

УДК 582.251.62

В. М. Карбовська, І. Ю. Костіков

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

CHLORELLA SPHAERICA ТА ЇЇ МІСЦЕ У СИСТЕМІ РОДУ DIPLOSPHAERA (CHLOROPHYTA, TREBOUXIOPHYCEAE)

За результатами морфологічного та молекулярно-генетичного аналізів автентичного штаму критичної у таксономічному відношенні зеленої водорості *Chlorella sphaerica* Tschermak-Woess встановлено її фенотипічну схожість та філогенетичну спорідненість із видами роду *Diplosphaera* Bialosuknia та суттєву відмінність від інших видів роду *Chlorella* Beijerinck. Виявлено нові морфологічні риси (наявність вегетативного поділу, здатність утворювати діади та пакети, формувати зовнішні слизові структури), які дозволяють розглядати *Ch. sphaerica* у системі роду *Diplosphaera*. Результати аналізу некодувальних нуклеотидних послідовностей ITS-1 та ITS-2 кластеру ядерних рибосомальних генів підтверджують цей висновок. На підставі отриманих даних запропоновано нову номенклатурну комбінацію: *Diplosphaera sphaerica* (Tschermak-Woess) Karbovska et Kostikov, comb. nova (basionym: *Chlorella sphaerica* Tschermak-Woess).

В. Н. Карбовская, И. Ю. Костиков

Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко

CHLORELLA SPHAERICA И ЕЕ МЕСТО В СИСТЕМЕ РОДА DIPLOSPHAERA (CHLOROPHYTA, TREBOUXIOPHYCEAE)

В результате морфологического и молекулярно-генетического анализов автентичного штамма критической в таксономическом отношении зеленой водоросли *Chlorella sphaerica* Tschermak-Woess установлено ее фенотипическое сходство и филогенетическое родство с видами рода *Diplosphaera* Bialosuknia и существенное отличие от других видов рода *Chlorella* Beijerinck. Обнаружены новые морфологические особенности (наличие вегетативного деления, способность к образованию диад и пакетов, а также внешних слизистых структур), которые указывают на положение *Ch. sphaerica* в системе рода *Diplosphaera*. Результаты анализа некодирующих нуклеотидных последовательностей ITS-1 и ITS-2 кластера ядерных рибосомальных генов подтверждают этот вывод. На основании полученных данных предложена новая номенклатурная комбинация: *Diplosphaera sphaerica* (Tschermak-Woess) Karbovska et Kostikov, comb. nova (basionym: *Chlorella sphaerica* Tschermak-Woess).

V. M. Karbovska, I. Y. Kostikov

Taras Shevchenko Kyiv National University

CHLORELLA SPHAERICA AND ITS POSITION IN THE GENUS DIPLOSPHAERA (CHLOROPHYTA, TREBOUXIOPHYCEAE)

Morphological and molecular genetic analyses of green alga *Chlorella sphaerica* Tschermak-Woess (authentic strain), which represents the taxonomically critical species, the phenotypic similarity and phylogenetic close relation with the genus *Diplosphaera* Bialosuknia were found but the significant difference from the genus *Chlorella* Beijerinck was demonstrated. Discovery of new morphological features (presence of vegetative division, the ability to dyads and packages forming, as well as external mucous structures) indi-

cates the position of *Ch. sphaerica* within the genus *Diplosphaera*. The analysis of nucleotide sequences of non-coding regions (ITS-1 and ITS-2) of nuclear-encoding ribosomal gene cluster confirms this conclusion. Based on these data the new nomenclature combination is suggested: *Diplosphaera sphaerica* (Tschermak-Woess) Karbovska et Kostikov, comb. nova (basionym: *Chlorella sphaerica* Tschermak-Woess).

Вступ

Chlorella sphaerica Tschermak-Woess описана на основі культури, виділеної з лишайника *Pseudocyphellaria carpoloma* (Delise) Vain., який розвивався на *Rhopalostylis sapida* Wendl et Drude, у Вав'єрському заповіднику у Новій Зеландії [15]. За оригінальним авторським діагнозом, для цього виду характерні поодинокі позбавлені слизових обгорткок сферичні або еліпсоїдні клітини, вкриті тонкою міцною клітинною оболонкою, що містять один чашоподібний або стрічкоподібний хлоропласт із піреноїдом, облямованим крохмальною обгорткою, що складається із двох або більше шкаралупок. Розмноження відбувається за допомогою автоспор, що утворюються по 4, 8 або 16 шляхом сукцесивного поділу протопласта і звільняються внаслідок лізису або розриву оболонки спорангію. Розмір клітин складає 3,0–9,5 мкм [15]. Штам, на основі якого виконано опис, депонований у колекції культур Геттінгенського університету (SAG 11.88), а його субкультури – у колекціях культур університету штату Техас в Остіні (UTEX 2485) та альгологічній колекції Київського національного університету ім. Тараса Шевченка (АСКУ 533-06).

