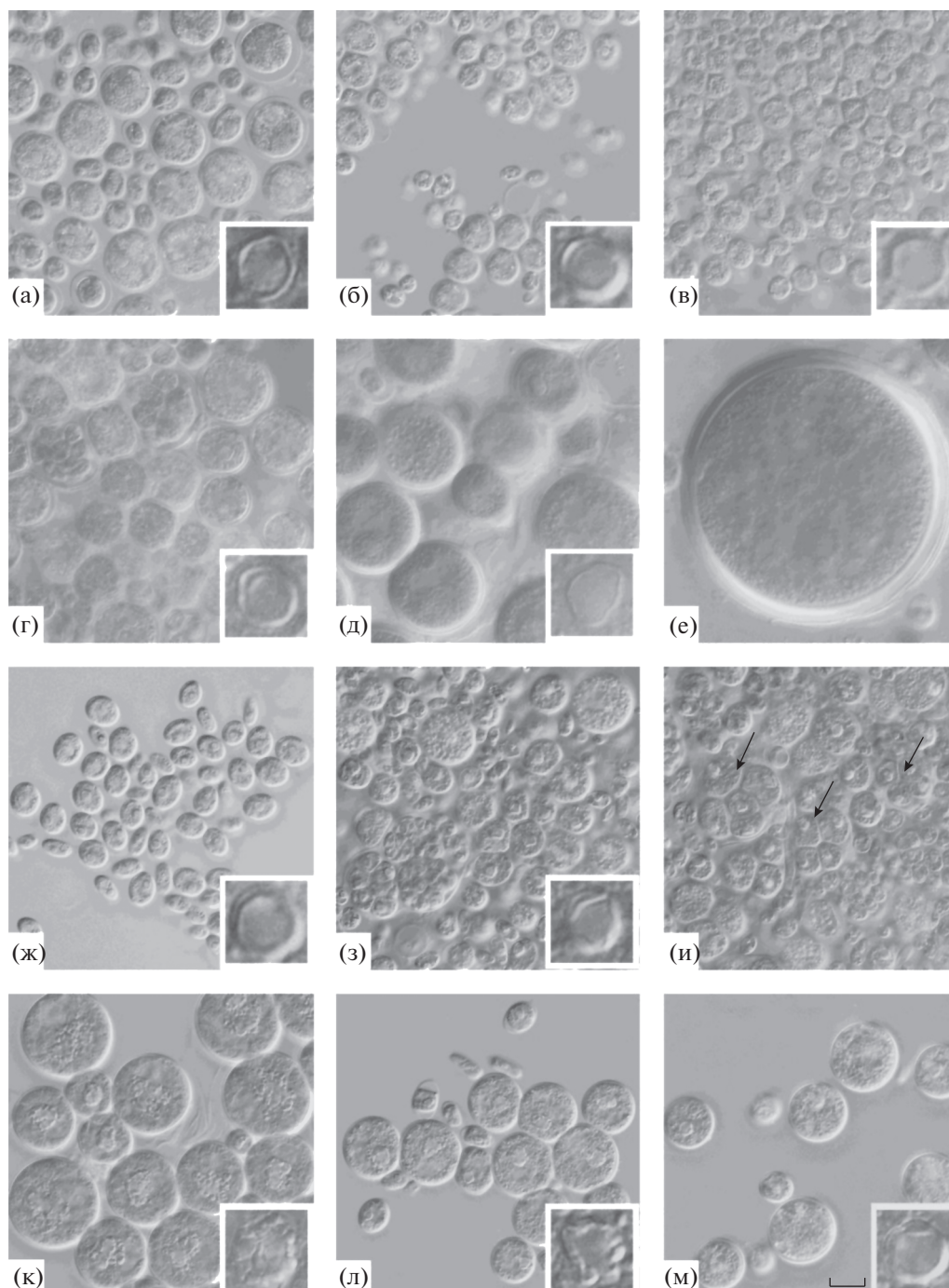
Вид	Авторское название штамма	Коллекционный штамм	Идентификационный номер GenBank		Местообитание
			18S рРНК	ITS2	
<i>Deasonia granata</i>	—	ACSSI 152	<b>MG491517</b>	<b>MG582216</b>	Почва, Беларусь
<i>Deasonia granata</i>	—	SAG 213-1*	KM020105	—	Почва, Чехия
<i>Deasonia multinucleata</i>	—	SAG 25.95*	KM020098	—	Садовая почва, Япония
<i>Deasonia prolifera</i> (T)	—	UTEX 1846*	AB936280	—	Почва с хлопкового поля, США
<i>Macrochloris radiosa</i>	—	SAG 213-2a*	KM020104	—	Почва, терр. бывш. Чехословакии
<i>Macrochloris rubrioleum</i>	—	CCCryo 340b-08*	AB983624	AB983643	Аэрофит, Шпицберген, Норвегия
<i>Neosporangiococcum alabamense</i> (T)	—	UTEX 960	AB972426	—	—
<i>Neosporangiococcum gelatinosum</i>	15 K1A	ACSSI 217* (SAG 64.80)	<b>MG491511</b>	<b>MG582212</b>	Торфяное болото, США
<i>Neosporangiococcum macropyrenoidosum</i>	—	UTEX 1839*	AB936284	—	Почва, США
<i>Neosporangiococcum vacuolatum</i>	—	UTEX 1838*	AB936283	—	Почва, США
<i>Protosiphon botryoides</i> (T)	—	UTEX B 99	JN880460	LC095629	Почва, США
<i>Sporangiobolus spongiosa</i> (T)	318	SAG 280-2b* (UTEX 1; CCAP 3/1)	KR607497	U34776	Почва, Швейцария
<i>Tetracystis aerea</i> (T)	C-6	SAG 89.80*	JN903990	—	Почва, США
<i>Tetracystis tetraspora</i>	59A	SAG 98.80*	JN968582	KM020024	Почва, Куба
Внешняя группа					
<i>Chlorella vulgaris</i> (T)	35	SAG 211-11b* (CCAP 211/11B; UTEX 259)	FM205832	AY591508	Пруд, Нидерланды

