



УДК 582.251

## ТИПИ КЛІТИН ТА ЇХ СТАТУСИ У CHLAMYDOMONAS-ПОДІБНИХ ВОДОРОСТЕЙ (CHLOROPHYCEAE) В УМОВАХ КУЛЬТУРИ НА АГАРИЗОВАНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

М.М. ПАВЛОВСЬКА \* та І.Ю. КОСТИКОВ

**Анотація.** Розроблено класифікацію типів клітин в умовах культури на агаризованих середовищах. Виділено 6 морфотипів клітин. В межах кожного з типів визначені статуси у залежності від ступеня редукції атрибутів монадної організації клітин. Показано варіанти переходу клітин із одного морфотипу в інший при розчиненні слизу. Найбільша кількість морфотипів представлена у кладі Reinhardtinia, а лише по одному – у кладах Monadinia та Polytominia.

**Ключові слова:** *Chlamydomonas*, морфологічні ознаки, агаризоване середовище, пальмелевидний стан

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка ННЦ “Інститут біології”, пр. Акад. Глушкова, 2, м. Київ, 03022, Україна; \* [annopol@rambler.ru](mailto:annopol@rambler.ru)

### Вступ

Під поняттям “*Chlamydomonas*-подібні водорості” ми розуміємо види родів *Chlamydomonas* Ehr., *Chloromonas* Gobi, а також родів *Oogamochlamys* T. Pröschold, V. Marin, U.W. Schlösser et M. Melkonian, *Lobochlamys* Pröschold, Marin, Schlösser et Melkonian та *Microglena* Demchenko, Mikhailyuk et Pröschold, які було виділено з роду *Chlamydomonas*, та інших родів зелених водоростей, які за результатами молекулярно-філогенетичних ревізій віднесено у молекулярні клади разом із видами роду *Chlamydomonas* (Ettl 1983; Pröschold et al. 2001; Демченко et al. 2012). За результатами молекулярно-філогенетичних реконструкцій, виконаних, в основному, на підставі аналізу нуклеотидних послідовностей ядерного гена, що кодує малу субодиницю рибосомальної РНК (18S rDNA) показано, що *Chlamydomonas*-подібні водорості входять до складу не менше, ніж семи молекулярних клад: Moevusinia, Monadinia, Chlorogonia, Polytominia, Chloromonadinia, Reinhardtinia,

Oogamochlamydia (Nakada et al. 2008).

Діагнозита ключі для визначення видів роду *Chlamydomonas* побудовані у першу чергу, за морфологічними ознаками монадних клітин, переважно – за результатами спостережень природного, а не культурального матеріалу (Ettl 1983). Однак відомо, що в умовах агаризованої культури види даного роду з монадного стану переходять у нерухомий, при цьому, як правило, втрачають джугтики, стигму, пульсуючі вакуолі, і у такому стані їх дуже важко визначити.

Перші систематизовані дані про нерухомі стани у видів роду *Chlamydomonas* в природному матеріалі і накопичувальних культурах приводить О.А. Коршиков (1938). Він розглядає пальмелевидний стан, як процес формування слизових оболонок у активно рухливих клітин. Цей стан спостерігається при ослизненні оболонок під час вегетативного розмноження, при зміні концентрації розчинених у воді мінеральних речовин, а також як стадія розвитку на вологому субстраті або ґрунті. При цьому Коршиков виділяє

кілька варіантів пальмелевидних станів: а) “Gloeocystis” – оболонка материнської клітини сильно розбухає і всередині знаходяться дочірні клітини, б) “Palmella” – оболонка клітини повністю ослизнюється, в результаті формується безструктурний слиз; в) “Asterococcus” – багаторазове ослизнення і відставання оболонки клітини від протопласту, який формує нову оболонку; г) варіант зі збереженням старої не ослизненої материнської оболонки навколо дочірніх клітин, для якого О.А. Коршиков не дав назви. Також він зазначав, що клітини в пальмелевидному стані нічим не відрізняються від монадних клітин, крім можливості активно рухатися.

