

УДК 582.27

И.Ю. КОСТИКОВ¹, Э.Н. ДЕМЧЕНКО¹, В.Р. БОЙКО¹, А.А. ГОНЧАРОВ²¹Киевский национальный ун-т им. Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64, 01601 Киев, Украина²Биолого-почвенный ин-т Дальневосточного отделения РАН,
пр. 100 лет Владивостоку, 159, 690022 Владивосток, Россия***CHLOROCHYTRIUM HYPANICUS* SP. NOV. (*CHLOROPHYCEAE*)
И ЕГО МЕСТО В СИСТЕМЕ *PROTOSIPHONALES***

Приведено описание нового вида зеленых водорослей *Chlorochytrium hypanicus* sp. nov. (*Chlorophyceae*), обнаруженного в выжимке тины р. Южный Буг (Украина). На основании анализа нуклеотидной последовательности ядерного гена 18S rDNA установлено место данного вида в системе макроклады *Stephanosphaerinia*, которая, в целом соответствует ранее предложенному порядку *Protosiphonales*. Показано, что в рамках данного порядка, включающего четыре клады и группу таксонов "Protosiphonales incertae sedis", *Ch. hypanicus* входит в кладу, соответствующую *Protosiphonaceae* s.l., представители которой отличаются от прочих членов порядка наличием голых двухгугтиковых зооспор. Морфологически вид сходен с *Ch. lemnae* Cohn, от которого отличается передней стигмой у зооспор, более толстой оболочкой субсенильных клеток, мелкобугорчатой оболочкой акинета, вегетацией в свободноживущем, а не эндофитном состоянии. От прочих видов рода *Chlorochytrium* Cohn отличается наличием деления по типу десмосхизиса, приводящему к образованию диад, пакетов и плевроккоидных агрегатов. Обсуждаются объем, диакритические признаки и структура *Protosiphonaceae*, близость результатов молекулярно-генетического и фенотипического подходов в таксономии данного семейства.

Ключевые слова: зеленые водоросли, таксономия, молекулярная филогения, *Chlorophyceae*, *Protosiphonales*, *Protosiphonaceae*, *Stephanosphaerinia*, *Chlorochytrium hypanicus*.

Введение

Род *Chlorochytrium* Cohn был описан на примере вида *Ch. lemnae*, который инфицировал листья ряски (*Lemna trisulca* L.) в водотоках г. Бреслау (Cohn, 1870–1875). В настоящее время этот род по традиционным морфологическим системам (Коршиков, 1953; Komárek, Fott, 1983) объединяет коккоидные зеленые водоросли, которые размножаются голыми двухгугтиковыми зооспорами. Виды данного рода либо ведут эндофит-

© И.Ю. Костиков, Э.Н. Демченко, В.Р. Бойко, А.А. Гончаров, 2012

ный образ жизни, развиваясь в межклетниках покрытосеменных водных растений (*Lemna* L., *Elodea* Michx., *Ceratophyllum* L., *Najas* L., *Potamogeton* Walter, *Nymphoides* Ség. (= *Limnanthemum* S.G. Gmel.), сфагновых мхов (*Sphagnum* L.), либо поселяются в пустых домиках золотистых водорослей рода *Dinobryon* Ehrenb. Согласно сводке Й. Комарека и Б. Фотта, род включает 7 видов: *Ch. lemnae*, *Ch. knyanum* Cohn et Szyman, *Ch. archerianum* Hieron., *Ch. biene* (Klebs) G.S. West, *Ch. limnanthemum* (Gunningh.) G.S. West, *Ch. paradoxum* (Klebs) G.S. West, *Ch. dinobryonis* Lund (Komárek, Fott, 1983). К нему отнесен также *Ch. bristolae* (G.M. Sm.) D.M. John et P. Tsarenko (John, Tsarenko, 2002).

Ранее на основе анализа комплекса фенотипических признаков, определенных с помощью светового микроскопа, виды рода *Chlorochytrium* вместе с родом *Kentrosphaera* Borzi провизорно были включены нами в состав расширенного по объему пор. *Protosiphonales* и интегрированы в систему сем. *Protosiphonaceae* sensu Kostikov et al. (Костиков та ін., 2001).

Современная реконструкция филогенетических отношений одноклеточных водорослей класса *Chlorophyceae*, выполненная на основе анализа большой выборки нуклеотидных последовательностей ядерного гена, кодирующего малую субъединицу рибосомальной РНК (далее – 18S rDNA), очертила в составе суперклады *Caudivolvoxa*¹ 6 монофилетических клад (Nakada et al., 2008). Одна из них – *Stephanosphaerinia* – соответствует предложенному нами расширенному пор. *Protosiphonales*, за исключением водорослей с монадным типом морфологической структуры тела. Более того, в составе клады *Stephanosphaerinia* выделилась субклада, которая объединила виды, включенные нами в сем. *Protosiphonaceae* s.l. Однако из-за отсутствия молекулярных данных место *Chlorochytrium* в системе *Protosiphonales* s.l. / *Stephanosphaerinia* до сих пор не подтверждено.

При изучении водорослей регионального ландшафтного парка Гранитно-степное Побужье (Украина) нами была обнаружена и выделена в культуру свободноживущая водоросль, которая по ряду признаков в целом соответствовала расширенному описанию *Ch. lemnae*, выполненному Р. Луином (Lewin, 1981), однако как по экологии, так и по ряду морфологических признаков не была полностью ему идентична.

Определение таксономического статуса и выяснение места данной водоросли в системе зеленых водорослей составило цель данной работы.

Материалы и методы

Материалом для данной работы послужил штамм АСКУ 222-03 из коллекции культур водорослей Киевского нац. ун-та им. Тараса Шевченко (Костиков и др., 2009). Данный штамм был изолирован из пробы вы-

¹ Названия клад в цитируемой работе были предложены в соответствии с принципам т.н. ФилоКода – провизорного Международного кодекса филогенетической номенклатуры (Cantino, de Queiroz, 2007, цит. по Nakada et al., 2008).

жимки макроскопических разрастаний водорослей, собранной Э.Н. Демченко в 2003 г. в р. Южный Буг на территории урочища Гард регионального ландшафтного парка Гранитно-степное Побужье (г. Южноукраинск Николаевской обл., Украина). Для проведения сравнительно-морфологического анализа штамм АСКУ 222-03 был также сопоставлен со штаммом АСКУ 686-06, который представляет субкультуру штамма *Ch. lemnae*, выделенного Р. Луином из того же вида ряски (*Lemna trisulca*), из которого данный вид был впервые описан Р. Коном (Lewin, 1981) и депонирован в коллекции культур Геттингенского ун-та под номером SAG 15.85 (Schlösser, 1994).

Оба штамма (АСКУ 222-03 и АСКУ 686-06) выращивали на 1,5 % агаризованной среде Болда с утроенным количеством азота (3N BBM) (Ettl, Gärtner, 1995) на осветительной установке при освещенности 1800–2500 лк и температуре 14–16 °С с 12-часовым чередованием световой и темновой фаз. Наблюдения проводили по достижении культурами возраста 0,5; 1; 3; 14 суток, 1; 3; 6 месяцев, 1 и 2 лет.

Микроскопические исследования выполняли на оптических микроскопах серий BMXS, CE и PrimoStar, оснащенных цифровыми фотокамерами, соединенными с персональными компьютерами при обязательном использовании иммерсионных объективов.

Для анализа родственных отношений штамма АСКУ 222-03 нами была получена последовательность ядерного гена 18S *rDNA*. Тотальную ДНК выделяли в соответствии с протоколом изоляции ДНК из растений (DNA Microprep Isolation from Plants, <http://www.scienceboard.net>).

Последовательность, кодирующая 18S *rDNA*, была амплифицирована при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием универсальных прямого (1-F) и обратного (1528-R) эвкариотических праймеров (табл. 1).

Таблица 1

Последовательности праймеров, использованных для амплификации ядерного гена, кодирующего 18S *rDNA*

Праймер	Последовательность
1-F	5' AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT A 3'
1528-R	5' CTT CTG CAG GTT CAC CTA C 3'

Ампликоны, полученные в результате ПЦР, визуализировали методом горизонтального электрофореза в агарозном геле, очищали при помощи набора Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega) в соответствии с инструкцией производителя и секвенировали с обоих концов при помощи трех пар прямых и обратных праймеров (1F, 536R, 528F, 1055R, 1055F, 1528R). Редактирование и сборку консенсусной последовательности проводили путем визуального сопоставления прямой и обратной хроматограмм при помощи программ Chromas (version 1.45) и Cap 2. Полученная консенсусная последовательность была депониро-

вана в GenBank (код доступа HE687020). Эта последовательность была добавлена к матрице сиквенсов 18S rDNA (Nakada et al., 2008).

Филогенетические деревья строили методом максимального правдоподобия (Maximal Likelihood, далее ML), объединения соседей (Neighborhood-Joining, далее NJ) и максимальной парсимонии (Maximum Parsimony, далее MP) в филогенетической программе RAUP 4.0b10 (Swofford, 2002). Эволюционные модели для ML и NJ анализов выбирали в программе Modeltest 3.04 (Posada, Crandall, 1998). Дистанции для NJ анализа рассчитывали через ML оптимизацию. Для ML и MP анализов использовали эвристический поиск оптимальной топологии. Устойчивость (статистическую поддержку) филогенетических деревьев в NJ и MP анализах оценивали методом бутстрепа (Felsenstein, 1985), используя 1000 бутстреп-реплик. В бутстреп-анализе MP-деревьев в каждой реплике проводили 10 эвристических поисков оптимальной топологии со случайным порядком добавления таксонов.