У 2002 р. при молекулярно-таксономічній обробці роду *Planophila* Gerneck автентичний штам *Ch. sphaerica* (SAG 11.88) типований за послідовністю ядерного гена 18S rRNA, а сіквенс депонований в NCBI [9]. При обговоренні результатів молекулярно-філогенетичного аналізу автори статті побіжно відзначили, що за послідовністю гена 18S rRNA *Ch. sphaerica* потрапляє в кладу, що включає *Stichococcus bacillaris* Näg. та види роду *Prasiola* Ag. При цьому відзначено, що інші секвеновані види роду *Chlorella* Beijerinck розташовуються в інших молекулярних кладах. Як наслідок, належність автентичного штаму *Ch. sphaerica* до роду *Chlorella* непрямим чином поставлена під сумнів.

Пізніше, під час з'ясування місця у системі зелених водоростей двох нових видів требуксіофіцієвих водоростей послідовність *Ch. sphaerica*, депонована в NCBI, залучена до аналізу філогенетичних відносин штамів, які представляли окрему молекулярну кладу, що отримала назву «*Stichococcus/Prasiola-clade*» [7]. У результаті проведеного аналізу встановлено, що в межах «*Stichococcus/Prasiola-clade*» *Ch. sphaerica* потрапляє у субкладу, до якої входить чотири штамми роду *Stichococcus*, з яких один ідентифікований як *S. chlorelloides* Grintz. et Peterfi, а решта – лише до роду (як *Stichococcus* sp.) та один штам роду *Diplosphaera* Bialosuknia – *D. chodatii* Bialosuknia. Жодний із видів роду *Chlorella* (крім *Ch. sphaerica*) до цієї субклади, а також до «*Stichococcus/Prasiola-clade*», не потрапив. Автори публікації уникли обговорення питання, чому одноклітинна кокоїдна автоспоротвірна водорість *Ch. sphaerica* виявилась близько спорідненою з багатоклітинними нитчастими представниками, зокрема, *Stichococcus* та *Diplosphaera*. Серед родів «*Stichococcus/Prasiola-clade*» деяку схожість із *Ch. sphaerica* демонструвала лише *D. chodatii*, оскільки, подібно до представників роду *Chlorella*, види роду *Diplosphaera* здатні розмножуватися нерухомими спорами.

Тому мета роботи – спроба пошуку відповіді на питання, чи справді результати молекулярно-таксономічних реконструкцій, за якими *Ch. sphaerica* є близькою до деяких видів роду *Diplosphaera*, суперечать даним про суттєву фенотипічну відмінність між цими таксонами. Для досягнення мети проведено повторне морфологічне дослідження субкультури автентичного штаму *Ch. sphaerica* та здійснено молекулярно-генетичний аналіз ділянки кластеру ядерних рибосомальних генів ITS1-5,8S-ITS2 для

штамів АСКУ 533-06 *Ch. sphaerica*, АСКУ 879-09 *Diplosphaera mucosa* Broady та АСКУ 880-09 *Diplosphaera sp.*

Матеріал і методи досліджень

Матеріал представляв штаб АСКУ 533-06 із колекції культур Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, який є субкультурою автентичного штаму *Ch. sphaerica* (SAG 11.88). Для порівняння використано аутентичний штаб АСКУ 879-09 *Diplosphaera mucosa* (SAG 48.86) та анотований в NCBI за ядерною послідовністю 28S rDNA штаб SAG 49.86, ідентифікований як *Diplosphaera sp.*, субкультура якого депонована в АСКУ за номером 880-09. Останній штаб морфологічно відповідав ознакам *Diplosphaera chodatii*, яка є номенклатурним типом роду *Diplosphaera*.