Зараз відомо, що основною ознакою пальмелевидного стану є наявність слизу. Слиз являє собою аморфну, липку суміш глікопротеїнів, мукополісахаридів та інших речовин. Формування слизу проходить за участі клітинної оболонки. Каркас клітинної оболонки хламідомонад утворений глікопротеїнами без кристалічно впорядкованої целюлози, яка характерна для оболонки більшості інших зелених водоростей та всіх вищих рослин (SATT *et al.* 1976; WOESSNER & GOODENOUGH 1994). Залежно від ультраструктури глікопротеїнового шару клітинної оболонки К. Робертс (ROBERTS 1974) виділив п'ять типів клітинної стінки, які відрізняються кількістю та щільністю шарів клітинної оболонки.

Мета даної роботи – розробити систему класифікації типів клітин в умовах культури на агаризованих середовищах для подальшого використання при ідентифікації та описі видів *Chlamydomonas*-подібних водоростей в умовах агарових культур.

### Матеріали і методи досліджень

Матеріалом слугували 70 штамів водоростей роду *Chlamydomonas* s.l. із колекції культур АСКУ Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Ці штами є субкультурами автентичних штамів даних видів з колекції культур Геттингенського університету (SAG) та університету штату

Техас в Остіні (UTEX). Відомості про походження штамів представлені в каталогах відповідних колекцій (Костиков и др. 2009).

Культури вирощували на 1% агаризованих середовищах Болда з нормальною і потроєною кількістю азоту (1N BBM і 3N BBM) та середовищі К (LIST OF MEDIA AND RECIPES 2013) на освітлювальних установках при інтенсивності освітлення 2.100-3.000 люкс і температурі 18-23°C до 1-го місяця і на холодильній установці з люмінесцентними лампами ЛБ-40 при температурі 12-14°C культури після 1-го місяця, з 12-ти годинним чергуванням світлової та темної фаз. Спостереження проводили після досягнення культурами віку 2 тижні, 2 і 6 місяців, та один рік.

Мікроскопічні дослідження виконували на оптичних мікроскопах серії VMXS і Primo Star, оснащених цифровими фотокамерами, з'єднаними з персональними комп'ютерами при обов'язковому використанні імерсійних об'єктивів. Слизові структури виявляли за допомогою фарбування препаратів розчином туші та 0,05% розчином метиленового синього.

### Результати досліджень

Результати досліджень штамів роду *Chlamydomonas* s.l. показали, що види роду в умовах культури на агаризованому середовищі утворюють різні типи слизових структур, а також, з віком, культури поступово втрачають атрибути монадності. Дотримуючись термінології та підходу, запропонованого О.А. Коршиковим (1938), розроблено систему класифікації типів нерухомих клітин. Вона включає шість морфотипів, чотири з яких представлено у роботі О.А. Коршикова, а два виділено як нові. Для кожного морфотипу наведено статуси, залежно від ступеня редукції атрибутів монадної організації.

В результаті редукції атрибутів монадної організації клітини набувають рис подібності з тими чи іншими родами водоростей. При виділенні статусів прийнято назви цих родів або цифрові індекси, також враховано вік

культури. Нами прийнято наступні індекси: 1 – клітини мають джгутики, стигму і пульсуючі вакуолі (залежно від положення джгутиків виділені дві варіації: 1a – джгутики знаходяться всередині слизу і 1b – джгутики виходять за межі слизу) (вік – до 1 міс.); 2 – клітини зберігають стигму та пульсуючі вакуолі (вік – 1-6 міс.); 3 – клітини зберігають пульсуючі вакуолі (вік – 6-12 міс.); 4 – клітини втрачають всі атрибути монадності (вік – старше 12 міс.). Всі варіанти типів і статусів клітин на агаризованому середовищі представлені у Табл. 1.

При переносі клітин з агаризованого середовища у водне при приготуванні препарату, залежно від здатності активно рухатися, можна виділити дві групи – монадні (рухливі) і гемімонадні (нерухомі) клітини. У рамках гемімонадних клітин можна виділити групу з клітинами, у яких відсутній слиз (кокоїди) і групи зі слизом різної консистенції (від рідкого безструктурного слизу до ослизнення клітинної оболонки).

*Монадний тип (монада)* – клітини на агаризованому середовищі зберігають всі атрибути монадності і можуть активно рухатися при приготуванні препарату.