Результаты

Оптическая микроскопия. Штамм АСКУ 222-03 в культурах различного возраста характеризовался высокой степенью морфологической изменчивости. Жизненный цикл представлял собой цикломорфоз, в котором представлены 10 стадий: ювенильные клетки (Ju), прегенеративные вегетативные клетки (Pre-g), молодые (G1) и зрелые (G2) генеративные клетки, субсенильные клетки (SS), клетки, трансформирующиеся в спорангии (Pre-sp), зоо- и апланоспорангии (Sp), зооспоры (Zsp) и апланоспоры (Asp), акинеты (Ak) (рис. 1).

Ювенильные клетки (Ju) представляют первую стадию, которая образуется из репродуктивных клеток — остановившихся зооспор или из апланоспор. Эти клетки сферические, с тонкой (толщ. до 0,3 мкм) оболочкой. Хлоропласт париетальный, у самых молодых клеток цельный, у более взрослых — перфорирован 1–2 щелями, не имеет внутренних тяжей. Пиреноид один, с крахмальной оберткой, которая на максимальных увеличениях оптического микроскопа кажется непрерывной. Центральная часть клетки занята крупной вакуолью, в которой, как правило, наблюдается одно дрожашее тельце. Минимальный диаметр клеток соответствует диаметру округлившихся зооспор (3–5 мкм), максимальный — до 12,5 мкм (рис. 2, 2; 4, 2).

Прегенеративные вегетативные клетки (Pre-g) в отличие от ювенильных имеют несколько вакуолей с клеточным соком и париетальный сетчатый хлоропласт. Клетки сохраняют сферическую форму, единственный пиреноид, вокруг которого различается фрагментированная крахмальная обертка, состоящая из 2–4 скорлупок. Диаметр прегенеративных клеток составляет 11–20 мкм (рис. 2, 3; 4, 3).

Молодые генеративные клетки (G1) характеризуются способностью вегетативно делиться по типу десмосхизиса, а при подсыхании среды образовывать акинеты, однако не трансформируются в спорангии и не образуют сложных "плевроккоккоидных" клеточных комплексов. В куль-

туре это возрастное состояние представлено как одиночными сферическими и субсферическими клетками, так и диадами либо пакетами. Клеточная оболочка тонкая (до 0,5 мкм), однослойная, двухконтурная. Хлоропласт состоит из периферической сети и 1–3 внутренних неразветвленных или слабозветвленных тяжей. Пиреноид один, париетальный, либо в результате его фрагментации образуется пара из двух сцепленных пиреноидов. Ядро одно, располагается в центре клетки в цитоплазме между вакуолями с клеточным соком, из-за чего кажется подвешенным на цитоплазматических тяжях. Сферические клетки диам. 18,5–25 мкм, субсферические клетки и клетки в диадах и пакетах 14–25 мкм дл., (8,6) 10–21 мкм шир. Комплексы из диад 16,0–37 мкм дл., 13,5–24 мкм шир., из 4-клеточных пакетов – до 42,5 мкм дл., до 28,5 мкм шир. (рис. 2, 4, 5; 4, 4).

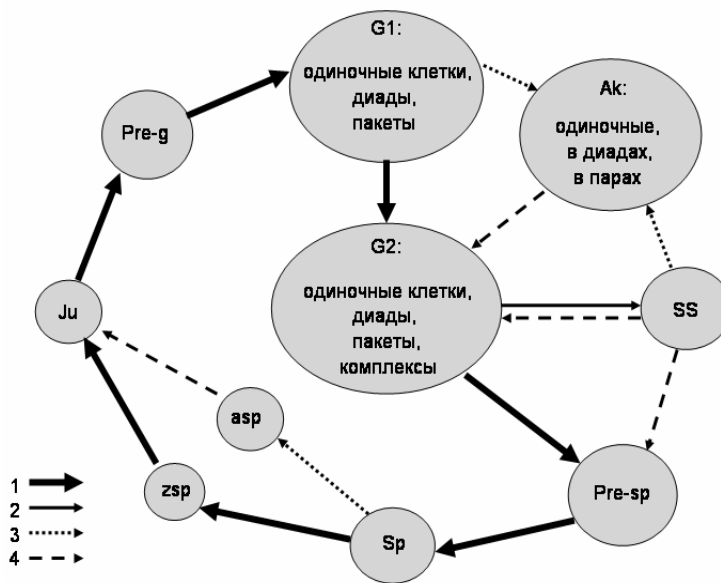


Рис. 1. Схема жизненного цикла *Chlorochytrium hypanicus* (АСКУ 222-03): 1 – направление онтогенеза в логарифмической и стационарной фазах при обычных сроках культивирования (возраст культуры до 3–4 месяцев); 2 – в стационарной фазе и фазе отмирания (от неск. месяцев до неск. лет); 3 – в фазе отмирания при дегидратации культуры (от неск. месяцев до неск. лет); 4 – при пересеве старых культур на свежую питательную среду. Возрастные состояния: ювенильное (Ju), прегенеративное (Pre-g), молодое генеративное (G1), зрелое генеративное (G2), субсенильное (SS), акинеты (Ak), многоядерные преспорангии (Pre-sp), спорангии (Sp), зооспоры (zsp), апланоспоры (asp)

Зрелые генеративные клетки (G2) способны как к трансформации в спорангии, так и к десмосхизису с образованием диад, пакетов и сложных "плеврококкоидных" клеточных комплексов, напоминающих короткие многорядные неправильно разветвленные нити. В отличие от ста-

дии G1, зрелые генеративные клетки не образуют акинет, а при старении или подсыхании среды переходят в субсенильное состояние.

Одиночные клетки преимущественно неправильно-эллипсоидные и неправильно-яйцевидные, часто удлинённые; клетки сферической формы встречаются редко. Клеточная оболочка слегка утолщается (до 0,6–0,9 мкм) и выглядит двухконтурной. В клеточных комплексах (диады, пакеты, "плеврококкоидные" нити) клетки неправильно-округлые, с тонкой оболочкой (0,5 мкм), иногда – с остатками оболочки материнской клетки или в ее слегка расширенной оболочке. В стадии G2 периферическая часть хлоропласта из сети трансформируется в почти сплошную сферу, перфорированную короткими щелями, а в центральной части развивается сеть из грубых и тонких разветвленных тяжей. Количество пиреноидов увеличивается до 4–8 (10). Они имеют равные или неравные размеры и располагаются как в периферической части хлоропласта, так и во внутренних тяжах, причем как одиночно, так и сцепленными парами. Обертки пиреноидов прерывистые, состоят из нескольких (4–7) крахмальных пластин. Количество вакуолей с клеточным соком также увеличивается. Клетки остаются одноядерными, с центральным ядром, подвешенным на цитоплазматических тяжах. Неправильные клетки (21) 27–40 мкм дл., 14,2–33 мкм шир., сферические клетки диам. 20–34,5 мкм (рис. 2, 6–8; 4, 5).

Субсенильные клетки (SS) образуются в старых (от 5 месяцев до 3 лет) культурах на невысохшей агаризованной среде и представляют основную из трех возможных покоящихся стадий. Размеры их существенно увеличены, имеют слоистые неравномерно утолщенные оболочки и в основном не объединены в клеточные агрегаты. Эти клетки образуются из зрелых генеративных и при пересеве на свежую питательную среду либо преобразуются в спорангии, либо путем десмосхизиса прорастают клеточными, преимущественно "плеврококкоидными" агрегатами в стадию G2 (рис. 3, 5; 4, 8). При высыхании агара протопласт субсенильных клеток однократно делится и далее каждый из дочерних протопластов трансформируется в акинету.

Субсенильные клетки удлинённые, изредка – сферические и субсферические, преимущественно одиночные, зеленые. Клеточная оболочка толстая, многослойная, на одном из полюсов односторонне утолщенная. В оболочке выделяется внутренняя "гиалиновая" (толщ. 1,3–2,2 мкм) и поверхностная слоистая (толщ. 2–5 мкм) части, а также нередко – апикальный бесцветный фибриллярный колпачок (толщ. до 8 мкм). Гиалиновая часть двухконтурная, приблизительно одинаковой толщины на всем протяжении, прилегает к протопласту. Слоистая часть представляет систему из 3–7 слоев вторичных оболочек. Каждый из этих слоев, начиная с наружного, на одном из полюсов может разрываться, отслаиваться от нижележащего и разделяться на систему плохо заметных фибрилл. Эта система фибрилл частично ослизняется, и на том полюсе, где произошел разрыв, образует фибриллярный бесцветный колпачок. Цитоплазма субсенильных клеток сильно вакуолизирована, содержит

большое количество крупных бесцветных капель масла и гранул крахмала, которые полностью маскируют структуру хлоропласта. Удлиненные клетки (28) 44–94 мкм дл., 25,5–42 мкм шир., сферические клетки диам. 36–50 мкм (рис. 3, 1; 4, 6, 7).