Водорості вирощували у чашках Петрі на 1,5 % агаризованому середовищі Болда з потроєною кількістю азоту 3N BBM [5] на люміностації при періодичному освітленні з інтенсивністю 1 800–3 000 лк та 12/12-годинному чергуванні світлової та темної фаз за температури 20 ± 3 °C. Спостереження проводили методом оптичної мікроскопії на мікроскопі PrimoStar (Carl Zeiss, Jena) з обов'язковим використанням імерсійних об'єктивів. Культури вивчали як у фазі логарифмічного росту (вік культури 2–4 тижні), так і в стаціонарній фазі (вік – 3–4 місяці). Результати документували мікрофотографіями, виконаними за допомогою цифрової камери ScoreTek DCM 510, встановленої на мікроскопі та з'єднаної з ПК. Під час спостережень проводили цитохімічні забарвлення матеріалу на наявність слизових структур (1 % розчином туші) та додаткове контрастування клітинних покривів (0,1 % розчином метиленового синього з подальшою відмиванням матеріалу дистильованою водою).

Для ампліфікації гена 18S rDNA та внутрішніх спейсерів, що транскрибуються (ITS 1 та ITS 2), суспензійну культуру водоростей осаджували центрифугуванням при 5 000 g протягом 10 хв. Тотальну ДНК виділяли за допомогою набору реактивів «DNeasy Plant Mini Kit» (Qiagen, Німеччина), відповідно до протоколу виробника. ПЛР проводили за допомогою суміші High Fidelity PCR Master Mix Plus (USB, США). Встановлювали наступний температурний профіль реакції: 94 °C – 5 хв., (94 °C – 30 с, 55 °C – 30 с, 68 °C – 2 хв.) – 30 циклів, 68 °C – 10 хв. Для ампліфікації ділянки 18S rDNA-ITS1-5,8S-ITS2-28S rDNA використовували специфічний для Chlorophyta прямий праймер A11500bf (5'-gatcattcaacgagccta-3') [10] та зворотний еукаріот-специфічний праймер ITS4 (5'-tctcctcgctattgatgc-3') [3]. Візуалізацію продуктів ампліфікації проводили в 1 % агарозному гелі в TAE буфері. Очищення ДНК із гелю здійснювали за допомогою набору Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, США) згідно з протоколом виробника.

Для підвищення якості сіквенсів ампліфіковані продукти були клоновані. Для клонування використовували плазмиду pST-Blue-1 і штаб *E. coli* NovaBlue (Novagen, США). Рекombінантну плазмідну ДНК очищали, використовуючи набір реактивів GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Литва). Автоматичне секвенування отриманих конструкцій проводили на генетичному аналізаторі ABI PRISM 3730 XL DNA Analyzer компанії Macrogen Inc (Південна Корея) з використанням набору BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

Первинний порівняльний аналіз отриманих послідовностей з послідовностями бази даних GenBank проводили за допомогою програми NCBI BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Редагування хроматограм проводили за допомогою редактора SeqAssem.

Подальший аналіз отриманої послідовності ITS1-5.8S rDNA-ITS2 *Ch. sphaerica* проводили шляхом її порівняння з вирівняними за допомогою ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) аналогічними послідовностями *Chlorella s. l.*, депонованими в NCBI, та з отриманими нами послідовностями двох штамів роду *Diplosphaera*. Послідовності ITS1-5.8S rDNA-ITS2, обрані для аналізу з NCBI, представляли як номенклатурний тип роду *Chlorella* Beijerinck *sensu stricto* (*Chlorella vulgaris*, код доступу FM205832), так і всі роди, виділені з *Chlorella sensu lato* на підставі молекулярно-філогенетичних даних – *Choroidium ellipsoideum* (FM946012), *Elliptochloris subsphaerica* (FJ648518), *Parachlorella kessleri* (FR865655).

Як критерій родової приналежності використовували оцінку можливості однозначного вирівнювання некодувальних регіонів відповідно до монофілітичної концепції виду у водоростей Дж. Джонсона та Д. Касаматти [11] з доповненнями Н. Рибалки зі співавторами [14]. Згідно з цією концепцією, можливість несуперечливого вирівнювання гомологічних варіабельних спейсерів у різних таксонів – ознака належності цих таксонів до одного роду, і навпаки.