*Гемімонадний тип (пальмелойд)* – клітини на агаризованому середовищі зберігають атрибути монадності, але не можуть активно рухатися. В межах цієї групи можна виділити п'ять типів.

*Кокоїдний тип (кокоїд)* – клітини позбавлені слизу і джгутиків, але зберігають інші атрибути монадності. Залежно від ступеня редукції атрибутів монадності нами виділено три статуси. Статус “*Nurpomonas*” (клітини зберігають полярність, стигму, пульсуючі вакуолі). Статус “*Customonas*” (стигма відсутня, інші атрибути – як у варіанту “*Nurpomonas*”). Статус “*Chlogosocum*” (полярність клітин не простежується, стигма, а іноді і пульсуючі вакуолі відсутні).

*Пальмелойдний тип (пальмела)* – клітини перебувають в спільному безструктурному слизу і зберігають джгутики та інші атрибути монадності. Залежно від ступеня редукції атрибутів монадності нами виділено чотири

статуси: “*Palmellopsis* – 1, 2, 3” та статус “*Palmella*” (повністю позбавлений атрибутів монадного типу морфологічної структури).

*Глеоцистоїдний тип (глеоциста)* – клітини знаходяться в одношарових слизових капсулах і зберігають джгутики та інші атрибути монадності. В найбільшій мірі нагадують представників роду *Sphaerello cystis*. Залежно від здатності зберігати нерухомі джгутики, стигму, пульсуючі вакуолі або повністю їх втрачати, нами виділено статуси “*Sphaerello cystis* – 1-4”.

*Астерококус тип* – клітини знаходяться в множинних слизових капсулах і зберігають атрибути монадності. В залежності від редукції атрибутів монадності виділено 4 статуси “*Asterococcus* – 1-4”.

*Мукоглеоцистоїдний тип (мукоглеоциста)* – клітини мають індивідуальні слизові капсули, що знаходяться у спільному слизу. Клітини, що зберігають стигму, а іноді і зачаткові джгутики, за аналогією з відповідним родом тетраспоральних водоростей виділено як статуси “*Chlamydocapsa* – 1, 2, 3”, а позбавлені цих атрибутів – як статус “*Gloeocystis*”.

Клітини усіх вище перерахованих типів мають клітинну оболонку. Якщо клітинна оболонка відсутня, то виникають “голі протопласти” – клітини втрачають оболонку і представлені голими протопластами, які можуть перебувати в колоніальному слизу, індивідуальних слизових капсулах або обидва ці варіанти поєднуються.

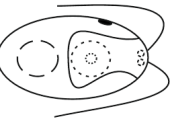
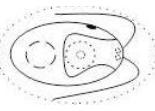
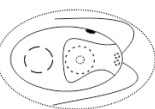
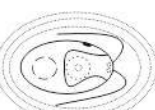
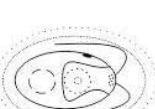
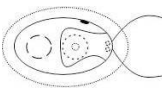
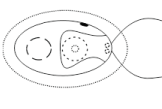
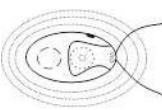
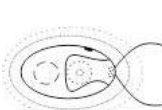
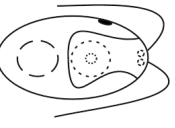
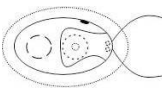
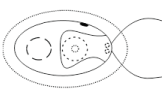
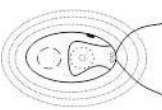
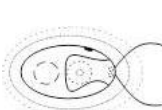
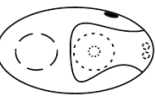
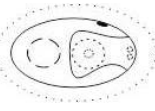
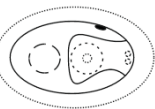
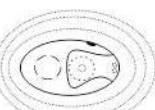

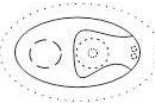
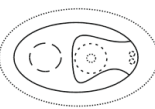
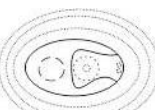
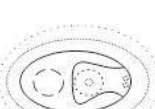
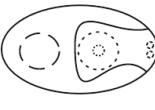
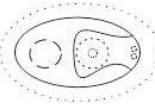
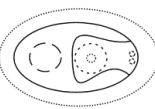
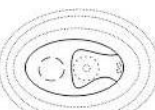
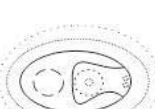


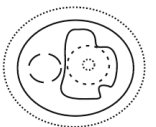



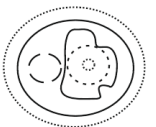


## Обговорення

Розроблена нами класифікація типів клітин при вивченні *Chlamydomonas*-подібних водоростей в умовах агаризованого середовища дозволяє більш детально описати біологію окремих видів, а також визначити приналежність до певної молекулярної клади. Представленість різних морфотипів у різних кладах показано у Табл. 2.