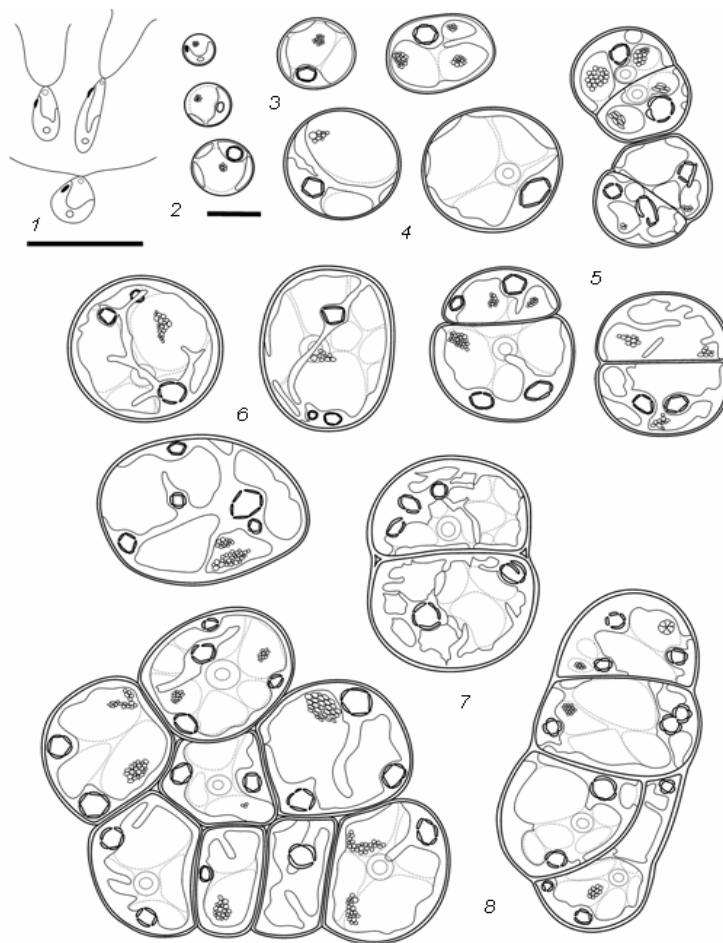


Рис. 2. *Chlorochytrium hypanicus* (штамм АСКУ 222-03): 1 – зооспоры; 2 – ювенильные клетки; 3 – прегенеративная клетка; 4, 5 – молодые генеративные клетки (4 – одиночные; 5 – диады); 6–8 – зрелые генеративные клетки (6 – одиночные, 7 – диады; 8 – "плевроккоккоидные" нити). Шкала 10 мкм

Преспорангиальные клетки (Pre-sp). При подготовке к спорогенезу зрелые генеративные и субсенильные клетки в течение нескольких часов проходят стадию трансформации в спорангии. На этой стадии происходит реорганизация хлоропласта в мелкоячеистую сеть, занимающую всю клетку. Пиреноиды быстро фрагментируются, их количество увеличивается и составляет от десяти и более пиреноидов на клетку. Каждый пиреноид располагается в одном из узлов сети хлоропласта. У преспо-

рангиальных клеток, образовавшихся из взрослых генеративных, клеточная оболочка остается достаточно тонкой (до 1,2 мкм). У клеток, образовавшихся из субсенильных, поверхностная слоистая часть оболочки разрывается, сдувается и протопласт остается окруженным только внутренней тонкой "гиалиновой" оболочкой. На стадии преспорангиальных клеток количество ядер возрастает и приблизительно соответствует количеству узлов сети хлоропласта. Таким образом, на стадии преспорангиальных клеток происходит подготовка к элеутеросхизису. Диаметр сферических преспорангиальных клеток 36–52 мкм. Размер удлиненных клеток, образовавшихся из зрелых генеративных, составляет 33–52 мкм дл., 19–30 мкм шир., а из субсенильных – 37–70 (90) мкм дл., 29–38 мкм шир. (рис. 3, б).

Спорангии (Sp) образуются только из преспорангиальных клеток в результате элеутеросхизиса и повторяют их по размеру и форме. Зрелые спорангии и спорангии в состоянии элеутеросхизиса отличаются от вегетативных клеток желто-зеленой окраской. В каждом спорангии образуется большое количество (от нескольких десятков до двух-трех сотен) голых протопластов репродуктивных клеток – зооспор либо апланоспор. Тип репродуктивных клеток и характер их освобождения из спорангия зависит от состояния культуры (рис. 3, 7).

В большинстве случаев в культурах как на жидкой, так и на и агаризованной среде в спорангиях образуются зооспоры (zsp). При их выходе оболочка спорангия вскрывается небольшим отверстием и в зоне разрыва спорангия наблюдается структура, похожая на колпачок. Далее отверстие расширяется и зооспоры освобождаются в быстро растворяющемся слизистом пузыре. Зооспоры голые, слабометаболические, с двумя равными жгутиками длиной 6–8 мкм, с одним пристенным чашевидным хлоропластом, содержащим малозаметный базальный пиреноид и крупную палочковидную стигму, расположенную в передней части клетки, с двумя апикальными пульсирующими вакуолями. При активном движении зооспоры веретеновидные, их длина составляет 6,2–7,5 мкм, ширина – 1,6–2,2 мкм; при замедлении движения форма зооспор приближается к субсферической. При остановке зооспоры округляются, их диаметр составляет 3,5–4,5 мкм (рис. 2, 1; 4, 1).

В культурах на подсыхающем агаре протопласты репродуктивных клеток иногда округляются без образования жгутиков еще в спорангии, одеваются в тонкую собственную оболочку и трансформируются в апланоспоры (asp). Освобождение апланоспор происходит в результате одностороннего частичного ослизнения и разрыва оболочки спорангия без образования слизистого пузыря. Апланоспоры морфологически полностью идентичны ювенильным клеткам с нерассеченным хлоропластом. Диаметр апланоспор составляет 4–6 мкм. Апланоспоры способны без дальнейшего роста сохраняться в старых культурах длительное время и, таким образом, представлять один из типов покоящихся клеток. При пересеве на свежую питательную среду апланоспоры прорастают в ювенильные и далее – в прегенеративные и генеративные клетки.

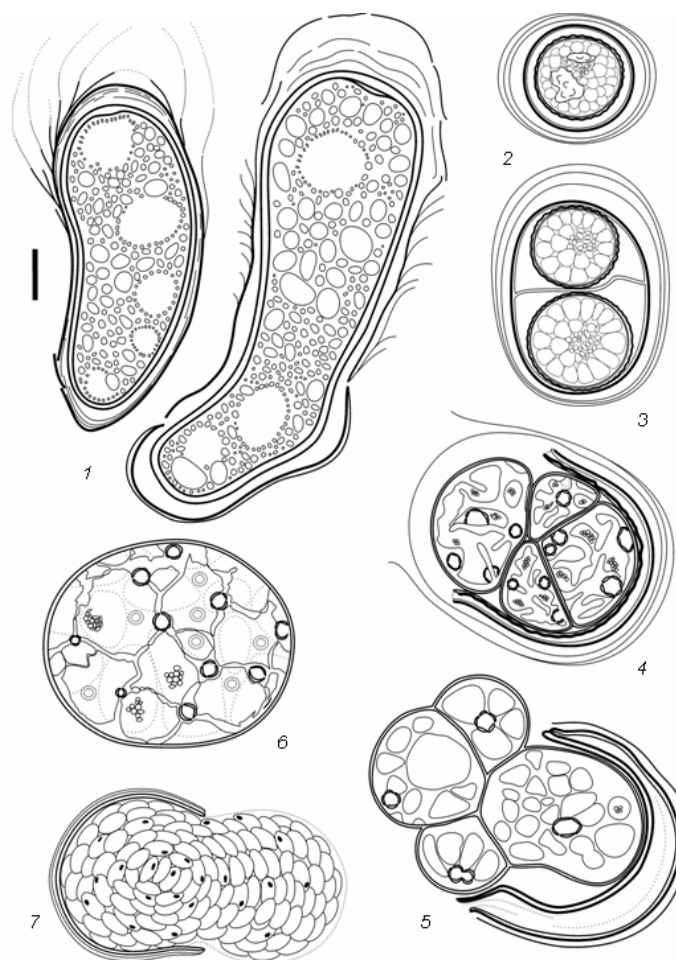


Рис. 3. *Chlorochytrium hypanicus* (штамм АСКУ 222-03): 1 – субсильные клетки; 2, 3 – акинеты; 4 – прорастание акинеты; 5 – прорастание субсильной клетки; 6 – преспорангиальная клетка; 7 – выход зооспор из спорангия. Шкала 10 мкм

Акинеты (Ак) образуются в культурах возрастом от 3 месяцев и более при подсыхании агаризованной среды из клеток двух возрастных состояний – G1 и SS. При образовании акинет протопласт сжимается, округляется, отстает от оболочки вегетативной клетки, вырабатывает собственную тонкую двуслойную оболочку, у которой внутренний слой бесцветный и гладкий (гиалиновый), толщ. около 0,5 мкм, внешний слой мелко- или среднебугристый, как правило, с красноватым оттенком, толщ. 0,3–0,8 мкм. В вакуолях и цитоплазме накапливаются желтые и оранжевые пигменты и акинета приобретает оранжевый цвет. Вокруг нее сохраняется оболочка исходной вегетативной клетки. У молодых генеративных клеток в акинеты трансформируются одиночные клетки или диады, при этом из одной вегетативной клетки образуется только одна акинета. В субсильных клетках при образовании акинет

сжатие протопласта происходит одновременно с его однократным делением, в результате чего под оболочкой одной субсенильной клетки формируется пара акинет. Их диаметр соответствует размеру молодых генеративных клеток и составляет 14,5–26,0 мкм при среднем значении 18,5 мкм (рис. 3, 2, 3; 4, 9).