Примечание. Прочерк означает отсутствие данных; (T) – типовой вид; последовательности, полученные в данном исследовании, отмечены жирным шрифтом.

\* Аутентичный штамм.

(рис. 2). Истинными представителями рода могут считаться виды, образовавшие группу с типовым видом *C. infusionum*, а именно *C. costatozygotum* ACSSI 201, *C. hypnosporum* ACSSI 205, *C. chlorococcoides* NIES-155, *C. echinozygotum* ACSSI 203. Кроме того, к ним же были перенесены виды *N. macropyrenoidosum*, *N. vacuolatum*, *T. aerea* и *T. polymorpha* (Watanabe, Lewis, 2017). Все они вошли в макрокладу *Moewusinia* (Watanabe, Lewis, 2017). Различия в гене, кодирующем 18S рРНК, внутри клады "истинных" *Chlorococcum* составляли от 0.1 до 2%, при сравнении с *Chlorococcum*-подобными видами различия варьировали от 9.4 до 10.9%.

Сам род в настоящее время сложно выделить морфологически. Но, например, замечено, что кластеризация таксонов на дереве 18S рРНК соответствует их группированию по типу крахмальной обертки пиреноида (рис. 2): клады *Chlorococcum*, принадлежащую макрокладу *Moewusinia*, составляли водоросли с прерывистой крахмальной оберткой пиреноида. Среди представителей макроклады *Stephanosphaerinia* часть таксонов характеризовалась прерывистой крахмальной оберткой пиреноида, часть – сплошной. Вероятно, требуется более детальное изучение цитологических признаков вегетативных клеток и зооспор для разграничения таксонов. Остальные предста-

