

***Hemiflagellochloris* (Chlorophyceae, Chlorophyta) — новый
для флоры России род зеленых водорослей**

А. Д. Темралеева¹, Е. В. Минчева², Ю. С. Букин²,
М. В. Ельцов¹, **В. А. Демкин**¹, Д. Ю. Щербаков^{2,3},
Д. Л. Пинский¹

¹ Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, ул. Институтская, д. 2, Пушкино, 142290, Россия; temraleeva.anna@gmail.com

² Лимнологический институт СО РАН, ул. Улан-Баторская, д. 3, Иркутск, 664033, Россия; elenakuznetsova01@gmail.com

³ Иркутский государственный университет, ул. Сухэ-Батора, д. 5, Иркутск, 664003, Россия; dysh007@gmail.com

Резюме. Род *Hemiflagellochloris* Watanabe *et al.* впервые приводится для территории России. Представитель рода был изолирован из погребенного солонца в зоне сухих степей (северная часть Ергенинской возвышенности, Волгоградская область). Описана морфология и экология данного штамма, на основе молекулярно-генетического анализа фрагмента гена 18S рДНК установлено его филогенетическое положение внутри класса *Chlorophyceae*.

Ключевые слова: зеленые водоросли, новая находка, *Hemiflagellochloris*, солонец, зона сухих степей, Ергенинская возвышенность, Россия.

Hemiflagellochloris (Chlorophyceae, Chlorophyta),
a new for Russian flora genus of green algae

A. D. Temraleeva¹, E. V. Mincheva², Yu. S. Bukin², M. V. Eltsov¹,
V. A. Demkin¹, D. Yu. Sherbakov^{2,3}, D. L. Pinsky¹

¹ Institute of Physico-Chemical and Biological Problems of Soil Science RAS, Institutskaya Str., 2, Pushchino, 142290, Russia; temraleeva.anna@gmail.com

² Limnological institute SB RAS, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia; elenakuznetsova01@gmail.com

³ Irkutsk State University, Sukhe-Bator Str., 5, Irkutsk, 664003, Russia; dysh007@gmail.com

Abstract. The genus *Hemiflagellochloris* Watanabe *et al.* was found in Russia for the first time. The algal strain was isolated from a buried solonetz in the zone of dry steppes (the north-end of Ergeni Hills, Volgograd Region). The morphology and ecology of this isolate are described. Its phylogenetic position within Chlorophyceae is determined by molecular analysis of 18S rDNA gene.

Keywords: green algae, new record, *Hemiflagellochloris*, solonetz, zone of dry steppes, Ergeni hills, Russia.

Введение

Новый род зеленых водорослей *Hemiflagellochloris* Watanabe *et al.* был описан относительно недавно (Watanabe *et al.*, 2006b). Штамм типового вида *Hemiflagellochloris kazakhstanica* Watanabe *et al.* был изолирован из почвенных образцов засоленных орошаемых земель бассейна р. Или, Казахстан. Зооспоры данной водоросли характеризуются отсутствием стигмы, наличием оболочки и двух жгутиков, сильно (почти в 2 раза) различающихся по длине. Молекулярно-генетический анализ последовательностей 18S и 28S рДНК показал, что данный род формирует самостоятельную ветвь, отдельную от зеленых водорослей, имеющих слегка неравные жгутики: *Heterochlamydomonas* Cox et Deason, *Spermatozopsis similis* Preisig et Melkonian, *Fasciculochloris* McLean et Trainor и *Heterotetracystis* Cox et Deason (Watanabe *et al.*, 2006b). Поскольку до настоящего времени в альгологической литературе не было упоминаний о находках *H. kazakhstanica* в почвах России, данная работа представляет собой первое такое описание.

