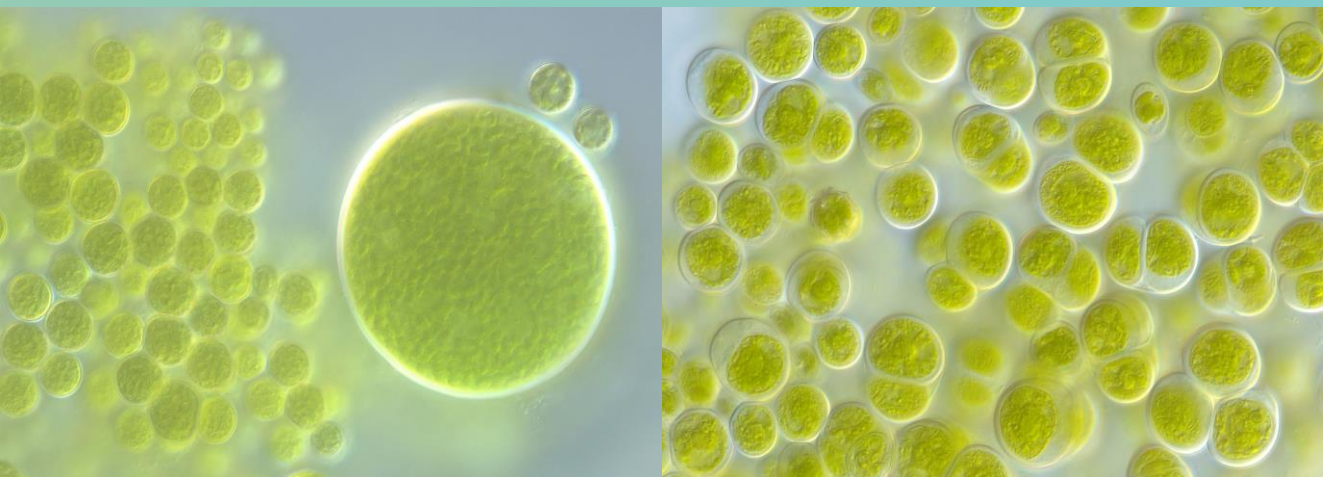
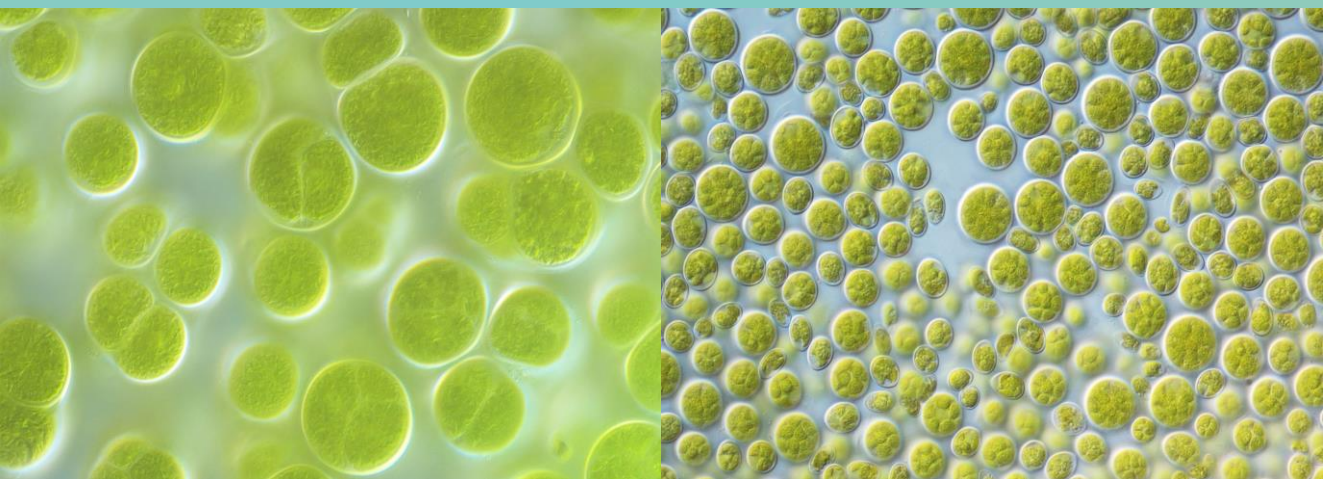


А.Д. Темралеева, Е.В. Минчева,
Ю.С. Букин, А.М. Андреева



СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ, КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ (CHLOROPHYTA)



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ
ПОЧВОВЕДЕНИЯ РАН**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ СО РАН**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД ИМ. И.Д. ПАПАНИНА РАН**

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ,
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ
ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ (CHLOROPHYTA)**

2014

УДК 582.263:(58.083+577.21+57.065)

ББК 28.591

Т-32

Ответственный редактор: к.б.н. А.Д. Темралеева

Рецензенты: д.б.н. В.В. Алешин (Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова)

д.б.н. А.А. Гончаров (Биолого-почвенный институт ДВО РАН)

Темралеева А.Д., Минчева Е.В., Букин Ю.С., Андреева А.М. Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (Chlorophyta). – Кострома: Костромской печатный дом, 2014. – 215 с.

ISBN 978-5-91806-016-2

В данной монографии описаны современные методы выделения, культивирования и определения зеленых водорослей из различных биотопов. Затрагиваются теоретические вопросы концепции вида у зеленых водорослей, роли традиционных морфологических методов и современных генетических подходов. Подробно описана процедура молекулярно-филогенетического анализа данных в виде протоколов и пошаговых инструкций с конкретными примерами. Рекомендуются научным сотрудникам, аспирантам и студентам, интересующимся проблемами биоразнообразия, экологии и молекулярной систематики зеленых водорослей.

Библиограф. 252 назв., рис. 69, табл. 25.

© Коллектив авторов, 2014



ДИА•М
современная лаборатория

© Фотографии зеленых микроводорослей Темралеевой А.Д.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	5
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
РАЗДЕЛ I. ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ	7
Глава 1. Методы сбора и выделения зеленых водорослей из природных образцов (А.Д. Темралеева, Е.В. Минчева)	7
1.1 Сбор водорослей из различных сред обитания	7
1.1.1 Сбор планктонных и бентосных водорослей	7
1.1.2 Сбор почвенных и аэрофильных водорослей	11
1.1.3 Сбор водорослей из экстремальных местообитаний	13
1.2 Получение накопительных смешанных культур	13
1.2.1 Чашечные культуры со «стеклами обрастания»	14
1.2.2 Водные и водно-почвенные культуры	15
1.2.3 Жидкие и агаризованные культуры	16
Глава 2. Методы получения альгологически чистых и аксеничных культур водорослей (А.Д. Темралеева)	20
2.1 Посев штрихом	20
2.2 Изоляция с помощью микропипетки	20
2.3 Метод последовательного разведения	21
2.4 Использование фототаксиса	22
2.5 Очистка с помощью антибиотиков	23
РАЗДЕЛ II. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ	31
Глава 3. Традиционный ботанический подход к описанию видового разнообразия водорослей vs. современной молекулярной идентификации (А.Д. Темралеева)	31
3.1 Концепция вида зеленых водорослей	31
3.2 Диаκριтические морфологические признаки в современной систематике водорослей	33
Глава 4. Основы молекулярной идентификации (Минчева Е.В., А.Д. Темралеева)	56
4.1 Методы молекулярной идентификации: преимущества и недостатки, проблемы и пути решения	56
4.2 Выбор молекулярно-генетического маркера	60
4.3 Работа с международными генетическими базами данных	64
Глава 5. Этапы ПЦР-анализа (Е.В. Минчева, А.Д. Темралеева, А.М. Андреева)	89
5.1 Выделение тотальной ДНК	89
5.2 Амплификация фрагментов ДНК с помощью ПЦР	94
5.2.1 Принцип метода ПЦР и ее виды	94

5.2.2 Оборудование, реактивы и пластик для ПЦР	97
5.2.3 Подбор праймеров для ПЦР и подготовка их к работе	106
5.2.4 Оптимизация параметров ПЦР	109
5.3 Электрофоретическая детекция ДНК в агарозном геле	110
5.4. Электрофоретическая детекция ДНК в полиакриламидном геле	115
5.5 Выделение ПЦР-продукта из геля и подготовка к секвенированию	121
5.6 Правила организации и работы в ПЦР-лаборатории	123
РАЗДЕЛ III. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ	126
Глава 6. Идентификация видов с помощью анализа генетических расстояний: дистанционный подход (Ю.С. Букин)	126
6.1 Выравнивание нуклеотидных последовательностей	128
6.2 Модели расчета генетических дистанций	137
6.3 Методы кластеризации последовательностей на основе генетических дистанций	148
6.3.1 Дистанционные методы кластеризации	149
6.3.2 Дискретные методы кластеризации	154
6.3.3 Статистическая оценка результатов кластеризации	158
6.3.4 Комплексные программы для филогенетического анализа	169
6.4 Интерпретация результатов филогенетического анализа при идентификации зеленых водорослей	170
Глава 7. Разделение видов с помощью ITS2-маркера: CBC-подход (А.Д. Темралева)	175
7.1 ITS2: структура и функции	175
7.2 CBC-концепция и биологическая концепция вида	177
7.3 Программное обеспечение для предсказания вторичной структуры ITS2 и поиска CBC	180
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	187
ПРИЛОЖЕНИЯ	188
<i>Приложение 1. Рецепты приготовления сред для культивирования зеленых водорослей</i>	188
<i>Приложение 2. Молекулярные маркеры и праймеры для ПЦР</i>	198
<i>Приложение 3. Протоколы приготовления реактивов и растворов для ПЦР-анализа</i>	201
<i>Приложение 4. Проблемы при амплификации ДНК и пути решения</i>	205
<i>Приложение 5. Молекулярно-биологические базы данных и другие интернет-ресурсы</i>	209

ПРЕДИСЛОВИЕ

Данная монография продолжает серию работ, изданных по инициативе Центра коллективного пользования «Молекулярные технологии» (с 2014 г. лаборатории экологической биохимии) ИБВВ РАН на основе результатов 6-й и 7-й научно-практических школ по проблемам молекулярной экологии и эволюции. Она предназначена для научных сотрудников, аспирантов и студентов, интересующихся проблемами биоразнообразия, экологии и молекулярной систематики зеленых водорослей. В книге затрагиваются теоретические вопросы концепции вида у зеленых водорослей, роли морфологических методов и молекулярно-генетических подходов, используемых в современной альгологии. Подробно описаны практические методы, которые используют авторы, от этапа сбора проб, выделения водорослей в культуру до их морфологической и молекулярно-генетической идентификации. Основное внимание уделено основам современной диагностики водорослей, выбору молекулярных маркеров, протоколам ПЦР-анализа, включая стадии выделения тотальной ДНК, амплификации фрагментов генов, электрофоретической детекции ампликонов и подготовки ПЦР-продукта к секвенированию. Процедура молекулярно-филогенетического анализа данных показана на конкретных примерах последовательностей генов зеленых водорослей (18S рДНК и *rbcL*) с пошаговыми инструкциями. Освещен как дистанционный подход разделения таксонов, так и *CBC*-подход. Объединена в виде приложений информация о культуральных средах для водорослей, используемых праймерах, интернет-ресурсах по альгологическим коллекциям, базам данных и журналам, программному обеспечению для анализа молекулярных данных и др. Особый акцент сделан на проблемы, возникающие у исследователя при использовании современных методов идентификации зеленых водорослей, и пути их решения.

Авторы выражают искреннюю благодарность своим коллегам (коллективы сотрудников ИФХиБПП РАН, ЛИН СО РАН, ИБВВ РАН) за ценные консультации и советы при подготовке книги, а также НИИ биологии ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет», НИПЧИ Сибири и ДВ Роспотребнадзора и лично Ренату Викторовичу Адельшину за предоставленные фотографии макрофитов озера Байкал. Неоценимую помощь при написании книги оказали ее рецензенты: Владимир Вениаминович Алешин и Андрей Анатольевич Гончаров. Особую признательность выражаем Игорю Юрьевичу Костинову за помощь и поддержку научных интересов.

От лица всех авторов,

д.б.н., зав. лаб. экологической биохимии ИБВВ РАН

А.М. Андреева

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

A(A), Г(G), Т(T), У(U), Ц(C) – аденин, гуанин, тимин, урацил, цитозин
CBC (*Compensatory Base Change*) – полная компенсаторная замена
dH₂O – дистиллированная вода
F81 – модель Фельзенштейна
F84 – модифицированная модель Кимуры K80
hCBC (*hemiCBC*) – полукompенсаторная замена
HEPES – 4-(2-оксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
HKY – модель Хасигавы-Кишино-Яно
JC69 – модель Джукса-Кантора
K80 – двухпараметрическая модель Кимуры
K81 – обобщенная модель Кимуры
MES – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота
ML (*Maximum Likelihood*) – метод максимального правдоподобия
MP (*Maximum Parsimony*) – метод максимальной экономии
Na₂ЭДТА – динатриевая соль ЭДТА
NJ (*Neighbor-Joining*) – метод присоединения соседей
T92 – модель Тамуры
TN93 – модель Тамуры-Нея
TEMED – N, N, N', N'- тетраметилэтилендиамин
TE-буфер – трис-ЭДТА-буфер
БСА – бычий сывороточный альбумин
БФС – бромфеноловый синий
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ДМСО – диметилсульфоксид
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазы – дезоксирибонуклеазы
дНТФ – дезоксинуклеозидтрифосфаты
ДСН (*SDS*) – додецилсульфат натрия
кДНК – комплементарная ДНК
КЦ – ксиленцианол
ПААГ – полиакриламидный гель
п.н. – пар нуклеотидов
ПЦР – полимеразная цепная реакция
рДНК – рибосомная ДНК
РНК – рибонуклеиновая кислота
РНКазы – рибонуклеазы
ТА-буфер – трис-ацетатный буфер
ТБЕ-буфер (*TBE*) – трис-боратный буфер с ЭДТА
ТСБ – трис-солевой буфер
ЦТАБ (*CTAB*) – цетилтриметиламмоний бромид
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

РАЗДЕЛ I. ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Глава 1. Методы сбора и выделения зеленых водорослей из природных образцов (А.Д. Темралева, Е.В. Минчева)

В главе собраны самые актуальные и популярные методы сбора зеленых водорослей из пресноводных и почвенных биотопов, в том числе и из экстремальных местообитаний. Подробно описаны и схематично проиллюстрированы методики получения накопительных смешанных культур. Приведены условия культивирования и фиксации альгологических проб. Сформулирован ряд общих рекомендаций по методам сбора и выделения зеленых водорослей из природных образцов.

1.1 Сбор зеленых водорослей из различных сред обитания

Водоросли широко распространены в любых экосистемах мира: пресноводных, морских, почвенных и др. В зависимости от местообитания выделяют следующие группы водорослей: планктонные, бентосные, аэрофильные, почвенные, литофильные, водоросли экстремальных местообитаний (горячих источников, снега, льда и т.д.). Исходя из образа жизни, выделяют водоросли в симбиотических ассоциациях (с грибами, простейшими, мхами, растениями и др.) и свободноживущие. Приемы и методы сбора различных экологических групп водорослей отличаются. В данной главе основное внимание будет уделено описанию методик сбора водных проб фитопланктона, бентоса, перифитона, а также микроводорослей из почвенных и аэрофильных субстратов.

1.1.1 Сбор планктонных и бентосных водорослей

Под фитопланктоном обычно понимают совокупность свободноплавающих в толще воды мелких, преимущественно микроскопических водорослей (Садчиков, 2003). Выбор метода пробоотбора фитопланктона зависит от типа водоема, степени развития водорослей и их размеров, задач исследования, доступности оборудования и т.д. С целью изучения видового состава фитопланктона часто используют методы прямого микроскопирования. При интенсивном размножении водорослей пробы не нуждаются в предварительном концентрировании. Наиболее надежным методом отбора проб фитопланктона считается батометрический метод, который позволяет учитывать водоросли всех размерных групп, правда, вероятность выявления наиболее редких видов при просмотре под микроскопом ограниченного числа особей значительно меньше, чем при микроскопировании проб, отобранных планктонной сетью (Коровин, 2007). Широкое применение в практике получил батометр системы Рутнера (рис. 1.1, а). Основная его часть – цилиндр, изготовленный из

металла или плексигласа, емкостью 1-5 л. Прибор снабжен верхней и нижней крышками, плотно закрывающими цилиндр. Под воду батометр опускают с открытыми крышками, при достижении требуемой глубины в результате сильного встряхивания веревки крышки закрывают отверстия цилиндра, который в закрытом виде извлекают на поверхность. Заключенную в цилиндре воду через боковой патрубков, снабженный краном, сливают в приготовленный сосуд. При изучении фитопланктона поверхностных слоев воды пробы отбирают, зачерпывая воду в сосуд определенного объема. Для работы на пресных водоемах чаще всего используют 1-2 литровые батометры, а в морях – 2 и 5 литровые (Садчиков, 2003). В водоемах с незначительным развитием водорослей желательно отбирать пробы объемом не менее 1 л параллельно с сетевыми сборами, позволяющими улавливать малочисленные, сравнительно крупные объекты. В водоемах с интенсивным развитием фитопланктона объем пробы можно уменьшить до 0.5 и даже до 0.25 л (Вассер и др., 1989).

Для обнаружения малочисленных видов планктонных водорослей проводят качественный лов планктона. Для этих целей используют метод предварительного концентрирования фитопланктона путем фильтрации через планктонные сети различной конструкции. Наиболее просты и удобны в изготовлении планктонные сети конической формы (рис. 1.1, б). Для их изготовления лучше использовать самое мелкое (не ниже №70) мельничное сито из шелковой или капроновой нити. Качественная планктонная сеть представляет собой конический мешок из газа, который с помощью полосок прочной ткани сверху пришит к металлическому кольцу, а снизу – к стаканчику. Стаканчик может открываться, что позволяет слить собранную сетью пробу вместе с порцией воды в посуду, в которой она затем фиксируется или доставляется в живом виде в лабораторию.

При сборе планктона поверхностных слоев воды планктонную сеть опускают в воду так, чтобы верхнее отверстие сети находилось на расстоянии 5-10 см над ее поверхностью. Литровой кружкой черпают воду из поверхностного слоя (до 15-20 см глубины) и выливают ее в сеть, отфильтровывая таким образом 50-100 л воды. На крупных водоемах планктонные пробы отбирают с лодки. При этом необходимо тянуть планктонную сеть на тонкой веревке за движущейся лодкой в течение 5-10 мин. На небольших водоемах планктонные пробы можно собирать с берега, постепенно заходя в воду, осторожно черпая воду кружкой впереди себя и фильтруя ее через сеть или забрасывая сеть на тонкой веревке в воду и осторожно вытягивая ее. Закончив сбор, планктонную сеть прополаскивают, чтобы отмыть водоросли, задержавшиеся на внутренней поверхности. Сконцентрированную таким образом пробу планктона, находящуюся в стаканчике планктонной сети, сливают через

выводную трубку в заранее приготовленную емкость (Вассер и др., 1989). Чтобы избежать повреждений сети, ее нельзя класть ни на какие шершавые поверхности. Хранить сеть нужно в специально отведенном месте, лучше всего – в подвешенном состоянии (если груз не открепляется, он должен лежать на полу).

Сгущение количественных проб фитопланктона можно осуществлять двумя методами: осадочным и фильтрационным. Сгущение проб осадочным методом проводят после их предварительной фиксации и отстаивания в темном месте в течение 15-20 дней путем отсасывания среднего слоя воды с помощью стеклянной трубки, один конец которой затянут мельничным ситом №77 в несколько слоев, а второй соединен с резиновым шлангом. Отсасывание проводят очень медленно и осторожно, чтобы не допустить нарушения осадка и засасывания поверхностного слоя пробы. Сгущенную таким способом пробу взбалтывают и, замерив ее объем, переносят в сосуд меньшего размера. При сгущении проб фильтрационным методом используют «предварительные», а при необходимости (если размеры планктонных организмов очень малы) бактериальные фильтры. При этом пробы воды предварительно не фиксируют, и фитопланктон изучают в живом состоянии. Для длительного хранения фильтр с осадком фиксируют в определенном объеме жидкости (Вассер и др., 1989).

К фитобентосу относят водоросли, жизнь которых тесно связана с дном водоема (Садчиков, 2003). Подавляющее большинство видов бентосных водорослей чаще всего прочно прикреплены к субстрату с помощью ризоидов и имеют относительно небольшие размеры (до 10-25 см). Существующие методы отбора фитобентоса предусматривают сбор водорослей с донных грунтов и отложений, в их толще (глубиной до 1 см) и в 2-3-сантиметровом придонном слое воды (Топачевский, Масюк, 1984). На мелководьях (до 0.5-1 м) сбор фитобентоса осуществляется с помощью опускания на дно пробирки или сифона (Садчиков, 2003). На глубине до 1.5-3 м сбор донных макрофитов можно проводить с помощью щипцов Рубцова. На мягком грунте сбор фитобентоса можно проводить с помощью дночерпателя Петерсена.

Для извлечения растений со дна при глубине воды не превышающей 2-3 м используются водяные грабельки трех- и шести зубовые (рис. 1.3, в). Работа с грабельками с лодки производится или при неподвижном ее состоянии, или на очень тихом ходу. Удобнее работать с кормы лодки (Абакумов, 1983). Для добывания донной растительности с глубин, превышающих 2-3 метра, применяются инструменты, привязывающиеся к длинной веревке, с помощью которой их можно волочить по дну. Длина веревки при этом должна в несколько раз превышать глубину, на которой производится работа (не менее 5-6 раз):

- якорьки-кошки – это небольшого размера якорьки (10-15 см в высоту вместе с петлей) с различным числом зубцов (3-10). Зубцы у них могут быть разной длины. Длинные зубцы должны чередоваться с короткими. Для лучшего удержания водорослей на якорьке можно намотать на зубцы проволоку или веревку (рис. 1.3, *з*).

- двусторонние водяные грабли состоят из железной планки длиной 30-35 см, толщиной 1-1.5 см с петлями на концах для привязывания веревки (рис. 1.3, *д*). Можно использовать обыкновенные железные грабли (лучше с витыми зубцами), связав по двое со стороны планок.

Для добывания водорослей со дна на больших глубинах можно также воспользоваться мотком колючей проволоки с грузом, который волочат по дну на веревке, а также драгами различных конструкций:

- драга Раменского имеет овальной формы раму с мешком (рис. 1.3, *е*). Рама изготавливается из железной полосы шириной 5-7 см.

- четырехугольная драга с зубцами имеет прямоугольную раму, сделанную из полосы железа шириной 2-3 см и толщиной около 1-1.5 см (рис. 1.3, *ж*) (Абакумов, 1983).

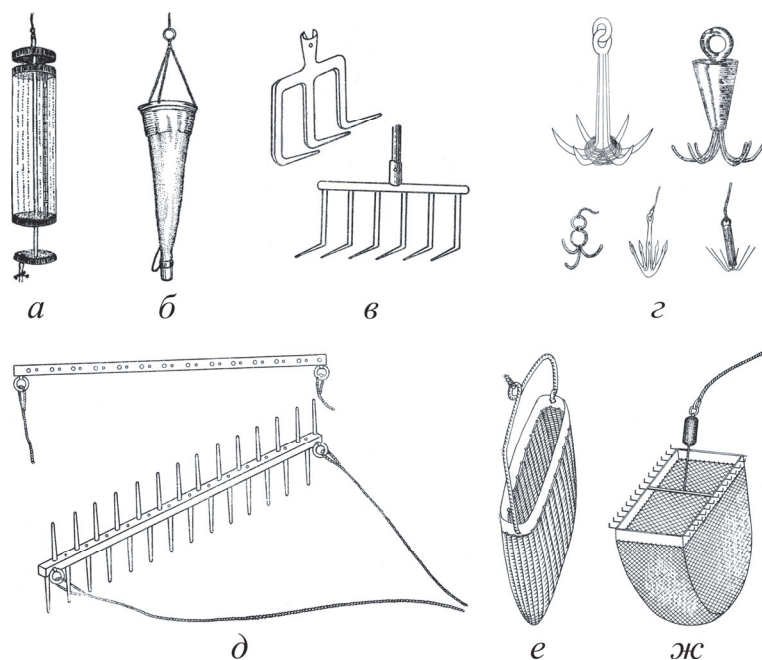


Рис. 1.1. Инструменты для сбора планктонных и бентосных водорослей.

Примечание. *а* – батометр Рутнера, *б* – планктонная сеть Апштейна, *в* – водяные грабельки, *г* – якорьки-кошки, *д* – водяные грабли, *е* – драга Раменского, *ж* – четырехугольная драга с зубцами.

Пробы бентосных водорослей могут быть собраны также с помощью водолазных погружений. На рис. 1.2 представлено фото эндемичной зеленой водоросли рода *Draparnaldioides*, выполненное во время водолазного погружения на дно оз. Байкал.

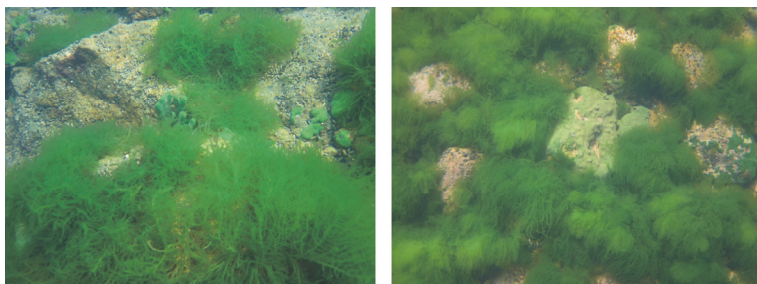


Рис. 1.2. Фотографии зеленой водоросли рода *Draparnaldioides* на дне оз. Байкал.

Примечание. Автор Р.В. Адельшин

Пробы бентосных водорослей вместе с субстратом, собранные в результате водолазного погружения, перекладывают в тазы с водой на борту экспедиционного судна. Отобранные с помощью описанных инструментов и методов пробы фитобентоса промывают через капроновое сито, водоросли аккуратно с помощью ножа отделяют от камней. Пробы фитопланктона концентрируют, а затем переносят в емкости для хранения. Собранный материал лучше изучать в живом состоянии и только при необходимости фиксировать 4% формалином. Для дальнейшего молекулярно-генетического анализа пробы водорослей заливают 80% этанолом (пробы необходимо перефиксировать минимум еще один раз). Для сохранения зеленой окраски водорослей в пробу можно добавить раствор медного купороса до появления голубой окраски фиксирующей жидкости (Малый практикум, 1976). Если водоросли покрыты слоем слизи, необходимо, чтобы объем фиксирующего раствора был в 2 раза больше объема водорослей (Ижболдина, 2007). Герметично закрытые фиксированные пробы хранят в темном месте. Живой материал используют для микроскопирования или дальнейшего культивирования. Каждая проба снабжается этикеткой, на которой указывают номер пробы, дату и место отбора, орудие лова, фамилию сборщика. Эти же данные параллельно записывают в полевом дневнике.

1.1.2 Сбор почвенных и аэрофильных зеленых водорослей

Почвенные водоросли представляют собой совокупность наземных, водно-наземных и собственно почвенных водорослей (Штина, Голлербах, 1976), в то время как для аэрофильных водорослей основной жизненной средой является поверхность внепочвенных твердых субстратов: скалы,

камни, кора деревьев, стены домов и т.д. (Водоросли, 1989). Практически с момента выхода в свет классического труда М.М. Голлербаха и Э.А. Штиной «Почвенные водоросли» (1969) на протяжении пяти десятилетий в абсолютном большинстве публикаций почвенных альгологов фраза: «Сбор и обработку материала проводили по общепринятым в почвенной альгологии методам» без дальнейшей детализации этих методов, стала клише. Однако, по справедливому замечанию И.Ю. Костікова с соавт. (2001) «М.М. Голлербах и Э.А. Штина в этом труде не предложили «общепринятых методов», а сделали обзор различных вариантов методик сбора и обработки почвенно-альгологических проб». Тем не менее, следует отметить, что в практике почвенно-альгологических исследований существуют некоторые общие принципы и приемы. Так, в случае массовых видимых разрастаний зеленых водорослей на поверхности почвы или аэрофильных субстратах в форме пятен «цветения», налетов, корочек и т.д. они доступны для непосредственного сбора в стерильные контейнеры, пробирки или пакеты. Однако чаще производится отбор почвы или аэрофильного субстрата стерильным ножом, лопаткой или пробоотборником. Инструмент стерилизуется непосредственно в полевых условиях: протирается 96% спиртом и обжигается в пламени спиртовки либо многократно втыкается в исследуемую почву. Отобранные пробы используются для получения смешанных накопительных культур в течение 1-2 суток с момента отбора. Для длительного хранения образцы почв или аэрофильных субстратов высушивают в стерильных условиях до воздушно-сухого состояния и сохраняют для дальнейшей обработки до 6 месяцев (Костіков та ін., 2001). Кроме того, исследователь может осуществлять отбор индивидуальных проб или смешанных образцов. Индивидуальную пробу отбирают, как правило, при наличии на почве локальных макроскопических разрастаний зеленых водорослей. Она охватывает небольшую глубину (преимущественно лишь 1-2 мм) и имеет незначительную площадь (до 10 см²). Индивидуальный сбор позволяет выявить только виды, способные к «цветению» почвы. Смешанную почвенную пробу отбирают, как правило, при проведении флористических и эколого-ценотических исследований. Отбор проводят в пределах одного фитоценоза с пробного участка, размер которого колеблется от 5-30 м² в травянистых фитоценозах, до 100-2500 м² в лесных фитоценозах (Костіков та ін., 2001). Смешанная проба состоит из 5-50 индивидуальных проб, площадь каждой из которых составляет от 1 до 25 см², при этом общая площадь всех индивидуальных проб, составляющих смешанную пробу, в работах разных исследователей колеблется в пределах 10-400 см². По данным И.Ю. Костікова с соавт. (2001) смешанные пробы, состоящие не менее чем из пяти индивидуальных и имеющие суммарную площадь большую чем 30-40

см², пригодны для сравнений, если точки отбора индивидуальных проб выбирались случайно. Если индивидуальные пробы отбирались не случайно (например, или только в фитогенном поле определенных растений, или на участках без подстилки, или в межкроновых пространствах и т.д.), то смешанная проба приобретает черты индивидуальной, что уменьшает возможности ее использования в сравнительно-флористическом анализе. Необходимо подчеркнуть, что вследствие большого количества вариантов отбора образцов почв и аэрофильных субстратов, необходимо подробно описывать процедуру сбора.

1.1.3 Сбор водорослей из экстремальных местообитаний

Сбор водорослей из экстремальных местообитаний (горячих источников, снега, льда, пещер и др.) осуществляется вместе с субстратом стерильными инструментами (ножом, совком, черпаком и др.) в одноразовые подписанные пакеты, контейнеры или пробирки. До культивирования водорослей желательно соблюдать условия хранения проб максимально близкие к естественным по температуре и освещенности.

1.2 Получение накопительных смешанных культур

Первым этапом обработки любого субстрата, содержащего зеленые водоросли, является получение накопительных смешанных культур. Этот этап объединяет приемы стимуляции роста и размножения водорослей следующими наиболее распространенными методами: чашечные культуры со «стеклами обрастания», водно-почвенные культуры и культуры на жидких и твердых питательных средах. Необходимо отметить, что смешанные культуры малопригодны для таксономической идентификации большинства почвенных зеленых водорослей монадной, коккоидной, сарциноидной и гетеротрихальной организации, т.к. существует высокий риск неправильного определения отдельных стадий развития одного и того же вида водоросли как нескольких самостоятельных видов. Например, представители рода *Muriella* отличаются от рода *Bracteacoccus* отсутствием подвижных репродуктивных стадий. Однако вегетативные клетки обоих родов в смешанных культурах разделить практически невозможно. Отличительной особенностью рода *Lobosphaeropsis* является продолжительный период клеточного деления. Неделяющиеся клетки данной водоросли напоминают вегетативные клетки водорослей рода *Chlorella*, а делящиеся, содержащие несколько хлоропластов и пиреноидов, – водоросли рода *Planktosphaerella*. В свою очередь представители рода *Planktosphaerella* сходны с видами рода *Planktosphaeria*, от которого отличается только отсутствием подвижных

репродуктивных клеток. Еще одним примером может служить близкая морфологическая характеристика видов родов *Auxenochlorella* и *Mychonastes*, различие между которыми заключается в фототрофном росте, способности синтезировать вторичные каротиноиды и отсутствии потребности в тиамине и аммонийном азоте у *Mychonastes*. Согласно Костікову с соавт. (2001) точность определения водорослей из смешанных почвенных культур на родовом уровне составляет 80-90%, тогда как на видовом – лишь 20-40%. Следовательно, получение смешанных культур является только первым шагом в культивировании водорослей, за которым обязательно идет очистка культур и доведение их до альгологически чистых штаммов с последующей таксономической диагностикой.

1.2.1 Чашечные культуры со «стеклами обрастания»

Метод почвенных или чашечных культур и различные его модификации (Bristol, 1920; Lund, 1945, 1947; Костіков та ін., 2001; Голлербах, Штина, 1969; Кузяхметов, Дубовик, 2001) является наиболее распространенным методом в почвенно-альгологической практике благодаря своей простоте и максимальной близости к естественным условиям среды (рис. 1.3, а). Для приготовления чашечной культуры необходимо:

1) поместить в чашку Петри 20-40 г хорошо перемешанной свежесобранной или воздушно-сухой пробы почвы,

2) увлажнить стерильной дистиллированной водой (dH_2O) или жидкой питательной средой до 60-80% от полной влагоемкости,

3) на поверхность увлажненной почвы поместить 3-5 покровных стекол, осторожно прижимая их почве для образования так называемых влажных камер. Площадь влажных камер должна составлять 40-60% от площади стекла. В этих полостях благодаря повышенной влажности и аэрации обычно наблюдается ускоренное развитие водорослей.

4) инкубировать чашку Петри в культуральном боксе при стандартных условиях.

Условия культивирования, при которых водоросли выращивают при температуре $20 \pm 3^\circ C$, периодическом освещении с интенсивностью 1800-3000 Лк ($54-90 \mu\text{моль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ для люминесцентных ламп типа FLUORA или PLANT; $25-42 \mu\text{моль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ для белых люминесцентных ламп) и 12-ти или 16-ти часовом световом дне, в почвенной альгологии называют стандартными (Bold, 1970; Deason, 1976). Через несколько суток и далее с периодичностью раз в несколько дней стекла просматриваются под микроскопом. Влажность почвы в чашке поддерживается периодическим добавлением стерильной воды. Все инструменты, покровные и предметные стекла, стеклянная культуральная посуда предварительно

стерилизуются. Весь процесс обработки чашечной культуры длится 1-3 месяца и более.

1.2.2 Водные и водно-почвенные культуры

Особенностью водных культур (рис. 1.3, б) является высокое соотношение жидкой фазы к твердому субстрату – почве (Костіков та ін., 2001). Для приготовления водной культуры необходимо:

1) *поместить 1-2 г свежесобранной или воздушно-сухой почвы в колбу на 250 мл и залить 100 мл стерильной dH_2O ,*

2) *колбу закрыть ватной пробкой и инкубировать в культуральном боксе при стандартных условиях.*

При появлении визуально заметных зеленых обрастаний и пленок, их отбирают, соскабливая микробиологической петлей, и готовят препараты для микроскопирования. Все инструменты, предметные и покровные стекла, стеклянная культуральная посуда предварительно стерилизуются. Весь процесс обработки культуры длится 1-3 месяца и более.

Несомненным достоинством данного способа является низкое содержание органического вещества, что предотвращает сильное развитие почвенных гетеротрофов (грибов, бактерий и простейших). Однако к недостаткам можно отнести преобладание гидрофильных и олиготрофных видов водорослей, растущих на бедных питательными веществами субстратах, и недоразвитие истинно почвенной альгофлоры. Поэтому большую популярность имеет метод водно-почвенных культур (рис. 1.3, в), при приготовлении которых одна часть почвы заливается тремя частями воды или питательной среды (Костіков та ін., 2001). Для приготовления водно-почвенной культуры необходимо:

1) *внести в пластиковые культуральные пробирки 1 г свежей или воздушно-сухой почвы и 3 мл стерильной dH_2O ,*

2) *закрыть пробирки вентилируемыми крышками и инкубировать в культуральном боксе при стандартных условиях.*

При появлении визуально заметных зеленых обрастаний и пленок, их отбирают, соскабливая микробиологической петлей, и готовят препараты для микроскопирования. Все необходимые инструменты и посуда предварительно стерилизуются. Весь процесс обработки культуры длится 1-3 месяца и более. Жидкая фаза водно-почвенной культуры в отличие от водной культуры содержит большое количество клеток водорослей и является достаточно концентрированной в отношении растворенного органического вещества, макро- и микроэлементов. Поэтому с одной стороны она более близка к почвенному раствору по химическому составу, что позволяет выделить различные группы зеленых водорослей. С другой стороны наряду с водорослями в этом насыщенном

растворе быстро развиваются почвенные гетеротрофы, от которых затем необходимо избавляться для получения альгологически чистой культуры.

1.2.3 Жидкие и агаризованные культуры

Метод жидких культур (рис. 1.3, б) заключается в помещении почвенного образца в жидкую питательную среду, выбор которой осуществляется в соответствии с экофизиологическими потребностями исследуемой группы водорослей. Для выделения максимального разнообразия зеленых водорослей используют широкий спектр сред и добавок (см. Прил. 1).

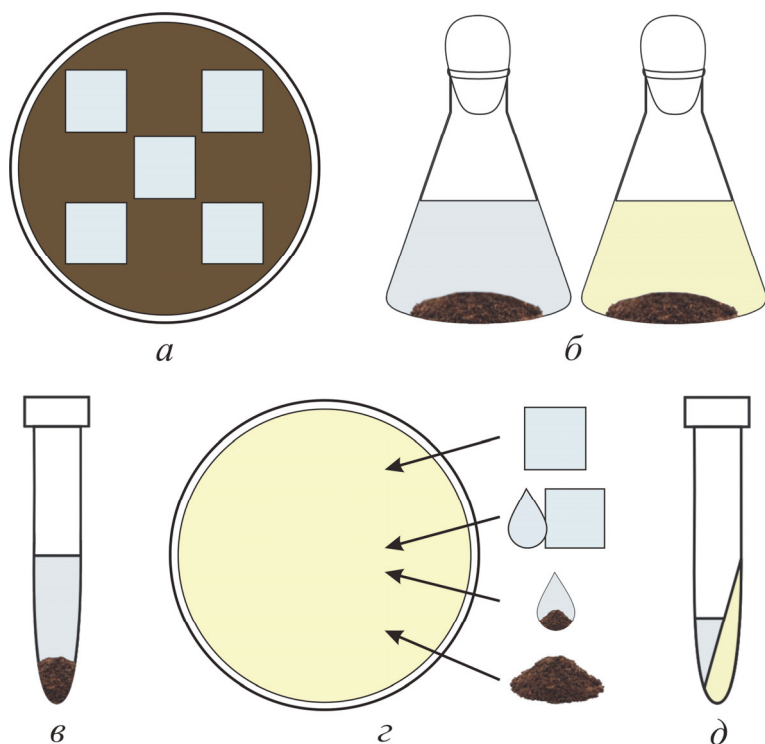


Рис. 1.3. Накопительные смешанные культуры зеленых водорослей.

Примечание. а – чашечные культуры со «стеклами обрастания», б – водные культуры и культуры на основе жидких питательных сред, в – водно-почвенная культура, г – культуры на агаризованной питательной среде, д – накопительная культура по методу А. Лукешевой.

Для приготовления жидкой культуры необходимо:

1) поместить 1-2 г свежесобранной или воздушно-сухой почвы в колбу на 250 мл и залить 100 мл питательной среды. Чаще всего используются среды Bristol или Bold 1N или 3N (см. Прил. 1).

2) закрыть колбу ватной пробкой и инкубировать в культуральном боксе при стандартных условиях.

При появлении визуально заметных зеленых обрастаний и пленок, их отбирают, соскабливая микробиологической петлей, и готовят препараты для микроскопирования. Все инструменты, покровные и предметные стекла, стеклянная культуральная посуда предварительно стерилизуются. Весь процесс обработки культуры длится 1-3 месяца и более.

Другой метод – получение накопительных культур на агаризованных питательных средах заключается в посеве небольшого количества свежееотобранной или воздушно-сухой пробы почвы на твердую питательную среду (рис. 1.3, з).

1) нанести на поверхность твердой питательной среды (1-2% агар) смыв и(или) посев со стекол обрастания, почвенную суспензию или непосредственно почву. Последний вариант также известен как метод почвенных комочков, когда осуществляется высев 5-8 небольших (3-5 мм в диаметре) комочков свежееотобранной почвы на поверхность агара. Воздушно-сухой почвенный образец вначале увлажняют до пастообразного состояния, а затем микробиологической петлей или шпателем выкладывают комочки на поверхность твердой питательной среды. При использовании почвенной суспензии капля наносится в середину чашки Петри и растирается с помощью шпателя Дригальского по поверхности агаризованной среды.

2) перевернуть чашку Петри, закрыть лентой Parafilm, подписать,

3) инкубировать чашки Петри в культуральном боксе при стандартных условиях.

Чешским альгологом А. Лукешовой (цит.: по Костікову та ін., 2001) был предложен интересный культуральный подход, который позволяет выделить разные группы водорослей, разделяя их экологические ниши в культуральной пробирке (рис. 1.3, д):

1) добавить в культуральную пробирку с предварительно приготовленным скошенным агаром (1.5-2%) жидкую питательную среду таким образом, чтобы только половина косяка была погружена в жидкость,

2) внести в пробирку микробиологической петлей небольшое количество почвы из почвенной культуры, в которой уже имеются макроскопические разрастания,

3) закрыть пробирку вентилируемой крышкой и инкубировать в культуральном боксе при стандартных условиях.

Через несколько дней по линии воды на агаре начинают разрастаться отдельные колонии водорослей. При этом за счет разнообразия условий почвенные виды постепенно разрастаются на поверхности агара выше края воды, гидрофильные и амфибиальные виды – в жидкой части культуры. Подобная дифференциация ниш выявляет большое видовое разнообразие зеленых водорослей почвенной пробы.

Основным преимуществом использования агаризованных сред является то, что независимо от выбора конкретных методов получения накопительных культур на твердой среде, из них достаточно легко можно выделить водоросли в монокультуры.

В заключение главы сформулируем ряд общих рекомендаций по методам сбора и выделения зеленых водорослей из природных образцов:

1. Основными обязательными правилами при отборе образцов водорослей или субстратов являются соблюдение условий стерильности, сохранение проб в условиях максимально близких к природным и, по возможности, их быстрая дальнейшая обработка.

2. Краеугольным камнем в способах выделения наибольшего разнообразия водорослей из естественной среды является выбор культуральной среды и условий культивирования. Большинство питательных сред, широко используемых альгологами (*BG-11*, *Bristol*, *Chu-10* и др.), были разработаны для культивирования пресноводных водорослей и являются, по сути, аналогами речных и озерных вод. Поэтому их с осторожностью следует использовать при культивировании почвенных и аэрофильных водорослей. В идеальном случае питательная среда для культивирования почвенных водорослей должна быть приближена к жидкой фазе исследуемой почвы – почвенному раствору, из которого и происходит питание почвенных водорослей. Однако, вследствие высокой динамичности и микрозональности жидкой фазы почвы в отношении содержания органических веществ, макро- и микроэлементов нецелесообразно полностью воспроизводить химический состав почвенного раствора и использовать его в качестве культуральной среды. Достаточно добавлять в стандартные культуральные среды почвенную вытяжку (см. Прил. 1) и регулировать кислотно-щелочные условия среды.

3. Минимизировать стресс водорослей при выделении их из естественной почвенной среды на искусственные питательные среды (Hagemann, 2002), а, следовательно, и увеличить их культивируемое разнообразие, можно при соблюдении следующей последовательности действий: отбор почвенного образца → получение смешанной культуры (чашечные и водно-почвенные культуры) → очистка и культивирование монокультуры на органо-минеральных (с почвенной вытяжкой) и минеральных средах.

Литература

1. Абакумов В.А. Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений. Ленинград: Гидрометеиздат, 1983. 240 с.

2. Вассер С.П., Кондратьева Н.В., Масюк Н.П. и др. Водоросли. Справочник. Киев: Наукова Думка, 1989. 608 с.

3. Голлербах М.М., Штина Э.А. Почвенные водоросли. Ленинград: Наука, 1969. 228 с.
4. Ижболдина Л.А. Атлас и определитель водорослей бентоса и перифитона озера Байкал (мейо- и макрофиты) с краткими очерками по их экологии. Новосибирск: Наука-Центр, 2007. 248 с.
5. Коровин В.П. Океанологические наблюдения в прибрежной зоне моря: учебное пособие. СПб.: Изд-во РГГМУ, 2007. 434 с.
6. Кузяхметов Г.Г., Дубовик И.Е. Методы изучения почвенных водорослей: учебное пособие. Уфа: Изд-е Башкирск. ун-та, 2001. 60 с.
7. Н.П. Горбунова, Е.С. Ключникова, Н.А. Комарницкий и др. Малый практикум по низшим растениям М.: Высшая школа, 1976. 216 с.
8. Садчиков А.П. Методы изучения пресноводного фитопланктона: методическое руководство. М.: Изд-во «Университет и школа», 2003. 157 с.
9. Топачевский А.В., Масюк Н.П. Пресноводные водоросли Украинской ССР. Киев: Вища школа, 1984. 333 с.
10. Штина Э.А., Голлербах М.М. Экология почвенных водорослей. М.: Наука, 1976. 143 с.
11. Костіков І.Ю., Романенко П.О., Демченко Е.М. та ін. Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, конспект флори). К.: Фітосоціо-центр, 2001. 300 с.
12. Bold H.C. Some aspects of the taxonomy of soil algae // *Annals of the New York Acad. Sci.* 1970. V. 175. P. 601–616.
13. Bristol B.M. On the alga-flora of some desiccated English soils: an important factor in soil biology // *Annals Bot.* 1920. V. 34. Iss. 1. P. 35–80.
14. Deason T.R. The genera *Spongiococcum* and *Neospongiococcum* (Chlorophyceae, Chlorococcales). 3. New species, biochemical characteristics and a summary key // *Phycologia*. 1976. V. 15. № 2. P. 197–214.
15. Hagemann M. Environmental stress, signalling and basic acclimation reactions / In: *Cyanobacteria and nitrogen fixation in extreme environments*, 2002. European Sci Found. CYANOFIX. P. 24.
16. Lund J.W.G. Observations on soil algae. 1. The ecology, size, and taxonomy of British soil diatoms // *New Phycologist*. 1945. V. 44. Iss. 2. P. 196–219.
17. Lund J.W.G. Observations on soil algae. 2. Notes on group other than diatoms // *New Phycologist*. 1947. V. 46. Iss. 1. P. 35–60.

Глава 2. Методы получения альгологически чистых и аксеничных культур водорослей (А.Д. Темралеева)

Глава посвящена описанию основных методов очистки альгологических культур от сопутствующих бактерий, грибов и простейших с помощью механических и химических приемов, а также с использованием биологических особенностей зеленых водорослей. Приводятся протоколы и схемы получения монокультур. Сформулированы основные принципы применения антибиотиков для получения аксеничных штаммов зеленых водорослей.

2.1 Посев штрихом

Данный метод широко используется в почвенной микробиологии (Сэги, 1983; Зенова и др., 2002). Схема метода приведена на рис. 2.1, а.

1) набрать микробиологической петлей из смешанной культуры небольшое количество биомассы водорослей и перенести в новую чашку Петри на агаризованную питательную среду, проводя по всей поверхности агаровой пластинки штрих, частый вначале и истончающийся в конце,

2) перевернуть чашку Петри, закрыть лентой Parafilm, подписать,

3) инкубировать в культуральном боксе при стандартных условиях.

Дальнейшие пересевы проводятся от единичных колоний в конце штриха. Подобный способ очистки хорошо подходит для получения альгологически чистых, но не аксеничных культур микроводорослей с коккоидной организацией таллома.

2.2 Изоляция с помощью микропипетки

Суть метода отображена на рис. 2.1, б и сводится к изоляции отдельной клетки или таллома водоросли в чистую культуру с помощью стеклянной микропипетки (Гайсина и др., 2008). Алгоритм действий следующий:

1) просмотреть под стереомикроскопом или биноклем препарат из смешанной культуры водорослей. При высоком обилии водорослей в пробе культуру необходимо развести стерильной dH_2O .

2) вытянуть пинцетом стеклянную пипетку Пастера в тонкий капилляр, держа ее над пламенем горелки, кончик капилляра обломить,

3) захватить выбранную клетку водоросли и поместить в стерильную каплю dH_2O на предметном стекле или чашке Петри,

4) снова просмотреть препарат под микроскопом, при наличии других организмов процедура повторяется. Далее возможны 2 варианта: перенос клетки в жидкую или агаризованную питательную среду.

5) закрыть пробирку вентилируемой крышкой, подписать. Или перевернуть чашку Петри, закрыть лентой Parafilm, подписать.

б) инкубировать чашку Петри или культуральную пробирку в культуральном боксе при стандартных условиях.

Захват отдельной клетки осуществляется с помощью тонкого гибкого резинового шланга или микрогруши. Диаметр капилляра должен быть в 2 раза больше диаметра клетки. При меньшем диаметре есть риск повредить клетку, при большем – отобрать из среды вместе с клеткой и загрязнителей. При выделении нитчатых зеленых водорослей пипетку лучше держать вдоль нити, направляя ее к концу, и под углом.

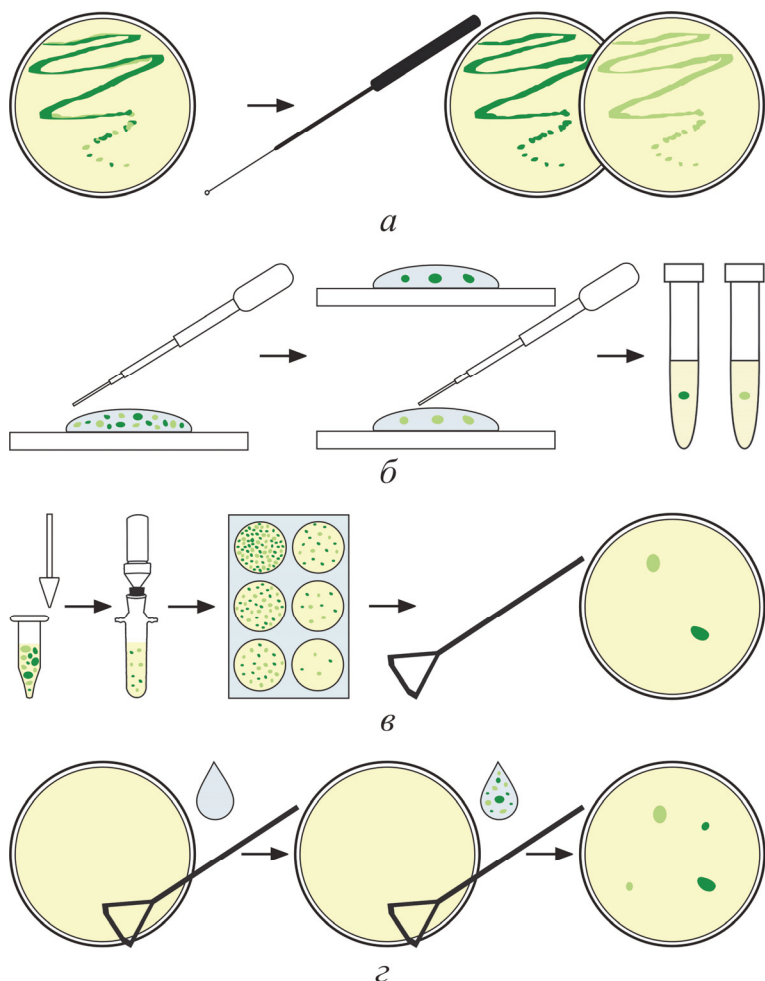


Рис. 2.1. Схемы методов получения альгологически чистых культур.
Примечание. а – посев штрихом, б – изоляция с помощью микропипетки, в – метод последовательного разведения, г – использование фототаксиса.

2.3 Метод последовательного разведения

Метод очистки путем многократного последовательного разведения смешанной культуры наиболее эффективен при комбинировании с

процедурой фильтрации и последующей очистки антибиотиками. Схема метода приведена на рис. 2.1, в. Данный прием хорошо подходит для выделения мелких коккоидных зеленых водорослей. Суть метода заключается в подборе диаметра пор мембранного фильтра, с помощью которого будут улавливаться крупные нитчатые и коккоидные водоросли, простейшие, грибной мицелий и споры. После фильтрации проводят серию многократных последовательных разведений отфильтрованной среды и высев инокулята на агаризованную среду. Мы предлагаем следующий протокол работы:

1) аккуратно гомогенизировать стерильным пестиком смешанную культуру микроводорослей, полученную смывом со стекол обрастания или в результате водного или водно-почвенного культивирования,

2) фильтровать под давлением полученную суспензию водорослей через стерильный нитрат-целлюлозный фильтр с необходимым размером пор (1-10 мкм),

3) отобрать 20 мкл фильтрата и ресуспендировать в 200 мкл жидкой питательной среды в культуральном планшете,

4) провести серию последовательных разведений, количество которых нужно установить опытным путем,

5) перенести 220 мкл максимально разведенной суспензии водорослей в середину чашки Петри с агаризованной питательной средой,

6) растереть каплю шпателем Дригальского по поверхности агара,

7) перевернуть чашку Петри, закрыть лентой Parafilm, подписать,

8) инкубировать в культуральном боксе при стандартных условиях.

Для того чтобы мелкие грибные споры проросли и не прошли через фильтр можно за несколько дней до фильтрации добавить в смешанную накопительную культуру органический субстрат (глюкозу, мальтозу). Удобнее всего для данной процедуры использовать 96-луночные микропланшеты и 8-канальный дозатор.

2.4 Использование фототаксиса

Приводим метод получения монокультуры с помощью фототаксиса, предложенный В.М.Андреевой (1998). Схема метода показана на рис. 2.1, г.

1) внести в середину чашки Петри на агаризованную поверхность (1.6-1.8% агар) 200-300 мкл стерильной dH_2O ,

2) равномерно распределить каплю шпателем Дригальского по поверхности,

3) сразу внести в центр небольшую каплю (~30 мкл) суспензии водорослей из смешанной накопительной культуры.

4) перевернуть чашку Петри, закрыть лентой Parafilm, подписать,

5) *инкубировать чашку Петри в культуральном боксе при стандартных условиях.*

В течение первых нескольких часов, пока на поверхности агара хранится вода, водоросли успевают образовать подвижные репродуктивные клетки, которые отплывают на определенное (иногда - довольно значительное) расстояние от центра чашки. После того как вода будет полностью впитана агаром, эти клетки в течение 1-2 недель развиваются в изолированные колонии. Методика является удобной для очистки зеленых водорослей, размножающихся с помощью зооспор. Смешанную накопительную культуру водорослей также можно предварительно гомогенизировать стерильным пестиком до внесения ее на поверхность агара.

2.5 Очистка с помощью антибиотиков

Антибиотики – вещества природного или полусинтетического происхождения, подавляющие рост живых клеток (бактерий, грибов, простейших). Теоретически с помощью различных антибиотиков можно уничтожить все контаминанты (загрязнители) в смешанных и альгологически чистых культурах водорослей, однако на практике такого результата достичь трудно. Как правило, применение антибиотиков позволяет уменьшить количество бактерий и(или) грибов до незначительного присутствия. Согласно современной классификации антибиотиков они различаются по механизму действия, химической структуре, противомикробному спектру, происхождению и др. (Егоров, 2004).

С учетом механизма действия антибиотики разделяют на три основные группы:

- ингибиторы синтеза клеточной стенки микроорганизма (β -лактамы, карбапенемы, ванкомицин, бенемил и др.),
- антибиотики, нарушающие молекулярную организацию, функции клеточных мембран (нистатин, амфотерицин и др.),
- антибиотики, подавляющие синтез белка и нуклеиновых кислот, в частности, ингибиторы синтеза белка на уровне рибосом (аминогликозиды, тетрациклины, хлорамфеникол и др.).

По характеру воздействия на бактериальную клетку антибиотики бывают бактериостатические (ингибирование размножения) и бактерицидные (гибель бактерий). По химической структуре выделяют следующие группы антибиотиков: β -лактамы (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и др.), аминогликозиды (гентамицин, неомицин, стрептомицин, канамицин и др.), хлорамфеникол, тетрациклины, полиены, гликопептиды и др. Ниже приводится характеристика наиболее часто используемых антибиотиков.

1. **Аминогликозиды** – группа антибиотиков, общим в химическом строении которых является наличие в молекуле аминосахара, соединенного гликозидной связью с аминоклическим кольцом. К антибиотикам аминогликозидного ряда относятся гентамицин, стрептомицин, неомицин, канамицин и др.

Гентамицин – бактерицидный антибиотик широкого спектра действия, подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе *Proteus* и *Pseudomonas*, не оказывает воздействия на грибы, однако проявляет противовирусную активность. Продуцируется бактериями рода *Micromonospora*.

Стрептомицин – бактерицидный антибиотик широкого спектра действия, активен против бактерий родов *Bacillus*, *Bordetella*, *Brucella*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus* при концентрации 100 мкг/мл, *Enterobacter*, *Corynebacterium*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Vibrio* – при концентрации 10-100 мкг/мл и *Bacteroides*, *Clostridium* – свыше 100 мкг/мл. Образуется актиномицетами рода *Streptomyces*.