Довжина матриці (data set) після вирівнювання без вилучення інделей становила 1 080 позицій, при цьому 683 вирівнювались і могли вважатися гомологічними. Для всієї матриці однозначне вирівнювання досягалось лише у кодувальних регіонах – термінальному фрагменті 18S rDNA та повній послідовності 5.8S rDNA. У некодувальних регіонах (послідовностях ITS1 та ITS2) сіквенс вирівнювались неоднозначно. Загалом у межах матриці наявні 397 варіабельних сайтів, зосереджені переважно саме в межах ITS1 та ITS2, що дозволяє провести оцінку родової причетності *Chlorella sphaerica*.

Результати та їх обговорення

Морфологічний аналіз. За результатами морфологічного аналізу у штаму *Ch. sphaerica* АСКУ 533-06 спостерігали всі ознаки, наведені в авторському діагнозі даного виду [15], за винятком незначного відхилення за розмірними характеристиками клітин. Діаметр сферичних клітин становив 2,8–7,9 мкм, довжина та ширина еліпсоїдних клітин – 3,1–7,9 x 2,2–6,5 мкм, відповідно.

Дослідження субкультури автентичного штаму *Ch. sphaerica* показали, з одного боку, відповідність морфології вегетативних клітин оригінальному діагнозу цього виду [15], з іншого боку – дозволили виявити раніше не відмічені особливості, за якими АСКУ 533-06 добре узгоджувався з діагнозом роду *Diplosphaera* (рис. 1).

Подібно до авторського діагнозу, вегетативні клітини АСКУ 533-06 мали сферичну або дещо видовжену (еліпсоїдну та еліпсоїдно-циліндричну) форму, один чашоподібний або стрічкоподібний хлоропласт із піреноїдом, облямованим крохмальною обгорткою, що складається з двох або більше платівок (рис. 1, *a*); водорість демонструвала здатність до розмноження за допомогою 2 або 4 (рис. 1, *b*), як виняток – 8 або 16 автоспор (рис. 1, *c*), що утворювались шляхом сукцесивного поділу протопласту і звільнялись внаслідок як лізису, так і розриву оболонки спорангію. Діаметр клітин, за нашими спостереженнями, становив 2,8–7,9 мкм. Він незначно відрізнявся від наведеного в авторському діагнозі (3,0–9,5 мкм). Ця відмінність може бути пов'язана зі зменшенням варіабельності розмірів клітин унаслідок багаторазових пересівів культури протягом 22 років. Риси, виявлені нами в автентичного штаму *Ch. sphaerica*, не були відмічені в першоописі даного виду, стосувались репродуктивних особливостей, пов'язаних із наявністю вегетативного поділу та здатністю клітин утворювати слизові структури.

