

Особливості *Chlamydomonas applanata* (Chlorophyta, Polytomina) у нерухомому стані

МАРІЯ МИКОЛАЇВНА ПАВЛОВСЬКА
ІГОР ЮРІЄВИЧ КОСТИКОВ

ПАВЛОВСЬКА М.М., КОСТИКОВ І.Ю., 2012: **Особливості *Chlamydomonas applanata* (Chlorophyta, Polytomina) у нерухомому стані**, *Чорноморськ. бот. ж.*, Т.8, №4: 439-445.

Наведено результати досліджень п'яти штамів *Chlamydomonas applanata* (включаючи штам-епітип) в нерухомому стані в умовах культури на агаризованому поживному середовищі. Визначено ознаки, придатні для ідентифікації *Ch. applanata* в умовах агарової культури при оптичній мікроскопії. Показано, що в нерухомому стані *Ch. applanata* відрізняється від інших видів роду *Chlamydomonas s.l.*, в першу чергу: а) відсутністю мультиплікації центрального триплету клітинної оболонки; б) наявністю колоніального слизу спорангіального походження; в) суцільною крохмальною обгорткою піреноїда; г) наявністю червоних сферичних акінетоподібних клітин та сферичних зелених зигот з потовщеною гладкою оболонкою; д) наявністю у зооспор в спорангіях зачаткових жгутиків.

Ключові слова: водорості, *Chlorophyta*, *Polytomina*, *Chlamydomonas*, морфологічні ознаки, таксономія, ідентифікація

PAVLOVSKA M. M., KOSTIKOV I.YU., 2012: **The features of *Chlamydomonas applanata* (Chlorophyta, Polytomina) in unmotile stage**, *Chornomors'k. bot. z.*, Vol. 8, № 4: 439-445.

The five strains of *Chlamydomonas applanata* in immotile stage in a culture on agar medium were investigated. The main morphological features of *Ch. applanata* which distinguished this species from other species of genus *Chlamydomonas s.l.* were established. The main features are: a) the absence of central triplet cell wall multiplication; b) the presence of colonial mucilage sporangium origin; c) continuous starch sheath of pyrenoid; d) the presence of red spherical akinetos-like cells and spherical green zygotes with thickened smooth wall; e) the presence of rudimentary flagella in zoospores in sporangia.

Key words: algae, *Chlorophyta*, *Polytomina*, *Chlamydomonas*, morphology, taxonomy, identification

ПАВЛОВСКАЯ М.Н., КОСТИКОВ И. Ю., 2012: **Особенности *Chlamydomonas applanata* (Chlorophyta, Polytomina) в неподвижном состоянии**, *Черноморск. бот. ж.*, Т. 8, № 4: 439-445.

Приведены результаты исследований пяти штаммов *Chlamydomonas applanata* (включая штам-эпитип) в неподвижном состоянии в условиях культуры на агаризованных питательных средах. Определены признаки, пригодные для идентификации *Ch. applanata* в условиях агаровой культуры при оптической микроскопии. Показано, что в неподвижном состоянии *Ch. applanata* отличается от других видов рода *Chlamydomonas s.l.*, в первую очередь: а) отсутствием мультипликации центрального триплета клеточной оболочки; б) наличием колонияльной слизи спорангиального происхождения; в) сплошной крахмальной оберткой пиреноида; г) наличием красных сферических акинетообразных клеток и сферических зеленых зигот с утолщенной гладкой оболочкой; д) наличием у зооспор в спорангиях зачаточных жгутиков.

