

Биология, морфология и систематика гидробионтов

УДК 593.16

О МОРФОЛОГИИ И ГЕОГРАФИЧЕСКОМ РАСПРОСТРАНЕНИИ ГЕТЕРОТРОФНОГО ЖГУТИКОНОСЦА *WOBBLIA LUNATA*

А. О. Беляев*, Д. В. Тихоненков

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: *abelyaev@ibiw.ru
Поступила в редакцию 31.05.2023

В работе приведены неопубликованные ранее морфологические характеристики новой находки жгутиконосца *Wobblia lunata* из оз. Кючюкчекмедже (Турция). Получены изображения сканирующей электронной микроскопии с визуализацией клеточных бороздок, жгутиков и мастигонем, выполнен анализ географического распространения природных последовательностей участка V4 гена 18S рРНК исследуемого протиста и их обилия в морских экосистемах.

Ключевые слова: сканирующая электронная микроскопия, мастигонемы, жгутиконосцы, 18S рРНК.

DOI: 10.47021/0320-3557-2023-7-13

ВВЕДЕНИЕ

Группа эукариот Stramenopiles чрезвычайно разнообразна и состоит как из автотрофных, так и гетеротрофных представителей. Общим признаком для всех организмов, принадлежащих к страменопилам, является жгутиковая стадия жизненного цикла с гетеродинамичными жгутиками, передний из которых оснащен трубчатыми мастигонемами [Patterson, 1989; Cavalier-Smith, 1986]. Среди страменопил филогенетическая группа Bigyа содержит значительное количество малоизученных представителей, морфология и систематическое положение которых слабо исследованы [Adl et al., 2019]. Таковым является жгутиконосец *Wobblia lunata* [Moriya et al., 2000], который, по-видимому, впервые был описан как *Pendulomonas adriperis* [Tong, 1997]. *P. adriperis* характеризовался яйцевидными или каплевидными клетками размером 4–

9 мкм, двумя равными жгутиками без акронем, выходящими субапикально. При питании клетки прикреплялись к субстрату кончиком заднего жгутика, задняя часть клетки при этом вытягивалась. Прикрепленные клетки совершали очень быстрые колеблющиеся (дрожашие) движения [Tong, 1997; Lee, Patterson, 2000]. Позже Moriya с соавторами выделили несколько изолятов очень похожих гетеротрофных жгутиконосцев из разных биотопов Тихоокеанского побережья Японии и изучили их ультраструктуру и филогению по последовательности гена 18S рРНК, независимо описав новый род и вид *Wobblia lunata* [Moriya et al., 2000], что внесло таксономическую путаницу. В работе Moriya et al. [2000] не цитируется исследование С. Тонг с соавторами и, вероятно, о *Pendulomonas adriperis* исследователи не были осведомлены.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изолят PD-1 выделен из пробы детрита солоноватого (~8‰) озера Кючюкчекмедже (Турция). Чтобы свести к минимуму количество фотосинтезирующих водорослей и ускорить развитие гетеротрофных организмов, чашки Петри с пробами выдерживали в термостате при температуре 25°C в полной темноте. Пробы содержали в условиях свободного доступа воздуха, что позволило развиваться аэробным формам. Пробы исследовали на третьи, шестые и девятые сутки после подкормки бактериями *Aeromonas sobria*. После выделения с помощью стеклянной микропипетки, клоны размножали на штамме В-69 *Procryptobia sorokini*, который выращивали в морской среде Шмальца-Пратта или искусственной морской среде (RS-R11040, Красное

море) с использованием бактерии *Aeromonas sobria* в качестве пищи.

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) клетки собирали центрифугированием (5500×g). К 0.5 мл ресуспендированных клеток добавляли 0.5 мл 2.5%-ного глутарового альдегида (в 0.1 М какодилатном буфере) и выдерживали при температуре +4°C в течение 30 мин. Фиксированные клетки аккуратно осаждали на поликарбонатном фильтре (диаметр 24 мм, поры 1 мкм). Затем клетки промывали 0.05 М какодилатным буфером в течение 10 мин. Фиксированные клетки обезвоживали в серии спиртов (30, 50, 70% один раз по 10 мин; 96% по 10 мин дважды). Затем спирт был заменен окисью пропилена. Раствор 96%-ного этанола и окиси пропилена

в соотношении 1:1 добавляли сначала в течение 10 мин, затем раствор заменяли 100%-ной окисью пропилена (по 10 мин дважды). Окись пропилена заменяли гексаметилдисилоксаном и выдерживали в течение ночи. Сухие фильтры были приклеены к алюминиевым столикам и напылены золотом. Наблюдения проводили с помощью электронного микроскопа JSM-6510LV (JEOL, Токио, Япония).