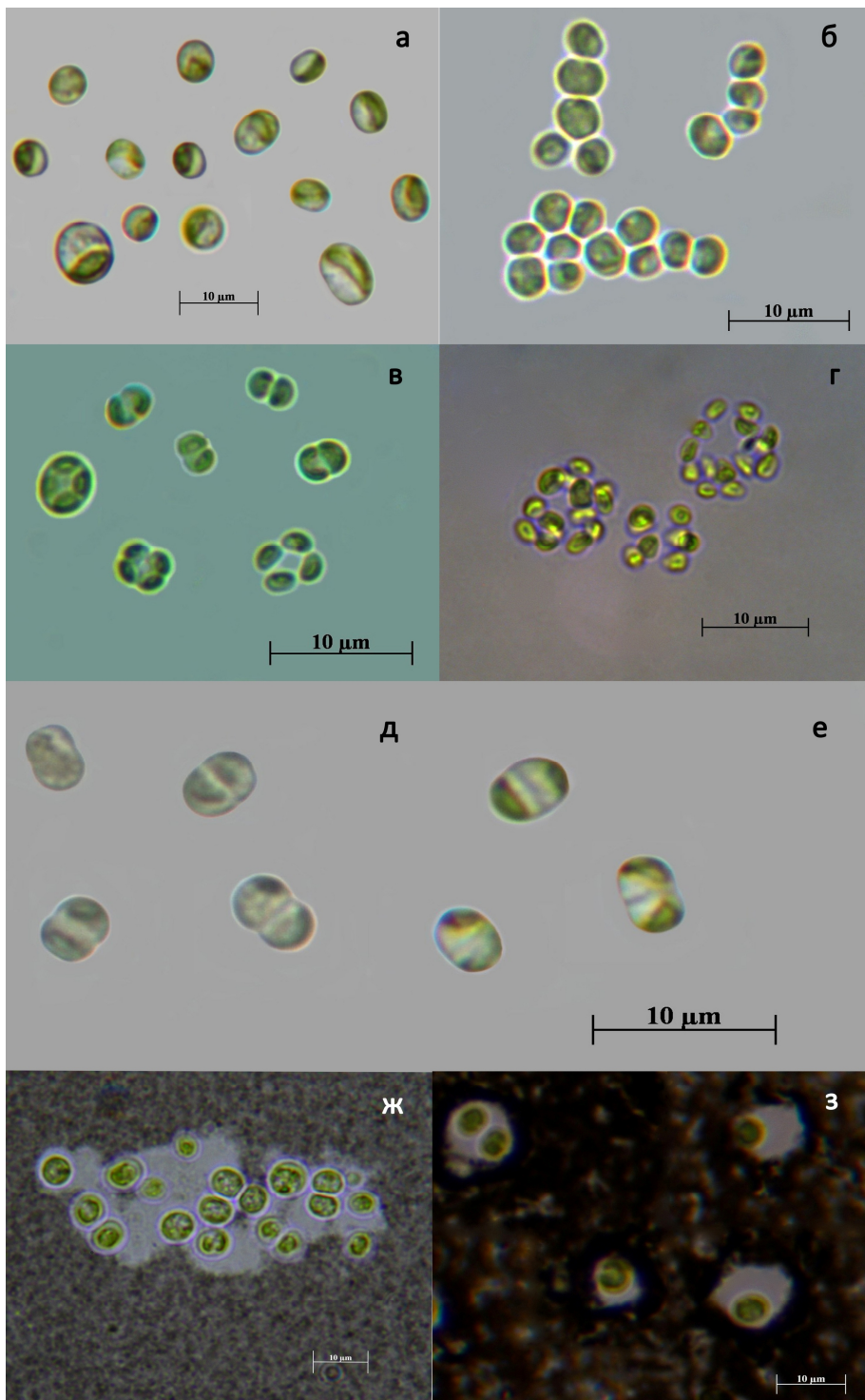


Рис. 1. Морфологічні особливості автентичного штаму *Chlorella sphaerica* АСКУ 533-06:
 а – сферичні та еліпсоїдно-циліндричні клітини, б – *Diplosphaera*-подібні групи клітин, в – спорангії з 2 та 4 автоспорами, з – спорангії з 8 та 16 автоспорами, д, е – вегетативний поділ, ж – колоніальний слиз, з – слизові капсули (д, ж, з – вік культури 2 тижні; а-в, е – 2 місяці; з – 7 місяців)

Найцікавіша особливість *Ch. sphaerica* – її здатність до розмноження шляхом вегетативного поділу клітин навпіл (рис. 1, *д, е*). Такий поділ в оригінальному діагнозі не описаний, хоча непрямі свідчення про його наявність присутні в роботі Е. Чермак-Весс на рис. 2*p*, підписаному як «група поодиноких диктіосом між двома парами диктіосом біля майбутньої септи» [15, fig. 2 *p*, с. 126]. Як видно з підпису, Чермак-Весс має на увазі не схізогонію (споруляцію), а один із варіантів клітинного поділу – цитотомію, яка здійснюється за типом клітинної платівки – септи, і яка за Н. П. Масюк [1] являє справжній вегетативний поділ. Сама ж картина, наведена на згаданому вище рисунку, відповідає картині цитокінезу *Stichococcus sp.* у пізній телофазі, наведеної на електроннограмах Дж. Пікет-Хіпса [13, fig. 8, 9], з тією лише різницею, що структури, ідентифіковані Е. Чермак-Весс на світлооптичному рівні як диктіосоми, на електроннограмах Дж. Пікет-Хіпса представлені як везикули з матеріалом майбутньої септи. Наявність вегетативного поділу у *Ch. sphaerica* не узгоджується з діагнозом ані роду *Chlorella*, ані родів, які виділені з *Chlorella s. l.*, зокрема *Parachlorella* Krieniz et al. та *Chloroidum* Nadson. Проте наявність вегетативного поділу – характерна ознака роду *Diplosphaera* [4].