Ключевые слова: водоросли, *Chlorophyta*, *Polytomina*, *Chlamydomonas*, морфологические признаки, таксономия, идентификация

Вступ

Одним із найчисленніших родів зелених водоростей є *Chlamydomonas* Ehrenberg, який, за оцінками різних авторів, нараховує 600-800 видів. За сучасними уявленнями, сформованими в першу чергу на основі молекулярно-філогенетичних даних, рід *Chlamydomonas* представляє штучний гетерогенний таксон, що включає водорості як мінімум восьми макроклад, які мають ранг не нижче родини або порядку. Назви макрокладам, до яких входять види роду *Chlamydomonas*, надані відповідно до т.зв. Філокоду – молекулярно-філогенетичного кодексу номенклатури [CANTINO, 2010] – *Moewusinia*, *Monadinia*, *Chlorogonia*, *Polytominia*, *Chloromonadinia*, *Reinhardtinia*, *Oogamochlamydia*, проте фенотипна характеристика цих макроклад наразі відсутня [NAKADA & ALL, 2008]. В той же час, на прикладі різних видів *Chlamydomonas* з *Oogamochlamydia*, *Reinhardtinia*, *Moewusinia* та *Chloromonadinia*, показано, що чіткі морфологічні відмінності між макрокладами простежуються в умовах культур на агаризованому середовищі, коли хламідомонади перебувають не в монадному, а у нерухомому стані [ПАВЛОВСЬКА, КОСТИКОВ, 2010]. В такому напрямі представники макроклади *Polytominia* раніше не вивчалися.

Ch. applanata Pringsheim разом з *Ch. subcaudata* Wille, *Ch. pulsatilla* Wollenweber, *Ch. pumilio* Ettl представляють групу хламідомонад, які з апопластидними видами роду *Polytoma* (*Polytoma uvella* Ehrenberg, *P. ellipticum* Pringsheim, *P. anomale* Pringsheim, *P. defficile* Pringsheim, *P. mirum* Pringsheim, *P. obtusum* Pascher) складають макрокладу *Polytominia* [NAKADA & ALL, 2008, RUMPF & ALL, 1996].

Серед фототрофних представників класу *Polytominia* *Ch. applanata* Pringsheim є найбільш повно дослідженим видом як на морфологічному, так і на ультраструктурному рівнях [VISVIKI, 2000]. Особливості морфології в рухомому стані на рідких середовищах наведені в роботі Х. Еттла та У. Шльозера [ETTL, SCHLÖSSER, 1992]. Крім того, відомо, що для *Ch. applanata* притаманні автолізини I типу (група № 7) [SCHLÖSSER, SACHS, ROBINSON, 1976]; клітинна оболонка належить до II-го типу (за класифікацією оболонок вольвокальних водоростей К. Робертса [ROBERTS, 1974]); піреноїд (згідно до класифікації О. Болдіної та І. Константинової [КОНСТАНТИНОВА, БОЛДИНА, 2000]) представляє 1-й ультраструктурний тип – у строму заходять поодинокі трубчасті тилакоїди, які закінчуються сліпо, а крохмальна обгортка піреноїду є суцільною [БОЛДИНА, 1996]; статевий процес ізогамний, зиготи мають гладку оболонку [ETTL, SCHLÖSSER, 1992].

У світових колекціях культур підтримується сім штамів *Ch. applanata*, морфологічна ідентичність яких в умовах культури на рідких поживних середовищах встановлена Х. Еттлом та У. Шльозером [ETTL, SCHLÖSSER, 1992]. Ідентичність культур на молекулярному рівні підтвердив Дж. Гордон [GORDON, 1995].

Штамом-епітипом даного виду є SAG 6.72 в колекції культур Гетингенського університету (Culture Collection of Algae at the University of Göttingen, Germany (SAG)) [0], субкультура якого (АСКУ 710-06) зберігається також у колекції культур Київського національного університету імені Тараса Шевченка [КОСТИКОВ, ДЕМЧЕНКО, НОВОХАЦКАЯ, 2009].

Таким чином, за ступенем вивченості на молекулярному, біохімічному та ультраструктурному рівнях, за даними, що стосуються репродуктивних особливостей, а також за кількістю штамів *Ch. applanata* відповідає критеріям референтного виду хламідомонад класу *Polytominia*. Проте на морфологічному рівні відмінності фотоавтотрофних видів даної класу (включаючи *Ch. applanata*) від хламідомонад інших класу залишаються не встановленими. Це, в свою чергу, призводить до відсутності будь-яких таксономічних рішень як щодо фотоавтотрофних представників класу *Polytominia*, так і в цілому щодо всієї класу.

