

ANALISIS MORFOLOGI DAN FILOGENETIK MOLEKULER ALGA HIJAU COCCOID YANG DIISOLASI DARI PULAU ENGGANO [Morphological and Molecular Phylogenetic Analysis of Coccoïd Green Algae Isolated from Enggano Island]

Debora Christin Purbani^{*✉}, Diah Radini Noerdjito^{*}, Ismu Purnaningsih, Yeni Yuliani dan Danang Ambar Prabowo^{*}

Indonesian Culture Collection (InaCC), Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN),
Jl. Raya Jakarta-Bogor KM.46, Cibinong, Indonesia
Email: deborachristin22@gmail.com

ABSTRACT

A combined of morphological characters and molecular approach, is important for evaluating the current classification of microalgae. Phylogenetic trees based on 18S rDNA gene sequence analysis provide useful tools to distinguish between inter- and intra-specific morphologically similar species of *coccoïd* green algae. The aim of the study was to compare the morphological characters and conduct molecular analysis of *coccoïd* green algae isolated from Enggano Island, located southwest of Sumatera, Indonesia. *Coccoïd* green algae samples were collected from different sites at Enggano Island by using a *simple random sampling*. Single cells algae were isolated and transferred into IMK medium in flasks by using microcapillaries method. The morphological characteristics of green algae were observed under culture conditions using light microscopy and the molecular phylogenetic positions of the isolated strains were defined according to the 18S rDNA gene sequences. According to homology search (BLAST) and molecular phylogenetic tree analysis, four of the isolated *coccoïd* green algae possessed high sequence similarities, ranging between 99–100%, to *Chlorella vulgaris*, *Auxenochlorella protothecoides* var. *acidicola*, *Miractinium reisseri*, and *Miractinium belenophorum*.

Keywords: *coccoïd* green algae, similar phenotypes, 18S rDNA, phylogeny, InaCC

ABSTRAK

Kombinasi karakter morfologi dan analisis filogenetik molekuler berperan penting dalam mengevaluasi klasifikasi mikroalga saat ini. Analisis pohon filogenetik, berdasarkan gen 18S rDNA, dapat digunakan untuk membedakan berbagai spesies alga hijau *coccoïd* yang memiliki kemiripan karakter inter- dan intra-spesifik. Tujuan dari penelitian ini adalah membandingkan karakter morfologi dan melakukan analisis molekuler pada alga hijau *coccoïd* yang diisolasi dari Pulau Enggano, yang berlokasi di barat daya Pulau Sumatera, Indonesia. Sampel alga hijau *coccoïd* dikumpulkan dari berbagai lokasi di Pulau Enggano menggunakan *simple random sampling*. Sel alga tunggal diisolasi dan dipindahkan ke medium IMK berbasis air laut dalam botol dengan menggunakan metode mikrokapiler. Karakter morfologi alga hijau diamati dari kultur menggunakan mikroskop cahaya, sementara analisis filogenetik dari isolat alga hijau *coccoïd* didefinisikan sesuai dengan sekuens dari gen 18S rDNA. Berdasarkan pencarian homologi (BLAST) dan analisis pohon filogenetik, empat isolat alga hijau *coccoïd* yang berhasil diisolasi memiliki similaritas sekuens yang tinggi antara 99–100% dengan *Chlorella vulgaris*, *Auxenochlorella protothecoides* var. *acidicola*, *Miractinium reisseri*, dan *Miractinium belenophorum*.

Kata Kunci: Alga hijau *coccoïd*, kesamaan fenotip, 18S rDNA, filogeni, InaCC

PENDAHULUAN

Mikroalga hijau merupakan organisme eukariota fotosintetik mikroskopik yang memiliki kloroplas dengan dua membran selubung, tumpukan tylakoid serta klorofil a dan b (John, 2003; Sheath *et al.*, 2015). Mikroalga jenis ini terdistribusi di seluruh dunia dan dapat ditemukan di hampir semua habitat, mulai dari Kutub Utara hingga Kutub Selatan, perairan (lautan dan danau air tawar) serta daratan (dari daerah beriklim sedang hingga kering). Alga hijau juga dapat ditemukan bersimbiosis dengan lumut, protozoa, atau foraminifera; bahkan sebagai parasit pada tanaman tropis (Lewis dan McCourt, 2004; Kaštovský *et al.*, 2019;). Bentuk morfologis mikroalga hijau sangat beragam mulai dari *coccoïd*, uniseluler berflagela, filamen bercabang atau tidak bercabang, hingga makrofit berinti banyak dan taksa dengan jaringan parenkim (Naselli-Flores dan Barone, 2009).

Berdasarkan bentuk selnya, alga hijau *coccoïd* juga sering disebut *little green balls* atau *little*

round green things. Kelompok mikroorganisme ini termasuk mikroalga uniseluler yang tidak berflagela pada fase vegetatifnya, hidup secara soliter atau kolonial, pada sebagian spesies selnya diselimuti oleh lendir dan dapat tumbuh di berbagai ekosistem, terutama di perairan lentik dangkal. Mereka termasuk produsen utama yang sangat penting di dalam komunitas perairan. Keberadaannya dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti cahaya, suhu, dan tingkatan trofik (Shubert dan Gärtner, 2015; Soylu dan Gönülol, 2012; Dunker dan Wilhelm, 2018). Dalam divisi *Chlorophyta*, mikroalga *coccoïd* berada pada tiga kelas yang berbeda yaitu *Chlorophyceae*, *Trebouxiophyceae*, dan *Prasinophyceae* (Krienitz dan Bock, 2012). Ukurannya yang sangat kecil, morfologi eksternalnya yang sederhana, serta kesamaan fenotip antar spesiesnya, membuat alga hijau *coccoïd* sulit diidentifikasi menggunakan analisis morfologi klasik di bawah mikroskop cahaya. Keterbatasan fitur fenotip yang dimiliki kelompok mikroalga ini menjadi dasar

*Kontributor Utama

*Diterima: 16 Maret 2021 - Diperbaiki: 31 Mei 2021 - Disetujui: 14 Agustus 2021

diperlukannya metode yang lebih handal untuk mengidentifikasi jenis-jenisnya secara tepat. Salah satunya dengan pendekatan polifasik yang menggabungkan data morfologis dan molekular dalam proses identifikasi spesiesnya.