Друга особливість, не відмічена у діагнозі Е. Чермак-Весс, полягає у здатності *Ch. sphaerica* утворювати слизові структури (рис. 1, *ж, з*). Утворення слизових структур, аналогічних до *Ch. sphaerica*, описана для *Diplosphaera mucosa* при масовій споруляції [6]. У той же час, П. Броді відзначив, що у культурах, які не перебувають у стані масового спорування, слиз не спостерігається. Така сама особливість (здатність культури продукувати слиз або бути повністю його позбавленим) відмічена нами і у *Ch. sphaerica*. Залежність утворення слизу від фази репродукційного циклу пояснює, чому Е. Чермак-Весс не спостерігала слизу у *Ch. sphaerica*, незважаючи на застосування нею цитохімічного забарвлення препаратів розчином туші.

У *D. mucosa* та *Ch. sphaerica* слиз може утримувати пари дочірніх клітин у дво- або чорирьохклітинних ниткоподібних з'єднаннях, які нагадують малоклітинні нитки *Stichococcus chodatii* (Bial.) Heer. та ниткоподібні утвори *Diplosphaera chodatii* (рис. 1, *б*). У *Ch. sphaerica* ниткоподібні ланцюжки клітин виявлені вперше, і не наведені в оригінальному описі Чермак-Весс. У *D. mucosa* та *Ch. sphaerica* нами також виявлено видовжені *Stichococcus*-подібні клітини, аналогічні до тих, що наведені на рисунку *D. chodatii* у В. Вішера [16].

Ch. sphaerica здатна розмножуватися за допомогою автоспор, що, на перший погляд, суттєво різнить її від *Diplosphaera chodatii*, яка є номенклатурним типом даного роду і, за Х. Етглом та Г. Гертнером [8], розмножується апланоспорами. Проте, на нашу думку, ця відмінність – лише термінологічна помилка, яка виникла внаслідок використання в описі та у підписах до рисунків *Diplosphaera chodatii* терміна «апланоспори» у роботі В. Вішера [16]. Під «апланоспорами», згідно з Е. Чермак-Весс [15], розуміють зооспори, які втратили джгутики не виходячи за межі материнської клітини. Проте ніяких свідчень про здатність будь-якого виду *Diplosphaera* утворювати зооспори немає. Більше того, в оригінальному описі *Diplosphaera mucosa* репродуктивні клітини, що утворюються у спорангіях, названі автоспорами [6]. Таким чином, наявність автоспор – спільна ознака для *D. chodatii*, *D. mucosa* та *Ch. sphaerica*.

В авторському діагнозі *Ch. sphaerica* відсутні будь-які відомості про здатність цього виду утворювати діади та пакети. Натомість така здатність вважається однією з найяскравіших ознак роду *Diplosphaera*. Проте, за нашими даними, автентичний штам *Ch. sphaerica* утворює як діади, так і пакети. При цьому утворення діад може бути наслідком вегетативного поділу або затримки двох автоспор у спорангії, утворення пакетів –

лише наслідком затримки виходу автоспор. В останньому випадку на походження діад та пакетів вказують як прямі спостереження, так і наявність у культурі сумкоподібних залишків оболонки спорангіїв. Сумкоподібні залишки оболонки спорангії відмічені також В. Вішером [16] у *D. chodatii*, і нами – у автентичного штаму *D. mucosa*.

Піреноїд у *Ch. sphaerica*, за авторським діагнозом, наявний, має обгортку із двох або декількох крохмальних платівок. Проте, за нашими спостереженнями, піреноїд у *Ch. sphaerica* у більшості випадків помітний погано, оскільки розвинена крохмальна обкладка, представлена переважно декількома гранулами, спостерігається зрідка та лише в культурах, вік яких не перевищує трьох місяців. Піреноїд із погано помітною обкладкою з декількох крохмальних гранул наводиться також для *D. mucosa* [6], що збігається з результатами наших спостережень автентичного штаму даного виду. У *D. chodatii*, за даними В. Вішера [16], піреноїд голий і тому майже непомітний.

За авторським діагнозом, *Ch. sphaerica* має переважно сферичні клітини; клітини еліпсоїдної форми зустрічаються зрідка. За нашими спостереженнями, форма клітин – ознака, що залежить від віку культури: у молодих культурах (до 2 тижнів) переважають еліпсоїдні клітини, у старіших – сферичні.

Таким чином, за результатами порівняльно-морфологічного аналізу автентичний штаму *Ch. sphaerica* виявився морфологічно подібним, хоча і не ідентичним, до обох відомих видів роду *Diplosphaera* (*D. chodatii* та *D. mucosa*), і суттєво відмінним від роду *Chlorella* та морфологічно близьких до останнього *Parachlorella* та *Chloroidium*.