Встановлення морфологічних особливостей *Ch. applanata*, в першу чергу – в нерухомому стані в умовах культури на агаризованому середовищі, за якими цей вид відрізняється від хламідомонад інших клад, становило мету даної роботи.

Матеріали та методи дослідження

Матеріалом були п'ять штамів *Ch. applanata* з колекції культур Київського національного університету імені Тараса Шевченка (акронім АСКУ) [КОСТИКОВ, ДЕМЧЕНКО, НОВОХАЦКАЯ, 2009]. Один із них представляє автентичний штам *Ch. applanata* (АСКУ 710-06). Інші чотири штами є автентичними культурами видів, які були переведені в синоніми *Ch. applanata* Х. Еттлом та У. Шлоссером [ETTL, SCHLÖSSER, 1992]: *Ch. humicola* Lucksch (АСКУ 707-06), *Ch. dysosmos* Moewus (АСКУ 978-11), *Ch. akinetos* Deason at Bold (АСКУ 709-06), *Ch. aggregata* Deason at Bold (АСКУ 708-06).

Культури вирощували на 1% агаризованому середовищі «К» [KUNL, LORENZEN, 1964] на освітлювальній установці при інтенсивності освітлення 2.100-3.000 люкс з 12-годинним чергуванням світлової і темної фаз. Вирощування, залежно від віку культури, проводили при двох температурних режимах: до 1-го місяця – при 18-23 °С, починаючи з другого – при 12-14 °С.

Мікроскопічні дослідження виконували на оптичних мікроскопах серій BMXS та Primo Star, оснащених цифровими фотокамерами Tucsen TCA 5,0 і Canon Power Shot G6, що з'єднані з персональними комп'ютерами, при обов'язковому використанні імерсійних об'єктивів. Морфологію розростань спостерігали за допомогою біокулярного стереоскопічного мікроскопа МБС-10.

Особливості морфології вегетативних клітин описували відповідно до методик, які використовуються для опису нерухомих клітин у систематиці тетраспоральних та хлорококальних водоростей, а також відповідно до морфологічних критеріїв, прийнятих Х. Еттлом [ETTL, 1976] (форма та розміри клітин, особливості покривів, морфологія хлоропласту та піреноїда, положення ядра та піреноїда, пульсуючі вакуолі та включення і т.п.). Для виявлення слизових структур застосовували забарвлення 0,05% розчином метиленового синього та розчином туші [КОРШИКОВ, 1938]. Для визначення вікової мінливості культури вивчали у віці: 2 тижні, 1 місяць, 6 місяців, 1 рік.

Розмірні характеристики клітин визначали шляхом обробки мікрофотографій клітин, отриманих на оптичних мікроскопах при використанні імерсійних об'єктивів 100^x (апертура 1,25). Вимірювання проводили за допомогою програми AxioVision 4.8. (Carl Zeiss Vision). Повторність вимірювань довжини та ширини клітин для кожного віку всіх штамів 40-кратна.

Результати

На агаризованих середовищах усі штами морфологічно ідентичні, утворюють пласкі, світло-зелені, блискучі розростання з нерівними зовнішніми контурами (рис.1.1). Клітини в розростаннях об'єднані в нестійкі слизові агрегати із легкокорозинним слизом спорангіального походження.

Колонії представлені індивідуальними клітинами, спорангіями з 2-4-8 дочірніми клітинами (гемізооспорами) однієї генерації, великими зеленими зиготами та червоними акінетоподібними сферичними клітинами (рис. 1.5). В колоніях клітини занурені у слиз, що утворений внаслідок ослизнення внутрішнього фібрилярного шару (W₁) або внутрішнього шару центрального триплету (W₂) оболонки спорангіїв та розчинення кристалічного шару центрального триплету (W₆). Колоніальний слиз добре помітно при фарбуванні щойно виготовлених препаратів розчином туші (рис. 1.4). При забарвленні метиленовим синім слиз колапсує і стає непомітним (рис. 1.2).

