

## Швидкість переходу в монадний стан, як допоміжний критерій при ідентифікації видів роду *Chlamydomonas* (Chlorophyta)

МАРІЯ МИКОЛАЇВНА ПАВЛОВСЬКА  
ІГОР ЮРІЄВИЧ КОСТИКОВ

ПАВЛОВСЬКА М.М., КОСТИКОВ І.Ю., 2010: **Швидкість переходу в монадний стан як допоміжний критерій при ідентифікації видів роду *Chlamydomonas* (Chlorophyta).** *Чорноморськ. бот. ж.*, Т.6, № 4: 508-512.

Наводиться оригінальна методика визначення швидкості переходу у монадний стан вегетативних клітин роду *Chlamydomonas*. На прикладі автентичних штамів 12 видів даного роду, які належать до 4-х молекулярно-філогенетичних клад показано, що швидкість та спосіб переходу нерухомих клітин у монадний стан при перенесенні культур з твердого середовища у рідке узгоджується з належністю досліджених видів до певних молекулярних клад. Швидкість переходу у монадний стан нерухомих вегетативних клітин залежить: а) від наявності у нерухомих клітин джгутиків; б) від здатності відрощувати джгутики *de novo*; в) від наявності, розчинності та товщини слизових обгортки у вегетативних клітин в нерухомому стані.

*Ключові слова:* *Chlorophyta, Chlamydomonas, Reinhardtina, Moewusinia, Oogamochlamydia, Chloromonadinia, систематика, морфологія, монадний стан*

PAVLOVSKA M.N., KOSTIKOV I.YU., 2010: **Duration of transition into the monad stage as a useful criterium for identification of species within *Chlamydomonas* (Chlorophyta).** *Chornomors'k. bot. z.*, Vol. 6, № 4: 508-512.

Methods for evaluation of the duration of the transition from vegetative cells to the monade state are described. Duration of the transition state, initiated by the transfer of cultures from solid to liquid media, corresponds with molecular clades. This was observed on the sample of 12 species presented by 12 authentic strains which belong to 4 different larger clades. Duration of the transition depends on: (1) presence of the flagella in immobile cells, (2) capability to form flagella *de novo*, (3) presence, solubility and width of mucilage sheaths on surface of vegetative cells in their immobile state.

*Keywords:* *Reinhardtina, Moewusinia, Oogamochlamydia, Chloromonadinia, taxonomy, morphology, motile stage*

ПАВЛОВСКАЯ М.Н., КОСТИКОВ И.Ю., 2010: **Скорость перехода в монадное состояние как дополнительный критерий при идентификации видов рода *Chlamydomonas* (Chlorophyta).** *Черноморск. бот. ж.*, Т. 6, № 4: 508-512.

Приводится оригинальная методика определения скорости перехода в монадное состояние вегетативных клеток рода *Chlamydomonas*. На примере автентичных штаммов 12-и видов данного рода, которые относятся к 4-м молекулярно-филогенетическимкладам показано, что скорость и способ перехода неподвижных клеток в монадное состояние при переносе культур из твердой среды в жидкую согласовывается из принадлежностью исследованных видов к определенным молекулярнымкладам. Скорость перехода в монадное состояние неподвижных вегетативных клеток зависит: а) от наличия у неподвижных клеток жгутиков; б) от способности отращивать жгутики *de novo*; в) от наличия, растворимости и толщины слизистых оболочек у вегетативных клеток в неподвижном состоянии.

*Ключевые слова:* *Chlorophyta, Chlamydomonas, Reinhardtina, Moewusinia, Oogamochlamydia, Chloromonadinia, систематика, морфология, монадное состояние*

Рід *Chlamydomonas* Ehrenberg об'єднує близько 500 видів монадних джгутикових водоростей, клітини яких вкриті оболонкою, мають парієнтальний хлоропласт з піреноїдом та одне ядро [КОРШИКОВ, 1938; Ettl, 1983]. За сучасними молекулярно-генетичними реконструкціями рід вважається поліфілітичним і включає вісім неспоріднених між собою молекулярних клад [PRÖSCHOLD et al., 2001, NAKADA, 2008]. Проте, наразі, фенотипні відміни міжкладами залишаються не з'ясованими, що практично унеможливлює ідентифікацію представників даного роду за фенотипними ознаками не лише на рівні видів, але й на рівні цих клад.