Keberhasilan dalam metode identifikasi molekular dengan teknik PCR dipengaruhi oleh gen pengkode dan primer yang digunakan (Bhuvaneshwari *et al.*, 2016). Wang *et al.* (2014) dalam studinya menggunakan marka 18S rDNA yang merupakan genom rekombinasi ribosom, dan dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan organisme eukariotik berukuran mikroskopis dalam suatu ekosistem. Gen 18S rDNA pada mikroalga memiliki rentang sekuen yang *conserved* (lestari) sehingga dapat digunakan untuk mendukung hubungan kekerabatan secara alami antar spesies mikroalga (Fučíková *et al.*, 2014; Leliaert *et al.*, 2016). Meskipun teknik molekular telah banyak digunakan di berbagai negara untuk menilai keabsahan konsep morfologi mikroorganisme, namun, penggunaan teknik ini dalam bidang fikologi belum banyak digunakan di Indonesia, khususnya untuk mengidentifikasi alga hijau *cocoid* dari perairan laut Pulau Enggano. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk membandingkan karakter morfologi dan analisis molekular menggunakan marka 18S rDNA dari kultur alga hijau *cocoid* yang diisolasi dari Pulau Enggano. Pulau Enggano merupakan bagian dari kepulauan terluar Indonesia, yang belum banyak dieksplorasi keanekaragamannya hayatinya. Isolasi dan identifikasi alga hijau *cocoid* ini juga dapat menjadi basis data primer mengenai keberadaan mikroorganisme ini di perairan laut Pulau Enggano, sebagai langkah awal dalam pengungkapan potensinya di tahap berikutnya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Pengambilan dan preparasi sampel

Pengambilan sampel dilakukan di dua lokasi perairan laut Kepulauan Enggano Provinsi Bengkulu, yaitu Banjarsari (N: 05°17'417'' E: 102°09'857''), dan Meok (N: 05°17'306'' E: 102°13'433''), dengan menggunakan *simple random sampling*. Pada setiap lokasi, sampel sedimen diambil dan disimpan di dalam *corning tubes*; sedangkan sampel mikroalga dari air laut dikoleksi dengan menggunakan jala plankton, kemudian disimpan di dalam *corning tubes*. Sampel kemudian diperkaya menggunakan media IMK dengan komposisi: satu liter air laut, 200mg NaNO₃, 1.4mg Na₂HPO₄, 5mg K₂HPO₄, 2.68mg NH₄Cl, 5.2mg Fe-EDTA, 0.332mg Mn-EDTA, 37.2mg Na₂-EDTA, 0.023mg ZnSO₄•7H₂O, 0.014mg CoSO₄•7H₂O, 0.0073mg Na₂MoO₄•2H₂O, 0.0025mg CuSO₄•5H₂O, 0.0017mg H₂SeO₃, 0.180mg MnCl₂•4H₂O, 0.2mg Thiamin•HCl,

0.0015mg Biotin, dan 0.0015mg Vitamin B12 dalam satu liter air laut) (Anderson, 2005). Sampel kemudian dibawa ke laboratorium untuk diisolasi mikroalganya.

Isolasi dan identifikasi morfologi

Isolasi sel dilakukan untuk memperoleh satu spesies mikroalga untuk tahap monokultur. Metode yang digunakan adalah pengenceran berseri dan *capillary micro-pipetting* di bawah mikroskop cahaya (Olympus CKX41). Pengamatan selama proses isolasi dilakukan sampai mendapatkan isolat tunggal. Adapun unit karakter yang digunakan adalah morfologi yang meliputi bentuk, ukuran, keberadaan kloroplas dan pirenoid, tipe reproduksi, dan keberadaan struktur khusus (bintik mata). Setiap isolat tunggal kemudian dikultur dalam medium IMK selama 10–14 hari pada suhu 25°C dibawah pencahayaan cahaya *fluorescent* sebesar 30 µmol m⁻² s⁻¹, dengan fotoperiodisme 12 jam terang:12 jam gelap (Song *et al.*, 2016). Identifikasi morfologis dilakukan pada magnifikasi obyektif 100x menggunakan mikroskop Olympus BX53 yang dihubungkan dengan kamera Olympus DP22 dan sebuah komputer dengan aplikasi Olympus *CellSens Standart* (Olympus, Tokyo, Japan). Karakter morfologi masing-masing isolat alga hijau *cocoid* kemudian dianalisis secara deskriptif menggunakan buku identifikasi mikroalga (Barsanti dan Gualtieri, 2014; Bellinger dan Sigeo, 2015).

Ekstraksi DNA, aplikasi PCR dan sekuensing

DNA genom dari setiap kultur alga hijau *cocoid* diekstraksi menggunakan *Genomic DNA mini kit (Plant) Geneaid* sesuai protokol dari manufaktur *Genetica Science*. DNA hasil ekstraksi kemudian diukur konsentrasi dan kemurniannya menggunakan *Nano Drop Spectrophotometer* berdasarkan prinsip penyerapan sinar ultraviolet oleh nukleotida (260nm) dan protein (280nm) dalam larutan. Dua set primer, yaitu primer *forward*: 18SF (5'-CCA ACC TGG TTG ATC CTG CCA GTA-3') dan primer *reverse*: 18SR (5'-CCT TGT TAC GAC TTC ACC TTC CTC T-3') digunakan untuk mengamplifikasi gen 18S rDNA dari setiap isolat terekstraksi menggunakan mesin *thermocycler*. Pada setiap sampel yang dianalisis, PCR mix yang digunakan adalah sebanyak 25 µl (per PCR tube) dan terdiri atas 12.5 µl *master mix Go Taq green*, 1 µl *primer forward*, 1 µl *primer reverse*, 0.5 µl DMSO, 9 µl *nuclease free water* (NFW) dan 1 µl DNA *template*. Proses PCR dilakukan dalam 5 tahap yaitu predenaturasi 94°C (5 menit), diikuti 35 siklus denaturasi pada suhu 94°C (1 menit), *annealing* pada suhu 63°C (1 menit), *extension* pada suhu 72°C (1 menit), kemudian dilanjutkan dengan *final extension* pada suhu 72°C (10 menit) dan tahap pendinginan pada

suhu 4°C. Pada tahap PCR ini turut disertakan kontrol negatif yang terdiri dari campuran reagen PCR tanpa DNA *template*. DNA hasil amplifikasi divisualisasi menggunakan elektroforesis horizontal dengan gel agarosa 1%. Sekuensing dilakukan di Macrogen.inc Korea Selatan untuk menentukan urutan basa rantai atau sekuens DNA berdasarkan primer 18SF dan 18SR (Tale *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Analisis filogenetik

Sekuens parsial 18S rDNA hasil sekuensing diinspeksi menggunakan *software* Chromas Pro dan dibandingkan dengan sekuens DNA yang berada dalam GenBank menggunakan NCBI *Basic Local Alignment Search* tool (BLAST; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=blastSearch). Beberapa sekuens di GenBank yang memiliki kemiripan tinggi dengan sekuens setiap isolat dari Pulau Enggano diunduh sebagai bahan analisis *multiple sequences alignment* (MSA). Prosedur analisis MSA dilakukan *alignment editor* pada program MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Sekuens dari setiap isolat sampel kemudian dibandingkan dengan sekuens hasil BLAST, termasuk strain *type* (4 sekuens isolat InaCC, 40 sekuens pembanding, dan 5 sekuens *Parachlorella* sebagai outgroup), menggunakan fitur *MUSCLE* (Edgar, 2004) yang terintegrasi pada MEGA X. Kedua area di bagian depan dan belakang MSA yang tidak berhasil di-align secara baik dipotong (*trimmed*) untuk menghasilkan dataset akhir yang akan digunakan dalam analisis filogenetik. Berdasarkan analisis *best-fit model*, Kimura's two-parameter model (K2) ditetapkan sebagai model terbaik untuk menganalisis pohon filogenetik. Konstruksi pohon filogenetik dilakukan melalui metode *Maximum Likelihood* (ML), *Neighbour Joining* (NJ) dan *Maximum Parsimony* (MP), dengan menerapkan K2 sebagai best-fit model, pengaturan *missing data* menggunakan *partial deletion* (95%) dan *bootstrap replication* sebanyak 1000 pada program MEGA X.