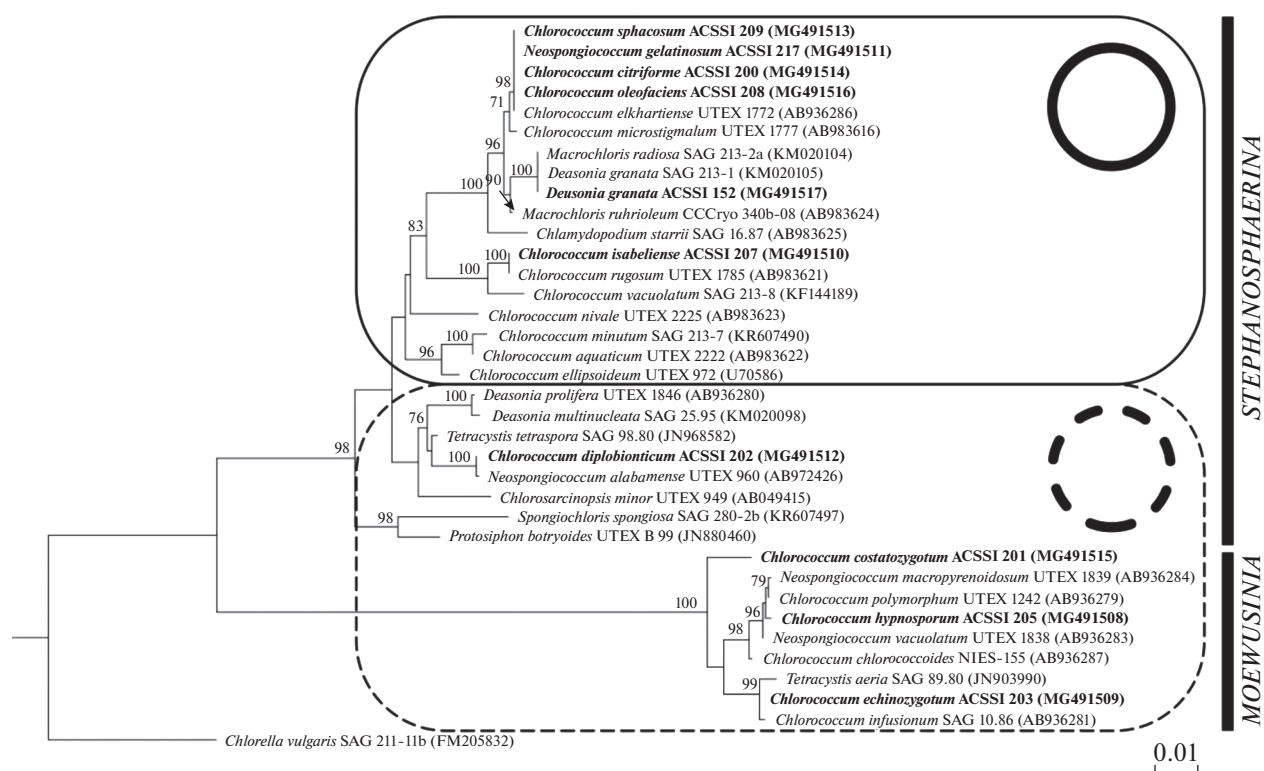


**Рис. 1.** Фотографии штаммов водорослей ACSSI: а – *C. sphacosum* ACSSI 209; б – *N. gelatinosum* ACSSI 217; в – *C. citriforme* ACSSI 200; г – *C. oleofaciens* ACSSI 208; д – молодые клетки и е – зрелая клетка *D. granata* ACSSI 152; ж – *C. isabeliense* ACSSI 207; з – одиночные клетки, и – комплексы клеток (указаны стрелками) *C. diplobionticum* ACSSI 202; к – *C. costatozygotum* ACSSI 201; л – *C. hynnosporum* ACSSI 205; м – *C. echinozygotum* ACSSI 203. Во вклейке представлена увеличенная фотография крахмальной обертки пиреноида. Масштабная линейка – 10 мкм.

вители *Chlorococcum* вошли в состав макроклады *Stephanosphaerinia* и разделились на четыре группы и отдельно *C. nivale* (рис. 2). Первая группа объединила *N. gelatinosum* ACSSI 217, *C. citriforme* ACSSI 200, *C. oleofaciens* ACSSI 208, *C. sphacosum*

ACSSI 209, *C. elkhartiense* UTEX 1772 и *C. microstigmatum* UTEX 1777 с различиями в гене 18S рРНК от 0 до 0.1%. Вторая группа со 100%-ной статистической поддержкой включает в себя *C. isabeliense* ACSSI 207, *C. rugosum* UTEX 1785 и *C. vacuolatum*





**Рис. 2.** Укорененное филогенетическое дерево некоторых видов рода *Chlorococcum* и близкородственных таксонов, построенное методом максимального правдоподобия (ML), на основе анализа гена 18S рРНК (1760 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 штаммы ACSSI.

SAG 213-8 (рис. 2). Между первыми двумя видами генетические различия в гене 18S рРНК отсутствуют, от *C. vacuolatum* они отличаются на 1.1%. В третью группу вошли *C. aquaticum*, *C. minutum*, *C. ellipsoideum* с генетическими дистанциями от 0.3 до 1%. В последнюю кладу образовал *C. diplobionticum* ACSSI 202 с *N. alabamense* и *T. tetraspora* с генетическими различиями в 0.1 и 1.0% соответственно.

Кроме того, в результате анализа установлена полифилия еще двух родов зеленых микроводорослей – *Deasonia* и *Neosporiococcum*. Кладу *Deasonia* образовали типовой вид *D. prolifera* и *D. multinucleata* (0.2% различий в гене 18S рРНК), а *D. granata* со 100%-ной статистической поддержкой группируется с *Macrochloris radiosa* (0% генетических различий), что позволяет перенести этот вид в род *Macrochloris*. Голотип рода *N. alabamense* вошел в кладу *Neosporiococcum*, остальные представители *N. gelatinosum*, *N. macropyrenoidosum*, *N. vacuolatum* были переименованы (Kawasaki et al., 2015; Watanabe, Lewis, 2017).

**Анализ вторичной структуры ITS2.** Поскольку 18S рРНК-анализа бывает недостаточно при исследовании близкородственных таксонов (Coleman, 2003; Hall et al., 2010), нами была дополни-

тельно изучена вторичная структура ITS2 для разделения коллекционных штаммов ACSSI по A. Coleman. Между *N. gelatinosum* ACSSI 217, *C. citrifforme* ACSSI 200 и *C. oleofaciens* ACSSI 208 не было обнаружено компенсаторных замен (рис. 3). Вторичная структура ITS2 данной группы отличается на 1 компенсаторную замену в I шпильке от ITS2 *C. sphaocosum* UTEX 1787 и *C. sphaocosum* ACSSI 152, между двумя последними структурами компенсаторных замен не выявлено. При сравнении перечисленных штаммов со штаммом *C. microstigmatum* UTEX 1777 в структуре ITS2 найдено 4 компенсаторные замены: одна – в I шпильке и три – на верхушке II шпильки (рис. 3). Все обнаруженные компенсаторные замены не относятся к заменам в консервативных регионах ITS2 и не учитываются при разграничении видов зеленых водорослей (Coleman, 2000, 2009).