Материалы и методы

Изоляция и культивирование штамма. Объектом данного исследования послужил штамм ACSSI 100 из коллекции культур водорослей ИФХиБПП РАН — ACSSI (Algal Collection of Soil Science Institute). Штамм был изолирован из верхнего горизонта А1 солонца мелкого, погребенного под почвенно-грунтовым слоем мощностью 25 см около кургана в результате мелиоративной распашки территории в 1970-х гг. Курган располагается в северной части Ергенинской возвышенности (Волгоградская область, Россия, зона сухих степей (Добровольский, Урусевская, 2004)). Географические координаты места отбора: 47°53'21" с. ш., 44°0'50" в. д. Содержание гумуса и рН почвы составляли 0.66 % и 8.6 соответственно. Культивирование штамма проводили на среде BG11 с азотом (1%-ный агар, рН = 7.0) при температуре +23–25 °С, освещенности 2000 Лк и световом режиме 12 : 12 ч.

Световая микроскопия. Изучение морфологии и жизненного цикла исследуемого штамма проводили методами световой микроскопии (светлое поле и интерференционный контраст) с помощью микроскопов Leica DM750 и Carl Zeiss Axio Scope A1 (Германия). Результаты наблюдений документированы рабочими рисунками и фотографиями, снятыми с помощью цветных цифровых камер «Видеозавр» (Россия) и Carl Zeiss MRc 5 (Германия). Для таксономической

идентификации проводили несколько прижизненных цитохимических реакций: на крахмал — раствором Люголя, на общие очертания слизи — 1%-ным раствором туши, на структуру слизи — 0.1%-ным раствором метиленового синего. Сроки наблюдения за штаммом составляли от 12 часов до 12 месяцев.

Экстракция, амплификация и секвенирование ДНК. ДНК выделяли из альгологически чистой культуры штамма с помощью 2%-ного лизирующего буфера СТАВ и протеиназы К (20 мг/мл) с последующей экстракцией смесью хлороформ-изоамиловый спирт (24 : 1) (Doyle, Dickson, 1987). Праймеры и условия амплификации фрагмента ядерного гена 18S рДНК указаны в таблице 1.

Таблица 1

**Праймеры и условия амплификации фрагмента гена 18S рДНК
(Katana et al., 2001)**

Primers and amplification conditions for 18S rDNA analysis (Katana et al., 2001)

Праймер Primer	Последовательность (5'–3') Sequence (5'–3')	Условия амплификации Amplification conditions
18S F	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	95 °C — 5 мин 95 °C — 1 мин 55 °C — 1 мин 72 °C — 1 мин 72 °C — 2 мин
18S R	TGATCCTTCTGCAGTTTCACCTACG	

Ампликоны анализировали электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили на базе ЗАО «Синтол» (Москва, Россия).

Филогенетический анализ. Для сравнительного филогенетического анализа был использован набор последовательностей 18S рДНК штаммов зеленых водорослей из базы данных GenBank (табл. 2).

Реконструкцию филогенетических взаимосвязей осуществляли методом максимального правдоподобия (ML) в программе PhyML и методом Байеса в программе MrBayes 3.1 с повторностью 1000 реплик. В качестве внешней группы использовали представителей рода *Trebouxia* Ruymala (*Trebouxiophyceae*). Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе BioEdit по алгоритму ClustalW. Общая длина анализируемых последовательностей составила 1349 пар нуклеотидов. Для выбора модели нуклеотидных замен использовали программу jModelTest. Статистическая поддержка топологии деревьев была оценена с помощью бутстреп-анализа и апостериорной вероятности и указана в узлах ветвей.