Молекулярно-генетичний аналіз. Часткові сіквенси *Ch. sphaerica* та *D. mucosa* подібні (хоча не ідентичні). Послідовність ITS1-5.8S rDNA -ITS2 у *Ch. sphaerica* найбільшою мірою схожа з *Diplosphaera mucosa* (98,8 %) та *Diplosphaera sp.* (98,6 %). Схожість цієї послідовності з *Ch. vulgaris*, *C. ellipsoideum*, *E. subsphaerica* та *P. kessleri* становила 83,1, 76,6, 74,4 та 73,3 % відповідно. Таким чином, за молекулярними даними *D. chodatii*, *D. mucosa* та *Ch. sphaerica* – близько споріднені таксони.

За результатами вирівнювання некодувальних послідовностей вибірка поділялась на дві групи (рис. 2). У першій однозначно вирівнювались некодувальні послідовності ITS1 та ITS2 у *Ch. sphaerica*, *D. mucosa* та *Diplosphaera sp.* У другій групі умовно успішне вирівнювання некодувальних послідовностей спостерігалось для *Ch. vulgaris*, *C. ellipsoideum*, *E. subsphaerica* та *P. kessleri*.

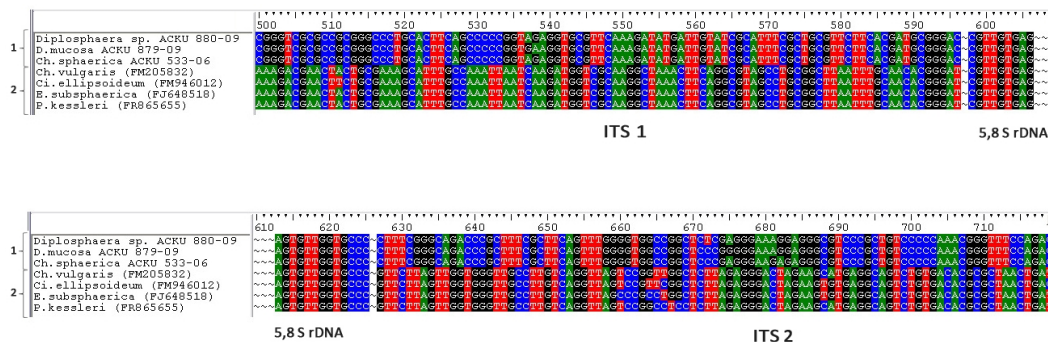


Рис. 2. Фрагменти вирівняних послідовностей ITS1-5.8S rDNA -ITS2 *Ch. sphaerica*, *D. mucosa*, *Diplosphaera sp.*, *Ch. vulgaris*, *C. ellipsoideum*, *E. subsphaerica* та *P. kessleri*, за якими вибірка поділяється на дві групи

Недостатня кількість сіквенсів послідовності ITS1-5.8SrDNA-ITS2 кластеру рибосомальних генів серед таксонів, близько споріднених із даним видом, не дозволяє наразі реконструювати філогенетичні відносини в межах цієї групи за допомогою звичайних методів молекулярно-філогенетичного аналізу. Проте порівняльний аналіз результатів вирівнювання некодувальних регіонів однозначно свідчить про належність *Ch. sphaerica* до роду *Diplosphaera* та неправомірність включення її до роду *Chlorella* (як у вузькому, так і в широкому розумінні останнього).

Цей висновок узгоджується з даними, наведеними на опублікованих молекулярно-філогенетичних дендрограмах філогенетичних відносин інших требуксієфіцієвих водоростей, побудованих за послідовністю 18S rDNA, де до матриці включені *D. chodatii* та *Ch. sphaerica* [2; 7; 12]. На жодній із таких дендрограм *Ch. sphaerica* не потрапила до дрібних клад, які містять представників роду *Chlorella* або виділені з цього роду *Chlorella*-подібні водорості.

З іншого боку, дані про молекулярно-генетичну схожість представників роду *Diplosphaera* та *Ch. sphaerica* добре узгоджуються з результатами наших морфологічних спостережень, які доповнюють оригінальний діагноз даного виду: наявність вегетативного поділу, здатність утворювати клітинні комплекси (діади та пакети) та зовнішні слизові структури.