Таким образом, учитывая генетические различия в гене 18S рРНК от 0 до 0.1%, отсутствие компенсаторных замен в консервативных регионах ITS2, одинаковую консервативную последовательность III шпильки (табл. 3) и сходные морфологические характеристики (тип хлоропласта, форма вегетативных клеток и зооспор, количество ядер, тип крахмальной обертки пиреноида), виды *N. gelatinosum*, *C. citrifforme*, *C. oleofaciens*,

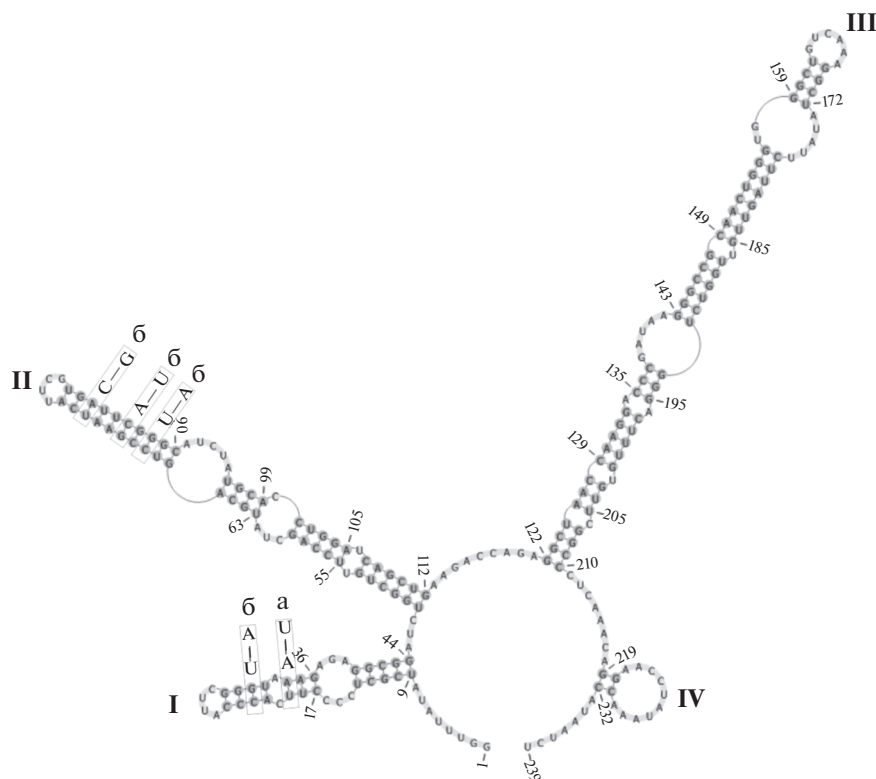


Рис. 3. Сравнение вторичной структуры ITS2 *C. oleofaciens* ACSSI 208 (показанная структура), *C. sphacosum* ACSSI 209 (а), *C. microstigmatum* UTEX 1777 (б).

*C. sphacosum* и *C. microstigmatum* следует объединить в один вид. Ранее *C. microstigmatum* был оставлен в качестве самостоятельного вида на основании формы стигмы (Kawasaki et al., 2015), что на наш взгляд и мнение других систематиков недостаточно (Ettl, Gärtner, 2014). Под сомнением оказывается самостоятельность вида *C. elkhartiense* (0–0.1% различий в гене 18S рРНК и сходные морфологические признаки), однако в генетических базах данных отсутствует депонированная последовательность ITS2 для аутентичного штамма UTEX 1772. Данный аутентичный штамм использовался в филогенетическом анализе рода *Chlorococcum* впервые. В ревизии Kawasaki et al. (2015) был исследован неаутентичный штамм *C. elkhartiense* UTEX 293, который не вошел в группу *C. oleofaciens* (макроклада *Stephanosphaerina*), а принадлежал макрокладу *Moewusinia*.

*D. granata* ACSSI 152 и *Macrochloris rubrioleum* CCCryo 340b-08 имеют идентичную консервативную последовательность III шпильки (табл. 3). Между ними было обнаружено 5 компенсаторных замен: одна в I шпильке, две — во II шпильке и две — в III, в том числе три из них в консервативных регионах ITS2 (рис. 4). Но определяется ли штамм ACSSI 152 самостоятельным видом *M. granata* или должен быть синонимизирован с *M. radiosa* невозможно без сравнения вторичной

структуры его ITS2 с *M. radiosa*, нуклеотидная последовательность которого в настоящее время в генетических базах данных отсутствует.

Группа штаммов *C. isabeliense* ACSSI 207, *C. rugosum* UTEX 1785, *C. vacuolatum* SAG 213-8 является морфологически сходной и имеет одинаковый консервативный мотив III шпильки (табл. 3). Между первыми двумя видами компенсаторные замены в ITS2 отсутствуют, благодаря чему их, возможно, следует объединить в один вид. От *C. vacuolatum* они отличаются на 2 компенсаторные замены (вершины I и II шпилек). Несмотря на то, что компенсаторные замены произошли в неконсервативных регионах, структура ITS2 *C. vacuolatum* сильно отличается от *C. isabeliense* и *C. rugosum*, что позволяет его оставить в качестве самостоятельного таксона (рис. 5). Морфологически *C. vacuolatum* отличается от близкородственных видов большими размерами вегетативных клеток и наличием толстой слизистой оболочки.

При сравнении вторичных структур ITS2 *Chlorococcum diplobionicum* ACSSI 202 и *Tetracystis tetraspora* SAG 98.80 было обнаружено две компенсаторные замены в неконсервативных участках ITS2 (рис. 6). Однако разница в длине спейсера и различия в консервативном мотиве III шпильки (табл. 3) дают возможность сохранить их в качестве отдельных видов.