Таблица 2

Список штаммов водорослей, использованных в филогенетическом анализе

List of algal strains used for phylogenetic analysis

Таксон Taxon	Коллекция, номер штамма Collection number of strain	Номер последовательности в GenBank (18S рДНК) Accession number from GenBank (18S rDNA)
Chlorophyceae		
<i>Carteria radiosa</i> Korshikov	UTEX 835	AF182819
<i>Carteria</i> sp.	UTEX 2	AF182817
<i>Chlamydomonas asymmetrica</i> Korshikov	SAG 70.72	U70788
<i>C. baca</i> Ettl	SAG 24.87*	U70781
<i>C. oblonga</i> Pringsheim	SAG 11-60a*	AF395434
<i>C. rapa</i> Ettl	SAG78.72	U70790
<i>C. reinhardtii</i> Dangeard (T)	CC-400	M32703
<i>C. zebra</i> Korschikov	SAG 10.83*	U70792
<i>Chloromonas radiata</i> (Deason et Bold) Pröschold, Marin, Schlösser et Melkonian (= <i>Chlamydomonas radiata</i> Deason et Bold)	UTEX 966*	U57697
<i>C. reticulata</i> (Goroschankin) Gobi (T)	UTEX 1970	U70791
<i>C. rosae</i> Ettl	UTEX 1337	U70796
<i>Desmotetra delicata</i> (Watanabe) Watanabe	NIES 153	AB218710
<i>D. stigmatica</i> (Deason) Deason et Floyd (T)	UTEX 962	AB218711
<i>Fasciculochloris boldii</i> McLean et Trainor (T)	UTEX 1451*	AB244240
<i>Hemiflagellochloris kazakstanica</i> Watanabe, Tsujiimura, Misono, Nakamura et Inoue (T)	BAKg15 = NIES 1722*	AB244244
<i>Hemiflagellochloris</i> cf. <i>kazakstanica</i>	ACSSI 100	KF652114
<i>Heterochlamydomonas inaequalis</i> Cox et Deason (T)	UTEX 1705* = SAG 4.75*	AF367857
<i>H. lobata</i> Langford et Cox	UTEX 728	AF367858
<i>H. rugosa</i> Langford et Cox	SAG 45.86	AF367859
<i>Heterotetracystis akinetos</i> Cox et Deason (T)	UTEX 1675	AB244242
<i>Lobochlamys culleus</i> (Ettl) Pröschold, Marin, Schlösser et Melkonian (= <i>Chlamydomonas culleus</i> Ettl)	SAG 17.73*	AJ410461
<i>L. segnis</i> (Ettl) Pröschold, Marin, Schlösser et Melkonian (T) (= <i>Chlamydomonas fimbriata</i> Ettl)	SAG 17.72*	U70784
<i>Neochlorosarcina auxotrophica</i> (Groover et Bold) Watanabe	UTEX 722	AB218696
<i>N. deficiens</i> (Groover et Bold) Watanabe	UTEX 1700*	AB218697
<i>N. pseudominor</i> (Groover et Bold) Watanabe	UTEX 1702*	AB218714

Окончание табл. 2

Таксон Taxon	Коллекция, номер штамма Collection number of strain	Номер последовательности в GenBank (18S рДНК) Accession number from GenBank (18S rDNA)
<i>Oogamochlamys gigantea</i> (Dill) Pröschold, Marin, Schlösser et Melkonian (T) (= <i>Chlamydomonas gigantea</i> Dill)	UTEX 1753	AJ410467
<i>Oogamochlamys zimbabwiensis</i> (Heimke et Starr) Pröschold, Marin, Schlösser et Melkonian (= <i>Chlamydomonas zimbabwiensis</i> Heimke et Starr)	UTEX 2213*	AJ410471
<i>Paulschulzia pseudovolvox</i> (Schultz) Skuja (T)	UTEX 167	U83120
<i>Sarcinochlamys stigmatica</i> Watanabe (T)	ASIB T105	AB218709
<i>Spermatozopsis similis</i> Preisig et Melkonian	SAG 1.85*	X65557
<i>Tetraspora</i> sp.	UTEX 234	U83121
<i>Volvox carteri</i> Stein	UTEX 1885	X53904
Trebouxiophyceae (внешняя группа)		
<i>Trebouxia aggregata</i> (Archibald) Gärtner	SAG 219-1d* = CCAP 219/1D; UTEX 180	EU123942
<i>T. asymmetrica</i> Friedl et Gärtner	SAG 48.88* = UTEX 2507	Z21553

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

Note. (T) — type species, * — authentic strain, blank means data absence.