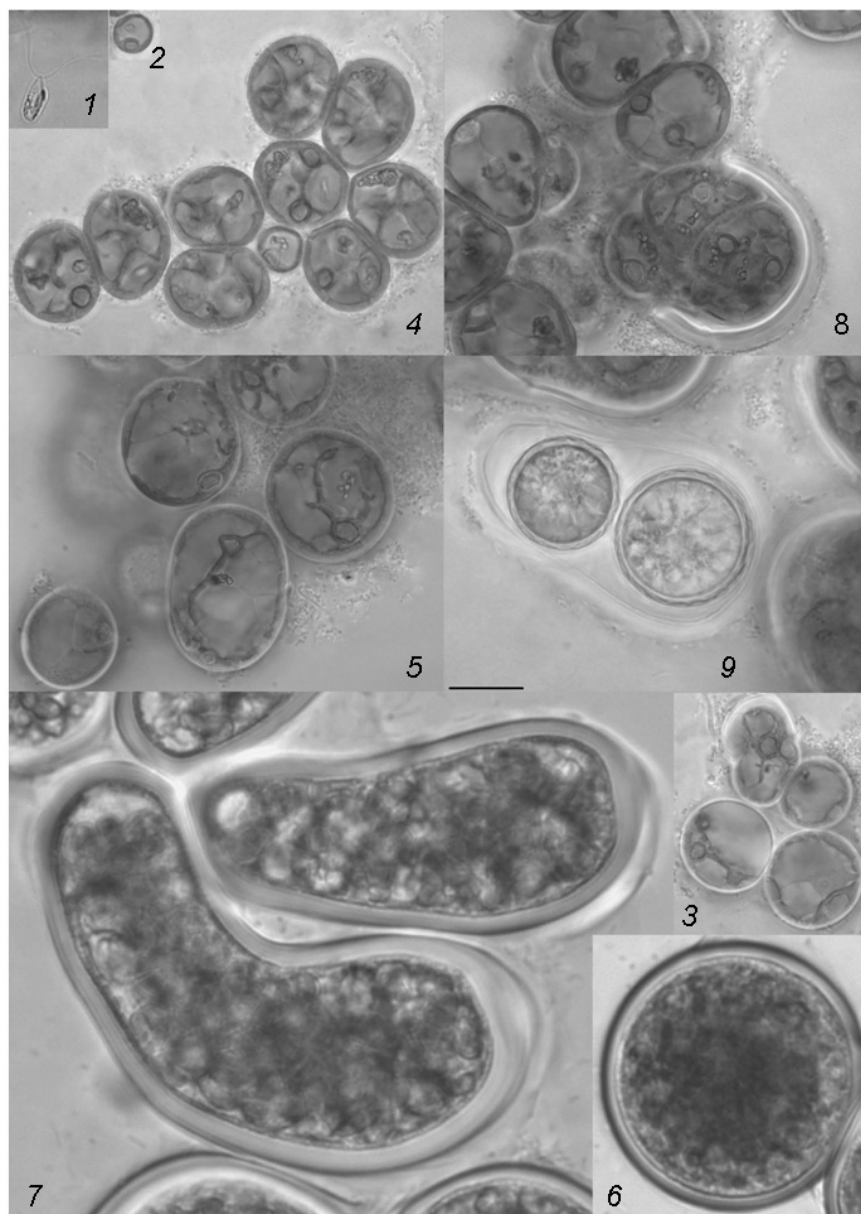


Рис. 4. *Chlorochytrium hyranicus* (штамм АСКУ 222-03): 1 – зооспора; 2 – ювенильная клетка; 3 – прегенеративные клетки; 4, 5 – молодые и зрелые генеративные клетки соответственно; 6, 7 – субсенильные клетки; 8 – прорастание субсенильной клетки; 9 – акинеты, образовавшиеся из субсенильной клетки. Шкала 10 мкм

Акинеты при пересеве на свежую среду приобретают зеленую окраску, их протопласт увеличивается и оболочки, окружающие акинету, разрываются. Протопласт делится путем десмосхизиса и далее прорастает в клетки состояния G2, образуя комплексы в виде "плеврококкоидных" нитей или неправильных пакетов (рис. 3, 4).

Молекулярно-филогенетический анализ

Нуклеотидная последовательность 18S, полученная для штамма АСКУ 222-03, составляла 2371 пн дл., что существенно больше типичной для большинства зеленых водорослей длины малой рибосомной субъединицы рДНК. Эти отличия были обусловлены наличием интрона длиной 600 пн.

Как и предполагалось на основе анализа фенотипических признаков, поиск сходных последовательностей в базе данных Генбанк (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с использованием megablast алгоритма показал, что 18S рДНК АСКУ 222-03 близок к членам клады *Stephanosphaerinia* (Nakada et al., 2008). Поэтому в дальнейшем были использованы только последовательности из этой клады (45), а также из клад *Arenicolina* (4) и *Chlorogonia* (7), взятых в качестве внешнего корня. Выравнивание 18S последовательности АСКУ 222-03 проводилось на основе матрицы Nakada et al. (2008; <http://www2.tba.t-com.ne.jp/nakada/takashi/data/index.html>). Всего набор данных, использованных для филогенетических анализов, включал 57 последовательностей и составлял 1688 пн дл. GTR+I+Г модель эволюции нуклеотидных последовательностей выбрана программой Modeltest 3.04 как наиболее адекватно описывающая наш набор данных. Филогенетическое древо, построенное ML методом, показано на рис. 5.

Штамм АСКУ 222-03 был помещен в кладу, объединяющую представителей родов *Chlorosarcinopsis* Herndon, *Protosiphon* Klebs, *Chlorosphaeropsis* Visch., *Spongiochloris* R.C.Starr, *Gongrosira* Kütz., *Pachycladella* P.C. Silva, в качестве сестринского таксона для *Chlamydomonadaceae* sp. Pic8/18P-3d. Принадлежность нового вида к этой кладе была поддержана умеренным значением бутстрепа (85 % ML), но его близость с *Chlamydomonadaceae* sp. Pic8/18P-3d менее убедительна.

Обсуждение

Статус таксона, представленного штаммом АСКУ 222-03. По комплексу признаков, включающих: а) голые двужгутиковые зооспоры; б) сетчатые хлоропласты с несколькими пиреноидами; в) одноядерные вегетативные клетки; г) десмосхизис с образованием диад, пакетов и более сложных клеточных агрегатов; д) зооспорогенез по типу элеутеросхизиса, штамм АСКУ 222-03 демонстрировал признаки сходства с двумя видами — *Chlorochytrium lemnae* (Cohn, 1870–1875) и *Chlorosphaeropsis lemnae* (Moeuwus, 1950).

Наиболее подробное описание *Chlorochytrium lemnae* представил Р. Луин (Lewin, 1981) на основе изучения 6 штаммов данного вида, из