Перехід у монадний стан у досліджених штамів відбувається шляхом формування спорангіїв із 2-8 зооспорами. Зооспори ще в спорангіях відрощують зачаткові джгутики, які, проте, до переносу клітин у рідке середовище не ростуть. При переносі у рідке середовище у багатьох клітин джгутики швидко доростають до повного розміру (протягом 0,5 хв. – до 4 мкм) і починають активно рухатися. Відрощування джгутиків у дорослих вегетативних клітин не спостерігалось.

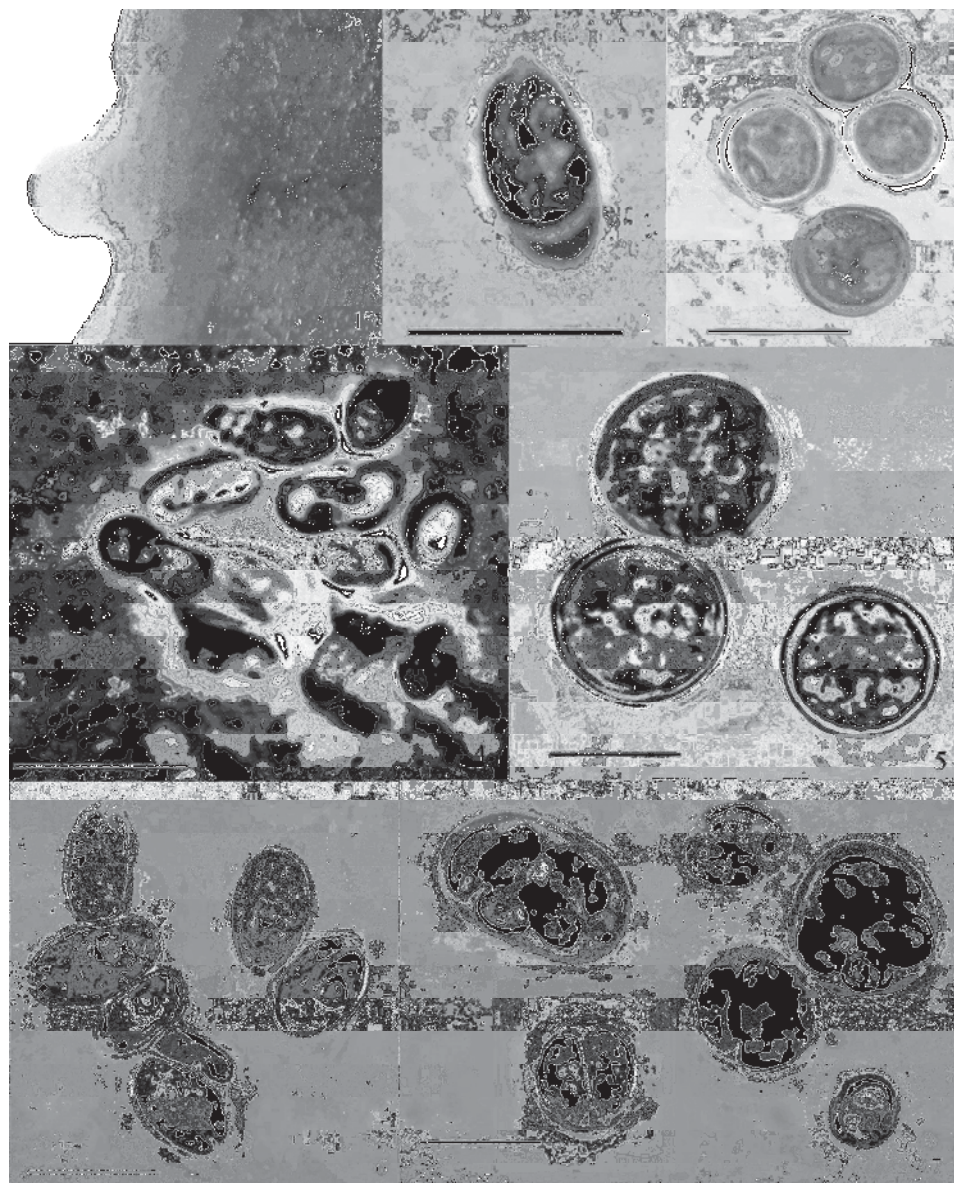


Рис. 1. *Ch. applanata* (1- штам АСКУ 707-06, 2, 4 - АСКУ 708-06, 3, 5, 6 - АСКУ 710-06, 7- АСКУ 978-11). 1 - загальний вигляд колоніального слизу, 2 - клітина при фарбуванні метиленовим синім, 3 - сферичні зелені зиготи з потовщеною оболонкою, 4 - загальний вигляд колоніального слизу при фарбуванні тушшю, 5 - акінетоподібні клітини, 6 - вегетативні клітини, 7 - спорангії.

Fig. 1. *Ch. applanata* (1- strain АСКУ 707-06, 2, 4 - АСКУ 708-06, 3, 5, 6 - АСКУ 710-06, 7- АСКУ 978-11). 1 - general view of the colonial mucilage, 2 – the cell at coloring with methylene blue, 3 - spherical green zygotes with thickened smooth wall, 4 - general view of the colonial mucilage at coloring ink, 5 – akinetos-like cells, 6 – vegetative cells, 7 - sporangia.

Вегетативні клітини досліджених видів мають видовжено-еліпсоїдну або овальну форму. В старих культурах вегетативні клітини округлюються.

Клітини на агаризованому середовищі зберігають носик. З ростом клітини носик розтягується. Клітинна оболонка відносно тонка, з віком майже не потовщується, проте дуже часто відстає від протопласту.

У індивідуальних клітин протопласт зберігає чіткі правильні контури. Центральний триплет клітинної оболонки (ЦТР) один, розширений, спостерігається лише у частини клітин, тонкий, одноконтурний, без видимої диференціації на зовнішній кристалічний (W_6) та внутрішній гіаліновий (W_2) шари. Шар W_2 , вірогідно, залишається інтактним, оскільки ЦТР зберігає