**Таблица 3.** Характеристика вторичной структуры ITS2 некоторых видов рода *Chlorococcum* и близкородственных таксонов

Свойства ITS2 Штаммы	Суммарное количество нуклеотидов	Консервативная последовательность III шпильки
<i>C. citriforme</i> ACSSI 200*	239	UGGGUGGGCUGUCAAG
<i>C. microstigmatum</i> UTEX 1777*	236**	
<i>C. oleofaciens</i> ACSSI 208*	239	
<i>C. sphacosum</i> ACSSI 209*	238**	
<i>N. gelatinosum</i> ACSSI 217*	239	UGGGUGGGCUGUCAAAA
<i>Deasonia granata</i> ACSSI 152	245	
<i>Macrochloris rubrioleum</i> CCCryo 340b-08*	243	UGGGUGGGCAG—AAAU
<i>C. isabeliense</i> ACSSI 207*	235	
<i>C. rugosum</i> UTEX 1785*		
<i>C. vacuolatum</i> SAG 213-8*	224**	UGGGUGAGCAUUAACCU
<i>C. nivale</i> UTEX 2225*	312	
<i>C. aquaticum</i> UTEX 2222*	235	UGGGUGGGCAUUUCCAA
<i>C. minutum</i> SAG 213-7*	250	
<i>C. diplobionticum</i> ACSSI 202*	257	UGGGUAGGCAUUCACAG
<i>T. tetraspora</i> SAG 98.80*	238	UGGGUAGGCAUUCGGA—
<i>P. botryoides</i> UTEX 99*	268	UGAGUAGGCACUUGU—U
<i>S. spongiosa</i> SAG 280-2b*	239	
<i>Chlorococcum echinozygotum</i> ACSSI 203*	366	UAGGUAGGAGGGACCAU
<i>Chlorococcum hypnosporum</i> ACSSI 205*	402	UAGGUAGGCUCAAGGCA

Примечание. Жирным шрифтом выделены штаммы ACSSI; подчеркнут консервативный мотив верхушки III спирали.

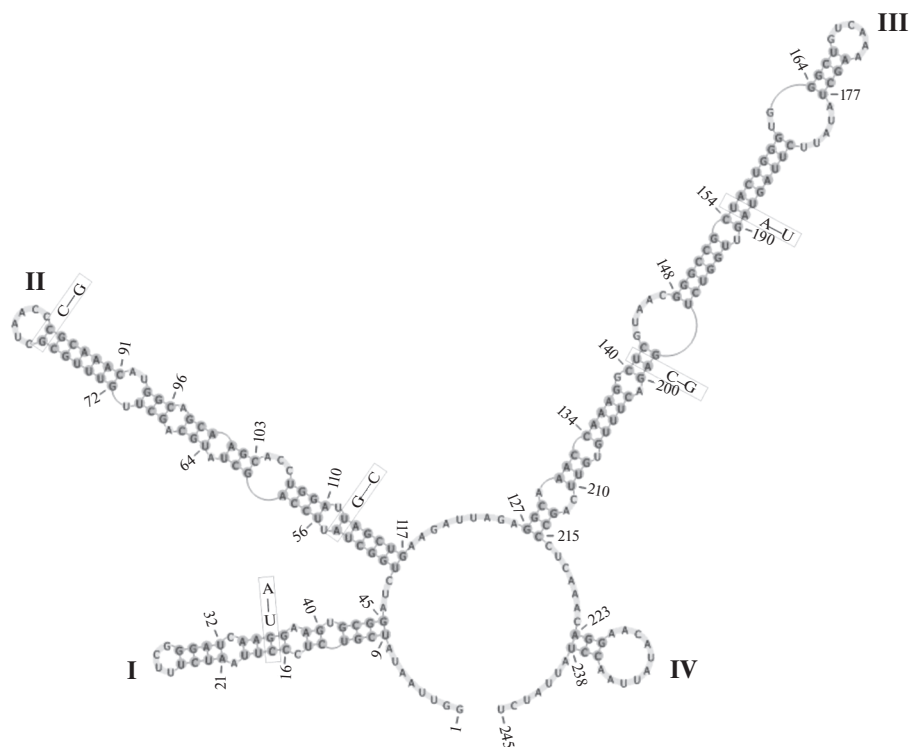
\* Аутентичные штаммы.

\*\* Частичная последовательность ITS2.