Неомицин – бактерицидный антибиотик, синтезируется актиномицетами рода *Streptomyces*. Активен в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий, его антимикробный спектр сходен со спектром стрептомицина, однако действие отличается. Так, неомицин малоактивен в отношении большинства видов бактерий родов *Clostridium* и *Streptococcus*, а также вирусов, грибов и простейших.

Канамицин – бактерицидный антибиотик, близок к стрептомицину и неомицину, но обладает меньшей токсичностью, и устойчивость к нему развивается медленнее. Продуцируется актиномицетом *Streptomyces kanamyceticus* или другими родственными бактериями.

2. **β-лактамы** – группа антибиотиков, которые объединяет наличие в структуре β-лактамного кольца. К β-лактамам относятся подгруппы пенициллинов (пенициллин, ампициллин), цефалоспоринов, карбапенемов и др.

Пенициллин – бактерицидный антибиотик, оказывающий антимикробное влияние в отношении широкого круга грамположительных и грамотрицательных бактерий и практически неактивен в отношении мицелиальных грибов и дрожжей. Синтезируется грибами рода *Penicillium*.

Ампициллин – полусинтетический бактерицидный антибиотик, активен в отношении грамположительных и ряда грамотрицательных микроорганизмов. Механизм антимикробного действия связан с угнетением активности фермента транспептидазы блокадой пептидогликана, что нарушает образование мукопептида клеточной стенки микроорганизмов и, как следствие, ингибирует биосинтез клеточной стенки (Waxman, 1983).

Цефалоспорины (цефалоридин, цефотаксим, цефокситин) – бактерицидные антибиотики, в основе химической структуры которых лежит 7-аминоцефалоспоровая кислота. Близки к пенициллинам, но отличаются большей резистентностью по отношению к β -лактамазам – ферментам, вырабатываемым микроорганизмами. Цефалоридин, цефокситин и цефотаксим относятся к цефалоспорином I, II и III поколения, соответственно. Они характеризуются высокой антимикробной активностью в отношении в основном грамположительных бактерий, а также грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, ряда штаммов *Proteus*, *Enterobacter*, и обладают умеренной активностью по отношению к стафилококкам. Продуцируются грибами рода *Cephalosporium*.

Имипенем – бактерицидный антибиотик группы карбапенемов. Проявляет устойчивость к β -лактамазам. Оказывает антибактериальную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Неактивен в отношении грибов. Синтезируется актиномицетами рода *Streptomyces*.

Меропенем – бактерицидный антибиотик группы карбапенемов. Проявляет устойчивость к β -лактамазам. Обладает широким спектром антибактериальной активности, в большей степени подавляет развитие грамотрицательных и в меньшей грамположительных аэробных и анаэробных бактерий. Неактивен в отношении грибов. Синтезируется актиномицетами рода *Streptomyces*.

3. Гликопептиды – класс антибиотиков, включающий циклические или полициклические нерибосомные пептиды, например ванкомицин.

Ванкомицин – бактерицидный антибиотик из группы трициклических гликопептидов. Механизм бактерицидного действия обусловлен ингибированием биосинтеза клеточной стенки. Подавляет развитие грамположительных микроорганизмов, включая виды родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*. Неактивен в отношении грамотрицательных микроорганизмов, микобактерий и грибов. Синтезируется актиномицетом *Amiclatopsis orientalis*.

4. Тетрациклины – группа антибиотиков, относящихся к классу поликетидов, например тетрациклин.

Тетрациклин – бактериостатический антибиотик широкого спектра действия, активен в отношении грамположительных микроорганизмов родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Clostridium*; грамотрицательных энтеробактерий родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Vibrio*. К тетрациклину устойчивы микроорганизмы: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, большинство штаммов *Bacteroides*, грибов и вирусов. Продуцируется актиномицетом *Streptomyces anrefaciens*.

5. **Хлорамфеникол** – бактериостатический антибиотик широкого спектра действия, подавляет развитие многих видов грамположительных и грамотрицательных бактерий, риккетсий, спирохет, хламидий. Образуется актиномицетом *Streptomyces venezuelae*.

6. **Противогрибковые антибиотики** – группа антибиотиков, в основном полиенового ряда, например нистатин, амфотерицин и др.

Нистатин – фунгицидный антибиотик широкого спектра действия, высокоактивен в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida*, не проявляет антибактериальной активности. Синтезируется актиномицетом *Streptomyces noursei*.

Амфотерицин – полиеновый макроциклический фунгицидный антибиотик, подавляет рост дрожжеподобных и мицелиальных грибов, а также амёб и лямблий. Не действует на бактерии, риккетсии, вирусы. Продуцируется актиномицетом *Streptomyces nodosus*.

Беномил – полусинтетический фунгицидный антибиотик, принадлежащий группе бензимидазолов. Широко применяется как противогрибковый препарат для многих сельскохозяйственных, декоративных и лекарственных растений. Его основной метаболит карбендазим подавляет развитие грибов, нарушая рост и дифференциацию гифов. Он связывается с микротрубочками и нарушает клеточное деление и внутриклеточный транспорт. Показан ингибирующий эффект карбендазима для широкого спектра грибов даже при очень низких концентрациях, но токсического воздействия на водоросли отмечено не было (Mahan et al., 2005).

Приведем подробный протокол очистки водорослей от бактериального загрязнения (Andersen, 2005):

1) *растворить 100 мг пенициллина (натриевой или калиевой соли), 25 мг сульфата дигидрострептомицина и 25 мг сульфата гентамицина в 10 мл dH₂O,*

2) *простерилизовать фильтрацией и хранить в поликарбонатных пробирках в замороженном виде до использования. Оттаявшие растворы можно хранить в холодильнике при 4°C в течение нескольких недель.*

3) *добавить 0.5 мл приготовленного раствора к 50 мл стерильной жидкой питательной среды для водорослей,*

4) *после посева инкубировать штаммы водорослей в культуральном боксе при стандартных условиях, через 1-2 недели провести микроскопирование.*

Конечная концентрация антибиотиков (100, 25 и 25 мг/л пенициллина, стрептомицина и гентамицина, соответственно) хорошо переносится большинством водорослей. Более высокие концентрации гентамицина и пенициллина также часто являются нетоксичными, но стрептомицин токсичен для некоторых видов водорослей. В

оригинальном рецепте (Guillard, 1973) вместо гентамицина был использован хлорамфеникол (25 мг/л), но он несколько более токсичен.

При загрязнении альгологической культуры бактериями и грибами можно использовать еще одну схему очистки (Kan, Pan, 2010):

1) *добавить плохо растворимый и термостойкий беномил в питательную среду до автоклавирования до конечной концентрации 0.04 мг/мл,*

2) *приготовить стоковые растворы ампициллина (100 мг/мл) и цефотаксима (50 мг/мл), стерилизовать фильтрацией и хранить при температуре -20°C,*

3) *добавить аликвоты стоковых растворов ампициллина и цефотаксима в стерильную среду до конечной концентрации 0.5 и 0.1 мг/мл, соответственно,*

4) *тщательно перемешать питательную среду с добавками, разлить по культуральным пробиркам,*

5) *после посева инкубировать штаммы в культуральном боксе при стандартных условиях, через 1-2 недели провести микроскопирование.*

Отметим, что использование стандартных протоколов очистки культур водорослей не всегда дает необходимый эффект. Выбор антибиотиков, их концентрации и продолжительности воздействия зависит не только от типа и сложности загрязнения альгологической культуры, но и от индивидуальных особенностей различных таксономических групп водорослей. В целом можно сформулировать общие принципы очистки культур водорослей с помощью антибиотиков:

1. При наличии у водорослей хорошо развитой слизи, в которой могут развиваться бактерии, первым шагом к очистке альгологической культуры должна стать процедура по ее удалению. С этой целью можно использовать очень плотную питательную среду (5% агар).

2. При использовании нескольких антибиотиков для очистки культуры водорослей следует помнить о возможных антагонистических или синергетических эффектах взаимодействия (рис. 2.2).

3. При использовании антибиотиков, угнетающих синтез клеточной стенки (пенициллин, ампициллин, цефотаксим и др.), необходимо присутствие в среде небольшого количества органического вещества, которое будет стимулировать клеточное деление. Это вызвано тем, что антибиотики подобного действия уничтожают бактерии только в фазе активного роста. Количество органического вещества должно быть 10 мг/л среды (примерно 10^{-4} М органики с молекулярным весом 10^2).

4. Необходимо выдерживать чашки с антибиотиками и органическим веществом в темноте, чтобы активизировать рост гетеротрофов в течение 1-2 суток. Затем тщательно отмыть культуры от культуральной среды с антибиотиком.

5. Не рекомендуется одновременное использование ингибиторов деления клеточной стенки (пенициллин) и ингибиторов клеточного роста (Guillard, 2005).

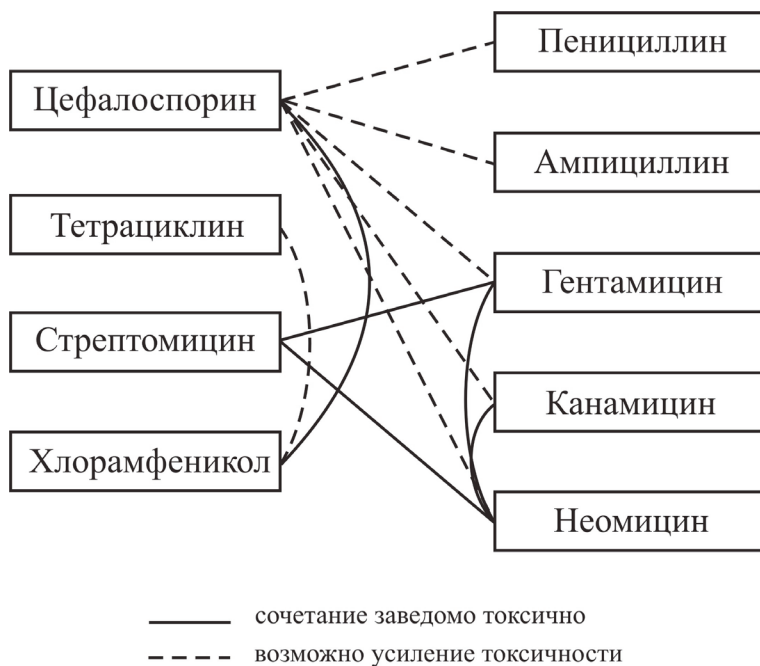


Рис. 2.2. Взаимодействие некоторых антибиотиков, используемых для деконтаминации альгологических культур.

Примечание. Схема нарисована по данным Смольяникова, Калитеевского (1989).

6. При добавлении антибиотиков необходимо помнить, что каждый из них имеет свои оптимальные интервалы pH, в которых проявляется его максимальная антимикробная активность (табл. 2.1).

Табл. 2.1. Границы оптимальных значений pH для эффективного действия некоторых антибиотиков, применяемых для очистки альгологических культур (цит. по: Егоров, 2004)

Антибиотик	pH
Нистатин	4.5-6.5
Ампициллин	5.0-6.0
Ванкомицин	5.0-7.0
Тетрациклин	6.2-6.5
Неомицин	7.0-8.0
Гентамицин	7.5-8.0
Стрептомицин	7.5-8.0
Канамицин	7.6-8.0

7. Наиболее эффективны при очистке альгологических штаммов приемы комбинирования антибиотиков и физических процедур (фльтрация, разведение, изоляция отдельных клеток с помощью микропипетки и др.).

8. Для проверки на чистоту культуры рекомендуется делать посевы на стерильный 0.25%-ный мясной бульон: при развитии бактерий бульон быстро мутнеет. Одновременно необходимо провести прямое микроскопирование культуры для обнаружения контаминантов.

Однако использование этих правил не гарантирует успех в получении аксеничной культуры водорослей. Каждый исследователь должен для себя определить необходимость процедур очистки штамма. Как правило, для целей таксономической идентификации достаточно выделить из смешанных культур – альгологически чистые штаммы. Это позволит исключить «двойной учет» отдельных стадий жизненного цикла зеленых водорослей как индивидуальных видов, и повысит точность определения. Неаксеничные монокультуры водорослей пригодны и для продолжительного хранения в альгологических коллекциях, так как описаны случаи, когда аксеничные штаммы обладали пониженной жизнеспособностью и серьезными изменениями в морфологии клеток (Bruckner, Kroth, 2009). Лишь для некоторых биохимических и физиологических исследований или молекулярно-генетического анализа с универсальными праймерами потребуются дополнительные приемы очистки. Поэтому компромиссным решением в культуральной практике является хранение исходного стокового материала в виде альгологически чистой культуры с минимальным присутствием контаминантов, а при необходимости – получение аксеничной культуры.

Литература

1. Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). СПб.: Наука, 1998. 351 с.

2. Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей: учебное пособие. Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. 152 с.

3. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. М.: Изд-во МГУ, Наука, 2004. 528 с.

4. Зенова Г.М., Степанов А.Л., Лихачева А.А. Манучарова Н.А. Практикум по биологии почв: учебное пособие. М.: Изд-во МГУ, 2002. 120 с.

5. Смольяников А.В., Калитеевский П.Ф. Лечиться или не лечиться? // Химия и жизнь, 1989. № 10. С. 45–53.

6. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. М.: Колос, 1983. 296 с.

7. Костіков І.Ю., Романенко П.О., Демченко Е.М. та ін. Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, конспект флори). К.: Фітосоціо-центр, 2001. 300 с.
8. Andersen R.A. Algal Culturing Techniques. New York, NY, U.S.A.: Elsevier Academic Press, 2005. 578 p.
9. Bruckner C.G., Kroth P.G. Protocols for the removal of bacteria from freshwater benthic diatom cultures // J. Phycology. 2009. V. 45. Iss. 4. 981–986.
10. Guillard R.R.L. Methods for microflagellates and nannoplankton. In: Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements (Eds: Stein J.R.). Cambridge: Cambridge University Press., 1973. P. 69–85.
11. Guillard R.R.L. Purification methods for microalgae. In: Algal culturing techniques (Eds: Andersen R.A.). New York, NY, U.S.A.: Elsevier Academic Press, 2005. P. 117–132.
12. Kan Y., Pan J. A one-shot solution of bacterial and fungal contamination in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by using an antibiotic cocktail // J. Phycology. 2010. V. 46. Iss. 6. P. 1356–1358.
13. Mahan K.M., Odom O.W., Herrin D.L. Controlling fungal contamination in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures // BioTechniques. 2005. V. 39. Iss. 4. P. 457–8.
14. Waxman D.J. Penicillin-binding proteins and the mechanisms of action of β -lactam antibiotics // Annual Review Biochemisry. 1983. V. 52. P. 825–869.

РАЗДЕЛ II. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Глава 3. Традиционный ботанический подход к описанию видового разнообразия водорослей vs. современной молекулярной идентификации (А.Д. Темралеева)

На протяжении 19 и 20 вв. основной таксономический вес при идентификации зеленых водорослей имели морфологические и размерные характеристики. По мере развития молекулярной таксономии и накопления новых данных об ультраструктурных и физиолого-биохимических свойствах водорослей стало очевидно, что использование исключительно фенотипических признаков, в некоторых случаях нестабильных и весьма изменчивых, недостаточно для четкого установления границ таксонов различного ранга.

В главе рассматривается современная концепция вида зеленых водорослей. Подробно обсуждаются диакритические морфологические признаки и их роль в молекулярной систематике водорослей. Описаны приемы получения зооспор, окрашивания клеточных оболочек, слизи, пиреноидов, запасных питательных веществ.

3.1 Концепция вида зеленых водорослей

Концепция вида – это система взглядов на понятие вида в биологии. Одной из распространенных является морфологическая концепция вида, которая рассматривает вид как группу морфологически идентичных или сходных организмов (Futuyma, 1998). Многие десятилетия эта концепция доминировала в систематике водорослей. Однако, выбор морфологического критерия для точной видовой диагностики достаточно сложен. Многие морфологически сходные таксоны зеленых водорослей вследствие конвергентной эволюции и упрощения морфологии до одноклеточных или простых нитчатых форм являются полифилетичными (Lewis, McCourt, 2004). Например, роды *Stichococcus* и *Klebsormidium* в традиционной классификации зеленых водорослей рассматривались как близкородственные таксоны (Ettl, Gärtner, 1995). Оба рода представляют собой однорядные неветвящиеся нити, размножающиеся вегетативным клеточным делением или фрагментацией на 1 или 2-х клеточные сегменты. Однако в филогенетическом плане они состоят в дальнем родстве и относятся к разным отделам в системе водорослей, а сам порядок Klebsormidiales в начальном понимании является полифилетичным. За последнее десятилетие была показана полифилия ряда родов зеленых водорослей: *Coccomyxa* (Rodríguez et al., 2008), *Trebouxia* (Škaloud, Peksa, 2010), *Trentepohlia* (Rindi et al., 2009), *Scenedesmus* (An et al., 1999; Hegewald, Wolf 2003), *Chlamydomonas* (Pröschold et al. 2001; Pröschold, Leliaert, 2007), *Planophila* (Friedl, O’Kelly, 2002), *Chlorella* (Luo et al., 2010), *Chlorosarcinopsis* (Watanabe et al., 2006a)

и др. При идентификации зеленых водорослей на основе морфологии возможна недооценка истинного биологического разнообразия, как было уже неоднократно продемонстрировано в исследованиях криптических видов Chlorophyta (Lewis, Flechtner, 2004; Fawley et al., 2005; Škaloud, Peksa, 2010). С другой стороны, фенотипическая пластичность может привести к резкому увеличению количества предполагаемых видов вследствие принятия различных морфоформ зеленых водорослей за самостоятельные виды и, следовательно, к переоценке видового разнообразия. Например, видовое богатство некоторых родов зеленых водорослей является удивительно большим, например род *Chlamydomonas* состоит из 1166, *Scenedesmus* – из 486, *Chlorella* – из 106, *Chlorococcum* – из 84, *Characium* – из 93 видов и внутривидовых таксонов, описанных преимущественно по морфологии (Guiry, Guiry, 2014). Л.А. Левис и В.Р. Флехтнер (Lewis, Flechtner, 2004), приняв во внимание высокую фенотипическую пластичность рода *Scenedesmus*, предполагают, что молекулярный анализ выявит на порядок меньше видов, чем уже описано в литературе с помощью морфологических критериев. Таким образом, упор исключительно на морфологию зеленых водорослей и предположение о том, что сходная морфология свидетельствует о близком генетическом родстве, может привести к неточностям и даже ошибкам в систематике.

Другая распространенная концепция вида – биологическая (изоляция) – определяет вид как группу свободно скрещивающихся организмов, которые репродуктивно изолированы от других групп (Мауг, 1942). Так как главным критерием данной концепции является репродуктивная изоляция, проблематично применять ее для большого числа видов зеленых водорослей с бесполом типом размножения. Однако о некоторых возможностях приблизиться к биологической концепции вида с помощью молекулярного маркера ITS2 подробно изложено в главе 7. С развитием молекулярных технологий, филогенетическая концепция вида, основанная на генетической однородности популяции, выходит на первый план. Для оценки общего богатства видов и разнообразия зеленых водорослей в водных и наземных экосистемах, интерпретации их экологии и биогеографии требуется полифазный подход, учитывающий морфологические, ультраструктурные, биохимические, физиологические, экологические и молекулярные данные. Поэтому большинство современных работ по открытию новых для науки таксонов (Watanabe et al., 2006a, б; Aslam et al., 2007; Zhang et al., 2008; Nakada, Nozaki, 2009; Nemcová et al., 2011; Neustupa et al., 2011, 2013a, б и др.) или ревизии уже описанных (Darienکو et al., 2010; Fucíková, Lewis, 2012; Hegewald et al., 2013; Škaloud et al., 2013; Matsuzaki et al., 2014 и др.) основывается именно на этом подходе.

3.2 Диакритические морфологические признаки в современной систематике водорослей

Среди морфологических признаков для таксономической идентификации зеленых водорослей используют следующие:

1. тип организации таллома;
2. форма вегетативных клеток;
3. количество и форма хлоропластов;
4. способность к образованию колоний и их форма;
5. строение клеточных оболочек и наличие слизистых образований;
6. наличие, количество и строение пиреноидов;
7. количество ядер;
8. тип размножения;
9. наличие, форма и расположение стигмы;
10. расположение, количество и тип жгутиков;
11. накопление запасных питательных веществ.

Разберем соответствие таксономическим рангам перечисленных морфологических признаков у представителей 2-х классов зеленых водорослей *Chlorophyceae* и *Trebouxiophyceae*, используя собственные и литературные данные.

Тип организации таллома

У зеленых водорослей наиболее распространены следующие типы морфологической организации таллома (Вассер и др., 1989):

- Монадный (жгутиковый) тип – отдельные клетки, имеющие постоянную форму, способны к активному движению в водной среде при помощи жгутиков (рис. 3.1, *а*). Одиночные, собирающиеся в колонии или ценобии (колонии с неизменным определенным числом клеток). Монадную структуру имеют также отдельные стадии водорослей (зооспоры, гаметы).

- Гемимонадный (пальмеллоидный, капсальный) тип – клетки, подобные монадным и имеющие некоторые характерные для монадного типа органеллы, но ведущие неподвижный образ жизни (рис. 3.1, *б*). Часто образуют колонии, состоящие из слизистых выделений и погруженных в эту слизь клеток. Клеткам гемимонадного типа свойственно полярное строение, они могут вести прикрепленный образ жизни благодаря специальным образованиям: слизистые подушки, стебельки или подошвы. У нейстонных водорослей есть плавательные колпачки.

- Коккоидный тип – клетки одиночные или колониальные (ценобиальные), одетые в плотные оболочки, без жгутиков, в вегетативном состоянии неподвижные (рис. 3.1, *в*).

- Сарциноидный тип характеризуется сочетанием коккоидного габитуса со способностью к вегетативному клеточному делению, которое

происходит в различных плоскостях, в результате чего образуются двух и трехмерные комплексы клеток (рис. 3.1, *з*).

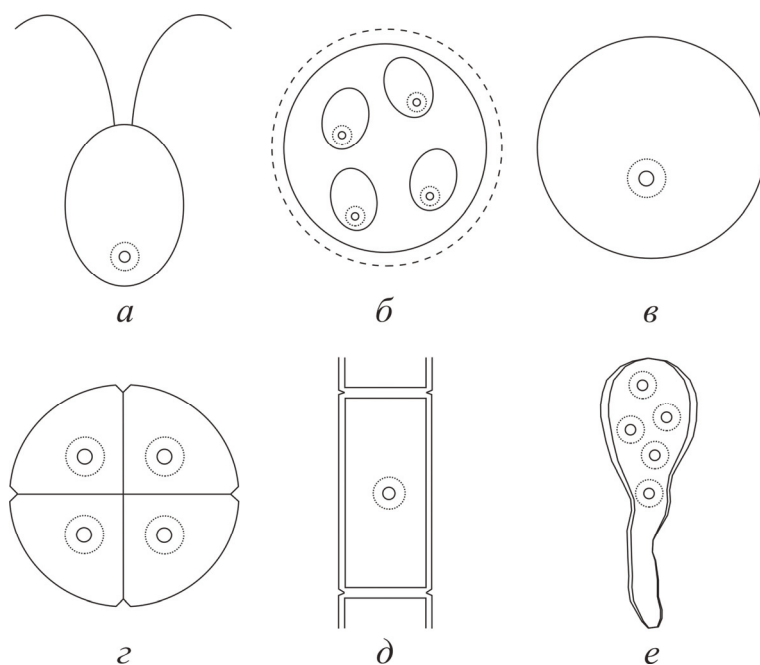


Рис. 3.1. Типы талломов зеленых водорослей.

Примечание. *а* – монадный, *б* – гемимонадный, *в* – коккоидный, *г* – сарциноидный, *д* – нитчатый, *е* – сифональный.

• Нитчатый (трихальный) тип – многоклеточный таллом, клетки которого делятся преимущественно в одной плоскости и образуют нити толщиной в один или несколько рядов (рис. 3.1, *д*). Нити могут быть простыми или разветвленными. Чаще всего клетки нити делятся поперечными перегородками, что обеспечивает постоянный рост нити в длину.

• Разнонитчатый (гетеротрихальный) тип возник на базе нитчатого вследствие морфологической дифференциации многоклеточных участков таллома в связи с приспособлением к выполнению различных функций: прикрепительной, опорной, ассимиляционной и пр.

• Тканевый (паренхиматозный, пластинчатый) тип образуется за счет деления клеток в двух или трех направлениях, в результате чего формируются объемные или пластинчатые, листовидные слоевища, дифференцированные на ткани, которые выполняют различные функции.

• Сифональный (неклеточный) тип – это многоядерное слоевище, как правило, без клеточных перегородок (рис. 3.1, *е*). Оно может вырастать до макроскопических размеров и иметь определенную степень

дифференцировки (внешнюю расчлененность). Перегородки появляются при повреждении таллома и в процессе размножения.

- Сифонокладальный тип представляет собой сложное слоевище нитчатой или другой формы, состоящее из многоядерных элементов.

Многие системы зеленых водорослей на основе морфологической концепции вида признавали тип организации таллома признаком на уровне порядков (подробнее Андреева, 1998; Pröschold, Leliaert, 2007). С развитием молекулярно-филогенетического анализа с помощью различных независимых молекулярных маркеров было неоднократно показано, что близкородственные таксоны часто имеют абсолютно различную организацию таллома. Так водоросли некоторых видов рода *Chlamydomonas* с монадной организацией филогенетически более близки сарциноидным видам родов *Fasciculochloris*, *Heterotetracystis* и *Hemiflagellochloris*, а не монадным родам *Lobochlamys*, *Oogamochlamys*, *Chloromonas* (Watanabe et al., 2006b). По данным Л.А. Левис и Ф.Р. Трайнора (Lewis, Trainor, 2012) минимальное генетическое различие показали зеленые водоросли родов *Spongiochloris*, *Protosiphon* и *Chlorosphaeropsis*, имеющие коккоидный, сифональный и сарциноидный тип организации таллома, соответственно. Таким образом, накопленный опыт в области молекулярной систематики не позволяет считать данный признак надежным для разграничения таксонов на уровне порядков и семейств, но хорошо разделяет близкородственные роды.

Форма вегетативных клеток, способность к образованию колоний и их форма

Зеленые водоросли характеризуются большим разнообразием формы клеток. Почвенные и аэрофильные водоросли преимущественно представлены шаровидными, эллипсоидными и яйцевидными клетками (рис. 3.2, а-в). Редко встречается грушевидная и лимоновидная форма, еще реже – веретеновидная, цилиндрическая, почковидная, серповидная (рис. 3.2, г-и) и др.

Различная форма клеток, способность образовывать колонии и их форма являются надежными диакритическими признаками, разделяющими роды зеленых водорослей семейства Selenastraceae: *Ankistrodesmus*, *Kirchneriella*, *Monoraphidium*, *Nephrochlamys*, *Podohedriella*, *Quadrigula*, *Raphidocelis*, *Rhombocystis*, *Selenastrum* и *Tetranephris*. Данные морфологические свойства хорошо согласуются с молекулярным анализом 18S рДНК (Krienitz, Bock, 2012). В традиционной систематике форма клетки зеленых водорослей используется как диагностический признак на родовом и видовом уровнях (Андреева, 1998).

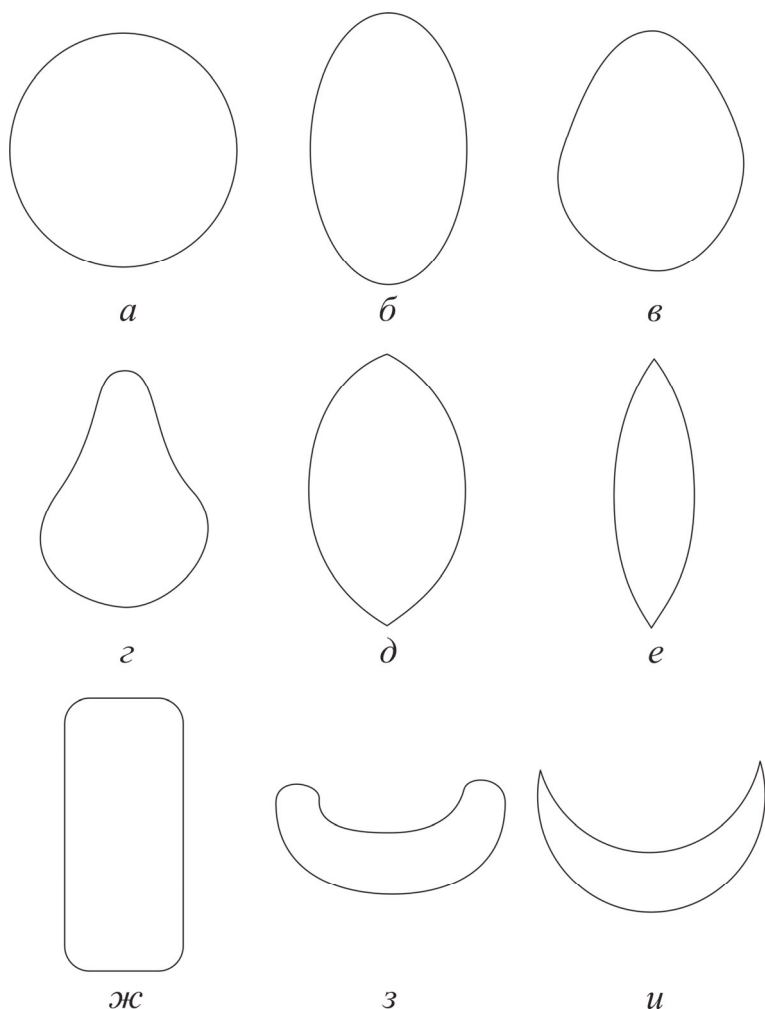


Рис. 3.2. Формы клеток зеленых водорослей.

Примечание. *а* – шаровидная, *б* – эллипсоидная, *в* – яйцевидная, *г* – грушевидная, *д* – лимоновидная, *е* – веретеновидная, *ж* – цилиндрическая, *з* – почковидная, *и* – серповидная формы.

Количество хлоропластов и их форма

Хлоропласты зеленых водорослей представляют собой фотосинтетические двумембранные органеллы, содержащие хлорофиллы, ксантофиллы и другие пигменты. По положению в клетке бывают пристенными и центральными (Андреева, 1998). При этом пристенные хлоропласты могут быть единичными или многочисленными. Одиночный пристенный хлоропласт может быть с отверстием или без, различной формы: шаровидной (рис. 3.3, *а*), блюдцевидной (рис. 3.3, *б*), чашевидной (рис. 3.3, *в*), поясковидной (рис. 3.3, *г*), двулопастной (рис. 3.3, *д*). Центральный хлоропласт всегда один, может быть билатерально или

радиально симметричным (звездчатым, рис. 3.3, *жс*), а также асимметричным. Кроме того отдельно выделяют губчатый (рис. 3.3, *з*) и сетчатый хлоропласты (рис. 3.3, *и*), которые сочетают в себе признаки пристенного и центрального хлоропластов. Губчатый хлоропласт заполняет всю клетку, за исключением небольших лакун, а сетчатый хлоропласт состоит из переплетающихся тяжей. Многочисленные пристенные хлоропласты могут иметь дисковидную или линзовидную (рис. 3.3, *е*), глыбистую, столбчатую, пирамидальную или конусовидную формы.

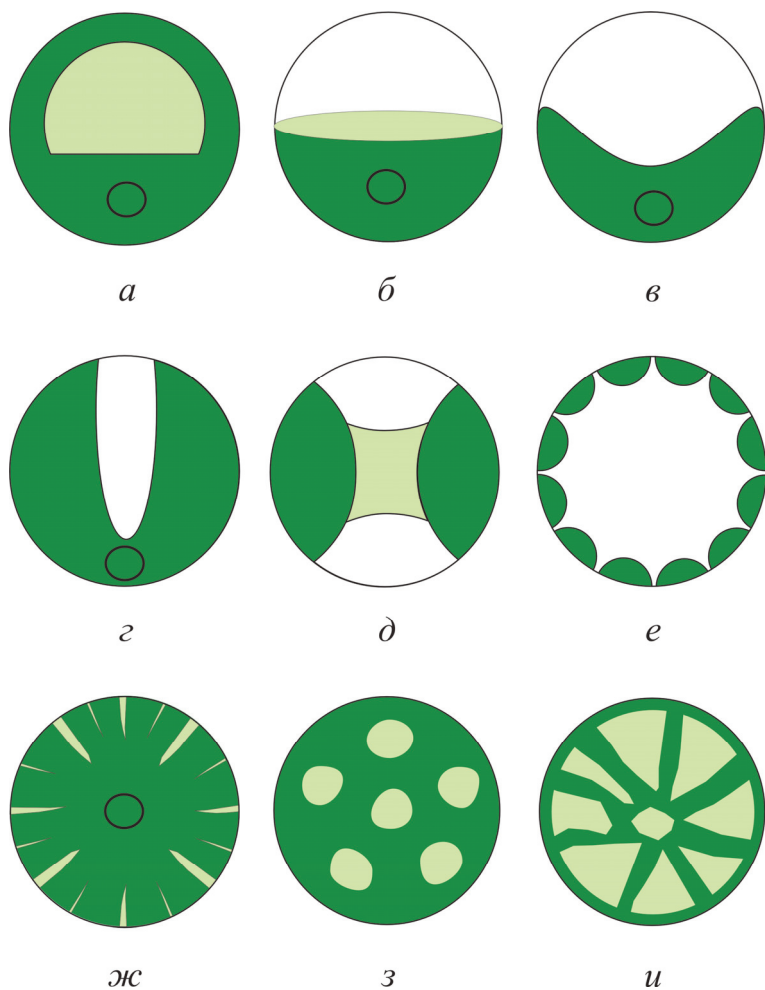


Рис. 3.3. Основные типы хлоропластов зеленых водорослей.

Примечание. *а* – шаровидный без отверстия, *б* – блюдцевидный, *в* – чашевидный, *г* – поясковидный, *д* – двулопастной, *е* – многочисленные дисковидные, *жс* – радиально симметричный или звездчатый, *з* – губчатый, *и* – сетчатый.

Следует отметить, что увеличение числа хлоропластов в зрелых вегетативных клетках может быть связано с их делением. Кроме того, в молодых вегетативных клетках зеленых водорослей можно наблюдать один тип хлоропласта, например, пристенный шаровидный, а в зрелых клетках – другой, например сетчатый или губчатый. Некоторые описанные типы хлоропластов зеленых водорослей проиллюстрированы на рис. 3.4.

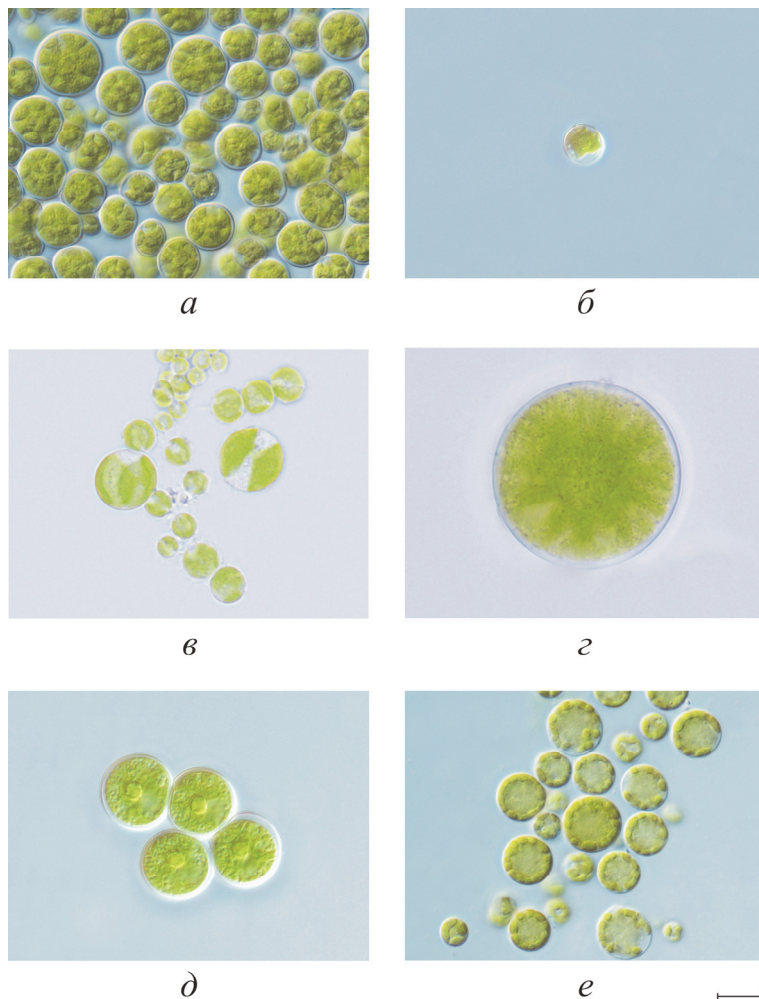


Рис. 3.4. Фотографии зеленых водорослей с различными типами хлоропластов.

Примечание. *a* – радиально симметричный хлоропласт у *Borodinellopsis texensis*; *б* – чашевидный хлоропласт, отстающий от оболочки, у *Heterochlorella luteoviridis*; *в* – двулопастной хлоропласт у *Myrmecia* sp.; *г* – радиально симметричный у *Actinochloris terrestris*; *д* – шаровидный хлоропласт с отверстием у *Chlorococcum infusionum*; *е* – многочисленные хлоропласты у *Bracteacoccus giganteus*. Шкала 10 мкм.

В современной систематике зеленых водорослей тип хлоропласта и их количество оцениваются как признаки родового уровня, форма хлоропласта, как правило, используется при разграничении видов (Андреева, 1998). Нам неизвестно ни одного рода зеленых микроводорослей, виды которого имели бы разные типы хлоропластов в зрелых вегетативных клетках. Однако наличие одного типа хлоропласта или одинаковое их количество у двух близкородственных родов, например *Chlorella* и *Parachlorella*, не означает их таксономической невалидности (Krienitz et al., 2004).

Строение клеточных оболочек и наличие слизистых образований

У большинства зеленых водорослей клеточные оболочки сохраняют более или менее постоянную форму. В световом микроскопе в оболочке, как правило, наблюдают два слоя – внутренний (обычно целлюлозный) и наружный (пектиновый). Оболочки могут быть инкрустированы солями железа или кальция, могут быть цельными или состоять из нескольких фрагментов (Вассер и др., 1989). На поверхности оболочки нередко образуются разнообразные структуры: выросты, шипы, щетинки, бородавки, папиллы, ребра, складки и др. Для определения таких структур, кроме световой или контрастной микроскопии, необходимо использовать сканирующую электронную микроскопию. Толщина оболочки у водорослей, растущих в культуре, зависит от ее возраста: при старении могут утолщаться. Утолщение может быть равномерным или локальным с образованием пузыревидных выростов. Освобождение дочерних клеток из оболочки материнской клетки происходит путем ее разрыва или ослизнения. У некоторых водорослей в культуре наблюдается длительное сохранение оболочек.

Слизь вокруг оболочки может окружать одиночные клетки или быть общей колониальной, слоистой или гомогенной, иметь четкий или расплывчатый контур. Слизь способствует образованию колоний, активному перемещению водоросли в пространстве, прикреплению к поверхности с помощью слизистых дисков, ножек, подушек, переживанию неблагоприятных условий окружающей среды (переход в пальмеллевидное состояние) и др. При определении водорослей обычно отмечают толщину слизистой оболочки и ее изменения при старении культуры, гомогенность или слоистость слизи, наличие отдельных выростов и утолщений, остатков спорангиев и др. Некоторые описанные типы слизистых образований зеленых водорослей представлены на рис. 3.5, а-и и 3.7, а, б.

Для изучения химической природы клеточной оболочки используют 0.01%-ный раствор рутина красного, который окрашивает целлюлозу в синий цвет; хлор-цинк-йод – в фиолетовый. Для выявления структуры поверхности клеточной оболочки используют 5%-ный водный раствор нигрозина и 0.1%-ный водный раствор генцианвиолета. Последний

краситель наряду с 0.1%-ным раствором метиленового синего, также используют для выявления структуры слизи. Для определения общих очертаний слизи применяют 1%-ный раствор туши (Вассер и др., 1989).

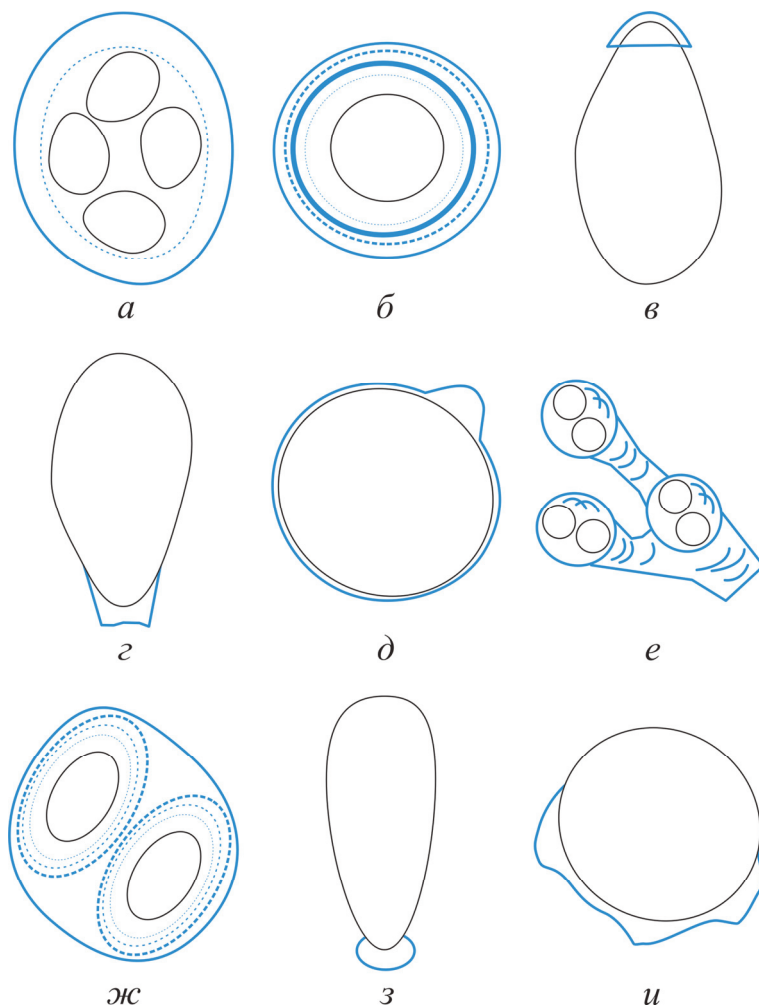


Рис. 3.5. Типы слизистых образований зеленых водорослей.

Примечание. а – слизистая колония *Chlamydocapsa mucifera*, б – старая клетка *Chlorococcum infusionum* с толстой слоистой слизистой оболочкой, в – *Nautococcus pyriformis* со слизистым колпачком, г – клетка *Chlamydomodium starii* со слизистой ножкой, д – клетка *Bracteacoccus giganteus* с пузыревидным утолщением, е – слизистые тяжи *Hormotila ramosissima*, ж – колония *Coccomyxa corbierei* со слоистой слизью, з – *Pseudococcomyxa simplex* со слизистой подушечкой, и – остатки слизистой оболочки вокруг округлившегося протопласта *Neochlorosarcina minuta*.

В традиционной систематике зеленых водорослей различные типы слизистых образований использовались в качестве признаков, разделяющих виды и роды. Например, разграничение видов *Bracteacoccus*

minor и *B. pseudominor* в традиционной системе основано на отсутствии у последнего пузыревидного слизистого выроста на клеточной оболочке (Андреева, 1998). Анализ ядерного гена 18S рДНК и пластидного гена *rbcL* подтвердили самостоятельность этих видов (Fučíková, Lewis, 2012). Еще одним примером может послужить разделение родов *Scotiellopsis* и *Coelastrella* на основе наличия полярных утолщений клеточной оболочки у первого рода и отсутствия у второго (Kalina, Punčochářová, 1987). Однако дальнейший анализ на основе данных по 18S рДНК и ITS2 показал несостоятельность этого разделения (Hegewald, Hanagata, 2000; Kaufnerová, Eliás, 2013). Собственные данные по изучению морфологии, ультраструктуры и филогении членов клады *Watanabea* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) свидетельствуют, что кластеризация родов *Heveochlorella*, *Kalinella*, *Chloroidium*, *Heterochlorella* от группы *Watanabea*+*Viridiella* по данным 18S рДНК также подтверждается наличием у последней однослойной клеточной стенки (Temraleeva et al., unpublished). Поэтому данный признак в исследованной кладе можно использовать в систематике надродовых таксонов, возможно семейств.

Наличие, количество и строение пиреноидов

Пиреноид – особое образование белковой природы (в основном состоит из фермента рибулезобифосфаткарбоксилазы), размером 3-12 мкм и обычно окружен крахмальными зернами (Вассер и др., 1989). У большинства зеленых водорослей по 1 пиреноиду, реже их 2-3 и более. Увеличение числа пиреноидов в зрелых вегетативных клетках может быть связано с их делением. Положение пиреноида в клетке определяется типом хлоропласта (Андреева, 1998). В центральном хлоропласте его положение совпадает с центром хлоропласта и клетки, в пристенном – пиреноид расположен в его утолщенной части. Пиреноиды чаще всего имеют шаровидную и эллипсовидную формы, реже линзовидную или неправильную. Крахмальная обертка пиреноида может быть сплошной (рис. 3.6, а) или состоять из 2-х (рис. 3.6, б) и более скорлупок (рис. 3.6, в), а также из нескольких крупных (рис. 3.6, г) или многочисленных зерен: удлинённых и ориентированных радиально (рис. 3.6, д) или мелких и свободно расположенных (рис. 3.6, е). Пиреноиды, лишённые крахмальной обертки, у зеленых водорослей встречаются реже. Некоторые описанные типы крахмальных оберткок пиреноида зеленых водорослей представлены на рис. 3.7, а-г, е.

Белковое тело пиреноида окрашивается 1%-ным раствором кислого фуксина или уксусным азокармином G в красный цвет на светло-розовом фоне. Для приготовления последнего красителя необходимо:

- 1) добавить к 1 мл ледяной уксусной кислоты 55 мл dH_2O и 5 г азокармина G,
- 2) кипятить полученную смесь около часа, пользуясь обратным холодильником, охладить,

3) фильтровать и хранить в сосуде из темного стекла.

В большинстве случаев крахмальную обкладку пиреноида хорошо заметно в световом микроскопе. Однако для более четкой ее визуализации можно использовать цитохимическую реакцию на крахмал с помощью раствора Люголя.

1) растворить 2 г йодистого калия в 5 мл dH_2O ,

2) добавить 1 г металлического йода,

3) довести объем до 300 мл dH_2O , перемешать.

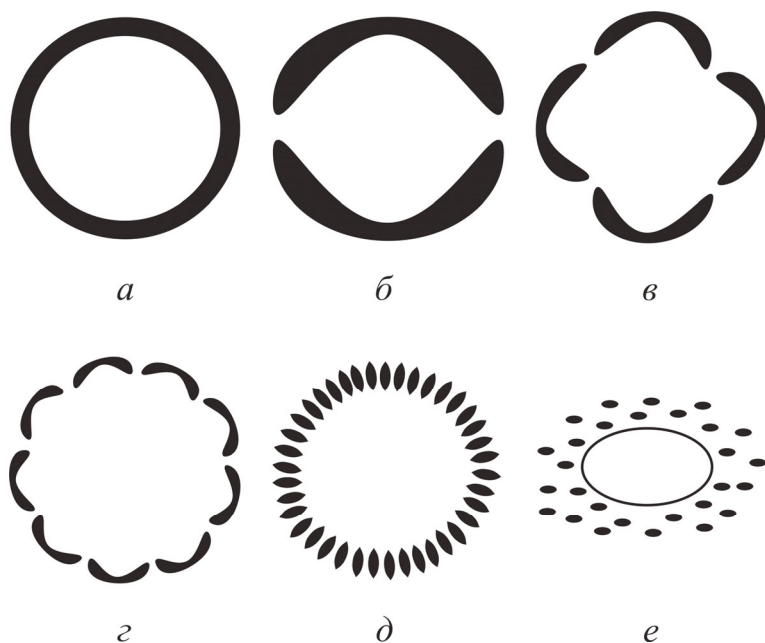


Рис. 3.6. Строение крахмальной обертки.

Примечание. а – сплошная, б – из двух скорлупок, в – из четырех скорлупок, г – из нескольких крупных зерен, д - из многочисленных радиально ориентированных удлинённых зерен, е – из многочисленных мелких и свободно расположенных зерен.

Считается, что наличие/отсутствие пиреноидов является диагностическим признаком видового уровня (Константинова, Болдина, 2000). И. Неуступа с коллегами (Neustupa et al., 2007) обнаружил, что штамм водоросли, описанный исходно как морфовид *Klebsormidium marinum*, по молекулярным данным относится к роду *Stichococcus*, несмотря на присутствие пиреноида с крахмальной оберткой, что считалось одним из диакритических признаков, разделяющих эти таксоны. Этот же коллектив авторов в 2009 году описал новый род зеленых водорослей – *Kalinella* с типовым видом *K. bambusicola*, хлоропласт которой содержал пиреноид (Neustupa et al., 2009). Спустя 4 года ими же был обнаружен новый вид данного рода – *K. apyrenoidosa* без

пиреноида (Neustupa et al., 2013a). Еще один пример – традиционное разделение родов *Chlamydomonas* и *Chloromonas* на основе отсутствия пиреноида у последнего (Ettl, 1970, 1983). Первое же молекулярное исследование этих морфологически различных таксонов показало несостоятельность подобного разделения (Buchheim et al., 1997) и в настоящее время род *Chloromonas* включает в себя как виды с пиреноидами, так и без (Hoham et al., 2002; Matzuzaki et al., 2012).

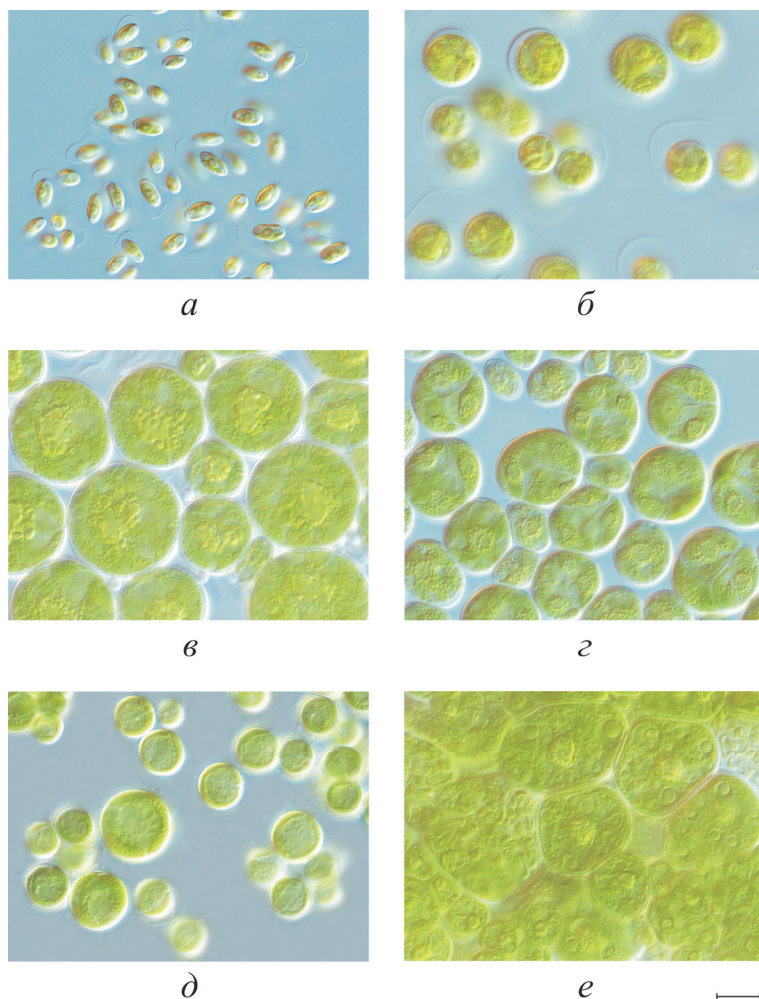


Рис. 3.7. Фотографии зеленых водорослей с различным количеством ядер, строением оболочки пиреноида и типом слизистых образований.

Примечание. а – слизистая колония *Oocystella oogata*, б – слизистая колония *Palmellopsis* sp., в – крахмальная оболочка пиреноида из крупных крахмальных зерен у *Chlorococcum costatozygotum*, г – крахмальная оболочка пиреноида из многочисленных мелких крахмальных зерен у *Tetracystis pampae*, д – одноядерные клетки *Myrmezia irregularis*, е – многоядерные клетки *Deasonia multinucleata*. Шкала 10 мкм.

Количество ядер

Как правило, клетки зеленых микроводорослей содержат одно ядро (рис. 3.7, *a-d*), многоядерные вегетативные клетки встречаются нечасто (рис. 3.7, *e*). Форма ядер, как правило, шаровидная или линзовидная. Объединение одноклеточных и многоядерных видов в один род, например, *Deasonia* (= *Ascochloris*) и *Neosporangium* (Deason, 1984), не оправдывалось при исследовании филогенетических взаимосвязей по анализу нуклеотидных последовательностей генов 18S рДНК и *rbcL* (Skaloud et al., 2013). По-видимому, различное количество ядер свидетельствует о различиях как минимум на уровне рода. Количество и местонахождение ядер в клетках зеленых водорослей определяют при микрофотографировании под иммерсионным объективом. Для лучшей визуализации ядер можно использовать интерференционно-контрастную микрофотографию (ДИК-микрофотографию) или красители (Царенко, 1990).

Тип размножения

Размножаются зеленые водоросли половым и бесполом путем с помощью вегетативных и специализированных клеток. Бесполое размножение осуществляется с помощью специализированных клеток – спор. Споры зеленых водорослей бывают подвижными – зооспоры (рис. 3.8, *a*) и неподвижными – апланоспоры и автоспоры (рис. 3.8, *b, в*). Зооспоры обладают всеми свойствами, присущими клеткам монадной организации: полярностью, жгутиками, сократительными вакуолями и стигмой (иногда может отсутствовать). Зооспоры различаются по количеству в зооспоре; форме (эллипсоидные, яйцевидные, цилиндрические, бочковидные, реповидные и др.); количеству, типу и расположению жгутиков; наличию или отсутствию клеточной оболочки («жесткие» неметаболические и «голые» метаболические зооспоры). Неметаболические зооспоры с жесткой оболочкой обычно несут на переднем полюсе небольшое утолщение – папиллу, которая имеет разнообразную форму: плоская, конусовидная, колпачковидная, седловидная и др. (Андреева, 1998). Индукцию зооспор можно вызвать следующим приемом (Neustupa et al., 2011):

1) перенести штамм водорослей из питательной среды в пробирку с 1%-водным раствором глюкозы или стерильной dH_2O ,

2) инкубировать в темноте и(или) при температуре 12°C,

3) просматривать культуру регулярно, с интервалом 0.5-1 час.

Неподвижные споры – апланоспоры – являются по своей сути несостоявшимися зооспорами, пропустившими подвижную стадию, иногда содержат стигму и сократительные вакуоли, образуются в меньшем или том же количестве, что и зооспоры. Автоспоры формируются как неподвижные дочерние клетки в меньшем количестве и, как правило, той группой водорослей, которая лишена подвижных стадий (Андреева, 1998). Кроме того, бесполое размножение может

проходить без образования специализированных клеток. У одноклеточных зеленых водорослей родов *Dunaliella* и *Nannochloris* наблюдается деление клетки надвое (рис. 3.8, *г*); у колониальных (неценобиальных) – фрагментация колонии (*Botryococcus*, *Dictyosphaerium*), у ценобиальных (*Scenedesmus*, *Volvox*) образуются дочерние ценобии внутри клеток материнского ценобия; у сарциноидных водорослей происходит распадение клеточных пакетов и комплексов, образованных путем десмосхизиса (рис. 3.8, *д*). Десмосхизис от остальных типов деления отличается тем, что внутренний слой материнской оболочки принимает участие в формировании оболочки дочерних клеток (Андреева, 1998).