погано помітний носик. Екстрацелюлярний матрикс (ЕЦМ) однорідний, без видимої диференціації на шари, метиленовим синім не фарбується, утворений в результаті ослизнення внутрішнього фібрилярного шару W_1 . Зовнішній фібрилярний шар (W_7) не виражений і зовнішній слизовий контур («протуберанці») при фарбуванні тушшю не спостерігаються.

Клітини мають паріетальний хлоропласт із піреноїдом, розташованим у латеральному потовщенні (рис. 1.6). Ядро розміщується позаду піреноїда. Стигма, маленька, в передній частині клітини. Вегетативні клітини зберігають дві пульсуючі вакуолі. За морфологічною класифікацією клітини відносяться до морфологічної групи «Chlorogoniella».

В культурах на агаризованому середовищі розмноження відбувається за допомогою зооспор. При спорогенезі протопласт ділиться з поворотом. Діленню протопласту передують зникнення піреноїда та стигми, в результаті в культурі спостерігаються безпіреноїдні клітини. У спорангіях формується 2-4-8 дочірніх клітин (рис. 1.7), які мають зачаткові джгутики. При звільненні зі спорангіїв молоді клітини швидко дорощують джгутики і переходять у монадний стан.

Оболонки спорангіїв розширюються за рахунок ослизнення внутрішніх шарів (W_1 та/або W_2) та розтягування кристалічного шару W_6 . Далі кристалічний шар повністю розчиняється, і дочірні клітини утримуються в групах залишками легкорозчинного спорангіального слизу (ЕЦМ оболонки). Таким чином, слизові розростання на агарі представлені нестійкими колоніями індивідуумів та спорангіїв, об'єднаних слизом екстрацелюлярного матриксу оболонок спорангіїв. В культурі часто спостерігаються зелені зиготи з потовщеною гладкою оболонкою (рис. 1.3).

В культурах старше 6 місяців у вегетативних клітин протопласт на полюсах відстає від клітинної оболонки і округлюється. Змінюється співвідношення вегетативних клітин та зооспор в бік збільшення кількості нерухомих клітин, хоча здатність відрощувати джгутики у зооспор зберігається.