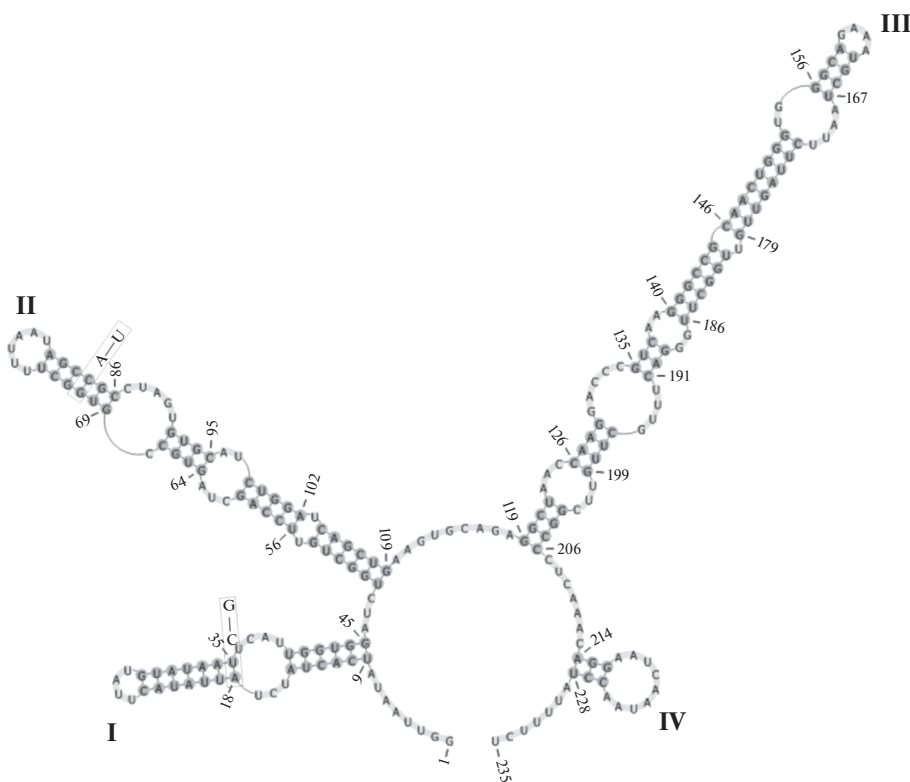
Все описанные штаммы имели длину ITS2 от 235 до 312 н. и типичную вторичную 4-х шпильчатую структуру. Исключением являлись штаммы *C. echinozygotum* ACSSI 203 и *C. hypnosporum* ACSSI 205, принадлежащие макрокладе *Moewusinia*, которые имели длину 366 и 402 н. (табл. 3). Первоначальный анализ вторичной структуры ITS2 этих двух видов показал несоответствие консенсусной модели принятой для классов *Chlorophyceae* и *Ulvophyceae* (Caisová et al., 2013) с полученной нами на основе принципа минимальной энергии на сервере Mfold (данные не представлены). Описание необычной вторичной структуры ITS2 истинных *Chlorococcum* готовится к публикации.

Таким образом, подтверждена полифилия трех родов зеленых микроводорослей — *Chlorococcum*, *Deasonia* и *Neosporiococcum*. Часть видов рода *Chlorococcum* вместе с типовым видом *C. infu-*

*sionum* вошли в состав макроклады *Moewusinia* и образовали истинную кладу *Chlorococcum*. Ее представители отличались сверхдлинными ITS2 с необычной вторичной структурой. Остальные являются членами макроклады *Stephanosphaerina* и должны быть переименованы. Уточнены и дополнены морфологические диагнозы некоторых аутентичных штаммов. Так, описан пристенный полый шаровидный хлоропласт у *N. gelatinosum* ACSSI 217, *C. isabeliense* ACSSI 207 и *C. sphacosum* ACSSI 209, а также сегментированная крахмальная обертка пиреноида у *C. diplobionticum* ACSSI 202. На основании морфологического сходства, уровня замен в гене 18S рРНК, наличия компенсаторных замен в консервативных регионах ITS2, различий во вторичной структуре спейсера и в консервативном мотиве III шпильки предложено объединить виды *N. ge-*



**Рис. 4.** Сравнение вторичной структуры ITS2 *D. granata* ACSSI 152 (показанная структура) и *M. rubrioleum* CCCгюо 340b-08 (во вклейках).



**Рис. 5.** Сравнение вторичной структуры ITS2 *C. isabeliense* ACSSI 207 (показанная структура) и *C. vacuolatum* SAG 213-8 (во вклейках).