Таким чином, за наявності у субкультури автентичного штаму *Ch. sphaerica* морфологічних ознак, притаманних роду *Diplosphaera*, та молекулярно-генетичної схожості цих таксонів, *Ch. sphaerica* має бути вилучена з системи роду *Chlorella* та перенесена до роду *Diplosphaera* Bialosuknia шляхом створення нової номенклатурної комбінації: *Diplosphaera sphaerica* (Tschermak-Woess) Karbovska et Kostikov, comb. nova (basionym: *Chlorella sphaerica* Tschermak-Woess 1988, Pl. Syst. Evol. 159, p. 136, figs. 1–3).

Висновки

На підставі морфологічного та порівняльного молекулярно-генетичного аналізів встановлено, що *Chlorella sphaerica* Tschermak-Woess має бути вилучена із системи роду *Chlorella* та перенесена до роду *Diplosphaera*, як *Diplosphaera sphaerica* (Tschermak-Woess) Karbovska et Kostikov, comb. nova (= *Chlorella sphaerica* Tschermak-Woess).

Бібліографічні посилання

1. **Масюк Н. П.** Эволюционные аспекты морфологии эукариотических водорослей. – К. : Наук. думка, 1993. – 256 с.
2. **A new** aerial alga *Stichococcus ampulliformis* sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) from Japan / S. Handa, M. Nakahara, H. Tsubota et al. // Phycological Research. – 2003. – Vol. 51. – P. 203–210.
3. **Amplification** and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor // PCR protocols: A guide to methods and applications / Ed. M. A. Innis, D. H. Geifand, J. J. Snisky, T. J. White. – San Diego (CA), 1990. – P. 315–322.
4. **Bialosuknia W.** *Diplosphaera chodatii* Bial. // Bull. de la Soc. bot. de Geneve. – 1909. – II, serie I. – 103 p.
5. **Bischoff H. W.** Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species / H. W. Bischoff, H. C. Bold // Phycol. Stud. 4, Univ. Texas Publ. – 1963. – N 6318. – P. 1–95.
6. **Broady P. A.** New records of chlorophycean microalgae cultured from Antarctic terrestrial habitats // Nova Hedwigia. – 1982. – Vol. 36. – P. 445–484.
7. **Ellias M.** *Pseudomarvania*, gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), a new genus for “budding” subaerial green algae *Marvania aerophytica* Neustupa et Sejnohova and *Stichococcus ampulliformis* Handa / M. Ellias, J. Neustupa // Fottea. – 2009. – Vol. 9, N 2. – P. 169–177.

8. **Ettl H.** Syllabus der Boden-, Luft und Flechtenalgen / H. Ettl, G. Gartner. – Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Germany, 1995. – 721 p.
9. **Friedl T.** Phylogenetic relationships of green algae assigned to the genus *Planophila* / T. Friedl, C. J. O'Kelly // Eur. J. Phycol. – 2002. – Vol. 37. – P. 373–384.
10. **Identification** of photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing / G. Helms, T. Friedl, G. Rambold, H. Mayrhofer // The Lichenologist. – 2001. – Vol. 33. – P. 73–86.
11. **Johansen J. R.** Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm / J. R. Johansen, D. A. Casamatta // Algol. Stud. – 2005. – Vol. 116. – P. 71–93.
12. **Neustupa J.** A taxonomic study of two *Stichococcus* species (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) with a starch-enveloped pyrenoid / J. Neustupa, M. Elias, L. Segnohova // Nova Hedwigia. – 2007. – Vol. 84, N 1–2. – P. 51–63.
13. **Pickett-Heaps J.** Cell division in *Stichococcus* // European Journal of Phycology. – 1974. – Vol. 9, N 1. – P. 63–73.
14. **Testing** for endemism, genotypic diversity and species concepts in Antarctic terrestrial microalgae of the Tribonemataceae (Stramenopiles, Xanthophyceae) / N. Rybalka, R. A. Andersen, I. Kostikov et al. // Environmental Microbiology. – 2009. – Vol. 11, N 3. – P. 554–565.
15. **Tschermak-Woess E.** New and known taxa of *Chlorella* (Chlorophyceae): Occurrence as lichen phycobionts and observations on living dictyosomes // Plant Systematics and Evolution. – 1988. – Vol. 159. – P. 123–139.
16. **Vischer W.** Reproduktion und systematische Stellung einiger Rinden- und Bodenalgae // Schweiz. Zeitschr. Hydrol. – 1960. – Vol. 22, N 1. – P. 330–349.

Надійшла до редакції 06.03.2012