Клітин досліджених штамів *Ch. applanata* 4,4-10,4 мкм завдовжки та 1,5-7,0 мкм завширшки. Співвідношення довжини клітин до їх ширини коливається в межах 1,7-1,9.

Загалом *Ch. applanata* на агаризованому середовищі нагадує колонії водорості роду *CYSTMOMONAS* Ettl & Gärtner, утворені зооспорами та зооспорангіями, проте без дорослих вегетативних клітин.

Обговорення

Для встановлення морфологічних особливостей *Ch. applanata* у нерухомому стані нами було проведено порівняння досліджених штамів із репрезентативними видами інших клад, до яких входять види роду *Chlamydomonas* s.l. Із результатів порівняння видно, що на морфологічному рівні *Ch. applanata* значною мірою відрізняється від хламідомонад з інших молекулярних клад.

Так, на відміну від *Ch. moewusii* Gerloff (репрезентативний вид клади *Moewusinia*), у *Ch. applanata* джгутики відрощують зооспори, а не вегетативні клітини; оболонка спорангію не розривається, а розчиняється; піреноїд має не фрагментовану, а суцільну крохмальну обгортку. Проте обидва види мають однакову ультраструктуру клітинної

стілки, яка відповідає II-му типу за класифікацією оболонки вольвокальних водоростей К. Робертса. На відміну від *Chloromonas reticulata* Gobi (клада Chloromonadina), у *Ch. applanata* клітини видовжено-еліпсоїдні, злегка асиметричні, а не овальні, та не мають індивідуальної зовнішньої слизової обгортки. Від *Oogamochlamys gigantea* Proshold, Marin, Schlosser & Melkonian (клада Oogamochlamidina) відрізняється іншим типом поведінки оболонки спорангію при виході спор та формою клітин. Від *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard (клада Reinhardtina) відрізняється формою клітини та відсутністю індивідуальної зовнішньої слизової обгортки, хоча спосіб звільнення зооспор у обох видів є схожим – оболонка спорангія повністю розчиняється [SCHLOSSER, 1974].

В цілому, від хламідомонад інших молекулярних клад *Ch. applanata* в культурі на агаризованому середовищі відрізняється наступним комплексом ознак: а) наявністю колоній із слабким колоніальним слизом (індивідууми утримуються разом лише залишками внутрішнього спорангіального слизу); б) кількісним переважанням в культурі гемізооспор над вегетативними клітинами; в) відсутністю навколо клітин індивідуальних зовнішніх слизових обгорток; г) тонким центральним триплетом клітинної оболонки, який не здатний до мультиплікації і при оптичній мікроскопії виглядає одноконтурним і гомогенним; д) відсутністю позитивного забарвлення ЕЦМ метиленовим синім; е) наявністю червоних сферичних акінетоподібних клітин; є) наявністю сферичних зелених зигот з потовщеною гладкою мультиплікованою оболонкою; ж) повним ослизненням оболонки спорангію; з) наявністю у зооспор, які перебувають у спорангіях, лише зачаткових джгутиків; и) зникненням піреноїда та стигми перед поділом клітини.

Висновки

В умовах агаризованої культури *Ch. applanata* як представник фотоавтотрофних видів із класу Polytomina відрізняється від хламідомонад інших клад своєрідним комплексом ознак, серед яких найважливішими є: а) відсутність мультиплікації центрального триплету клітинної оболонки; б) наявність колоніального слизу спорангіального походження; в) наявність суцільної крохмальної обгортки піреноїда; г) наявність червоних сферичних акінетоподібних клітин та сферичних зелених зигот із потовщеною гладкою мультиплікованою оболонкою; д) здатність зооспор в спорангіях відрощувати зачаткові джгутики.