З іншого боку, відомо, що в культурах на твердих поживних середовищах всі види роду *Chlamydomonas* перебувають в нерухомому стані [КОРШИКОВ, 1938]. Проте, при переносі у рідке середовище хламідомонади здатні зберігати або відрощувати джгутики і повертатися у монадний стан. Досліджуючи морфологію аутентичних штамів 12 видів роду *Chlamydomonas* з колекції культур АСКУ кафедри ботаніки Київського національного університету імені Тараса Шевченка ми звернули увагу на те, що види, віднесені до різних молекулярних клад, переходять з нерухомого у монадний стан з різною швидкістю. Це дозволило припустити, що показник швидкості переходу у монадний стан може бути використаний, як один із таксономічних критеріїв при пошуку консенсусу між класичними фенотипними та сучасними молекулярними системами роду *Chlamydomonas* і визначило мету роботи – на прикладі аутентичних штамів видів роду *Chlamydomonas* оцінити можливість застосування показника швидкості переходу у монадний стан, як допоміжного критерію в таксономії роду *Chlamydomonas*.

#### Матеріали та методи дослідження

Матеріалом слугували 12 аутентичних штамів водоростей роду *Chlamydomonas* s.l., які відносяться до 4 молекулярних клад (Табл. 1). Дані про походження штамів представлені в каталозі колекції Київського національного університету АСКУ [КОСТИКОВ, ДЕМЧЕНКО, НОВОХАЦКАЯ, 2009]. Всі штами вирощували на твердому агаризованому поживному середовищі за загальноприйнятих умов підтримання цих культур у колекції.

Таблиця 1

Список досліджених видів та штамів роду *Chlamydomonas* s.l.

Table 1

List of investigated species and strains of the genus *Chlamydomonas* s.l.

№	Вид	№ штаму в АСКУ	Молекулярна клада (за Nakada & al., 2008)
1	<i>Chlamydomonas globosa</i> Snow	853-09	Reinhardtinia
2	<i>Ch. debariana</i> Goroschankin	854-09	
3	<i>Ch. zebra</i> Korshikov ex Pascher	742-06	
4	<i>Ch. gigantea</i> Dill	988-11	Oogamochlamydia
5	<i>Ch. segnis</i> Ettl	734-06	
6	<i>Ch. culleus</i> Ettl	983-11	
7	<i>Ch. pitschmanii</i> Ettl	727-06	Moewusinia
8	<i>Ch. noctigama</i> Korshikov	761-06	
9	<i>Ch. moewusii</i> Gerloff	781-06	
10	<i>Ch. augustae</i> Skuja	992-11	Chloromonadinia
11	<i>Ch. macrostellata</i> Ettl et Schwarz	980-11	
12	<i>Chloromonas reticulata</i> Ettl et Schwarz	981-11	

Швидкість переходу у монадний стан оцінювали за показником  $M_{50}$  – часом, за який у монадний стан переходить 50% нерухомих клітин.  $M_{50}$  визначали наступним чином: на сухе предметне скло наносили матеріал з агарової культури. Далі у полі зору на збільшенні  $100^{\times}$  рахували загальну кількість клітин і після цього у препарат додавали воду. З моменту додавання води через 1, 2 та 5 хвилин проводили підрахунок кількості клітин, які перейшли у монадний стан. Кожен підрахунок фіксували

фотографією. Всі спостереження проводили на оптичному мікроскопі VMXS серії з цифровою фотокамерою, з'єднаною з ПК. Дослідження проводили не менше, ніж у 20 повторностях. За результатами спостережень на основі звичайних методів статистичного аналізу визначали коефіцієнт кореляції між кількістю клітин, що перейшли у монадний стан та часом перебування матеріалу у водному препараті [Зайцев, 1984]. При значенні коефіцієнту кореляції більшому від +0,44, який для  $n=20$  відповідає 95% рівню значущості, для кожного штаму на основі регресійного аналізу розраховували рівняння лінійної регресії виду:

$$y = kx + b, \text{ де } y - \text{відсоток клітин, що перейшли у монадний стан; } x - \text{час у хвиликах.}$$

На основі цього рівняння розраховували  $M_{50}$  (хв) для значення  $y = 50\%$ .