Результаты и обсуждение

Морфологическое описание. За жизненным циклом штамма ACS-SI 100 наблюдали в течение длительного периода времени (до 1 года включительно). Стадии жизненного цикла изолята представлены на рис. 1.

Молодые клетки, развивающиеся из зооспор, широкоэллипсоидные, яйцевидные или веретеновидные (рис. 1, *a*). По мере роста клетки приобретают шаровидную форму, до 13–16 мкм в диам., иногда с выступающим утолщением, которое является остатком вытянутого конца зооспоры (рис. 1, *b*), диаметр зрелых клеток может достигать 30 мкм и более. Оболочка тонкая. Хлоропласт один, пристенный, полый, шаровидный. Пиреноид один, с несплошной оберткой из 3–6 крахмальных скорлупок. В культуре часто наблюдаются не только одиночные вегетативные клетки, но и сарциноидные пакеты в материнской оболочке по 2, 4, 8 клеток (рис. 1, *c, d*), образованные, вероятно, путем десмосхизиса. Бесполое размножение апланоспорами и зооспорами,

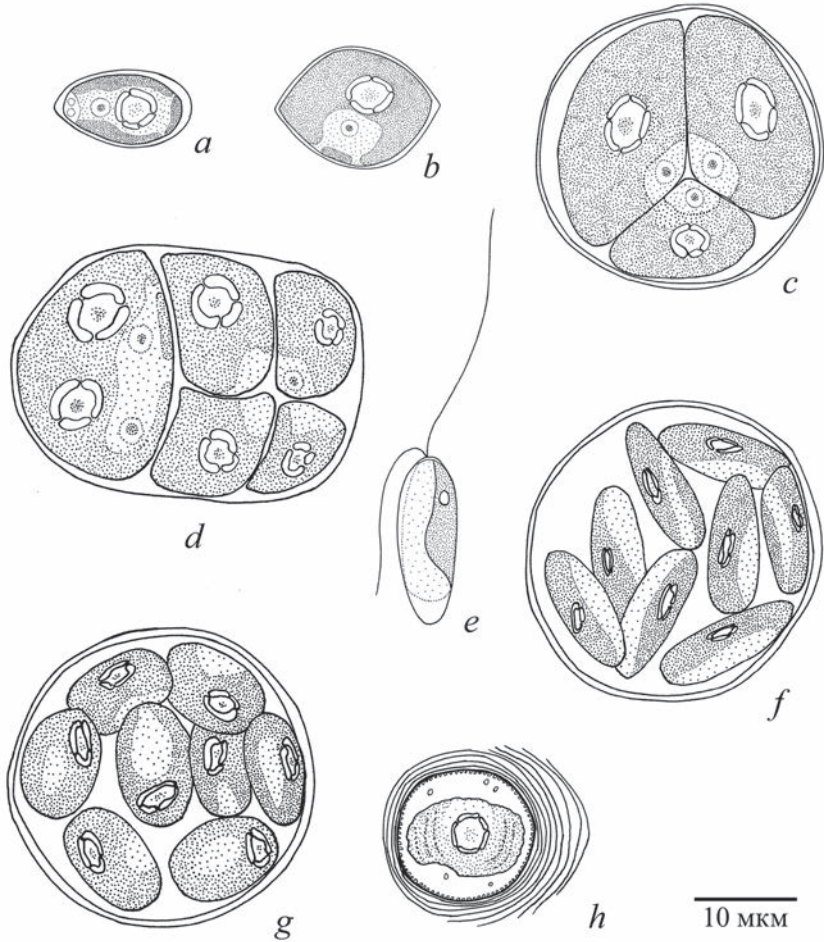


Рис. 1. *Hemiflagellochloris* cf. *kazakhstanica* ACSSI 100.