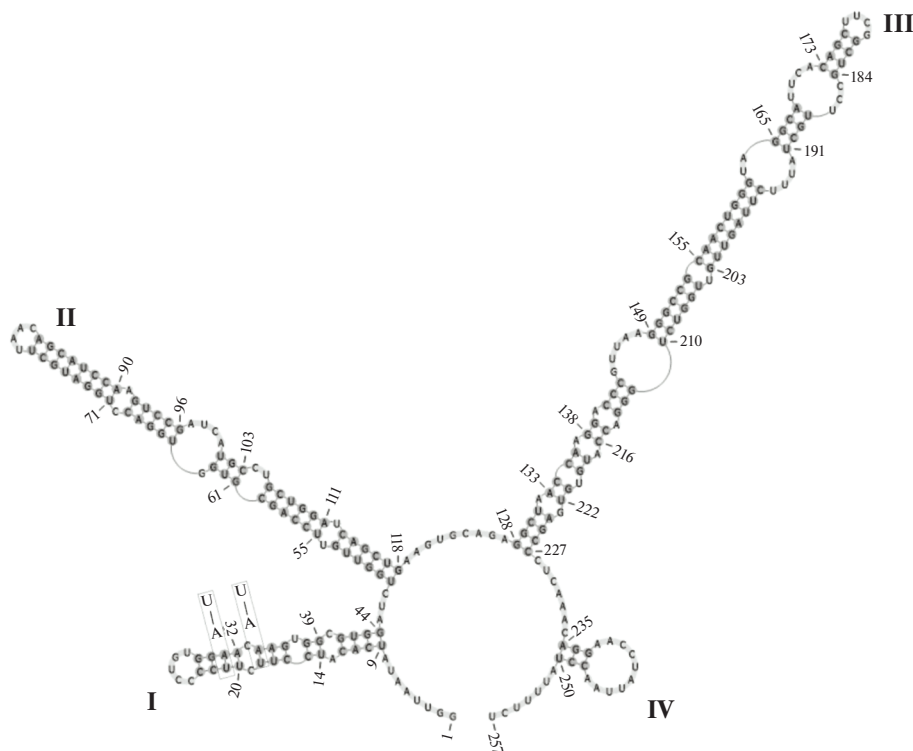


Рис. 6. Сравнение вторичной структуры ITS2 *Chlorococcum diplobionicum* ACSSI 202 (показанная структура) и *Tetracystis tetraspora* SAG 98.80 (во вклейках).

*latinosum*, *C. citriforme*, *C. oleofaciens*, *C. sphacosum* и *C. microstigmatum* в один вид, а виды *C. vacuolatum*, *C. diplobionicum* и *T. tetraspora* оставит в качестве самостоятельных. Следует отметить, что на достоверность филогенетических выводов влияет полнота генетических баз данных и доступность необходимых нуклеотидных последовательностей конкретных таксонов, например, последовательностей ITS2 *C. elkhartiense* и *M. rubrioleum*.

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 по анализу вторичной структуры ITS2, а также к. б. н., доц. кафедры ботаники и физиологии растений Гомельского государственного университета им. Ф. Скорины Ю.М. Бачура за депонирование штамма *Deasonia granata* (ACSSI 152).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60020 мол\_а\_дк.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (*Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales*). СПб.: Наука, 1998. 351 с.

Коршиков О.А. Підклас протококові (*Protococcineae*) // Визначник прісноводних водоростей УРСР. Київ: Вид-во АН УРСР, 1953. Вип. 5. 440 с.

Темралева А.Д., Минчева Е.В., Букин Ю.С., Андреева А.М. Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (*Chlorophyta*). Кострома: Костромской печатный дом, 2014. 215 с.

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: Фітосоціцентр, 2001. 300 с.

Archibald P. Descriptions of new edaphic and aquatic species of *Chlorococcum* Meneghini (*Chlorococcales*) // Brit. Phycol. J. 1979. V. 14. P. 305–312.

Archibald P.A., Bold H.C. Phycological studies XI. The genus *Chlorococcum* Meneghini // University of Texas Publication. 1970. № 7015. P. 1–115.

Archibald P.A. *Chlorococcum pamirum* and *C. salinum*, two new species of the *Chlorophyceae* from Central Asia // Brit. Phycol. J. 1988. V. 23. P. 121–128.

Bold H.B., Parker B.C. Some supplementary attributes in the classification of *Chlorococcum* species // Arch. Microbiol. 1962. V. 42. P. 267–288.

Brown R.M., McLean R.J. New taxonomic criteria in the classification of *Chlorococcum* species. II. Pyrenoid fine structure // J. Phycol. 1969. V. 5. P. 114–118.

Byun Y., Han K. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1435–1437.