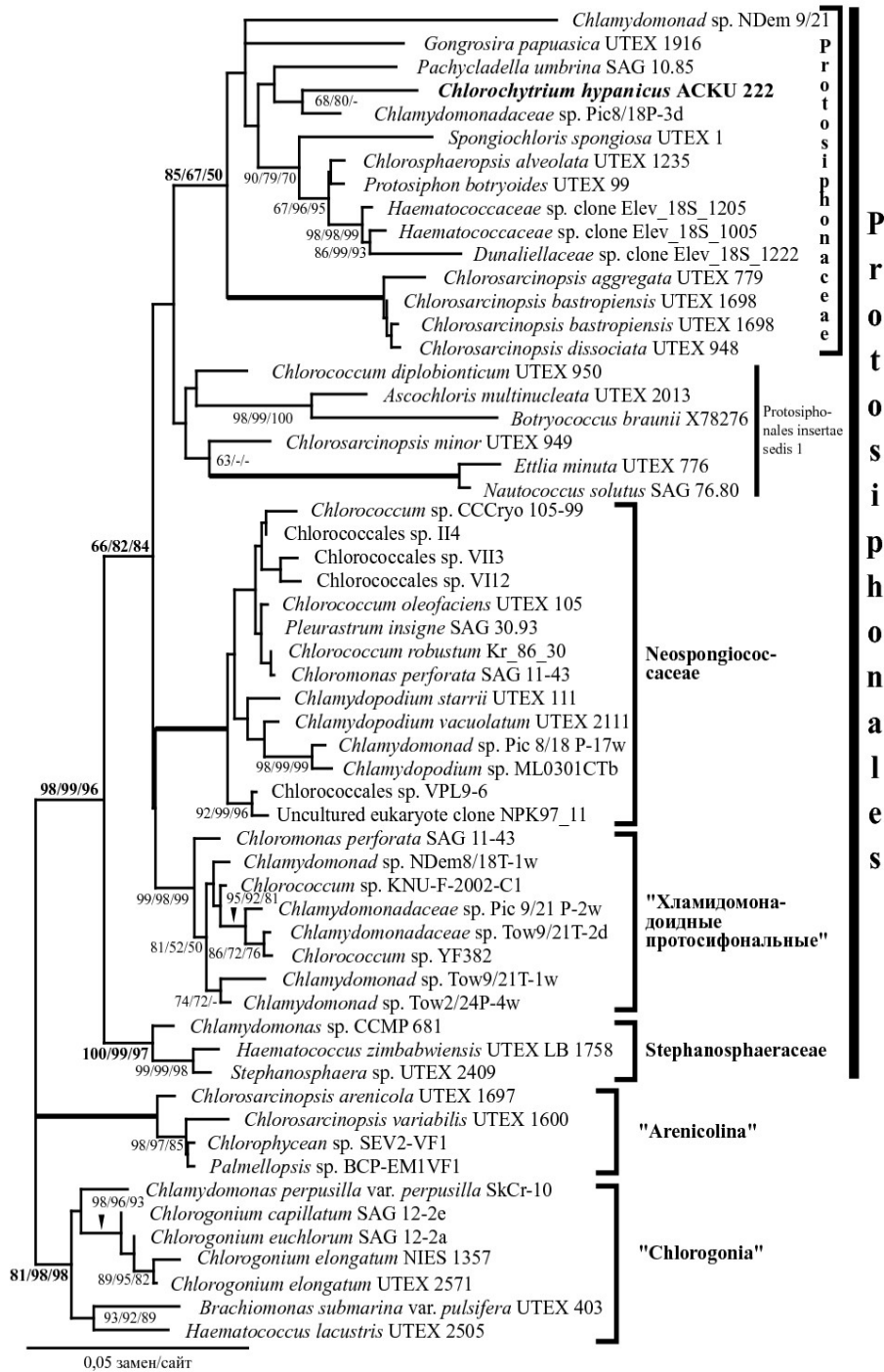


Рис. 5. Место *Chlorochytrium hypanicus* в системе *Protosiphonales* по результатам анализа за последовательности 18S рДНК (филогенетическое древо, построенное ML методом; на ветвях — значения бутстрепа для ML/NJ/MP)

которых пять были выделены из *Lemna minor* L. и *L. gibba* L., растущих в водоемах в окрестностях Оксфорда (Великобритания), а шестой — из ряски, растущей в водоемах штата Небраска (США). В данной работе Р. Луин убедительно показал соответствие изученных им штаммов авторскому диагнозу данного вида и значительно дополнил сведения о фенотипических признаках *Chlorochytrium lemnae*.

Chlorosphaeropsis lemnae был описан Л. Мевус (Moewus, 1950) на основе культуры, выделенной из отмерших листьев *L. minor* в бот. саду Гейдельберга, Германия. Хотя в его диагнозе был отмечен один из признаков, отличающий ее штамм от *Chlorochytrium lemnae* — сравнительно небольшие максимальные размеры вегетативных клеток — диам. около 20 мкм, Р. Луин не счел этот признак существенным и предложил считать *Chlorosphaeropsis lemnae* синонимом *Chlorochytrium lemnae*.

Позже Р. Луин из *Lemna trisulca*, растущей в пруду в окр. г. Утрехт, выделил в культуру и депонировал в коллекции культур Геттингенского ун-та (SAG 15.85) штамм, идентифицированный им как *Chlorochytrium lemnae* (Schlösser, 1994). Субкультура этого штамма в дальнейшем была депонирована в коллекции культур водорослей Киевского нац. ун-та им. Тараса Шевченко (АСКУ 686-06).

Между собой штаммы АСКУ 222-06 и АСКУ 686-06 отличались. Морфология АСКУ 222-06 в основном соответствовала описанию *Chlorochytrium lemnae*, выполненному Р. Луином (Lewin, 1981). Второй штамм — АСКУ 686-06, который в коллекциях депонирован как *Chlorochytrium lemnae*, в полной мере соответствовал авторскому диагнозу *Chlorosphaeropsis lemnae* (табл. 2).

В наибольшей степени сходство АСКУ 222-06 с описанием и иллюстрациями *Chlorochytrium lemnae* проявилось в наличии крупных удлиненных субсенильных клеток, длина которых может достигать 80 мкм и более, и акинет с тонкой двуслойной оболочкой. Отличия АСКУ 222-03 от *Ch. lemnae* состояли в переднем, а не среднем положении стигмы у зооспор, в наличии более толстой оболочки у субсенильных клеток (4–15 вместо 2–3 мкм), в формировании у части акинет мелкобугорчатой, а не гладкой оболочки, а также в экологии — вегетацией в свободноживущем, а не эндофитном состоянии.

Штамм АСКУ 686-06, по нашему мнению, может быть идентифицирован как *Chlorosphaeropsis lemnae*. Он отличается как от АСКУ 222-03, так и от описания *Chlorochytrium lemnae*, выполненного Р. Луином, меньшими максимальными размерами вегетативных клеток (диам. до 36 мкм), отсутствием крупных удлиненных субсенильных клеток (изредка присутствуют субсферические клетки до 36,5 мкм дл. и до 28 мкм шир.), а также наличием у акинет толстой многослойной, а не тонкой двуслойной оболочки. Кроме того, субсенильные клетки АСКУ 686-06 при пересеве на свежую среду трансформируются только непосредственно в спорангии, а не прорастают в клеточные агрегаты, т.е. десмосхизис при прорастании субсенильных клеток не наблюдается.

Сравнительная характеристика штаммов АСКУ 222-03 и АСКУ 686-06, описаний *Chlorosphaeropsis lemnae* и *Chlorochytrium lemnae*

Признак	АСКУ 222-03	АСКУ 686-06	<i>Chlorochytrium lemnae</i> (Lewin, 1981)	<i>Chlorosphaeropsis lemnae</i> (Moewus, 1950)
Положение стигмы у зооспор	Переднее	Переднее или средне-переднее	Среднее	?
Длина зооспор, мкм	6,2–7,5	5–7	5–7	5
Ширина зооспор, мкм	1,6–2,2	2–3	ок. 2	2,5
Диаметр округлившихся зооспор, мкм	3,0–4,5	3,8–4,6	ок. 3*	?
Макс. диаметр клеток стадии Pre-g, мкм	20	9,8	10	?
Мин. диаметр клеток стадии G1, мкм	18,5	10,5	20	?
Макс. размер сферических клеток стадии SS, мкм	52	36	25	20
Макс. длина удлинённых клеток стадии SS, мкм	94	Не выявлены	До 80*	Не выявлены
Макс. ширина удлинённых клеток стадии SS, мкм	42	Не выявлены	?	Не выявлены
Макс. толщина оболочки стадии SS, мкм	4–15	4,9 (7,2)	2–3	?
Диаметр акинет, мкм	14,5–26	17,7–25 (28)	11,5–17**	?
Оболочка акинет	Гладкая и мелко-бугорчатая	Средне-бугорчатая, изредка почти гладкая, толстая (45 слойная)	Гладкая **	?
Экология	Свободно-живущая	Эндифит Lemna	Эндифит Lemna	Эндифит Lemna

*Согласно авторскому диагнозу Р. Кона, диаметр округлившихся зооспор составляет 4-5 мкм, максимальная длина удлинённых клеток – до 100 мкм (Cohn, 1870–1875);

** согласно рисунку 6.6 (Lewin, 1981).

Недавно для рода *Chlorochytrium* была предложена концепция, согласно которой в данный род была включена большая группа видов, у которых вегетативные клетки одноядерные, имеют париетальные лопастные хлоропласты со многими пиреноидами, многочисленными пульсирующие вакуоли и способны к десмосхизису перед образованием зоо-

спор, причем сами зооспоры не метаболичны, находятся в клеточных оболочках и имеют дорзовентральное строение (Wujek, Thompson, 2005). При обсуждении несоответствия этой родовой концепции результатам электронно-микроскопического исследования зооспор *Chlorochytrium lemnae*, показавшим несомненное наличие у данного вида именно голых зооспор (Watanabe, Floyd, 1994), Д. Вужек и Р. Томпсон (Wujek, Thompson, 2005) предположили, что авторы, проводившие электронно-микроскопическое исследование, имели дело с контаминированными или неправильно идентифицированными культурами. Однако наши данные подтверждают наличие именно голых зооспор у штаммов, соответствующих классической концепции рода *Chlorochytrium*, и позволяют утверждать, что исследования С. Ватанабе и Г.Л. Флойда (Watanabe, Floyd, 1994) были выполнены на чистом и правильно идентифицированном материале, а методическую ошибку, по-видимому, связанную с неправильной идентификацией или контаминацией материала, допустили Д. Вужек и Р. Томпсон.

Таким образом, по морфологическим признакам АСКУ 222-03 может быть определен как новый вид рода *Chlorochytrium*, близкий к *Chlorochytrium lemnae*, а АСКУ 686-06 переопределен как *Chlorosphaeropsis lemnae* и, в отличие от мнения Р. Луина (Lewin, 1981), исключен из числа синонимов *Chlorochytrium lemnae*. Для вида, представленного штаммом АСКУ 222-03, предлагается название *Chlorochytrium hypanicus*, отражающее древнегреческое название р. Южный Буг – Гипанис.