a — молодые вегетативные клетки, развившиеся из зооспор; *b* — вегетативные клетки со слизистым утолщением; *c, d* — формирование пакетов клеток; *e* — зооспора с двумя неравными жгутиками; *f* — зооспорангий; *g* — апланоспорангий; *h* — старая клетка с концентрической слизистой оболочкой. Масштабная линейка: 10 мкм.

a — young vegetative cells, derived from zoospores; *b* — vegetative cells with mucilaginous thickening; *c, d* — a formation of cell packets; *e* — a zoospore with two flagella of unequal lengths; *f* — a zoosporangium; *g* — an aplanosporangium; *h* — an old cell with concentric mucilage. Scale bar: 10 μm .

которые образуются при последовательном делении. В зооспорангии находится от 4 до 16 зооспор с носиком, но без стигмы (рис. 1, *f*). Зооспоры удлинненно-веретеновидной или эллипсоидной формы, 3.8–7 мкм шир. и 12.9–15 мкм дл., с 2 неравными жгутиками: более длинный 15–18 мкм, более короткий 9–10 мкм (рис. 1, *e*). При движении длинный жгутик направлен вперед, а короткий назад. Хлоропласт занимает большую часть клетки с центральным пиреноидом; ядро, как правило, переднее. На переднем конце клетки присутствуют 2 сократительные вакуоли. Зооспоры после движения не округляются и сохраняют свою форму. В апланоспорангиях находится до 8 апланоспор, 8.5–11 мкм в диам. (рис. 1, *g*). Половое размножение не наблюдали. Старая культура приобретает темно-оранжевую окраску, оболочка клеток утолщается до 5–6 мкм, становится концентрической (рис. 1, *h*). Запасной продукт: липиды.

Отличительные черты штамма ACSSI 100. Штамм ACSSI 100 отличается от типового штамма *Hemiflagellochloris kazakhstanica*, согласно описанию Watanabe *et al.* (2006b), более крупными вегетативными клетками (до 30 мкм в диам.) и зооспорами (до 7 мкм шир. и до 15 мкм дл.), а также более толстой слизистой оболочкой в старой культуре (до 5–6 мкм).

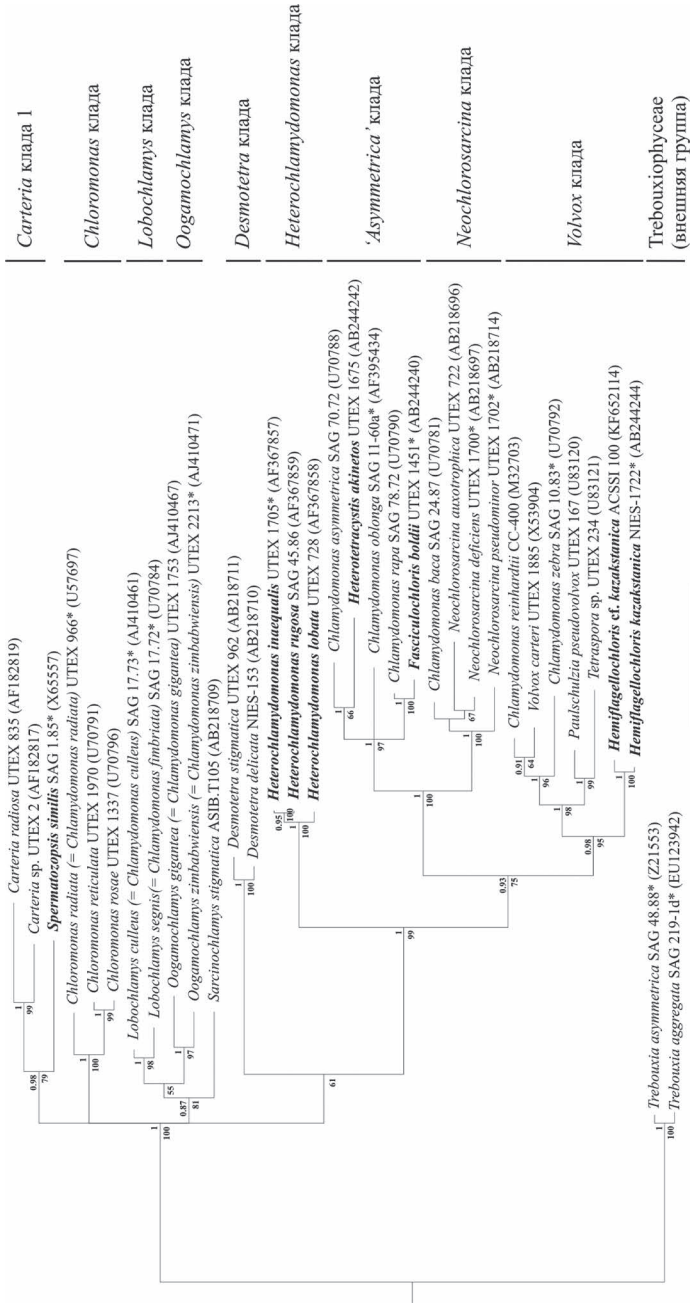
Филогенетический анализ. Деревья, построенные ML и байесовским методом, имели сходную топологию, поэтому за основу было взято байесовское дерево (рис. 2). Названия клад и их объем даны в понимании Watanabe *et al.* (2006a, b). По данным анализа 18S рДНК исследуемый штамм ACSSI 100 является представителем рода *Hemiflagellochloris* и расположен в корневом регионе Volvox-клады. Данная клад имеет высокие статистические поддержки и образована предста-