При выделении тотальной ДНК жгутиконосцев ожидали полного выедания ими бактериотрофных кинетопластид *Procryptobia sorokini*. После этого клетки флагеллят собирали центрифугированием (1000 × g, комнатная температура) в пластиковых колонках объемом 0.8 мл (Vivaclear mini, Sartorius Stedim Biotech Gmng, Cat. No. 203000007). Для выделения ДНК использовался набор MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre, Мадисон, Висконсин, США, Cat. No. MC85200).

Для амплификации гена 18S рРНК использовали мастермикс для ПЦР EconoTaq PLUS GREEN 2X Master Mix (Lucigen, Миддлтон, Висконсин, США, Cat. No. 30033-1) Амплификацию проводили в ДНК-амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Lab Inc., Геркулес, Калифорния, США). Для амплификации использовали следующие праймеры:

PF1 (прямой):

GCGCTACCTGGTTGATCCTGCC;

FAD4 (обратный):

TGATCCTTCTGCAGGTTTACCTAC

ПЦР-программа состояла из начальной денатурации при 95°C в течение 3 мин, 35 циклов амплификации (95°C в течение 30 с, 52°C в течение 30 с, 72°C в течение 1.5 мин) и финальной элонгации при 72°C в течение 5 мин. Результат амплификации проверяли с помощью гель-электрофореза. Полученный

ПЦР-продукт очищали на колонках QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Хильден, Германия, Cat. No. 28106). Концентрацию выделенной ДНК и очищенного ПЦР-продукта проверяли на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) набором dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США, Cat. No. Q32851).

Полученный ПЦР продукт клонировали с использованием набора StrataClone PCR Cloning Kit (Agilent, Санта-Клара, США, Cat. No. 240205). Бактериальные колонии, имеющие плазмиды со вставкой требуемой длины, идентифицировали при помощи ПЦР с универсальными праймерами M13F и M13R и гель-электрофореза. С очищенными продуктами амплификации проводили сиквенсную реакцию с помощью набора реагентов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Уолтем, Массачусетс, США).

Дидезокси-секвенирование по Сэнгеру проводили на капиллярном анализаторе-секваторе Applied Biosystems 3500 (Applied Biosystems, США; Hitachi, Япония).

Секвенировали образцы в одной повторности с использованием внешних плазмидных праймеров M13F и M13R, а также двух универсальных внутренних праймеров:

18SintF (прямой):

5'-GGTAATTCAGCTCCAATAGCGTA-3'

18SintR (обратный):

5'-GTTTCAGCCTTGCGACCATACT-3'

Поиск по базе данных Tara oceans OTU 18S V4 v. 2 был выполнен с использованием веб-сайта Ocean Barcode Atlas (<http://oba.mio.osupytheas.fr>), используя для запроса полученную нами последовательность гена 18S рРНК и алгоритм vsearch с порогом сходства 97%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология клеток выделенного изолята PD-1 из пробы детрита солоноватоводной лагуны в целом идентична описанию *Wobblia lunata* [Moriya et al., 2000] и *Pendulomonas adriperis* [Tong, 1997]. Изображения, полученные с помощью СЭМ, визуализируют жгутиконосцев с четко оформленными трехчастными мастигонемами на переднем жгутике (рис. 1a, b). Мастигонемы большинства страменопил состоят из трех частей, средняя и дистальная из которых имеют почти равную длину [Clayton 1989; Fenchel and Patterson 1988; Honda et al., 1995; Moestrup 1982]. Мастигонемы *Wobblia lunata*, напротив, имеют две неравные дистальные части (рис. 1b) [Moriya et al., 2000]. Подобный признак известен для оомицетов [Domnas et al., 1986; Hardham, 1987;

Reichle, 1969]. Дистальный конец переднего жгутика тупой, без акронематического сужения. Задний жгутик гладкий, оснащен акронемой (рис. 1a, c, e). Клетки плавают передним концом вперед. На вентральной стороне клетки есть небольшой выступ, из которого выходят два гетеродинамичных жгутика, проходящие через индивидуальные вентральные бороздки (рис. 1d). Вентральная сторона клетки уплощенная с выемкой (рис. 1c), в то время как дорсальная выпуклая (рис. 1a, c, e). Клетки PD-1 полушаровидной формы, 6–10 мкм в длину и 4–6 мкм в ширину. Жгутиконосцы совершают движение по спирали. Передний жгутик вытянут вперед и двигается по синусоиде. Задний жгутик неподвижен при плавании клетки. Нередко наблюдается скользящее движение

при контакте вентральной поверхности клетки с субстратом. Рулевой жгутик при этом вытянут и направлен назад, соприкасаясь с субстратом.