- Caisová L., Marin B., Melkonian M. A consensus secondary structure of ITS2 in the *Chlorophyta* identified by phylogenetic reconstruction // *Protist*. 2013. V. 164. P. 482–496.
- Canter-Lund H., Lund J.W.G. *Freshwater Algae. Their Microscopic World Explored*. Bristol: UK Biopress, 1995. 360 p.
- Chantanachat S., Bold H.C. *Phycological studies. II. Some algae from arid soils* // University of Texas Publications. 1962. № 6218. P. 1–74.
- Chihara M., Nakayama T, Inoue I., Kodama M. *Chlorococcum littorale*, a new marine green coccoid alga (*Chlorococcales*, *Chlorophyceae*) // *Archiv für Protistenkunde*. 1994. V. 144. № 3. P. 227–235.
- Coleman A.W. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2009. V. 50. P. 197–203.
- Coleman A.W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons // *Trends Genet.* 2003. V. 19. P. 370–375.
- Coleman A.W. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence // *Protist*. 2000. V. 151. P. 1–9.
- Darriba D., Taboada G. L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // *Nature Methods*. 2012. V. 9. № 8. P. 772.
- Deason T.R. The genera *Spongiococcum* and *Neospongiococcum*. I. The genus *Spongiococcum* and the multinucleate species of the genus *Neospongiococcum* // *Phycologia*. 1971. V. 10. P. 17–27.
- Deason T.R., Bold H.C. *Phycological studies. I. Exploratory studies of Texas soil algae* // University of Texas Publication. 1960. № 6022. P. 1–72.
- Ettl H., Gärtner G. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. 2. Auflage*. Springer: Berlin Heidelberg, 2014. 773 p.
- Ettl H., Gärtner G. Taxonomic and nomenclatural changes and descriptions of new taxa of the *Tetrasporales*, *Chlorococcales* and *Gloeodendrales* (*Chlorophyta*, *Chlamydomophyceae* and *Chlorophyceae*) // *Nova Hedwigia*. 1987. V. 44. P. 509–517.
- Guiry M.D., Guiry G.M. *AlgaeBase. World-wide electronic publication*, National University of Ireland, Galway. 2018. <http://www.algaebase.org>. Searched on 24 May 2018.
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999. № 41. P. 95–98.
- Hall J.D., Fučíková K., Lo C., Lewis L.A., Karol K.G. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae // *Cryptogamie, Algol.* 2010. V. 31. P. 529–555.
- Herndon W. Some new species of chlorococcacean algae // *Am. J. Bot.* 1958. V. 45. P. 308–323.
- John D.M., Tsarenko P.M. *Order Chlorococcales* // *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae* / Eds. John D.M., Whitton B.A., Brook A.J. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. P. 327–409.
- 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* (*Volvoales*, *Chlorophyceae*) and its relatives // *J. Phycol.* 2015. V. 51. P. 1000–1016.
- Klochkova T.A., Kang S.H., Cho G.Y., Pueschel C.M., West J.A., Kim G.H. Biology of a terrestrial green alga *Chlorococcum* sp. (*Chlorococcales*, *Chlorophyta*), collected from the Miruksazi stupa in Korea // *Phycologia*. 2006. V. 45. P. 349–358.
- McGuire R.F. Attributes of *Chlorococcum* species: A numerical analysis // *J. Phycol.* 1969. V. 5. P. 220–223.
- McLean R.J. New taxonomic criteria in classification of *Chlorococcum* species. I. Pigmentation // *J. Phycol.* 1968. V. 4. P. 328–332.
- Meneghini G. *Monographia Nostochinearum Italicarum addito specimine de Rivulariis. Memorie della Reale Accademia delle Scienze di Torino. Ser. 2.* 1842. V. 5. P. 1–143.
- Metting B. New species of green microalgae (*Chlorophyta*) from an eastern Washington silt loam // *Phycologia*. 1980. V. 19. P. 296–306.
- Müller T., Philippi N., Dandekar T., Schultz J., Wolf M. Distinguishing species // *RNA*. 2007. V. 3. P. 1469–1472.
- Nakayama T., Watanabe S., Mitsui K., Uchida H., Inouye I. The phylogenetic relationship between *Chlamydomonadales* and *Chlorococcales* inferred from 18S rDNA sequence data // *Phycol. Res.* 1996. V. 44. № 1. P. 47–55.
- Seibel P.N., Müller T., Dandekar T., Schultz J., Wolf M. 4SALE – a tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing // *BMC Bioinformatics*. 2006. V. 7. P. 498.
- Shubert E. Nonmotile coccoid and colonial green algae // *Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification* / Eds. Wehr J.D., Sheath R.G. San Diego: Academic Press, 2003. P. 253–309.
- Silva P.C., Starr R.C. Difficulties in applying the International Code of Botanical Nomenclature to certain unicellular algae, with special reference to *Chlorococcum* // *Svensk Botanisk Tidskrift*. 1953. V. 47. № 2. P. 235–247.
- Starr R.C. A comparative study of *Chlorococcum meneghini* and other spherical, zoospore-producing genera of the *Chlorococcales* // *Indiana University Publications Science*. 1955. V. 20. P. 1–111.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 2725–2729.
- Trainor F.R., Bold H.C. Three new unicellular *Chlorophyceae* from soil // *Am. J. Bot.* 1954. V. 40. P. 758–767.
- Trainor F.R., Verses P.A. A new *Chlorococcum* from a Connecticut cornfield soil // *Phycologia*. 1967. V. 6. № 4. P. 237–239.
- Watanabe S., Lewis L.A. Phylogenetic interpretation of light and electron microscopic features of selected members of the phylogroup *Moewusinia* (*Chlorophyceae*), with new generic taxonomy // *Phycologia*. 2017. V. 56. № 3. P. 329–353.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* / Eds. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. San Diego: Acad. Press, 1990. V. 3. P. 315–322.

## Application of Morphological and Molecular Systematics for Identification of Green Microalgae of the Genus *Chlorococcum* and Some Closely Related Taxa

A. D. Temraleeva<sup>1,\*</sup> and S. V. Moslalenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

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

Received June 25, 2018

Revised August 28, 2018

Accepted October 2, 2018

**Abstract**—Polyphyly of three genera of green microalgae, *Chlorococcum*, *Deasonia*, and *Neosporangiococcum*, was confirmed. Some *Chlorococcum* species, together with the type species *C. infusionum*, formed a true clade *Chlorococcum* within the macroclade *Moewusinia*. Its members were characterized by extremely long ITS2 regions with unusual secondary structure. Other species were found to belong to the *Stephanosphaerina* macroclade, and should be reclassified accordingly. The research of authentic strains resulted in revised and enhanced morphological descriptions of *N. gelatinosum*, *C. diplobonticum*, *C. isabeliense*, and *C. sphacosum*. Proposals on taxonomic revision are based on morphological similarity, 18S rRNA distances, presence of compensatory base changes in ITS2 conserved regions, differences in the secondary structure of the spacer, and differences of the Helix III conserved motif.

**Keywords:** identification, morphology, molecular taxonomy, 18S rRNA, ITS2, green algae, *Chlorophyta*