Монадний тип характерний для видів з трьох клад (*Reinhardtinia*, *Moewusinia*, *Oogamochlamydia*). Вегетативні клітини видів цих трьох клад здатні з різною швидкістю переходити в рухомий

Табл. 1. Типи нерухомих клітин та їх статуси.

Table 1. The types of immotile cells and their statuses.

Тип / Статус	Монета	Реміондані				
		Кожія	Пальмеа	Гаеписга	Астерококус	Мукормецисга
1a		-				
		-				
1b		-				
2		-				
		-				
3		-				
4		-				
		-				

**Табл. 2.** Типи нерухомих клітин у *Chlamydomonas*-подібних водоростей із різних молекулярних клад.**Table 2.** The types of immotile cells of *Chlamydomonas*-like alga from difference molecular clades.

Тип/Клада	Moewusinia	Monadina	Polytominia	Chloromonadina	Reinhardtina	Oogamochlamydia
Монада	+	-	-	-	+	+
Кокоїд	+	+	-	+	-	-
Пальмела	+	-	+	-	+	-
Глеоциста	-	-	-	+	+	+
Астерококус	-	-	-	-	+	+
Мукоглеоциста	-	-	-	-	+	+

стан при переносі у водне середовище і зберігають джгутики у нерухомому стані або відрощують *de novo* (Павловська і Костіков 2010). Вегетативні клітини видів інших трьох клад (Monadina, Polytominia, Chloromonadina) не здатні відрощувати джгутики при переносі в рідке середовище.

Кокоїдний тип представлений у видів клад Moewusinia, Monadina та Chloromonadina. У клітин цих клад слаборозвинений або відсутній зовнішній шар клітинної оболонки і слиз відсутній. При цьому вегетативні клітини видів із клади Moewusinia здатні досить швидко відрощувати джгутики і переходити у монадності стан, тоді як вегетативні клітини видів клад Chloromonadina та Monadina у монадний стан не переходять.

Пальмелоїдний тип характерний для видів клад Moewusinia, Polytominia, Reinhardtina. Наявність неструктурованого слизу обумовлена колоніальним слизом після звільнення клітин зі спорангію. При розчиненні слизу клітини видів клад Moewusinia та Reinhardtina можуть переходити у монадний стан.

Глеоцистоїдний тип спостерігався у видів клад Chloromonadina, Reinhardtina, Oogamochlamydia. Цей тип характерний видам у яких масивний зовнішній слизовий шар клітинної оболонки. При розчиненні слизу клітини можуть переходити у монадний або кокоїдний стан.

Астерококус та мукоглеоциста типи характерні для видів клад Reinhardtina та Oogamochlamydia. Клітинна оболонка

видів цих клад має здатність до мультиплікації і при цьому формує тип астерококус. При розриванні зовнішніх мультиплікованих шарів вивільняється між триплетний слиз, що обумовлює тип мукоглеоциста. При розчиненні слизу клітини можуть переходити у монадний стан.

Таким чином, наша класифікація дає можливість більш детально описувати види *Chlamydomonas*-подібних водоростей в умовах агарових культур.

## Висновки

Відповідно до класифікації станів нерухомих клітин в умовах агарових культур виділено шість морфотипів клітин. В межах кожного морфотипу виділено статуси в залежності від ступеню редукції атрибутів монадної організації клітин. Морфотипи монада, кокоїд, пальмелоїд та глеоциста приблизно в однаковій мірі представлені в усіх кладах. А морфотипи астерококус і мукоглеоциста характерні лише для видів клад Reinhardtina та Oogamochlamydia. Жоден з морфотипів не простежується у всіх кладах *Chlamydomonas*-подібних водоростей одразу.