Клетки часто прикрепляются к субстрату дистальной частью заднего жгутика. Передний жгутик создает поток воды в направлении цитостома, расположенного в зад-

ней части клетки. При этом клетка интенсивно качается/вибрирует. *W. lunata* питается бактериями или другими жгутиконосцами. Отмечены случаи каннибализма [Tong, 1997]. Клетки размножаются путем продольного бинарного деления, жгутики не втягиваются внутрь клетки в процессе цитокенеза. Половое размножение не наблюдали.

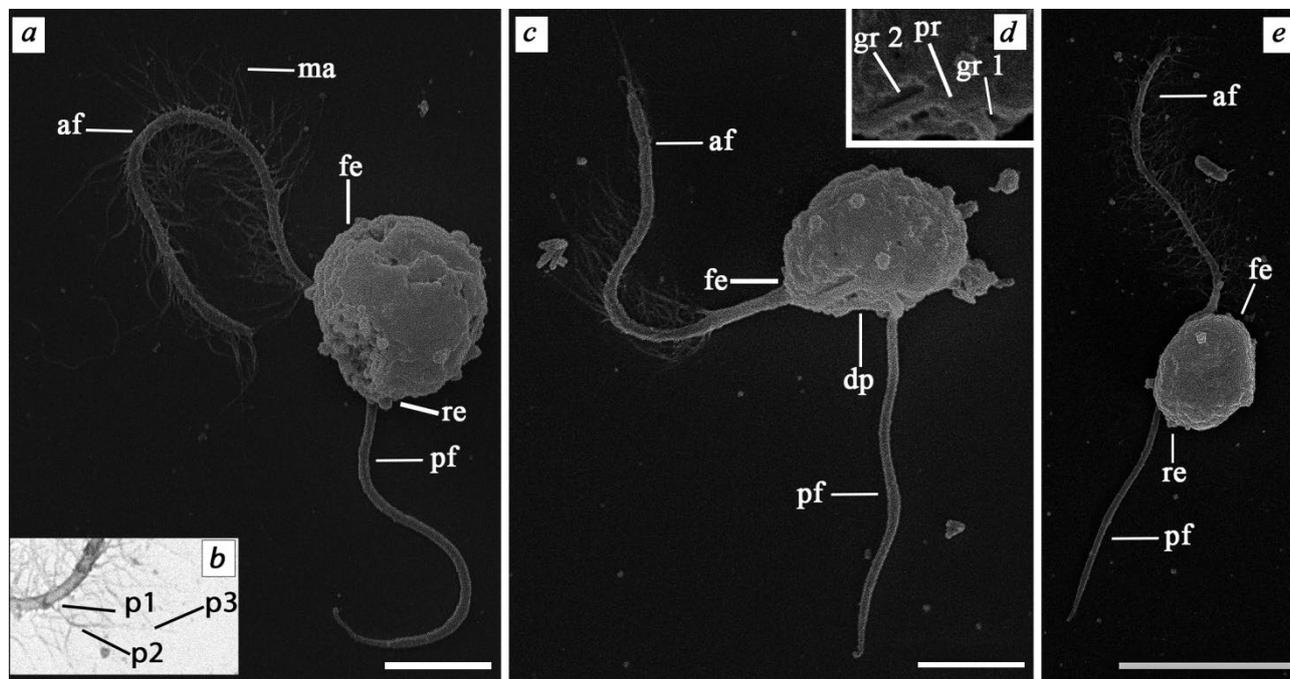


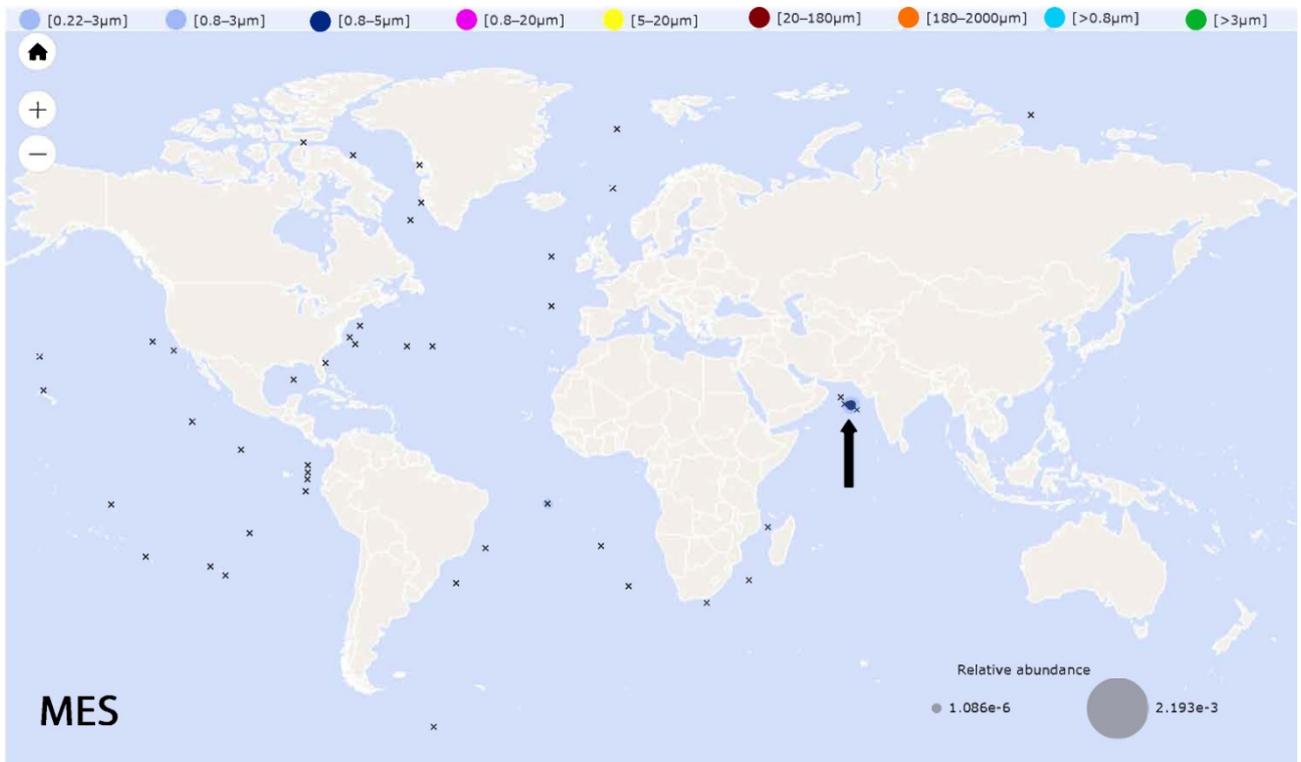