***Chlorochytrium hypanicus* sp. nov.**

Cellulae solitariae, in diadis, in paketis et in filis brevibus irrectis, sphaericae et elongatae, cum membrana, quae crassitudo ad 15 μm . Chloroplastum reticulatum, cum uno sive multis pirenoideis cum involucro interrupto amyloceo. Nucleus unus. Reproductio it per divisionem vegetativam (desmoschisis) ac per zoosporas et aplanosporas (eleuteroschisis). Zoosporae nudaе, cum duobus aequalibus flagellis, cum stigmatе anteriore sunt, post moram rotundantur. Actinetae rubrae, cum membrana levi (crassitudo 0.8–1.3 μm) aut bistratali microtuberoso sunt. Metra: zoosporae in motu 6.2–7.1 \times 1.6–2.2 μm , post moram 3.0–4.5 μm in diametro, longitudo cellularum vegetativarum ad 94 μm , latitudo 44 μm , actinetarum 14.5–26.5 μm in diametro.

Iconotypus: figura nostra 2, 3.

Materia fixa in cathedra bothanicae conservata est (certum sample АСКУ 222-3F)

Stamm autenticus (epitypus): АСКУ 222-03

Habitatio typica: inter macrophyta aquosa in Pivdennyj Buh fluvio, in agro Hard viridarii regionalis localis Hranitno-stepove Pobuzhzhya (urbs Juzhnoukrajinsk, Mykolajivska oblast, Ukraїna). Collectus est anno 2003 E. Demchenko.

Клетки одиночные, в диадах, пакетах и коротких неправильных нитях, сферические и удлинённые, с оболочкой толщ. до 15 мкм. Хлоропласт сетчатый, с одним или многими пиреноидами с прерывистой крахмальной оберткой. Ядро одно. Размножение вегетативным делением (десмосхизис) и зоо- и апланоспорами (элеутеросхизис). Зооспоры голые, с двумя равными жгутиками, передней стигмой, после остановки округляются. Акинеты красные, с гладкой или мелкобугорчатой двуслойной оболочкой толщ. 0,8–1,3 мкм. Размеры: зооспоры в движении 6,2–7,1×1,6–2,2 мкм, после остановки 3,0–4,5 мкм в диаметре, вегетативные клетки до 94 мкм дл., до 44 мкм шир., акинеты диам. 14,5–26,0 мкм.

Иконотип: рис. 2, 3.

Фиксированный материал сохраняется на кафедре ботаники (экс. АСКУ 222-3F).

Автентичный штамм (эпитип): АСКУ 222-03

Типовое местонахождение: среди водных макрофитов р. Южный Буг в урочище Гард регионального ландшафтного парка Гранитно-степное Побужье (г. Южноукраинск Николаевской обл., Украина). Собран в 2003 г. Э.Н. Демченко.

Наиболее сходен с *Chlorochytrium lemnae*, от которого отличается передним положением стигмы у зооспор, толстой (до 15 мкм) клеточной оболочкой у субсенильных клеток, формированием акинет с мелкобородчатой оболочкой, экологией. От всех прочих видов рода *Chlorochytrium* отличается наличием деления по типу десмосхизиса, приводящему к образованию диад, пакетов и плеврококкоидных агрегатов.

Место *Chlorochytrium hypanicus* в системе зеленых водорослей. В настоящее время положение рода *Chlorochytrium* в системе зеленых водорослей не известно. На сайте AlgaTerra (<http://www.algaterra.net/ATDB/Molecular/MolecularMain.cfm>) имеется ссылка о том, что у штамма, депонированного как *Chlorochytrium lemnae* SAG 15.85 (его субкультуру представляет АСКУ 686-06), Д. Хепперли и Т. Фридл секвенировали 18S rDNA. Однако этот сиквенс в международных банках генетической информации не депонирован, а материалы о результатах молекулярно-филогенетического анализа данного штамма не публиковались. Кроме того, этот штамм, по нашим данным, основанным на морфологическом исследовании АСКУ 686-06, представляет не *Chlorochytrium lemnae*, а *Chlorosphaeropsis lemnae*.

Согласно полученным нами данным, *Chlorochytrium hypanicus* является членом молекулярной макроклады *Stephanosphaerinia* (рис. 5), выделенной среди большой группы зеленых водорослей без учета каких-либо фенотипических данных исключительно на основании результатов филогенетического анализа 18S rDNA в соответствии с принципами Фи́лоКода. Эта макроклада объединила несколько клад монадных, коккоидных, сарциноидных и нитчатых водорослей. Ранее коккоидные, сарциноидные и нитчатые водоросли, входящие в *Stephanosphaerinia*, на основе анализа комплекса морфологических, ультраструктурных и биохимических признаков были объединены в одну кладу.

мических признаков было предложено включить в расширенный по объему пор. *Protosiphonales* (Костіков та ін., 2001), имеющий общего предка с одноклеточными монадными водорослями, — *Chloromonas perforata* Gerloff et Ettl. Современные молекулярно-филогенетические данные подтверждают целесообразность выделения пор. *Protosiphonales*, определяя его как монофилитическую группу. При этом границы порядка еще больше расширяются — до макроклады *Stephanospherinia* в целом, за счет включения в него, с одной стороны, клады хламидомонадоидных протосифональных водорослей (в которую входит *Chloromonas perforata* и родственные ему *Chlamydomonas*-подобные таксоны), с другой — клады, содержащей *Haematococcus zimbabwiensis* Pockock и *Stephanosphaera* sp.

Таким образом, *Chlorochytrium hypanicus*, который является первым видом рода *Chlorochytrium*, чье место в системе определено на основе молекулярно-филогенетических реконструкций, относится к классу *Chlorophyceae* и входит в пор. *Protosiphonales* s.l., соответствующий молекулярной макрокладе *Stephanospherinia*.

***Chlorochytrium hypanicus* в системе *Protosiphonales*.** *Protosiphonales* Ettl et Komárek (1982) в расширенной трактовке (включая монадных представителей; см. Костіков та ін., 2001) объединяет как одноклеточные (монадные и коккоидные), так и многоклеточные водоросли. У последних многоклеточные таломы образуются в результате десмосклизиса и представлены сарциноидными агрегатами и их комплексами. Для протосифональных характерно бесполое размножение двужгутиковыми зооспорами, которые могут быть либо голыми, либо одетыми в клеточные оболочки. Монадные стадии двужгутиковые, с базальными телами, смещенными по часовой стрелке (1–7, или CW-ориентация), система микротубулярных жгутиковых корней крестообразная и соответствует формуле 4-2-4-2. Митоз хламидомонадового или цилиндрикапсового типа. Клеточная оболочка, по меньшей мере у коккоидных и многоклеточных представителей, содержит внутренний слой из упорядочено расположенных целлюлозных фибрилл. Водоросли, входящие в данный порядок, способны к гиперсинтезу вторичных каротиноидов.

Порядок включает, как минимум, четыре клады, ранг каждой из них может соответствовать семейству, и одну группу с неопределенным статусом — *Protosiphonales incertae sedis*. Три клады, приведенные как "хламидомонадоидные протосифональные", *Stephanosphaeraceae* и *Neosporangiococcaceae* (см. рис. 5), объединяют виды, для которых характерно размножение при помощи неметаболических зооспор, одетых в клеточные оболочки. Для "хламидомонадоидных протосифональных" и *Stephanosphaeraceae* характерен монадный тип морфологической структуры тела и хламидомонадный тип митоза. Клада *Neosporangiococcaceae* включает коккоидные и нитчатые протосифональные с париетальными или губчатыми хлоропластами и митозом цилиндрикапсового типа. Эта клада соответствует двум ранее предложенным семействам — *Neosporangiococcaceae* Kostikov (Костіков та ін., 2001) и *Deasoniaceae* Kostikov (Костіков та ін., 2001). Этой кладе также соответствует предложенная Т. Фридлином ин-

терпретация пор. *Chlorococcales* (Friedl, 1997a, b). Однако номенклатурный тип рода *Chlorococcum* (*Ch. infusionum* (Schrank) Menegh.) в данную кладу не попадает (Nakada et al., 2008).

Protosiphonales incertae sedis представляет группу, для которой комплекс диакритических признаков не определен. Большинство видов, достоверно входящих в эту группу (*Chlorococcum diplobionicum* Herndon, *Ascochloris multinucleata* Bold et MacEntee, *Ettlia minuta* (Arce et Bold) Komárek, *Nautococcus solutus* P.A. Archibald), размножаются двужгутиковыми в той или иной степени метаболическими зооспорами в тонкой оболочке (Андреева, 1998; Komárek, Fott, 1983; Ettl, Gärtner, 1995; и др.). У одного из видов (*Chlorosarcinopsis minor* Herndon) зооспоры голые (Melkonian, 1978). Для *E. minuta* и видов рода *Nautococcus* Korschikov описан хламидомонадный тип митоза (Kouwets, 1994). Возможно, для данной группы характерен пиреноид, облицованный несколькими крахмальными пластинами и пронизанный многочисленными одиночными тилакоидами, как это показано на примере *Ch. minor*, *E. minuta* и *N. solutus* (Melkonian, 1978; Kouwets, 1994).

Chlorochytrium hypanicus относится к последней, четвертой кладе. Эта кладка характеризуется наличием исключительно голых зооспор и в целом соответствует сем. *Protosiphonaceae* в ранее предложенном расширенном объеме (Костиков та ін., 2001). На уровне фенотипа монофилию данного семейства поддерживают следующие признаки: а) наличие голых двужгутиковых зооспор, у которых базальные тела смещены по часовой стрелке, а система микротрубочковых корней соответствует формуле 4-2-4-2; б) цилиндрикапсовый тип митоза; в) наличие в клеточной оболочке внутреннего слоя из кристаллически упорядоченных целлюлозных фибрилл; г) наличие пиреноидов, в строении которых размещается незначительное число парных тилакоидов; эти пиреноиды способны фрагментироваться; д) образование при неблагоприятных условиях акинет, накапливающих значительные количества масла и вторичных каротиноидов. Кроме того, в данном семействе прослеживаются, по меньшей мере, три тенденции: а) у клеток, достигающих размера более 15–20 мкм, хлоропласт из париетального трансформируется в сетчатый; б) акинеты (а у ряда таксонов и вегетативные клетки) способны делиться по типу десмосхизиса; в) у крупных клеток элеутеросхизису предшествует более или менее длительное многоядерное состояние.