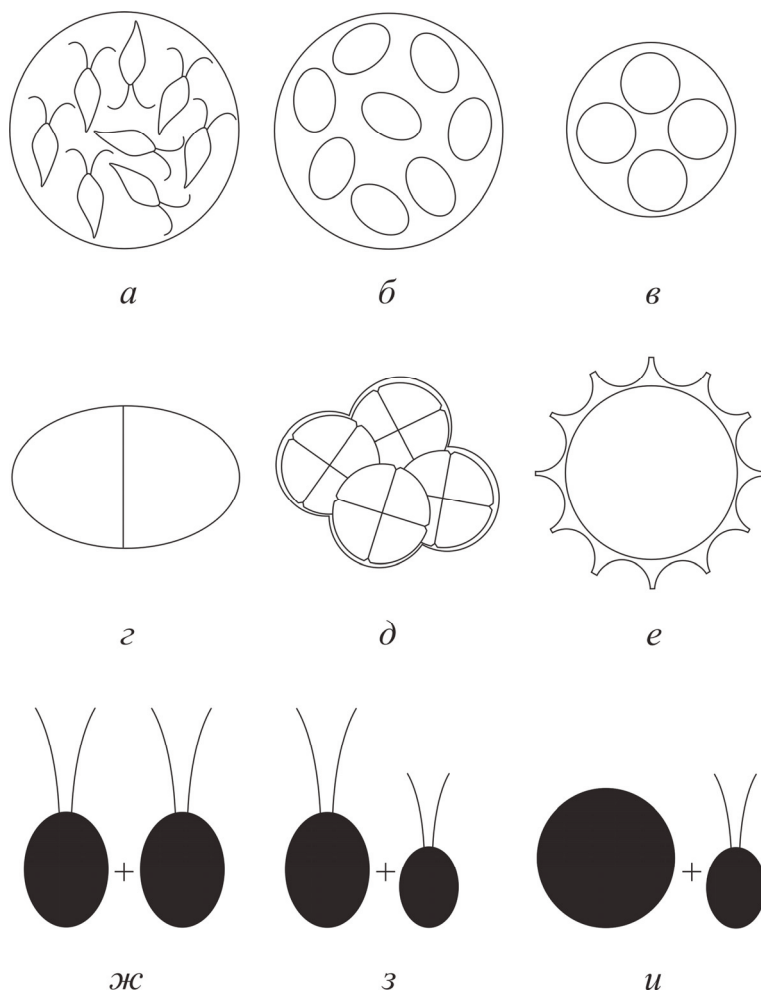


Рис. 3.8. Типы бесполого и полового размножения зеленых водорослей.

Примечание. *а* – зооспорангий, *б* – апланоспорангий, *в* – автоспорангий, *г* – деление клетки надвое, *д* – комплекс клеток, образованный в результате десмосхизиса, *е* – зигота с шиповатой оболочкой, *ж* – изогамия, *з* – гетерогамия, *и* – оогамия.

Половой процесс представлен разнообразными формами: изогамией (слияние гамет одинаковых по величине, строению и подвижности), гетерогамией (слияние гамет, имеющих различные размеры, но одинаковую форму) и оогамией (слияние утратившей подвижность более крупной женской гаметы с подвижной, имеющей жгутики, мужской гаметой) (рис. 3.8, *ж-и*). Зиготы имеют вид обычных вегетативных клеток или могут быть окружены утолщенной, иногда скульптурированной оболочкой (рис. 3.8, *е*).

Способам размножения в настоящее время придается серьезное диагностическое значение. Особый вес в современной таксономии зеленых водорослей имеют тип клеточных покровов у зооспор и тонкое строение жгутикового аппарата монадных клеток (вегетативных или зооспор). Эти характеристики хорошо согласуются с молекулярными признаками зеленых водорослей (Watanabe et al., 20066). Некоторые описанные типы бесполого и полового размножения проиллюстрированы на рис. 3.10, *а-г*.

Наличие, форма и расположение стигмы

Стигма – внукрикеточный органоид, отвечающий за способность зеленых водорослей к фототаксису. Функционально она связана со жгутиковым аппаратом и расположена в хлоропласте. Обычно окрашена в различные оттенки красного цвета и имеет линейную, палочковидную, овальную, линзовидную или точечную формы (Андреева, 1998). В традиционной систематике зеленых водорослей этот признак использовался как дополнительный для разграничения близкородственных видов. Дальнейшие молекулярно-филогенетические исследования подтвердили его состоятельность. Так, для разделения видов рода *Microglена* были успешно использованы такие характеристики стигмы как длина, форма и положение (Demchenko et al., 2012). Группа украинских альгологов под руководством И.Ю. Костикова описала новый вид рода *Chlorochytrium* – *C. hypanicus* (Костиков и др., 2012). Новый вид отличался от типового – *C. lemnae* – передним положением стигмы у зооспор. Анализ данных 18S рДНК обоих видов не позволил надежно их разделить, однако сравнение интронов в данном гене может подтвердить обоснованность выделения нового вида (Temraleeva et al., unpublished).

Расположение, количество и тип жгутиков

Монадные вегетативные клетки и монадные стадии в жизненном цикле (зооспоры и гаметы) водорослей снабжены жгутиками – длинными и довольно толстыми выростами клеток, снаружи покрытыми плазмалеммой. Их количество, длина, морфология, место прикрепления, характер движения разнообразны у водорослей, но постоянны внутри родственных групп. Возможности оптической микроскопии в отношении жгутикового аппарата зеленых водорослей без предварительной их обработки достаточно ограничены: можно отметить расположение

жгутиков (широко расставленные, как у зооспор *Dictyochloropsis*; близко посаженные, как у родов *Chlamydomonas*, *Chloromonas* и др.), длину, их количество, способ биения, место прикрепления. Жгутики могут прикрепляться на переднем конце клетки (апикальные) или могут быть слегка сдвинуты вбок (субапикальные). Жгутики, одинаковые по морфологии, называют изоморфными, если они различаются – гетероморфными. Подвижные клетки зеленых водорослей (*Chlorophyta*) обычно обладают двумя изоконтными жгутиками (Bold, Wynne, 1985), которые не отличаются между собой по длине, внешнему виду и способу биения (рис. 3.9, а), иногда встречаются 4 и более жгутиков (рис. 3.9, з). Однако зооспоры коккоидных водорослей *Bracteacoccus* и *Dictyochloris* имеют анизоконтные жгутики (Starr, 1955), т.е. одинаковые по строению, но неравные по длине (рис. 3.9, б, в). Такой же тип жгутиков описан у вегетативных клеток монадных водорослей: *Heterochlamydomonas* (Cox, Deason, 1969) и *Spermatozopsis similis* (Preisig, Melkonian, 1984), у зооспор нитчатой водоросли *Microspora quadrata* (Lokhorst, Star 1999) и у зооспор сарциноидных водорослей: *Fasciculochloris* (McLean, Trainor, 1965), *Heterotetracystis* (Cox, Deason, 1968) и *Hemiflagellochloris* (Watanabe et al., 2006б).

Акронематический (бичевидный) жгутик (рис. 3.9, д), несущий нитевидный цитоплазматический вырост (акронему) на дистальном конце жгутика (Карпов, 2001), у зеленых водорослей встречается достаточно редко, например, у представителей класса *Mammiellophyceae*. Немногочисленные представители *Chlorophyta* относятся к стефаноконтам, которые имеют венчик жгутиков на переднем конце клетки (рис. 3.9, е), например, водоросли порядка *Oedogoniales* (Alberghina et al., 2006). Все жгутики зеленых водорослей без мастигонем, но могут быть покрыты чешуйками и волосками. Наблюдения за длиной жгутиков, характером их движения, местом прикрепления проводят на живом материале с помощью световой и фазово-контрастной микроскопии.

Как правило, морфологические различия жгутиков вегетативных клеток или зооспор позволяют разделять зеленые водоросли на уровне видов и родов. Для исследований более высоких таксономических рангов (порядков, классов) зеленых водорослей необходимы ультраструктурные исследования жгутикового аппарата с помощью электронной микроскопии.

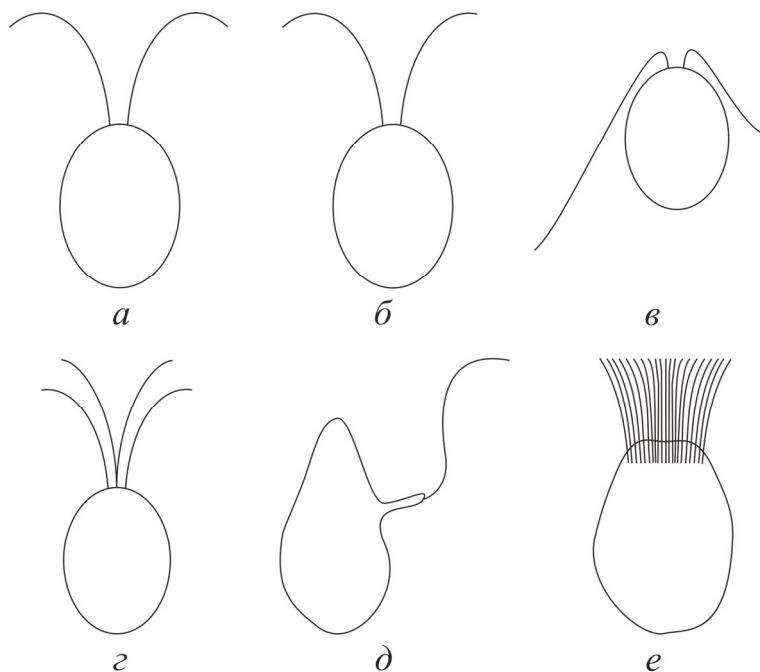


Рис. 3.9. Типы жгутиков у монадных форм и стадий зеленых водорослей.

Примечание. *а* – два изоконтных жгутика, *б* – два анизоконтных жгутика слегка неравных по длине, *в* – два анизоконтных жгутика сильно неравных по длине, *г* – четыре изоконтных жгутика, *д* – один акронематический жгутик, *е* – стефаноконтные жгутики.

Накопление запасных питательных веществ

В качестве запасных питательных веществ у зеленых водорослей обычно отмечают крахмал, липиды, изредка волютин и белковые гранулы. Крахмал откладывается в строме хлоропласта в виде мелких зерен и вокруг пиреноида, образуя его обертку. Липиды накапливаются в цитоплазме стареющих и покоящихся клеток в форме маслянистых мелких или крупных капель, бесцветных или окрашенных в различные цвета: желтый, оранжевый, красный, оливковый и др. Волютин и белковые гранулы рассеяны в виде гранул в цитоплазме. На рис. 3.10, *д*, *е* отмечены морфологические изменения водорослей при старении культуры. Для выявления запасных питательных веществ используют следующие красители (Вассер и др., 1989): крахмал окрашивают йод-содержащими красителями, липиды – суданом III (0.1 г судана III в 20 мл абсолютного этилового спирта) или оксидом осмия (IV).

Некоторые группы зеленых водорослей, особенно из почвенных и экстремофильных местообитаний, способны к гиперсинтезу вторичных каротиноидов, которые (в отличие от первичных или фотосинтетических каротиноидов) не участвуют в фотосинтезе, но играют важную роль в экранировании избыточной фотосинтетически активной радиации, создании стока для избыточных фотоассимилятов, а также подавлении

образования и детоксикация уже образовавшихся активных форм кислорода (Соловченко, 2013).

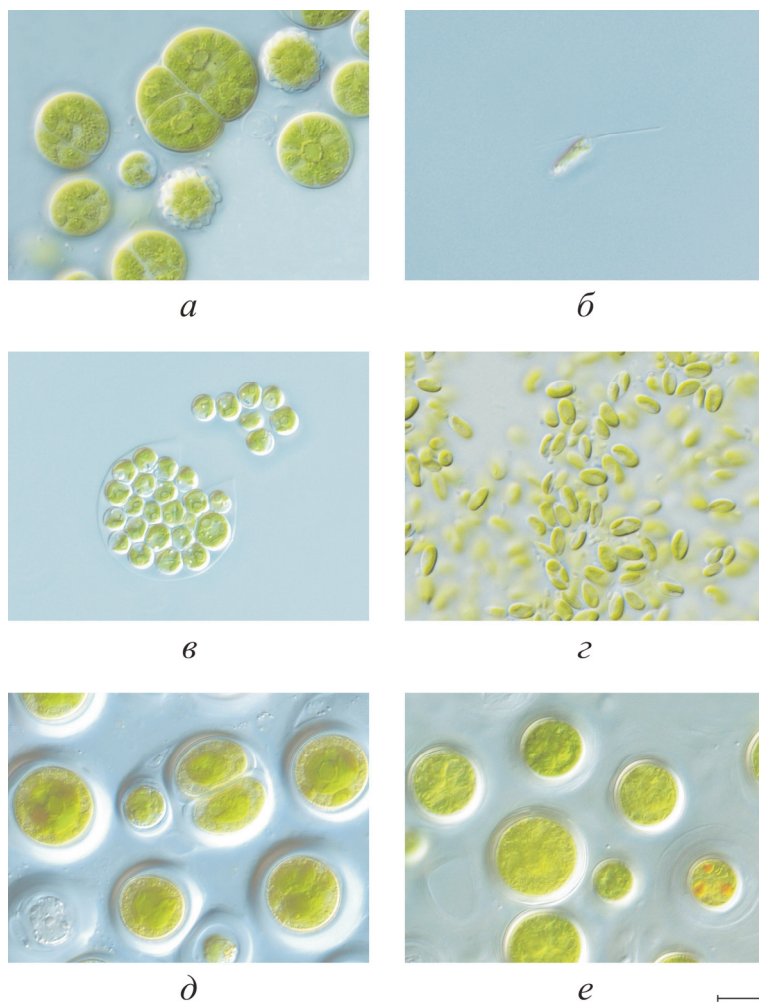


Рис. 3.10. Фотографии размножения и старения зеленых водорослей.

Примечание. *а* – диады и тетрады клеток *Tetracystis aggregata*, образующиеся в результате десмосизиса, зиготы с шиповатой оболочкой; *б* – зооспора *Hemiflagellochloris kazakhstanica*, *в* – апланоспоры *Spongiochloris excentrica* в оболочке материнского спорангия; *г* – автоспоры *Pseudococcomyxa simplex*; *д* – изменение окраски хлоропласта и утолщение слизистых оболочек *Hemiflagellochloris kazakhstanica*, *е* – капли оранжевого масла в старых клетках *Spongiochloris spongiosa*. Шкала 10 мкм.

В целом, вторичный каротиногенез – это адаптивная реакция зеленых водорослей к неблагоприятным факторам окружающей среды, заключающаяся в инициировании и накоплении в липидных включениях цитоплазмы и хромопластов кетокаротиноидов группы астаксантина (Челебиева, 2014). Данная способность была предложена

И.Ю. Костиковым в качестве признака для выделения порядка Protosiphonales внутри класса Chlorophyceae (Костиков и др., 2012). Внутри этого же класса зеленых водорослей несколько близкородственных родов порядка Sphaeropleales (*Muriella*, *Bracteacoccus* и *Chromochloris*) синтезируют вторичные каротиноиды, окрашивающие культуры в ярко-оранжевый цвет (Fučíková et al., 2012). Для недавно открытых 3-х новых родов порядка Sphaeropleales (*Rotundella*, *Tumidella* и *Bracteamorpha*) также была характерна эта особенность (Fučíková et al., 2014). Однако возможность использования этого признака в качестве критерия в систематике зеленых водорослей все еще обсуждается.

Некоторые морфологические характеристики являются приспособительными и зависят от условий окружающей среды, а, следовательно, могут быть достаточно вариабельными. Например, слизь, соединяющие тяжи, одиночный или колониальный образ жизни, формирование игл у видов *Chlorella*-клады являются адаптивным ответом на факторы окружающей среды, такие как выедание, эндосимбиотическое или наземное существование (Luo et al., 2006, 2010). Представителей рода зеленых водорослей *Mychonastes* традиционно отличали от *Pseudodictyosphaerium* по образу жизни: свободноживущие в первом случае и колониальные во втором. Однако это морфологическое различие родов не подтвердилось молекулярными данными, и оба таксона были объединены в род *Mychonastes* (Krienitz et al., 2011). В ряде работ по *Scenedesmus* было убедительно показано, что такие морфологические признаки видов как присутствие и форма шипов, величина колонии зависят от температуры окружающей среды (Trainor, 1991; Trainor, Egan 1991). Таким образом, подобные признаки не могут быть диагностически значимыми при таксономическом определении данных родов. Подводя итог, следует подчеркнуть, что при разделении таксонов водорослей всегда должен использоваться целый набор диакритических морфологических признаков, который является индивидуальным в зависимости от уровня таксономической категории и биологических особенностей исследуемой группы зеленых водорослей.

Литература

1. Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). СПб.: Наука, 1998. 351 с.
2. Вассер С.П., Кондратьева Н.В., Масюк Н.П. и др. Водоросли. Справочник. Киев: Наукова думка, 1989. 608 с.
3. Карпов С.А. Строение клетки протистов: учебное пособие. СПб.: ТЕССА, 2001. 384 с.

4. Константинова И.А., Болдина О.Н. Сравнительный анализ ультраструктуры пиреноидов зеленых монадных и коккоидных водорослей // Физиология растений. 2000. Т. 47. № 5. С. 747–751.

5. Костиков И.Ю., Демченко Э.Н., Бойко В.Р., Гончаров А.А. *Chlorochytrium hypanicus* sp. nov. (Chlorophyceae) и его место в системе Protosiphonales // Альгология. 2012. Т. 22. № 3. С. 227–249.

6. Соловченко А. Е. Физиология и адаптивное значение вторичного каротиногенеза у зеленых микроводорослей // Физиология растений. 2013. Т. 60. № 1, С. 3-16.

7. Царенко П.М. Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР. Киев: Наукова думка, 1990. 210 с.

8. Челебиева Э.С. Особенности вторичного каротиногенеза у зеленых микроводорослей: Дис. ... канд.биол.наук. - Севастополь, 2014. – 154 с.

9. An S.S., Friedl T., Hegewald E. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons // Plant Biol. 1999. V. 1. Iss. 4. P. 418–428.

10. Alberghina J., Vigna M., Confalonieri V. Phylogenetic position of the Oedogoniales within the green algae (Chlorophyta) and the evolution of the absolute orientation of the flagellar apparatus // Plant. Syst. Evol. 2006. №261. P. 151–163.

11. Aslam Z., Shin W., Kim M.K. et al. *Marinichlorella kaistiae* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) based on polyphasic taxonomy // J. Phycology. 2007. V. 43. Iss. 3. P. 576–584.

12. Bold H.C., Wynne M.J. Introduction to the Algae. NJ. Prentice-Hall Inc, New Jersey: Englewood Cliffs, 1985. 2nd ed. 720 p.

13. Buchheim M.A., Buchheim J.A., Chapman R.L. Phylogeny of *Chloromonas* (Chlorophyceae): a study of 18S ribosomal RNA gene sequences // J. Phycology. 1997. № 33. P. 286–293.

14. Cox E.R., Deason T.R. *Axilosphaera* and *Heterotetracystis*, new Chlorosphaeracean genera from Tennessee soil // J. Phycology. 1968. V. 4. Iss. 3. P. 240–249.

15. Cox E.R., Deason T.R. *Heterochlamydomonas*, a new alga from Tennessee // J. Tenn. Acad. Sci. 1969. V. 44.4. № P. 105–107.

16. Darienko T., Gustavs L., Mudimu O. et al. *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // Eur. J. Phycology. 2010. V.45. Iss. 1. P. 79–95.

17. Deason T.R. A discussion of the classes Chlamydomphyceae and Chlorophyceae and their subordinate taxa // Plant. Syst. Evol. 1984. V. 146. № 1/2. P. 75–86.

18. Demchenko E., Mikhailyuk T., Coleman A.W., Proschold T. Generic and species concepts in *Microglana* (previously the *Chlamydomonas monadina*

- group) revised using an integrative approach // *European Journal of Phycology* 2012. V. 47. Iss. 3. P. 264–290.
19. Ettl H. Die Gattung *Chloromonas* Gobi emend. Wille (Chlamydomonas und Die Nächstverwandten Gattungen I) In: Beihefte zur Nova Hedwigia Beihefte. 1970. H. 34. 283 p.
20. Ettl H. Chlorophyta I. Phytomonadina // Süßwasserflora von Mitteleuropa (Eds: Ettl H., Gerloff J., Heynig H., Mollenhauer D.). Stuttgart and New York: Gustav Fischer Verlag, 1983. V. 9. 807 p.
21. Ettl H., Gärtner G. Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. Stuttgart: Gustav Fischer, 1995. 721 p.
22. Fawley M.W., Fawley K.P., Owen H.A. Diversity and ecology of small coccoid green algae from Lake Itasca, Minnesota, USA, including *Meyerella planktonica*, gen. et sp. nov. // *Phycologia*. 2005. V. 44. Iss. 1. P. 35–48.
23. Friedl T., O'Kelly C.J. Phylogenetic relationships of green algae assigned to the genus *Planophila* (Chlorophyta): evidence from 18S rDNA sequence data and ultrastructure // *Eur. J. Phycology*. 2002. V. 37. Iss. 3 P. 373–384.
24. Fučíková C., Lewis L.E. Intersection of *Chlorella*, *Muriella* and *Bracteacoccus*: Resurrecting the genus *Chromochloris* Kol et Chodat (Chlorophyceae, Chlorophyta) // *Fottea*. 2012. V. 12. № 1. P. 83–93.
25. Fučíková K., Lewis P.O., Lewis L.A. Putting *incertae sedis* taxa in their place: a proposal for ten new families and three new genera in Sphaeropleales (Chlorophyceae, Chlorophyta) // *J. Phycology*. 2014. V. 50. Iss. 1. P. 14–25.
26. Futuyma D.J. *Evolutionary Biology*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 1998. 3rd ed. 751 p.
27. Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase [Electronic resource] // National University of Ireland, Galway. 2014 [Official website]. URL: <http://www.algaebase.org> (accessed: 28.07.2014).
28. Hegewald E., Bock C., Krienitz L. A phylogenetic study on Scenedesmaceae with the description of a new species of *Pectinodesmus* and the new genera *Verrucodesmus* and *Chodatodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae) // *Fottea*. 2013. V. 14. № 2. P. 149–164.
29. Hegewald E., Hanagata N. Phylogenetic studies on Scenedesmaceae (Chlorophyta) // *Algol. Stud.* 2000. № 100. P. 29–49.
30. Hegewald E., Wolf M. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Acutodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae) as inferred from 18S rDNA and ITS-2 sequence comparisons // *Plant Syst. Evol.* 2003. V. 241. Iss. 3-4. P. 185–191.
31. Hoham R.W., Bonome T.A., Martin C.W., Leebens-Mack J.H. A combined 18S rDNA and *rbcL* phylogenetic analysis of *Chloromonas* and

Chlamydomonas (Chlorophyceae, Volvocales) emphasizing snow and other cold-temperature habitats // J. Phycology. 2002. V. 38. Iss. 5. P. 1051–1064.

32. Kalina T., Punčochářová M. Taxonomy of the subfamily Scotielloecystoideae Fott 1976 (Clorellaceae, Chlorophyceae) // Algal. Stud. 1987. № 45. P. 473–521.

33. Kaufnerová V., Eliás M. The demise of the genus *Scotiellopsis* Vinatzer (Chlorophyta) // Nova Hedwigia. 2013. B. 97. H. 3-4. P. 415–428.

34. Krienitz L., Bock C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. 2012. V. 698. Iss. 1. P. 295–326.

35. Krienitz L., Bock C., Dadheech P.K., Pröschold T. Taxonomic reassessment of the genus *Mychonastes* (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species // Phycologia. 2011. V. 50. Iss. 1. P. 89–106.

36. Krienitz L., Hegewald E.H., Hepperle D. et al. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) // Phycologia. 2004. V. 43. Iss. 5. P. 529–542.

37. Lewis L.A., Flechtner V.R. Cryptic species of *Scenedesmus* (Chlorophyta) from desert soil communities of western North America // J. Phycology. 2004. V. 40. Iss. 6. P. 1127–1137.

38. Lewis L.A., McCourt R.M. Green algae and the origin of land plants // Amer. J. Bot. 2004. V. 91. № 10. P. 1535–1556.

39. Lewis L.A., Trainor F.R. Survival of *Protosiphon botryoides* (Chlorophyceae, Chlorophyta) from a Connecticut soil dried out for 43 years // Phycologia. 2012. V. 51. № 6. P. 662–665.

40. Lokhorst G.M., Star W. The flagellar apparatus structure in *Microspora* (Chlorophyceae) confirms a close evolutionary relationship with unicellular green algae // Plant Syst. Evol. 1999. V. 217. Iss. 1-2. P. 11–30.

41. Luo W., Pflugmacher S., Pröschold T. et al. Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) // Protist. 2006. V. 157. Iss. 3. P. 315–333.

42. Luo W., Pröschold T., Bock C., Krienitz L. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) // Plant Biol. 2010. V. 12. Iss. 3. P. 545–553.

43. Matzuzaki R., Hara Y., Nozaki H. A taxonomic revision of *Chloromonas reticulata* (Volvocales, Chlorophyceae), the type species of the genus *Chloromonas*, based on multigene phylogeny and comparative light and electron microscopy // Phycologia. 2012. V. 51. Iss. 1. P. 74–85.

44. Matsuzaki R., Hara Y., Nozaki H. A taxonomic study of snow *Chloromonas* species (Volvocales, Chlorophyceae) based on light and electron microscopy and molecular analysis of cultured material // Phycologia. 2014. V. 53. Iss. 3. P. 293–304.

45. Mayr E. Systematics and the origin of species. New York: Columbia Univ. Press, 1942. 334 p.

46. McLean R.J., Trainor F.R. *Fasciculochloris*, a new chlorosphaeracean alga from a Connecticut soil // *Phycologia*. 1965. V. 4. Iss. 3. P. 145–148.
47. Nakada T., Nozaki H. Taxonomic study of two new genera of fusiform green flagellates, *Tabris* gen. nov. and *Hamakko* gen. nov. (Volvocales, Chlorophyceae) // *J. Phycology*. 2009. V. 45. Iss. 2. P. 482–492.
48. Nemcová Y., Eliás M., Skaloud P. et al. *Jenufa* gen. nov.: a new genus of coccoid green algae (Chlorophyceae, *incertae sedis*) previously recorded by environmental sequencing // *J. Phycology*. 2011. V. 47. Iss. 4. P. 928–938.
49. Neustupa J., Eliás M., Sejnohová L. A taxonomic study of two *Stichococcus* species (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) with a starch-enveloped pyrenoid // *Nova Hedwigia*. 2007. B. 84. H. 1-2. P. 51–63.
50. Neustupa J., Eliás M., Skaloud P. et al. *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga // *Phycologia*. 2011. V. 50. Iss. 1. P. 57–66.
51. Neustupa J., Nemcová Y., Eliás M., Skaloud P. *Kalinella bambusicola* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid *Chlorella*-like subaerial alga from Southeast Asia // *Phycological Research*. 2009. V. 57. Iss. 3. P. 159–169.
52. Neustupa J., Nemcová Y., Veselá J. et al. *Leptochlorella corticola* gen. et sp. nov. and *Kalinella apyrenoidosa* sp. nov.: two new *Chlorella*-like green microalgae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) from subaerial habitats // *Int. J. Syst. and Evol. Microb.* 2013a. V. 63. Pt 1. P. 377–387.
53. Neustupa J., Nemcová Y., Veselá J. et al. *Parachloroidium* gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel genus of coccoid green algae from subaerial corticolous biofilms // *Phycologia*. 2013b. V. 52. № 5. P. 411–421.
54. Preisig H.R., Melkonian M. A light and electron microscopical study of the green flagellate *Spermatozopsis similis* spec. nova // *Plant Syst. Evol.* 1984. V. 146. Iss. 1-2. P. 57–74.
55. Pröschold T., Leliaert F. Systematics of the green algae: Conflict of classic and modern approaches // *Unravelling the Algae: the Past, Present, and Future of the Algae Systematics*. London: Taylor and Francis, 2007. P. 123–153.
56. Pröschold T., Marin 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. V. 152. Iss. 4. P. 265–300.
57. Rindi F., Lam D.W., Lopez-Bautista J.M. Phylogenetic relationships and species circumscription in *Trentepohlia* and *Printzina* (Trentepohliales, Chlorophyta) // *Mol. Phy. Evol.* 2009. V. 52. Iss. 2. P. 329–339.
58. Rodríguez F., Feist S.W., Guillou L. et al. Phylogenetic and morphological characterisation of the green algae infesting blue mussel *Mytilus*

edulis in the North and South Atlantic oceans // Dis. Aq. Org. 2008. V. № 81. 3. P. 231–240.

59. Skaloud P., Kalina T., Nemjová K. et al. Morphology and phylogenetic position of the freshwater green microalgae *Chlorochytrium* (Chlorophyceae) and *Scotinosphaera* (Scotinosphaerales, ord. nov., Ulvophyceae) // J. Phycology. 2013. V. 49. Iss. 1. P. 115–129.

60. Skaloud P., Peksa O. Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // Mol. Phylogen. Evol. 2010. V. 54. Iss. 1. P. 36–46.

61. Starr R.C. A comparative study of *Chlorococcum meneghini* and other spherical, zoospore-producing genera of the Chlorococcales. Bloomington: Indiana University Publications. Sci. Ser., 1955. № 20. 111 p.

62. Trainor F.R. The format for a *Scenedesmus* monograph // Algol. Stud. 1991. № 61. P. 47–53.

63. Trainor F.R., Egan P.F. Discovering the various ecomorphs of *Scenedesmus*. The end of a taxonomic era // Arch. Protistenk. 1991. V. 139. № 1-4. P. 125–132.

64. Watanabe S., Mitsui K., Nakayama T., Inouye I. Phylogenetic relationships and taxonomy of sarcinoid green algae: *Chlorosarcinopsis*, *Desmotetra*, *Sarcinochlamys* gen. nov., *Neochlorosarcina*, and *Chlorosphaeropsis* (Chlorophyceae, Chlorophyta) // J. Phycology. 2006a. V. 42. Iss. 3. P. 679–695.

65. Watanabe S., Tsujimura S., Misono T. et al. *Hemiflagellochloris kazakhstanica* gen. et sp. nov.: a new coccoid green alga with a flagella of considerably unequal lengths from a saline irrigation land in Kazakhstan (Chlorophyceae, Chlorophyta) // J. Phycology. 2006b. V. 42. Iss. 3. P. 696–706.

66. Zhang J., Huss V.A.R., Sun X. et al. Morphology and phylogenetic position of a trebouxiophycean green alga (Chlorophyta) growing on the rubber tree, *Hevea brasiliensis*, with the description of a new genus and species // Eur. J. Phycology. 2008. V. 43. Iss. 2. P. 185–193.

Глава 4. Основы молекулярной идентификации (Минчева Е.В., А.Д. Темралеева)

В главе описаны основы ДНК-штрихкодирования зеленых водорослей, возникающие перед исследователем проблемы при использовании этой технологии и пути решения. Обсуждается важность выбора молекулярного маркера и характеристики наиболее популярных из них. Приведена концептуальная схема молекулярной идентификации и филогенетического анализа, указаны принципиальные различия между ними. Рассмотрены принципы работы с генетическими базами данных: **GenBank**, **BOLDSYSTEMS** и **ITS2 DataBase**.

4.1 Методы молекулярной идентификации: преимущества и недостатки, проблемы и пути решения

Концепция вида, пожалуй, наиболее обсуждаемый предмет эволюционной биологии, о чем свидетельствует существование более двадцати определений вида, основанных на различных подходах, методах и критериях (Heu, 2001). Подробно современная концепция вида зеленых водорослей изложена в главе 3.1. Трудности в определении и уточнении таксономического статуса организмов могут быть решены с помощью привлечения различных молекулярных методов идентификации, основанных на анализе последовательностей ДНК и белков. Эти методы имеют теоретическое обоснование в рамках теории нейтральной эволюции, согласно которой большинство из замен в ДНК и белках эффективно нейтральны, и по этой причине неизбежно и по определенными законам накапливаются при расхождении видов (Kimura, 1968; King, Jukes, 1969). В результате этого представители одного вида несут определенную последовательность ДНК (или белка), отличную от представителей других видов. Теоретические предсказания закономерностей молекулярной эволюции достаточно хорошо согласуются с наблюдениями на реальных биологических объектах. Популярным подходом к видовой идентификации организмов является технология ДНК-штрихкодирования, предложенная в 2003 г. канадским ученым Полом Хебертом. Суть данного подхода состоит в молекулярной идентификации разнообразия всего живого мира на основе расшифровки одного и того же участка генома, последовательность которого будет одинаковой у особей одного вида, но отличаться у разных видов. Такой участок называется ДНК-штрихкод (*DNA-barcode*) и должен удовлетворять следующим требованиям (Шнеер, 2009):

1. Короткая длина – не более 700-800 п.н. для облегчения выделения, амплификации и секвенирования ДНК.

2. Консервативность, чтобы штрихкоды можно было амплифицировать с широкоспецифичными праймерами.

3. Легкое выравнивание, т.е. штрихкод должен содержать мало инделей (вставок-удалений).

Таким образом, ген, участок которого мог бы стать потенциальным ДНК-штрихкодом, должен быть хорошо изучен. В настоящее время молекулярные данные о зеленых водорослях быстро накапливаются. Так, например, секвенированы полные геномы 10 зеленых водорослей (ядерные, пластидные или митохондриальные): *Ostreococcus tauri* (Derelle et al., 2006), *O. lucimarinus* (Palenik et al., 2007) и *Micromonas pusilla* и *M. sp.* (Worden et al., 2009), *Chlamydomonas reinhardtii* (Merchant et al., 2007), *Volvox carteri* (Prochnik et al., 2010), *Chlorella variabilis* (Blanc et al., 2010), *Auxenochlorella protothecoides* (Gao et al., 2014), *Coccomyxa subellipsoidea* (Blanc et al., 2012), *Helicosporidium* sp. (de Koning, Keeling, 2006; Pombert, Keeling, 2010). Продолжаются несколько геномных проектов, результатами которых должна стать полная расшифровка геномов зеленых водорослей родов *Coccomyxa*, *Dunaliella*, *Bathycoccus*, *Botryococcus* и дополнительных штаммов *Ostreococcus* и *Micromonas* (Tirichine, Bowler, 2011). Быстро развивающиеся методы технологии высокопроизводительного секвенирования (*Next-Generation Sequencing*, *NGS*) позволяют массово открывать и изучать свойства генов, тем самым расширяя список потенциальных ДНК-штрихкодов для надежной таксономической идентификации организмов.

Для таксономической идентификации зеленых водорослей с помощью технологии ДНК-штрихкодирования необходимо выделить ДНК исследуемого объекта из культуры или природного образца, амплифицировать участок гена (ДНК-штрихкод) с помощью подобранных праймеров и расшифровать его последовательность (рис. 4.1). Далее полученную последовательность нужно сравнить с референсным образцом из базы данных. И согласно принятому уровню генетических различий сделать вывод о принадлежности организма к конкретному таксону. Следует отметить, что ДНК-штрихкодирование все еще остается технологией будущего, т.к. до сих пор не принят официальный ДНК-штрихкод зеленых водорослей, не установлены пороговые величины генетических различий. Возможно, именно потому, что филогенетика еще не исчерпала себя как наука и продолжает бурно развиваться (Алешин, 2013). И в настоящее время для идентификации водорослей до необходимой таксономической категории большинство исследователей используют молекулярно-филогенетический анализ, основная задача которого заключается в установлении родственных связей между живыми организмами на основе изучения структуры макромолекул (ДНК, белков), хотя и включает их идентификацию.

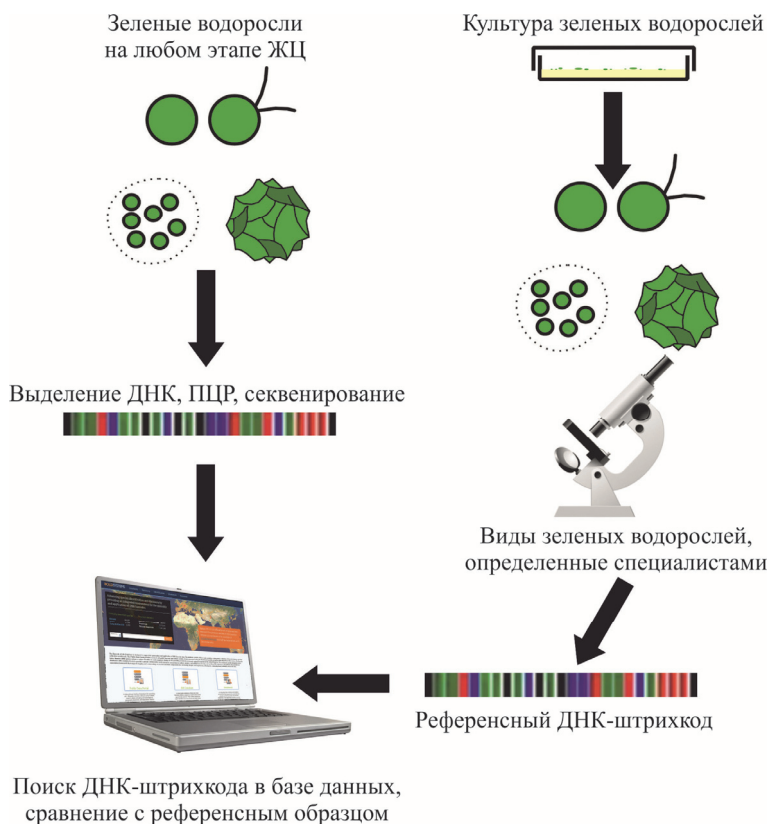


Рис. 4.1. Общая схема видовой идентификации зеленых водорослей с помощью ДНК-штрихкодирования.

Молекулярно-филогенетический анализ можно разделить на 2 блока: молекулярный (работа с ДНК) и филогенетический анализ (работа с расшифрованной нуклеотидной последовательностью). Молекулярный анализ включают следующие процедуры: экстракция или выделение суммарной ДНК, амплификация необходимого фрагмента ДНК с помощью подобранных праймеров, электрофоретическая детекция продуктов амплификации и секвенирование. Полученную расшифрованную последовательность используют в филогенетическом анализе, который состоит из этапов: предварительная работа с генетическими базами данных (поиск гомологии по алгоритму **BLAST**, составление набора данных для дальнейшего анализа и др.), множественное выравнивание, определение эволюционной модели, построение филогенетического дерева, статистическая оценка надежности топологии дерева, интерпретация результатов. Алгоритм молекулярно-филогенетического анализа приведен на рис. 4.2.

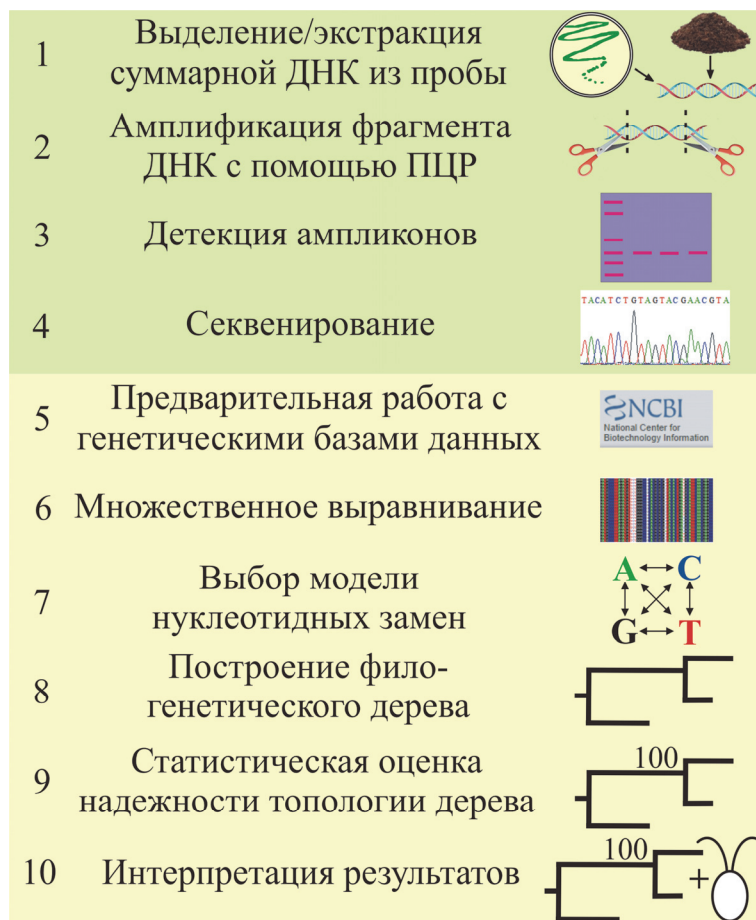


Рис. 4.2. Этапы молекулярно-филогенетического анализа зеленых водорослей.

Примечание. Этапы молекулярного анализа выделены в зеленом блоке, филогенетического анализа – в желтом блоке.

При условии того, что на данном этапе валидность таксономической принадлежности и установленных филогенетических отношений исследуемого штамма не вызывает сомнений, депонированный в генетические базы данных сиквентс считается ваучерным или референсным образцом. При 100%-ном совпадении исследуемой последовательности неизвестного организма с референсным ДНК-штрихкодом верифицированного организма, можно сделать однозначный вывод о принадлежности двух последовательностей одному виду. Следовательно, нет необходимости проводить дальнейший анализ (морфологический, ультраструктурный и др.) исследуемого объекта с использованием различных диагностических признаков и маркеров. Таким образом, успешность молекулярной идентификации в данном

случае определяется наличием в генетических базах эталонов сравнения или ваучерных нуклеотидных последовательностей. В данном случае молекулярная идентификация сводится к процедуре ДНК-штрихкодирования и включает только с 1 по 5 этапы молекулярно-филогенетического анализа (рис. 4.2). Однако если степень сходства менее 100%, возникают варианты принадлежности двух организмов к одному виду, к двум видам одного рода, двум родам и т.д. И так как уровни внутри- и межвидовой дивергенции зависят от времени и скорости накопления замен в нуклеотидной последовательности и для разных таксонов могут существенно различаться, то пороговые значения внутри-, межвидовых и родовых различий должны устанавливаться индивидуально для каждой группы. И, как указывалось выше, никаких универсальных диапазонов генетических различий для таксонов различного ранга у зеленых водорослей не существует. Следовательно, необходимо использовать полный алгоритм молекулярно-филогенетического анализа (с 1 по 10 этапы, рис. 4.2).

В любом случае, и при отсутствии ваучерной или референсной последовательности и при ее не 100%-ной идентичности, дальнейший молекулярно-филогенетический анализ для идентификации таксона или уточнения его филогенетических отношений потребует от исследователя:

- достаточно высокой степени научной квалификации в области филогенетики;
- знаний о систематическом положении изучаемого объекта;
- сведений о номенклатуре объекта (его валидное название, возможные комбинации, синонимика и др.);
- привлечения других видов анализа (морфологического, ультраструктурного, экологического и др.);
- необходимости работать с большим объемом выборки, желательно с широким биогеографическим охватом,
- тщательного выбора молекулярно-генетических маркеров (см. главу 4.2).

4.2. Выбор молекулярно-генетического маркера

Для таксономической идентификации зеленых водорослей и определения их филогенетических взаимоотношений используют целый ряд молекулярных маркеров (Темралеева и др., 2013).

1. Традиционно ядерный ген 18S рРНК является главным филогенетическим маркером для зеленых водорослей. Однако использование одного этого консервативного гена часто не может обеспечить достаточной вариабельности для разделения близкородственных видов, а, следовательно, надежно определить их таксономическую принадлежность. Так, например, в статье Е.В. Минчевой с соавт. (2013) показано, что использование 18S маркера

не позволяет подтвердить самостоятельный таксономический статус зеленых водорослей родов *Draparnaldioides*, *Draparnaldia* и *Chaetophora*, в отличие от ITS. Разграничение видов рода *Chlorosarcinopsis* с помощью 18S маркера также невозможно, в отличие от видов рода *Bracteacoccus* (Hall et al., 2010). Таким образом, использование 18S рДНК целесообразно именно в филогенетических работах: для разделения эволюционно более древних таксонов зеленых водорослей (например, в работах Aboal, Werner, 2011; Neustupa et al., 2011) или выявления новых филогенетических линий (De Wever et al., 2009; Horath, Bachofen, 2009). В то время как для целей идентификации некоторых водорослей на уровне видов он может оказаться неуспешным молекулярным маркером.

2. Ген хлоропластной рибосомной большой субъединицы 23S (универсальный пластидный ампликон UPA) также используется в молекулярно-генетических исследованиях зеленых водорослей. Однако последние работы подтвердили, что он является менее вариабельным, чем другие маркеры, в т.ч. и другие хлоропластные гены (Sherwood et al., 2008; Clarkston, Saunders, 2010).

3. Хлоропластный ген *rbcL*, кодирующий большую субъединицу фермента рибулозобифосфат-карбоксилазы, постепенно становится стандартным вторым маркером для зеленых водорослей после 18S рДНК, и, как правило, топологии филогенетических деревьев, построенных на основе этих двух маркеров, совпадают (Neustupa et al., 2013). Однако существуют и исключения. Иногда, топология дерева на основе данных по гену *rbcL* отличается от таковой по гену 18S рДНК: например, семейство Oocystaceae на дереве *rbcL* не образует кластер внутри порядка Chlorellales (Thüs et al., 2011; Novis, Visnovsky, 2012; Neustupa et al., 2013). Кроме того, не разработаны универсальные праймеры, комплементарные фрагменту данного гена, которые бы успешно амплифицировались у всех представителей отдела Chlorophyta (Nozaki et al., 1995a, 1999, 2000; Buchheim et al., 2010). Вследствие чрезвычайной вариабельности *rbcL* у зеленых водорослей он не является, по сути, универсальным геном. Как альтернатива *rbcL* были предложены другие пластидные гены: *matK*, кодирующий матуразу К, *rpoB* и *rpoC1*, кодирующие субъединицы РНК-полимераз, и межгенный спейсер *trnH-psbA*, расположенный между генами гистидиновой тРНК и геном, контролирующим синтез белка D1 фотосистемы II (Матвеева и др., 2011). В работе Л. Келли с соавт. (Kelly et al., 2010) показано, что локусы *matK* и *rpoC1* являются наиболее вариабельными у водных растений семейства Podostemaceae. Рабочая группа по изучению ДНК-штрихкодирования растений (CBOL Plant Working Group, 2009) рекомендовала использовать в качестве молекулярных маркеров наземных растений *rbcL* и *matK*. Однако пока не удалось амплифицировать *matK* у зеленых водорослей (Pombert et al., 2005; Buchheim et al., 2011) и мхов (von Cräutlein et al., 2011).

4. Ген *tufA*, кодирующий фактор элонгации белкового синтеза хлоропластов, был предложен относительно недавно и исследован в основном у морских зеленых водорослей (Fama et al., 2002). В целом, геномы хлоропластов полезны для филогенетических реконструкций вследствие относительно высокого содержания генов и более плотной их упаковки. Кроме того, в отличие от многих ядерных генов, которые являются по своей природе мультикопийными (представлены в геноме несколькими паралогами, отличающимися между собой по первичной структуре, а иногда и по функциям) и могут запутать филогенетическую реконструкцию, гены органелл, как правило, являются однокопийными и не вызывают таких проблем (Leliaert et al., 2012).

5. Внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2) ядерного рибосомного оперона широко используются для разделения зеленых водорослей на видовом уровне (Verbruggen et al., 2006; Coleman, 2007; Mei et al., 2007; Keller et al., 2008; O'Kelly et al., 2010). ITS1 расположен между ядерным геном малой субъединицы рибосомы (18S) и геном 5.8S рРНК, ITS2 – между геном 5.8S рРНК и ядерным геном большой субъединицы рибосомы (28S). Длина локуса в зависимости от таксона варьирует от нескольких сотен до более тысячи пар нуклеотидов. ITS1 и ITS2 вариабельны и многокопийны, что позволяет их легко амплифицировать у практически всех Viridiplantae с помощью одного набора универсальных праймеров (White et al., 1990). Кроме того, они примыкают к консервативному участку 5.8S рДНК и фланкированы консервативными генами 18S и 28S рДНК, что облегчает создание праймеров (Шнеер, 2009). По эффективности амплификации у зеленых водорослей ген ITS2 предпочтительнее *rbcL* (Buchheim et al., 2011). Однако к недостаткам ITS1 и ITS2 можно отнести высокую вариабельность длины и инделей, сложность в выравнивании и определении ортологичности (Feliner, Rosseló, 2007; Poczaí, Hyvärinen, 2010). Подробно о применении ITS2 в качестве инструмента для разграничений видов зеленых микроводорослей изложено в главе 7.

6. Широко используемый для животных (Moore, 1995; Ferri et al., 2009; Wilson, 2010), некоторых таксонов красных (Sherwood et al., 2008; Le Gall, Saunders, 2010), бурых (McDevit, Saunders, 2010) и диатомовых водорослей (Evans et al., 2007) 5'-фрагмент субъединицы 1 митохондриального белоккодирующего гена цитохром С оксидазы (CO1 или *cox1*) является самым хорошо изученным из перечисленных молекулярных маркеров. Однако для зеленых водорослей этот ген сложен для амплификации (Hall et al., 2010).

В табл. 1 (Прил. 2) представлена сводная информация о наиболее широко используемых молекулярных маркерах и структуре праймеров для различных таксонов зеленых водорослей. Если сравнивать между собой все предложенные локусы, то *rbcL*, ITS2 и *tufA* обладают

умеренной и сильной степенью вариабельности (Hall et al., 2010). CO1, 18S и 23S (UPA) меньше подходят в качестве молекулярных маркеров: 18S и 23S рДНК недостаточно вариабельные для видового уровня, а CO1 не амплифицируется у большинства таксонов. Поэтому для молекулярно-генетического анализа зеленых водорослей необходимо использовать мультилокусный или двухэтапный подход. Так, например, монофилия зеленых водорослей порядка Sphaeropleales не вызывает сомнения, т.к. была подтверждена как данными по вторичной структуре ITS2 (Keller et al., 2008), так и филогенетическим анализом ядерной рДНК и пластидных генов *atpB* и *rbcL* (Verghese, 2007). В то время как филогенетические отношения между тремя классами зеленых водорослей – Chlorophyceae, Trebouxiophyceae и Ulvophyceae – являются спорными (Pröschold, Leliaert, 2007; Zuccarello et al., 2009) и отражают, по-видимому, их древнее происхождение и быструю дивергенцию (O’Kelly, 2007; Cocquyt et al., 2010). Анализ окаменелостей показывает присутствие данных классов в среднем неопротерозе, а молекулярные часы оценивают дивергенцию данных классов в раннем неопротерозе (Butterfield et al., 1994; Douzery et al., 2004; Herron et al., 2009). В некоторых ранних филогенетических работах с использованием 18S рДНК показаны сестринские взаимоотношения между классами Chlorophyceae и Trebouxiophyceae (например, Krienitz et al., 2001), в то время как последние исследования с увеличенной выборкой таксонов выявили бо́льшую генетическую близость между классами Chlorophyceae и Ulvophyceae (например, Friedl, O’Kelly, 2002; Watanabe, Nakayama, 2007; DeWever et al., 2009). Филогенетический анализ на основе хлоропластных генов, как правило, поддерживает сестринские взаимоотношения между Ulvophyceae и Trebouxiophyceae (Pombert et al., 2005; Turmel et al., 2009). Другой пример мультилокусного исследования зеленых водорослей семейства Hydrodictyaceae, систематика которых до недавнего времени основывалась практически целиком на морфологических данных, также не внес ясности: М. Бухгейм с коллегами, используя молекулярные маркеры 18S рДНК, 26S рДНК и ITS2, подтвердили полифилетичность рода *Pediastrum* Meyen и предположили существование еще 4 дополнительных родов: *Stauridium*, *Pseudopediastrum*, *Monactinus* и *Parapediastrum* (Buchheim et al., 2005). Однако Х. Макманус и Л. Левис (McManus, Lewis, 2011), применяя для молекулярно-филогенетического анализа два молекулярных маркера (26S рДНК и *rbcL*), выделили только 2 рода – *Stauridium* и *Monactinus* и указали, что систематика родов *Pediastrum*, *Pseudopediastrum* и *Parapediastrum* требует уточнения и комплексного изучения.

Последние два примера свидетельствуют о том, что до сих пор вопросы: «Как перевести топологию дерева в таксономический ключ? Всегда ли клады, выделенные по отдельным генам, соответствуют

самостоятельным видам или другим таксонам? Какова должна быть мера различий между видами?» – остаются открытыми и требуют дальнейших исследований.

В целом, при выборе молекулярного маркера для идентификации зеленых водорослей исследователю следует учесть:

1. Возможность сравнения выбранного маркера с уже имеющимися в генетических базах данных последовательностями предположительно родственных групп на выбранном уровне таксономической детализации.

2. Для анализа таксонов со значительным уровнем дивергенции (семейства, порядки) нужен менее изменчивый маркер (например, 18S рДНК) по сравнению с тем, который потребуется для изучения близкородственных видов (например, ITS2, *rbcL*). Неправильный выбор молекулярного маркера может привести к необоснованному объединению или разделению таксонов, т.е. к ошибкам в идентификации.

В случае идентификации нового таксона при определении его филогенетического положения внутри отдела Chlorophyta необходимо использовать несколько независимо эволюционирующих маркеров, например ядерных и хлоропластных. Как правило, молекулярный анализ одного гена не обеспечивает достаточного разрешения для установления филогенетических отношений большинства организмов, а иногда дает противоречивые результаты (как отмечено в примерах выше), которые часто связывают с ограниченным числом выровненных нуклеотидов или с различной скоростью генетической эволюции организмов (Sunnucks, 2000). Молекулярный анализ, основанный на использовании нескольких генов, увеличивает филогенетическое разрешение и лучше согласуется с морфологическими признаками таксона (Gontcharov et al., 2004).

4.3. Работа с международными генетическими базами данных

Для видовой идентификации и установления филогенетических взаимосвязей собственные экспериментальные данные необходимо сравнить с последовательностями, полученными ранее другими исследователями. С целью хранения, систематизации и анализа генетической информации существует целый ряд международных баз данных или генетических банков. Как правило, доступ к этим базам данных свободный, без регистрации. В настоящее время существует Международный консорциум баз данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей (*International Nucleotide Sequence Database Collaboration*), в который входит **GenBank** Национального центра биотехнологической информации США (*National Center for Biotechnology Information, NCBI*), **EMBL-Bank** Европейской молекулярно-биологической лаборатории (*European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute*) и **DDBJ** Японии (*DNA Data Bank of Japan*). Кроме того, существуют независимые базы данных,

например, **BOLDSYSTEMS** (*Barcode of Life Data System*) – база данных ДНК-штрихкодов, **PIR** Национального биомедицинского исследовательского фонда США (*Protein Identification Resource, National Biomedical research Foundation*) и **SWISS-PROT** Университета Женевы и Института биоинформатики, Швейцария (*Protein Sequence Data Bank*) и др.

Каждый исследователь может не только использовать нуклеотидные или аминокислотные последовательности из генетического банка, но и депонировать собственные последовательности, создав новую запись и заполнив определенные формы с информацией о таксономическом статусе организма, характеристике локуса, авторах, публикации (если имеется) и т.д. После периода премодерации каждой новой генетической последовательности, поступившей в банк, присваивается идентификатор или уникальный номер (*Accession number*), а сама последовательность становится доступна пользователям со всей сопровождающей ее информацией (в том случае, если автором не были установлены временные ограничения – *Release Data*), т.е. последовательность становится аннотированной. Любой генетический банк является не просто местом хранения генетической информации, но и предоставляет исследователям различные программы и сервисы, позволяющие анализировать собственные и чужие данные. Наиболее гибкую, эффективную и всестороннюю, а потому и наиболее часто используемую, платформу для доступа, депонирования и анализа генетической информации предоставляет **GenBank** (Benson et al., 2008). Поэтому остановимся на нем поподробнее.

GenBank позволяет найти и получить генетическую информацию в виде аминокислотных или нуклеотидных последовательностей различных организмов, а также сортировать эти последовательности по какому-либо признаку (характеристика локуса, конкретный таксон, автор, ключевые слова, журнал, длина последовательности, дата публикации и др.). Кроме того, **GenBank** предоставляет пользователю ряд возможностей для анализа собственных и депонированных другими исследователями данных. В первую очередь, это сравнительный анализ с помощью алгоритма **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*). **BLAST** осуществляет поиск похожих последовательностей в базах данных и сравнение их с исследуемой. Главным достоинством алгоритма является скорость. При этом можно сравнивать как собственно нуклеотидные последовательности, так и кодируемые ими аминокислотные последовательности. В настоящее время **BLAST** позволяет учитывать вставки и делеции при поиске схожих последовательностей, используя алгоритмы локального выравнивания. Семейство программ серии **BLAST** делится на несколько групп (табл. 4.1).

Табл. 4.1. Программы **BLAST**-поиска (цит. по: Обзоры, 2014)

Тип BLAST	Назначение
<i>Blastp</i>	Сравнение заданной аминокислотной последовательности с базой данных белковых последовательностей
<i>Blastn</i>	Сравнение заданной нуклеотидной последовательности с базой данных нуклеотидных последовательностей
<i>Blastx</i>	Сравнение заданной нуклеотидной последовательности, транслированной в 6-ти рамках считывания, с базой данных белковых последовательностей
<i>tblastn</i>	Сравнение заданной нуклеотидной последовательности с базой данных нуклеотидных последовательностей, транслированных в 6-ти рамках считывания
<i>tblastx</i>	Сравнение заданной нуклеотидной последовательности, транслированной в 6-ти рамках считывания

Работа со всеми вариантами **BLAST** очень сходна. Итак, вернемся к алгоритму, приведенному в разделе 4.1. (рис. 4.2), а именно пункту 5 «предварительная работа с международными генетическими базами данных». Для идентификации неизвестного организма, используя методы молекулярного анализа, мы должны сравнить полученную последовательность с последовательностями, хранящимися в базе данных **GenBank**. Для начала необходимо выбрать программу, в нашем случае «*nucleotide blast*», загрузить последовательность или файл с ней (в формате *FASTA*) или ввести ее идентификационный номер (*ID*), если она уже депонирована в **GenBank** (рис. 4.3).