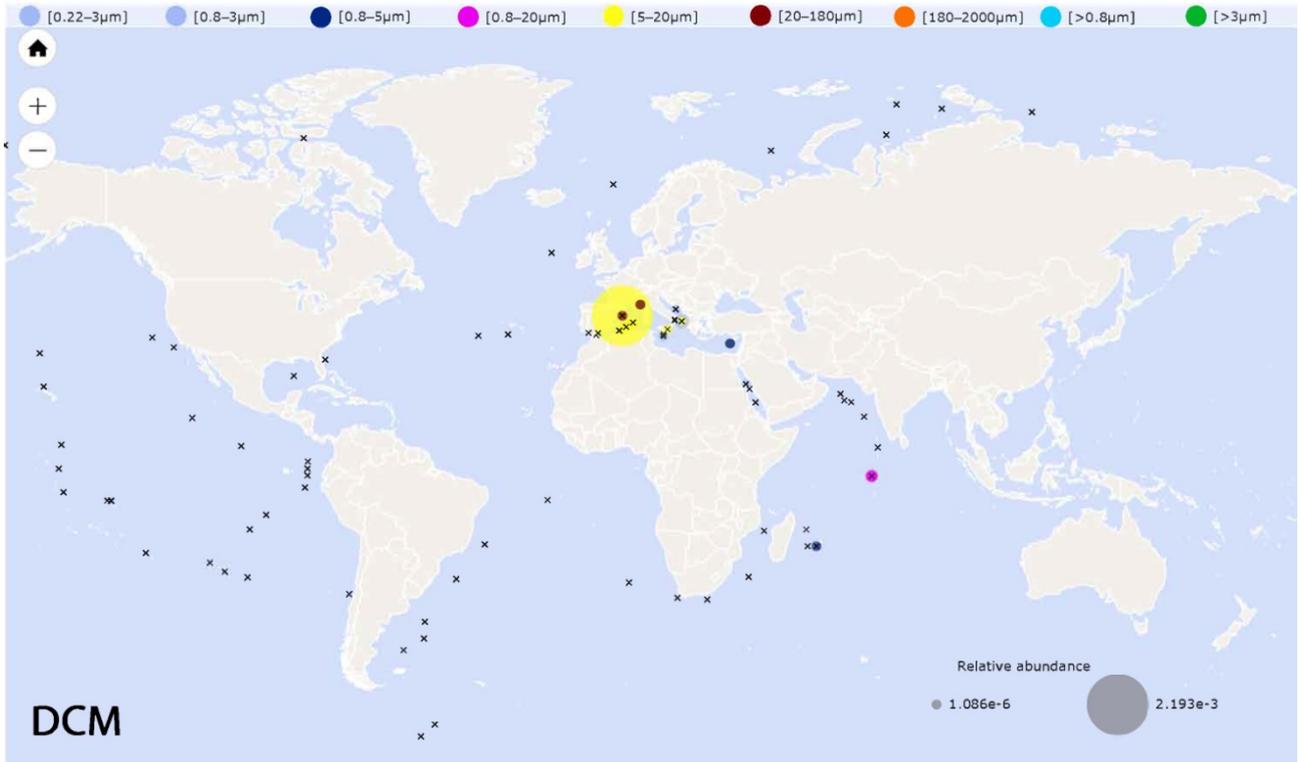
Рис. 1. Морфология клона PD-1, сканирующая электронная микроскопия. *a, c, e* – общий вид клетки, *b* – трехчастные мастигонемы, *d* – проксимальные концы жгутиков. *af* – передний жгутик, *dp* – углубление в вентральной части клетки, *fe* – передний конец клетки, *gr 1, 2* – жгутиковые бороздки 1 и 2 (по аналогии с традиционной нумерацией жгутиков), *ma* – мастигонемы, *p1, 2, 3* – части мастигонемы, *pf* – задний жгутик, *pr* – выступ, из которого выходят жгутики, *re* – задний конец клетки.