Analisis jarak genetik (*Pairwise genetic distance*)

Analisis lanjutan untuk menentukan jarak genetik (*pairwise genetic distance*) dilakukan menggunakan MEGA X. Analisis ini dilakukan untuk memastikan bahwa setiap isolat alga hijau *coccoid* dari Pulau Enggano memiliki identitas yang sesuai dengan hasil analisis pohon filogenetik. Analisis dimulai dengan melakukan MSA menggunakan fitur *MUSCLE* di MEGA X secara terpisah untuk setiap kelompok (*clade*) alga hijau *coccoid* sesuai hasil analisis pohon filogenetik pada tahap sebelumnya. Hasil setiap MSA yang telah di-*trimmed* tersebut kemudian dianalisis dengan

fitur *Compute pairwise distance* pada MEGA X dengan menerapkan pengaturan model *p-distance*, *uniform rate*, dan *bootstrap replicates* sebanyak 1000.

HASIL

Mikroalga yang berbeda secara taksonomi dapat diamati dari dua jenis sampel (sedimen dan air laut) yang dikumpulkan dari titik sampling yang berbeda di Pulau Enggano. Sebanyak delapan isolat mikroalga dari lima sampel sedimen dan enam isolat dari lima sampel air laut berhasil diisolasi. Empat isolat diantaranya merupakan alga hijau *coccoid* yang berasal dari sampel air laut, kemudian diidentifikasi lebih lanjut dalam penelitian ini secara morfologis menggunakan mikroskop (Gambar 1) dan analisis filogenetik molekuler (Gambar 2).

Karakteristik morfologis umum

Secara umum, isolat InaCC M146 (Gambar 1.a-d), InaCC M148 (Gambar 1.f-i), InaCC M172 (Gambar 1.j-l), dan InaCC M173 (Gambar 1.m-o) memiliki kesamaan karakteristik morfologis seperti *Chlorella* dalam hal bentuk selnya yang bulat atau elips dengan diameter berkisar antara 2.0–8.0 µm. Di bawah pengamatan mikroskop, sel-sel dari setiap isolat memiliki kloroplas dengan pirenoid yang berbentuk bulat atau elips (Gambar 1.d, h, k, l, n). Sel-selnya juga dapat hidup soliter ataupun berkoloni, meski pada saat pengamatan mikroskop, umumnya kumpulan koloni tersebut terburai akibat proses pipetting dan juga tekanan lapisan kaca *coverslip* saat observasi dengan pembesaran 100x.

Sel isolat InaCC M146 berbentuk bulat dan berdiameter 4.19–6.30 µm (rata-rata= 5.40; n=10 sel) (Gambar 1.a). Kloroplast berbentuk seperti cawan dan seringkali terlihat memenuhi setengah isi sel (Gambar 1.b). Nukleus kecil dan seringkali berwarna kebiruan bila diamati di bawah mikroskop (Gambar 1.c). Satu pirenoid kecil berbentuk bulat terdapat di dalam kloroplas (Gambar 1.d).

Sel isolat InaCC M148 juga berbentuk bulat dan berdiameter 2.97–5.2 µm (rata-rata= 4.47 µm; n=10 sel) (Gambar 1.f). Karakteristik morfologis mirip dengan isolat InaCC M146, kloroplast berbentuk cawan, sering terlihat memenuhi sebagian (Gambar 1.g) atau seluruh bagian sel (Gambar 1.h,i), tergantung sudut observasi. Nukleus bulat kecil dan berwarna kebiruan (Gambar 1.g). Pirenoid berbentuk bulat-elips dan berada di dalam kloroplas (Gambar 1.h).

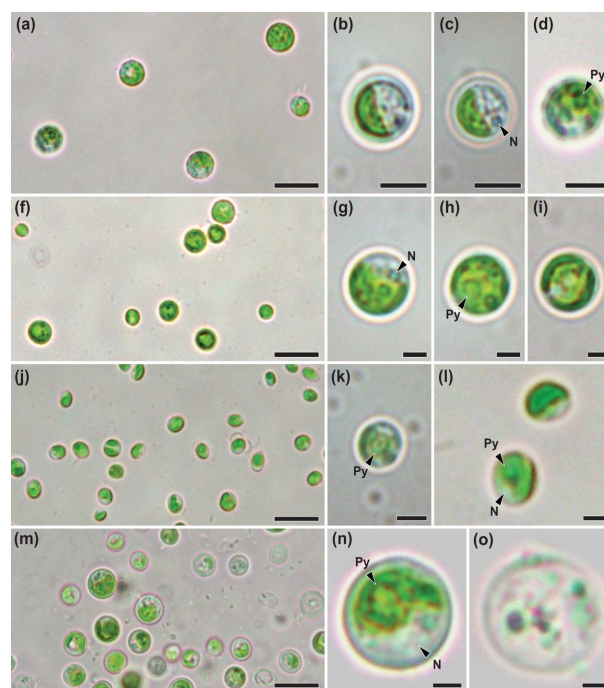
Berbeda dengan dua isolat InaCC sebelumnya, InaCC M172 berbentuk bulat-oval (Gambar 1.j) dengan ukuran diameter terpanjangnya 3.29–5.09 µm (rata-rata= 4.14 µm;

n=10 sel). Sebagian kloroplas memenuhi dengan satu buah pirenoid berbentuk bulat-elips di dalam kloroplas (Gambar 1.k). Nukleus berukuran kecil dan samar terlihat di bawah mikroskop cahaya (Gambar 1.l).

Isolat InaCC M173 memiliki sel yang berbentuk bulat (Gambar 1.m,n,o) dengan diameter 3.71–7.79 μm (rata-rata= 5.98 μm ; n=10). Kloroplast berbentuk seperti cawan dan memenuhi sebagian atau seluruh sel (Gambar 1.m,n). Satu buah pirenoid berbentuk bulat-elips (Gambar 1.n) di dalam kloroplas.

Filogenetik molekuler

Karena kesamaan morfologi sel-selnya, sangat sulit membedakan dan mengidentifikasi masing-masing isolat hanya berdasarkan karakter morfologis yang dapat diamati dibawah mikroskop cahaya (Gambar 1). Oleh karenanya, pendekatan molekuler (filogenetik dan jarak genetik) dilakukan untuk identifikasi masing-masing isolat. Amplifikasi PCR untuk mengetahui identitas isolat hingga tingkat spesies menggunakan gen 18S rDNA menghasilkan amplicon atau sekuens sekitar 1000 bp. Pencarian kemiripan dari database GenBank menggunakan NCBI BLAST menunjukkan bahwa empat sekuens yang diperoleh