The screenshot displays the NCBI BLAST search interface. At the top, it says "Standard Nucleotide BLAST". Below this, there are tabs for "blastn", "blastp", "blastx", "tblastn", and "tblastx". The "blastn" tab is selected. The main section is titled "Enter Query Sequence" and contains a large text area for "Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)". To the right of this area are "Clear" and "Query subrange" buttons. Below the text area, there are fields for "From" and "To". Further down, there is a section for "Or, upload file" with a button labeled "Обзор" and a message "Файл не выбран". Below this is a "Job Title" field with a placeholder "Enter a descriptive title for your BLAST search". There is a checkbox for "Align two or more sequences". The "Choose Search Set" section is expanded, showing "Database" options: "Human genomic + transcript", "Mouse genomic + transcript", and "Others (nr etc.)". The "Organism" section is also expanded, showing a text input for "Enter organism name or id—completions will be suggested" and a checkbox for "Exclude". The "Exclude" section has checkboxes for "Models (X/M/D/P)" and "Uncultured/environmental sample sequences". The "Limit to" section has a checkbox for "Sequences from type material". The "Entrez Query" section has a text input for "Enter an Entrez query to limit search" and buttons for "You" and "Create custom database". The "Program Selection" section is also expanded, showing "Optimize for" options: "Highly similar sequences (megablast)", "More dissimilar sequences (discontiguous megablast)", and "Somewhat similar sequences (blastn)". There is a button for "Choose a BLAST algorithm".

Рис. 4.3. Вид поисковой страницы **BLAST**.

Далее эта последовательность будет называться «*Query*» (Запрос), а сравниваемые последовательности из банка – «*Sbjct*». Для поиска нуклеотидных последовательностей необходимо указать, следует ли вести поиск среди последовательностей человека («*Human genomic + transcript*»), мыши («*Mouse genomic + transcript*») или других организмов («*Others*») как в случае с поиском последовательностей зеленых водорослей. Далее можно выбрать один из типов программ поиска, отличающихся по скорости и чувствительности: поиск высоко сходных последовательностей («*Highly similar sequences (megablast)*»), менее похожих последовательностей («*More dissimilar sequences (discontiguous megablast)*»), отчасти похожих последовательностей («*Somewhat similar sequences (blastn)*»). Для поиска ближайших гомологов полученной исследователем последовательности необходимо выбрать «*Highly similar sequences*» (для идентификации и филогенетического анализа на видовом и родовом уровнях). Для идентификации и установления филогенетических отношений на более высоких таксономических уровнях следует применять более мягкий критерий. Дополнительно можно изменить параметры поиска во вкладке «*Algorithm parameters*», например, максимальное количество сравниваемых последовательностей (чем меньше задано последовательностей, тем быстрее время поиска), оптимизировать настройки для коротких запросов (50 нуклеотидов и менее), статистическую значимость и т.д. Собственно, после этого можно запустить алгоритм, нажав кнопку «*BLAST*». Представленная после расчетов информация состоит из четырех блоков: краткая аннотация запроса, графическая информация «*Graphic Summary*», описание «*Descriptions*», выравнивания «*Alignments*».

Аннотация содержит информацию о названии базы данных, типе и версии программы (в примере это *BLASTN 2.2.30*), типе молекулы, названии организма, гена и длине последовательности (рис. 4.4). В поле «*Other Reports*» расположены активные ссылки на «*Search Summary*», где содержится информация о параметрах поиска и статистических характеристиках; «*Taxonomy reports*», где приводятся данные о классификации всех организмов, найденных при поиске в **BLAST**; и ссылка «*Distance tree of results*», при нажатии на которую открывается дерево генетических дистанций, построенное на основе попарного выравнивания.

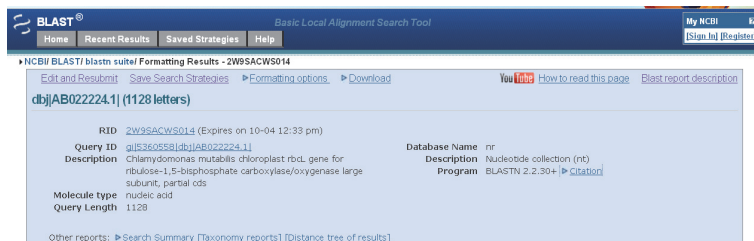


Рис. 4.4. Аннотация поиска в **BLAST** последовательности AB022224.1 зеленой водоросли *Chlamydomonas mutabilis*.

Ниже следует блок «*Graphic Summary*», где отображается графическое представление найденного сходства (рис. 4.5). Наиболее похожие последовательности находятся в верхней части графика. При наведении курсора на линию во всплывающем окне можно увидеть информацию о сравниваемой последовательности, одинарный щелчок мыши позволяет перейти к подробной информации о выравнивании этой последовательности с последовательностью-запросом. Цветовая кодировка предназначена для оценки выравнивания. Красными сплошными линиями обозначены очень похожие последовательности (≥ 200 – счета выравнивания). Розовыми сплошными линиями показаны вероятные гомологи, которые требуют особого внимания. Длинными зелеными, синими и черными полосами представлены более отдаленные гомологи. Прерывистые полосы свидетельствуют о сходстве только определенной части последовательности.

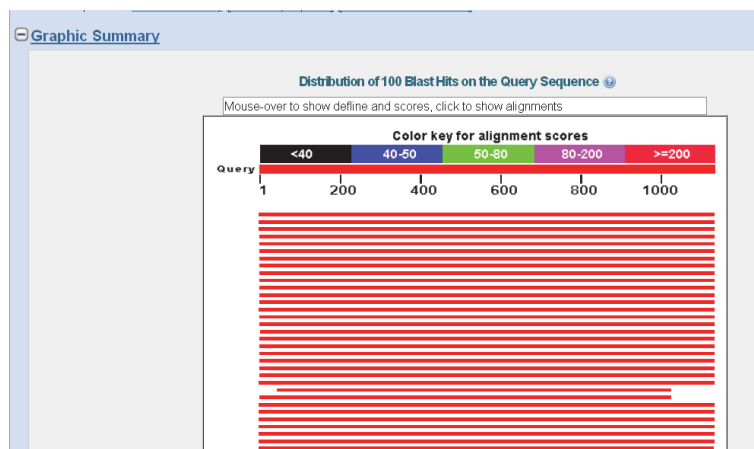
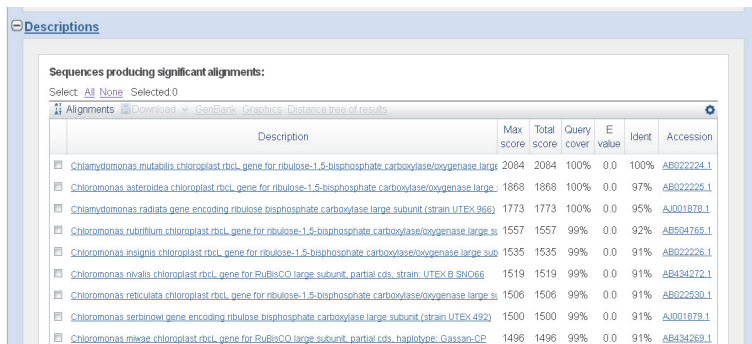


Рис. 4.5. Блок «*Graphic Summary*»: графическое представление найденной гомологии из отчета **BLAST**.

Примечание. Показаны результаты для последовательности AB022224.1 зеленой водоросли *Chlamydomonas mutabilis*.

Далее следует блок «*Descriptions*», данные которого представлены в виде таблицы с подробным описанием выравнивания для каждой последовательности (рис. 4.6).



The screenshot shows the 'Descriptions' section of a BLAST search result. It includes a table with the following columns: Description, Max score, Total score, Query cover, E value, Ident, and Accession. The table lists several sequences related to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) from various Chloromonas species.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Chloromonas mutabilis chloroplast rbcL gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large	2084	2084	100%	0.0	100%	AB022224.1
Chloromonas asteroides chloroplast rbcL gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large	1868	1868	100%	0.0	97%	AB022225.1
Chloromonas radiata gene encoding ribulose biphosphate carboxylase large subunit (strain UTEX 966)	1773	1773	100%	0.0	95%	AF001878.1
Chloromonas rubriflora chloroplast rbcL gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large su	1557	1557	99%	0.0	92%	AF594765.1
Chloromonas insipida chloroplast rbcL gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large sub	1535	1535	99%	0.0	91%	AB022226.1
Chloromonas nivalis chloroplast rbcL gene for RuBisCO large subunit, partial cds, strain: UTEX B-5NC66	1519	1519	99%	0.0	91%	AF434272.1
Chloromonas reticulata chloroplast rbcL gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large su	1506	1506	99%	0.0	91%	AB022530.1
Chloromonas serbinowii gene encoding ribulose biphosphate carboxylase large subunit (strain UTEX 492)	1500	1500	99%	0.0	91%	AF001879.1
Chloromonas macleod chloroplast rbcL gene for RuBisCO large subunit, partial cds, haplotype: Gassan-CP	1496	1496	99%	0.0	91%	AF434269.1

Рис. 4.6. Блок «*Descriptions*»: описание выравнивания каждой последовательности из отчета **BLAST**.

В таблице, приводимой в начале страницы с результатами, для каждой нуклеотидной записи приводятся следующие данные:

1. Описание (*Description*) – название таксона, номер штамма, локус.
2. Максимальный вес (сходство) выравнивания (*Max score*).
3. Общий вес выравнивания (*Total score*). Значения «*Max score*» и «*Total score*» совпадают, если был всего один участок сходства (*matches*), по которому производилось выравнивание.

4. Показатель *E-value* – ожидаемое число последовательностей с таким же или большим весом при поиске в базе данных случайных последовательностей. Он показывает вероятность того, что сходство данных последовательностей случайно, т.е. вероятность того, что две (или более) столь сходные последовательности могли возникнуть независимо друг от друга, а не произошли от общей предковой последовательности. Чем выше степень сходства и чем оно протяженнее, тем больше баллов (*Score*) получает пара, и тем меньше для нее показатель *E-value* (для очень сходных последовательностей, когда *E-value* принимает значение менее 10^{-150} , в таблице отображается 0).

5. Доля покрытия (*Query cover*) – процент, который составляет гомологичный участок в найденной последовательности от ее общей длины.

6. Идентичность (*Ident*) – процент совпавших нуклеотидов/аминокислот. По умолчанию сортировка вывода **BLAST** производится по значению «*Score*»; если в базе данных имеется идентичная, но неполная последовательность, то она может попасть в середину списка или даже вообще не попасть в выборку, которая по умолчанию состоит из 100 последовательностей с наибольшим весом

выравнивания. Таким образом, имеет смысл просмотреть находки с высоким значением идентичности (*Ident*) и малой долей покрытия (*Query cover*).

Последний блок «Alignments» содержит подробную информацию о каждом попарном выравнивании (рис. 4.7). Каждое выравнивание начинается с описания сравниваемой последовательности (*Sbjct*) и идентификационного кода (*Sequence ID*), при нажатии на который можно перейти к странице выбранной последовательности. При сравнении последовательностей нуклеиновых кислот обязательно указывается, в каком направлении производилось выравнивание. Если обе последовательности выравнивались в одном и том же направлении, то это обозначается как «Strand=Plus/Plus». Если последовательности оказываются комплементарны друг другу, то для выравнивания одна из них «переворачивается», то есть заменяется на комплементарную самой себе. **BLAST** «переворачивает» последовательность из базы (*Sbjct*), что обозначается как «Strand=Plus/Minus»; при этом нумерация нуклеотидов в «перевернутой» последовательности сохраняется и идет от конца к началу. Между идентичными нуклеотидами проведена вертикальная черта, в противном случае ставится пробел, разрыв последовательности обозначен знаком «-».

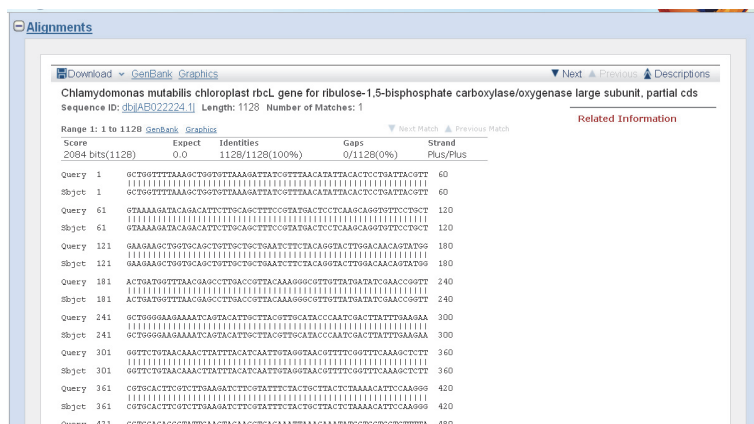


Рис. 4.7. Блок «Alignments»: попарное выравнивание последовательностей из отчета BLAST.

Следует помнить, что поиск в базе данных последовательностей, схожих с анализируемой, важен, но не является доказательством их общего происхождения (Лукашов, 2009). Если в результате поиска не было обнаружено 100%-ного сходства исследуемой последовательности с депонированными в **GenBank**, то следующим шагом станет молекулярно-

филогенетический анализ для идентификации объекта и установления его филогенетического положения. Для этого необходимо подготовить набор данных (*dataset*), состоящий из наиболее схожих последовательностей, найденных при помощи **BLAST**. К данной выборке следует добавить внешнюю группу (*outgroup*) – последовательность близкого таксона, но не входящего в исследуемую совокупность (подробнее в главе 6).

Если необходимо оценить представленность нуклеотидных последовательностей конкретного таксона в базе данных **GenBank**, следует воспользоваться системой **Entrez** (Geer, Sayers, 2003). Она является интегрированным компонентом **GenBank** и служит для поиска конкретных последовательностей по определенным критериям запроса (название, идентификационный номер, молекулярный маркер и др.) Система **Entrez** состоит из трех блоков: «*Nucleotide*» – информация о нуклеотидных последовательностях, «*EST*» (*expressed sequence tags*) – короткие (порядка 300-500 п.н.) последовательности кДНК, «*GSS*» (*genome survey sequences*) – короткие геномные последовательности. Эти блоки синхронизированы между собой, поэтому при поиске, например, в блоке «*Nucleotide*» всегда можно видеть ссылки на результаты в «*EST*» и «*GSS*» (рис.4.8).

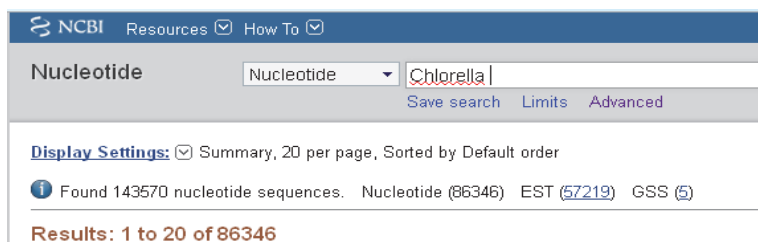


Рис. 4.8. Поиск нуклеотидных последовательностей в блоке «*Nucleotide*» на примере зеленых водорослей рода *Chlorella*.

Примечание. Представлены ссылки на результаты поиска в «*EST*» и «*GSS*».

Для поиска последовательностей по имени автора, необходимо вводить поисковый запрос следующего вида: фамилия, затем инициалы без знаков препинания, далее [*Author*], например, «*Temraleeva AD [Author]*». Или задать в расширенном поиске (*Advanced*) соответствующие запросу критерии. Возможно использование в поисковом запросе идентификационного номера, например, KF652114. Поиск можно осуществлять с помощью логических операторов «*AND/OR/NOT*» (и/или/не). Логический оператор «*AND*» позволяет найти записи, содержащие каждое из условий поиска, оператор «*OR*» может исключать одно из условий поиска, а оператор «*NOT*» отрицает одно из условий поиска. Например, по запросу «*ITS1 AND ITS2 Chlorella*» найдено 262 записи; «*ITS1 OR ITS2 Chlorella*» – 627199 записей и «*ITS1 NOT ITS2*

Chlorella» – найдено 626890 записей. В левой части страницы (в окне с найденными по запросу последовательностями) есть возможность установить различные ограничения поиска (фильтры), что позволит, в конечном счете, составить определенную выборку записей из множества найденных данных **GenBank**.

Допустим необходимо найти в **GenBank** все имеющиеся нуклеотидные последовательности для зеленых водорослей. В поле для поиска вводим «*green algae*» или «*Chlorophyta*» (либо в зависимости от цели поиска – название вида, рода и т.п.) и жмем «*Search*». На рис.4.9 представлен результат поиска, слева в ряд расположены дополнительные фильтры, которые могут ограничить поиск последовательностей по таксонам (*Species*), типу молекулы (*Molecule types*), базам данных (*Source databases*), субклеточной локализации ДНК (*Genetic compartments*), длине последовательности (*Sequence length*), дате выхода (*Release data*) или ревизии (*Revision date*) записи.

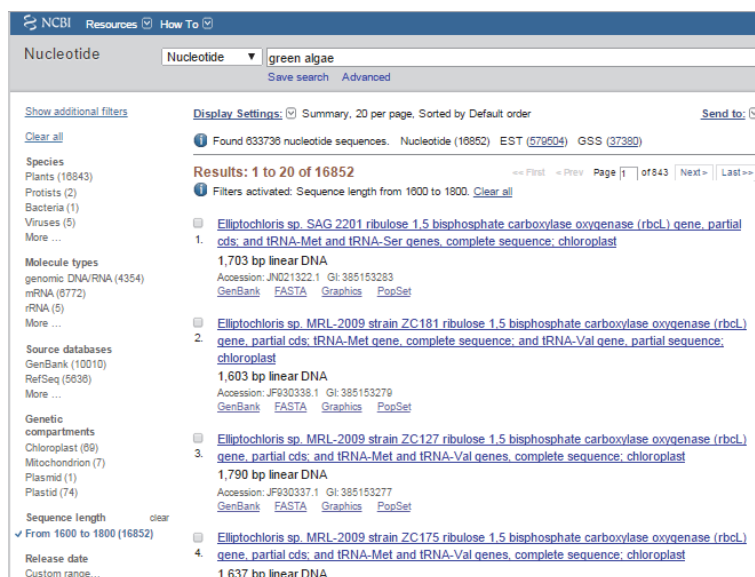


Рис. 4.9. Результат поиска нуклеотидных последовательностей по запросу «*green algae*».

Примечание. Установлен фильтр по критерию – длина последовательности (1600-1800 п.н.), правая часть страницы не показана.

Если из всех результатов поиска необходимо выбрать только определенные категории (например, нуклеотидных последовательностей одного вида), можно воспользоваться основными фильтрами (*Manage Filters*), расположенными в правой части страницы (рис. 4.10).

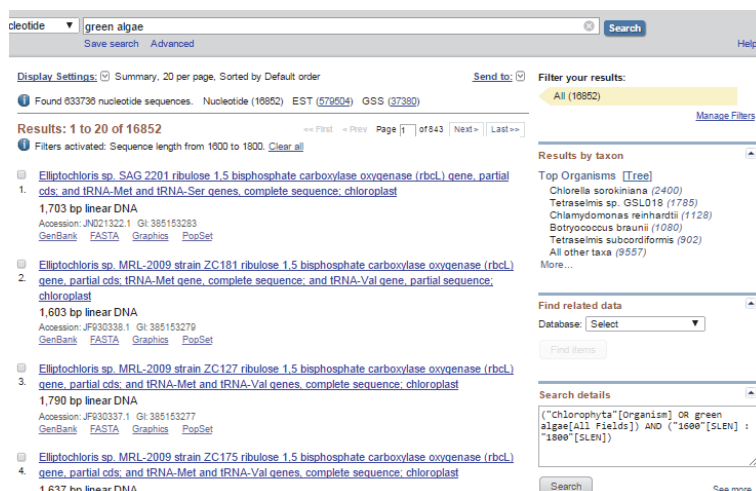


Рис. 4.9. Результат поиска нуклеотидных последовательностей по запросу «green algae».

Примечание. Левая часть страницы не показана.

С помощью поля «Find related data» можно найти дополнительную информацию о представленных последовательностях в других базах данных – **PubMed** (публикации), **PopSet** (набор последовательностей для анализа из одной работы), **Taxonomy** (таксономическая классификация) и т.п. В меню настроек экрана (*Display Settings*), которое появляется в верхнем левом углу страницы представления результатов, есть возможность выбрать нужный формат данных (*Format*), количество представленных на странице записей (*Items per page*), сортировать данные (*Sort by*) по критериям. После выбора настроек для их активации необходимо нажать кнопку «Apply» (рис. 4.11).

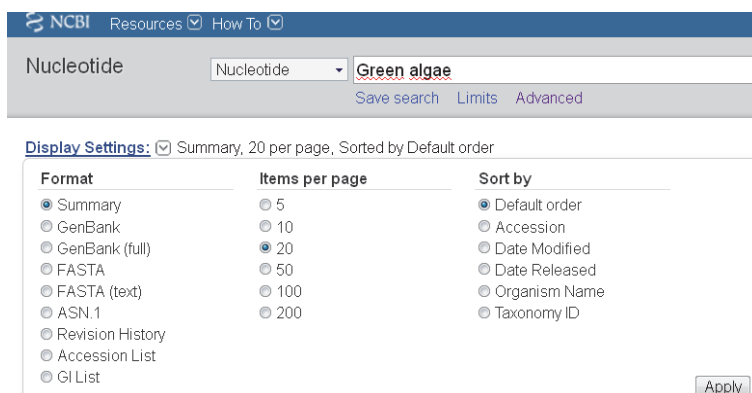


Рис. 4.11. Настройка отображения данных поиска нуклеотидных записей.

Для сохранения данных поиска в один файл в формате *FASTA* необходимо нажать кнопку «*Send to*» в левом верхнем углу страницы, затем выбрать в открывающемся списке «*File*» и его формат, нажать кнопку «*Create file*» (рис. 4.12). В файле будут отображены только выделенные последовательности, если не было выделено ни одной записи, то все последовательности, найденные в соответствии с критериями поиска. При составлении набора данных рекомендуем не сохранять автоматически все предложенные результаты поиска, а просмотреть дополнительную информацию о каждой нуклеотидной последовательности, которую Вы планируете включить в дальнейший филогенетический анализ. Подобная предварительная проверка позволит исключить сомнительные записи и отобрать только надежные данные: нуклеотидные последовательности, депонированные ведущими альгологическими коллективами, длинные и полностью «прочитанные» последовательности, последовательности аутентичных штаммов водорослей и др. Последовательности выбранного молекулярного маркера следует сохранить в отдельный файл, который по умолчанию называется «*sequence.fasta*».

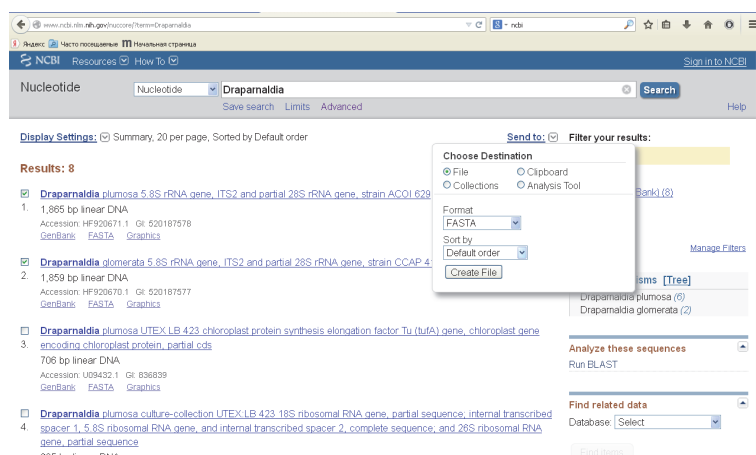


Рис. 4.12. Создание файла, содержащего нуклеотидные последовательности водорослей рода *Draparnaldia*.

Если депонированная последовательность состоит из нескольких генов и межгенных спейсеров, например, 18S, ITS1, 5.8S ITS2, 28S или в ее состав включены интроны, то в аннотации обычно указывается длина таких участков и местоположение. Зная эту информацию любой интересующий фрагмент из такой последовательности легко вырезать в программе для визуализации и редактирования последовательностей, например **BioEdit**. При отсутствии такой информации, подобную

нуклеотидную последовательность можно попробовать аннотировать в **ITS2 DataBase**.

Кроме того, создать файл с данными можно вручную, для этого необходимо, чтобы нуклеотидная последовательность отображалась в формате *FASTA* (рис. 4.13).

Draparnaldia plumosa 5.8S rRNA gene, ITS2 and partial 28S rRNA gene, strain ACOI 629

GenBank: HF920671.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

>gi|520187578|emb|HF920671.1| Draparnaldia plumosa 5.8S rRNA gene, ITS2 and partial 28S rRNA gene, strain ACOI 629

```
TAACTAAGACAACTCTCAACCGGATATCTGGCTCTGCCACGATGAAGACGCACGAAATCGGATA
CTGTAGTGTGAATTGCAAACTCCGTGAACCATGAACTTTGAAGCATATTGCGCTCGAGGCTCGGCG
GAGAGCATGTCTGCTCAGCTCGGCTTACCCATCACCCCTCTCTCATGCTCTGCGATGTGTGGCTCGG
GTGGACCTGGCACTCTCAGCAGCGCTCGCGGCGGCTGGCTCTGCCAAGAAATAGAAGCTTGAAGCAGGA
CCCGATCACGGCAACAACCTGGGTGGGCGAGCTCTCTGCAACTAGTTGGAGCTTGGGACCTGCTGGGGGG
CCGAGGAAAGCAGCGGCTTGGCTGTGAACACTCACTATTGACCTGAGCTCAGGCAAGATTACCCGCT
GAACTTAAGCATATCAATAAGCGAGGAAAGAACTACAGAGGATTCCTTAGTAAGCGAGCGAAGC
GGGAATAGCCAACTTGGAAATCTCTCTGGAGAAATTGACTCTATAGAAGCGGCTCTTGCAGCGGCGG
GTCCCAAGTCCCTTGAAGGGGGGCTGTCTTGAAGGTTGAAGCCCGCTGGAACCTTGGTGGGCTGCTCA
CGAGTGCTTTGAAGAGCTCGGTTGTTTGGGAATGAGCCCAAGCTGTGTGTAATCTCATCTAAGGC
TAAATATTGGCGAGAGCCGATAGCGAACAACTAGTCCGCGAGGGAAGATGAAGAACTTTGAAAAGAGA
GTTAAAAAGTGTCTGAATTTGTTAGGGGGGAGCGATTGGCAGCTGCTGTGACCCAGGCTTACGCGCG
CTAACGATCGCTGCACTGGCTGGGTTGTTGTCAGCATGGGTTGGCTTGGCAGGATTAACGCGGGGTT
GTTACTCGCTTATGCTCGCGGGCGACGAGGCGTGAAGGCGCTCTTCTGCTGGGATCTGCGGCT
CGAGATGCTCGGAGGAGCTTTCAATCGCGGCTCTTGAACACGAGCAAGGCTCAACTGTATGCG
AGCTGTGGTGTGTAACCCATGAGGCGCGCAAGTAACTGACTTTGGTGGATGGCCGCAAGGCTGCAAC
ATCGACCGACGCTGATCTCTGTGAAAAGTTTCAAGTACGATACCTGTTGGGACCGAAGATGTGTA
ACTATGCTTGAAGCAGGCGCAAGCAGAGGAACTGTGGAGGCTGTAGATGTGCTGACGTGCAAAATC
GCTTTTGGAGTGTGGTAAAGGGGAAAGACTAATGAAACATCTAGTAGTGTGCTTCTGAAATTT
CCCCAGAGTATGCTGAGACTGTGTGTCAGTTTATCGGTTAAGCTAATGATTAGAGTTCGGGGATG
AAACTCTTCCCACTTCTCAAACTTAAATAGTAAGTGTGAGTTGCTTAACTGAACACACGAT
TCAATGAGAGTCCAAAGTGGGCACTTTTGGTAAGCAGAACTGGCGATCGGGATGAACGATGTTGG
TTAAGTGGCGGCACTCGGCTAACTAGATCCCAAGAGGTTGTTGATTGATACAGACAGCAGGAGCGT
GCTCATGGAAGTCAAACTCGCTAAGAGTGTGTAAACAACTCACTGCGCAATCAATTAGCCCCGAAAT
GATGGCTGAAGCGCTGACTTAACCGGCTGAGGCGCAAGTGGAGCTCCATGATGATGAAGG
CTGGGTTGCTGCGGAGCTGGGCGGTGACCCCGGTTGAAGCGCACTAGTGCAGATTTTGGTGTGA
GTAGCAATATTCAATGAGAACTTGAAGACTGAAGGGGAGAA
```

Рис. 4.13. Пример отображения записи HF920671.1 зеленой водоросли *Draparnaldia plumosa* в формате *FASTA*.

Последовательность нужно скопировать и вставить в новый текстовый документ, таким же образом поступить с остальными последовательностями, которые будут использоваться в дальнейшем филогенетическом анализе. В итоге все записи должны быть собраны в одном текстовом файле с расширением *.fas*. Как отмечалось выше информацию о каждой последовательности необходимо отдельно просмотреть и принять решение о включение ее в выборку для анализа. Просмотр записи удобнее всего осуществлять в формате *GenBank* (рис. 4.14). Первая строка «*LOCUS*» (Локус) содержит информацию о названии локуса, длине представленной последовательности, типе молекулы и дате последнего изменения записи. Название локуса – уникальный идентификатор, состоящий из букв и цифр. Как правило, для 6-символьных форм первая буква – это название рода и вида, а затем регистрационный номер, а для 8-символьных (JF930330 на рис. 4.14) – название локуса это просто номер доступа (*Accession number*). Длина последовательности – это количество пар оснований, в примере составляет 1706 п.н. Максимального ограничения на размер последовательности, передаваемой в **GenBank** нет, можно депонировать полногеномные данные. Тем не менее, существует ограничение для

индивидуальной записи в 350 Кб с некоторыми исключениями (например, если длина одного гена превышает 350 Кб). Это ограничение было сделано по результатам международной договоренности для облегчения обработки данных о последовательностях с помощью различных программ. Минимальная длина депонированной последовательности составляет 50 пар нуклеотидов.

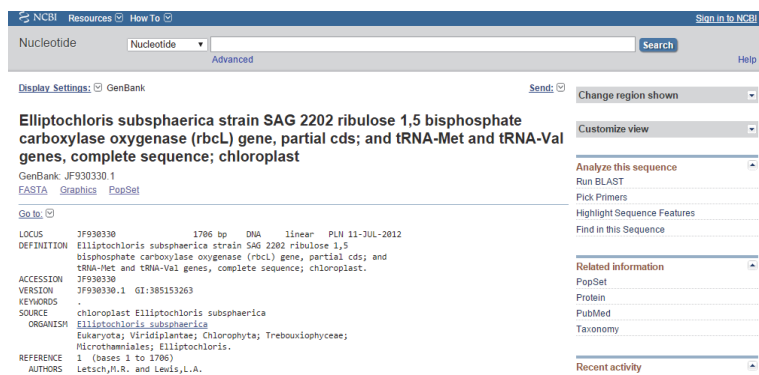


Рис. 4.14. Пример отображения записи JF930330.1 зеленой водоросли *Elliptochloris subsphaerica* в формате *GenBank*.

Далее следует информация о молекуле, последовательность которой была прочитана. В **GenBank** могут быть представлены фрагменты геномной ДНК, РНК, молекулы РНК-предшественника, мРНК (кДНК), рибосомной РНК, транспортной РНК, малой ядерной РНК и малой цитоплазматической РНК. В нашем примере тип молекулы: ДНК (*DNA*). Трехбуквенной аббревиатурой обозначается раздел **GenBank**, к которому относится данная последовательность. На рис. 4.14 указано «*PLN*» (*plant, fungal and algal sequences*), что означает последовательность растений, грибов или водорослей. Затем указана дата последнего изменения последовательности: *11_JUL_2012*. В некоторых случаях дата последнего изменения может соответствовать дате релиза (открытие доступа). В следующей строке «*DEFINITION*» (Определение) содержатся сведения о названии организма, названии гена и(или) некоторые описания (в случае если последовательность не кодирующая). Если последовательность имеет кодирующую область *CDS* (*Coding DNA Sequences*), то описание может сопровождаться характеристиками степени ее полноты (частичная или полная). Далее следует номер доступа «*ACCESSION*», затем «*VERSION*»: это поле характеризует изменения в последовательности. Параллельно уникальному идентификационному номеру присваивается порядковый номер *GI* (*GenInfo*) (в примере, *GI: 385153263*). Если данные о последовательности корректируются, *GI* изменяется. В поле «*KEYWORDS*» находятся ключевые слова или фразы, описывающие

последовательность. Если таковые не включены в запись, то ставится точка. Ключевые слова обычно присутствуют в более ранних записях. В следующей строке записана информация об источнике «*SOURCE*», сведения о котором предоставляется в произвольном формате: родовое или видовое название организма, иногда тип молекулы. В поле «*ORGANISM*» находится информация о принятом названии организма и его таксономия по данным **Taxonomy Database**. Названия работ, в которых обсуждаются приведенные последовательности, располагаются в поле «*REFERENCE*». Ссылки автоматически сортируются по дате публикации: «*REFERENCE1*», «*REFERENCE2*» и т.д. Работы, которые еще не опубликованы, имеют статус «не опубликовано» или «в печати». Когда номер доступа или последовательность будет опубликована, авторам нужно сообщить об этом в **GenBank** и предоставить ссылку на работу. Последнее цитирование обычно содержит информацию о заявителе последовательности, месте его работы и почтовый адрес. Отдельно приводится список авторов «*AUTHORS*», название опубликованной работы «*TITLE*», название журнала «*JOURNAL*», а также ссылка на публикацию в базе данных **PubMed** «*PUBMED*». В строке «*FEATURES*» записана информация о гене или продукте генной экспрессии, областях биологической значимости в последовательности. Поле «*source*» – обязательная функция в каждой записи - предоставляет данные о длине последовательности, названии организма и его таксономической принадлежности и идентификационном номере таксона (дается ссылка на **Taxonomy Browser**). Это поле по усмотрению заявителя последовательности может быть дополнено сведениями о географическом местообитании, номере штамма, типе ткани и т.д. *CDS (coding sequences)* – кодирующая последовательность, то есть область нуклеотидов, которая соответствует аминокислотной последовательности в белке – включает в себя стартовый и стоп-кодон. Представленные последовательности могут быть полными (в этом случае их длина обозначается цифрами, например, 1...1827), неполной на 5' – конце (обозначается знаком «<», например, <1...305) или неполной на 3' – конце (обозначается знаком «>», например, 306...701>). Для кодирующей последовательности должен быть представлен идентификационный номер белковой последовательности (*protein_id*) – такие номера состоят из трех букв и пяти цифр, точки и номера версии, в нашем примере это AF143887.1. Последнее поле записи «*ORIGIN*» содержит саму последовательность. В правой части страницы записи в формате *GenBank* расположены прямые ссылки на разные инструменты для анализа этой последовательности (*Analyze this sequence*), например, **BLAST**, поиск определенного участка в последовательности и др. (рис. 4.14).

В целом, описанная система **Entrez** состоит из 40 молекулярных и литературных баз данных, которые продолжают пополняться

параллельно научным достижениям в области молекулярной систематики и филогенетики. Специалисту-альгологу в целях идентификации и анализа филогенетических связей зеленых водорослей может понадобиться информация не только о таксономии и отдельных нуклеотидных последовательностях, но и *Popset* (попсеты). Этот инструмент позволяет сразу извлечь набор данных из конкретной работы. Такая информация полезна при изучении генетики популяций и анализа внутривидового генетического разнообразия.

Не вызывает сомнения тот факт, что выбор маркера и достоверная интерпретация данных филогенетического анализа невозможны без знания номенклатуры выбранного гена, его характеристик, генных продуктов и т.д. Эта информация содержится в базе данных **Gene**. Данные о прочитанных полных геномах можно получить из базы **Genome**. Иногда для поиска интересующих исследователя организмов и нуклеотидных последовательностей удобнее пользоваться еще одним инструментом **GenBank** – таксономическим браузером (**Taxonomy Browser**), который дает информацию об иерархической классификации исследуемых организмов. На рис. 4.15 приведен пример поиска записей в **Taxonomy Browser** по запросу «*green algae*». Форма вывода данных позволяет выбрать представителей разных классов, порядков и семейств отдела Chlorophyta для дальнейшего филогенетического анализа. Постепенно переходя по открывающимся спискам, мы можем найти информацию о нуклеотидных и аминокислотных записях для различных видов зеленых водорослей. Подробно про различные инструменты **GenBank** описано в руководстве пользователей (The NCBI handbook, 2013).

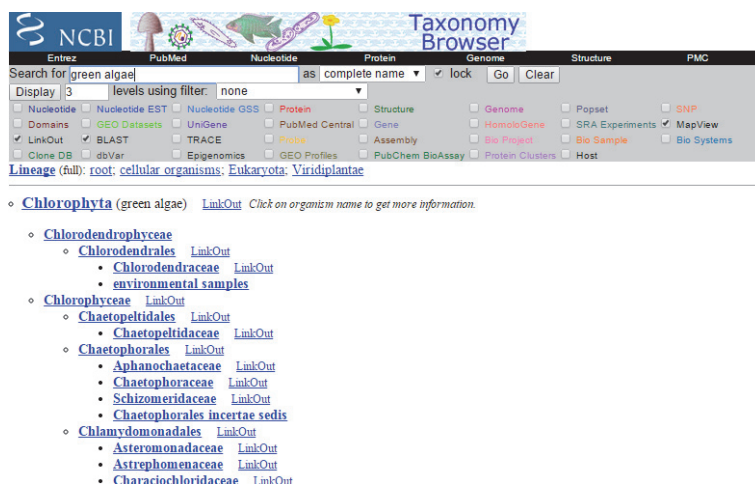


Рис. 4.15. Пример поиска записей по запросу «*green algae*» в **Taxonomy Browser**.

В связи с ежедневным добавлением в базу данных новых видов и тем фактом, что анализ нуклеотидных последовательностей становится неотъемлемым компонентом систематических исследований, таксономические данные в браузере постоянно обновляются. На этапе премодерации информация о систематическом положении таксона, указанная пользователем при депонировании нуклеотидной последовательности в **GenBank**, проходит обязательную проверку на соответствие современным представлениям и актуальной классификации. Тем не менее, ввиду постоянных изменений в систематике зеленых водорослей, рекомендуем параллельно уточнять таксономическое положение исследуемого организма в базе данных **AlgaeBase**.

Для депонирования генетических последовательностей в **GenBank** используются программы **Sequin** или **BankIt** (Benson et al., 2008). При работе с **Sequin** необходимо загрузить с сайта **NCBI** и установить на свой компьютер программу **Sequin**. **BankIt** предназначен для онлайн-загрузки последовательностей. Для добавления последовательности потребуется информация о том, в рамках какого проекта или статьи было произведено секвенирование, следует указать, могут ли данные быть доступны другим исследователям сразу после загрузки или через какое-то время (часто после публикации статьи). Затем необходимо указать свои контактные данные, информацию о соавторах и научно-исследовательской организации, в которой вы работаете, также необходимо аннотировать добавляемую последовательность. После того, как последовательность будет отправлена, в течение некоторого времени вы получите ответ из **GenBank**, в котором кураторы могут попросить некоторые уточнения, и только после этого депонированным последовательностям будут присвоены идентификационные номера (*ID*).

По данным **NCBI** на 20 октября 2014 г. объем генетической информации о зеленых водорослях составляет 408897 нуклеотидных записей, база данных непрерывно пополняется. На сегодняшний день **GenBank** – наиболее востребованная и пользующаяся авторитетом в научном сообществе база данных. Тем не менее, достижения современной науки требуют создания новых информационных систем, одной из которых является **BOLDSYSTEMS**. Данная генетическая база специализирована на депонировании, хранении и анализе записей ДНК-штрихкодов различных организмов. В нее депонировано более 11000 нуклеотидных записей отдела *Chlorophyta*, в том числе 1544 видов зеленых водорослей с ДНК-штрихкодами. **BOLDSYSTEMS** позволяет осуществлять идентификацию по ДНК-штрихкодам, поиск информации по публикациям, географическим координатам, а также содержит комплексный реестр праймеров, используемых для получения последовательностей ДНК-штрихкода. Таксономический браузер **BOLD** (*Barcode of Life Data*) предоставляет информацию о количестве

собранных образцов, числе образцов со штрихкодами, о месте хранения образцов, географическом распространении, а также изображение образцов (рис 4.16).

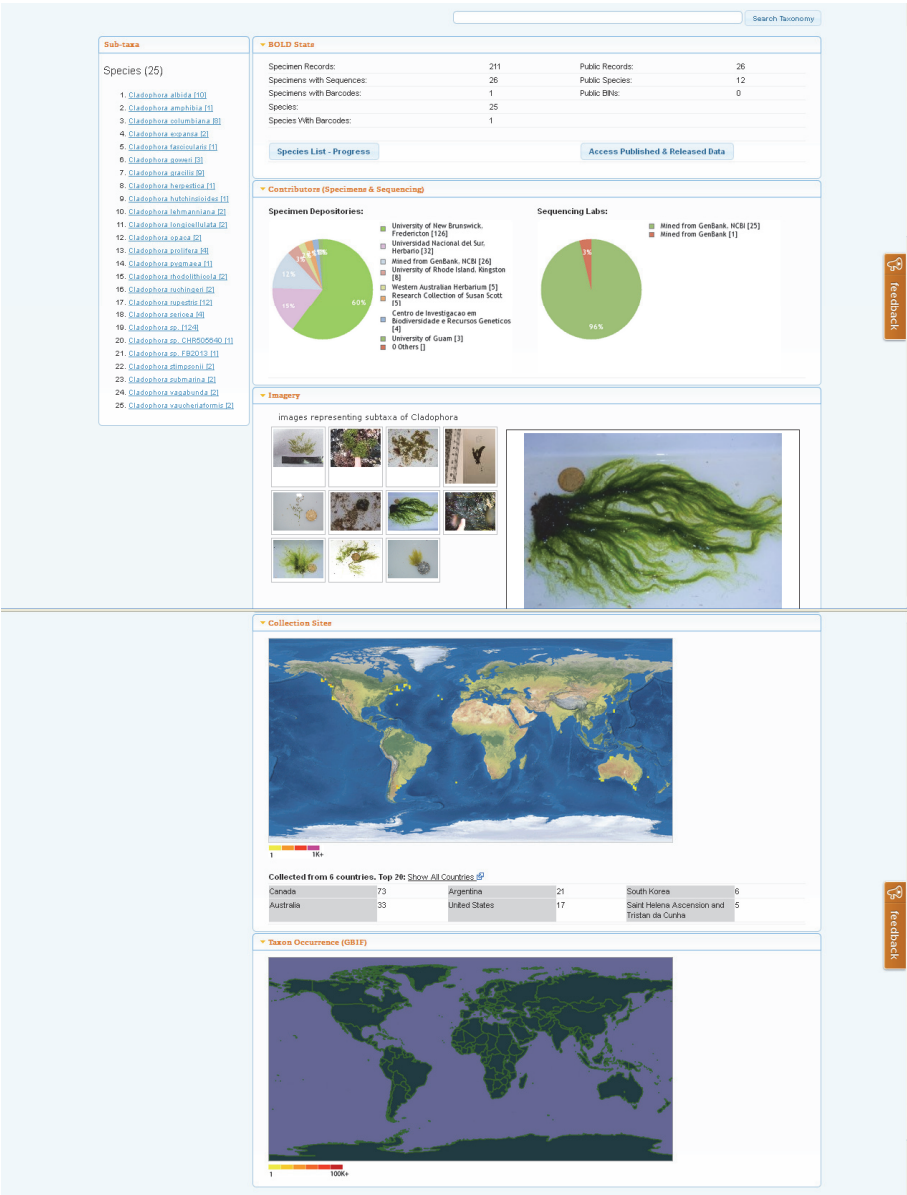


Рис. 4.16. Таксономический браузер **BOLDSYSTEMS**.
Примечание. Представлены результаты поискового запроса для зеленых водорослей рода *Cladophora*: данные о видовом составе, количестве нуклеотидных последовательностей, числе видов с баркодами; фотографии представителей рода, а также их географическое распространение.

Из таксономического браузера легко можно перейти к portalу публикаций об интересующем таксоне водорослей. **BOLDSYSTEMS** позволяет осуществлять поиск по имеющимся нуклеотидным последовательностям, а также депонировать собственные последовательности. Несмотря на растущее число депонированных штрихкодов, в отношении зеленых водорослей технология ДНК-штрихкодирования, как и база данных **BOLDSYSTEMS** все еще недостаточно разработаны. Для дальнейшего развития необходимо утверждение штрихкода зеленых водорослей, массовое секвенирование и депонирование нуклеотидных последовательностей в базу данных.

Еще одна популярная специализированная база данных – **ITS2 DataBase** – представляет собой массив последовательностей второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2), отобранных из генетического банка **NCBI** и тщательно переаннотированных (Keller et al., 2009; Koetschan et al., 2010). После аннотации с помощью скрытых марковских моделей предсказывается вторичная структура каждой последовательности. В первую очередь, предсказанная вторичная структура ITS2 тестируется, приводит ли процедура прямого фолдинга (складывания) на основе принципа минимальной энергии к образованию правильной 4-х спиральной конформации (Markham, Zuker, 2008). Если нет, то структура предсказывается путем моделирования гомологии (Wolf et al., 2005). При моделировании гомологии уже известная вторичная структура ITS2 переносится на ту последовательность ITS2, вторичная структура которой не смогла корректно сложиться при прямом фолдинге. ITS2 Database является базой данных не только для хранения и поиска последовательностей ITS2, но и предоставляет ряд инструментов для обработки пользовательских данных, например аннотирование, предсказание структуры, обнаружение консервативных мотивов ITS2. Кроме того, в базу данных интегрированы сокращенные версии пакетов **4SALE** и **ProfDistS** для множественного выравнивания последовательностей с учетом вторичной структуры, а также возможность реконструировать филогенетическое дерево методом объединения ближайших соседей. Данные опции позволяют пользователю провести согласованный анализ от начального набора последовательностей до филогении на основе первичной и вторичной структуры ITS2. Интерфейсное окно запроса представлено на рис. 4.17.

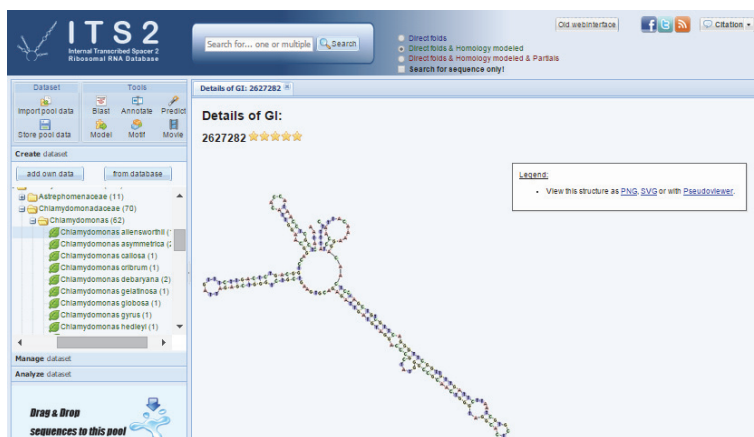


Рис. 4.17. Запрос в **ITS2 DataBase** последовательности *GI 2627282*
Chlamydomonas allensworthii.

Примечание. Представлена предсказанная вторичная структура ITS2 на основе прямого фолдинга последовательности согласно принципу минимальной энергии.

Более подробная информация о работе с базой данных представлена в видео-уроке <http://www.jove.com/video/3806> и описании к нему (Merget et al., 2012), а также в избранных тематических статьях (Schultz et al., 2006; Koetschan et al., 2012). Электронные ссылки на описанные в главе базы данных размещены в Прил. 5.

Таким образом, базы данных **GenBank NCBI**, **BOLDSYSTEMS**, **ITS2 DataBase** и др. являются основным источником генетической информации, находятся в свободном доступе для всех пользователей и позволяют осуществлять не только поиск и импорт/экспорт данных, но и различные манипуляции с помощью определенных алгоритмов и инструментов (выравнивание, аннотирование, поиск мотивов и гомологии, филогенетические реконструкции и др.). Кроме того, что они интегрированы с другими базами данных, в них самих содержится огромное количество дополнительных сведений об экологии и биогеографии таксонов, фотографии, ссылки на литературу и т.д. В настоящее время без использования этих ресурсов невозможно осуществить ни таксономическую идентификацию зеленых водорослей, ни установление их филогенетических отношений.

Литература

1. Алешин В.В. Филогения беспозвоночных в свете молекулярных данных: перспективы завершения филогенетики как науки // Труды Зоологического института РАН. 2013. № 2. с. 9–38.
2. Лукашов В.Н. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М.: БИНОМ. 2009. 256 с.

3. Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И., Демкович А.Е., Лутова Л.А. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // Экол. генетика. 2011. Т. 9. № 1. С. 32–43.
4. Обзоры: NCBI [Электронный ресурс] // Практическая молекулярная биология [Официальный сайт] URL: http://molbiol.edu.ru/review/01_02.html (дата обращения: 19.10.2014).
5. Темралеева А.Д., Минчева Е.В., Щербаков Д.Ю., Пинский Д.Л. ДНК-штрихкодирование зеленых водорослей: обзор // Альгология. 2013. Т. 23. № 4. С. 396–418.
6. Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование – новое направление в сравнительной геномике растений // Генетика. 2009. Т. 45. № 11. С. 1436–1448.
7. Aboal M., Werner O. Morphology, fine structure, life cycle and phylogenetic analysis of *Phyllosiphon arisari*, a siphonous parasitic green alga // Eur. J. Phycology. 2011. V. 46. Iss. 3. P. 181–192.
8. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J. et al. GenBank // Nucleic acids res. 2008. V. 36. Database iss. P. D25–D30.
9. Blanc G., Agarkova I., Grimwood J. et al. The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation // Genome Biology. 2012. V. 13. Iss. 5. R39.
10. Blanc G., Dunkan G., Agarkova I. et al. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex // Plant Cell. 2010. V. 22. Iss. 9. P. 2943–2955.
11. Buchheim M., Buchheim J., Carlson T. et al. Phylogeny of the Hydrodictyaceae (Chlorophyceae): inferences from rDNA data // J. Phycology. 2005. V. 41. Iss. 5. P. 1039–1054.
12. Buchheim M.A., Keller A., Koetschan C. et al. Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: towards an automated reconstruction of the green algal tree of life // PLoS ONE. 2011. V. 6. Iss. 2. P. e16931.
13. Buchheim M.A., Kirkwood A., Buchheim J.A. et al. Hypersaline soil supports a diverse community of *Dunaliella* (Chlorophyceae) // J. Phycology. 2010. V. 46. Iss. 5. P. 1038–1047.
14. Butterfield N.J., Knoll A.H., Swett K. Paleobiology of the neoproterozoic Svanbergfjellet formation, Spitsbergen // Fossils and Strata. 1994. № 34. 84 p.
15. CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants // Proc. Nat. Acad. Sci., 2009. V. 106. № 31. P. 12794–12797.
16. Clarkston B.E., Saunders G.W. A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, Florideophyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. // Botany. 2010. V. 88. № 2. P. 119–131.

17. Cocquyt E., Verbruggen H., Leliaert, F., De Clerck O. Evolution and cytological diversification of the green seaweeds (Ulvophyceae) // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. Iss. P. 2052–2061.

18. Coleman A.W. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35. № 10. P. 3322–3329.

19. De Koning A.P., Keeling P.J. The complete plastid genome sequence of the parasitic green alga *Helicosporidium* sp. is highly reduced and structured // BMC Biol. 2006. № 4. P. 12.

20. De Wever A., Leliaert F., Verleyen E. et al. Hidden levels of phylogeny in Antarctic green algae: further evidence for the existence of glacial refugia // Proc. Roy. Soc. Biol. Sci. 2009. V. 276. № 1673. P. 3591–3599.

21. Derelle E., Ferraz C., Rombauts S. et al. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006. V. 103. № 31. P. 11647–11652.

22. Douzery E.J.P., Snell E.A., Bapteste E. et al. The timing of eukaryotic evolution: Does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils? // Ibid. 2004. V. 101. № 43. P. 15386–15391.

23. Evans K.M., Wortley A.H., Mann D.G. An assessment of potential diatom «barcode» genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta) // Protist. 2007. V. 158. № 3. P. 349–364.

24. Fama P., Wysor B., Kooistra W.H.F.C., Zuccarello G.C. Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpales, Chlorophyta) inferred from chloroplast tufA gene // J. Phycology. 2002. V. 38. Iss. 5. P. 1040–1050.

25. Feliner G.N., Rosseló J.A. Better the devil to know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants // Mol. Phyl. Evol. 2007. V. 44. Ed. 2. P. 911–919.

26. Ferri E., Barbuto M., Bain O. et al. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda) // Front. Zool. 2009. V. 6. P. 1.

27. Friedl T., O’Kelly C.J. Phylogenetic relationships of green algae assigned to the genus *Planophila* (Chlorophyta): evidence from 18S rDNA sequence data and ultrastructure // Eur. J. Phycology. 2002. V. 37. Iss. 3. P. 373–384.

28. Gao C., Wang Y., Shen Y. et al. Oil accumulation mechanisms of the oleaginous microalga *Chlorella protothecoides* revealed through its genome, transcriptomes, and proteomes // BMC Genomics. 2014. V. 15. Iss. 1. P. 582.

29. Geer R.C., Sayers E.W. Entrez: making use of its power // Brief Bioinform. 2003. V. 4. № 2. P. 179–184.

30. Gontcharov A.A., Marin B., Melkonian M. Are combined analyses better than single gene phylogenies? A case study using SSU rDNA and rbcL

- sequence comparisons in the Zygnematomyceae (Streptophyta) // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 21. Iss. 3. P. 612–624.
31. Hall J.D., Fučíková K., Lo C., Lewis L.A., Karol K.G. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae // *Cryptogamie, Algol.* 2010. 31. № 4. P. 529–555.
32. Herron M.D., Hackett J.D., Aylward F.O., Michod R.E. Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009. V. 106. № 9. P. 3254–3258.
33. Hey J. The mind of species problem // *Trends in Ecology and Evolution.* 2001. V. 16. № 7. P. 326–329.
34. Horath T., Bachofen R. Molecular characterization of an endolithic microbial community in dolomite rock in the central Alps (Switzerland) // *Microbiol. Ecol.* 2009. V. 58. № 2. P. 290–306.
35. Keller A., Schleicher T., Forster F. et al. ITS2 data corroborate a monophyletic chlorophytean DO-group (Sphaeropleales) // *BMC Evol. Biol.* 2008. V. 8. P. 218.
36. Keller A., Schleicher T., Schultz J. et al. 5.8 S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation // *Gene.* 2009. V. 430. Iss. 1-2. P. 50–57.
37. Kelly L.J., Ameka G.K., Chase M.W. DNA barcoding of African Podostemaceae (river-weeds): a test of proposed barcode regions // *Taxon.* 2010. V. 59. № 1. P. 251–260.
38. Kimura M. Evolutionary rate at molecular level // *Nature.* 1968. V. 217. P. 624–626.
39. King J.L., Jukes T.H. Non-Darwinian evolution // *Science.* 1969. V. 164. № 3881. P. 788–798.
40. Koetschan C., Förster F., Keller A. et al. The ITS2 Database III: sequences and structures for phylogeny // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. Database iss. P. D275–D279.
41. Koetschan C., Hackl T., Müller T. et al. ITS2 Database IV: Interactive taxon sampling for internal transcribed spacer 2 based phylogenies // *Mol. Phyl. Evol.* 2012. V. 63. Iss. 3. P. 585–588.
42. Krienitz L., Ustinova I., Friedl T., Huss V.A.R. Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastreae (Chlorophyceae, Chlorophyta) // *J. Phycology.* 2001. V. 37. Iss. 5. P. 852–865.
43. Le Gall L., Saunders G.W. DNA barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phyllophoraceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian flora // *Ibid.* 2010. V. 46. Iss. 2. P. 374–389.
44. Leliaert F., Smith D.R., Moreau H. et al. Phylogeny and molecular evolution of the green algae // *Crit. Rev. Plant Sci.* 2012. V. 31. Iss. 1. P. 1–46.
45. Markham N., Zuker M. UNaFold: Software for nucleic acid folding and hybridization // *Methods in Molecular Biology.* 2008. V. 453. P. 3–31.

46. McDevit D.C., Saunders G.W. A DNA barcode examination of the Laminariaceae (Phaeophyceae) in Canada reveals novel biogeographical and evolutionary insights // *Phycologia*. 2010. V. 49. Iss. 3. P. 235–248.

47. McManus H.A., Lewis L.A. Molecular phylogenetic relationships in the freshwater family Hydrodictyaceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae), with an emphasis on *Pediastrum duplex* // *J. Phycology*. 2011. V. 47. Iss. 1. P. 152–163.

48. Mei H., Luo W., Liu G.X., Hu Z.Y. Phylogeny of Oedogoniales (Chlorophyceae, Chlorophyta) inferred from 18S rDNA sequences with emphasis on the relationships in the genus *Oedogonium* based on ITS-2 sequences // *Plant Syst. Evol.* 2007. V. 265. Iss. 3-4. P. 179–191.

49. Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O. et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions // *Science*. 2007. V. 318. № 5848. P. 245–251.

50. Merget B., Koetschan C., Hackl T. et al. The ITS2 Database [Electronic resource] // *J. Vis. Exp.* [Official website]. 2012. 61. P. e3806. DOI: 10.3791/3806. URL: <http://www.jove.com/video/3806> (accessed: 25.10.2014).

51. Moore W.S. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees // *Evolution*. 1995. V. 49. № 4. P. 718–726.

52. Neustupa J., Eliáš M., Škaloud P. et al. *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga // *Phycologia*. 2011. V. 50. Iss. 1. P. 57–66.

53. Neustupa J., Němcová Y., Veselá J. et al. *Leptochlorella corticola* gen. et sp. nov. and *Kalinella apyrenoidosa* sp. nov.: two new Chlorella-like green microalgae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) from subaerial habitats // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. Pt. 1. P. 377–387.

54. Novis P.M., Visnovsky G. Novel alpine algae from New Zealand: Chlorophyta // *Phytotaxa*. 2012. V. 39. P. 1–30.

55. Nozaki H., Itoh M., Sano R. et al. Phylogenetic relationships within the colonial Volvocales (Chlorophyta) inferred from *rbcL* gene sequence data // *J. Phycology*. 1995a. V. 31. Iss. 6. P. 970–979.

56. Nozaki H., Misawa K., Kajita T. et al. Origin and evolution of the colonial Volvocales (Chlorophyceae) as inferred from multiple, chloroplast gene sequences // *Mol. Phyl. Evol.* 2000. V. 17. Iss. 2. P. 256–268.

57. Nozaki H., Ohta N., Takano H., Watanabe M.M. Reexamination of phylogenetic relationships within the colonial Volvocales (Chlorophyta): An analysis of *atpB* and *rbcL* gene sequences // *J. Phycology*. 1999. V. 35. Iss. 1. P. 104–112.

58. O’Kelly C.J. The origin and early evolution of green plants / *Evolution of Primary Producers in the Sea*. Burlington: Elsevier Acad., 2007. P. 287–309.

59. O'Kelly C.J., Kurihara A., Shipley T.C., Sherwood A.R. Molecular assessment of *Ulva* spp. (Ulvophyceae, Chlorophyta) in the Hawaiian Islands // J. Phycology. 2010. V. 46. Iss. 4. P. 728–735.

60. Palenik B., Grimwood J., Aerts A. et al. The tiny eukaryote *Ostreococcus* provide insights into the paradox of plankton speciation // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007. V. 104. № 18. P. 7705–7710.

61. Poczai P., Hyvönen J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects // Mol. Biol. Rep. 2010. V. 37. № 4. P. 1897–1912.

62. Pombert J.F., Keeling P.J. The mitochondrial genome of the entomoparasitic green alga *Helicosporidium* // PLoS One. 2010. V. 5. Iss. 1. P. e8954.

63. Pombert J.F., Otis C., Lemieux C., Turmel M. The chloroplast genome sequence of the green alga *Pseudendoclonium akinetum* (Ulvophyceae) reveals unusual structural features and new insights into the branching order of chlorophyte lineages // Mol. Biol. Evol. 2005. V. 22. Iss. P. 1903–1918.

64. Prochnik S.E., Umen J., Nedelcu A.M. et al. Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green algae *Volvox carteri* // Science. 2010. V. 329. № 5988. P. 223–226.

65. Pröschold T., Leliaert F. Systematics of the green algae: Conflict of classic and modern approaches // Unravelling the Algae: the Past, Present and Future of the Algae Systematics. London: Taylor and Francis, 2007. P. 5. P. 123–153.

66. Schultz J., Müller T., Achtziger M. The internal transcribed spacer 2 database – a web server for (not only) low level phylogenetic analyses [Electronic resource] // Nucleic Acids Res. [Official website]. 2006. V. 34. Iss. suppl. 2. P. W704–W707. DOI: 10.1093/nar/gkl129. URL: http://nar.oxfordjournals.org/content/34/suppl_2/W704.long (accessed: 25.10.2014).

67. Sherwood A.R., Vis M.L., Entwistle T. J., Jr O.N., Presting G.G. Contrasting intra versus interspecies DNA sequence variation for representatives of the Batrachospermales (Rhodophyta): Insights from a DNA barcoding approach // Phycol. Res. 2008. V. 56. Iss. 4. P. 269–279.

68. Sunnucks P. Efficient genetic markers for population biology // TREE. 2000. V. 15. № 5. P. 199–203.

69. The NCBI handbook [Electronic resource] // Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US) [Official website]. Nucleotide. 2013. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169444> (accessed: 20.10.2014).

70. Thüs H., Muggia L., Pérez-Ortega S. et al. Revisiting photobiont diversity in the lichen family Verrucariaceae (Ascomycota) // Eur. J. Phycology. 2011. V. 46. Iss. 4. P. 399–415.

71. Tirichine L., Bowler C. Decoding algal genomes: tracing back the history of photosynthetic life on Earth // *Plant J.* 2011. V. 66. Iss. 1. P.45–57.
72. Turmel M., Otis C., Lemieux C. The chloroplast genomes of the green algae *Pedinomonas minor*, *Parachlorella kessleri*, and *Oocystis solitatis* reveal a shared ancestry between the Pedinomonadales and Chlorellales // *Mol. Biol. Evol.* 2009. V. 26. Iss. 10. P. 2317–2331.
73. Verbruggen H., De Clerck O., N'Yeurt A.D.R. et al. Phylogeny and taxonomy of *Halimeda incrassata*, including descriptions of *H. kanaloana* and *H. heteromorpha* spp. nov. // *Eur. J. Phycology.* 2006. V. 41. Iss. 3. P. 337–362.
74. Verghese B. Phylogeny and evolution of the Chlorophyceae and Trebouxiophyceae / Abstr. Ph.D. (Biol.) Thesis. The University of Tulsa: Tulsa, 2007. 138 p.
75. Von Cräutlein M., Korpelainen H., Pietiläinen M., Rikkinen J. DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity // *Biodiver. Conserv.* 2011. V. 20. Iss. 2. P. 373–389.
76. Watanabe S., Nakayama T. Ultrastructure and phylogenetic relationships of the unicellular green algae *Ignatius tetrasporus* and *Pseudocharacium americanum* (Chlorophyta) // *Phycol. Res.* 2007. V. 55. Iss. 1. P. 1–16.
77. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR Protocols.* San Diego: Acad. Press, 1990. Pt. 3. P. 315–322.
78. Wilson J.J. Assessing the value of DNA barcodes and other priority gene regions for molecular phylogenetics of Lepidoptera // *PlosONE.* 2010. V. 5. Iss. 5. P. e10525.
79. Wolf M., Achziger M., Schultz J. et al. Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures // *RNA.* 2005. V. 11. № 11. P. 1616–1623.
80. Worden A.Z., Lee J.H., Mock T. et al. Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeucaryotes *Micromonas* // *Science.* V. 324. № 5924. P. 268–272.
81. Zuccarello G.C., Price N., Verbruggen H., Leliaert F. Analysis of a plastid multigene data set and the phylogenetic position of the marine macroalga *Caulerpa filiformis* (Chlorophyta) // *J. Phycology.* 2009. V. 45. Iss. 5. P. 1206–1212.

Глава 5. Этапы ПЦР-анализа (Е.В. Минчева А.Д. Темралеева, А.М. Андреева)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это метод молекулярной биологии, который позволяет быстро амплифицировать целевые фрагменты ДНК. В главе подробно рассматриваются все этапы ПЦР-анализа: выделение тотальной ДНК, амплификация, электрофоретическая детекция ПЦР-продуктов (ампликонов), подготовка проб к секвенированию (рис. 4.2, глава 4). Приведены теоретические основы метода ПЦР, ее стадии и разновидности; описана процедура подбора праймеров. Указаны основные параметры оптимизации условий ПЦР, возможные проблемы и пути их решения. Детально охарактеризованы необходимые реактивы, оборудование и пластик для ПЦР-анализа. Обсуждаются правила организации и работы в молекулярной лаборатории.

5.1 Выделение тотальной ДНК

Выделение ДНК – это первый шаг в проведении молекулярно-генетических исследований. Качество и чистота нуклеиновых кислот относятся к одним из самых важных факторов ПЦР-анализа. Для того чтобы получить высокоочищенные нуклеиновые кислоты, не содержащие ингибирующих примесей, необходимо использовать наиболее подходящие методы выделения: жидко- или твердофазные. Выделение суммарной (тотальной) ДНК включает несколько этапов: лизис клеточных стенок, инактивацию клеточных нуклеаз, денатурацию и удаление нецелевых продуктов – белков, полисахаридов, липидов и др. При выделении ДНК из клеток и тканей зеленых водорослей важным фактором является эффективное разрушение клеточных стенок, которое проводят с помощью следующих процедур:

1) механическое разрушение (измельчение, гипотонический лизис, цикл «размораживание-оттаивание», ультразвук);

2) химическая обработка (лизис с помощью хаотропных агентов или детергентов, тиоловое восстановление);

3) ферментативное расщепление белков (протеиназа К).

Для достижения наилучшего результата на **этапе лизиса клеточных стенок** лучше использовать комбинацию из нескольких приемов, т.к. с одной стороны процесс должен быть достаточно жестким, чтобы разрушить структуру сложного исходного материала, но с другой достаточно деликатным, чтобы сохранить в целостности целевой продукт – нуклеиновые кислоты. Для выделения ДНК из растений, в т.ч. и зеленых водорослей, широко используется детергент цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ, *CTAB*). ЦТАБ хорошо растворяет мембраны клеток. Кроме того, его применение позволяет разделить ДНК и полисахариды, поскольку они отличаются по растворимости в

присутствии этого поверхностно-активного вещества. При высоких концентрациях солей нуклеиновые кислоты образуют стабильные и растворимые комплексы со ЦТАБ. При снижении концентрации соли ниже 0.4М NaCl происходит выпадение в осадок комплексов ЦТАБ/ДНК, в то время как большая часть полисахаридов остается в растворе (Великов, 2013). Для **инактивации нуклеаз** обычно используют протеиназу К. Методика выделения ДНК с помощью ЦТАБ изложена ниже:

1. достать из морозильника 2% ЦТАБ-буфер (Прил. 3, протокол 1) и разморозить на водяной бане при 65°C,
2. добавить по 300 мкл ЦТАБ-буфера в 1.5-2 мл пробирки,
3. перенести соскобы клеток водорослей с чашки Петри, живой или фиксированный образец ткани (около 1 мм³) в подписанные пробирки и растереть с помощью пестика,
4. добавить в каждую пробирку по 5 мкл протеиназы К (20 мг/мл),
5. инкубировать 1.5 часа при температуре 65°C.

Другая распространенная методика предусматривает использование детергента додецилсульфата натрия (ДСН, SDS), который осуществляет солюбилизацию биомембран и быструю денатурацию протеинов. Методика описана ниже:

1. аккуратно снять колонию водорослей с чашки Петри и поместить биомассу в 100 мкл трис-солевого буфера (ТСБ; Прил. 3, протокол 2),
2. тщательно растереть биомассу пестиком,
3. добавить еще 300 мкл ТСБ и 40 мкл 10% ДСН (Прил. 3, протокол 3),
4. перемешать на вортексе и инкубировать при комнатной температуре 10 мин.,
5. последовательно провести 3 стадии полного замораживания-оттаивания пробы (при -20°C и комнатной температуре, соответственно),
6. добавить 2.5 мкл протеиназы К (10 мг/мл), аккуратно перемешать покачиванием,
7. инкубировать при 50°C в течение 15 мин.

После описанных процедур лизиса клеточных стенок с помощью ЦТАБ или ДСН и инактивации нуклеаз протеиназой К следует **этап очистки ДНК от нецелевых продуктов** – белков и полисахаридов. Стандартная методика выделения и очистки ДНК от других макромолекул клетки основана на том, что ДНК – полярная молекула, которая плохо растворяется в органических растворителях. При перемешивании клеточного лизата и растворителя образуются две фазы: ДНК находится в верхней (водной) фазе, а денатурированные белки – в нижней (органической) фазе. Очистку ДНК осуществляют с помощью

смеси фенол : хлороформ, хлороформ : изоамиловый спирт, фенол : хлороформ : изоамиловый спирт.

Фенольный метод выделения ДНК является очень эффективным, но для него требуется перегнанный фенол, уравновешенный слабощелочным буфером, который хранится строго при -20°C : при комнатной температуре фенол очень быстро окисляется, а при кислых значениях pH ДНК переходит из водной фазы в фенольную (последнее свойство используют при выделении РНК, свободной от ДНК). Фенол-хлороформный метод очистки ДНК от других макромолекул описан ниже:

1. *добавить к пробе равный объем фенола (в случае лизиса ЦТАБ-методом – 300 мкл, ДСН – 440 мкл),*
2. *перемешать на ротаторе 10-15 мин. в интенсивном режиме,*
3. *центрифугировать 10 мин. при 14.5 тыс. об/мин.,*
4. *тщательно отобрать в чистую пробирку водную верхнюю фазу с растворенной ДНК, не захватывая интерфазу,*
5. *измерить объем отобранной пробы и внести равный ей объем смеси фенол : хлороформ в соотношении 1:1,*
6. *повторить шаги 2-4,*
7. *измерить объем пробы, внести равный объем хлороформа,*
8. *повторить шаги 2-4,*
9. *измерить полученный объем.*

Далее следует **этап осаждения ДНК** ацетатом натрия.

1. *к известному объему водной фазы пробы добавить 1/10 часть объема 3М ацетата натрия pH 5.0 (Прил. 3, протокол 4),*
2. *добавить двухкратный объем холодного абсолютного этанола, осторожно перемешиваем покачиванием,*
3. *поместить пробу в морозильник при -20°C на ночь,*
4. *далее пробу центрифугировать при 14.5 тыс. об/мин. в течение 30 мин.,*
5. *слить этанол, аккуратно отобрать оставшийся этанол досуха,*
6. *добавить 400 мкл холодного 70% этанола для удаления солей,*
7. *центрифугировать при 14.5 тыс. об/мин. в течение 10 мин.,*
8. *еще раз слить этанол и аккуратно отобрать остатки дозатором,*
9. *после этого осадок подсушить при комнатной температуре и растворить ДНК в 30 мкл milliQ-воды или TE-буфера (протокол 6, Прил. 3).*

Кроме описанной методики очистки ДНК от нецелевых продуктов с помощью смеси фенол : хлороформ и осаждения ДНК ацетатом натрия, можно использовать смесь хлороформ : изоамиловый спирт и осаждение ДНК изопропанолом. Протокол описан ниже:

1. *добавить 300 мкл смеси хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1),*

2. встряхивать на шейкере 25 мин.,
3. центрифугировать 10 мин. на максимальных оборотах (14.5 тыс. об/мин. или выше),
4. аккуратно отобрать в чистые пробирки верхнюю фазу,
5. добавить равный объем холодного изопропанола и оставить пробирки на ночь при -20°C или на 4 часа при -70°C,
6. центрифугировать пробирки 10 мин. на максимальных оборотах,
7. аккуратно слить супернатант,
8. промыть осадок 50 мкл 70%-го спирта 2-3 раза,
9. слить спирт (это можно осторожно сделать при помощи автоматического дозатора либо вакуумным насосом),
10. высушить пробы в термостате при 37°C,
11. растворить в 30-50 мкл milliQ-воды или TE-буфера (протокол 6, Прил. 3). Растворенную ДНК хранить в морозильнике при -20°C. Если пробу необходимо хранить в течение нескольких лет рекомендуем осадить ДНК в изопропаноле и хранить при -20°C.

Для выделения ДНК из зеленых водорослей с развитой слизью, которая в дальнейшем может ингибировать ПЦР, рекомендуем использовать сильные хаотропные агенты, например гуанидин тиоцианат. Приведем протокол выделения ДНК с помощью гуанидин тиоцианата с последующей экстракцией смесью фенол : хлороформ и осаждением ДНК изопропанолом.

1. поместить пробу водоросли (часть таллома или соскоб колонии) в 1.5 мл пробирку и добавить четырехкратный объем 4М гуанидин тиоцианата (Прил. 3, протокол 5) (~400 мкл),
2. биомассу растереть пестиком,
3. инкубировать при 65°C в течение 1 ч.,
4. добавить 400 мкл фенола и инкубировать при 65°C в течение 30 мин.,
5. охладить при комнатной температуре,
6. добавить 500 мкл хлороформа и перемешать содержимое пробирки на вортексе,
7. центрифугировать 10 мин. при максимальных оборотах,
8. отобрать верхнюю фазу в чистые пробирки, добавить равный объем холодного изопропанола и оставить пробы на ночь в морозильнике при -20°C или в кельвинаторе на 4 ч. при -70°C,
9. отобрать по 100 мкл смеси ДНК и изопропанола в новые чистые микропробирки,
10. центрифугировать в течение 10-15 мин. на максимальных оборотах, слить верхнюю фазу,
11. добавить в пробирки по 300 мкл холодного 80%-ного этанола и оставить при +4°C на 1 ч.,
12. слить этанол, осадок подсушить при 37°C в течение 5-10 мин.,

13. растворить в 30 мкл *milliQ*-воды или TE-буфера (протокол 6, Прил. 3). Растворенную ДНК хранить в морозильнике при -20°C . Если срок работы с выделенной ДНК не превышает 1 мес., то ДНК можно хранить в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$.

Описанные выше методы выделения ДНК из клеток зеленых водорослей относятся к жидкофазным. Твердофазные системы, адсорбирующие нуклеиновые кислоты, представляют собой частицы на основе кварца, стеклянные волокна, силикагель, анионообменные носители и др. В последние годы все большей популярностью пользуется колоночное выделение нуклеиновых кислот. В таком случае ДНК специфично сорбируется на поверхности мембраны колонки в присутствии хаотропных агентов, которые разрушают клеточные мембраны и инактивируют внутриклеточные ДНКазы. На заключительном этапе после промывания мембраны элюируется ДНК с высоким выходом и чистотой.

Еще одна модификация методов с использованием твердофазных систем основана на сорбции ДНК на магнитных частицах (например, на стекле, покрывающем магнитные частицы) с последующим сбором с помощью магнита (магнитного штатива). Использование магнитных твердых носителей имеет много преимуществ по сравнению с немагнитными сепарационными методами: простой протокол, уменьшение времени выделения (всего 2-3 ч.), высокий выход и чистота ДНК, промывание осадка без использования центрифуги с помощью магнитного штатива, удаление ингибиторов ПЦР, присутствующих в пробе (Антонова и др., 2010). Магнитные частицы производят из различных синтетических полимеров, биополимеров, пористого стекла или на основе неорганических магнитных материалов, например, оксида железа с модифицированной поверхностью. В настоящее время разработан ряд импортных приборов для выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах в автоматическом режиме, например, *BioRobot (QIAGEN)*, *MagNA Pure LC Instrument (Roche)* и др.

В целом, выделение ДНК из клеток зеленых водорослей вызывает ряд трудностей, связанных с их биохимическими особенностями: полисахариды, спорополленин и другие органические вещества препятствуют разрушению клеточной стенки, способны ухудшать качество выделения ДНК и ингибировать ПЦР. Методы органической жидкофазной экстракции эффективны для работы с большим объемом проб водорослей, требуют соблюдения техники безопасности при работе с органическими растворителями, длительны по времени, но недороги; в то время как твердофазные методы (колоночное выделение или магнитная сепарация) подходят для малых биопроб (5-10 мг), безопасны, быстры, но достаточно дороги в пересчете на стоимость выделения ДНК из одного образца.

5.2 Амплификация фрагментов ДНК с помощью ПЦР

5.2.1 Принцип метода ПЦР и ее виды

В начале 1970-х годов норвежский ученый Хьяелль Клеппе предложил способ амплификации ДНК с помощью пары коротких одноцепочечных молекул ДНК – синтетических праймеров. Однако его идея так и осталась нереализованной. Только в 1983 г. американским биохимиком Кэри Маллисом был разработан метод полимеразной цепной реакции, за изобретение которого ученый получил Нобелевскую премию. В основе метода ПЦР лежит природный процесс – комплементарное достраивание ДНК-матрицы, осуществляемое с помощью фермента ДНК-полимеразы. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах, с помощью ПЦР в искусственных условиях (*in vitro*) амплифицируются относительно короткие участки ДНК. Поскольку ДНК-полимераза не способна сама начать репликацию и может только достраивать комплементарную цепь к уже имеющемуся двухцепочечному фрагменту, то сначала синтезируют два олигонуклеотида (праймера), комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК. Праймеры инкубируют с ДНК-матрицей и термостабильной ДНК-полимеразой, которая катализирует реакцию полимеризации ДНК, достраивая цепи в направлении 5'-3' по принципу комплементарности. Специфичность реакции зависит от выбора правильной структуры праймеров. Данная реакция проходит в буферном растворе при участии ионов магния и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ). Количество циклов амплификации зависит от поставленной задачи, эффективности ПЦР и исходного количества ДНК-матрицы. Обычно при проведении ПЦР выполняется 25-35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий (рис.5.1):

1. **Денатурация ДНК:** двухцепочечную ДНК нагревают до 94-96°C (или до 98°C, если используется термостабильная полимеразы) в течение 0.5-2 мин. для разрушения водородных связей и разделения комплементарных цепей. Обычно перед первым циклом проводят длительный прогрев реакционной смеси в течение 2-10 мин. для полной денатурации матрицы. Следует помнить, что слишком долгая предварительная денатурация ведет к ускоренному падению активности полимеразы и, в конечном счете, снижает эффективность ПЦР.

2. **Отжиг праймеров:** присоединение праймера к одноцепочечной ДНК-матрице при температуре 40-72°C (наиболее часто 55°C) (McPherson, Moller, 2000). Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается равной температуре плавления. Праймеры подбирают так, что они ограничивают начало и конец амплифицируемого фрагмента и комплементарны противоположным цепям ДНК. Праймеры действуют в качестве промежуточных

инициаторов для ДНК-полимеразы. Время стадии отжига составляет около 30 сек.

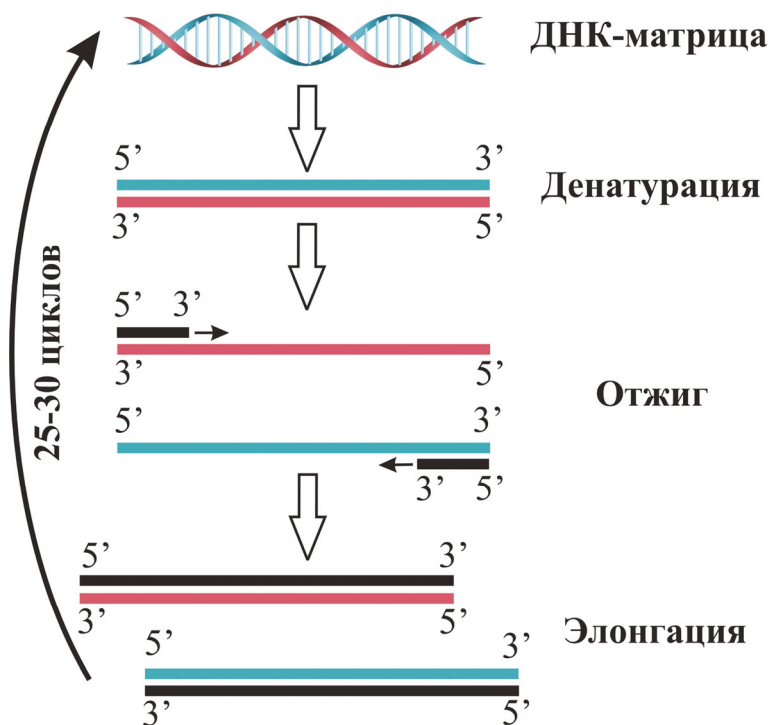


Рис. 5.1. Основные стадии полимеразной цепной реакции.

3. Элонгация ДНК: синтез новой цепи с помощью ДНК-полимеразы, которая достраивает вторую цепь, используя праймер в качестве затравки. Температура элонгации зависит от типа полимеразы, обычно составляет 68-72°C для *Taq*- и *Pfu*-полимераз. Время элонгации зависит от типа ДНК-полимеразы и длины амплифицируемого фрагмента. Обычно для каждой тысячи пар оснований требуется 1 мин. После окончания всех циклов обычно проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 5-10 мин.

Различают несколько разновидностей ПЦР:

Вложенная ПЦР (*Nested PCR*) применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. В первой реакции одна пара праймеров используется для синтеза ДНК-продуктов, которые помимо намеченной цели, могут по-прежнему состоять из неспецифически амплифицированных фрагментов ДНК. Продукты используются затем во второй ПЦР с парой праймеров, сайты связывания которых лежат внутри

целевого фрагмента ДНК, полученного в первой реакции. Вложенная ПЦР часто наиболее успешна при специфической амплификации длинных фрагментов ДНК, при работе со следовыми количествами матрицы, при плохом качестве исходной ДНК и во многих других случаях, когда традиционная ПЦР не дает результата, но она требует более подробных знаний о последовательностях-мишенях.

Количественная ПЦР или ПЦР в режиме реального времени (*Real-Time PCR*) используется для одновременной амплификации и измерения количества конкретного ПЦР-продукта после каждого цикла амплификации. Для этого используют флуоресцентные красители, интеркалирующие в двухцепочечные молекулы ДНК или модифицированные дНТФ, которые флуоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК.

ПЦР с горячим стартом (*hot-start PCR*) – модификация ПЦР с использованием ДНК-полимеразы, полимеразная активность которой блокируется при комнатной температуре, т.е. с момента приготовления реакционной смеси до первой денатурации в ПЦР. Использование горячего старта позволяет избежать появления побочных продуктов амплификации, которые возникают в стандартной ПЦР на стадии подготовки смеси реагентов и снижают ее эффективность. Поскольку компоненты реакции, как правило, смешивают именно при комнатной температуре, в момент приготовления реакционной смеси праймеры могут неспецифично отжигаться на постоянно присутствующую в очищенной ДНК одноцепочечную фракцию (или друг на друга) и удлиняться полимеразой еще до начала ПЦР. В результате могут появиться неспецифичные фрагменты, эффективно амплифицируемые в ходе последующей реакции (ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ, 2012). Существует несколько методов временной инактивации ДНК-полимеразы:

- добавление одного из компонентов реакции при высокой температуре (70-95°C). Таким компонентом может быть: полимеразы, Mg^{2+} , дНТФ или праймеры.

- барьерное разделение компонентов смеси: изоляция одного из необходимых ПЦР-компонентов барьером, исчезающим при высокой температуре. Чаще всего такой барьер делают из парафина путем разделения смеси на два отсека парафиновой пробкой либо за счет помещения компонента (магния или полимеразы) внутрь парафиновых шариков (Chou et al, 1992; Horton et al, 1994).

- ингибирование полимеразы антителами. При температуре ниже 50-60°C можно блокировать работу полимеразы путем ее связывания с антителами. При нагревании реакционной смеси в ходе первого цикла ПЦР антитела инактивируются, и полимеразы начинают работать.

- использование химически модифицированной полимеразы. Ковалентное присоединение термолабильных (или pH-лабильных)

химических групп к некоторым аминокислотам полимеразы обратимо ингибирует активность ДНК-полимеразы. При 95°C во время первого цикла ПЦР такие химические группы отделяются, и фермент начинает работать.

- другие ингибиторы (например, модифицированные олигонуклеотиды).

Инвертированная ПЦР (*Inverse PCR*) используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод особенно полезен для определения соседних последовательностей после вставки ДНК в геном. Для осуществления инвертированной ПЦР проводят ряд разрезов ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов (лигирование) и циклизацию фрагмента ДНК. В результате известные фрагменты оказываются на обоих концах неизвестного участка, после чего можно проводить ПЦР как обычно (Ochman et al., 1988).

ПЦР с обратной транскрипцией (*Reverse transcription PCR*) применяется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из библиотеки РНК. Перед обычной ПЦР на матрице РНК проводят синтез одноцепочечной молекулы ДНК с помощью ревертазы и получают одноцепочечную кДНК, которая используется в качестве матрицы для ПЦР (Shiao, 2003).

Ступенчатая ПЦР (*Touchdown PCR*) - с помощью этого подхода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров. Первые циклы проводят при температуре выше оптимальной температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру отжига постепенно снижают до оптимальной. Прием направлен на то, чтобы праймер гибридизовался с комплементарной цепью всей своей длиной; тогда как при более низкой оптимальной температуре праймер может гибридизоваться и с другими участками генома, комплементарными ему только частично. Увеличение температуры отжига способствует амплификации специфичного ПЦР-продукта. В большинстве случаев, первые 10 циклов ПЦР можно проводить при температуре отжига 72-75°C, а последующие – при оптимальной температуре, например 55°C (Korbie, Mattick, 2008).

5.2.2 Оборудование, реактивы и пластик для ПЦР

Оборудование для проведения ПЦР-анализа делится на специализированное и общелабораторное. К специализированному относится амплификатор, ПЦР-бокс и приборы для электрофоретической детекции продуктов амплификации. К лабораторному – центрифуга, вортекс, термостат, ротатор, холодильник с морозильником, весы, системы очистки воды.

Приборы для проведения ПЦР (термоциклеры, ДНК-амплификаторы, ПЦР-амплификаторы) представляют собой устройства для быстрого изменения температуры реакционной смеси по определенной программе. Современные амплификаторы можно разделить на модели с возможностью детекции накопления ДНК во время реакции (рис. 5.2, *а*) и без таковой (рис. 5.2 *б*, *в*).



Рис.5.2. Примеры амплификаторов.

Примечание. *а* – детектирующий амплификатор CFX-96 «Real Time» (Bio-Rad, США), *б* – амплификатор T-100 с функцией температурного градиента, *в* – многоканальный амплификатор «Терцик» (ДНК-Технология, Россия).

Амплификаторы без детекции бывают с нагреваемой крышкой и без, в последнем случае для предотвращения испарения воды из реакционной смеси необходимо добавление минерального масла. Детектирующие амплификаторы оснащены дополнительной оптической насадкой, позволяющей регистрировать флуоресценцию в закрытой реакционной пробирке непосредственно во время реакции. Одним из основных факторов успешного применения ПЦР на практике является воспроизводимость заданных исследователем параметров термоциклирования. Так, важным параметром амплификаторов является равномерность температурных условий для всех пробирок в данном эксперименте, а также скорость достижения заданной температуры. Скорость корректной работы термоциклера (то есть работы, обеспечивающей точное соответствие программы амплификации и параметров реакционной смеси) зависит как от конструкции прибора, так и от типа пробирок и объема реакционной смеси. Чем меньше объем реакционной смеси, тем меньше время требуется для достижения заданной температуры в пробирке. Однако минимизация объема также имеет ограничения, связанные с необходимостью добавления в реакцию определенного количества стартовой ДНК, концентрация которой не всегда высокая. Обычно объем реакционной смеси составляет 15-25 мкл. Чаще всего объем реакционной смеси составляет 15-25 мкл. Постановка ПЦР в объеме менее 5 мкл проводится под маслом независимо от типа крышки амплификатора.

ПЦР-бокс применяется для чистой работы с выделенной тотальной ДНК. Для защиты от контаминации образцов и компонентов ПЦР приготовление реакционной смеси осуществляют в боксе. Оборудование для электрофоретической детекции продуктов амплификации описано в п/главе 5.3 и 5.4.

Пластик

Для ПЦР-анализа необходимы одноразовые тонкостенные пластиковые микропробирки объемом 0.1(0.2), 0.5(0.6) и 1.5(2) мл. Микропробирки 0.1(0.2) мл предназначены для проведения ПЦР в малых объемах, что оптимизирует нагрев и расход реактивов при проведении амплификации. Бывает три различных варианта микропробирок такого объема: индивидуальные, скрепленные по 8 или 12 штук (в «стрипах») и в виде 24, 48 или 96-луночных планшетов. Планшеты могут быть с юбкой, полуюбкой или без юбки. Юбка (или полуюбка) выполняет роль штатива, облегчая работу с микропробирками при извлечении из амплификатора. Микропробирки объемом 0.5(0.6) мл подходят как для проведения ПЦР, так и для центрифугирования. Микропробирки объемом 1.5(2) мл используют на стадии выделения ДНК, для центрифугирования, хранения образцов и прочих нужд. Пробирки с плоской крышкой и полосой для записи удобнее подписывать при работе. Тип пробирки также оказывает существенное влияние на результат ПЦР: чем лучше пробирка подходит к лункам термоблока и чем тоньше стенки пробирки, тем короче может быть время инкубации при каждой температуре, сокращая общее время амплификации. На всех этапах молекулярного анализа необходимо использовать пластиковые наконечники с фильтрами, что позволит снизить риск кросс-контаминации образцов. При постановке ПЦР в планшетах удобнее выбирать многоканальные дозаторы для сокращения времени замешивания и раскапывания реакционной смеси, а также минимизации ошибок. Наиболее часто используются пластиковые наконечники объемом 20 и 200 мкл. Любой используемый пластик в ПЦР-анализе должен быть одноразовым, изготовленным из прозрачного высококачественного полипропилена и сертифицированным на отсутствие РНКаз, ДНКаз и апирогенность.

Реактивы для ПЦР

Необходимыми реакционными компонентами для ПЦР-анализа являются: термостабильная ДНК-полимераза, олигонуклеотидные праймеры, дНТФ, *milliQ*-вода, реакционный буфер, матричная (целевая) ДНК, а также ионы магния Mg^{2+} . Все реагенты, за исключением матричной ДНК, смешиваются в одной пробирке (основная смесь или «мастер-микс») в достаточном объеме в соответствии с количеством проб (обычно готовят на 1 пробу больше). Затем из основной ПЦР-смеси отбирают аликвоты в отдельные подписанные пробирки, в которые добавляют матричную ДНК водорослей. Использование «мастер-микса»

снижает риск загрязнения и улучшает эффективность ПЦР вследствие унифицированного качества раствора и уменьшения стадий добавления компонентов. До приготовления реакционной смеси следует всегда полностью размораживать и тщательно перемешивать все компоненты ПЦР (кроме полимеразы). Если разморозить растворы частично и не перемешать их, правильная концентрация реагентов, необходимых для успешной ПЦР, нарушается. Полимеразу можно перемешивать только аккуратным покачиванием или пипетированием. После добавления сразу уносить обратно в морозильник на -20°C .

ДНК-полимераза. Основное требование к полимеразе, используемой в ПЦР, - это способность сохранять активность после инкубации при 95°C . Все ДНК-полимеразы способны присоединять нуклеотиды только с 3'-конца полинуклеотида. В настоящее время выделяют следующие виды ДНК-полимераз.

Taq-полимераза – первая использованная термостабильная ДНК-полимераза, полученная из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988). Фермент представляет собой одну полипептидную цепь с молекулярной массой около 95 кДа. Это умеренно процессивный фермент (обычно эффективно амплифицирующий фрагменты длиной до 3-5 тыс. п.н.) с хорошо выраженной 5'-3' экзонуклеазной активностью и без 3'-5' (корректирующей) экзонуклеазной активности. Получаемые при использовании *Taq-полимеразы* фрагменты ДНК, как правило, содержат выступающий 3'-концевой нуклеотид (чаще всего – аденозин), нематрично присоединяемый ферментом (Ребриков и др., 2009).

Tth-полимераза была выделена из термофильной бактерии *Thermus thermophilus*. Это высокопроцессивный фермент (дает фрагменты длиной до 10 тыс. п.н.) массой около 94 кДа. Фермент осуществляет синтез ДНК в направлении 5'-3' в присутствии ионов Mg^{2+} и при определенном значении pH, а также синтез ДНК в направлении 5'-3' в присутствии ионов Mn^{2+} , используя в качестве матрицы РНК. *Tth-полимераза* также обладает 5'-3' экзонуклеазной активностью (эта активность проявляется только при работе фермента на двухцепочечной ДНК). Ампликоны, полученные с использованием *Tth-полимеразы*, могут иметь на концах выступающий дНТФ. Данный фермент используют для проведения обратной транскрипции и ПЦР в одной пробирке.

Pwo-полимераза была выделена из гипертермофильной археи *Pyrococcus woesei*. Масса фермента около 90 кДа. Это процессивный фермент (дает фрагменты до 3 тыс. п.н.) без 5'-3' экзонуклеазной активности и с хорошо выраженной 3'-5' экзонуклеазной активностью (Ребриков и др., 2009).

Pfu-полимераза получена из археи *Pyrococcus furiosus*. Масса фермента около 92 кДа. Максимальная активность фермента проявляется при температуре $70-74^{\circ}\text{C}$, время полуинактивации при 94°C составляет не

менее 30 мин. Фермент осуществляет синтез ДНК в направлении 5'-3' в присутствии ионов Mg^{2+} и при соответствующем значении pH, а также обладает 3'-5' экзонуклеазной активностью (так называемая «проверочная активность» – «*proofreading activity*»). Наличие 3'-5' экзонуклеазной активности делает фермент пригодным для ПЦР, где необходимо получение продукта с высокой точностью синтеза. При работе в оптимальных условиях *Pfu*-полимераза допускает минимальное количество ошибок по сравнению с другими термостабильными полимеразы. Ампликоны, полученные с использованием *Pfu*-полимеразы, являются тупоконечными, т.к. фермент не добавляет дНТФ на 3'-конец новосинтезированной цепи. Следовательно, ампликон не пригоден для клонирования в Т-вектор, однако готов для клонирования по тупым концам. Важная особенность *Pfu*-полимеразы заключается в том, что наличие 3'-5' экзонуклеазной активности делает этот фермент «медленным». При этом снижается чувствительность к низкокопийной матрице и сокращается выход продукта.

HiFi-полимераза представляет собой специально подобранную смесь ферментов *Pfu*- и *Taq*-полимеразы для проведения более эффективной ПЦР, чем с использованием *Taq*-полимеразы. Максимальная активность фермента проявляется при температуре 70-74°C, время полуинактивации при 94 °C составляет приблизительно 45 мин. Фермент осуществляет синтез ДНК в направлении 5'-3' в присутствии ионов Mg^{2+} и при определенном значении pH, а также обладает небольшой 3'-5' экзонуклеазной активностью. Наличие 3'-5' экзонуклеазной активности делает *HiFi*-полимеразу более эффективной в ПЦР, чем *Taq*-полимераза. При работе в оптимальных условиях *HiFi*-полимераза допускает меньшее количество ошибок по сравнению с *Taq*-полимеразой. Ампликоны, полученные с использованием *HiFi*-полимеразы, имеют на концах незначительные полиаденилированные участки и достигают максимальной длины до 5 тыс. п.н.

Vent-полимераза выделена из термофильной археи *Thermococcus litoralis*, способной расти в горячих ключах на дне океана при температуре 98°C. Катализирует матричный синтез ДНК, при этом ее точность в 5-15 раз выше, чем у *Taq*-полимеразы благодаря наличию 3'-5' корректирующей экзонуклеазной активности. Данная активность позволяет удалять неспаренные основания, пока не образуется правильно спаренный по основаниям конец цепи. Отличается более высокой термостабильностью по сравнению с *Taq*-полимеразой.

Deep Vent-полимераза выделена из штамма бактерии *Escherichia coli*, несущего рекомбинантный ген *Vent*-ДНК-полимеразы из археи *Pyrococcus sp.*, способной расти при температуре около 104°C. Более стабильна, чем *Vent*-полимераза при 95-100°C.

В настоящее время большинство коммерческих ферментов представляют собой смеси полимераз с различными свойствами, биологический источник которых производители часто не раскрывают. Например, современная ДНК-полимераза – *Q5 (New England Biolabs)* – подходит для амплификации длинных фрагментов (до 20 тыс. нуклеотидов) с богатым ГЦ-составом и имеет точность более чем в 100 раз выше, чем у *Taq*-полимеразы.

Нуклеотиды. Для приготовления ПЦР-микса используют заранее смешанные в равной пропорции дНТФ четырех типов:

дАТФ (dATP) – дезокси**а**дено**з**интрифосфат,

дГТФ (dGTP) – дезокси**г**уано**з**интрифосфат,

дТТФ (dTTP) – дезокс**и**т**и**мид**и**нтрифосфат,

дЦТФ (dCTP) – дезокс**и**ц**и**тид**и**нтрифосфат.

В ПЦР оптимальнее всего использовать коммерческие растворы смеси нуклеотидов, в которых все четыре дНТФ находятся в эквимольных соотношениях. Неравная концентрация четырех дНТФ ведет к увеличению ошибок ДНК-полимеразы в ходе ПЦР. Обычно в протоколах конечная суммарная концентрация дНТФ – 200 мкМ (около 25 мкМ для каждого нуклеотида). Теоретически этого количества достаточно для синтеза 10 мкг продукта (на практике 2-3 мкг) (McPherson, Møller, 2000). Если необходимо увеличение концентрации дНТФ в реакционной смеси, то одновременно с этим следует увеличить и концентрацию Mg^{2+} , так как уменьшение его концентрации (в результате связывания с дНТФ) влияет на температуру и специфичность отжига праймеров.

ПЦР-буфер. В дополнение к реагентам, непосредственно участвующим в реакции, метод ПЦР требует наличия подходящего буфера. Состав буфера зависит от типа и характеристики фермента, который предполагается использовать в реакции. Большинство поставщиков термостабильной ДНК-полимеразы поставляют вместе с ферментом 10x реакционный буфер. Как правило, 1x буфер имеет следующий состав: 10 мМ Tris (pH 8.3), 50 мМ KCl, 1.5-2.5 мМ $MgCl_2$.

Tris-HCl – это дипольный ионный буфер, pH которого зависит от температуры, поэтому в ходе ПЦР pH изменяется в пределах 6.8-8.3. На самом деле *Taq*-полимераза обладает более высокой точностью в кислой реакции среды, которая наблюдается при повышении температуры в ходе ПЦР.

KCl – способствует отжигу праймеров, но в высоких концентрациях может приводить к образованию неспецифичных продуктов.

Mg^{2+} – один из основных критических компонентов в ПЦР, так как является кофактором ДНК-полимеразы, входит в ее активный центр, а также его концентрация влияет на специфичность и эффективность реакции. Ионы Mg^{2+} образуют растворимые комплексы с дНТФ,

формируя субстрат для ДНК-полимеразы. Избыток магния может приводить к частым ошибкам в работе ДНК-полимеразы. Как правило, стандартный ПЦР-буфер содержит 1.5 мМ $MgCl_2$ (1х буфер). Для достижения наилучших результатов можно эмпирически подобрать концентрацию Mg^{2+} . Многие поставщики термостабильных ДНК-полимераз вместе с ферментом прилагают буфер без магния и стоковый раствор сульфата (хлорида) магния (чаще всего 25 или 50 мМ) для того, чтобы исследователь мог оптимизировать концентрацию этого компонента (Lorenz, 2012).

Вода. Рекомендуется использовать стерильную воду высокой степени очистки без нуклеаз, например, *MilliQ (Millipore)* или аналог. Воду можно разаликвотить по 1.5 мл в микропробирки и хранить в морозильнике при $-20^{\circ}C$. В крайнем случае в ПЦР можно использовать бидистиллированную воду.

Минеральное масло. Используется в термоциклерах без нагреваемой крышки для защиты от испарения реакционной смеси или при постановке ПЦР в малых объемах (менее 5 мкл). Следует учесть, что масло может ингибировать ПЦР. Абсолютное большинство современных амплификаторов имеет крышку с подогревом.

Другие компоненты. Иногда в ПЦР добавляют присадки, улучшающие результат реакции. Их можно разделить на группы:

1. влияющие на температуру отжига (T_a) ДНК и олигонуклеотидов: диметилсульфоксид (ДМСО), формамид и др.;
2. влияющие на стабильность ДНК-полимеразы: бетаин, бычий сывороточный альбумин (БСА), неионные детергенты, желатин, глицерин и др.

Использовать ДМСО и формамид в качестве добавок, улучшающих выход целевых ПЦР-продуктов, можно в следующих случаях:

- при неспецифичной наработке ПЦР-продукта (присутствуют многочисленные полосы, шмеры на дорожке геля), т.к. они уменьшают неспецифическое связывание и способствуют получению чистого ПЦР-продукта;
- в некоторых (относительно редких) случаях при наличии устойчивых элементов вторичной структуры ДНК (шпильки, которые не расплетаются при температурной денатурации и препятствуют отжигу праймеров на матрице);
- при ПЦР ДНК-матрицы, обогащенной ГЦ-парами.

ДМСО и формамид добавляют к ПЦР-смеси перед началом реакции в максимальном количестве, не превышающем 10% от объема смеси. Большее количество препятствует отжигу праймеров, ингибирует ДНК-полимеразу и, как следствие, снижает выход целевого ПЦР-продукта.

Бетаин, как и БСА, обладает осмопротекторными свойствами, что повышает устойчивость полимеразы к денатурации (Frackman et al., 1998). Бетаин (в конечной концентрации от 0.5 до 2.5 М) также позволяет преодолеть небольшое количество возможных ингибиторов, присутствующих в ПЦР-смеси (Lorenz, 2012). БСА или желатин в концентрации 0.01-0.1% (вес/объем) а также неионные детергенты *Triton X100*, *Nonidet NP40* и *Tween 20* в концентрации 0.05-0.1% (объем /объем) также являются стабилизаторами ДНК-полимеразы. Обобщенные сведения о влиянии дополнительных компонентов на эффективность ПЦР приведены в Прил. 4 (табл.2).

Для постановки ПЦР необходимо рассчитать рабочие концентрации компонентов реакционной смеси в соответствии с рекомендациями производителя при использовании коммерческого набора. Советуем следовать некоторым правилам при замешивании компонентов ПЦР:

1. При выполнении нескольких параллельных реакций удобно готовить «мастер-микс» (смесь *milliQ*-воды, буфера с $MgCl_2$, дНТФ и праймеров в одной пробирке), который затем аликвотируется по индивидуальным пробиркам. Затем добавляется ДНК-матрица – выделенная суммарная ДНК, растворенная в *milliQ*-воде;
2. Все компоненты ПЦР (кроме полимеразы) необходимо перемешать на вихрексе после оттаивания и сбросить капли перед приготовлением «мастер-микса»;
3. Добавлять полимеразу в «мастер-микс» следует в последнюю очередь, и сразу уносить в морозильник. Перемешивать полимеразу можно только покачиванием или аккуратным пипетированием.
4. Рекомендуем делать стоковую пробирку отрицательным контролем.
5. Начинать смешивать реагенты лучше с воды, малые количества вязких растворов (таких как раствор фермента с добавлением 50% глицерина) необходимо вносить внутрь реакционной смеси и несколько раз пипетировать, чтобы быть уверенным в том, что в смесь попало необходимое количество вещества.
6. Если не используется амплификатор с нагреваемой крышкой или ставится ПЦР в малых объемах (менее 5 мкл), то поверх реакционной смеси наслаивается минеральное масло.

Приведем пример расчета концентраций компонентов ПЦР при использовании коммерческого набора «*Encyclo PCR*» (Евроген). Рекомендованные производителем концентрации компонентов смеси указаны в табл. 5.1.

Табл.5.1. Рекомендуемые концентрации компонентов набора «*Encyclo PCR*» (Евроген)

Компонент	Объем для 50 мкл	Конечная концентрация
<i>milliQ</i> -вода	До 50 мкл	-
10x <i>Encyclo</i> буфер	5 мкл	1x
50x смесь дНТФ	1 мкл	1x (0.2 mM каждого)
PCR праймер F	переменный	0.2-0.5 мкМ
PCR праймер R	переменный	0.2-0.5 мкМ
50x <i>Encyclo</i> полимеразы	1 мкл	1x
ДНК-матрица	переменный	1 пг-200 нг/50 мкл
Суммарный объем	50 мкл	-

Примечание. ДНК-матрица в смесь не входит, добавляется в пробирки отдельно.

Однако обычно используют меньшие объемы реакционной смеси для постановки ПЦР (10-25 мкл). Возьмем для примера более сложный случай расчета: нам необходимо провести расчет ПЦР смеси для 15 проб зеленых водорослей (+ 2 отрицательных контроля), из них 10 проб амплифицируется с праймером 18S рДНК и 5 – с праймером *rbcL*. Если бы мы использовали только одну пару праймеров для всех ДНК-проб, то объемы компонентов реакционной смеси были бы следующие (табл. 5.2):

Табл. 5.2. Расчетные концентрации компонентов набора «*Encyclo PCR*» (Евроген)

Компонент	Объем для 17 проб
<i>milliQ</i> -вода	95.2 мкл
10x <i>Encyclo</i> буфер	17 мкл
50x смесь дНТФ	3.4 мкл
PCR праймер F	17 мкл
PCR праймер R	17 мкл
50x <i>Encyclo</i> полимеразы	3.4 мкл
ДНК-матрица*	17 мкл
Суммарный объем	170 мкл

Примечание. ДНК-матрица в смесь не входит, добавляется в пробирки отдельно.

В нашем случае схема будет немного посложнее. Сначала сделаем общий расчет объемов необходимых компонентов исходя из рекомендаций производителя коммерческого набора (табл. 5.1). В расчетах воду добавляют по остаточному принципу. Смешиваем в одной пробирке *milliQ*-воду, 10x *Encyclo* буфер, 50x смесь дНТФ, 50x *Encyclo* полимеразу. Общий объем «мастер-микса» составляет 119 мкл. Из них 77 мкл переносим в пробирку для добавления праймеров 18S рДНК и 42 мкл

– для *rbcL*. К первому варианту добавляем по 11 мкл прямого (*F*, *forward*) и обратного праймеров (*R*, *reverse*), ко второму – по 6 мкл. Далее 99 мкл смеси для амплификации 18S рДНК разносим по 9 мкл в 11 пробирок, в 10 из них добавляем 1 мкл ДНК-матрицы, а в 11-ю (отрицательный контроль) добавляем 1 мкл *milliQ*-воды. Аналогично 54 мкл «мастер-микса» для амплификации *rbcL* разносим по 9 мкл в 5 пробирок, добавляем по 1 мкл ДНК-матрицы, а в 6-ю (отрицательный контроль) – добавляем 1 мкл *milliQ*-воды. Скидываем капли перед амплификацией. Общая схема приготовления «мастер-микса» изображена на рис. 5.3.

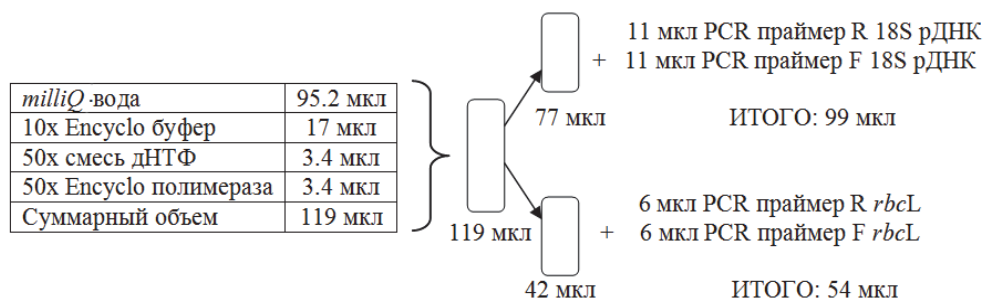


Рис. 5.3. Схема приготовления «мастер-микса» из компонентов набора «Encyclo PCR» для двух пар праймеров.

5.2.3 Подбор праймеров для ПЦР и подготовка их к работе

Один из наиболее критических параметров для успешного проведения ПЦР – это подбор и конструирование праймеров. Последовательность праймера определяет целый ряд показателей, таких как позиция и длина продукта, его температура плавления и, безусловно, выход продукта (Innis et al., 1994). Плохо сконструированный праймер может привести к малому выходу ПЦР-продукта или его отсутствию, вследствие неспецифичной амплификации и/или образования димера праймера, который может стать конкурентным настолько, что будет подавлять образование целевого продукта.

В настоящее время существуют многочисленные программы для конструирования праймеров и расчета их основных параметров, например, **Oligo** (*Molecular Biology Insights, Inc.*), **GeneRunner** (*Hastings Software, Inc.*), **PrimerSelect**, **DNASTAR** (*DNASTAR, Inc.*) и др. (Прил. 5). Однако ни один из существующих алгоритмов не обеспечивает полной гарантии хорошей работоспособности праймеров. При конструировании праймеров для ПЦР следует принимать во внимание следующие параметры:

- длина праймера,
- температура плавления (T_m),

- специфичность,
- комплементарная последовательность праймера,
- ГЦ-содержание и полипиримидиновые (Т, Ц) или полипуриновые (А, Г) протяженные участки,
- 3'-концевая последовательность.

Длина праймера. В основном используют праймеры длиной 16-30 нуклеотидов, что позволяет применять достаточно высокую температуру отжига. Кроме того, длина праймера прямо пропорциональна эффективности отжига.

Температура плавления. Часто температура отжига, рассчитанная теоретически, оказывается не очень эффективной, и требуется проведение специальных экспериментов для определения оптимальной температуры эмпирическим путем. Этот подбор наиболее легко выполнить при наличии амплификатора с функцией температурного градиента. Важно учитывать, что, т.к. в ПЦР используют два праймера, необходимо подбирать их таким образом, чтобы они имели примерно одинаковую температуру плавления (T_m). Если праймеры не совпадают в отношении T_m , амплификация будет менее эффективной или может вовсе не пройти.

Специфичность. При разработке праймеров выгодно найти фрагмент ДНК-мишени, который бы отличался эволюционной консервативностью, но при этом присутствовал только у интересующего нас таксона (вида, рода, семейства, порядка и т.д.) зеленых водорослей – то есть был бы специфичным. Найти участок, удовлетворяющий таким противоречивым требованиям, удастся не всегда. Чаще всего альгологам приходится иметь дело с универсальными праймерами (18S рДНК, ITS1-ITS4, *tufA*, *rbcL* и др., Прил. 2), что предполагает повышенные требования к чистоте культуры: отсутствие других эукариотов (грибов, простейших, других водорослей).

Комплементарная последовательность праймера. Также нежелательно наличие последовательностей, комплементарных другим праймерам, используемым в ПЦР, а также отсутствие внутренней комплементарности, превышающей 3 нуклеотидные пары. Если праймер имеет участок внутренней комплементарности, то могут создаваться частично двухцепочечные структуры, типа «обратного схлопывания» или «шпилек», которые будут мешать отжигу с матрицей. Если в комплементарное взаимодействие вовлечен 3'-конец любого праймера, возможно образование структуры, способной взаимодействовать с полимеразой, конкурируя со связыванием праймера на целевой матрице; в случае достройки полимеразой комплементарных нуклеотидов к 3'-концу праймера в такой структуре, молекула праймера теряет способность к образованию целевого продукта.

ГЦ-содержание и полипиримидиновые (Т, Ц) или полипуриновые (А, Г) протяженные участки. Один из важных параметров – состав

оснований в последовательности праймера: содержание ГЦ-пар желательно соблюдать в пределах 45-55%. При конструировании праймеров следует избегать наличия в их структуре протяженных участков, состоящих из одного нуклеотида, либо повторяющихся мотивов – они могут гибридизоваться несоответствующим образом на матрице.

3'-концевая последовательность. По возможности 3'-конец праймера должен быть богат Г- и Ц-основаниями для повышения эффективности отжига этого конца праймера, который будет гибридизоваться.

Для расчета разведения сухих праймеров можно использовать программу **OligoAnalyzer** (ссылка в Прил. 5). В интерфейсное окно необходимо ввести последовательность праймера, нажать «*Analyze*», внизу появится необходимая информация, из которой важен «*Extinction coefficient*». Выбираем «*Resuspension*», в графе «*Quantity*» меняем на параметр на «*OD260*» (оптическая плотность), вносим данные от производителя, синтезировавшего праймеры. Вводим «*Extinction coefficient*» и «*Final concentration*» (100 пкмоль/мкл), нажимаем «*Calculate*». Пример расчета представлен на рис. 5.4.

Resuspension Calculator
The Resuspension Calculator assists in determining the volume needed to resuspend a dry, lyophilized oligo to a desired concentration. Simply enter the quantity of oligonucleotide and final desired concentration and click "Calculate." If you choose a pre-determined Extinction Coefficient or if the Molecular Weight is not required for your calculation, "Not Needed" will be shown.

Results
Results: For a **100 μ M** concentration, resuspend oligo in **227.3 μ L** of water or TE buffer.

Quantity
5 OD260

Final Concentration
100 μ M (μ mole/L or pmole/ μ L)

Extinction Coefficient [Where do I find my EC?](#) Preset Extinction Coefficients
220000 L/(mole*cm) Manual Entry

Molecular Weight
Not Needed

Calculate Clear

Рис. 5.4. Интерфейсное окно онлайн-программы **OligoAnalyzer** для расчета разведения сухих праймеров.

После проведения расчетов по разведению сухих праймеров необходимо выполнить следующие действия:

1. *центрифугировать пробирки с сухими праймерами 2-3 мин. на максимальных оборотах,*
2. *добавить рассчитанный объем milliQ-воды или TE-буфера (см. протокол 6, Прил. 3),*
3. *тщательно перемешать на шейкере, чтобы сухие праймеры полностью растворились в объеме воды,*
4. *стоковые праймеры (100 пкмоль/мкл) хранить при -20°C в виде аликвот по 30 или 50 мкл,*

5. для приготовления рабочей концентрации праймеров (10 пкмоль/мкл) нужно взять 5 мкл 100-пкмольных (стоковых) праймеров и добавить 45 мкл milliQ-воды или TE-буфера (протокол 6, Прил. 3), перемешать, хранить при -20°C.