Fig. 1. Morphology of clone PD-1, scanning electron microscopy. *a, c, e* – general view of the cell, *b* – tripartite mastigonemes, *d* – proximal ends of flagella. *af* – anterior flagellum, *dp* – depression on the ventral part of the cell, *fe* – front end of the cell, *gr 1, 2* – flagella grooves 1 and 2 (according to flagella 1 (posterior) and 2 (anterior)), *ma* – mastigonemes, *p1, 2, 3* – parts of mastigoneme, *pf* – posterior flagellum, *pr* – protrusion and flagella emergence, *re* – rear end of the cell.

Систематическое положение *W. lunata* [согласно Adl et al., 2019] – Stramenopiles: Bigyга: Opalozoa: Placidida.

Ген 18S рРНК клона PD-1 демонстрирует 99.5% сходства с последовательностью *W. lunata* AB032606, согласно базе данных NCBI. Поиск по базе данных метабаркодирования Tara Oceans 18S V4 v. 2 с использованием последовательности *W. lunata* (strain PD-1) выявил одну операционную таксономическую единицу (OTU) со сходством >97%, которую мы относим к тому же виду. Вертикальное распределение нуклеотидных последовательностей *W. lunata* в водной толще варьирует от поверхностного слоя (~5 м)

с относительной численностью $1.16e^{-4}$ до мезопелагической зоны (~800 м) с относительной численностью $1.88e^{-6}$ (рис. 3). OTU *W. lunata* в пробах поверхностного слоя морских вод наиболее широко представлены в Средиземном море, в Индийском океане недалеко от о. Мадагаскар и в Аравийском море. Похожая картина географического распределения наблюдается и для горизонта глубинного максимума хлорофилла. В мезопелагической зоне OTU *W. lunata* отмечены только в пробе из Аравийского моря. OTU *W. lunata* наиболее представлены в размерной фракции планктонных организмов от 5 до 20 мкм, с относительной численностью $2.19e^{-3}$.