***Chlorochytrium hypanicus* как представитель *Protosiphonaceae*.** Семейство *Protosiphonaceae*, установленное в начале XX ст. (Blackman, Tansley, 1902), почти более полувека считалось монотипным и включало только один вид — *Protosiphon botryoides* Klebs. В 70-х гг. XX ст. в это семейство на основании наличия удлиненных многоядерных клеток, напоминающих вегетативные клетки *Protosiphon*, было предложено включить род *Urnella* Playfair (Bourrelly, 1966). Позже при исследовании ультраструктуры зооспор *Urnella terrestris* Playfair и *Ascochloris multinucleata* было установлено, что цитоскелет обоих изученных видов имеет черты сходства с

Protosiphon, однако зооспоры отличаются от последнего наличием тонкой клеточной оболочки (Watanabe, Floyd, 1989a, b).

Л.А. Левис (Lewis, 1997) по результатам анализа последовательности 18S *rDNA* показала, что близкими родственниками *Protosiphon botryoides* являются *Spongiochloris spongiosa* R.C. Starr и *A. multinucleata*, однако таксономических решений в отношении объема и возможных признаков *Protosiphonaceae* этот автор не предложил.

В 2001 г. на основе морфологических критериев, с учетом данных Л.А. Левис, а также ряда ультраструктурных данных (Watanabe, Floyd, 1989a, b; Kouwets, Van der Schaaf, 1992; Kouwets, 1994), было предложено расширить объем *Protosiphonaceae* Blackman et Tansley и помимо рода *Protosiphon* включить в него рода *Ascochloris* Bold et McEntee, *Spongiochloris*, *Kentrosphaera* (включая часть видов *Chlorochytrium*) и *Chlorosphaeropsis* (Костиков та ін., 2001). Данные об ультраструктуре зооспор и митозе у *Protosiphon*, *Spongiochloris* и *Ascochloris* (Watanabe, Floyd, 1989b; Kouwets, Van der Schaaf, 1992, 1993; Kouwets, 1994) позволили отнести представителей *Protosiphonaceae* s.l. к группе хлорофициевых водорослей с ориентацией базальных тел по часовой стрелке (CW-ориентация), имеющей крестовидный цитоскелет, описываемый формулой 4-2-4-2, и цилиндрикапсовый тип митоза.

В 2003 г. на основе анализа последовательности 18S *rDNA* было показано возможное близкое родство *Protosiphon botryoides* и *Gongrosira papuasica* (Borzi) Turra (Lopez-Bautista, Chapman, 2003). Эти результаты согласовывались с данными о соответствии ультраструктуры жгутикового аппарата гамет *Gongrosira papuasica* протосифоновому типу (Watanabe et al., 1992). Далее анализ 18S *rDNA* подтвердил родственные отношения *Protosiphon botryoides* и *Chlorosphaeropsis alveolata* Herndon (Watanabe et al., 2006).

Реконструкция филогенетических отношений большой выборки монадных, гемимонадных, коккоидных и сарциноидных водорослей, выполненная на основе сравнения 18S *rDNA*, показала, что в кладе, включающую *P. botryoides*, помимо *Ch. alveolata*, *S. spongiosa*, *G. papuasica* следует включить *Pachycladella umbrina* (G.M. Smith) Silva, а также три неидентифицированные одноклеточные зеленые водоросли, приведенные как "Chlamydomonad sp.", и некоторые виды р. *Chlorosarcinopsis* (*Ch. dissociata* Herndon, *Ch. bastropiensis* Groover et Bold, *Ch. aggregata* Arce et Bold) (Nakada et al., 2008).

По результатам нашего анализа, *Chlorochytrium hypanicus* подлежит включению в кладу, соответствующую *Protosiphonaceae*. Кроме того, три вида р. *Chlorosarcinopsis* — *Ch. dissociata*, *Ch. bastropiensis*, *Ch. aggregata* — также достоверно являются членами этой клады (Nakada et al., 2008). Поскольку номенклатурный тип р. *Chlorosarcinopsis* — *Ch. minor* в эту группу не входит, упомянутые выше виды *Chlorosarcinopsis*, по видимому, могут быть выделены в отдельный самостоятельный род. К *Protosiphonaceae* следует отнести и *Pachycladella umbrina* — коккоидную зеленую водоросль, имеющую шипы на поверхности клеточной оболоч-

ки. У этого вида, относимого по классической системе к представителям *Treubariaceae* с неизвестным типом размножения (Komárek, Fott, 1983), при специальном исследовании были выявлены зооспоры с ориентацией базальных тел по типу 1–7, причем на опубликованной электронограмме зооспоры выглядят голыми (Reymond, Hegewald, 1990).

Из *Protosiphonaceae* подлежит исключению *Ascochloris multinucleata*. Он, с одной стороны, достоверно не является членом клады, соответствующей данному семейству (входит в группу "Protosiphonales insertae sedis", см. рис. 5), с другой — фенотипически отличается от таксонов клады *Protosiphonaceae* наличием у зооспор клеточной оболочки (Watanabe, Floyd, 1989b).

В настоящее время недостаточный объем выборки таксонов, однозначно входящих в *Protosiphonaceae*, и недостаточная информативность 18S rDNA не позволяют достоверно установить систему родственных связей внутри данного семейства и, соответственно, более точно установить степень родства *Chlorochytrium hypanicus* с другими видами данной группы. Анализ фенотипических признаков также не является достаточно надежным. Например, по наличию способности к делению путем десмосхизиса, ведущего к образованию многоклеточных агрегатов, *Ch. hypanicus* кажется более родственным *Chlorosphaeropsis alveolata*, *Gongrosira papuasica* и входящим в *Protosiphonaceae* видам рода *Chlorosarcinopsis*. Однако деление путем десмосхизиса описано как один из способов прорастания акинет у *Spongiochloris typica* Trainor et McLean (McLean, 1969) и *S. irregularis* Kostikov (Костиков, 1991), а также, по нашим наблюдениям, при образовании и прорастании акинетоподобных клеток у *Protosiphon botryoides*.

По наличию сетчатого хлоропласта у вегетативных клеток *Ch. hypanicus* кажется более сходным с видами рода *Protosiphon*, *Ch. alveolata* и видами *Spongiochloris*, чем с видами рода *Chlorosarcinopsis* и *G. papuasica*. Однако все эти водоросли на прегенеративных стадиях характеризуются наличием париетального хлоропласта, причем формирование сетчатого хлоропласта зависит от способности клеток достигать крупных размеров и от степени вакуолизации цитоплазмы.

Характер вскрывания оболочки спорангия при выходе зооспор по наличию структуры, напоминающей колпачок, имеет черты сходства с *Pachycladella umbrina* (Reymond, Hegewald, 1990).

В генеративном состоянии клетки *Ch. hypanicus* остаются одноядерными и по этому признаку более сходны с *P. umbrina*, видами *Chlorosarcinopsis* и *G. papuasica*. Однако на стадии преспорангиев клетки *Ch. hypanicus* многоядерные, с мелким сетчатым хлоропластом и более напоминают виды родов *Spongiochloris* и *Chlorosphaeropsis alveolata*.

Таким образом, *Ch. hypanicus* вместе с видами родов *Protosiphon*, *Spongiochloris*, *Chlorosphaeropsis*, а также некоторыми видами *Chlorosarcinopsis* (*Ch. dissociata*, *Ch. bastropiensis*, *Ch. aggregata*), *P. umbrina* и *G. papuasica* входит в сем. *Protosiphonaceae* s.l. Провизорно к этому же семейству на основе морфологических признаков могут быть отнесены и дру-

гие виды р. *Chlorochytrium* (в частности, *Ch. lemnae*, который в наибольшей степени сходен с *Ch. hypanicus*), а также *Chlorosphaeropsis lemnae* и, возможно, виды *Kentrosphaera*.

Выводы

1. На основании комплекса фенотипических признаков и результатов молекулярно-филогенетических реконструкций описан новый вид *Chlorochytrium hypanicus* (*Chlorophyceae*), входящий в молекулярную макрокладу *Stephanosphaerinia*, которая, в целом, соответствует ранее предложенному пор. *Protosiphonales*.

2. В рамках данного порядка *Ch. hypanicus* вместе с видами родов *Protosiphon*, *Spongiochloris*, *Chlorosphaeropsis*, а также некоторыми видами *Chlorosarcinopsis* (*Ch. dissociata*, *Ch. bastropiensis*, *Ch. aggregata*), *Pachycladella umbrina* и *Gongrosira papuasica*, входит в молекулярную кладу, принимаемую как сем. *Protosiphonaceae* s.l.