Качество синтеза олигонуклеотидов также важно для проведения эффективной и специфичной ПЦР. В идеальном случае, используемый в качестве праймера олигонуклеотид должен представлять собой единственный вариант последовательности фиксированной длины. Однако на самом деле любой синтезированный нуклеотид представляет собой смесь молекул различной длины и состава. Молекулы олигонуклеотидов, отличающиеся по последовательности от предполагаемой структуры, образуются из-за невозможности проведения пошагового синтеза олигонуклеотида со 100% эффективностью на каждом шаге. Вследствие этого непрореагировавшие на некотором шаге синтеза олигонуклеотиды ведут к появлению так называемых «минусовых» фракций – молекул с последовательностью, укороченной на 1, 2, 3 и более основания. Суммарное содержание «минусовых» фракций может составлять от нескольких процентов до половины продукта. Поэтому для получения наилучших результатов после синтеза изготовитель проводит очистку праймеров. Среди вариантов очистки праймеров распространена высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и препаративный электрофорез в ПААГ. Как правило, фирмы, синтезирующие олигонуклеотиды, включают цену услуги по их очистке в общую стоимость синтеза праймеров.

После того как выбраны последовательности для праймеров из статьи или разработан собственный праймер, они заказаны и синтезированы, необходимо убедиться в том, что праймеры работают, т.е. дают целевые ДНК-продукты нужного размера без неспецифики. Рекомендуем опробовать праймеры, используя в качестве матрицы стабильную и проверенную пробу ДНК. В этом случае, если ПЦР не пройдет, то праймеры не работают вследствие неоптимальных условий ПЦР или недоучета параметров их конструирования. Если амплификация прошла успешно, то праймер считается проверенным и можно переходить к работе с новыми образцами ДНК.

5.2.4 Оптимизация параметров ПЦР

Даже при условии применения проверенных стандартных протоколов и коммерческих наборов реактивов нередко приходится оптимизировать параметры проведения ПЦР для улучшения эффективности и специфичности реакции. Проблемы, возникающие при ПЦР, обнаруживаются на этапе электрофоретической детекции продуктов амплификации (см. п/главу 5.3). К ним можно отнести отсутствие ПЦР-продукта или низкий выход реакции (слабый ПЦР-продукт), а также

образование множественных или смазанных ПЦР-продуктов. Решение проблемы и подбор оптимальных параметров ПЦР осуществляется в двух направлениях: компоненты реакционной смеси и условия ПЦР.

Отсутствие ПЦР-продукта или низкий выход реакции

Причиной данной проблемы могут стать следующие:

- компоненты не добавлены или испорчены,
- неоптимальные концентрации компонентов (магния, праймеров, ДНК-матрицы и др.),
- неудачная структура праймеров,
- неоптимальные условия ПЦР (время и(или) температура денатурации, элонгации матрицы, а также отжига праймеров),
- сложная ДНК-матрица (сложная структура амплифицируемой области и/или высокая концентрация гомологичных повторов, н-р ГЦ-обогащенные фрагменты),
- плохое качество ДНК-матрицы,
- наличие в реакционной смеси ингибиторов ПЦР,
- недостаточное число циклов ПЦР,
- неисправная работа амплификатора.

Образование множественных или смазанных ПЦР-продуктов

Причиной данной проблемы могут стать следующие:

- неоптимальные концентрации компонентов (высокая концентрация ДНК-матрицы, полимеразы),
- неоптимальные условия ПЦР (низкая температура отжига праймеров или денатурации, длинное время элонгации),
- избыточное число циклов ПЦР,
- сложная ДНК-матрица (сложная структура амплифицируемой области и/или высокая концентрация гомологичных повторов, н-р ГЦ-обогащенные фрагменты),
- контаминация пробы посторонней ДНК-матрицей,
- неудачная структура праймеров.

В некоторых случаях может потребоваться комплексная оптимизация параметров амплификации, поэтому нужно быть готовыми проявить гибкость мышления в подборе экспериментальных условий. Подробное описание проблем ПЦР-анализа, их возможных причин и путей решений обобщены в табл.1, Прил. 4.

5.3. Электрофоретическая детекция ДНК в агарозном геле

Следующий этап молекулярного анализа для идентификации зеленых водорослей после ПЦР – электрофоретическая детекция продуктов амплификации. Электрофорез – это метод, который служит для обнаружения, разделения, и очистки фрагментов ДНК на основе их размера, электрического заряда и других физических свойств, влияющих на миграцию заряженных частиц под воздействием электрического поля.

Различают аналитический и препаративный электрофорез. Аналитический электрофорез проводят с целью обнаружения целевого ПЦР-продукта, в то время как препаративный электрофорез используется для визуализации целевого продукта амплификации, очистки и извлечения из геля для дальнейшего секвенирования.

Миграция ДНК осуществляется в буферном растворе через гель. Для электрофоретического анализа относительно длинных молекул ДНК обычно используют агарозный гель, если необходимо высокое разрешение коротких молекул ДНК, то полиакриламидный гель (ПААГ). Агароза – это линейный полисахарид, особо чистая фракция природного агара, выделяемого из морских водорослей. В агарозе для электрофореза, которая поставляется в виде лиофилизированного порошка, удалены остаточные сульфогруппы, которые являются ингибиторами некоторых ферментов – лигаз, протеиназ и экзонуклеаз рестрикции. Агароза плавится при температуре 70-95°C, а при остывании (30-40°C) образует прочный гель. Хаотически застывшие нити затвердевшей агарозы, благодаря образующимся между ними водородным связям, скручиваются в жгуты. Перекрещиваясь, эти жгуты образуют в окружающей жидкости крупнопористую, но прочную пространственную решетку (Остерман, 1985). Скорость миграции ДНК через агарозный гель при электрофорезе определяется следующими параметрами:

1. *Размер молекул ДНК.* Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в геле со скоростями обратно пропорциональными логарифму их молекулярных масс.
2. *Концентрация агарозы.* Фрагменты ДНК определенного размера перемещаются в геле с различной скоростью в зависимости от концентрации агарозы (табл. 5.3). Таким образом, применяя агарозные гели разных концентраций, можно разделить большой диапазон фрагментов ДНК с различной молекулярной массой.

Табл. 5.3. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК разного размера в зависимости от концентрации агарозы (Великов, 2013)

Концентрация агарозы, %	Диапазон размеров ДНК (п.н.)
0.75	10 000 - 15 000
1	500 – 10 000
1.25	300 – 5 000
1.50	200 – 4 000
2	100 – 2 500
2.50	50 – 1 000

3. *Конформация ДНК.* ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации (например, кольцевая неповрежденная,

кольцевая с одноцепочечным разрывом и линейная) движутся в агарозном геле с различными скоростями.

4. *Напряженность электрического поля.* Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от минуса к плюсу. При низких напряженностях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. Однако с увеличением напряженности электрического поля подвижность фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально возрастает. Следовательно, с увеличением напряженности область эффективного разделения ДНК в агарозном геле снижается. Время и напряжение, при котором проводят электрофорез, зависят от целей исследователя (аналитический или препаративный электрофорез) и от размера ПЦР-продукта. В среднем это время колеблется от 30 мин до 2 часов, а напряжение от 50 до 100В (выше 100В начинает разрушаться агарозная решетка) (Остерман, 1985).

5. *Состав оснований и температура.* Электрофоретическое поведение ДНК в агарозных гелях (в отличие от поведения в ПААГ) слабо зависит от состава оснований ДНК и температуры геля. Обычно электрофорез в агарозных гелях ведут при комнатной температуре (Маниатис и др., 1984).

В настоящее время существует огромное разнообразие марок агарозы в порошковой или таблетированной форме, последний формат исключает стадию взвешивания агарозы. Для электрофореза следует выбирать агарозу с высокой растворимостью и прозрачностью, низким электроэндо́смосом, свободную от протеаз, ДНКаз/РНКаз и с минимальным содержанием сульфатов. Для проведения гель-электрофореза используются специальные камеры для горизонтального электрофореза (рис.5.5) и источником питания.

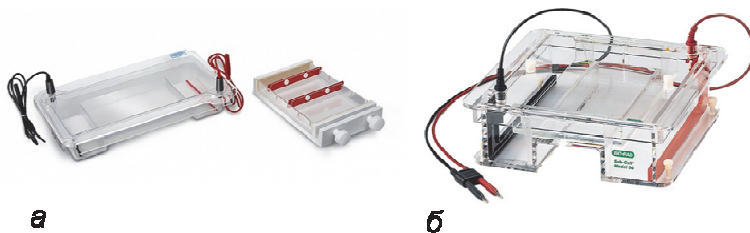


Рис 5.5. Камеры для горизонтального электрофореза.

Примечание. *а* – SE-1 (Helicon), *б* - Wide Mini Sub Cell GT (Bio-Rad).

Для визуализации ПЦР-продукта в ультрафиолете используют интеркалирующие агенты, например, бромистый этидий, интенсивность флуоресценции которого увеличивается примерно в 20 раз при

связывании с ДНК. Приготовление агарозного геля для детекции ампликонов описано ниже:

1. для приготовления 1%-ного агарозного геля взвесить в стеклянный стакан 0.5 г агарозы,
2. добавить 50 мл 0.5х ТВЕ-буфера (аналитический электрофорез, протокол 8, Прил.3) или ТА-буфера (препаративный электрофорез, протокол 7, Прил.3),
3. расплавить агарозу СВЧ-печи, не доводя до сильного кипения,
4. под тягой добавить 25 мкл раствора бромистого этидия (стоковый раствор 10 мг/мл) до конечной концентрации 0.5 мкг/мл, тщательно перемешать,
5. остывший примерно до 50°C гель залить в ванночку и установить гребенки,
6. оставить застывать гель на 25-30 мин. при комнатной температуре в темноте. Бромистый этидий можно не добавлять непосредственно в гель. В этом случае пластину агарозного геля после окончания электрофореза инкубируют в темноте в слабом растворе бромистого этидия (конечная концентрация 2 мкг/мл) в течение 10-15 мин.

Минимальное количество ДНК, которое можно визуализировать в агарозном геле с добавлением бромистого этидия – 2 нг. Если вносить слишком большое количество ДНК (более 200 нг), происходит перегрузка карманов и, как следствие, смазывание полос ДНК-фрагментов, появление шмеров и т.п., что значительно затрудняет визуализацию. Стоковый раствор бромистого этидия следует хранить при комнатной температуре в стеклянной таре, обернутой светонепроницаемой фольгой. На свету бромистый этидий разрушается.

Внимание! Бромистый этидий – сильный мутаген. Необходимо работать в резиновых перчатках, соблюдая меры предосторожности. Избегать контакта с кожей и слизистыми оболочками! При попадании промыть участок большим количеством воды. Существует большое количество современных альтернативных красителей, не проявляющих выраженные токсичные свойства. Например, *SYBR Green*, *DNA-Day NonTox*, *Midori Green* и другие. Тем не менее, бромистый этидий часто используется благодаря высокой чувствительности и низкой стоимости. Все реагенты, содержащие бромистый этидий, перед утилизацией необходимо подвергать специальной обработке, один из протоколов приведен ниже:

1. поместить отработанные гели и буфер из электрофорезной камеры в пластиковую емкость с плотно закрывающейся крышкой,
2. добавить 1 объем 0.5 М раствора перманганата калия и затем 1 объем 2.5 М соляной кислоты,

3. аккуратно перемешать и оставить при комнатной температуре на 4-6 ч.,

4. добавить 1 объем 2.5 М гидроксида натрия, осторожно перемешать,

5. нейтрализованные таким образом реактивы можно утилизировать бытовым способом.

Пока гель застывает, можно заполнить электрофорезную камеру буфером: ТА (трис-ацетатный) или ТВЕ (трис-боратный с ЭДТА). ТВЕ-буфер используется для аналитических электрофорезов, так как дает более четкое разделение полос, но борная кислота, входящая в его состав, является ингибитором полимераз. Поэтому при подготовке проб к секвенированию – препаративный электрофорез – используется ТА-буфер. Застывший гель помещают в электрофорезную камеру, заполненную буфером, и аккуратно вынимают гребенки. В образовавшиеся карманы геля (лунки) вносят маркер молекулярного веса, ПЦР-продукты и отрицательный контроль. Если цель электрофореза заключается в оценке успешности ПЦР (аналитический электрофорез), то в карманы геля можно вносить по 3-5 мкл ПЦР-продукта, при препаративном электрофорезе в лунку вносят весь объем пробы. При использовании окрашенного ПЦР-буфера нет необходимости использовать дополнительный лидирующий краситель. Если же буфер не окрашен, то для облегчения внесения ПЦР-продуктов в карманы геля и визуального контроля миграции проб, к вносимому количеству ПЦР-продукта следует добавить 1 мкл лидирующего красителя и аккуратно внести окрашенные пробы в лунки. Смешивать ПЦР-продукт с красителем лучше в специальных планшетах или на лабораторной ленте *Parafilm*. Лидирующий краситель обычно представляет собой смесь двух красителей: бромфеноловый синий (БФС) и ксиленцианол (КЦ), которые имеют различную подвижность в агарозном геле при электрофорезе. Подвижность КЦ (на уровне примерно 1000 п.н.) в несколько раз ниже, чем БФС (на уровне 300 п.н.), поэтому его используют при анализе нуклеиновых кислот с высокой молекулярной массой.

Для приготовления смеси красителей для нанесения проб необходимо растворить в воде 0.25% бромфеноловый синий (БФС), 0.25% ксиленцианол (КЦ) и 40% сахарозу, тщательно перемешать.

В крайние карманы обычно вносят маркер молекулярного веса (*DNA ladder*) – коммерческий набор фрагментов ДНК известной длины, сравнивая с которым, определяют размеры исследуемого ПЦР-продукта. После окончания электрофореза, агарозный гель помещают на фильтр трансиллюминатора (рис.5.6), который излучает свет в ультрафиолетовом диапазоне (254-310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм). Яркость полос

продуктов амплификации может быть различной, но напрямую бывает не связана с исходным количеством ДНК-мишени в образце. Часто уменьшение яркости свечения полос связано со снижением эффективности амплификации под влиянием ингибиторов или других факторов.

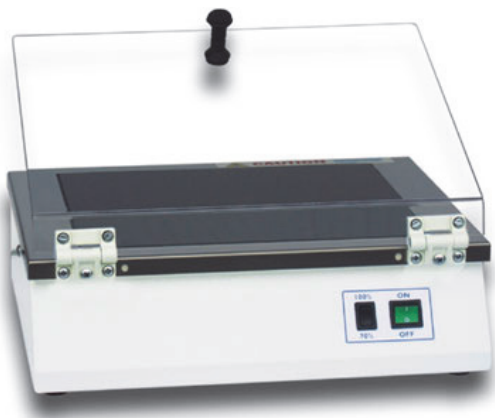


Рис.5.6. Трансиллюминатор ECX-F15.C (*Vilber Lourmat*).

Результаты визуализации ампликонов следует зафиксировать с помощью фотоаппарата или специализированных систем геледокументирования. Если на данном этапе обнаружены проблемы с ПЦР-продуктом: отсутствие или слабый ПЦР-продукт, множественные или смазанные ПЦР-продукты (многочисленные полосы, шмеры на дорожке геля), необходимо оптимизировать параметры ПЦР (см. п/главу 5.2.4).

5.4. Электрофоретическая детекция ДНК в полиакриламидном геле

Как отмечалось выше, электрофорез в ПААГ имеет большую разрешающую способность (с точностью до 1 нуклеотида) по сравнению с агарозным гелем (10-20 п.н.) и позволяет не только разделять смеси, содержащие большое число разных видов молекул, но и характеризовать их по заряду, молекулярной массе и конформации. Основной характеристикой ПААГ является размер пор, которые образуются при его полимеризации. Этот показатель определяет способность макромолекул продвигаться внутри геля в процессе проведения электрофореза. В ходе застывания геля происходит винильная полимеризация, приводящая к формированию полимера с хаотически свернутой структурой, который содержит разветвленную сеть пор, что позволяет просеивать макромолекулы с различными размерами. Для получения ПААГ используют акриламид и N,N'-метиленабисакриламид (или бисакриламид), последний из которых отвечает за образование поперечных

сшивок в геле. Соотношение между сшивающим агентом и акриламидом является очень важным показателем, так как оно существенно влияет на свойства геля. Увеличение бис-акриламида приводит к образованию гелей с повышенной жесткостью и хрупкостью, а снижение – к возрастанию мягкости и эластичности. Для полимеризации также необходимы добавки следующих веществ: персульфата натрия или аммония – инициатора полимеризации и *TEMED* (N,N,N',N' - тетраметилэтилендиамин) – катализатора процесса. Акриламид и бис-акриламид представляют собой хорошо растворимые в водной среде порошки белого цвета. Акриламид – высокотоксичное вещество, при работе с ним необходимо использовать перчатки и маску (ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ, 2012). Прочность и механические характеристики ПААГ зависят от процентного отношения суммарной массы акриламида и бис-акриламида к объему геля. Оно варьирует от 3 до 30%. Вес бис-акриламида составляет примерно 1-3% суммарной массы мономеров (Остерман, 1985). В качестве стокового раствора наиболее часто готовят 40%-ый раствор акриламид/бис-акриламид (полиакриламида), протокол приготовления которого описан ниже:

1. *растворить 38 г акриламида в 50 мл dH₂O,*
2. *после его полного растворения добавить 2 г бис-акриламида, растворить на магнитной мешалке с подогревом,*
3. *довести объем раствора dH₂O до 100 мл.* 4. *профильтровать раствор через бумажный фильтр «синяя лента» и хранить в холодильнике при +4°C.*

Для приготовления геля стоковый раствор разводят до нужной концентрации и добавляют катализаторы полимеризации (описание приведено ниже). Готовый ПААГ может содержать разные конечные концентрации полиакриламида (табл. 5.4) в зависимости от размера анализируемых фрагментов (Маниатис и др., 1984).

Табл.5.4. Электрофоретическое разделение ДНК-фрагментов разного размера в зависимости от концентрации полиакриламида

Полиакриламид, %	Диапазон размеров ДНК (п.н.)
3.5	100 – 1 000
5.0	80 - 500
8.0	60 - 400
12.0	40 - 200
20.0	10 - 100

Приготовленный раствор полиакриламида заливают между двумя стеклянными пластинами, разделенными прокладками. Обычно стекла и

прокладки идут в комплекте с камерой для вертикального электрофореза, длина стекол может составлять от 10 до 100 см в зависимости от необходимого характера разделения. При этом основная часть раствора акриламида не контактирует с воздухом, так как полимеризация происходит без доступа кислорода (Маниатис и др. 1984). Электрофорез проводится в вертикальной камере, заполненной буферным раствором (рис. 5.7). Чаще всего используют 1х ТВЕ-буфер (Прил 2., протокол 8).



Рис. 5.7. Камера для проведения вертикального электрофореза (*Helicon*) в ПААГ и источник питания (ДНК-Технология).

Молекулы нуклеиновых кислот в нативном и денатурированном (однонитевом) состоянии отличаются по электрофоретической подвижности. Коротким полинуклеотидным цепям свойственны нативные молекулы с более жесткой структурой, чем таких же размеров денатурированные молекулы, которые труднее проходят через пространственную сетку геля. Поэтому относительно короткие двунитевые фрагменты при электрофорезе в ПААГ будут отставать от денатурированных фрагментов ДНК той же длины. Для более крупных молекул ситуация может быть обратной. Длинная двунитевая цепочка может оказаться достаточно гибкой и с легкостью проходить через поры геля, в то время как однонитевая цепь той же длины сворачивается в рыхлый «хаотический клубок» большого размера, что затрудняет его прохождение в геле. В этом случае при электрофорезе в ПААГ денатурированная ДНК отстает от нативной. Определение молекулярных

масс анализируемых фрагментов ДНК и воспроизводимое разделение возможно только в условиях полной денатурации, разрывающей все водородные связи между нитями (Остерман, 1985). В связи с этим, различают неденатурирующий электрофорез, при котором разделяемые биологические макромолекулы в процессе электрофореза остаются в нативном состоянии (ПЦР-продукт вносится с утяжеляющей краской, например, БФС+ксиленцианол+сахароза); и денатурирующий – перед которым ПЦР-продукт подвергается денатурации с помощью формамида либо глиоксаля. Устойчивость нативной спиральной структуры к воздействию различных денатурирующих агентов у ДНК из самых разнообразных источников коррелирует с содержанием в них ГЦ-пар. Установлено, что с повышением содержания ГЦ-пар термостабильность ДНК возрастает линейно. Денатурацию ДНК вызывают такие факторы как нагревание, изменение pH, действие органических растворителей.

К анализируемому ПЦР-продукту обычно добавляют низкомолекулярный кислый краситель (например, БФС) чтобы визуализировать ход электрофореза в камере. Для приготовления 6% денатурирующего ПААГ необходимо:

1. *предварительно растворить 25 г мочевины (растворяется только при нагревании, при замерзании кристаллизуется) в небольшом объеме dH_2O ,*

2. *последовательно смешать 7.5 мл стокового 40% раствора акриламид/бис-акриламид (пропись приготовления выше), 5 мл 10х TBE-буфера, 30 мл dH_2O , 80 мкл TEMED, 400 мкл 10% персульфата натрия,*

3. *довести объем смеси до 50 мл dH_2O ,*

4. *готовую смесь необходимо быстро залить между стеклами до того, как произойдет полимеризация.*

Иногда необходимо дополнительно денатурировать ПЦР-продукт:

1. *смешать 2 мкл буфера (протокол 9, Прил. 3), и 1.5 мкл ПЦР-продукта. Это можно сделать в специальных планшетах, на лабораторной ленте Parafilm или в пластиковых пробирках на 0.2 мл,*

2. *денатурировать фрагменты ДНК, инкубируя пробы в термостате при 95°C в течение 3 мин. (опционально),*

3. *внести пробы в карманы денатурирующего геля.*

В процессе денатурирующего ПААГ-электрофореза молекулы сохраняются в денатурированном состоянии за счет наличия в геле хаотропных агентов, обычно мочевины. Денатурация ДНК сопровождается изменением конфигурации молекул, что выражается в резком изменении вязкости, оптического вращения, плавучей плотности, светорассеивания и коэффициента экстинкции. Согласно Маниатису с соавторами (1984) рекомендуется использовать 5% ПААГ для разделения фрагментов длиной более 200 п.н. и 6-8% ПААГ - для фрагментов длиной менее 200 п.н. Например, для разделения фрагментов ITS зеленых

водорослей оптимально использовать 6% неденатурирующий ПААГ, протокол приготовления которого приведен ниже:

1. последовательно смешать 7.5 мл стокового 40% раствора акриламид/бис-акриламид (пропись приготовления выше), 5 мл 10х TBE-буфера, 30 мл dH₂O, 80 мкл TEMED, 400 мкл 10% персульфата натрия,

2. довести объем смеси до 50 мл dH₂O,

3. готовую смесь необходимо быстро залить между стеклами до того, как произойдет полимеризация.

Для проведения полиакриламидного электрофореза в неденатурирующих условиях необходимо сразу вносить ДНК-пробы в карманы геля.

Перед заливкой ПААГ необходимо хорошо помыть стекла, прилагаемые к электрофорезной камере, теплой водопроводной водой, а затем ополоснуть dH₂O, высушить и протереть их спиртом (лучше всего это делать бумажными платочками без ворсинок). Одно стекло обычно прямоугольное, а другое – «ушастое». Так как гель очень непрочный и тонкий, во время электрофореза и последующей окраски он должен быть прикреплен к одному из стекол, а другое («ушастое») – должно с легкостью отделяться. Для достижения такого эффекта «ушастое» стекло обрабатывают гидрофобным раствором («антилипой»), а второе стекло – гидрофильным раствором («липой»). Затем протирают стекла спиртом, чтобы удалить остатки несвязавшегося раствора.

Для приготовления гидрофильного раствора нужно смешать 1 мл изопропанола с 1 мкл 3-(триметоксилил)-пропилметакрилата. Для приготовления гидрофобного раствора смешать 10 мл гексана и 100 мкл диметилдихлорсилана. Хранить приготовленные растворы в стеклянной таре под тягой, гидрофобный раствор быстро испаряется, поэтому можно дополнительно хорошо залить крышку воском.

Затем стекла совмещают и заливают гель (это нужно делать на ровной поверхности, можно чуть приподнимать верхнюю часть стекол). Во время заливки геля рекомендуется постукивать по стеклу, чтобы избежать образования пузырей воздуха. После заливки геля необходимо закрепить стекла специальными зажимами, которые поставляются в комплекте с камерой. Вставить гребенку и плотно закрепить ее зажимами, иначе образующиеся карманы «зарастают» акриламидом. После того, как гель застынет (40-60 мин.), аккуратно извлечь гребенку и удалить остатки геля путем промывания совмещенных стекол водой. Далее поместить стекла в электрофорезную камеру и добавить необходимое количество 1х TBE-буфера. Карманы геля нужно промыть буфером верхней камеры при помощи шприца и, если есть необходимость, очистить от кусочков геля с помощью уплощенного наконечника для нанесения образцов в гель. Когда камера собрана и готова, для стабилизации системы нужно в течение 20-30 мин. провести префорез. В крайние карманы геля при этом

добавляют по 1 мкл краски, чтобы визуально наблюдать ход префореза. Проводить форез необходимо первые 20 мин. при напряжении 100В, пока образцы входят в гель, а затем при 300В до достижения краской нижней части стекла (обычно этот этап занимает от 2.5 до 4 ч). Затем аккуратно слить буфер из камеры (его можно использовать неоднократно), снять зажимы и отсоединить стекла. Стекло с прикрепленным гелем используют для дальнейшей окраски (процедура не отличается для денатурирующего и неденатурирующего геля). Фрагменты ДНК разной длины визуализируют при помощи флуоресцентных красителей, специфично взаимодействующих с ДНК, например, бромистого этидия. Гели выдерживают в слабом растворе (1 мкг/мл) бромистого этидия в течение 15-30 мин. в темноте, либо используют окраску гелей нитратом серебра по стандартной методике, приведенной ниже:

1. *предварительно приготовить растворы: 0.1% ЦТАБ, 1% аммиак, раствор нитрата серебра и раствор проявителя (Прил. 3, протокол 10),*

2. *на гель, помещенный в емкость для окрашивания, вылить 500 мл раствора 0.1% ЦТАБ и оставить на 20 мин.,*

3. *слить раствор, ополоснуть гель dH_2O ,*

4. *промыть гель 1% раствором NH_3 при медленном встряхивании (вручную или на шейкере) в течение 5 мин. Повторить 2 раза.*

5. *аммиак слить, гель промыть dH_2O ,*

6. *добавить в емкость с гелем раствор нитрата серебра, встряхивать при дополнительном освещении в течение 15 мин.,*

7. *слить раствор нитрата серебра и промыть гель dH_2O ,*

8. *добавить проявитель и инкубировать гель на свету при встряхивании в течение примерно 2 мин. – до появления коричнево-окрашенных полос,*

9. *слить раствор проявителя и ополоснуть гель dH_2O .*

Определение размеров ампликонов производят путем их сравнения с коммерческими наборами фрагментов ДНК с известными длинами – маркерами молекулярного веса, которые обычно наносят в крайние карманы геля.

При сравнении двух описанных видов гель-электрофореза следует отметить следующие преимущества агарозного геля по сравнению с полиакриламидным: прочность, крупнопористость (позволяющая разделять особенно крупные молекулы нуклеиновых кислот), простота приготовления, относительно небольшая продолжительность электрофореза, дешевизна реактивов. Тем не менее, электрофорез в ПААГ целесообразно использовать для высокого разрешения коротких нуклеотидных последовательностей гетерозиготных организмов (в случаях, когда в трейс-файле присутствуют перекрывающиеся пики и невозможно установить какой нуклеотид должен быть в этом месте), при

амплификации фрагментов ITS, для которых характерны вставки и делеции. Кроме того, электрофорез в ПААГ применяется для проверки состояния праймеров

5.5. Выделение ПЦР-продукта из геля и подготовка к секвенированию

При проведении прямого секвенирования ПЦР-продуктов может возникнуть ряд проблем. Одна из них заключается в неиспользованном в ходе ПЦР большом количестве дНТФ и праймеров, что делает невозможным прямое секвенирование ампликонов без соответствующих процедур удаления нецелевых компонентов. Эту проблему можно решить, снизив количество дНТФ и праймеров в реакционной смеси и(или) повысив число циклов ПЦР. При необходимости очистку ПЦР-продукта можно осуществить с помощью различных методов, в основе которых лежит разница в размерах дНТФ (менее 600 Да), праймерах (в среднем – около 8000 Да и обычно не превышающих 12000 Да) и целевых ПЦР-продуктов, характеризующихся значительно большей молекулярной массой (Gyllenstein, 1989). Например, осаждение целевого ПЦР-продукта с помощью ацетата аммония:

- 1. добавить к 10 мкл ПЦР-продукта 50 мкл смеси ацетата аммония с этанолом (Прил. 3, протокол 11),*
- 2. перемешать и инкубировать при комнатной температуре 20 мин.,*
- 3. центрифугировать при 11-13 тыс. об./мин. 20 мин.,*
- 4. аккуратно удалить супернатант с помощью водоструйного насоса или дозатора,*
- 5. добавить 250 мкл 70% этанола и сразу же удалить его водоструйным насосом или дозатором,*
- 6. высушить пробы при 37°C в термостате,*
- 7. растворить в 10-20 мкл milliQ-воды.*

Однако самый простой и распространенный способ избавления от дНТФ и праймеров – вырезание фрагмента геля с последующим извлечением из него ПЦР-продукта. При экстракции ДНК из агарозного геля следует учесть, что:

1. большинство марок агарозы загрязнено сульфатированными полисахаридами, экстрагируемыми из геля вместе с ДНК. Они ингибируют многие ферменты (лигазы, полимеразы и т.п.), участвующие в последующих этапах молекулярного анализа – секвенирование, клонирование и др. Поэтому рекомендуется использовать агарозу высокой степени очистки.

2. эффективность экстракции ПЦР-продукта из агарозных гелей зависит от молекулярной массы ДНК-фрагмента. Фрагменты длиной менее 1 тыс. п.н. могут быть извлечены практически без потерь (до 90%).

С увеличением молекулярной массы ДНК выход постепенно снижается, так что при извлечении фрагментов крупнее 20 тыс. п.н. он редко превышает 20%.

Для очистки ДНК из геля и(или) реакционных смесей коммерческие компании предлагают широкий выбор наборов для колоночного выделения, которые позволяют получить ПЦР-продукт высокой чистоты и выхода, но достаточно дороги. В самом простом случае можно выделить целевой ПЦР-продукт из геля следующим образом:

1. после окончания электрофореза убедиться, что в геле присутствует целевой ПЦР-продукт искомого размера,
2. вырезать полосу геля, содержащую необходимый фрагмент при помощи стерильного скальпеля либо специальными насадками для автоматических дозаторов (рис.5.8),
3. подготовить микропробирки на 1.5 мл, вставив в них обрезанный по второму делению наконечник на 200 мкл с фильтром,
4. поместить агарозную полоску («таблетку») на фильтр и заморозить на ночь при -20°C или при -70°C в течение 2 ч.,
5. добавить в пробирки по 10 мкл *milliQ*-воды и механически разрушить агарозную «таблетку» чистым наконечником,
6. инкубировать в термостате при 37°C в течение 30 мин.,
7. центрифугировать на максимальных оборотах в течение 15 мин.,
8. отобрать жидкость.



Рис.5.8. Наконечники для вырезания геля, 1.1x4 мм (*Axygen*).

Из ПААГ ДНК-продукт извлекается аналогичным образом с той лишь разницей, что рекомендуется добавить больше *milliQ*-воды (до 15 мкл). Если фрагмент имеет достаточно большую молекулярную массу (от 700 п.н.), то можно провести несколько циклов замораживания-оттаивания.

Следующий этап после очистки ПЦР-продукта – измерение концентрации ДНК-пробы, экстрагированной из геля или осажденной с помощью ацетата аммония, и подготовка к секвенированию. В коммерческих фирмах, осуществляющих услуги по секвенированию ДНК, требования к количеству матрицы и пробоподготовке ПЦР-продукта различаются, поэтому следуйте их рекомендациям.

5.6 Правила организации и работы в ПЦР-лаборатории

Проведение исследований методом ПЦР допускается при условии организации в лаборатории самостоятельных или выделенных в составе других функциональных помещений рабочих зон, соответствующих этапам ПЦР-анализа. ПЦР-лаборатория должна включать следующий минимальный набор рабочих зон:

- зона выделения ДНК,
- зона приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР (в ней располагается ПЦР-бокс),
- зона детекции продуктов амплификации методом электрофореза.

Главная проблема при функционировании лаборатории ПЦР – контаминация. Контаминация возникает тогда, когда продукты ПЦР попадают в окружающую среду. Это может происходить по нескольким причинам: вследствие неправильной организации ПЦР-лаборатории, из-за ошибок при постановке реакции или детекции ее результатов, по причине большого потока анализов. Контаминацию можно отследить при постановке отрицательного контроля (ложноположительные результаты ПЦР), возникновении неспецифических ПЦР-продуктов или после получения результатов секвенирования. Перекрестная контаминация от одной пробы к другой может возникать при обработке образцов или в процессе приготовления реакционной смеси. Следствие перекрестной контаминации – спорадические ложноположительные результаты. При несоблюдении мер безопасности с течением времени в лаборатории могут накапливаться ампликоны, что приводит к появлению тотальной контаминации.

Для предотвращения контаминации в ПЦР-лаборатории требуется следовать следующим правилам:

1. организовать для работы зоны, соответствующие этапам молекулярного анализа. Приготовление реакционной смеси осуществлять строго в ПЦР-боксе. Желательно исключить воздухообмен между помещением детекции продуктов амплификации и другими помещениями.
2. использовать отдельные лабораторные халаты в каждой рабочей зоне, одноразовые перчатки без талька, автоматические дозаторы.
3. работать исключительно с наконечниками для дозаторов с фильтрами, защищающими от аэрозоля; с одноразовым пластиком, сертифицированным на отсутствие РНКаз, ДНКаз и апирогенность.
4. соблюдать поточность продвижения анализируемых образцов, т.е. избегать перемещения оборудования или реактивов из одного помещения в другое (особенно из зоны детекции в другие зоны).
5. проводить химическую и УФ дезинфекцию всех поверхностей рабочих зон. Согласно Методическим рекомендациям по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод

полимеразной цепной реакции, подготовленным Государственным Комитетом санитарно-эпидемиологического контроля, рабочие поверхности необходимо обрабатывать коммерческими средствами деkontаминации от ДНК/РНК или раствором муравьиной кислоты, либо 10% хлорной известью, а затем 70% этанолом. Реагенты для приготовления реакционной смеси следует хранить в виде небольших порций (аликвот).

6. включать контрольные реакции при постановке ПЦР: отрицательный контрольный образец, в котором есть все компоненты реакции кроме ДНК-матрицы, и положительный контрольный образец, в котором реакция должна пройти обязательно. Отсутствие результата в положительном контрольном образце будет свидетельствовать об ошибках в приготовлении реакции или непригодности реактивов. Наличие продуктов амплификации в отрицательном контрольном образце (ложноположительный результат) свидетельствует о загрязнении оборудования или реактивов продуктами ПЦР предыдущих исследований.

Кроме того, все химические реактивы, используемые в ПЦР-анализе, должны быть маркированы с указанием названия реактива и даты приготовления. В Прил. 3 (табл. 3) приведен перечень всех описанных в главе реактивов и указан их режим хранения.

Литература

1. Антонова О.С., Корнева Н.А., Белов Ю.В., Курочкин В.Е. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (обзор) // Научное приборостроение. 2010. Т. 20. № 1. С. 3–9.

2. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство. Саратов. Изд-во «Саратовский источник», 2013. 84 с.

3. Кузнецов Вл.В., Кузнецов В.В., Романов Г.А. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М.: Бином. 2012. 487 с.

4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.

5. Основы полимеразной цепной реакции. Методическое пособие [Электронный ресурс] // ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ [Офиц. сайт]. М. 2012. 80 с. URL: <http://www.dna-technology.ru/files/images/metodichki/OsnoviPCR.pdf> (дата обращения 15.10.2014).

6. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот (электрофорез и ультрацентрифугирование). М.: Наука, 1983. 304 с.

7. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семенов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. ПЦР «в реальном времени» / под ред. Д.В. Ребрикова. М.:БИНОМ, 2009. 224 с.

8. Chou Q., Russell M., Birch D.E. et al. Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications // *Nucleic Acid Res.* 1992. V. 20. № 7. P.1717–1723.

9. Frackman S., Kobs G., Simpson D., Storts D. Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR // *Promega Notes*. 1998. № 65. P. 27.

10. Hall J.D., Fucikova K., Chien L.O. et al. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae // *Cryptogamie Algologie*. 2010. V. 31. № 4. P. 529–555.

11. Horton R.M., Hoppe B.L., Conti-Tronconi B.M. AmpliGrease: “hot start” PCR using petroleum jelly // *Biotechniques*. 1994. V. 16. Iss. 1. P. 42–43.

12. Innis M.A., Gelfand D.H., Shinsky D.H., White T.J. Optimization of PCRs / *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. London: CRC Press, 1994. P. 5–11.

13. Korbie D.J., Mattick J.S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification // *Nat. Protoc.* 2008. V. 3. Iss. 9. P. 1452–1456.

14. Lorenz T.C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies // *J. Vis. Exp.* 2012. 22(63). P. e3998.

15. McPherson M.J., Møller S.G. PCR.. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000. 288 p.

16. Ochman H., Gerber A.S., Hartl D.L. Genetic applications of an inverse Polymerase Chain Reaction // *Genetics*. 1998. V. 120. № 3. P. 621–623.

17. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // *Science*. 1988. V. 239. № 4839. P. 487–491.

18. Shiao Y-H. A new reverse transcription-polymerase chain reaction method for accurate quantification // *BMC Biotechnology*. 2003. V. 3. P. 22.

РАЗДЕЛ III. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ

Глава 6. Идентификация видов с помощью анализа генетических расстояний: дистанционный подход (Ю.С. Букин)

Филогенетический анализ данных играет одну из ключевых ролей в процессе идентификации видов с использованием расшифрованных последовательностей ДНК. По своей сути молекулярная филогенетика представляет собой совокупность математических и статистических методов, позволяющих установить степень родства и филогенетические связи между исследуемыми организмами. Сравнивая с помощью методов молекулярной филогенетики собственные расшифрованные последовательности ДНК с последовательностями из генетических баз данных, можно установить принадлежность исследуемого объекта к определенному виду, роду, семейству, порядку и т.д. Разрешающая способность филогенетического метода (таксономическая идентификация до более низкого ранга) зависит от представленности в базах данных информации по расшифрованным последовательностям ДНК того же маркера для близких родственников организма. Этапы молекулярно-филогенетического анализа описаны в главе 4.1. В данной главе подробно описаны методы филогенетического анализа. В качестве примера филогенетических реконструкций и обработки последовательностей на всех этапах будут использованы последовательности 18S рДНК и пластидного гена рубиско (*rbcL*) 12-ти видов зеленых водорослей (табл. 6.1). Данный набор таксонов зеленых водорослей, обозначим его как *Chloro-dataset*, был выбран таким образом, чтобы в нем присутствовало несколько представителей одного вида, рода, семейства, порядка, класса и внешняя группа (*outgroup*) из другого класса зеленых водорослей. Такой спектр систематических категорий различного ранга позволит проанализировать разнообразие генетических дистанций на всех таксономических уровнях зеленых водорослей. Сравнение маркеров 18S рДНК и *rbcL* позволит выявить разницу в характере эволюции в белок-некодирующих и белок-кодирующих маркерах, соответственно.

Табл. 6.1. Список штаммов зеленых водорослей, использованных в филогенетическом анализе (*Chloro-dataset*).

Вид (синонимы)	Номер штамма	Номер последовательности в GenBank (ID)		Местообитание
		18S рДНК	<i>rbcL</i>	
Класс Chlorophyceae				
<i>Chlamydomodium starrii</i> (<i>Characium starrii</i> , <i>Characium saccatum</i>)	UTEX LB 111*	M84319	-	Почва, Южная Африка

<i>Chlamydomonium vacuolatum</i> (Characium vacuolatum)	UTEX 2111	M63001	EF113426	Почва, Куба
<i>Chlorochytrium lemnae</i>	CAUP H6902 = SAG 16.85	HE860249	HE860265	Эндофит на <i>Lemna minor</i> , р.Червелл, Англия
<i>Chlorochytrium lemnae</i>	CAUP H6903 = UTEX LB 2283*	HE860250	-	
<i>Chlorosarcinopsis arenicola</i>	UTEX 1697*	AB218701	AB451192	Песчаная почва, США
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i>	BCP-JT1VF80	HQ246316	HQ246349	Пустынные почвы, США
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i>	BCP-JT1VF8	HQ246315	HQ246348	Пустынные почвы, США
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i>	BCP-JO1VF2	HQ246314	HQ246347	Пустынные почвы, США
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i>	BCP-FI5LVF16	HQ246313	HQ246346	Пустынные почвы, США
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i>	BCP-JT1VF20	HQ246312	HQ246345	Пустынные почвы, США
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i>	UTEX B 1186*	AB218706	HQ246342	Почва, США
<i>Chlorosphaeropsis alveolata</i>	UTEX 1235	AB218708	-	Почва кукурузного поля, Ямайка
<i>Nautococcus minutus</i> (Ettlia minuta, Chlorococcopsis minuta)	UTEX 776*	M62996	-	Пахотная почва под сахарным тростником, Куба
<i>Nautococcus solutus</i>	SAG 76.80* = CCAP 53/2 = UTEX 1793	AB360749	AB360758	Почва возле свинофермы, США
<i>Pleurastrum insigne</i>	SAG 30.93	Z28972	EF113464	Насыпь возле ручья, Германия
<i>Protosiphon botryoides</i>	UTEX 46 = CCAP 731/3 = SAG 731-3	JN880457	JN880465	Почва, Индия
<i>Protosiphon botryoides</i>	UTEX B 461 = CCAP 731/1A = SAG 731-1a	-	JN880464	Почва, Чехия
<i>Protosiphon botryoides</i>	FRT2000 = UTEX B 2969	JN880459	JN880462	Почва кукурузного поля, США
<i>Protosiphon botryoides</i>	UTEX B 99	JN880460	JN880463	Почва, США
<i>Protosiphon botryoides</i>	UTEX 47 = SAG 731-1a = CCAP 731/1A = ATCC 30414	-	JN880466	Лечебная грязь, Чехия

<i>Spongiochloris spongiosa</i>	UTEX 1 = SAG 280-2b* = CCAP 3/1	U63107	-	Почва, Швейцария
Класс Trebouxiophyceae (outgroup)				
<i>Trebouxia aggregata</i>	SAG 219-1d* = CCAP 219/1D = UTEX 180	EU1239 42	EU123967	Фикобионт лишайника <i>Xanthoria parietina</i>

Примечание. UTEX, CAUP, SAG – акронимы альгологических коллекций (прил. 5), звездочкой (*) отмечены голотипы.

Согласно современной систематике все последовательности, представленные в таблице, за исключением внешней группы (*Trebouxia aggregata*) принадлежат как минимум трем семействам зеленых водорослей. Первое семейство объединяет виды *Chlorosarcinopsis eremi* и *Chlorosarcinopsis arenicola*. Второе семейство включает в себя виды *Chlamydomodium vacuolatum*, *Chlamydomodium starii*, *Pleurastrum insigne*, *Nautococcus solutus*, *Nautococcus minuta*. Третье семейство состоит из *Protosiphon botryoides*, *Chlorosphaeropsis alveolata*, *Spongiochloris spongiosa*, *Chlorochytrium lemnae*. В дальнейшем описании анализа обращение к семействам будет происходить не по названиям, а по предложенным здесь номерам, для удобства восприятия информации на филогенетических деревьях.

6.1 Выравнивание нуклеотидных последовательностей

В процессе эволюции нуклеотидные последовательности претерпевают множественные мутационные события: замены, вставки, делеции, инверсии, дупликации отдельных нуклеотидов или целых фрагментов. Первым этапом филогенетического анализа является идентификация таких мутаций, которая осуществляется с помощью процедуры выравнивания – поиска гомологичных (имеющих общее эволюционное происхождение) позиций анализируемых последовательностей. В самом простом случае выравниваются две последовательности (парное выравнивание), в более сложных случаях используется целый набор последовательностей или *dataset* (множественное выравнивание). Как правило, множественное выравнивание осуществляется на основе результатов парного. Базовым принципом выравнивания последовательностей является установление наиболее вероятного сценария эволюции, который требовал бы минимального числа эволюционных событий: минимального числа замен при минимальном числе пробелов. Пробелы или «гэпы» (*gap*, обозначается «-») – это участки, где может происходить вставка или выпадение нуклеотида в одной из последовательностей. Алгоритмы, применяемые для выравнивания последовательностей, достаточно

сложны и используют принципы динамического программирования. В рамках данной главы мы не будем касаться подробного описания этих алгоритмов, а остановимся на их практическом использовании. Процедуру выравнивания можно разделить на несколько этапов. На первом этапе происходит визуализация последовательностей с помощью одной из программ; на втором – предварительное выравнивание последовательностей с последующим визуальным контролем и исправление ошибок. На заключительном этапе последовательности после редактирования окончательно выравнивают с учетом их структурных или функциональных особенностей. Рассмотрим по порядку все этапы.

Для визуализации нуклеотидных последовательностей существует достаточно большой набор компьютерных программ, например **MEGA** (Tamura et al., 2013), **BioEdit** (Hall, 1999; Tom, 2001), **SeaView** (Gouy et al., 2010) и др. Все они имеют как недостатки, так и достоинства, но в целом выбор конкретной программы определяется индивидуальными предпочтениями исследователя. Мы рассмотрим визуализацию и редактирование последовательностей ДНК в программе **BioEdit**, которая позволяет проводить большое количество манипуляций с последовательностями (редактирование имен последовательностей, изменение, добавление и удаление отдельных нуклеотидов или групп и др.). **BioEdit** воспринимает последовательности ДНК в нескольких распространенных форматах: *.gb*, *.txt*, *.fas*, *.phy*, *.xml* и др. Формат *.fas* (*FASTA*) обычно используется для экспорта данных из **GenBank** (см. главу 4.3). Преимуществом формата *FASTA* для хранения последовательностей является неограниченное количество символов в названии последовательности. Формат *.phy* (*Phylip 3.2* или *4*) используется некоторыми филогенетическими программами. В этом формате длина имени последовательности ограничена 10 символами, что создает большое неудобство при переходе от формата *FASTA* к формату *Phylip 4*, т.к. при переходе из одного формата в другой из-за потери части имени последовательности в наборе данных могут появиться последовательности с одинаковыми именами, что недопустимо в филогенетическом анализе. В связи с этим рекомендуем иметь 2 файла в формате *FASTA*: один с полной информацией из **GenBank**: порядковый номер (*GI*), идентификатор (*ID*), название организма и локуса, последовательность; второй, содержащий только уникальный идентификатор последовательности (*ID*) и саму нуклеотидную последовательность. Последний файл будет рабочим в филогенетическом анализе. Как показывает опыт работы с молекулярно-филогенетическими данными, совпадение имен последовательностей в наборе является одной из самых распространенных ошибок начинающих пользователей.

Вначале рассмотрим процедуру предварительного выравнивания белок-некодирующих последовательностей ДНК на примере 18S рДНК. На рис. 6.1 представлено интерфейсное окно программы **BioEdit**, в котором изображены 20 нуклеотидных последовательностей 18S рДНК зеленых водорослей из описанного набора данных (табл. 6.1).



Рис. 6.1. Общий вид окна программы **BioEdit**.

Окно редактора последовательностей позволяет выбрать режим их редактирования (*Mode*): Выделить/Переместить (*Select/Slide*), Редактировать (*Edit*), Схватить/Сместить (*Grab&Drag*). После того как последовательности просмотрены и проверены их имена, можно приступить к предварительному выравниванию. Для этого в главном меню необходимо открыть ниспадающее меню на вкладке «*Accessory Application*», далее выбрать алгоритм «*ClustalW Multiple alignment*», в результате чего запустится встроенное в программу **BioEdit** приложение для множественного выравнивания последовательностей **ClustalW** (Larkin et al., 2007). Далее откроется форма, где можно будет выбрать параметры для выравнивания последовательностей в **ClustalW**. Наиболее существенными являются параметры «*Gap open*» (штраф за открытие гэпа – делеции) и «*Gap extend*» (штраф за продолжение гэпа – делеции) для множественного и парного выравнивания. Уменьшение параметра «*Gap open*» способствует внесению разрывов в выравнивание, что ухудшает его качество. А увеличение приводит к тому, что выравнивание будет представлять собой длинные участки последовательностей почти

без вставок или делеций. Параметр «Gap extend» контролирует возможность внесения длинных вставок или делеций. Увеличение этого параметра уменьшает длину вставок и делеций. По умолчанию эти ячейки не заполнены. После выбора данных параметров необходимо нажать кнопку «Run ClustalW» и получить результат выравнивания в новом окне.

В результате предварительного выравнивания последовательностей могут быть получены два варианта выравнивания. Первый вариант (рис. 6.2) отражает качественное множественное выравнивание гомологичных последовательностей консервативного гена 18S рДНК, а второй (рис. 6.3) – свидетельствует о наличии в наборе данных последовательностей с очень низким уровнем сходства относительно большинства.

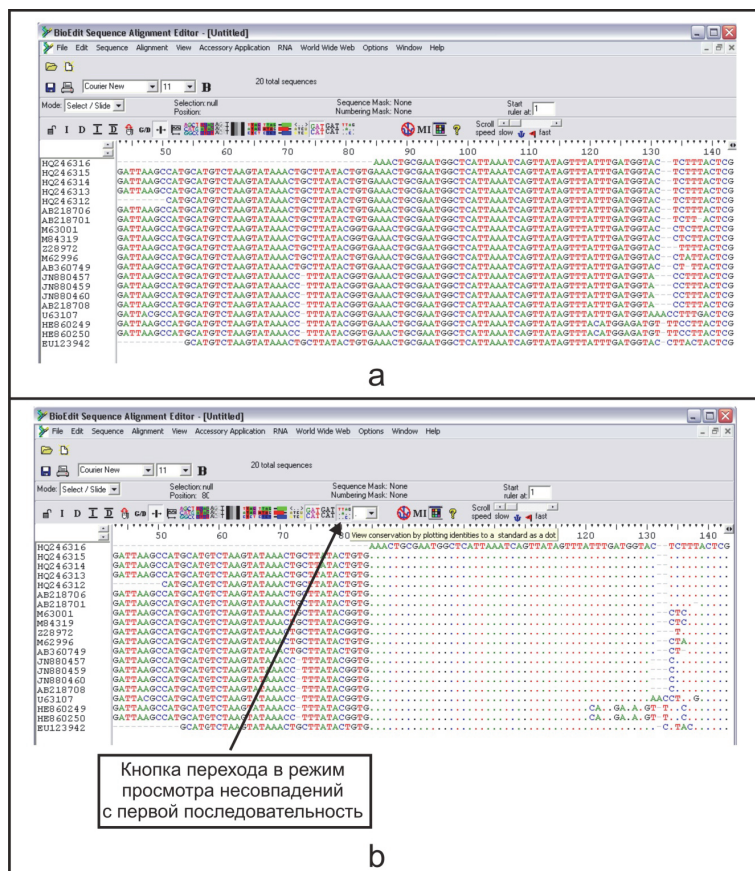


Рис. 6.2. Результат множественного выравнивания последовательностей 18S рДНК из *Chloro-dataset*.

Примечание. а – обычный режим просмотра, б – режим просмотра несовпадающих букв с первой последовательностью.

Вторую ситуацию можно легко определить визуально, если перейти в режим просмотра несовпадений с первой последовательностью набора

(иконка на панели задач «*View conservation by plotting identities to a standard as a dot*»). Причин наличия последовательностей с очень низким уровнем сходства после выравнивания может быть несколько. Во-первых, депонирование в генетические базы данных комплементарных и реверсных последовательностей (см. п/главу 4.3). В таком случае последовательность необходимо трансформировать в программе **BioEdit** с помощью команд: «*Sequence*» → «*Nucleic Acid*» → «*Reverse Complement*», «*Complement*» или их комбинаций. Если описанные действия не помогут улучшить качество выравнивания, то вероятно последовательность ошибочна (неверно указан locus, неверно произведена идентификация, ошибки при секвенировании и т.д.), включать ее в *dataset* не рекомендуется.

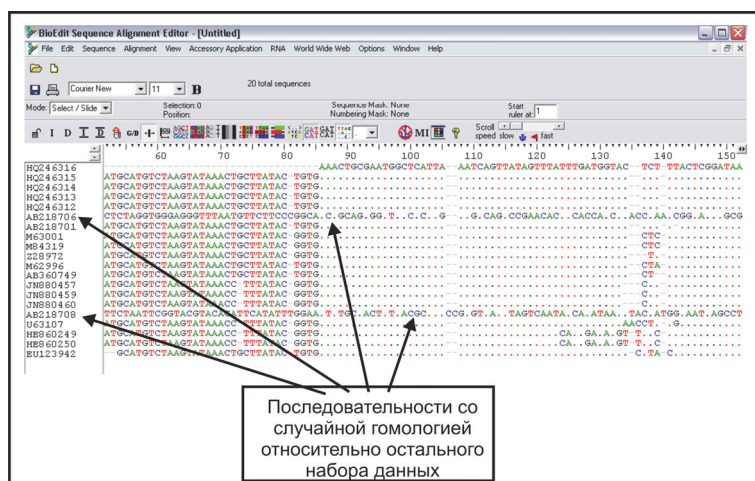


Рис. 6.3. Наличие после множественного выравнивания последовательностей с очень низким уровнем сходства.

При предварительном выравнивании белок-кодирующих последовательностей, например *rbcL*, необходимо убедиться, что первая позиция в каждой нуклеотидной последовательности соответствует первой позиции кодона (триплета). Для решения этой задачи можно использовать интернет-сервис **EMBOSS Transeq** (ссылка в Прил. 5), который позволяет транслировать нуклеотидные последовательности в аминокислотные с учетом выбора различных вариантов рамок считывания и генетического кода. На первом шаге работы с сервисом необходимо скопировать или загрузить последовательность ДНК в формате *FASTA* (рис. 6.4). Далее выбрать рамку считывания и нажать «*Submit*». Теперь белок-кодирующая нуклеотидная последовательность транслирована в аминокислотную, в которой стоп-кодоны отмечены звездочками (*). Необходимо убедиться, что внутри кодирующей части

отсутствуют стоп-кодоны. Триплет в начале или конце последовательности, соответствующий стоп-кодону, следует удалить. После этого в программе **BioEdit** производится множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей по алгоритму, описанному выше. Существует достаточно ограниченный класс расшифрованных последовательностей ДНК, содержащих как кодирующие, так и не кодирующие области. Например, белок-кодирующие последовательности ДНК с интронами. При выравнивании таких последовательностей набор данных делится на блоки (разные наборы данных). Например, в отдельный набор выделяется первая кодирующая область, во второй набор – первый интрон и т.д. После чего предварительное выравнивание осуществляется независимо для двух наборов.

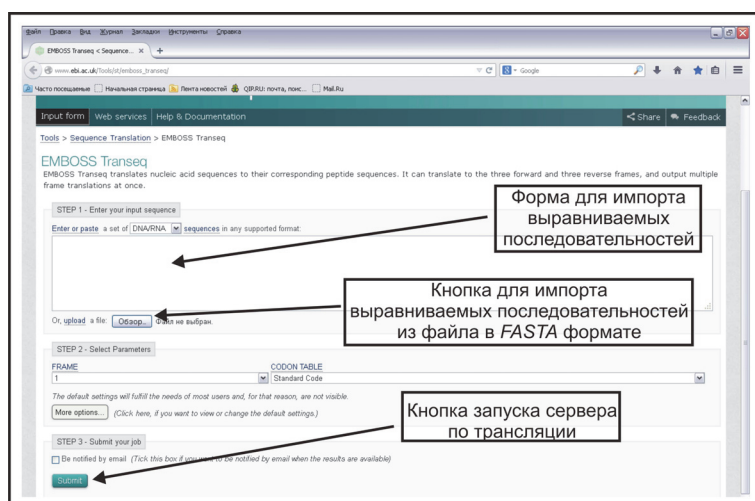


Рис 6.4. Интерфейсное окно приложения **EMBOSS Transeq** для трансляции нуклеотидных последовательностей в аминокислотные.

Таким образом, предварительное выравнивание позволяет установить, имеем ли мы дело с гомологичными последовательностями, на основе которых можно установить степень родства между видами. Отметим, что на данном шаге исследователю необходимо быть предельно внимательным, т.к. от качества множественного выравнивания зависит дальнейший результат филогенетического анализа.

Следующий этап связан с окончательным выравниванием последовательностей. Если последовательность не кодирует белок и при этом экспрессируется, как например интроны или 18S рДНК, то функция этих последовательностей определяется вторичной структурой синтезированных в процессе транскрипции РНК. Наличие вторичной

структуры РНК у кодирующей последовательности ДНК налагает определенные ограничения на процесс выравнивания. Подобным ограничением, например, является невозможность появления асинхронных вставок и делеций в участках, кодирующих ножки шпильчатых структур РНК, что необходимо учесть при выравнивании. Такая технология выравнивания получила название – выравнивание с учетом вторичной структуры РНК, которое осуществляется в различных онлайн-сервисах, например **T-Coffee** (Wilm et al., 2008; Di Tommaso et al., 2011; ссылка в Прил. 5). На главной странице сервиса необходимо выбрать инструмент **R-Coffee** – для работы со вторичной структурой РНК (рис. 6.5).