Найбільша кількість морфотипів (п'ять із шести) представлена у кладі Reinhardtina, що підтверджує значну різноманітність цієї клади. У кладах Polytominia та Monadina представлено лише по одному морфотипу. У кладі Oogamochlamydia представлено чотири морфотипи, Moewusinia – три, Chloromonadina – два морфотипи.



## Використані джерела

- КОРШИКОВ О.А. 1938.** Volvocinae. Визначник прісноводних водоростей УРСР. Т. 4. Вид-во АН УРСР, Київ.
- КОСТИКОВ І.Ю., ДЕМЧЕНКО Э.Н., НОВОХАЦКАЯ М.А. 2009.** Коллекция культур водорослей Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. Каталог штаммов (2008 г.). *Черноморский ботан. журн.* 5 (1): 37–79.
- ПАВЛОВСЬКА М.М., КОСТИКОВ І.Ю. 2010.** Швидкість переходу в монадний стан, як допоміжний критерій при ідентифікації видів роду *Chlamydomonas* (Chlorophyta). *Черноморський ботан. журн.* 6 (4): 508–512.
- САТТ J., HILLS G., ROBERTS K.A. 1976.** Structural glycoprotein, containing hydroxyproline, isolated from the cell wall of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 131 (2): 165–171.
- ДЕМЧЕНКО Е., МІКНАЙЛЮК Т., COLEMAN A.W., PRÖSCHOLD T. 2012.** Generic and species concepts in *Microglena* (previously the *Chlamydomonas monadina* group) revised using an integrative approach. *Eur. J. Phycol.* 47 (3): 264–290.
- ЕЙТЛ Н. 1983.** Chlorophyta. 1. Phytomonadina. In: EITL H., GERLOFF J., HEYENIG H., MOLLENHAUER D. (eds). Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 9: 1-807. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart – New York.
- LIST OF MEDIA AND RECIPES 2013.** Experimental Phycology and culture collection of algae at the University of Goettingen (EPSAG). Goettingen. <http://www.uni-goettingen.de/en/186449.html>
- NAKADA T., MISAWA K., NOZAKI H. 2008.** Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses. *Mol. Phylogenet. Evol.* 48: 281–291.
- PRÖSCHOLD T., MARIN B., SCHLÖSSER U.G., MELKONIAN M. 2001.** Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas Ehrenberg* and *Chloromonas Gobi*, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist.* 152: 265–300.
- ROBERTS K. 1974.** Crystalline glycoprotein cell walls of algae: their structure, composition and assembly. *Phil. Trans. R. Soc. B* 268 (891): 129–146.
- WOESSNER J., GOODENOUGH U. 1994.** Volvocine cell walls and their constituent glycoproteins: An evolutionary perspective. *Protoplasma* 181 (1-4): 245–258.

## CELL TYPES AND THEIR STATUS IN CHLAMYDOMONAS-LIKE ALGAE (CHLOROPHYCEAE) ON AGAR MEDIUM CULTURE

M.M. PAVLOVSKA \* &amp; I.YU. KOSTIKOV

**Abstract.** The classification of cell types under agar culture was proposed. Six cell morphotypes were allocated. The statuses were identified depending on the reduction of monade attributes of cells. The variants of transition from one cell morphotype to another under dissolving mucilage were shown.

The monade, cocciod, palmeloid and gloeocysta morphotypes approximately equally represented in all clades. The asterococcus and mucogloeocysta morphotypes presented only in Reinhardtinia and Oogamochlamydia clades. Any morphotype isn't typical for all clades of *Chlamydomonas*-like algae at once.

The most of morphotypes numbers (5 from 6) are presented in Reinhardtinia clade. This demonstrates the diversity of the Reinhardtinia clade species. There are only one morphotype presented in Polytomina and Monadina clades. There are four morphotypes presented in Oogamochlamydia clade, three – in Moewusinia, two morphotypes – in Chloromonadina.

**Key words:** *Chlamydomonas*, morphology feature, agar medium, palmeloid stage

National Taras Shevchenko University of Kyiv ESC "Institute of Biology", 2 Acad. Glushkov Avenue, Kyiv 03022;  
\* annopol@rambler.ru