### Результати досліджень

В результаті досліджень нами отримано значення показника  $M_{50}$  для 12 видів роду *Chlamydomonas* із 4 молекулярних клад. Результати розрахунку показника  $M_{50}$  представлені у таблиці 2.

Найшвидше у монадний стан переходять види із клади *Moewusinia*, для яких  $M_{50}$  становить лише 0,45 – 0,6 хв. Трохи повільніше у монадний стан переходять види із клади *Reinhardtinia*, для них  $M_{50}$  становить від 0,5 до 1,2 хвилин. Для видів з клади *Oogamochlamydia* показники  $M_{50}$  коливається у широкому діапазоні (від 1,2 хв. у *Ch. segnis* до 16,1 хв. у *Ch. gigantea*); для одного з видів цієї клади (*Ch. culleus*)  $M_{50}$  визначити не вдалося, оскільки вегетативні клітини у монадний стан шляхом відрощування джгутиків не переходили. Також  $M_{50}$  не встановлений для видів із клади *Chloromonadina* – всі види цієї клади переходили у монадний стан не шляхом відрощування джгутиків, а в результаті спорогенезу – шляхом утворення зооспор.

Таблиця 2

Рівняння регресії швидкості переходу у монадний стан та показник  $M_{50}$  для досліджених видів роду *Chlamydomonas*

Table 2

Regression equation of the duration of the transition into monad stage and indices  $M_{50}$  for species of the genus *Chlamydomonas*

№	Клада	Вид	Рівняння регресії*	Розрахунковий показник $M_{50}$
1	Reinhardtinia	<i>Chlamydomonas globosa</i>	$y = 4,6526 * x + 47,7154$	0,50 хв
2		<i>Ch. debariana</i>	$y = 8,4767 * x + 39,4873$	1,24 хв
3		<i>Ch. zebra</i>	$y = 8,2297 * x + 42,2962$	0,94 хв
4	Oogamo-chlamydia	<i>Ch. gigantea</i>	$y = 3,197 * x - 1,3636$	16,1 хв
5		<i>Ch. segnis</i>	$y = 8,2441 * x + 40,0152$	1,21 хв
6		<i>Ch. culleus</i>	–	Не переходить
7	Moewusinia	<i>Ch. pitschmanii</i>	$y = 8,209 * x + 46,1849$	0,46 хв
8		<i>Ch. noctigama</i>	$y = 6,4765 * x + 46,2255$	0,58 хв
9		<i>Ch. moewusii</i>	$y = 7,4496 * x + 46,4764$	0,47 хв
10	Chloromonadina	<i>Ch. augustae</i>	–	Не переходить
11		<i>Ch. macrostellata</i>	–	Не переходить
12		<i>Chloromonas reticulata</i>	–	Не переходить

\*  $y$  – відсоток клітин, що перейшли у монадний стан;  $x$  – час у хвиликах.

### Обговорення результатів дослідження

Швидкість переходу у монадний стан, за нашими спостереженнями, залежить, по-перше, від типу клітин, за допомогою яких здійснюється перехід з нерухомого стану у рухомий; по-друге, від наявності або відсутності у нерухомому стані джгутиків; по-третє, від здатності вегетативних клітин відрощувати джгутики при переносі їх з твердого середовища у рідке. Крім того, швидкість переходу у монадний стан залежить від наявності зовнішніх слизових структур та особливостей їх поведінки при переносі клітин у рідке середовище.