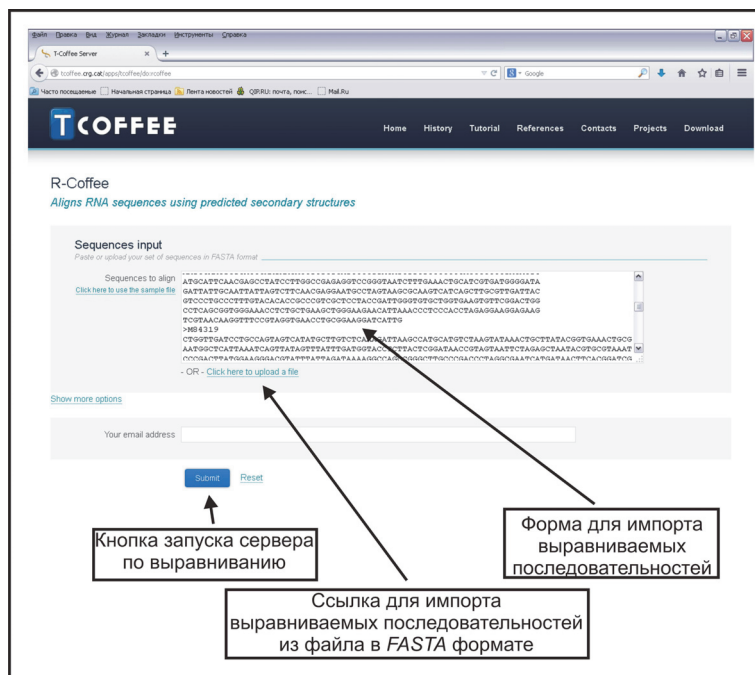


Рис. 6.5. Онлайн-сервис **R-Coffee** для выравнивания последовательностей РНК с учетом предсказанной вторичной структуры.

В поле «*Sequences to align*» необходимо скопировать последовательности в формате *FASTA*. В выпадающем списке «*Hide advanced options*» можно указать алгоритмы попарного или множественного выравнивания, а также опции вывода данных. После установления всех параметров нажать кнопку «*Submit*». Страница с результатом выравнивания приведена на рис. 6.6. Сохранить выровненные последовательности можно в нескольких предлагаемых форматах. Следует отметить, что сервис **T-Coffee** в выровненном наборе данных заменяет *T* на *U*. В готовом наборе данных необходимо

кодирующих последовательностей произойдет нарушение работы моделей нуклеотидных замен для расчета генетических дистанций, которые учитывают вариабельность накопления замен в различных участках последовательности. Окно онлайн-сервиса для выравнивания белок-кодирующих последовательностей с описанием полей приведено на рис. 6.7.

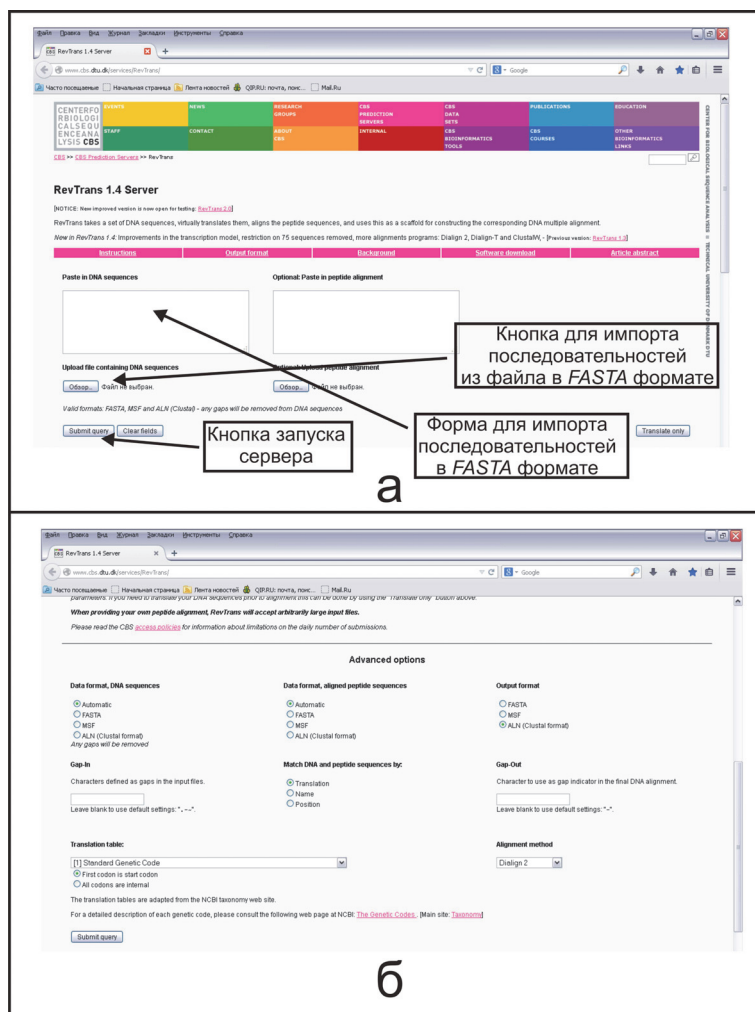


Рис. 6.7. Окно онлайн-сервиса **RevTrans 1.4 Server** для выравнивания белок-кодирующих последовательностей.

Примечание. *a* – часть окна с формой для ввода последовательностей, *б* – часть окна для задания параметров.

Этот сервис требует для ввода данные в формате *FASTA*, *MSF* или *ALN*. Так как используемый нами набор данных (*Chloro-dataset*) был предварительно протестирован сервисом по трансляции

последовательностей, то ошибок при выравнивании не должно возникнуть. В результате будет получен набор выровненных последовательностей в формате *FASTA*.

6.2 Модели расчета генетических дистанций

В процессе независимой эволюции двух последовательностей ДНК, произошедших от общего предка, в них будут накапливаться различия в результате мутационного процесса. Предположим, что мы сравниваем две последовательности длиной в N нуклеотидов (после выравнивания). Если мы обнаружим в этих последовательностях S несовпадающих нуклеотидов, то генетическую дистанцию p можно определить по формуле:

$$p = \frac{S}{N} \quad (1)$$

Дистанцию p называют долей замен или долей несовпадающих нуклеотидов в последовательностях. Ожидается, что дистанция p не может превышать величину 0.75. Это связано с тем, что последовательности состоят из нуклеотидов четырех типов. Если все положения заменились хотя бы один раз, то в среднем каждое четвертое положение будет совпадать, а каждые три положения будут отличаться, т.е. p достигнет максимального значения 0.75. В особых случаях, если нуклеотидный состав сравниваемых последовательностей неодинаков, отличия могут превысить порог 0.75. Другая проблема состоит в том, что каждое положение в последовательности может заменяться не один раз. Это приводит к тому, что генетическая дистанция p не изменяется пропорционально времени. Для проведения филогенетического анализа наоборот требуются такие меры генетического расстояния, которые бы увеличивались прямо пропорционально времени прошедшему с момента разделения предковой линии. Решить проблему расчета линеаризированной, относительно времени прошедшего с момента разделения предковой линии, меры генетического расстояния можно с помощью одной из моделей накопления замен.

В самой простой ситуации можно считать, что замена любого одного нуклеотида в ДНК последовательности на любой другой равновероятна. Тогда для расчета эволюционных дистанций можно применить модель Джукса-Кантора (Jukes, Cantor, 1969). Исходя из этой модели, генетическая дистанция рассчитывается по формуле:

$$K = -\frac{3}{4} \ln\left(1 - \frac{4p}{3}\right) \quad (2)$$

где p - это доля замен, рассчитываемая по формуле (1). В этом соотношении величина K есть ожидаемая доля нуклеотидных различий в двух последовательностях. Величина K увеличивается прямо пропорционально времени независимого существования двух последовательностей. Коррекция p -дистанции до линейаризированной доли замен показана на рис. 6.8.

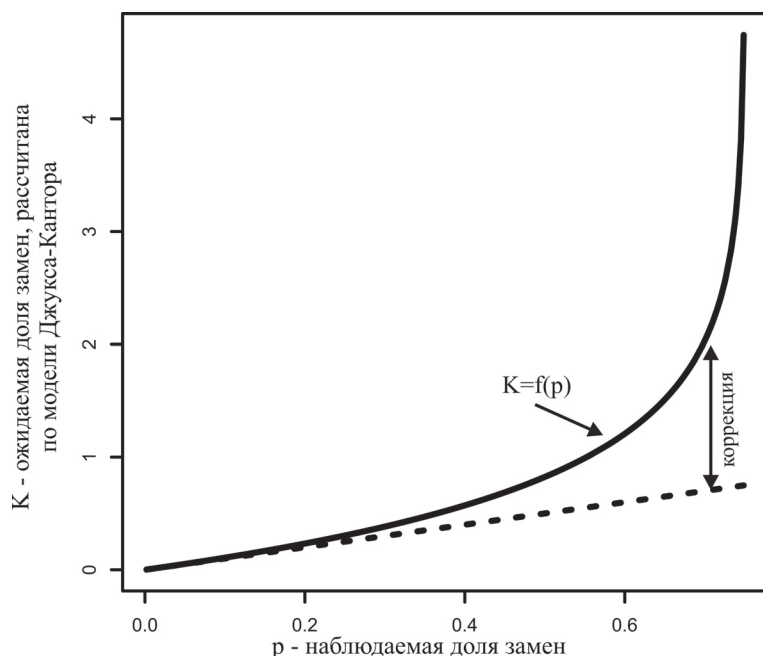


Рис. 6.8. Соотношения между долями замен в модели Джукса-Кантора.

Модель Джукса-Кантора является однопараметрической, т.к. учитывает только один параметр – долю несовпадающих нуклеотидов в сравниваемых последовательностях. Все более сложные модели замен так или иначе основаны на принципах расчета линейаризированной меры генетического расстояния, предложенных Джуксом и Кантором. Более реалистичной моделью по сравнению с однопараметрической моделью Джукса-Кантора является модель $K80$, предложенная Кимура (Kimura, 1980). Известно, что на самом деле замены по типу транзиций (т.е. между пуринами $[A$ и $G]$, а также между пиримидинами $[C$ и $T]$) происходят намного чаще, чем замены по типу трансверсий (т.е. пуринового основания на пиримидиновое или наоборот). В соответствии с этим Кимура предложил модель с различными вероятностями для замен по типу транзиций и трансверсий. Можно обозначить долю транзиций как Q , а долю трансверсий как P . Тогда ожидаемая $dk2p$ доля замен будет вычисляться по формуле:

$$K2p = -\frac{1}{2}\ln(1 - 2P - Q) - \frac{1}{4}\ln(1 - 2Q) \quad (3)$$

Таким образом, используемые в модели Кимуры рассуждения аналогичны тем, которые использованы в модели Джукса-Кантора, только с учетом двух типов замен. Существуют и более сложные эволюционные модели, учитывающие и возможное влияние содержания каждого из четырех нуклеотидов на частоту транзиций и трансверсий и др. параметры. Целью всех моделей является линейаризация относительного количества замен между нуклеотидными последовательностями. Перечислим часто используемые для филогенетического анализа модели нуклеотидных замен:

1) *raw* или *p*-дистанция: доля несовпадающих нуклеотидов при попарном сравнении выровненных последовательностей. Данный вид дистанций может применяться для проверки насыщения последовательностей заменами.

2) *JC69* – модель Джукса-Кантора: модель производит линейаризацию *p*-дистанции с учетом того, что все замены имеют одинаковую вероятность. Частоты встречаемости нуклеотидов всех четырех типов не различаются.

3) *K80* – двухпараметрическая модель Кимуры: имеет те же основные предположения, что и модель Джукса-Кантора за исключением того, что два вида замен транзиций ($A \leftrightarrow G$, $C \leftrightarrow T$), и трансверсий ($A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow T$, $C \leftrightarrow G$, $G \leftrightarrow T$) происходят с разной вероятностью. Частоты встречаемости нуклеотидов всех четырех типов не различаются.

4) *F81* – модель Фельзенштейна: обобщенный вариант модели *JC69*, учитывающей поправку на разные частоты встречаемости нуклеотидов.

5) *K81* – обобщенная модель Кимуры: предполагает различные вероятности для двух видов трансверсий: $A \leftrightarrow C$ и $G \leftrightarrow T$ с одной стороны, и $A \leftrightarrow T$ и $C \leftrightarrow G$ с другой стороны. Частоты встречаемости нуклеотидов всех четырех типов не различаются.

6) *F84* – модифицированная модель Кимуры *K80*, с предположением о разных частотах встречаемости нуклеотидов.

7) *T92* – модель Тамуры: обобщенная модель *K80* с учетом смещения нуклеотидного состава последовательностей в область увеличения концентрации GC-пар.

8) *TN93* – модель Тамуры-Нея: модель предполагает различные вероятности для обоих видов транзиций ($A \leftrightarrow G$ по сравнению с $C \leftrightarrow T$), и трансверсий. Частоты встречаемости нуклеотидов различаются.

9) *HKY* – модель Хасигавы-Кишино-Яно: объединение предположений модели *K80* и *F81*, близка к модели *F84* и доступна только в программах, производящих кластеризацию на основе

дискретных методов, например, таких как метод максимального правдоподобия.

10) *GTR* – обобщенная модель с полным временным преобразованием: вероятности всех возможных вариантов замен (за исключением обратных) отличаются друг от друга и частоты встречаемости нуклеотидов разные. Модель доступна только в программах, производящих кластеризацию на основе дискретных методов таких, например как метод максимального правдоподобия.

Вторым фактором, определяющим генетическую дистанцию между последовательностями, является неодинаковость скоростей накопления замен в различных участках сравниваемых последовательностей ДНК. Причиной этому может быть, например, кодирование участком ДНК активного центра белка, который обладает высокой степенью консервативности относительно аминокислотного состава и функции. Для корректировки неодинаковой скорости накопления замен в различных участках последовательности служит гамма распределение с параметром *G*. Подобная корректировка получила название *G*-коррекция, она предусмотрена в моделях *JC69*, *K80*, *F81*, *K81*, *F84*, *T92*, *TN93*, *HKY* и *GTR*. Если внимательно посмотреть на приведенное описание 10-ти моделей, то по мере продвижения от начала списка к его концу заметно постепенное усложнение алгоритма расчета генетической дистанции. При выборе более сложной модели происходит увеличение расчетного компьютерного времени для проведения филогенетического анализа, особенно при больших выборках.

Одним из наиболее универсальных средств для вычисления матриц попарных генетических дистанций между последовательностями является язык программирования **R** в комплекте с пакетом **APE** (Paradis et al., 2004). Подробно об основах программирования на языке **R** написано в книге Шипунова с соавт. (2012). Пакет **APE** для языка программирования **R** реализует огромный набор функций для филогенетического анализа на основе расшифрованных последовательностей ДНК (ссылки в Прил. 5). В операционной системе **Windows** после установки интерпретатора **R** для установки пакета **APE** необходимо скачать пакет с расширением *.zip*. Далее следует запустить консоль **R**, кликнув на ярлык в панели меню «Пуск». После запуска консоли **R** в главном меню необходимо выбрать последовательность вкладок «*Packages*» (Пакеты) → «*Install package(s) from local zip files*» (Установить пакеты из локальных *zip*-файлов). В открывшемся меню выбрать сохраненный *zip*-файл с пакетом **APE** и установить пакет. После установки пакета его необходимо подключить с помощью функции *library*, задав следующую команду:

library(ape)

Используя пакет **APE** для языка программирования **R**, можно проанализировать генетические дистанции, рассчитанные с помощью

разных моделей замен для набора последовательностей видов зеленых водорослей из таблицы 6.1 (*Chloro-dataset*). Для расчета генетических дистанций необходимо проделать следующие действия:

1) Задать полное имя файла (путь) в формате *FASTA* с набором выровненных последовательностей:

```
str_pas="C:\\Rrab\\data\\18S.fas"
```

переменная *str_pas* будет хранить строку, содержащую полное имя файла с данными о расшифрованных последовательностях ДНК в формате *FASTA*. В данном случае файл *18S.fas* хранит информацию о последовательностях маркера 18S рДНК. Разделителем вложенных директорий выступает символ двойной слеш \\\.

2) Считать набор данных с диска с помощью функции *read.dna*:

```
pas<-read.dna(str_pas, format = "fasta")
```

функция *read.dna* считывает с диска набор последовательностей и сохраняет их в переменной *pas*. Первый аргумент функции *read.dna* – это строка с именем файла, второй аргумент *format* задает формат файла.

3) Рассчитать генетические дистанции с помощью функции *dist.dna*:

```
d<-dist.dna(pas, "K80", gamma = FALSE)
```

Функция *dist.dna* производит расчет генетической дистанции и сохраняет результат в виде треугольной матрицы в переменной *d*. Первый аргумент функции *dist.dna* задает набор последовательностей ДНК, второй аргумент задает модель расчета генетических расстояний (модель записывается в кавычках, название моделей приведены выше в списке) и третий аргумент *gamma* имеет логический тип. Если *gamma = FALSE*, то гамма-коррекция дистанции не производится, если *gamma = TRUE*, то гамма-коррекция выполняется.

Общий вид скрипта по расчету генетических дистанций выглядит следующим образом:

```
library(ape)
```

```
str_pas="C:\\Rrab\\data\\18S.fas"
```

```
pas<-read.dna(str_pas, format = "fasta")
```

```
d<-dist.dna(pas, "K80", gamma = FALSE)
```

```
d
```

Вызов переменной *d* позволяет визуализировать матрицу генетических дистанций на экране.

Если необходимо узнать генетическую дистанцию между конкретными организмами необходимо матрицу дистанций преобразовать в обычную квадратную матрицу с помощью функции *as.matrix()*:

```
d<-as.matrix(d)
```

После этой операции обратиться к дистанции между конкретными организмами можно по их индексам или названиями:

$d[1,10]$ – визуализация дистанции между первым и десятым организмами.

$d["Chlorochytrium\ lemnae\ 2\ 3", "Spongiocloris\ spongiosa\ 1\ 3"]$ – визуализация генетической дистанции между последовательностью с именем «*Chlorochytrium lemnae 2 3*» и последовательностью с именем «*Spongiocloris spongiosa 1 3*».

С помощью указанных инструментов нами был проанализирован весь спектр доступных в **APE** моделей замен применительно к *Chloro-dataset* для 18S рДНК и *rbcl*. На рис. 6.9 приведены зависимости расчетных генетических дистанций от доли замен между последовательностями ДНК для набора данных 18S рДНК.

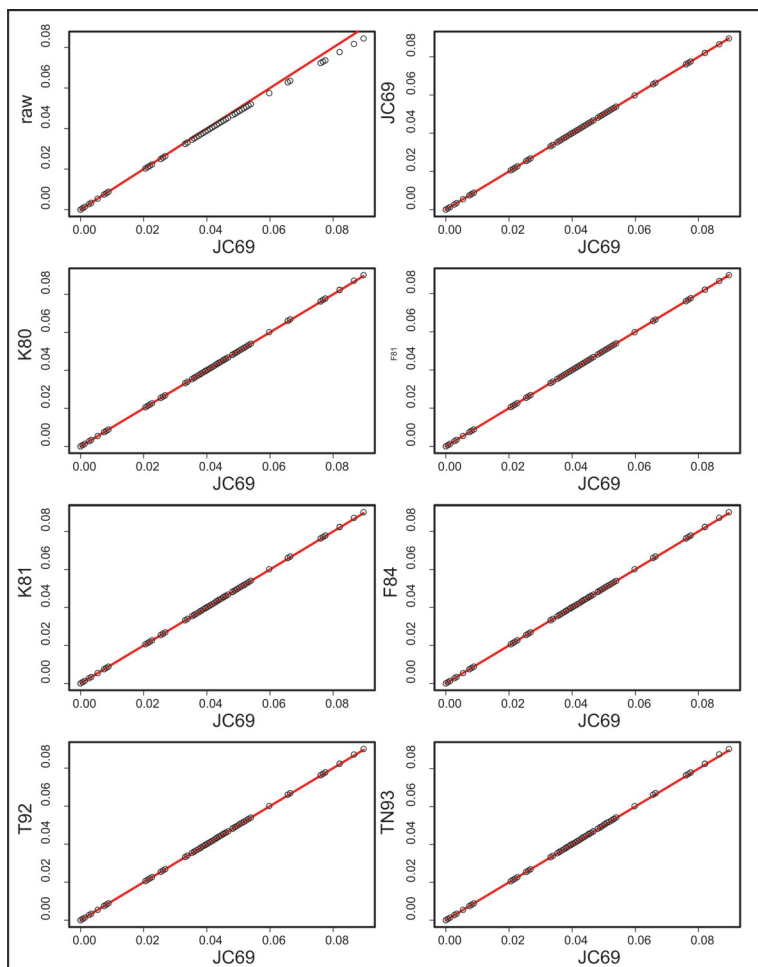


Рис. 6.9. Зависимость между попарными долями замен и мерой генетического расстояния, определенного одной из моделей расчета генетических дистанций для набора последовательностей 18S рДНК.

Красная линия показывает линейную зависимость, выходящую из начала координат с угловым коэффициентом 1. Указатели в виде окружности показывают дистанции, определенные как доля замен, и дистанции, определенные по одной из моделей расчета генетических расстояний. Анализ рисунка показывает, что отклонение от прямой линии визуально наблюдается только при сопоставлении p -дистанций с генетическими дистанциями, рассчитанными по модели Джукса-Кантора ($JC69$). Все остальные доступные в пакете **APE** модели расчета генетических дистанций ($K80$, $K81$, $F81$, $F84$, $T92$, $TN93$) на данном конкретном наборе сравниваемых последовательностей дают результат неотличимый от модели Джукса-Кантора. Отклонение линейной зависимости дистанций, рассчитанных по модели $JC69$, от p -дистанций визуально наблюдается, если p -дистанций превышает порог 0.04. Вероятней всего подобная картина взаимосвязи генетических дистанций, рассчитанных с использованием различных моделей расчета генетических дистанций, связана с тем, что для рассматриваемого набора последовательностей максимальная p -дистанций составляет достаточно малую величину 0.08. В большем диапазоне p -дистанций соотношение между различными моделями расчета генетических дистанций может быть иным. Относительно полученных результатов анализа генетических дистанций можно сделать вывод, что чем большая доля замен при попарном сравнении последовательностей наблюдается в наборе данных, тем большее значение приобретает использование сложных моделей для расчета генетических расстояний.

Аналогичные расчеты были проведены для маркера рубиско ($rbcL$). Результат немного отличался от того, что был получен для маркера 18S рДНК: пороговое значение доли замен, при котором наблюдалось отклонение доли замен от генетической дистанции, рассчитанной по модели замен, равнялось 0.03. Таким образом, если для набора данных расшифрованных последовательности ДНК маркера $rbcL$ имеются доли попарных различий, превышающие порог в 0.03, то для расчета генетического расстояния следует применить одну из моделей замен.

На следующем этапе были оценены среднепроцентные отклонения между генетическими дистанциями и долями замен для наборов данных маркеров 18S рДНК и $rbcL$ и среднепроцентные отклонения между генетическими дистанциями, оцененными с помощью различных моделей расчета генетических расстояний, и долями замен для наборов данных маркеров 18S рДНК и $rbcL$. Результаты представлены в таблицах 6.2 и 6.3. Анализ результатов показывает, что для маркера 18S рДНК наибольшее среднепроцентное отклонение долей замен от расчетных генетических дистанций наблюдалось для модели $TN93$ и составило 3.6%. Для модели $JC69$, $K80$ и $F81$ расчетное среднепроцентное отклонение составило 3.2%, для моделей $K81$, $F84$ и $T92$ – 3.4%. Данные значения

совпадают с предположениями, заложенными в модели расчета генетических дистанций. Для маркера *rbcL* ситуация оказалась немного иной. Среднепроцентное отклонение между долей замен и генетическими дистанциями, оцененными с помощью моделей замен, колебалось в пределах от 6.7 до 7.6%. Это говорит о том, что данный маркер более чувствителен к выбору определенной модели расчета генетических дистанций. Небольшие среднепроцентные отклонения долей замен (*p*-дистанций) от генетических дистанций, рассчитанных с использованием одной из моделей замен, связаны с небольшим интервалом *p*-дистанций для рассматриваемых наборов данных 18S рДНК и *rbcL*. При увеличении максимальной *p*-дистанции наблюдаемое среднепроцентное отклонение также будет увеличиваться.

Табл. 6.2. Среднее различие между генетическими дистанциями, определенными с помощью различных моделей замен для набора последовательностей 18S рДНК

Среднее различие генетических дистанций от доли замен (<i>raw</i>)			Среднее различие генетической дистанции, определенной с помощью модели <i>JC69</i> , от других моделей замен		
Независимая модель	Зависимая модель	Среднее различие между моделями, %	Независимая модель	Зависимая модель	Среднее различие между моделями, %
<i>raw</i>	<i>raw</i>	0	<i>JC69</i>	<i>raw</i>	-3.3
<i>raw</i>	<i>JC69</i>	3.2	<i>JC69</i>	<i>JC69</i>	0.0
<i>raw</i>	<i>K80</i>	3.3	<i>JC69</i>	<i>K80</i>	0.2
<i>raw</i>	<i>F81</i>	3.2	<i>JC69</i>	<i>F81</i>	0.0
<i>raw</i>	<i>K81</i>	3.4	<i>JC69</i>	<i>K81</i>	0.2
<i>raw</i>	<i>F84</i>	3.4	<i>JC69</i>	<i>F84</i>	0.2
<i>raw</i>	<i>T92</i>	3.4	<i>JC69</i>	<i>T92</i>	0.2
<i>raw</i>	<i>TN93</i>	3.6	<i>JC69</i>	<i>TN93</i>	0.4

Среднепроцентное отклонение генетического расстояния, оцениваемого в долях замен (*raw*) модели *JC69* как для маркера 18S рДНК, так и для маркера *rbcL*, оказалось отрицательным. Это означает, что генетическая дистанция в виде доли замен в большинстве случаев недооценивает реальное количество замен, произошедших с момента разделения последовательностей от общего предка. Все остальные различия между моделями колебались в пределах десятых долей процента.

Табл. 6.3. Среднее процентное различие между генетическими дистанциями, определенными с помощью различных моделей замен для набора последовательностей *rbcL*

Среднее различие генетических дистанций от доли замен (<i>raw</i>)			Среднее различие генетической дистанции, определенной с помощью модели <i>JC69</i> , от других моделей замен		
Независимая модель	Зависимая модель	Среднее различие между моделями, %	Независимая модель	Зависимая модель	Среднее различие между моделями, %
<i>raw</i>	<i>raw</i>	0	<i>JC69</i>	<i>raw</i>	-6.7
<i>raw</i>	<i>JC69</i>	6.7	<i>JC69</i>	<i>JC69</i>	0.0
<i>raw</i>	<i>K80</i>	6.9	<i>JC69</i>	<i>K80</i>	0.2
<i>raw</i>	<i>F81</i>	6.8	<i>JC69</i>	<i>F81</i>	0.1
<i>raw</i>	<i>K81</i>	7.2	<i>JC69</i>	<i>K81</i>	0.5
<i>raw</i>	<i>F84</i>	7.0	<i>JC69</i>	<i>F84</i>	0.3
<i>raw</i>	<i>T92</i>	7.0	<i>JC69</i>	<i>T92</i>	0.3
<i>raw</i>	<i>TN93</i>	7.6	<i>JC69</i>	<i>TN93</i>	0.9

При расчете генетических дистанций следует принимать во внимание тот факт, что при достаточно больших *p*-дистанциях рассчитываемая по одной из моделей ожидаемая доля замен может существенно отличаться от ее истинного значения. Это связано с тем, что сравниваемые последовательности ДНК имеют неодинаковую вероятность закрепления мутаций в разных позициях последовательности. Например, третье положение в кодонах белок-кодирующих последовательностей накапливает замены с большей скоростью, так как обычно мутации подобного типа не влияют на кодируемую триплетом аминокислоту и не отсеваются естественным отбором. Аналогично, в последовательностях 18S рДНК существуют участки, в меньшей степени влияющие на вторичную структуру кодируемой рРНК, эти участки накапливают замены с большей скоростью, так как менее подвержены действию стабилизирующего отбора. Таким образом, существует предельный порог, называемый пределом насыщения для *p*-дистанций, при котором дальнейшее увеличение времени независимого существования двух филогенетических линий не приводит к существенному увеличению *p*-дистанций и генетических дистанций, рассчитанных по одной из моделей замен. По литературным данным предел насыщения для белок-кодирующих последовательностей наступает при $p > 0.2$, а для генов рРНК - при $p > 0.15$.

В спектре таксономических категорий, для которых были проанализированы генетические дистанции, представлены водоросли, принадлежащие разным классам. Максимальная генетическая дистанция, характерная для маркера 18S рДНК составила 0.08, а для *rbcL* – 0.17. Это означает, что рассчитанные доли замен, оцененные по моделям генетических дистанций для зеленых водорослей, далеки от предела насыщения. Таким образом, при филогенетических исследованиях зеленых водорослей конкретной выборки *Chloro-dataset* с применением маркеров 18S рДНК и *rbcL* исследователям нет необходимости задумываться об устранении эффекта насыщения генетических дистанций.

Для более обоснованного выбора модели нуклеотидных замен можно воспользоваться программой **jModelTest** (Darriba et al., 2012; Прил. 5). Программа доступна для запуска на различных операционных системах и написана на языке **Java**. Для запуска программы на компьютере должен быть установлен интерпретатор для выполнения **Java**-приложений **JRE**. Программа **jModelTest** может определить оптимальную модель для конкретного набора данных нуклеотидных последовательностей в формате *FASTA*. После запуска программы с помощью вкладки главного меню «File» можно загрузить набор выровненных последовательностей ДНК, для которых будет определяться модель нуклеотидных замен. Для запуска анализа необходимо выбрать в главном меню вкладку «Analysis» → «Compute likelihood scores». После этого перед вами откроется окно для выбора параметров моделей нуклеотидных замен (рис. 6.10).

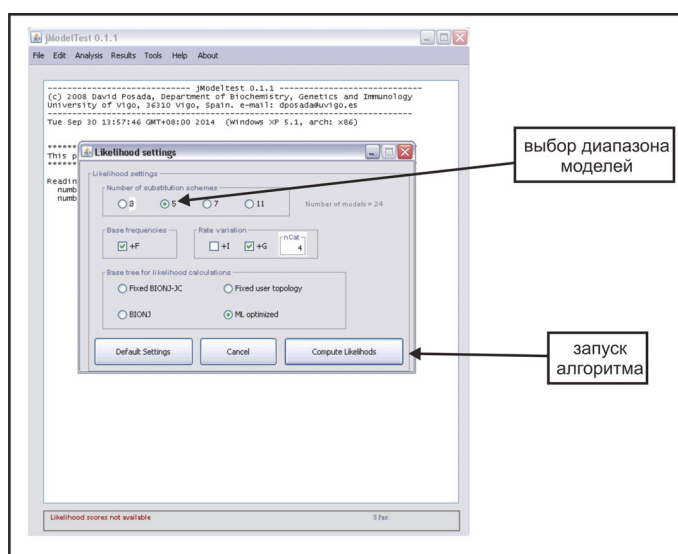


Рис. 6.10. Окно программы **jModelTest** с открытым меню для выбора параметров модели расчета генетических дистанций.

Следует отметить, что в параметрах программы **jModelTest** есть возможность выбора достаточно большого количества моделей нуклеотидных замен, но необязательно тестировать все возможные варианты. Как правило, оптимальным количеством схем моделей является 5 («*Number of substitution schemes*»). В пункте меню «*Rate variation*» необходимо выбрать пункт +G. В этом случае для каждой из моделей замен будет просчитаны варианты с гамма-коррекцией и без. После установки всех параметров можно запустить расчет, нажав кнопку «*Compute Likelihoods*». После того как расчет завершен, необходимо выбрать вкладку меню «*Analysis*» → «*Do AIC calculations*», в результате чего произойдет подсчет значения обобщенного *AIC* критерия (информационный критерий Акаике), на основе которого можно будет сделать выбор оптимальной модели для конкретного набора нуклеотидных последовательностей. Для просмотра результатов анализа в виде сводной таблицы необходимо выбрать вкладку меню «*Result*» → «*Show result*». Общий вид сводной таблицы с расчетными характеристиками эволюционных моделей представлен на рис. 6.11.

Results

ID	Name	Partition	-lnL	p	AIC	deltaAIC	weight
1	PSI+G	000000	991.6156	26	2035.2312	6.4232	0.016
5	K80	010010	1025.8394	23	1922.6768	68.8688	0.0
6	K80+G	010010	1020.8775	24	2089.7592	60.9469	0.0
7	HKY	010010	993.0346	26	2038.0692	7.2412	0.004
8	HKY+G	010010	988.0143	27	2030.0287	1.2205	0.223
9	TN1ef	010020	1025.1353	24	2098.2706	69.4626	0.0
10	TN1ef+G	010020	1020.2296	25	2090.4592	61.6511	0.0
11	TN1	010020	991.9832	27	2037.9665	9.1584	0.004
12	TN1+G	010020	986.9832	28	2029.9664	1.1584	0.230
13	TPM1	012210	1025.7831	24	2099.5663	70.7583	0.0
14	TPM1+G	012210	1020.8234	25	2091.6468	62.8388	0.0
15	TPM1uf	012210	992.8541	27	2039.7082	10.9002	0.001
16	TPM1uf+G	012210	987.8245	28	2031.6489	2.9409	0.096
17	SYM	012345	1020.7414	27	2095.4828	66.6748	0.0
18	SYM+G	012345	1015.9402	28	2087.8804	59.0724	0.0
19	GTR	012345	988.2635	30	2036.527	7.719	0.006
20	GTR+G	012345	983.404	31	2028.808	0.0	0.411

Decimal numbers are rounded. Click on column headers to sort data in ascending or descending order (⇧+Shift) OR Ctrl+Shift+Z.

PAQ 151732,2710
 PAT 72126,1718
 PCG 55921,9441
 PCT 88679,5609
 PCT 1,0000
 alpha(G) 0,0104

Numbers have been rounded.
 (I): considers only +I models.
 (G): considers only +G models.
 (AC): considers only +AC models.

Likelihood scores loaded for 20 models (optimized trees) N: 548

Рис. 6.11. Оценка результатов работы программы **jModelTest** при выборе оптимальной модели расчета генетических дистанций.

Наиболее оптимальная модель с минимальным значением критерия *AIC* выделена красным цветом. В процессе филогенетических реконструкций необходимо использовать именно эту модель. Так же следует обратить внимание, рекомендуется ли для наиболее оптимальной

модели проводить гамма-коррекцию скоростей накопления замен в разных позициях последовательности. Если модель будет указана с опцией +G, то гамма-коррекцию при расчете дистанций необходимо провести.

Если в программах построения филогенетических деревьев отсутствует оптимальная модель, предложенная программой **jModelTest**, то, следует обратить внимание на значения натурального логарифма вероятностей $-\ln L$, представленные в таблице «*Results*» программы **jModelTest**. Логарифм является возрастающей функцией, следовательно, для больших значений функции $-\ln L$ значения вероятности 1 будет меньше. В списке моделей из таблицы результатов необходимо выбрать те модели расчета генетических расстояний, которые вам доступны. Среди этого списка моделей необходимо выбрать то значение показателя $-\ln L$, которое ближе всего приближается к показателю $-\ln L$ оптимальной модели. Таким образом, вам удастся выбрать оптимальную модель из списка доступных. Следует подчеркнуть, что согласно критериям байесовского анализа, для принятия гипотез существует положение: если разность по модулю между $-\ln L$ двух моделей замен меньше чем 8, то обе модели с одинаковым успехом могут использоваться для расчета генетических дистанций, что следует принять во внимание при выборе моделей по результатам работы программы **jModelTest**.

6.3 Методы кластеризации последовательностей на основе генетических дистанций

Итак, на предыдущем этапе мы научились оценивать генетические дистанции, основываясь на различных моделях накопления замен в нуклеотидных последовательностях. Существует гипотеза молекулярных часов, на основе которой можно предположить, что чем меньше генетическая дистанция, определенная на основе модели расчета генетических расстояний, тем ближе степень родства или сходства между организмами, от которых получены сравниваемые последовательности. Следовательно, на основе полученных генетических дистанций можно кластеризовать нуклеотидные последовательности для реконструкции родственных связей между исследуемыми организмами. Кластеризация в этом случае будет разбиением организмов на группы по близости генетических дистанций или, что одно и то же, по степени родства. Результат кластеризации может быть представлен в виде дерева, отражающего родственные связи между организмами – филогенетического дерева. Дерево состоит из ветвей, узлов и корня. Несколько ветвей, отходящих от одного узла (общего предка), образуют кладу (кластер). Методы кластеризации можно разделить на две большие группы. Первая группа методов основана на расчетных генетических дистанциях между последовательностями ДНК – дистанционные методы

филогенетического анализа, использующие матрицу генетических расстояний. Вторая группа методов учитывает не только генетические дистанции между последовательностями, но и сочетание позиций в ДНК, которые подверглись изменению, – дискретные методы или символично-ориентированные.

6.3.1 Дистанционные методы кластеризации

Дистанционные методы кластеризации относятся к наиболее простым методам филогенетического анализа. Распространенным дистанционным методом является метод объединения ближайших соседей (*Neighbor-Joining*, *NJ*). Этот метод дает хороший результат в ситуации, когда с момента межвидовой (межпопуляционной) изоляции прошел достаточно небольшой промежуток времени. Одной из самой доступной реализации метода объединения ближайших соседей является пакет **APE** для языка программирования **R**. Для проведения филогенетической реконструкции необходимо воспользоваться следующим набором функций:

1) *str_pas* = "C:\\Rrab\\data\\18S.fas"

переменная *str_pas* будет хранить строку, содержащую полное имя файла с данными о расшифрованных последовательностях ДНК в формате *FASTA*. В данном случае файл *18S.fas* хранит информацию о последовательностях маркера 18S рДНК. Разделителем вложенных директорий выступает символ двойной слеш \\\.

2) считывание набора данных с диска с помощью функции *read.dna*:

```
pas<- read.dna(str_pas, format = "fasta")
```

функция *read.dna* считывает с диска набор последовательностей и сохраняет их в переменной *pas*. Первый аргумент функции *read.dna* – это строка с именем файла, второй аргумент *format* задает формат файла, из которого мы производим чтение данных.

3) расчет генетических дистанций производится с помощью функции *dist.dna*:

```
d<-dist.dna(pas, "K80", gamma = FALSE)
```

Функция *dist.dna* производит расчет генетической дистанции и сохраняет результат в виде треугольной матрицы в переменной *d*. Первый аргумент функции *dist.dna* задает набор последовательностей ДНК, второй аргумент задает модель расчета генетических расстояний (модель записывается в кавычках, название моделей приведены выше) и третий аргумент *gamma* имеет логический тип: если *gamma* = *FALSE*, то гамма-коррекция дистанции не производится; если *gamma* = *TRUE*, то гамма-коррекция производится.

4) следующая функция непосредственно проводит построение филогенетического дерева методом объединения ближайших соседей (*Neighbor-Joining*):

```
tree<-nj(d)
```

в этом выражении появляется новая переменная *tree*, которая хранит результат кластеризации, сама функция *nj* имеет один параметр - матрицу генетических дистанций *d*.

5) на заключительном этапе филогенетическое дерево необходимо укоренить, т.е. связать в нем последовательность филогенетических событий со временем, прошедшим с момента дивергенции филогенетических линий. Для укоренения, как правило, используют последовательность ДНК таксона, который имеет дальнейшее родство со всеми остальными. Например, если вы устанавливаете филогенетические связи внутри рода, семейства, порядка, класса и т.д., в качестве корневой (внешней) группы следует взять представителя(лей) из другого рода, семейства, порядка, класса и т.д. Для удобства последовательность для укоренения дерева следует поместить в конец набора данных. Для укоренения дерева в **R** нужно использовать команду *root*:

```
rooted_tree<-root(tree, nrow(pas)=N)
```

Переменная *rooted_tree* сохраняет филогенетическое дерево с новой топологией. Функция *root* имеет два аргумента: первый аргумент – это переменная, хранящая филогенетическое дерево со старой топологией (неукорененное дерево) и второй аргумент *N* – это номер строки укореняющей последовательности (внешней группы) в исходном наборе данных *pas*. Так как в нашем случае укореняющая последовательность была последней в наборе, то ее номер будет равен количеству последовательностей.

6) для записи филогенетического дерева на диск в текстовом формате сначала необходимо определить полное имя файла для сохранения результатов филогенетического анализа:

```
str_tree="C:\\Rrab\\data\\18S_tree.txt"
```

7) Воспользовавшись функцией *write.tree* можно записать результат анализа на диск:

```
write.tree(rooted_tree, file=str_tree)
```

rooted_tree – это переменная, содержащая укорененное филогенетическое дерево, *file* определяет место и имя сохраняемого файла.

Полностью скрипт для филогенетической реконструкции методом объединения ближайших соседей будет выглядеть следующим образом:

```
library(ape)
str_pas="C:\\Rrab\\data\\18S.fas"
pas<-read.dna(str_pas, format = "fasta")
d<-dist.dna(pas, "K80", gamma = FALSE)
tree<-nj(d)
rooted_tree<-root(fit,nrow(pas))
str_tree="C:\\Rrab\\data\\18S_tree.txt"
```

```
write.tree(rooted_tree, file=str_tree_text)
```

Визуализировать филогенетическое дерево, сохраненное в текстовом формате можно с помощью нескольких программ. Одной из наиболее удобных программ является **FigTree** (ссылка в Прил. 5). Другим способом визуализации дерева является применение возможностей языка программирования **R** и пакетов **APE** и **devEMF**. Алгоритм установки пакета **devEMF** такой же, как и у пакета **APE**. Для визуализации филогенетического дерева в виде файла в формате *.emf* требуется произвести следующие действия:

1) подключить пакет **APE** с помощью функции *library(ape)*.

2) подключить пакет **devEMF** с помощью функции *library(devEMF)*.

3) задать переменную, хранящую полное имя файла с филогенетическим деревом в текстовом формате:

```
str_tree="C:\\Rrab\\data\\18S_tree.txt"
```

4) считать филогенетическое дерево из файла в текстовом формате с помощью функции *read.tree*:

```
tree<-read.tree(file=str_file_tree)
```

Здесь *tree* – переменная, хранящая в оперативной памяти информацию о структуре филогенетического дерева, *file* – параметр функции, задающий полное имя считываемого файла.

5) задать полное имя файла формата *.emf* для сохранения филогенетического дерева в виде векторного рисунка:

```
str_plot="C:\\Rrab\\data\\18S_tree.emf"
```

6) выделить место в оперативной памяти для сохранения рисунка с помощью функции *emf()*:

```
emf(str_plot,width = 12, height = 7)
```

str_plot - полное имя файла для сохранения рисунка, параметр *width* задает ширину рисунка в условных единицах, параметр *height* задает высоту рисунка в условных единицах.

7) отобразить филогенетическое дерево на рисунке с помощью функции *plot()*:

```
plot(tree, edge.width=3)
```

Первый параметр функции определяет объект для визуализации (филогенетическое дерево), второй параметр *edge.width* определяет толщину линий на филогенетическом дереве в условных единицах.

8) добавить единичную шкалу на дерево с помощью функции *add.scale.bar()*:

```
add.scale.bar(lwd = 3)
```

Параметр *lwd* определяет толщину линии на шкале в условных единицах.

9) сохранить рисунок на диск и освободить оперативную память с помощью функции *dev.off()*.

Полностью скрипт для визуализации филогенетического дерева будет выглядеть следующим образом:

```
library(ape)
library(devEMF)
str_tree="C:\\Rrab\\data\\18S_tree.txt"
tree<-read.tree(file=str_tree)
str_plot="C:\\Rrab\\data\\18S_tree.emf"
emf(str_plot,width = 12, height = 7)
plot(fit, edge.width=3)
add.scale.bar(lwd = 3)
dev.off()
```

На основе данных из **GenBank** нами было реконструировано и визуализировано филогенетическое дерево по маркерам 18S рДНК и *rbcL* для видов, представленных в табл. 6.1 (*Chloro-dataset*). При филогенетической кластеризации для расчета линейаризированных генетических дистанций была использована модель *K80*. Выбор модели проводился на основании результатов тестирования моделей в программе **jModelTest** для набора данных *Chloro-dataset*. Данная программа после окончания расчетов в качестве наиболее оптимальной выдала модель *GTR+I* как для 18S рДНК, так и для *rbcL*. Разность по модулю логарифмов вероятности $-\ln L$ для модели *K80* и *GTR+I* для обоих маркеров была меньше чем 8. Следовательно, модель замен *K80* также применима для расчета генетических дистанций.

Филогенетическое дерево, реконструированное на основе маркера 18S рДНК, представлено на рис. 6.12. На рисунке кластеры с представителями одного семейства выделены одним цветом. Анализ топологии дерева, построенного *NJ*-методом, позволяет нам выделить один кластер, который образовали виды, принадлежащие семейству 1 (*fam1*). Остальные два семейства 2 и 3 (*fam 2* и *fam 3*) не представлены одним кластером для каждого. Подобная ситуация может объясняться несколькими причинами. Одной из причин может быть истинная полифилия семейств, то есть для разных групп видов в одном семействе ближайший общий предок был также предком и каких-то видов из других семейств. Другой причиной может быть близость по времени филогенетических событий, при которых происходило разделение семейств от первоначального общего предка и разделение филогенетических линий внутри семейств. Подобные процессы в частности могут происходить при взрывном видообразовании. Так как процессы накопления замен в ДНК носят случайный вероятностный характер, то для маленьких промежутков времени будет характерен большой разброс по наблюдаемым заменам в ДНК, что приведет к появлению нечетких филогенетических сигналов в последовательностях.

Такая ситуация может выглядеть как полифилетичное происхождение в пределах одной таксономической группы.

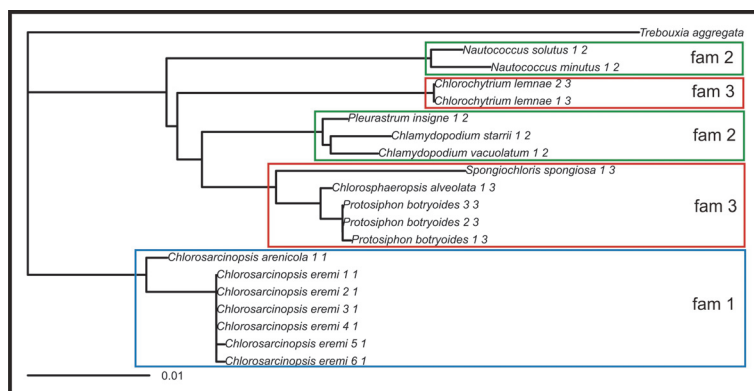


Рис. 6.12 Филогенетическое дерево, реконструированное на основе маркера 18S рДНК.

Примечание. Цифрами и цветными прямоугольниками отмечена принадлежность видов к определенным семействам.

Филогенетическое дерево, реконструированное на основе маркера *rbcL*, представлено на рис. 6.13. Так же как и для филогении по маркеру 18S рДНК, дерево для маркера *rbcL* характерно полифилией семейств 2 и 3. В данном случае полифилия может быть обусловлена не только причинами, характерными для ядерных маркеров, но и возможностью горизонтального переноса пластидной ДНК между видами.

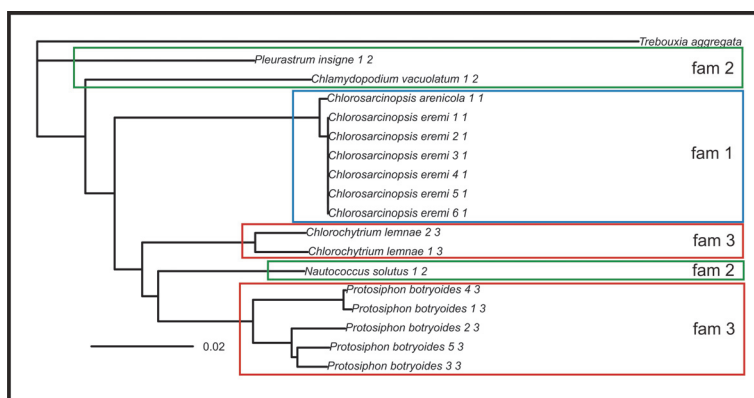


Рис. 6.13. Филогенетическое дерево, реконструированное на основе маркера *rbcL*.

Примечание. Цифрами и цветными прямоугольниками отмечена принадлежность видов к определенным семействам.

В целом, при сравнении генетических дистанций, рассчитанных по маркеру 18S рДНК и *rbcL*, можно сказать, что последний маркер является менее консервативным и накапливает замены приблизительно в два раза быстрее. Это означает, что при идентификации видов, имеющих достаточно близкие таксономические статусы, маркер *rbcL* более предпочтителен.

6.3.2 Дискретные методы кластеризации

В отличие от дистанционных методов филогенетического анализа, базирующихся на анализе эволюционных дистанций между последовательностями, методы анализа дискретных признаков рассматривают различия между последовательностями в конкретных позициях. Целью методов анализа дискретных признаков является реконструкция сценария, наиболее вероятно объясняющего порядок конкретных нуклеотидных замен в эволюционной истории анализируемой группы (Лукашов, 2009). Среди дискретных методов реконструкции филогенетического дерева выделяют методы максимальной экономии (*Maximum Parsimony*, *MP*), максимального правдоподобия (*Maximum Likelihood*, *ML*) и байесовский метод (*Bayesian inference*). В филогенетических исследованиях наиболее часто используются два последних метода, т.к. метод максимальной экономии по умолчанию не учитывает длину ветвей, которая отображает количество замен нуклеотидов во время эволюции той или иной клады. Рассмотрим их подробнее. Метод максимального правдоподобия, как и дистанционные методы, базируется на использовании моделей эволюции. Однако применяет их исходя из оценки вероятности (правдоподобия) нахождения каждого конкретного нуклеотида в каждой конкретной позиции. Если имеется информация о закономерностях эволюционных преобразований признаков (иными словами, если разработана модель эволюции признака) и известно распределение состояний признаков у изучаемых организмов, то можно рассчитать вероятности различных эволюционных траекторий, которые могли привести к современным формам, а затем выбрать наиболее вероятную из них. В нашем случае состояниями признака являются основания ДНК в позициях последовательности. В разных последовательностях ДНК в наборе могут находиться разные нуклеотиды, которые меняются в процессе мутаций по определенным правилам. Закономерности процесса накопления мутационных изменений в последовательностях могут быть отражены в одной из моделей замен. Соответственно выбор одной из моделей будет задавать модель эволюции признака. Получаемые филогенетические реконструкции зависят от выбора модели замен. Выбор принципиально неправильной модели эволюции может привести к серьезным ошибкам в филогенетической кластеризации последовательностей. Поэтому

сравнительный анализ моделей расчета генетических дистанций с помощью программы **jModelTest** является более важным этапом исследования, чем при использовании дистанционных методов.

Одной из наиболее популярных программ, реализующей метод максимального правдоподобия, является программа **PhyML** (*Phylogenetic estimation using Maximum Likelihood*), которая использует для анализа наборы выровненных последовательностей в формате *Phylip 4.0* (Bevan et al., 2005). Как уже отмечалось ранее, этот формат данных имеет ограничение, связанное с длиной имени таксона: длина имени не может быть больше, чем 10 символов. Пересохранить файлы с выровненными последовательностями ДНК из формата *FASTA* в формат *phylip 4.0* можно в программе **BioEdit**. Запуск программы в консольном режиме осуществляется двойным кликом указателя мыши на исполняемый файл программы. Вначале работы необходимо ввести имя файла с последовательностями и его путь хранения. Если программа **PhyML** лежит в одной папке с файлом последовательностей, то полный путь к файлу задавать не нужно. Далее появится меню задания параметров филогенетического анализа (рис. 6.14), которое представляет собой ряд строк.

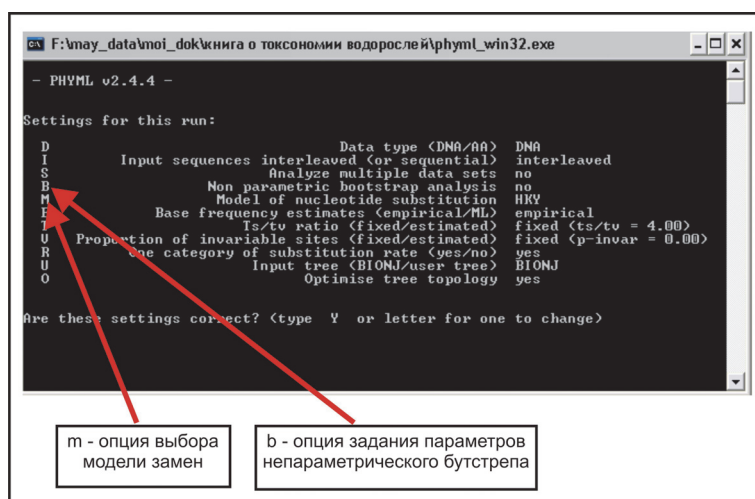


Рис. 6.14. Консольное окно выбора параметров филогенетического анализа в программе **PhyML**.

Каждая строка начинается с определенной буквы, после которой идет описание параметра филогенетического анализа. Если необходимо изменить или задать параметр, то вам необходимо нажать соответствующую букву на клавиатуре и далее «Enter». Например, чтобы выбрать определенную модель нуклеотидных замен, подобранную для наших данных с помощью программы **jModelTest**, нужно последовательно нажимать клавишу «M» для выбора необходимой

модели. После того как все опции были установлены, для запуска вычислений необходимо нажать клавишу «Y» («Yes») и затем клавишу «Enter». После окончания расчетов филогенетическое дерево будет сохранено на диске в директории с исполняемым файлом в текстовом формате.

Для визуализации филогенетического дерева, так же как и в предыдущем случае можно использовать программу **FigTree** или возможности, предоставляемые пакетом **APE** языка программирования **R**. Процедура визуализации средствами языка программирования **R** будет следующая:

1) после считывания с диска с помощью функции *read.tree* информация о филогенетическом дереве будет храниться в переменной *tree*. В качестве одного из внутренних содержимых переменной *tree* выступают названия таксонов или исходных последовательностей набора данных. Обратиться к этому внутреннему содержимому можно как *tree\$tip.label* – это вектор, содержащий имена таксонов. Среди этих имен будет иметься имя последовательности, выбранной в качестве внешней группы (корня дерева). Для того, чтобы узнать номер этого имени в векторе *tree\$tip.label*, можно воспользоваться функцией *match*. Для этого необходимо задать переменную *str_name_out*= "name_out", хранящую имя таксона внешней группы и вызвать функцию *match*:

```
out<-match(str_name_out,fit$tip.label),
```

где переменная *out* будет хранить номер внешней группы в филогенетическом дереве.

2) Затем дерево можно укоренить с помощью функции *root*:

```
rooted_tree<-root(tree,out)
```

Полностью скрипт для визуализации филогенетического дерева будет выглядеть следующим образом:

```
library(ape)
library(devEMF)
str_tree="C:\\Rrab\\data\\18S_tree_ml.txt"
tree<-read.tree(file=str_tree)
str_name_out="Trebouxia"
out=match(str_name_out,fit$tip.label)
rooted_tree<-root(tree,out)
str_plot="C:\\Rrab\\data\\18S_tree_ml.emf"
emf(str_plot,width = 12, height = 7)
plot(rooted_tree, edge.width=3)
add.scale.bar(lwd = 3)
dev.off()
```

На основе данных из **GenBank** нами было реконструировано и визуализировано филогенетическое дерево по маркерам 18S рДНК и *rbcL* видов, представленных в таблице 6.1 (*Chloro-dataset*), методом *ML*. При

филогенетической кластеризации для расчета линейаризированных генетических дистанций была использована модель *GTR* с гамма-коррекцией. Эта модель была выбрана на основе результатов тестирования набора данных *Chloro-dataset* в программе **jModelTest**. Филогенетическое дерево, реконструированное на основе маркера 18S рДНК с помощью метода *ML*, представлено на рис. 6.15. Сравнивая филогенетические деревья для маркера 18S рДНК, реконструированные методом *NJ* (рис. 6.12) и методом *ML* (рис. 6.15), можно сделать вывод, что последний метод дает картину кластеризации, сопоставимую с современным представлением о систематике данной группы зеленых водорослей. При использовании дискретного метода *ML*, в отличие от дистанционного метода *NJ*, полифилии семейств 3 и 2 не наблюдается.

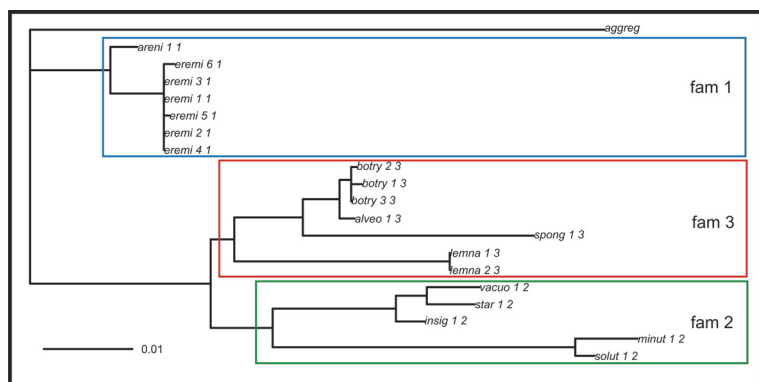


Рис. 6.15. Филогенетическое дерево, реконструированное на основе маркера 18S рДНК методом *ML*.