3. Морфологические особенности (в первую очередь наличие голых двужгутиковых зооспор, а также проявление на разных стадиях онтогенеза признаков, присущих другим таксонам данной молекулярной клады) на фенотипическом уровне подтверждают обоснованность включения *Ch. hypanicus* в сем. *Protosiphonaceae* s.l., несмотря на то, что система родственных отношений внутри этого семейства требует дальнейших уточнений.

Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (*Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales*). – СПб.: Наука, 1998. – 352 с.

Коришков О.А. Підклас Протококові (Protococcineae) // Визначник прісноводних водоростей Укр. РСР. Вип. 5. – К.: Вид-во АН УРСР, 1953. – 440 с.

Костиков І.Ю. Новый вид роду *Spongiochloris* Starb (*Chlorophyta, Chlorococcaceae*) // Укр. бот. журн. – 1991. – 48, № 4. – С. 80–86.

Костиков І.Ю., Демченко Э.Н., Новохацкая М.А. Коллекция культур водорослей Киев. нац. ун-та им. Тараса Шевченко. Каталог штаммов (2008 г.) // Черномор. бот. журн. – 2009. – 5, № 1. – С. 37–79.

Костіков І.Ю., Романенко П.О., Демченко Е.М. та ін. Водорості ґрунтів України (Історія та методи дослідження, система, конспект флори). – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 300 с.

Blackman F. F., Tansley A. G. A revision of the classification of the green algae (Continued) // New Phytol. – 1902. – 1, N 10. – P. 238–244.

Bourelly P. Les Algues d'Eau Douce. I. Les Algues vertes. – Paris: N. Boubée et Cie, 1966. – 511 p.

Cohn R. Ueber parasitische Algen // Beitr. Biol. Pflanz. – 1870–1875. – 1. – P. 87–108.

Ettl H., Gärtner G. Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. – Stuttgart, etc.: G. Fischer Verlag, 1995. – 721 S.

Ettl H., Komárek J. Was versteht man unter dem Begriff “coccale Grünalgen”? – Algol. Stud. – 1982. – 29. – S. 345–347.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. – 1985. – 39. – P. 783–791.

- Friedl T. The evolution of the Green Algae // *Plaut. Syst. Evol. [Suppl.]*. – 1997a. – **11**. – P. 87–101.
- Friedl T. The evolution of the Green Algae // *Origin of Algae and their Plastids*. – Wien: Springer-Verlag., 1997b. – P. 87–102.
- John D.M., Tsarenko P.M. *Chlorococcales* // *The freshwater Algal Flora of the British Isles*. – Cambridge: Univ. Press, 2002. – P. 327–409.
- Komárek J., Fott B. *Chlorophyceae* (Grünalgen). Ordnung: *Chlorococcales*. 7. Teil. 1. Hälfte // *Das Phytoplankton des Süßwassers*. – Stuttgart: E. Schweizer. Verlag, 1983. – 1043 S.
- Kouwets F.A.C. The Cell Cycle in Multinucleate Coccoid Green Algae: Ultrastructure & Systematics. – Leiden, Rijksherbarium: Hort. Bot., 1994. – 161 p.
- Kouwets F.A.C., Van der Schaaf P.J. Two types of cytoplasmic cleavage in the coenocytic soil alga *Protosiphon botryoides* (*Chlorophyceae*) // *J. Phycol.* – 1992. – **28**. – P. 526–537.
- Kouwets F.A.C. Van der Schaaf P.J. Ultrastructural study of mitosis in the coenocytic soil alga *Protosiphon botryoides* (*Chlorophyceae*) with special reference to absolute configuration and behaviour of the basal apparatus // *Cryptogam. Bot.* – 1993. – **3**. – P. 221–234.
- Lewin R. Culture and Taxonomic Status of *Chlorochytrium lemnae*, a Green Algal Endophyte // *Brit. Phycol. J.* – 1981. – **19**. – P. 107–116.
- Lewis L.A. Diversity and phylogenetic placement of *Bracteacoccus* Tereg (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) based on 18S ribosomal RNA gene sequence data // *J. Phycol.* – 1997. – **33**, N 2. – P. 279–285.
- Lopez-Bautista J.M., Chapman R.L. Phylogenetic affinities of the *Trentepohliales* inferred from small-subunit rDNA // *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – **53**. – P. 2099–2106.
- McLean R.J. Rejuvenation of senescent cells of *Spongiochloris typica* // *J. Phycol.* – 1969. – **5**, N 1. – P. 32–37.
- Melkonian M. Structure and significance of cruciate flagellar root systems in green algae: comparative investigations in species of *Chlorosarcinopsis* (*Chlorosarcinales*) // *Plant Syst. Evol.* – 1978. – **130**. – P. 265–292.
- Moewus L. Entwicklungsgeschichtliche Studien ueber einige microscopisch kleine Aufwuchsalgen // *Schweitz. Hydrobiol.* – 1950. – **12**. – S. 47–66.
- Nakada T., Misawa K., Nozaki H. Molecular systematics of *Volvocales* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses // *Mol. Phylog. Evol.* – 2008. – **48**. – P. 281–291.
- Posada D., Crandall K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution // *Bioinformatics*. – 1998. – **14**, N 9. – P. 817–818.
- Reymond O.L., Hegewald E. Morphology, life cycle and taxonomy in *Pachycladella umbrina* (*Chlorophyceae*, *Chlorococcales*) // *Algol. Stud.* – 1990. – **58**. – P. 15–28.
- Schlösser U.G. SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen: Catalogue of Strains, 1994 // *Bot. Acta.* – 1994. – **107**. – P. 113–186.
- Swofford D.L. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Beta version 10. – Sunderland: Sin. Ass., 2002.
- Watanabe S., Floyd G.L. Variation in the ultrastructure of the biflagellate motile cells of six unicellular genera of the *Chlamydomonadales* and *Chlorococcales* (*Chlorophyceae*), with emphasis on the flagellar apparatus // *Amer. J. Bot.* – 1989a. – **76**. – P. 307–317.

- Watanabe S., Floyd G.L. Ultrastructure of the Zoospores of the Coenocytic Algae *Ascochioris* and *Urnella* (*Chlorophyceae*), with Emphasis on the Flagellar Apparatus // Brit. Phycol. J. – 1989b. – **24**. – P. 143–152.
- Watanabe S., Floyd G.L. Ultrastructure of the flagellar apparatus of the zoospores of the irregularlyshaped coccoid green algae *Chlorochytrium lemnae* and *Kentrosphaera gibberosa* (*Chlorophyta*) // Nova Hedw. – 1994. – **59**. – P. 1–11.
- Watanabe S., Chappell D.F., Floyd G.L. Ultrastructure of the flagellar apparatus of the gametes of *Gongrosira papuasica* (*Chlorophyta*) // Ibid. – 1992. – **27**. – P. 21–28.
- Watanabe S., Mitsui K., Nakayama T., Inouye I. Phylogenetic relationships and taxonomy of sarcinoid green algae: *Chlorosarcinopsis*, *Desmotetra*, *Sarcinochlamys* gen. nov., *Neochlorosarcina*, and *Chlorosphaeropsis* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) // J. Phycol. – 2006. – **42**, N 3. – P. 679–695.
- Wujek D.E., Thompson R.H. Endophytic unicellular chlorophytes: a review of *Chlorochytrium* and *Scotinosphaera* // Phycologia. – 2005. – **44**, N 3. – P. 254–260.

Получена 16.09.11

Рекомендовала в печать Г.К. Хурсевич

I.Yu. Kostikov¹, E.N. Demchenko¹, V.R. Boiko¹, A.A. Goncharov²

¹Taras Shevchenko Kiev National Univ., Dept. of Botany,
64, Vladymyrskaya St., 01001 Kiev, Ukraine

²Biological-Soil Sci. Institute of the Far East Branch of the RAS,
159, 100 Let Vladivostoku Prosp., 690022 Vladivostok, Russia

CHLOROCHYTRIUM HYPANICUS SP. NOV. (*CHLOROPHYCEAE*) AND ITS POSITION IN THE SYSTEM OF *PROTOSIPHONALES*

The description of a new species of green algae, *Chlorochytrium hypanicus* sp. nov. (*Chlorophyceae*), found in a flow of mud from the Southern Bug River (Ukraine) is presented. The analysis of the nucleotide sequence of the nuclear gene of 18S rDNA showed the position of this species in the system of *Stephanosphaerinia* macroclade, which generally corresponds to the previously proposed order *Protosiphonales*. It is shown that, in this order, incorporating four clades and "*Protosiphonales* incertae sedis" group of taxa, *Chlorochytrium hypanicus*, belongs to the clade corresponding *Protosiphonaceae* s.l., whose members differ from other representatives of this order by the presence of naked biflagellate zoospores. Morphologically, *Ch. hypanicus* is similar to *Ch. lemnae* Cohn, differing from it by anterior stigma in zoospores, thicker envelope of subsenile cells, a finely tuberculate envelope of akinetes, and by mode of life (free-living, not endophytic). From other species of the genus *Chlorochytrium* Cohn, new species differ by fission of desmoschisis type, leading to the formation of dyads, packages, and pleurococcal clusters. We discuss the volume, diacritical features, and structure of *Protosiphonaceae*, including the similarity of the results of molecular genetic and phenotypic approaches in the taxonomy of this family.

Key words: green algae, taxonomy, molecular phylogeny, *Chlorophyceae*, *Protosiphonales*, *Protosiphonaceae*, *Stephanosphaerinia*, *Chlorochytrium hypanicus*.