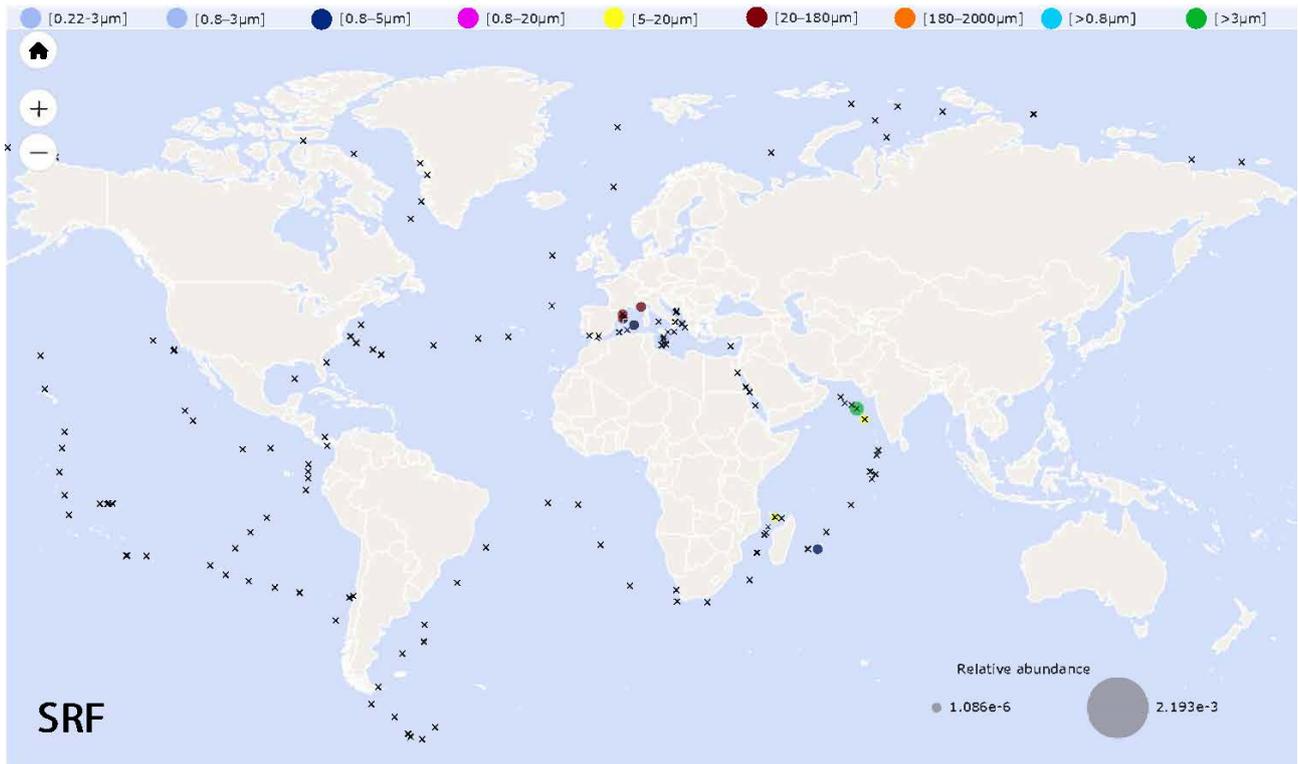


Рис. 2. Карта географического распределения операционных таксономических единиц (OTU) *Wobblia lunata* (Tara oceans 18S v. 2). DCM – глубокий максимум хлорофилла; MES – мезопелагическая зона (200–1000 м); SRF – поверхностные воды. Размеры кружков пропорциональны обилию OTU. Крестиками отмечены станции отбора проб экспедиции Tara Oceans. Стрелка указывает на станцию с OTU *W. lunata*. Размерные фракции планктонных организмов имеют цветовую маркировку, соответствующую легенде на рисунках.

Fig. 2. Map of the geographic distribution of operational taxonomic units (OTU) of *Wobblia lunata* (Tara Oceans 18S v. 2). DCM – deep chlorophyll maximum; MES – mesopelagic zone (200–1000 m); SRF – surface water. Sizes of the circles are proportional to the abundance of OTU. Crosses mark the sampling stations of the Tara Oceans expedition. The arrow points to the station with OTU of *W. lunata*. Size fractions of planktonic organisms are color-coded according to the legend in the figures.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило установить, что изолят PD-1 характеризуется двумя гетеродинамичными жгутиками, один из которых имеет мастигонемы, состоящие из трех частей неравной длины. Жгутики выходят из апикального выступа и имеют отдельные жгутиковые бороздки. Клетка каплевидной формы, с выемкой в вентральной части. Распространение последовательности гена 18 рРНК в морских экосистемах по данным

Tara Ocean ограничено Средиземным и Аравийским морями, а также двумя точками в Индийском океане. Наибольшим обилием операционных таксономических единиц *W. lunata* характеризуется размерная фракция планктона 5–20 мкм, что согласуется с полученными нами и литературными данными по размеру клеток исследованных жгутиконосцев.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-14-00280, <https://rscf.ru/project/23-14-00280/>.