Gambar 1. Morfologi keempat isolat alga hijau *cocoid* dari Pulau Enggano (a-o). Morfologi InaCC M146 (a-d). Morfologi InaCC M148 (f-i). Morfologi InaCC M172 (j-l). Morfologi InaCC M173 (m-o). Py dan N masing-masing mengindikasikan pirenoid dan nucleus/inti sel. Skala = 10 μm (a, f, j, m). Skala = 2 μm (b-d; g-i; k-l; n-o). (*Morphology of cocoid green algae from Enggano Island (a-o) represented by InaCC M146 (a-d), InaCC M148 (f-i), InaCC M172 (j-l), and InaCC M173 (m-o). The Py and N indicate pyrenoid and nucleus, respectively. Scale bar = 10 μm (a, f, j, m). Scale bar = 2 μm (b-d; g-i; k-l; n-o).*

memiliki kemiripan komposisi asam-basa (nukleotida) yang tinggi dengan *Chlorella vulgaris* strain SAG 211–11b untuk sekuen isolat InaCC M146; *Auxenochlorella protothecoides* strain var. *acidicola* untuk sekuen isolat InaCC M148; dan *Micractinium reisseri* untuk sekuen isolat InaCC

M172. Sedangkan sekuen isolat InaCC M173 memiliki kemiripan yang tinggi dengan *Micractinium belenophorum* strain SAG 42.98. Empat isolat alga hijau coccoid dari Pulau Enggano menunjukkan kesamaan urutan nukleotida 18S rDNA yang sangat tinggi dengan spesies *reference* pada rentang 99.34–100% (Tabel 1).

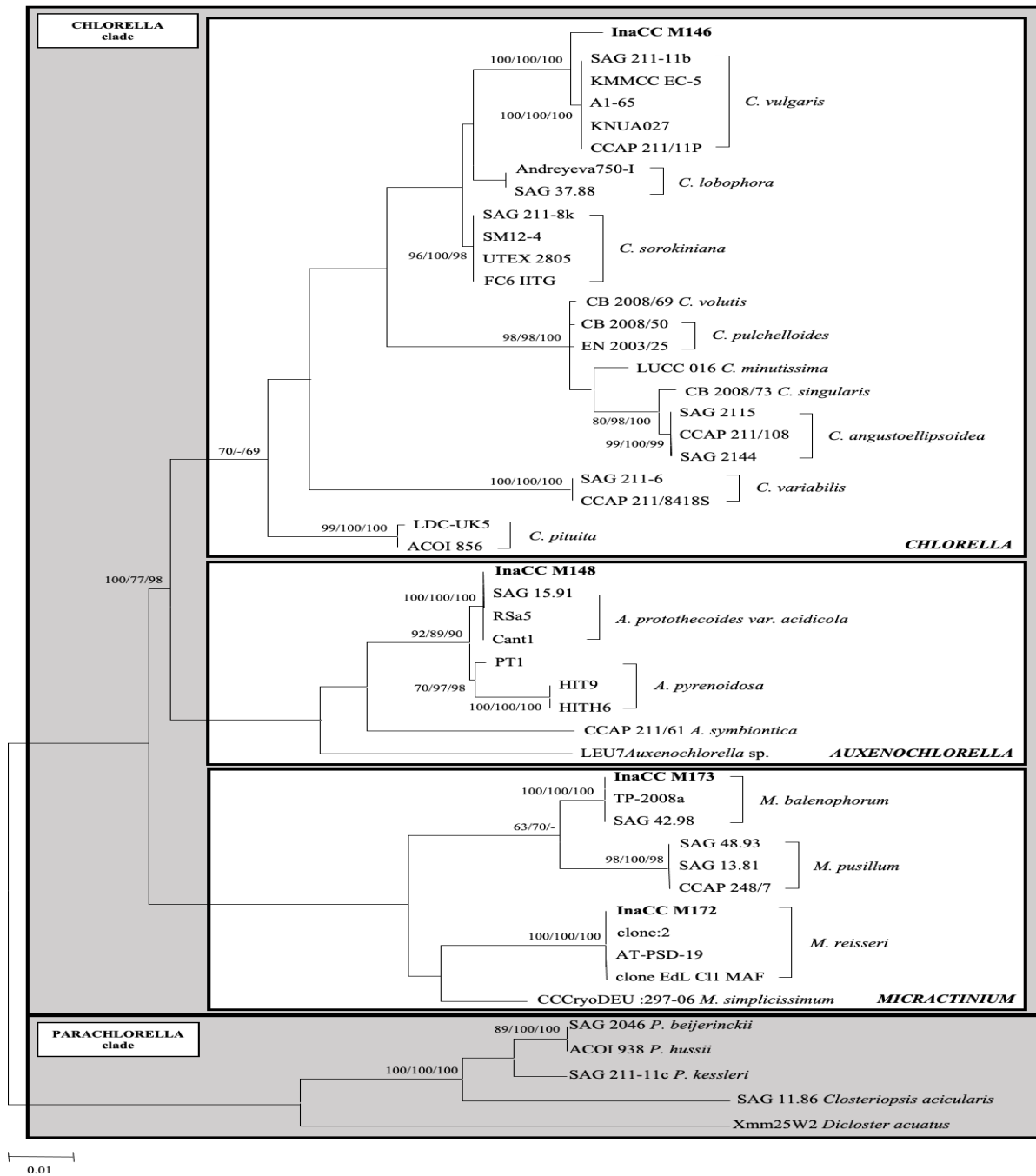
Tabel 1. Hasil identifikasi isolat alga hijau coccoid berdasarkan gen 18S rDNA (*Identification result of coccoid green algae isolates based on 18S rDNA*).

Kode isolat (<i>Isolate code</i>)	Jumlah nukleotida (<i>Number of nucleotide</i>)	Hasil sekuensing (<i>Sequencing result</i>)	Presentase homologi (<i>Percentage of homology</i>)
InaCC M146	706	<i>Chlorella vulgaris</i> SAG 211–11b (X13688.1)	99.34
InaCC M148	720	<i>Auxenochlorella protothecoides</i> var. <i>acidicola</i> (LN610705.1)	100
InaCC M172	716	<i>Micractinium reisseri</i> (AB506071.1)	100
InaCC M173	698	<i>Micractinium belenophorum</i> SAG 42.98 (AY323837.1)	100

Evaluasi hubungan filogenetik berdasarkan gen 18S rDNA dilakukan antara isolat alga hijau coccoid yang diperoleh dari Pulau Enggano dengan spesies *reference* yang diperoleh dari hasil pencarian BLAST dan dari berbagai penelitian yang telah dipublikasikan, termasuk untuk *clade Parachlorella* sebagai *outgroup*. Hasil analisis filogenetik menunjukkan dua *clade* yang berbeda yaitu *clade Chlorella* dan *Parachlorella*, yang didukung secara penuh pada ML (100%) dan MP (98%) dan secara moderat pada NJ (78%) (Gambar 2). Masing-masing isolat InaCC dari Pulau Enggano membentuk hubungan kekerabatan yang sangat erat dan didukung penuh (100/100/100; ML/NJ/MP) berdasarkan posisi filogenetiknya dengan empat jenis mikroalga yang berbeda, yaitu *Chlorella vulgaris*, *Auxenochlorella protothecoides* var. *acidicola*, *Micractinium reisseri*, dan *Micractinium belenophorum* (Gambar 2).