Рис. 2. Укорененное филогенетическое дерево, сконструированное байесовским методом и ML, на основе последовательностей 18S рДНК (1349 пар нуклеотидов).

The rooted phylogenetic tree constructed by Bayesian analysis and ML for 18S rDNA sequence data (1349 bp).

Примечание. В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны байесовские апостериорные вероятности (над ветвью) и бутстреп-значения ML (под ветвью); значения <0.8 и 50, соответственно, не показаны. Модель нуклеотидных замен: GTR+I+G. Штаммы, выделенные жирным шрифтом, имеют два анизоконтных жгутика. Звездочкой отмечены аутентичные штаммы.

Note. Node support of the tree is given as Bayesian posterior probabilities (above branch) and ML bootstrap values (below branch); values <0.8 and 50, respectively, are not shown. Model of nucleotide changes is GTR+I+G. The strains typed in bold letters have two anisokont flagella. Authentic strains were marked with an asterisk.



вителями родов колониальных зеленых водорослей *Paulschulzia* Skuja, *Tetraspora* Link и *Volvox* L., монадной водорослью *Chlamydomonas* Ehr. и сарциноидной *Hemiflagellochloris*. Последний род имеет зооспоры с двумя жгутиками, сильно неравными по длине. *Volvox*-клада является сестринской для клад *Neochlorosarcina* и ‘*Asymmetrica*’ (рис. 2). В кладе ‘*Asymmetrica*’ есть роды с неравными жгутиками: зооспоры *Fasciculochloris* и *Heterotetracystis* (клада ‘*Asymmetrica*’) имеют по два анизоконтных жгутика. Еще два представителя зеленых водорослей также имеют анизоконтные жгутики: *Heterochlamydomonas* (клада *Heterochlamydomonas*) и *Spermatozopsis similis*. Однако в последнем случае морфологическое описание вида не согласуется с родовым диагнозом — с наличием четырех равных жгутиков у остальных представителей *Spermatozopsis* Korshikov. По данным анализа 18S рДНК (рис. 2) *S. similis* близок к первой кладе *Carteria*.