**Тип клітин, за допомогою яких здійснюється перехід у монадний стан.** Перехід з нерухомого стану у рухомий може здійснюватись або за допомогою вегетативних клітин, які при потраплянні у рідке середовище відрощують джгутики, або через стадію зооспор. В останньому випадку вегетативні клітини при переносі на рідке середовище джгутиків не відрощують, а протягом кількох годин трансформуються у зооспорангії. Далі зооспори після виходу зі спорангіїв трансформуються у монадні вегетативні клітини, забезпечуючи, таким чином, існування саме монадної біоморфи у водному середовищі. Для такого способу переходу у монадний стан значення  $M_{50}$  за нашою методикою розрахувати неможливо, оскільки відновлення монадної біоморфи через зооспорогенез є неперервним, а дискретним процесом, що визначається в першу чергу, цикладними ритмами конкретних видів.

Перехід у монадний стан шляхом відрощування джгутиків у вегетативних клітин спостерігається у всіх досліджених штамів з клад Reinhardtina та Moewusinia, а також у 2-х штамів із класу Oogamochlamydia (АСКУ 998-11 *Ch.gigantea* та АСКУ 734-06 *Ch.segnis*). Для всіх цих штамів  $M_{50}$  становить від 0,5 до 16 хв. Всі штами з класу Chloromonadina та один штам із класу Oogamochlamydia (АСКУ 983-11 *Ch. culleus*) переходять у монадний стан виключно через стадію зооспор.

**Джгутики у нерухомих клітин на твердому поживному середовищі** наявні у всіх штамів, які належать до класу Reinhardtina. У досліджених штамів всіх інших клад джгутики на твердому поживному середовищі не спостерігалися.

На твердому середовищі у водоростей з класу Reinhardtina клітини із джгутиками оточені слизовою капсулою. У цих клітин при переносі у рідке середовище внутрішній шар слизової капсули набрякає, внаслідок чого зовнішній шар капсули розривається. При цьому клітина, яка зберігала джгутики, потрапляє у водне середовище і переходить до активного руху. Таким чином,  $M_{50}$  в цьому випадку визначається, в першу чергу, часом набрякання і розриву слизової капсули, що у досліджених штамів класу Reinhardtina обумовлює досить швидкий перехід у монадний стан ( $M_{50}$  складає 0,5 - 1,2 хв.).

**Здатність відрощувати джгутики** при переносі клітин з твердого поживного середовища у рідке зафіксована нами у всіх досліджених штамів класу Moewusinia та у двох штамів (АСКУ 734-06 *Ch.segnis* та АСКУ 988-11 *Ch.gigantea*) з класу Oogamochlamydia.

Клітини досліджених штамів з класу Moewusinia на твердих поживних середовищах позбавлені джгутиків та слизу, а при переносі у рідке середовище дуже швидко ( $M_{50}=0,5$  хв.) відрощують джгутики і переходять до активного руху.

У *Ch. segnis* та *Ch. gigantea* з класу Oogamochlamydia клітини на твердому середовищі також позбавлені джгутиків, але вкриті шаром аморфного слизу, завдяки якому розростання на агарі мають вигляд слизових колоній. При переносі у рідке середовище колоніальний слиз починає розчинятися. Далі клітини, навколо яких слиз повністю розчинився, відрощують джгутики (при цьому швидкість відрощування джгутиків приблизно така сама, як у видів з класу Moewusinia – в середньому біля 30 сек.) і переходять у монадний стан. Хоча спосіб переходу у монадний стан у обох видів даної класу однаковий, проте  $M_{50}$  суттєво відрізняється (для *Ch.segnis*  $M_{50}$  становить 1,2 хв, для *Ch.gigantea* – 16,1 хв).

Фактором, який, на нашу думку, визначає відміни  $M_{50}$  у цих двох видів, є різна кількість та різна розчинність колоніального слизу у цих видів. Так, у *Ch. segnis* товщина слизу між сусідніми клітинами становить 2-5 мкм, при цьому цей слиз розчиняється швидко (протягом 1-3 хв.). У *Ch. gigantea* товщина слизу між сусідніми клітинами становить понад 10 мкм, і цей слиз розчиняється довго – від кількох до кількох десятків хвилин.