Selanjutnya, masing-masing posisi filogenetik keempat isolat tersebut dapat dijelaskan berdasarkan jarak genetiknya (*pairwise genetic distance*). Hasil analisis sekuen DNA alga hijau coccoid dari Pulau Enggano memberikan jarak genetik terendah sebesar 0% ($p=0.000$) dan tertinggi 21% ($p=0.211$) (Tabel 2–4). Spesies dari

GenBank yang menunjukkan jarak genetik paling kecil dengan sekuen isolat dari Pulau Enggano memiliki potensi terbesar untuk diadopsi namanya sebagai identitas *species* bagi masing-masing isolat InaCC. Isolat InaCC M146 memiliki jarak genetik paling kecil dengan *Chlorella vulgaris* (0.3%; $p=0.003$) dibanding spesies *Chlorella* lainnya (Tabel 2), sehingga isolat InaCC M146 diidentifikasi sebagai *C. vulgaris*. Selanjutnya, jarak genetik isolat InaCC M148 paling kecil dengan *Auxenochlorella protothecoides* var. *acidicola* (0.0%; $p=0.000$) (Tabel 3). Isolat InaCC M172 menunjukkan jarak genetik terkecil dengan *Micractinium reisseri* (0.0–0.1%; $p=0.000–0.001$) (Tabel 4) sedangkan isolat InaCC M173 memiliki kedekatan erat dengan *Micractinium belenophorum* (0.0%; $p=0.000$) (Tabel 4). Bila dibandingkan, kedua isolat InaCC M172 dan M173 memiliki jarak genetik yang cukup jauh (4.8%; $p=0.048$) sehingga sangatlah tepat bila keduanya diidentifikasi sebagai spesies *Micractinium* yang berbeda (Tabel 4).



Gambar 2. Pohon filogenetik molekuler isolat alga hijau *coccoid* dari Pulau Enggano berdasarkan sekuens gen 18S rDNA menggunakan analisis *Maximum Likelihood* (ML), *Neighbour Joining* (NJ) dan *Maximum Parsimoni* (MP), dengan 1000 replikasi *bootstrap* (*Phylogenetic tree of four isolates of coccoid green algae from Enggano Island based on 18S rDNA gene sequences using ML, NJ and MP analyses using 1000 bootstrap replications, respectively*).

Tabel 2. Hasil *pairwise distance calculation* dari *Chlorella* spp. (*Pairwise distance calculation result of Chlorella spp. group*).

Isolat	InaCC M146
InaCC M146	
<i>Chlorella vulgaris</i> SAG 211-11b (X13688.1)	0.003
<i>Chlorella vulgaris</i> KMMCC EC-5 (HQ702321.1)	0.003
<i>Chlorella vulgaris</i> A1-65 (KF661335.1)	0.003
<i>Chlorella vulgaris</i> KNUA027 (KU306723.1)	0.003
<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/11P (FR865658.1)	0.003
<i>Chlorella lobophora</i> Andreyeva750-I (X63504.1)	0.046
<i>Chlorella lobophora</i> (Syn. <i>Lobosphaeropsis lobophora</i> SAG 37.88 (FM205833.1)	0.052
<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-8k (X62441.2)	0.048
<i>Chlorella sorokiniana</i> SM12-4 (KX495086.1)	0.048
<i>Chlorella sorokiniana</i> UTEX 2805 (KR092112.1)	0.048
<i>Chlorella sorokiniana</i> FC6 IITG (JX453208.1)	0.048
<i>Chlorella volutis</i> CB 2008/69 (HQ111434.1)	0.055
<i>Chlorella pulchelloides</i> CB 2008/50 (HQ111431.1)	0.051
<i>Chlorella pulchelloides</i> EN 2003/25 (HQ111430.1)	0.049
<i>Chlorella minutissima</i> LUCC 016 (KC794703.1)	0.071
<i>Chlorella singularis</i> CB 2008/73 (HQ111435.1)	0.082
<i>Chlorella angustoeilipsoidea</i> SAG 2115 (FM946019.1)	0.090
<i>Chlorella angustoeilipsoidea</i> CCAP 211/108_(FM946021.1)	0.090
<i>Chlorella angustoeilipsoidea</i> SAG 2144 (FM946020.1)	0.090
<i>Chlorella variabilis</i> SAG 211-6 (FM205849.1)	0.142
<i>Chlorella variabilis</i> CCAP 211/8418S (FN298923.1)	0.142
<i>Chlorella pituita</i> LDC-UK5 (KJ849832.1)	0.174
<i>Chlorella pituita</i> ACOI 856 (FM205856.1)	0.172

Tabel 3. Hasil *pairwise distance calculation* dari *Auxenochlorella* spp. (*Pairwise distance calculation result of Auxenochlorella spp. group*).

Isolat	InaCC M148
InaCC M148	
<i>Auxenochlorella protothecoides</i> var. <i>acidicola</i> SAG 15.91 (LN610705.1)	0.000
<i>Auxenochlorella protothecoides</i> var. <i>acidicola</i> RSa5 (KM016995.1)	0.000
<i>Auxenochlorella protothecoides</i> var. <i>acidicola</i> Cant1 (JF694006.1)	0.000
<i>Auxenochlorella pyrenoidosa</i> PT1 (KX752082.1)	0.019
<i>Auxenochlorella pyrenoidosa</i> HITH6 (MF040793.1)	0.068
<i>Auxenochlorella pyrenoidosa</i> HIT9 (MF040792.1)	0.068
<i>Auxenochlorella symbiontica</i> CCAP 211/61 (FN298932.1)	0.183
<i>Auxenochlorella</i> sp. LEU7 (LC350100.1)	0.211

Tabel 4. Hasil *pairwise distance calculation* dari *Micractinium* spp. (*Pairwise distance calculation result of Micractinium spp. group*).

Isolat	InaCC M172	InaCC M173
InaCC M172		
InaCC M173	0.048	
<i>Micractinium belenophorum</i> SAG 42.98 (AY323837.1)	0.048	0,000
<i>Micractinium belenophorum</i> TP-2008a (FM205879.1)	0.048	0,000
<i>Micractinium reisseri</i> clone:2 (AB506071.1)	0.000	0.048
<i>Micractinium reisseri</i> clone EdL CII MAF (KF887344.1)	0.001	0.049
<i>Micractinium reisseri</i> AT-PSD-19 (AB437244.1)	0.002	0,050
<i>Micractinium simplicissimum</i> CCCryoDEU:297-06 (HQ404895.1)	0.068	0,137
<i>Micractinium pusillum</i> SAG 48.93 (AF364102.1)	0.050	0,022
<i>Micractinium pusillum</i> SAG 13.81 (AF364101.1)	0.050	0,022
<i>Micractinium pusillum</i> CCAP 248/7 (AM231740.1)	0.051	0,023