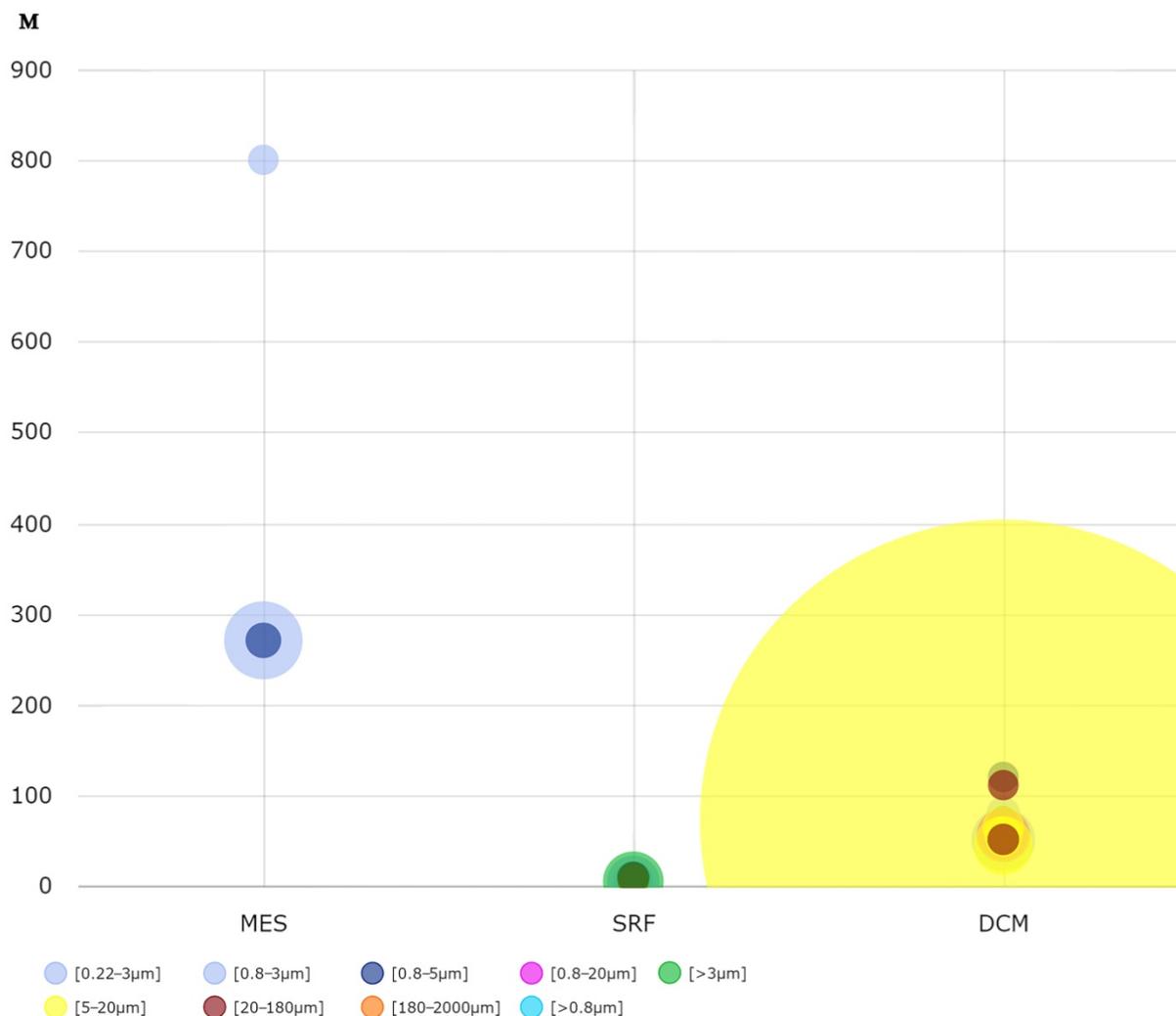


Рис. 3. Обилие OTU *Wobblia lunata* (пропорционально цветным кружкам) на разных глубинах (м). Цвета соотносятся с размерными фракциями на легенде к рисунку. DCM – глубинный максимум хлорофилла; MES – мезопелагическая зона (200–1000 м); SRF – поверхностные воды.

Fig. 3. Abundance of OTUs of *Wobblia lunata* (proportional to colored circles) at different depths (m). Size fractions of planktonic organisms are color-coded according to the legend in the figure. DCM – deep chlorophyll maximum; MES – mesopelagic zone (200–1000 m); SRF – surface water.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adl S.M., Bass D., Lane C.E., Lukes J., Schoch C.L. et al. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes // *J. Eukaryot. Microbiol.* 2019. Vol. 66. P. 4–119.
- Cavalier-Smith T. The kingdom Chromista: origin and systematics // *Progress in Phycological Research.* 1986. Vol. 4. P. 309–347.
- Clayton M.N. Brown Algae and Chromophyte Phylogeny. In: *The Chromophyte algae: Problems and Perspectives.* Eds.: Green J.C., Leadbeater B.S.C., Diver W.L. Clarendon Press, Oxford, 1989, pp. 229–253.
- Domnas A, Jaronski S, Hanton W.K. The zoospore and flagellar mastigonemes of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes, Lagenidiales) // *Mycologia.* 1986. Vol. 78. P. 810–817.
- Fenchel T., Patterson D.J. *Cafeteria roenbergensis* nov. gen., nov. sp., a heterotrophic microflagellate from marine plankton // *Mar. Microb. Food Webs.* 1988. Vol. 3. P. 9–19.
- Hardham A.R. Microtubules and the flagellar apparatus in zoospores and cysts of the fungus *Phytophthora cinnamomic* // *Protoplasma.* 1987. Vol. 137. P. 109–124.
- Honda D., Kawachi M., Inouye I. *Sulcochrysis biplastida* gen. et sp. nov.: cell structure and absolute configuration of the flagellar apparatus of an enigmatic chromophyte alga // *Phycol Res.* 1995. Vol. 43. P. 1–16.
- Lee W.J., Patterson D.J. Heterotrophic flagellates (Protista) from marine sediments of Botany Bay, Australia // *J. Nat. Hist.* 2000. Vol. 34. P. 483–562.