Заключение

Сравнительный анализ последовательностей фрагмента 18S рДНК подтвердил самостоятельность рода *Hemiflagellochloris* и принадлежность к нему штамма ACSSI 100, который был изолирован из погребенного солонца в зоне сухих степей (северная часть Ергенинской возвышенности, Волгоградская обл.). Таким образом, впервые на территории России был обнаружен представитель данного рода. В морфологии описанного штамма имеются отличия от диагноза голотипа *H. kazakhstanica*, а именно более крупные размеры вегетативных клеток (до 30 мкм в диам.) и зооспор (до 7 мкм шир. и до 15 мкм дл.), более толстая слизистая оболочка в старой культуре (до 5–6 мкм). Согласно морфологической концепции вида, этих оснований могло бы быть достаточно для описания нового таксона. С позиций современной систематики зеленых водорослей, новый таксон может быть выделен при использовании полифазного подхода, комбинируя морфологические, экологические и молекулярные данные, что мы и попытались сделать. Тем не менее, вопрос о принадлежности данного штамма к типовому виду *Hemiflagellochloris kazakhstanica* остается открытым и требует дальнейшего изучения с применением других молекулярных маркеров, например *rbcL* и ITS2.

Фрагмент ядерного гена 18S рДНК исследованного штамма *Hemiflagellochloris* cf. *kazakhstanica* ACSSI 100 был депонирован в GenBank под номером KF652114. Штамм ACSSI 100 был передан в международные альгологические коллекции: коллекцию культур водорослей Киевского национального университета им. Т. Шевченко (АСКУ) и коллекцию водорослей и цианобактерий Башкортостана (BCAC).

Благодарности

Авторы благодарят зав. кафедрой ботаники Учебно-научного центра «Институт биологии» Киевского национального университета им. Т. Шевченко И. Ю. Костикова за консультации и валидацию штамма ACSSI 100 *Hemiflagellochloris* cf. *kazakhstanica*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-31016 мол_а и 12-04-00385 и.

Литература

- [Dobrovolskiy, Urusevskaya] Добровольский Г. В., Урусевская И. С. 2004. *География почв*. М.: 460 с.
- Doyle J. J., Dickson E. 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon*. 36: 715–722.
- Katana A., Kwiatowski J., Spalik K. *et al.* 2001. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA. *J. Phycol.* 37(3): 443–451.
- Watanabe S., Mitsui K., Nakayama T., Inouye I. 2006a. Phylogenetic relationships and taxonomy of sarcinoid green algae: *Chlorosarcinopsis*, *Desmotetra*, *Sarcinochlamys* gen. nov., *Neochlorosarcina*, and *Chlorosphaeropsis* (Chlorophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 42(3): 679–695.
- Watanabe S., Tsujimura S., Misono T. *et al.* 2006b. *Hemiflagellochloris kazakhstanica* gen. et sp. nov.: a new coccoid green alga with a flagella of considerably unequal lengths from a saline irrigation land in Kazakhstan (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Phycologia*. 42(3): 696–706.

References

- Dobrovolskiy G. V., Urusevskaya I. S. 2004. *Geografiya pochv* [Soil geography]. Moscow: 460 p. (In Russ.).
- Doyle J. J., Dickson E. 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon*. 36: 715–722.
- Katana A., Kwiatowski J., Spalik K. *et al.* 2001. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA. *J. Phycol.* 37(3): 443–451.
- Watanabe S., Mitsui K., Nakayama T., Inouye I. 2006a. Phylogenetic relationships and taxonomy of sarcinoid green algae: *Chlorosarcinopsis*, *Desmotetra*, *Sarcinochlamys* gen. nov., *Neochlorosarcina*, and *Chlorosphaeropsis* (Chlorophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 42(3): 679–695.
- Watanabe S., Tsujimura S., Misono T., Nakamura S., Inoue H. 2006b. *Hemiflagellochloris kazakhstanica* gen. et sp. nov.: a new coccoid green alga with a flagella of considerably unequal lengths from a saline irrigation land in Kazakhstan (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Phycologia*. 42(3): 696–706.