PEMBAHASAN

Karakter morfologi isolat alga hijau *cocoid* dari Pulau Enggano diperiksa secara berkala untuk melihat pertumbuhan dan siklus hidupnya termasuk perkembangan reproduksinya dalam kondisi kultur. Secara morfologis keempat isolat yang ada yaitu InaCC M146, InaCC M148, InaCC M172, dan InaCC M173 memiliki fenotipik yang serupa dalam hal bentuk, ukuran dan susunan sel, sehingga identifikasi taksonomi pada tingkat spesies sangat sulit untuk dilakukan. Ciri-ciri morfologi yang berhasil diamati menunjukkan bahwa keempat isolat tersebut merupakan famili Chlorellaceae. Menurut Dunker dan Wilhelm (2018), mikroalga berbentuk *cocoid* dan tidak berflagela ini merupakan kelompok besar dari kelas *Trebouxiophyceae* yang masih dapat dibagi lagi menjadi beberapa kelompok lainnya menggunakan beberapa karakteristik pembeda, seperti bentuk koloni, seta, lendir, dan pirenoid. Namun karakteristik tersebut tidak berbeda nyata pada keempat isolat alga hijau *cocoid* dalam penelitian ini. Beberapa studi terbaru menunjukkan bahwa beberapa kelompok mikroalga dapat mengalami perubahan drastis pada ukuran atau bentuk selnya (*morphological plasticity*), misalnya disebabkan oleh disintegrasi koloni serta hilangnya fitur morfologis seperti lendir dan seta. Akibatnya, secara morfologis, karakteristik spesies tersebut dapat menyimpang dari klasifikasi ekofungsionalnya, misalnya karena dipengaruhi oleh interaksinya dengan lingkungan abiotik dan biotik (Dunker dan Wilhelm, 2018; Song *et al.*,

2016).

Klasifikasi berdasarkan konsep spesies biologis (*biological species*) melalui pengamatan reproduksi seksual pada keempat isolat alga hijau *cocoid* juga sulit dilakukan dalam penelitian ini. Sebagian besar spesies dari kelompok Chlorellaceae merupakan organisme haploid dengan mutasi yang cepat diekspresikan sehingga mengakibatkan kurangnya dominansi proses reproduksi seksual antar selnya. Selain itu, karakter genotip yang menentukan variasi morfologi juga tidak dihapuskan selama pembelahan meiosisnya. Lebih lanjut, Coesel dan Krienitz (2008) menambahkan bahwa reproduksi seksual dari sebagian besar spesies alga hijau *cocoid* tidak diketahui.

Oleh karena itu konsep spesies morfologis (*morphological species*) yang mengklasifikasikan berbagai organisme dengan karakter morfologis yang identik atau serupa sebagai satu spesies atau konsep spesies biologis (*biological species*) yang mendefinisikan spesies sebagai kelompok populasi yang dapat melakukan kawin silang (reproduktif seksual) di antara mereka namun terisolasi dari kelompok lain, tidak dapat diterapkan pada isolat alga hijau *cocoid* yang berasal dari Pulau Enggano ini. Sebagai konsekuensinya, hanya konsep spesies filogenetik (*phylogenetic species*) yang dapat digunakan untuk menentukan identitas alga hijau *cocoid* dalam penelitian ini hingga tingkat spesies. Pada dasarnya, konsep *phylogenetic species* ini menggabungkan aspek genealogi dan morfologis

berdasarkan marka molekular tertentu (dalam hal ini 18S rDNA) untuk menentukan posisi suatu organisme atau isolat di antara berbagai taksa lainnya dalam sebuah pohon filogenetik.

Meskipun analisis morfologi tidak dapat digunakan untuk menentukan identitas isolat hingga ke level spesies, namun karakter morfologi yang diperoleh dapat menjadi indikator awal pengelompokan taksonominya pada level yang lebih tinggi (misalnya famili, kelas atau lainnya). Hal ini sangat membantu dalam pemilihan primer yang akan digunakan dalam analisis molekular. Berdasarkan karakter morfologis umumnya, keempat isolat dari Pulau Enggano merupakan alga hijau dari filum *Chlorophyta* yang termasuk dalam kelompok besar *eukariota*. Oleh karenanya, pasangan primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah primer universal (18SF dan 18SR) yang mentarget gen 18S rDNA yang hanya terdapat pada eukariota. Subunit kecil (SSU) dari sekuens gen ribosomal rDNA (18S rDNA) digunakan sebagai penanda dalam studi filogenetik ini, karena 18S rDNA merupakan gen universal dan memainkan peran utama dalam translasi protein. Gen ini berisi daerah sekuens *conserved* (lestari) yang mendukung pengembangan primer universal, dapat menyederhanakan *sequence alignment* dari jarak antar taksa, memiliki salinan dalam genom dan mudah untuk diamplifikasikan selama PCR (Krienitz dan Bock, 2012; W. Luo *et al.*, 2010). Selain itu, analisis sekuens 18S rDNA juga telah digunakan untuk klasifikasi mikroalga kelompok *Chlorophyceae* dan *Trebouxiophyceae* karena datanya yang melimpah sehingga memungkinkan determinasi posisi filogenetik dan identitas taksa yang terkait erat dengan baik (Alemzadeh *et al.*, 2014). Oleh karenanya, gen 18S rDNA masih dapat menjadi alat yang sangat berguna dalam menghasilkan analisis filogenetik beresolusi tinggi dalam hal identifikasi ataupun diferensiasi spesies yang berkerabat dekat, khususnya pada alga hijau *coccoid* dalam penelitian ini.

Hasil analisis molekular dan filogenetik menunjukkan bahwa isolat InaCC M146 teridentifikasi sebagai *Chlorella vulgaris* dan isolat InaCC M148 sebagai *Auxenochlorella protothecoides*. Sedangkan isolat InaCC M172, dan InaCC M173 berafiliasi erat dengan genus *Micractinium* yang terpisah jelas dari genus *Chlorella* dan *Auxenochlorella*. Kedua isolat tersebut masing-masing teridentifikasi sebagai *M. reisseri* dan *M. belenophorum*. Posisi isolat berdasarkan analisis pohon filogenetik ini diperkuat dengan hasil analisis jarak genetik (*genetic distance*), yaitu berkisar antara 0.0–0.3% ($p=0-0.003$). Analisis *pairwise genetic distance* ini digunakan untuk melihat tingkat substitusi transisi dan tranversi melalui banyaknya perbedaan

nukleotida per pasangan sekuens yang dibandingkan. Spesies yang memiliki nilai jarak genetik yang semakin rendah dianggap memiliki hubungan kekerabatan yang semakin dekat. Sebaliknya, spesies yang memiliki jarak genetik yang semakin tinggi, maka hubungan kekerabatannya juga semakin jauh (Dharmayanti, 2011).

Secara taksonomis, keempat spesies yang teridentifikasi termasuk dalam famili *Chlorellaceae* dan kelas *Trebouxiophyceae*. Menurut Krienitz dan Bock (2012), lebih dari 100 spesies dari *Chlorellaceae* telah dideskripsikan dari habitat air tawar, laut, dan tanah, mengikuti deskripsi pola dasar alga hijau *coccoid*. Berdasarkan pohon filogenetik yang dibangun dan analisis jarak genetik (*pairwise genetic distance*), hubungan genetik spesies dalam populasi dan antar populasi dapat dikenali. Dalam studinya, Krienitz *et al.* (2004), telah mengidentifikasi dua garis keturunan terpisah dalam *Chlorellaceae*, yaitu *clade Chlorella* dan *clade Parachlorella*. *Clade Chlorella* memiliki delapan garis keturunan berbeda yang membentuk kelompok atau genera. Genus *Chlorella*, *Auxenochlorella*, dan *Micractinium* termasuk dalam *clade Chlorella* ini. Kedekatan antara tiga genera tersebut dalam *clade Chlorella* dan pemisahannya dengan *clade Parachlorella* juga ditunjukkan pada pohon filogenetik dalam penelitian ini (Gambar 2).