- Moestrup Ø. Flagellar structure in algae: a review, with new observations particularly on the Chrysophyceae, Phaeophyceae (Fucophyceae), Euglenophyceae, and Reckertia // *Phycologia*. 1982. Vol. 21. P. 427–528.
- Moriya M., Nakayama T., Inouye I. Ultrastructure and 18S rDNA sequence analysis of *Wobblia lunata* gen. et nov., a new heterotrophic flagellate (stramenopiles, incertae sedis) // *Protist*. 2000. Vol. 151. P. 41–55.
- Patterson D.J. Stramenopiles: Chromophytes from a Protistan Perspective. In: *The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives*. Eds.: Green J.C., Leadbeater B.S.C., Diver W.L. Clarendon Press, Oxford, 1989. P. 357–379.
- Reichle R.E. Fine structure of *Phytophthora parasitica* zoospores // *Mycologia*. 1969. Vol. 61. P. 30–51.
- Tong S. Heterotrophic flagellates and other protists from Southampton Water, UK // *Ophelia*. 1997. Vol. 47. P. 71–131.

REFERENCES

- Adl S.M., Bass D., Lane C.E., Lukes J., Schoch C.L. et al. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2019, vol. 66, pp. 4–119.
- Cavalier-Smith T. The kingdom Chromista: origin and systematics. *Progress in Phycological Research*, 1986, vol. 4, pp. 309–347.
- Clayton M.N. *Brown Algae and Chromophyte Phylogeny*. The Chromophyte algae: Problems and Perspectives. Eds.: Green J.C., Leadbeater B.S.C., Diver W.L. Clarendon Press, Oxford, 1989, pp. 229–253.
- Domnas A., Jaronski S., Hanton W.K. The zoospore and flagellar mastigonemes of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes, Lagenidiales). *Mycologia*, 1986, vol. 78, pp. 810–817.
- Fenchel T., Patterson D.J. *Cafeteria roenbergensis* nov. gen., nov. sp., a heterotrophic microflagellate from marine plankton. *Mar. Microb. Food Webs*, 1988, vol. 3, pp. 9–19.
- Hardham A.R. Microtubules and the flagellar apparatus in zoospores and cysts of the fungus *Phytophthora cinnamomic*. *Protoplasma*, 1987, vol. 137, pp. 109–124.
- Honda D., Kawachi M., Inouye I. *Sulcochrysis biplastida* gen. et sp. nov.: cell structure and absolute configuration of the flagellar apparatus of an enigmatic chromophyte alga. *Phycol. Res.*, 1995, vol. 43, pp. 1–16.
- Lee W.J., Patterson D.J. Heterotrophic flagellates (Protista) from marine sediments of Botany Bay, Australia. *J. Nat. Hist.*, 2000, vol. 34, pp. 483–562.
- Moestrup Ø. Flagellar structure in algae: a review, with new observations particularly on the Chrysophyceae, Phaeophyceae (Fucophyceae), Euglenophyceae, and Reckertia. *Phycologia*, 1982, vol. 21, pp. 427–528.
- Moriya M., Nakayama T., Inouye I. Ultrastructure and 18S rDNA sequence analysis of *Wobblia lunata* gen. et nov., a new heterotrophic flagellate (stramenopiles, incertae sedis). *Protist*, 2000, vol. 151, pp. 41–55.
- Patterson D.J. *Stramenopiles: Chromophytes from a Protistan Perspective*. The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives. Eds.: Green J.C., Leadbeater B.S.C., Diver W.L. Clarendon Press, Oxford, 1989, pp. 357–379.
- Reichle R.E. Fine structure of *Phytophthora parasitica* zoospores. *Mycologia*, 1969, vol. 61, pp. 30–51.
- Tong S. Heterotrophic flagellates and other protists from Southampton Water, UK. *Ophelia*, 1997, vol. 47, pp. 71–131.

ON THE MORPHOLOGY AND GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF THE HETEROTROPHIC FLAGELLATE *WOBBLIA LUNATA*

A. O. Belyaev*, D. V. Tikhonenkov

*Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences
152742 Borok, Russia, e-mail: *abelyaev@ibiw.ru
Revised 31.05.2023*

We are presenting previously unpublished morphological characteristics of a new finding of the flagellate *Wobblia lunata* from Küçükçekmeje lake (Turkey). Scanning electron microscopy images with visualization of flagellar grooves, flagella, and mastigonemes were obtained. The geographical distribution of environmental V4 18S rRNA sequences of the studied protist and their abundance in marine ecosystems were analyzed.

Keywords: scanning electron microscopy, mastigonemes, flagellates, 18S rRNA