Список літератури

- Болдина О.Н. Основные типы ультраструктурной организации пиреноидов у CHLAMYDOMONAS (Chlorophyta, Chlamydomonadales) // Ботан. журн., 1996. – 81. – С. 49-58.
- КОНСТАНТИНОВА И.А. Сравнительный анализ ультраструктуры пиреноидов зеленых монадных и коккоидных водорослей / И.А. Константинова, О.Н. Болдина // Физиология растений. - 2000. - Т. 47. № 5. - С. 655-659.
- КОРШИКОВ О. А. Volvocinae // Визначник прісноводних водоростей УРСР. Т.4. – К.: Вид-во АН УРСР, 1938. – 184 с.
- КОСТИКОВ И.Ю. Коллекция культур водорослей Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. Каталог штаммов (2008 г.) / И.Ю. Костиков, Э.Н. Демченко, М.А. Новохацкая // Черноморский ботанический журнал. - 2009. - Т.5, №1. – С. 37-79.
- ПАВЛОВСЬКА М.М. Швидкість переходу в монадний стан як допоміжний критерій при ідентифікації видів роду *Chlamydomonas* (Chlorophyta) / М.М. Павловська, І.Ю. Костіков // Чорноморський ботан. журн. – 2010. – Т. 6, №4. – С. 508-512.
- CANTINO P. D. PhyloCode: International Code of Phylogenetic Nomenclature, Version 4c(online) / P.D. Cantino, K. Queiroz // Website: <http://www.ohio.edu/phylocode/documents.html>. - 2010.
- ETTL H. Die Gattung CHLAMYDOMONAS Ehrenberg / H. Ettl // Nova Hedwigia. – 1976. - Beih. 49. - 1-1122 p.
- ETTL H. Towards to a revisions of the systematics of the genus CHLAMYDOMONAS (Chlorophyta). 1. CHLAMYDOMONAS applanata Pringsheim / H. Ettl, U.G. Schlösser // Bot. Acta. – 1992. – Vol. 105. – P. 323-330.

- GORDON J. Sequences of the RRN 18 genes of CHLAMYDOMONAS humicola and C. dysosmos are identical, in agreement with their combination in the species C. applanata (Chlorophyta) / J. Gordon, R. Rump, S. L. Shank, [and al.] // J. Phycol. – 1995. – 31. – P. 312-313.
- 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.
- NAKADA T. Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses. / T. Nakada, K. Misawa, H. Nozaki // Mol. Phylogenet. Evol. – 2008. - Vol. 48. - P. 281-291.
- ROBERTS K. Crystalline glycoprotein cell walls of algae: their structure, composition and assembly. / K. Roberts // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. – 1974. – Vol. 268, No. 891. - P. 129-146.
- RUMPF R. Evolutionary consequences of the loss of photosynthesis in Chlamydomonadaceae: phylogenetic analysis of Rrn18 (18S rDNA) in 13 POLYTOMA strains (Chlorophyta) / R. Rumpf, D. Vernon, D. Schreiber [& al] // J. Phycol. – 1996. – 32. – P. 119 – 126.
- SCHLOSSER U. G. Isolation of protoplasts by means of a “species-specific” autolysine in CHLAMYDOMONAS / U. G. Schlösser, H. Sachs, D. G. Robinson // Protoplasma. – 1976. – Vol. 88. – P. 51-64.
- SCHLÖSSER U.G. Sammlung von Algenkulturen Göttingen: Additions to the Collection since 1984. / U. G. Schlösser // Ber. Deutsch. Bot. Ges. - 1986. – N. 99. – P. 161-168.
- VISVIKI I. A cytological study of the green alga CHLAMYDOMONAS applanata Pringsheim (Chlamydomonadaceae) / I. Visviki // Journal of the Torrey Botanical Society. – 2000. - Vol. 127, No. 1. - P. 1-8.

Рекомендує до друку
М.Ф. Бойко

Отримано 25.09.2012 р.

Адреса авторів:

М.М. Павловська,
І.Ю. Костіков
Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка
ННЦ «Інститут біології»
пр. Акад. Глушкова, 2
м. Київ, 03022
Україна
e-mail: annopol@rambler.ru

Authors' address:

М.М. Pavlovska,
I.Yu.Kostikov
National Taras Shevchenko
University of KyivESC "Institute of Biology"
2, Acad. Glushkov Avenue
Kyiv, 03022
Ukraine
e-mail: annopol@rambler.ru