Genus *Chlorella* ditemukan pada tahun 1890 oleh Beijerinck, ketika ia mendeskripsikan dan mengilustrasikan *C. vulgaris* sebagai spesies tipenya. Anggota genus ini dalam konteks tradisional dan juga menurut hasil studi pertama yang menggunakan pendekatan molekular dan filogenetik dianggap dapat mewakili pola dasar dari kelompok alga hijau *coccoid*. Selnya dideskripsikan tidak memiliki selubung berlendir atau hiasan dinding sel lainnya, mengandung kloroplas tunggal dengan pirenoid yang tertutup pati dan dilalui oleh membran tilakoid, seperti morfologi umum yang dapat diamati dari isolat dari Pulau Enggano pada penelitian ini. Studi berbasis filogenetik yang pernah dilakukan pada *Chlorella* menunjukkan bahwa hanya tiga spesies yang benar-benar berbentuk *coccoid* dan termasuk dalam genus ini, yaitu *C. vulgaris*, *C. lobophora* dan *C. sorokiniana* (Champenois *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2010). *C. vulgaris* merupakan mikroorganisme fotosintesis pertama yang diisolasi dan ditumbuhkan dalam kultur murni dari habitat air tawar. Menariknya, dalam penelitian ini, isolat *C. vulgaris* ditemukan pada sampel yang berasal dari perairan laut Pulau Enggano. Hasil penelitian ini mendukung studi Darienko *et al.* (2019), yang juga berhasil mengidentifikasi tiga isolat *C. vulgaris* yang berasal dari ekosistem laut. Spesies jenis ini

diketahui memiliki dinding sel tebal (100–200nm) sebagai karakteristik utamanya. Dinding sel ini memberikan perlindungan mekanis dan kimia, serta kemampuannya beradaptasi dengan lingkungan (Duong, 2016). Lebih lanjut, *C. vulgaris* yang berasal dari laut juga menunjukkan variasi bentuk sel (*morphological plasticity*) yang lebih tinggi dibanding jenis yang ditemukan di air tawar (Darienko *et al.*, 2019).

Dalam sejarah klasifikasinya, *Auxenochlorella protothecoides* pernah diidentifikasi sebagai *Chlorella protothecoides* untuk jangka waktu yang lama dan merupakan salah satu strain mikroalga tertua yang disimpan dalam koleksi kultur. Hal ini karena morfologinya yang sangat sederhana dengan karakter fenotipik yang mirip dengan spesies *Chlorella* spesies pada umumnya. Jang *et al.* (2017), kemudian memisahkan *C. protothecoides* menjadi genus tersendiri (*Auxenochlorella*) berdasarkan senyawa organik yang dimilikinya seperti gula, vitamin, keberadaan pyrenoid dan perbedaan genotipiknya dengan spesies *Chlorella* lainnya.. Hasil BLAST dari sekuens 18S rDNA menunjukkan bahwa isolat InaCC M148 memiliki similaritas yang tinggi (100% *similarity*) dengan *A. protothecoides* var. *acidicola*. Hal ini didukung dengan hasil analisis filogenetik dan *pairwise genetic distance* yang menunjukkan adanya kekerabatan yang dekat antara isolat dari Pulau Enggano ini dengan spesies lain dari genus *Auxenochlorella* (Gambar 2).

Wei Luo *et al.* (2006) membahas konsep genus dan spesies dari *Chlorella* dan *Micractinium*, mereka mengusulkan untuk mempertahankan keduanya sebagai genera yang terpisah karena adanya perbedaan genotipik dan fenotipiknya. Meskipun demikian delimitasi spesies *Micractinium* tidak mudah dilakukan karena hanya ada sedikit karakter morfologi yang dapat digunakan untuk diagnostik dan tidak mudah diamati. *Micractinium* memiliki sel bulat hingga elips yang sebagian besar membentuk koloni. Dinding sel dilengkapi dengan seta yang terbentuk dari protein dan kurangnya serat selulosa, merupakan karakteristik khas *Micractinium*. Menariknya, tidak semua spesies *Micractinium* mampu menghasilkan seta. Seta ini merupakan fitur adaptif yang dapat muncul ketika terdapat cekaman lingkungan seperti adanya zooplankton dalam kultur (Chae *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2010). Secara morfologis isolat InaCC M172, dan InaCC M173 tidak menunjukkan karakteristik khas *Micractinium*. Spesies dari genus *Micractinium* dalam penelitian ini yang tumbuh soliter dalam kondisi kultur memiliki bentuk sel *coccolid*. Keberadaan seta dari spesies ini tidak teramati selama pengamatan menggunakan mikroskop. Secara umum morfologis spesies *Micractinium*

yang kami miliki mirip dengan spesies *Chlorella* lainnya. Isolat tersebut memiliki pirenoid yang serupa. Sedikitnya perbedaan dalam hal morfologis yang tampak antara *Micractinium* dan *Chlorella* mendukung hubungan kekerabatan yang dekat antara keduanya, seperti yang ditunjukkan pada pohon filogenetik dalam studi ini. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa identifikasi menggunakan kriteria morfologis, khususnya mikroskop cahaya saja, tidaklah cukup untuk mengidentifikasi secara akurat isolat alga hijau *coccolid* hingga ke level spesies. Oleh karenanya identifikasi spesies pada kelompok alga ini hanya dapat dilakukan secara tepat dengan pendekatan analisis filogenetik molekuler, misalnya dengan gen 18S rDNA ataupun ITS seperti yang dilakukan oleh Hoshina *et al.* (2010).

KESIMPULAN

Studi ini menunjukkan bahwa identifikasi morfologis menggunakan mikroskop cahaya saja tidak dapat menentukan pengelompokan spesifik alga hijau *coccolid*. Namun analisis filogenetik molekuler menggunakan subunit kecil (SSU) dari gen 18S rDNA berhasil mengidentifikasi keempat isolat ke dalam level spesies alga hijau *coccolid* dengan baik. Primer universal 18S rDNA untuk eukariota (18SF dan 18SR) dapat digunakan secara efektif dan menghasilkan sekuens berkualitas baik untuk mendukung analisis filogenetik molekuler. Setidaknya terdapat empat jenis mikroalga yang berhasil diidentifikasi dari wilayah ekosistem laut Pulau Enggano, yaitu *Chlorella vulgaris*, *Auxenochlorella protothecoides* var. *acidicola*, *Micractinium reisseri*, dan *Micractinium balenophorum*. Hasil penelitian ini dapat menjadi indikator awal bahwa Pulau Enggano memiliki potensi keanekaragaman mikroalga yang tinggi, sehingga perlu dieksplorasi lebih dalam. Studi lanjutan tentang karakter fisiologis masing-masing isolat juga diperlukan untuk melengkapi informasi morfologi dan molekuler untuk keperluan taksonomi dan sistematika alga hijau *coccolid*, serta untuk menggali potensi pemanfaatannya lebih lanjut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Mikroalga yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dan diidentifikasi sebagai bagian dari proyek penelitian DIPA Kedeputian Ilmu Pengetahuan Hayati LIPI.