Таким чином,  $M_{50}$  у видів, що відрощують джгутики, залежить, в першу чергу, від швидкості звільнення клітини від зовнішніх слизових структур. Це пояснює той факт, чому найменше значення  $M_{50}$  (0,5 хв.) притаманне видам, які у нерухомому стані не утворюють слизу (клада *Moewusinia*), а також відміни  $M_{50}$  (1,2 хв. та 16,1 хв.) у *Ch.segnis* та *Ch.gigantea* з класу *Oogamochlamydia*, які у нерухомому стані продукують різну кількість колоніального слизу різної розчинності.

### Висновки

Види роду *Chlamydomonas*, які належать до різних молекулярних класів, при перенесенні клітин з твердого поживного середовища у рідке переходять у монадний стан або неперервно – через трансформацію нерухомих вегетативних клітин у рухомі, або дискретно – через стадію зооспор, при утворенні яких вегетативні клітини трансформуються у зооспори. Швидкість переходу у монадний стан вегетативних клітин для представників різних молекулярних класів різна, і залежить: а) від наявності у нерухомих клітин джгутиків; б) від здатності відрощувати джгутики *de novo*; в) від наявності, розчинності та товщини слизових обгортки у вегетативних клітин в нерухомому стані.

Найшвидше у монадний стан переходять види класу *Moewusinia* ( $M_{50} = 0,45 - 0,6$  хв.), які відрощують джгутики та позбавлені слизу. Повільніше у монадний стан переходять види із класу *Reinhardtina* ( $M_{50} = 0,5 - 1,2$  хв.), які у нерухомому стані зберігають джгутики у слизових капсулах. Довше за всіх у монадний стан переходять види класу *Oogamochlamydia* ( $M_{50} = 1,2 - 16,1$  хв.), які відрощують джгутики, проте мають масивний колоніальний слиз. Деякі види класу *Oogamochlamydia* та всі досліджені види класу *Chloromonadinia* переходять у монадний стан виключно через стадію зооспор; для таких видів  $M_{50}$  визначити не вдається.

Таким чином, у видів роду *Chlamydomonas* як швидкість, так і спосіб переходу нерухомих клітин у монадний стан узгоджується з належністю досліджених видів до певних молекулярних класів, що в перспективі може дозволити суттєво покращити рівень філогенетичних узагальнень у систематиці даного роду.

### Список літератури

- Коршиков О. А. Volvocinae. Визначник прісноводних водоростей УРСР. Т.4. – К.: Вид-во АН УРСР, 1938. – 184 с.
- Костиков І.Ю., Демченко Э.Н., Новохацька М.А. Коллекция культур водорослей Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. Каталог штаммов (2008 г.) // Черноморск. ботан. журн. – 2009. – Т. 5, №1. – С. 37-79.
- Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. – Москва: Наука, 1984. – 424 с.
- ETTL H. Chlorophyta. I. Phytomonada. / Süßwasserflora von Mitteleuropa, 1983. – Bd.9. Jena: G.Fischer. – 807 p.
- NAKADA, T., MISAWA, K., NOZAKI, H. Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses // Mol. Phylogenet. Evol. – 2008. / doi:10.1016/j.ympev.2008.03.016/.
- PRÖSCHOL, T., MARI, B., SCHLÖSSER U. G., MELKONIAN M. 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. – 2001. – Vol. 152. – P. 265-300.

Рекомендує до друку  
О.Є. Ходосовцев

Отримано 28.12.2010 р.

#### Адреса авторів:

М.М. Павловська, І.Ю. Костиков  
Київський національний університет ім. Тараса  
Шевченка  
вул. Володимирська, 64  
м. Київ, 01017  
Україна  
e-mail: annopol@rambler.ru  
kost@univ.kiev.ua

#### Author's address:

М.М. Pavlovska, I.Yu. Kostikov  
National Taras Shevchenko University of Kyiv  
64, Volodimirska Str.  
Kyiv, 01017  
Ukraine  
e-mail: annopol@rambler.ru  
kost@univ.kiev.ua