DAFTAR PUSTAKA

Alemzadeh, E., Haddad, R., Ahmadi, A.R., Hosseini, R. and Moezzi, M., 2014. Identification of *Chlorophyceae* based on 18S rDNA sequences from Persian Gulf. *Iranian Journal of Microbiology*, 6(6), pp. 437–442.

- Anderson, R.A., 2005. *Algal Culturing Techniques*, 1st Edition. Elsevier Academic Press Phycological Society of America. San Diego, CA. pp. 596
- Barsanti, L. and Gualtieri, P., 2014. Algal Culturing. In *Algae*. CRC Press. Italy. pp. 221–266.
- Bellinger, E.G. and Sigeo, D.C., 2015. *Freshwater Algae: Identification, Enumeration and Use as Bioindicators*. 2nd ed. John Wiley and Sons, Ltd. London. pp. 275.
- Bhuvaneshwari, T., Deviram, G.V.N.S., Uma, L. and Prabakaran, D., 2016. Validation of Selected Oscillatoriales from Various Indian Coasts through Phenetic and 16S rDNA Gene. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(7), pp. 944–952.
- Chae, H., Lim, S., Kim, H.S., Choi, H.G., and Kim, J.H., 2019. Morphology and phylogenetic relationships of micractinium (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*) taxa, including three new species from antarctica. *Algae*, 34(4), pp. 267–275.
- Champenois, J., Marfaing, H. and Pierre, R., 2015. Review of the taxonomic revision of *Chlorella* and consequences for its food uses in Europe. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), pp. 1845–1851.
- Coesel, P.F.M. and Krienitz, L., 2008. Diversity and geographic distribution of desmids and other coccoid green algae. *Biodiversity and Conservation*, 17(2), pp. 381–392.
- Darienko, T., Rad-Menéndez, C., Campbell, C. and Pröschold, T., 2019. Are there any true marine *Chlorella* species? Molecular phylogenetic assessment and ecology of marine *Chlorella*-like organisms, including a description of *Droopiella* gen. nov. *Systematics and Biodiversity*, 17(8), pp. 811–829.
- Dharmayanti, I., 2011. Filogenetika molekular: Metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa*, 21(1), pp. 1–10.
- Dunker, S. and Wilhelm, C., 2018. Cell wall structure of coccoid green algae as an important trade-off between biotic interference mechanisms and multidimensional cell growth. *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 1–11.
- Duong, V.T., 2016. *Isolation and evaluation of microalgae strains from The Northern Territory and Queensland - Australia that have adapted to accumulate triacylglycerides and protein as storage*. The University of Queensland. Queensland, Australia. pp. 168.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), pp. 1792–1797.
- Fučíková, K., Leliaert, F., Cooper, E.D., Škaloud, P., D'Hondt, S., De Clerck, O., Gurgel, C.F.D., Lewis, L.A., Lewis, P.O., Lopez-Bautista, J.M., Delwiche, C.F. and Verbruggen, H., 2014. New phylogenetic hypotheses for the core Chlorophyta based on chloroplast sequence data. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2(63), pp. 1–12.
- Hoshina, R., Iwataki, M. and Imamura, N., 2010. *Chlorella variabilis* and *Micractinium reisseri* sp. nov. (*Chlorellaceae*, *Trebouxiophyceae*): Redescription of the endosymbiotic green algae of *Paramecium bursaria* (*Peniculia*, *Oligohymenophorea*) in the 120th year. *Phycological research*, 58(3), pp.188–201.
- Jang, H.S., Kang, N.S., Kim, K.M., Jeon, B.H., Park, J.S. and Hong, J.W., 2017. Description and application of a marine microalga *Auxenochlorella protothecoides* isolated from Ulleung-do. *Journal of Life Sciences*, 27(10), pp. 1152–1160.
- Kaštovský, J., Fucíková, K., Veselá, J., Carias, C.B. and Vegas-Vilarrúbia, T., 2019. Algae. In *Biodiversity of Pantepui: The Pristine "Lost World" of the Neotropical Guiana Highlands*. Academic Press Elsevier. San Diego, CA. pp. 470.
- Krienitz, L. and Bock, C., 2012. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. *Hydrobiologia*, 698, pp. 295–326.
- Krienitz, L., Hegewald, E.H., Hepperle, D., Huss, V.A.R., Rohr, T. and Wolf, M., 2004. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*). *Phycologia*, 43(5), pp. 529–542.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), pp. 1547–1549.
- Leliaert, F., Tronholm, A., Lemieux, C., Turmel, M., Depriest, M.S., Bhattacharya, D., Karol, K.G., Fredericq, S., Zechman, F.W. and Lopez-Bautista, J.M., 2016. Chloroplast phylogenomic analyses reveal the deepest-branching lineage of the *Chlorophyta*, *Palmophyllophyceae* class. nov. *Scientific Reports*, 6, pp. 1–13.
- Lewis, L.A., and McCourt, R.M., 2004. Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany*, 91(10) pp. 1535–1556.
- Luo, W., Pröschold, T., Bock, C. and Krienitz, L., 2010. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (*Chlorophyta*,

- Trebouxiophyceae*). *Plant Biology*, 12(3), pp. 545–553.
- Luo, Wei, Pflugmacher, S., Pröschold, T., Walz, N. and Krienitz, L., 2006. Genotype versus Phenotype Variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, *Trebouxiophyceae*). *Protist*, 157(3), pp. 315–333.
- Naselli-Flores, L. and Barone, R., 2009. *Green Algae*. Encyclopedia of Inland Waters. Academic Press. New York, USA. pp. 166–173.
- Nishimaki, T. and Sato, K., 2019. An Extension of the Kimura Two-Parameter Model to the Natural Evolutionary Process. *Journal of Molecular Evolution*, 87(1), pp. 60–67.
- Shubert, E., and Gärtner, G., 2015. Nonmotile Coccoid and Colonial Green Algae. In: Wehr, J.D., Sheath, R.G. and Kociole, J.P. eds. *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. 2nd Ed. Academic Press. New York, US. pp. 315–373.
- Song, H., Hu, Y., Zhu, H., Wang, Q., Liu, G. and Hu, Z., 2016. Three novel species of coccoid green algae within the *Watanabea* clade (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), pp. 5465–5477.
- Soylu, E.N. and Gönülol, A., 2012. Morphological and 18S rDNA analysis of coccoid green algae isolated from lakes of Kızılırmak Delta. *Turkish Journal of Biology*, 36, pp. 247–254.
- Tale, M., Ghosh, S., Kapadnis, B., and Kale, S., 2014. Isolation and characterization of microalgae for biodiesel production from Nisargruna biogas plant effluent. *Bioresource Technology*, 169, pp. 328–335.
- Wang, Y., Tian, R.M., Gao, Z. M., Bougouffa, S. and Qian, P.Y., 2014. Optimal eukaryotic 18S and universal 16S/18S ribosomal RNA primers and their application in a study of symbiosis. *PLoS ONE*, 9(3), pp. 1–11.