Филогенетическое дерево, реконструированное на основе маркера *rbcL* методом *ML*, представлено на рис. 6.16.

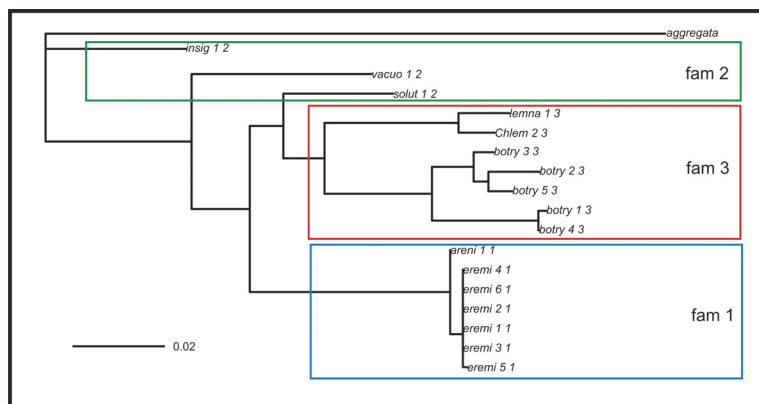


Рис. 6.16. Филогенетическое дерево, реконструированное на основе пластидного маркера *rbcL* методом *ML*.

Так же как и при использовании дистанционного метода (см. рис. 6.13) для маркера *rbcL* наблюдается полифилия по происхождению семейств 2 и 3. Возможные причины подобной ситуации рассматривались выше.

6.3.3. Статистическая оценка результатов кластеризации

После построения филогенетического дерева с помощью любого метода идет этап оценки надежности или статистической достоверности полученной реконструкции. Существует два метода оценки достоверности топологии филогенетического дерева. Первый метод это непараметрический бутстрэп-анализ (*bootstrap analysis*) (Hedges, 1992). И второй метод – это метод байесовского оценивания (Cummings et al 2003). Оба метода позволяют провести приблизительную оценку вероятностей узлов ветвления (*P-value*) на филогенетическом дереве. Опираясь на оцененное значение *P-value* можно сделать соответствующие выводы о достоверности топологии филогенетического дерева, построенного на ограниченном наборе данных. Обычно *P-value*, рассчитанные с помощью бутстрэп-метода, называться бутстрэпными вероятностями (**BP**), а **P-value**, рассчитанные методом байесовского оценивания, называются апостериорными вероятностями (**PP**). Вычислительные затраты, необходимые для расчета **BP**, обычно намного ниже чем для расчета **PP**.

Считается, что непараметрический бутстрэп-анализ, рассчитывающий бутстрэпные вероятности (**BP**), является более грубым методом по сравнению с байесовским оцениванием апостериорных вероятностей (**PP**) (Cummings et al., 2003). В большом количестве случаев расчетные значения **BP** смещены в сторону уменьшения по сравнению с **PP** (Cummings et al., 2003). Это означает, что если наблюдаемые значения **BP** для узла на дереве, на основе которого делаются какие-либо выводы о топологии ветвления, близки к пределу 0.9, то подобным выводам можно доверять. Если на основе узла необходимо сделать какой-либо вывод о топологии ветвления на дереве, а **BP** для этого узла мала, то можно оценить **PP** (возможно значение этой вероятности будет достаточным для формулировки точных выводов).

Непараметрический бутстрэп-анализ основан на повторных выборках. Данный метод применим как к дистанционным методам филогенетических реконструкций, так и к методу *ML*. Суть метода заключается в том, что в выровненном наборе данных выбирается *N* случайных столбцов с возвратом, где *N* – длина последовательностей в выровненном наборе данных. Из этих *N* столбцов формируется новый набор последовательностей, где имена таксонов соответствуют именам таксонов в первоначальном наборе. Данную процедуру необходимо повторить большое количество раз, сформировав несколько наборов последовательностей. Каждый новый набор называется бутстрэп-

повтором или репликой. Для каждой из бутстрэп-реплик необходимо провести филогенетический анализ с получением финального филогенетического дерева. Затем следует сравнить исходное филогенетическое дерево, построенное по первоначальному набору данных, с филогенетическими деревьями, построенными на основании бутстрэп-реплик. Для каждого узла в исходном филогенетическом дереве можно оценить его представленность в филогенетических деревьях, построенных на основе бутстрэп-реплик. Количество раз, при которых данный узел ветвления был повторен в деревьях-репликах, служит статистической характеристикой встречаемости (надежности) узла на филогенетическом дереве. Отношение встречаемости узла ветвления к количеству бутстрэп-реплик дает оценочное значение бутстрэпных вероятностей (**BP**).

Точная оценка **BP** для филогенетического дерева может быть получена при бесконечно большом количестве бутстрэп-реплик. Расчеты показывают, что при 200 бутстрэп-репликах относительная ошибка определения **BP** может составлять 9%, при 1000 бутстрэп-реплик – 4%, а при 2000 бутстрэп-реплик – 1-2%. Обычно достаточным считается бутстрэп-анализ из 1000 реплик.

Реконструкция филогенетического дерева с **BP** для узлов ветвления является более сложной задачей для языка **R** и пакета **APE** по сравнению с обычной филогенией. Для проведения бутстрэп-анализа с помощью дистанционного метода филогении – метода объединения ближайших соседей (*NJ*) необходима следующая последовательность действий:

1) *str_pas* = "C:\\Rrab\\data\\18S.fas"

переменная *str_pas* будет хранить строку, содержащую полное имя файла с данными о расшифрованных последовательностях ДНК в *FASTA* формате. В данном случае файл *18S.fas* хранит информацию о последовательностях маркера 18S рДНК. Разделителем вложенных директорий выступает символ двойной слеш \\\.

2) считывание набора данных с диска с помощью функции *read.dna*:
pas < *_read.dna(str_pas, format = "fasta")*

функция *read.dna* считывает с диска набор последовательностей и сохраняет их в переменной *pas*. Первый аргумент функции *read.dna* - это строка с именем файла и второй аргумент *format* задает формат файла, из которого мы производим чтение данных.

3) задание функции для проведения филогенетического анализа. Для задания функции необходимо определить название функции (пусть в нашем случае название будет состоять из одной буквы *f*). Затем с помощью оператора *function* задаются аргументы функции. Тело самой функции – набор операторов далее идет в фигурных скобках {}:

```
f<-function(pas)
{
```

```

d<-dist.dna(pas, "K80", gamma = FALSE)
tree<-nj(d)
rooted_tree<-root(tree,nrow(pas))
return (rooted_tree)
}

```

В этой функции: *function(pas)* указывает на то, что мы имеем дело с функцией, в качестве аргумента которой выступает набор последовательностей ДНК; *d<-dist.dna (pas, "K80", gamma = FALSE)* – расчет матрицы генетических дистанций; *tree<-nj(d)* – расчет филогенетического дерева на основе матрицы генетических дистанций методом *NJ*; *rooted_tree<-root(tree,nrow(pas))* – укоренение филогенетического дерева; *return (rooted_tree)* – возвращение филогенетического дерева в качестве результата работы функции.

4) Построение филогенетического дерева с помощью функции *f*:

```
tree<-f(pas)
```

5) Задание количества бутстрэп-реплик:

```
nr=1000
```

6) Расчет частот встречаемости для узлов ветвления на дереве с помощью функции *boot.phylo*:

```
bp<-boot.phylo(tree, pas, f, B=nr)
```

В качестве аргументов для функции *boot.phylo* выступают *tree* – переменная, содержащая исходное филогенетическое дерево, для которого рассчитываются бутстрэп-поддержки; *pas* – исходный набор расшифрованных последовательностей ДНК; *f* – функция, на основе которой производится филогенетический анализ; *B* – количество бутстрэп-реплик.

7) Расчет **BP** для узлов ветвления на основе частот встречаемости:

```
bp=bp/nr
```

8) Добавление значений **BP** в переменную *tree*:

```
tree$node.label=bp
```

9) Определение полного имени файла для сохранения результатов филогенетического анализа:

```
str_tree="C:\\Rrab\\data\\I8S_nj_boot.txt"
```

10) Запись филогенетического дерева на диск в текстовом формате

```
write.tree(tree, file=str_tree)
```

Полностью скрипт построения филогенетического дерева с **BP** дистанционным методом *NJ* выглядит следующим образом:

```

library(ape)
str_pas="C:\\Rrab\\data\\I8S.fas"
pas<-read.dna(str_pas, format = "fasta")
f<-function(pas)
{
  d<-dist.dna(pas,mod)

```

```

tree<-nj(d)
rooted_tree<-root(tree,nrow(pas))
return (rooted_tree)
}
tree<-f(pas)
nr=1000
bp<-boot.phylo(tree, pas, f, B=nr)
bp=bp/nr
fit$node.label=bp
str_tree="C:\\Rrab\\data\\18S_nj_boot.txt"
write.tree(tree, file=str_tree_text)

```

При использовании метода *ML* функция непараметрического бутстрэпа реализована в программе **PhyML**. Для анализа необходимо нажать клавишу «*B*» и «*Enter*» (рис. 6.14). В меню будет выведена надпись «*Number of replicates*» (количество реплик), далее следует ввести количество реплик для проведения бутстрэп-анализа, например 1000, и нажать «*Enter*». После чего в меню на экране появится вопрос «*Print bootstrap trees (and statistics)? (Y/N)*» (записать на диск филогенетические деревья для бутстрэп-реплик?). Если вы нажмете «*Y*» и «*Enter*», деревья будут записаны. В итоге после расчетов в рабочей папке будет записан файл, содержащий филогенетическое дерево в текстовом формате с частотами встречаемости для узлов ветвления. Визуализировать филогенетические деревья с частотами встречаемости для узлов ветвления можно с помощью программы **FigTree**, либо с помощью средств языка программирования **R** и пакета **APE**. Приведенные выше скрипты для визуализации филогенетических деревьев нужно немного изменить, добавив функцию *nodelabels* – отображения **BP** в следующем виде:

```

nodelabels(tree$node.label,adj = c(1,0))

```

в этой функции первый аргумент *fit\$node.label* – частоты встречаемости узлов ветвления либо **BP**; *adj = c(1,0)* – параметр, указывающий на то, что на рисунке бутстрэпные поддержки должны быть смещены немного влево относительно узлов ветвления.

Если мы визуализируем филогенетическое дерево, построенное методом *ML*, с бутстрэп-поддержками, то частоты встречаемости узлов ветвления можно конвертирования в **BP**. Это позволит упростить восприятие рисунка при анализе. Конвертация проводится следующим образом:

```

nr=1000
tree$node.label=strtoi(tree$node.label)/nr

```

сначала мы задаем количество бутстрэп-реплик, используемых в ходе анализа – *nr*, затем пересчитываем частоты встречаемости узлов ветвления в **BP** с помощью оператора *strtoi(fit\$node.label)/nr*, функция

strtoi конвертирует строковый вектор, в котором цифры записаны в виде строк, в числовой.

Полностью скрипт для визуализации филогенетического дерева с **BP** для узлов ветвления, построенного методом *NJ*, будет выглядеть следующим образом:

```
library(ape)
library(devEMF)
str_tree="C:\\Rrab\\data\\18S_nj_boot.txt"
tree<-read.tree(file=str_tree)
str_plot="C:\\Rrab\\data\\18S_tree.emf"
emf(str_plot,width = 12, height = 7)
plot(tree, edge.width=3)
nodelabels(tree$node.label,adj = c(1,0))
add.scale.bar(lwd = 3)
dev.off()
```

Скрипт для визуализации филогенетического дерева с **BP** для узлов ветвления, построенного методом *ML*, будет выглядеть следующим образом:

```
library(ape)
library(devEMF)
str_tree="C:\\Rrab\\data\\18S_ml_boot.txt"
tree<-read.tree(file=str_tree)
str_name_out="Trebouxia"
out=match(str_name_out,fit$tip.label)
rooted_tree<-root(tree,out)
str_plot="C:\\Rrab\\data\\18S_tree.emf"
emf(str_plot,width = 12, height = 7)
plot(tree, edge.width=3)
nr=1000
tree$node.label=strtoi(fit$node.label)/nr
nodelabels(tree$node.label,adj = c(1,0))
add.scale.bar(lwd = 3)
dev.off()
```

Филогенетическое дерево, реконструированное на основе маркера 18S рДНК с помощью дистанционного метода *NJ* и **BP** для узлов ветвления в тестовом наборе данных зеленых водорослей, представлено на рис. 6.17, а с помощью дискретного метода *ML* - на рис. 6.18, для пластидного гена *rbcL* - на рис. 6.19 и 6.20, соответственно. Анализ **BP** узлов ветвления для филогенетических деревьев 18S рДНК (рис. 6.17, 6.18) показывает, что в области узлов, разделяющих семейства 2 и 3 наблюдаются достаточно низкие значения (от 0.334 до 0.651). В случае если мы высказываем гипотезу о том, что данный порядок ветвления

наблюдался на самом деле, гипотеза может быть принята при ее вероятностной поддержке больше, чем 0.9.

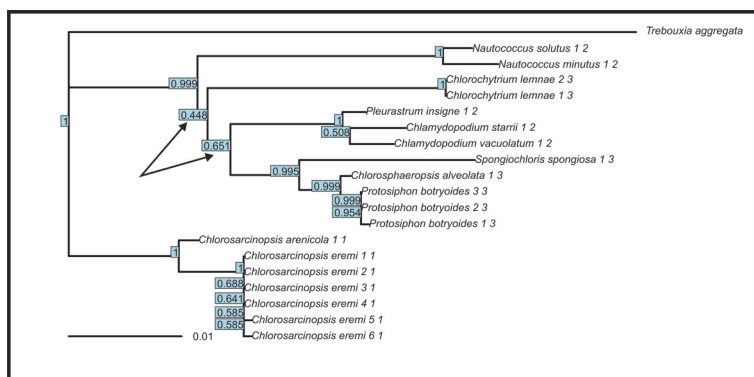


Рис. 6.17. Филогенетическое дерево, реконструированное на основе маркера 18S рДНК с помощью дистанционного метода *NJ* с **BP** для узлов ветвления.

Примечание. Стрелками показаны вероятности для узлов разделяющих семейства 2 и 3.

Таким образом, данная гипотеза не может быть принята ни в случае *ML*, ни *NJ*. Если сравнить длины ветвей, которые разделяют узлы ветвления, то они являются достаточно короткими, т.е. данные участки деревьев содержат слабый филогенетический сигнал. Другими словами, накопленных в течение некоторого времени после дивергенции от общего предка замен недостаточно, чтобы разделить эти филогенетические линии на отдельные кластеры.

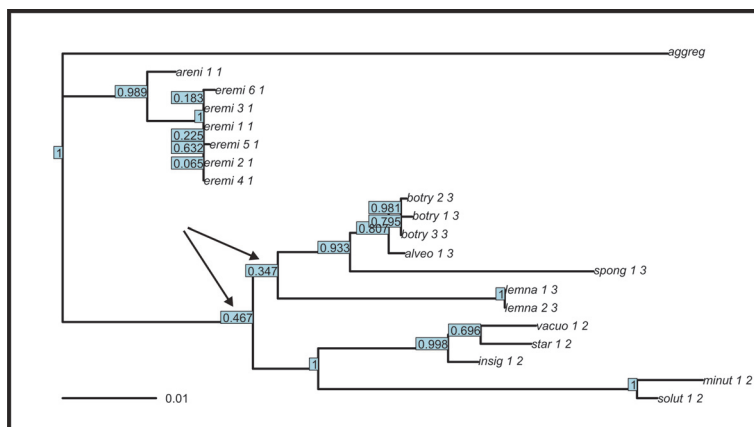


Рис. 6.18. Филогенетическое дерево, реконструированное на основе маркера 18S рДНК с помощью дискретного метода *ML* с **BP** для узлов ветвления.

Примечание. Стрелками показаны вероятности для узлов разделяющих семейства 2 и 3.

При филогенетической реконструкции взаимосвязей выбранных таксонов зеленых водорослей по пластидному гену *rbcL* наблюдается аналогичная картина, что и для ядерного гена 18S рДНК, а именно, низкие вероятности узлов, разделяющих семейства 2 и 3 (рис. 6.19, 6.20).

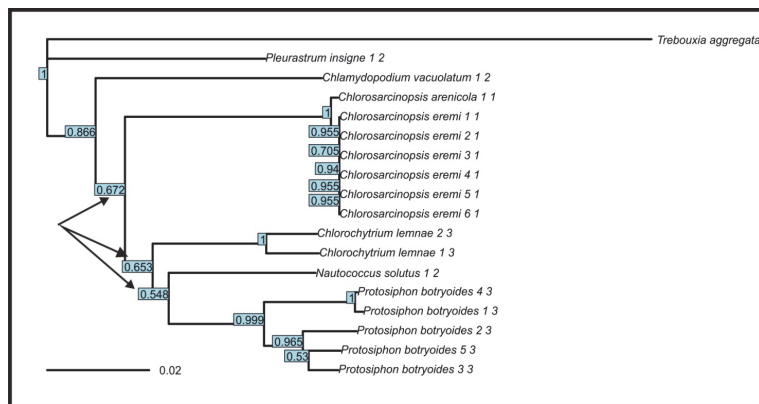


Рис. 6.19. Филогенетическое дерево, реконструированное на основе маркера *rbcL* с помощью дистанционного метода *NJ* с **BP** для узлов ветвления.

Примечание. Стрелками показаны вероятности для узлов разделяющих семейства 2 и 3.

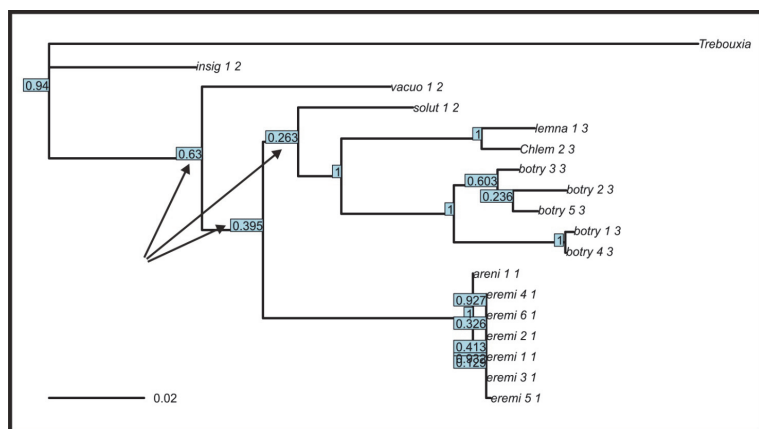


Рис. 6.20. Филогенетическое дерево, реконструированное на основе маркера *rbcL* с помощью дискретного метода *ML* с **BP** для узлов ветвления. Примечание. Стрелками показаны вероятности для узлов разделяющих семейства 2 и 3.

Байесовский подход в молекулярной филогенетике, реализованный в программе **MrBayes** (ссылка в Прил. 5), позволяет, как непосредственно реконструировать филогенетические деревья со статистическими

поддержками в виде апостериорных вероятностей (PP), так и рассчитывать PP для заранее заданной топологии ветвления, рассчитанной дистанционным методом *NJ* или дискретным методом *ML*. Ввиду достаточно сложных теоретических основ, заложенных в методику байесовского оценивания при филогенетических реконструкциях, мы остановимся только на прикладных аспектах применения программы **MrBayes** для байесовской филогении. Для осуществления филогенетического анализа программа **MrBayes** требует выровненные последовательности ДНК, сохраненные в формате *NEXUS*. Конвертировать последовательности из формата *FASTA* в формат *NEXUS* можно с помощью онлайн-конвертора **FABOX** (ссылка в прил. 5). Интерфейсное окно онлайн-сервера для конвертации форматов представлено на рис. 6.21.

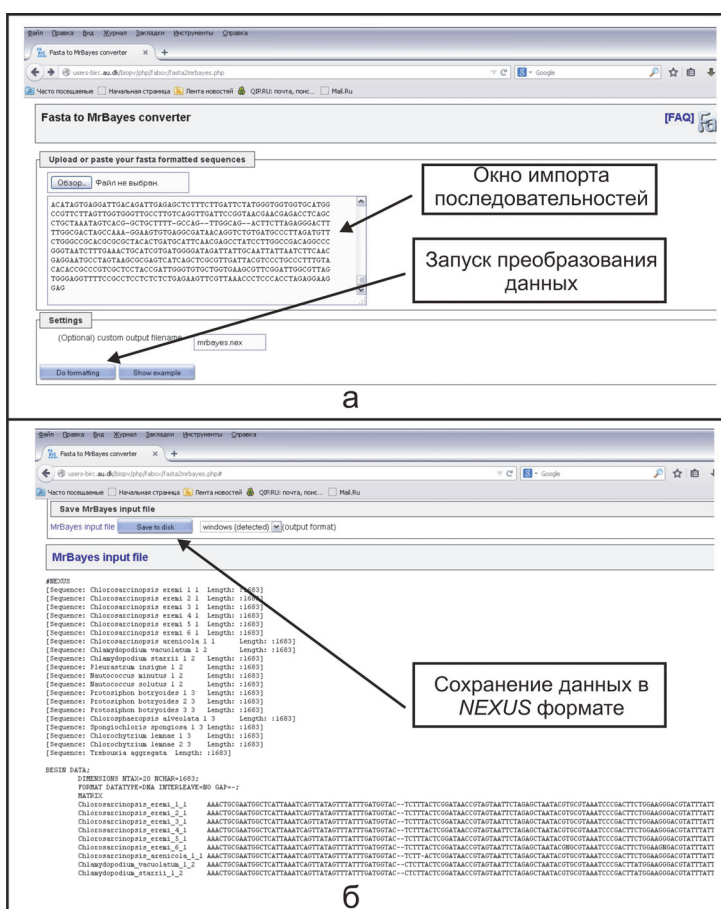


Рис. 6.21. Окно онлайн-сервера для конвертации последовательности из формата *FASTA* в формат *NEXUS*.

Примечание. а – страница для импорта последовательностей, б – страница с результатом преобразования *FASTA* в *NEXUS*.

После того как вы получили файл с последовательностями в *NEXUS* формате, можно открывать и редактировать этот файл в программе блокнот. Данный файл должен содержать блок для задания параметров при расчете филогенетического дерева с помощью байесовского метода. Блок для задания параметров выглядит следующим образом:

```
begin mrbayes;  
  lset nst=2 rates=gamma;  
  mcmc stoprule=yes stopval=0.003 ngen=50000000 samplefreq=1000  
  file=.18S.mb;  
  sumt contype=Allcompat;  
end;
```

В блоке, заключенном между командами «*begin mrbayes;*» и «*end;*» задаются параметры модели расчета генетических дистанций и параметры марковских цепей для симуляции филогенетических деревьев.

Строка, начинающаяся со слова *lset*, задает модель замен. *nst=2* означает, что для расчетов применяется модель *K80* или *HKY* (*nst=6* – модель *GTR*, *nst=1* – модель *JC96* и *F81*). *rates=gamma* указывает на применение гамма-коррекции.

Строка, начинающаяся со слова *mcmc*, задает параметры для марковских цепей. Параметр *stoprule=yes* задает правило для остановки расчетов при заданном значении параметра сходимости *stopval=0.003*. Значение 0.003 сообщает о том, что расчет будет прекращен при значении параметра сходимости равного 0.003. Считается, что расчет можно прекратить при значении параметра сходимости меньше, чем 0.01. *ngen=50000000* задает количество марковских цепей для генерации деревьев. *samplefreq=1000* означает, что для построения консенсусного дерева на диск будет сохраняться каждое тысячное сгенерированное дерево. Опция *file=.18S.mb* задает мнемоническую маску для сохранения результатов расчетов.

sumt contype=Allcompat задает правило для построения консенсусного дерева. В данном случае нам будет выдано дихотомическое дерево и рассчитанные статистические поддержки в виде апостериорных вероятностей для всех узлов на дереве.

Для запуска расчетов необходимо запустить программу **MrBayes** двойным щелчком мыши на исполняемый файл *mrbayes.exe*. После чего на экране появиться консольное окно с приглашением для введения команд:

MrBayes >

В командной строке необходимо ввести команду *execute 18S.nex*:

MrBayes > execute 18S.nex

Команда *execute* загружает в память файл с последовательностями *18S.nex* и использует его блок *begin mrbayes; end;* как инструкции для расчетов филогенетического дерева. Файл с последовательностями

18S.nex должен находиться в папке с программой. После окончания расчетов в папке с программой **MrBayes** появится файл *18S.mb.con.tre*, в котором будет сохранено филогенетическое дерево в *NEXUS* формате. Визуализировать филогенетическое дерево можно с помощью программы **FigTree**. Интерфейс программы с визуализированным деревом, реконструированным на основе 18S рДНК *Chloro-dataset*, представлен на рис. 6.22.

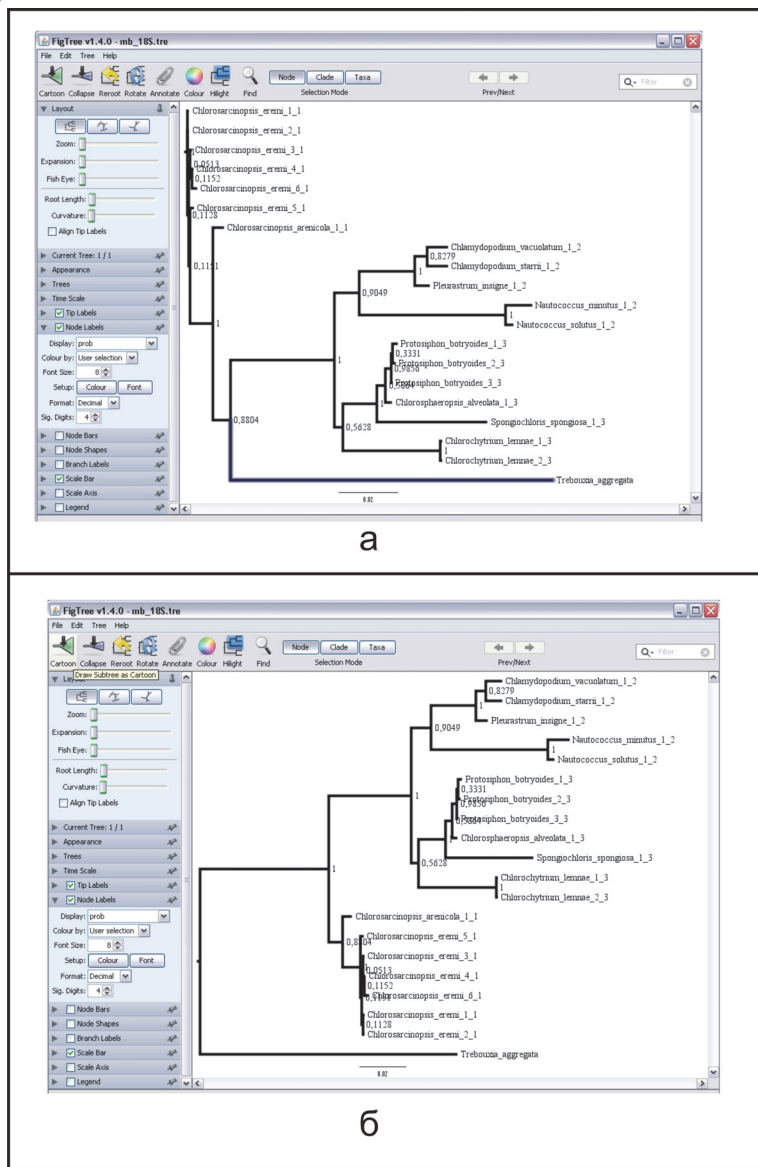


Рис. 6.22. Визуализация филогенетического дерева, реконструированного байесовским методом с помощью программы **FigTree**.

Примечание. *а* – неукорененное филогенетическое дерево,
б – укорененное филогенетическое дерево.

Программа **FigTree** позволяет не только визуализировать филогенетические деревья, но и укоренять их. Для укоренения дерева необходимо с помощью мыши выделить филогенетическую линию, которая будет новым корнем дерева, и выбрать в меню кнопку «*Reroot*».

Кроме **PP** узла ветвления, байесовский метод позволяет оценить 95% доверительный интервал для генетической дистанции узла ветвления. Визуализировать 95% доверительный интервал можно с помощью программы **FigTree**, поставив галочку в левом контекстном меню в поле *Node Bars*. При расчете апостериорных вероятностей (**PP**) для филогенетических деревьев, построенных другими методами, для программы **MrBayes** кроме выровненных последовательностей потребуется топология оцениваемого филогенетического дерева в текстовом формате. Для этого необходимо взять филогенетическое дерево в текстовом формате и удалить из него информацию о длине ветвей.

Пример топологии дерева в текстовом формате:
 (((((((((AB360749,M62996),U63106),AB049415),(((HE860252,HE860251),((JN968585,((U70794,AY122332),((JN968580,JN968584),U41176),Z28972)),(M84319,M63001))),U70586)),(AB360751,KC589697))),((JN968582,U70587)),(U18503,((((HE687020,HE860249),HE860250),7_18S),((HQ830203,(HQ830204,JF343794)),((AB218702,AB218703),DQ009758)),AB218695))),U63107,(AB218708,((JN086489,(JN086488,JN086487)),((JN880459,JN880457),JN880460))))),AB218701,(AB218704,(AB218706,((((HQ246314,HQ246315),HQ246312),HQ246313),HQ246316))))),FR865585,GQ122365)),EU123942,Z21553);

После того как топология в текстовом формате получена, ее можно использовать в качестве пользовательского дерева для программы **MrBayes**. Текст блока задания параметров в *NEXUS* файле будет выглядеть следующим образом:

```
lset nst=6 rates=gamma;
usertree = (((AB360749,M62996),U63106),AB049415);
mcmc startingtree=user ngen=4000000 samplefreq=1000 file=uc_main.mb;
sump burnin=1000;
sumt;
```

При расчетах необходимо выбрать ту модель накопления замен, которая использовалась при реконструкции филогенетического дерева. После завершения расчетов в качестве результата будет выдано филогенетическое дерево с той же топологией ветвления, что и пользовательское дерево с рассчитанными значениями **PP** для узлов ветвления. В последнее время, в связи с быстрым ростом производительности персональных ЭВМ и упрощением доступа к супер ЭВМ, многие исследователи, занимающиеся филогенетическими реконструкциями на основе расшифрованных последовательностей ДНК,

при проведении анализа топологий рассчитывают как бутстрэпные вероятности (BP) так и апостериорные вероятности (PP) для реконструированных филогенетических деревьев.

6.3.4 Комплексные программы для филогенетического анализа

Все описанные выше программы являются специализированными, т.е. решают одну задачу. Например, **FigTree** визуализирует филогенетическое дерево, **PhyML** реализует метод *ML* и т.д. В этом плане свободная программная среда **R** отличается огромным спектром возможностей для филогенетического анализа и графического представления его результатов. Тем не менее, начинающих исследователей из-за простоты использования могут больше привлекать комплексные программы для филогенетического анализа с графическим интерфейсом. Существует достаточно обширный ряд таких программ, позволяющих реконструировать филогенетические деревья на основе расшифрованных последовательностей ДНК. Например, пакет **PAUP**, пакет **Mesquite**, пакет **MEGA** (Tamura et al., 2013), программа **SeaView** (Gouy et al., 2010). Остановимся подробнее на последней (ссылка в Прил. 5). Одним из преимуществ программы **SeaView**, кроме простоты использования, является наличие версий под наиболее распространенные операционные системы, такие как **Windows**, **Linux** и **MacOS**. Для работы программы **SeaView** потребуются файлы с выровненными последовательностями ДНК в формате *FASTA*. Графический интерфейс программы **SeaView** представлен на рис. 6.23.

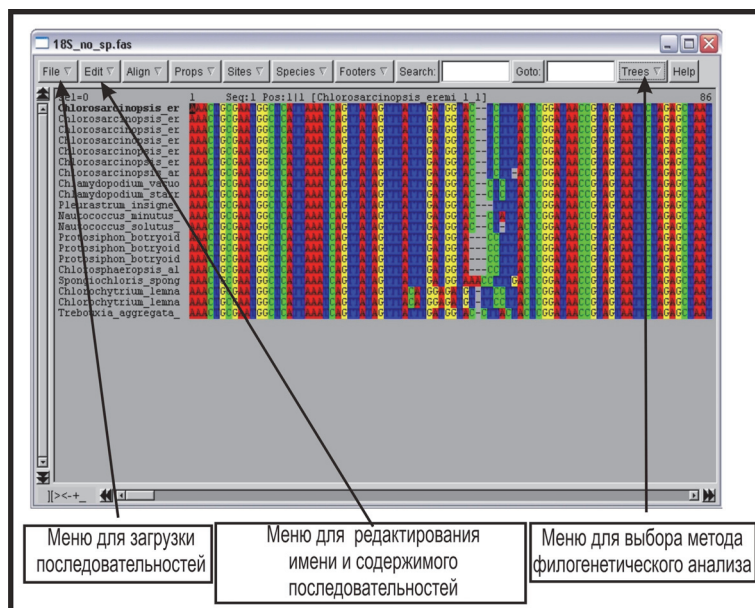


Рис. 6.23. Графический интерфейс программы **SeaView** (Version 4.5.3).

Главное меню программы содержит следующие пункты: *File* - для загрузки последовательностей, *Edit* - для редактирования имен последовательностей и самих последовательностей, *Trees* - пункт меню для проведения филогенетического анализа и др. С помощью программы **SeaView** можно реконструировать филогенетическое дерево дистанционным методом *NJ*. Для расчета генетических расстояний при этом доступны модели *JC69*, *K80*, *HKY*. Как видно, спектр моделей для расчета генетических дистанций при дистанционном методе кластеризации в программе **SeaView** существенно уступает спектру моделей пакета **APE** для языка программирования **R**. Гамма-коррекция генетических дистанций в **SeaView** при дистанционном филогенетическом анализе не предусмотрена.

Кроме того, программа **SeaView** позволяет проводить филогенетическую кластеризацию последовательностей методом *ML*. Для этого программа использует встроенный модуль на основе программы **PhyML**. Все возможные опции и модели расчета генетических дистанций аналогичны тем, что предоставляет оригинальная версия программы **PhyML**, описанная в разделе 6.3.2. Так же, как и большинство других комплексных пакетов для филогенетического анализа, **SeaView** позволяет оценивать достоверность топологии филогенетического дерева методом бутстрэпа. Следует заметить, что в отличие от пакета **APE**, программа **SeaView** не воспринимает имена последовательностей с пробелами. При наличии пробелов в имени последовательности в *FASTA*-файле имя будет прочитано до первого пробела. В связи с этим необходимо быть внимательным при редактировании имен последовательностей перед загрузкой их в программу **SeaView**. Преимуществом **SeaView** является наличие базовых возможностей для графической визуализации построенного филогенетического дерева. С помощью встроенных графических средств можно вращать филогенетическое дерево относительно узлов ветвления и выбирать один из узлов для укоренения дерева. Программа позволяет сохранять филогенетическое дерево в стандартном текстовом формате или в виде векторного рисунка в формате *SVG*.

6.4 Интерпретация результатов филогенетического анализа при идентификации зеленых водорослей

При идентификации организмов с помощью молекулярно-филогенетического анализа необходимо тщательно контролировать каждый этап:

1. Первичная обработка и визуальный контроль расшифрованных последовательностей ДНК. При получении трейс-файла после секвенирования стоит обратить внимание на качество расшифрованной

последовательности: без посторонних сигналов, большая длина прочтения, пики примерно одинаковой высоты.

2. Поиск в генетической базе данных **GenBank** ближайших гомологов исследуемых последовательностей ДНК (см. главу 4.3). Если сходство с какой-то из представленных последовательностей составляет 100%, то можно делать выводы о принадлежности исследуемого организма конкретному виду, при условии, что таксономической идентификации депонированной последовательности можно доверять. Если последовательностей со 100%-ным сходством нет, то для филогенетического анализа необходимо составить набор данных из максимально близких нуклеотидных последовательностей выбранного маркера (ядерного, пластидного, митохондриального). В эту же выборку необходимо добавить последовательность внешней группы.

3. Множественное выравнивание. Обязательный учет вторичной структуры последовательности (если она имеется); проверка на наличие интронов в гене.

4. Подбор модели нуклеотидных замен, правильно описывающей динамику нуклеотидных замен в тестируемом наборе данных.

5. Построение филогенетического дерева и интерпретация результатов филогенетического анализа. На первом этапе филогенетических реконструкций необходимо выбрать модель расчета генетических дистанций, и реконструировать филогенетическое дерево дистанционным методом *NJ* с бутстрэп-анализом топологии в виде бутстрэпных вероятностей (**BP**). После реконструкции необходимо произвести визуальный анализ топологии ветвления полученного филогенетического дерева. Неизвестный таксон будет входить в одну из нескольких клад на филогенетическом дереве. Кладу необходимо выбрать так, чтобы неизвестный таксон оказался внутри нее. Возможные варианты расположения неизвестного таксона приведены на рисунке 6.24. В указанном примере минимальное количество таксонов в кладе, для которой неизвестный таксон будет внутренним содержимым, равно трем (рис 6.24, *а*). В общем случае количество таксонов в кладе, для которой неизвестный таксон будет внутренним, может быть большим (рис 6.24, *б*). Анализируемая клад, в простейшем случае, будет содержать только один известный входящий таксон до неизвестного таксона (таксон *s12* на рис. 6.24, *а* и таксон *s13* на рис. 6.24, *б*). После этого, необходимо оценить бутстрэпную вероятность (**BP**) для этой выбранной клад. Если **BP** ≤ 0.7 то анализ клад не даст достоверных результатов относительно таксономической принадлежности анализируемого таксона. Необходимо включить в кладу еще один входящий таксон и оценить **BP** для вновь полученной клад. Повторять включение в кладу входящих таксонов необходимо до тех пор, пока значение **BP** для клад не станет >0.7 .

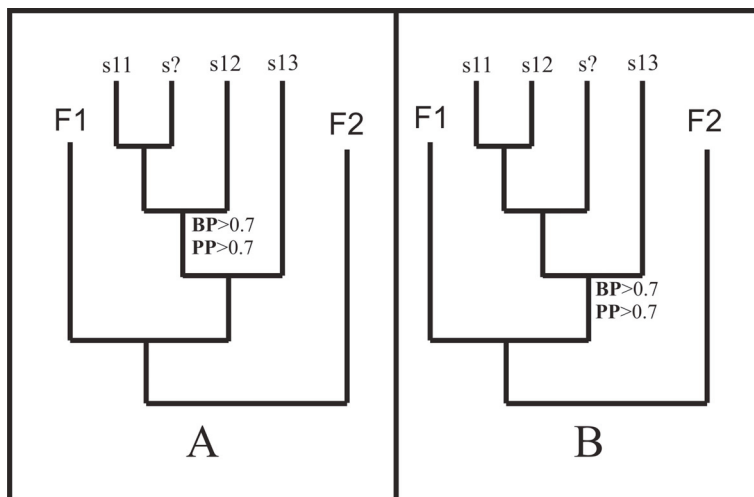


Рис. 6.24. Возможные варианты топологии филогенетического дерева с неизвестным таксоном.

Примечание. s_{11} , s_{12} , s_{13} – представители клады с известным таксономическим статусом, s_{12} – неизвестный таксон.

BP и **PP** – бутстрэпные и апостериорные вероятности для клады с s_{12}

F1 и F2 - остальное содержимое филогенетического дерева.

После того как клада для анализа таксономической принадлежности была выбрана с помощью вышеуказанных манипуляций, необходимо оценить таксономический состав данной клады на филогенетическом дереве. Если все таксоны в кладе принадлежат одному виду, то и неизвестный таксон принадлежит этому же виду. Если все таксоны в кладе принадлежат одному роду, то и неизвестный таксон принадлежит этому же роду водорослей. Если все таксоны в кладе принадлежат одному семейству, то и неизвестный таксон принадлежит этому же семейству водорослей. Остальные рассуждения относительно принадлежности таксонам более высокого порядка можно проводить аналогично.

При идентификации неизвестного таксона могут возникнуть проблемы, связанные с низкими значениями **BP** для анализируемых клад на дереве. Решить проблему низких значений **BP** можно путем построения дерева, используя вместо дистанционного метода *NJ* более сложный метода максимального правдоподобия *ML* с бутстрэп-анализом **BP**. При использовании метода *ML* топология может измениться, но при этом значения **BP** могут увеличиться таким образом, что позволят определить неизвестный таксон до более низкого ранга. Другим способом увеличения разрешающей частоты анализа является использования байесовского метода для филогенетических реконструкций и расчет апостериорных вероятностей (**PP**). Если использование разных методов филогенетического анализа не приводит к появлению разрешенной

картины для неизвестного таксона (на дереве нет клады с **BP** или **PP** >0.7 в которую попадает неизвестный таксон), то необходимо вернуться обратно к базе данных **GenBank**. С помощью поиска в приложении BLAST найти и добавить в набор еще несколько последовательностей менее сходных с исследуемой, для которой не определен таксономический статус. Таким образом, при филогенетическом анализе необходимо начинать исследование с более простых дистанционных методов и переходить к более сложным – дискретным, если простые методы не позволяют идентифицировать организм.

Литература

1. Шипунов А.Б., Балдин Е.М., Волкова П.А. и др. Наглядная статистика. Используем R! М.: ДМК Пресс, 2012. 298 с.
2. Bevan R.B., Lang B.F., Bryant D. Calculating the evolutionary rates of different genes: A fast, accurate estimator with applications to maximum likelihood phylogenetic analysis // Systematic Biology. 2005. V. 54 (6). P. 900–915.
3. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // Nature Methods. 2012. 9(8). P. 772.
4. Di Tommaso P., Moretti S., Xenarios I. et al. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension // Nucleic Acids Res. 2011. 39. P. W13-7.
5. Gouy M., Guindon S., Gascuel O. (2010) SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building // Molecular Biology and Evolution. 2010. 27(2). P. 221-224.
6. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl.Acids. Symp. Ser.1999. 41. P. 95-98.
7. Huelsenbeck J. P., Ronquist F., Nielsen R., Bollback J.P. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology // Science. 2001. 294. P. 2310-2314.
8. Jukes T.H., Cantor C.R. Evolution of protein molecules. In: Munro H.N. (ed.) "Mammalian Protein Metabolism. New York: «Academic Press», 1969. P. 21-123.
9. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J Mol. Evol. 1980. 16. P. 111-120.
10. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P. et al. ClustalW and ClustalX version 2. // Bioinformatics. 2007. 23(21). P. 2947-2948.
11. Li W-H. Molecular Evolution. Sinauer Associates, Inc., Publiahers, 1997. 487 p.

12. Paradis E., Claude J., Strimmer K. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language // *Bioinformatics*. 2004. 20. P. 289-290.
13. Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. // *Molecular Biology and Evolution*. 2013. 30. P. 2725-2729.
14. Tom H. «Bio Edit» Sequence Alignment Editor. Version 5.0.9. [Electronic resource] // Department of Microbiology [Official website]. North Carolina State Univ. 2001. URL: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> (accessed: 12.10.2014).
15. Wilm A., Higgins D.G., Notredame C. R-Coffee: a method for multiple alignment of non-coding RNA // *Nucleic Acids Res.* 2008. 36(9). P. e52.
16. Hedges S. B. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies // *Mol. Biol. Evol.* 1992. 9(2). P. 366-369.
17. Cummings M.P., Handley S.A., Myers D.S., Reed D.L., Rokas, A., Winka K. Comparing bootstrap and posterior probability values in the four-taxon case // *Systematic Biology*. 2003. 52(4). – P. 477-487.

Глава 7. Разделение видов с помощью ITS2-маркера: СВС-подход (А.Д. Темралева)

Молекулярно-филогенетический анализ обеспечивает большую объективность для построения классификационной системы органического мира. Самым распространенным подходом в разделении видов зеленых водорослей является дистанционный, который использует пороговые значения внутривидовых и межвидовых различий в ядерном гене 18S рРНК. Некоторые исследователи считают, что различия в нем более чем на 1% свидетельствует о различных видах. Этот подход подвергался критике (Nielsen, Matz, 2006; Rubinoﬀ et al., 2006), так как уровни внутри- и межвидовой дивергенции зависят от времени и скорости накопления замен в нуклеотидной последовательности. Например, при исследовании штаммов зеленой водоросли рода *Dunaliella*, изолированных из водных и наземных гипергалинных экосистем, было показано, что наземные изоляты имеют значимо более высокие темпы накопления нуклеотидных замен, чем водные (Buchheim et al., 2010). В данной главе описан другой подход к разграничению видов, основанный на оценке сходства вторичной структуры ITS2 по наличию общих мотивов небольшой протяженности и по присутствию диагностических признаков (мутаций) в определенных консервативных позициях. Охарактеризована структура и функции данного молекулярного маркера, основные отличительные признаки для зеленых водорослей. Обсуждается связь СВС-концепции и биологической концепция вида. Приведены примеры работы с программным обеспечением при использовании вторичной структуры ITS2 в молекулярно-филогенетических исследованиях.

7.1 ITS2: структура и функции

Второй внутренний транскрибируемый спейсер (ITS2) является быстро эволюционирующей частью ядерного оперона и широко используется для филогенетических реконструкций на уровне вида и рода (Álvarez and Wendel, 2003; Müller et al., 2007; Coleman, 2003, 2009). Схема организации ядерного оперона представлена на рис. 7.1.



Рис. 7.1. Схема организации ядерного оперона зеленых водорослей.

Примечание. 18S, 5.8S и 28S – ядерные гены; ITS1 и ITS2 – внутренние транскрибируемые спейсеры 1 и 2.

ITS2 играет важную роль в процессинге пре-рРНК (Coleman, 2009): чтобы получить зрелую функциональную молекулу рРНК, оперон транскрибируется как предшественник рРНК с последующим сложным

процессом удаления обоих ITS (Pöll et al., 2009; Thomson, Tollervey, 2010; Zakrzewska-Placzek, 2010). ITS2 является многокопийным (его копияность равна копияности генов рРНК), что позволяет его легко амплифицировать с помощью универсальных праймеров (White et al., 1990). Кроме того, он фланкирован консервативными участками 5.8S рДНК с одной стороны и 28S рДНК с другой, что облегчает создание специфичных праймеров (Шнеер, 2009). По эффективности амплификации у зеленых водорослей ITS2 предпочтительнее *rbcL* (Buchheim et al., 2011). Однако к его недостаткам можно отнести высокую вариабельность длины и инделей, а, следовательно, и сложность в выравнивании и поиске гомологичных позиций (Feliner, Rosseló, 2007; Poczaí, Nyvöñen, 2010). Это ограничение может быть преодолено, если анализировать не первичную, а вторичную структуру ITS2 (An et al., 1999; Buchheim et al., 2011). Данные о вторичной структуре ITS облегчают выравнивание дивергентных последовательностей, поскольку позволяют определять участки, формирующие гомологичные стебли. Правильная вторичная структура способствует его точному вырезанию ферментами во время процессинга рРНК. Этот процесс требует определенных мотивов во вторичной структуре, которые, по-видимому, консервативны для большинства эукариот. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ITS у разных видов позволяет выявить эти консервативные участки, которые, вероятно, имеют функциональное значение в биогенезе рРНК.

ITS2 у зеленых водорослей (Chlorophyta) имеет длину 128-483 основания (Buchheim et al., 2011). Для большинства зеленых водорослей отличительными признаками вторичной структуры ITS2 являются (Mai, Coleman, 1997; Schultz et al., 2005; Coleman, 2007):

1. четыре неразветвленные шпильки (стебель-петля);
2. пиримидин-пиримидиновое несовпадение (*mismatch*) – неспаренный участок U-U, U-C, C-C во 2-й шпильке;
3. 3-я шпилька самая длинная и содержит мотив 5' GGUAGG 3' на вершукше (или GGUAGA, AGUAGG).

Тем не менее, встречаются исключения в структуре ITS2, например, у зеленых водорослей родов *Scenedesmus* и *Hydrodictyon* 1-я шпилька разветвлена (Hegewald, Wolf 2003; Keller et al., 2008). На рис. 7.2 представлены предсказанные с помощью программы 4SALE вторичные структуры ITS2 у зеленых водорослей классов Trebouxiophyceae и Chlorophyceae: *Gloeotila scopulina* и *Chlamydocapsa ampla*, соответственно.

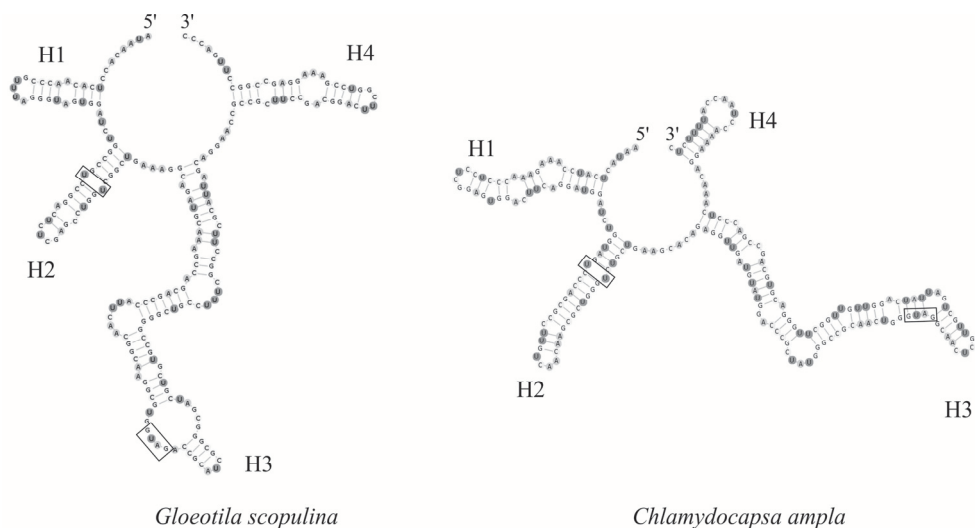


Рис. 7.2. Вторичные структуры ITS2 зеленых водорослей.

Примечание. Неспаренный участок U-U во 2-й шпильке (H2) и мотив **GUAG** в 3-й шпильке (H3) выделены боксами.

7.2 CBC-концепция и биологическая концепция вида

Несмотря на то, что ITS2 является быстро эволюционирующим молекулярным маркером в отличие от консервативного гена 18S рРНК, использование дистанционного подхода для разделения видов зеленых водорослей требует установления порога межвидовых различий. Для применения второго подхода, связанного с поиском общих мотивов и мутаций в консервативных регионах ITS2, необходима хорошо проработанная концепция, апробированная на большом экспериментальном материале. Такую концепцию в своих исследованиях предложила А. Coleman (2000, 2003, 2007, 2009). Оказалось, что различия во вторичной структуре ITS2 зеленых водорослей могут быть индикатором возможности успешного скрещивания: «если имелась хотя бы одна компенсаторная замена в относительно консервативных участках вторичной структуры ITS2, то таксоны были неспособны к скрещиванию» (Coleman, Vacquier, 2002). А наличие репродуктивной изоляции и неспособность к скрещиванию являются критериями биологического вида (Mayr, 1982).

Таким образом, выявлено, что наличие хотя бы 1 компенсаторной замены (CBC) в консервативных регионах ITS2 (2 и 3 шпильки) у двух организмов коррелирует с их полной половой несовместимостью (Coleman, 2009). Напротив, замена в менее консервативных регионах (1 и 4 шпильки), а также полукомпенсаторная замена (*hCBC*) в консервативных регионах не были связаны со способностью скрещиваться. Компенсаторная замена нуклеотидов происходит, если

замена нуклеотида на одной стороне шпильки нарушает правило комплементарности, что приводит к компенсации – замене нуклеотида с другой стороны. Например, $G-C \rightarrow C-G$. Если замена нуклеотида не нарушает правило комплементарности, то происходит полукompенсаторная замена – $hCBC$. Например, $G-U \rightarrow G-C$. При анализе компенсаторных замен в качестве консервативных регионов были предложены участки в 10 пар нуклеотидов для 2-й шпильки ($H2$) и 18 пар – для 3-й шпильки ($H3$) (Coleman, 2007). Позднее А. Coleman (2009) рекомендовала учитывать 30 пар оснований 5'-конца 3-й шпильки. Некоторые авторы предлагают использовать для разделения видов всю последовательность ITS2 (Müller с соавт., 2007).

А. Coleman (2000) определила группы организмов без CBC в консервативных участках ITS2 ($H2$ и $H3$) как CBC -клада, которая отличается от другой CBC -клады как минимум на 1 компенсаторную замену. При наличии хотя бы 1 компенсаторной замены в высоко консервативных частях ITS2, совместимость гамет полностью утрачивается, вследствие параллельных эволюционных изменений в генах, контролирующих спаривание (Swanson, Vacquier, 2002; Namaji et al., 2008). А группы организмов, продуцирующие совместимые гаметы, которые могут формировать зиготу, были названы Z -клады (Coleman, 2000). Схема, иллюстрирующая взаимоотношения CBC - и Z -клад представлена на рис. 7.3.

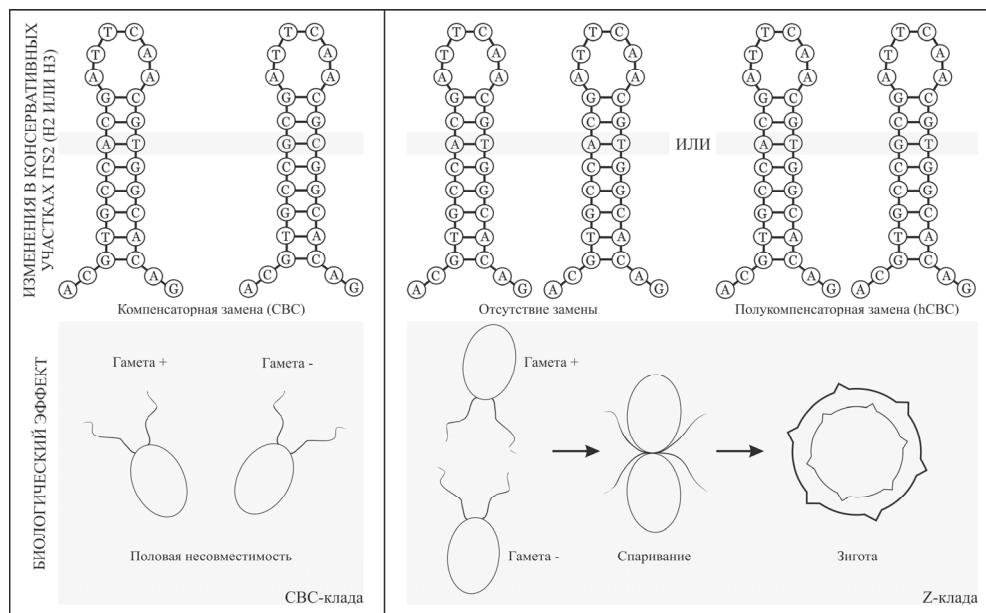


Рис. 7.3. Схема, отображающая корреляцию между наличием CBC и половой несовместимостью у зеленых водорослей.

Ни *CBC*-клада, ни *Z*-клада не являются в полной мере эквивалентом биологического вида, т.к. из зиготы может не развиваться плоидное потомство, вследствие существования постзиготических изолирующих механизмов, проявляющихся в гибридной нежизнеспособности или стерильности зигот. В целом, *CBC*-клада может содержать 1 или больше *Z*-клад, которая в свою очередь может содержать 1 или более биологических видов. Кроме того, *CBC*-критерий работает только в одном направлении, т.е. отсутствие *CBC* во вторичной структуре ITS2 не свидетельствует о том, что 2 организма принадлежат одному виду. На основе мета-анализа большого числа данных Müller с соавт. (2007) установили, что наличие даже 1 *CBC* в 93% исследованных случаев, по крайней мере, для растений и грибов, указывает на их принадлежность к разным видам. Этими же авторами показано, что отсутствие *CBC* между 2 таксонами свидетельствует, что только в 77% случаев они принадлежат одному виду. Так как наличие/отсутствие *CBC* во вторичной структуре ITS2 сильно коррелирует с отдельными биологическими видами, авторы предложили использовать этот критерий как молекулярный индикатор для разделения минимального количества отдельных видов в метагеномных анализах. *CBC*-критерий может быть успешно использован для разграничения видов зеленых водорослей, размножающихся бесполым путем. Так как компенсаторная замена – редкое эволюционное событие (Coleman, 2003), то *CBC* является скорее мерой истекшего эволюционного времени, показывающее, что прошло достаточно времени для событий видообразования, а не необходимым условием. Ожидаемое количество *CBC* зависит от степени дивергенции, длины последовательности и скорости замен на участок. Несмотря на то, что существуют сотни тандемных копий генов рРНК в эукариотическом геноме, ранее считалось, что ITS2 может успешно использоваться у гаплоидов, но не гибридов, диплоидов и полиплоидов (Buckler et al., 1997). Однако последние исследования ITS2 в качестве ДНК-штрихкода растений показали, что опасения по поводу его гетерогенности завышены (Chen et al., 2010; Yao et al., 2010).

В целом для разграничения таксонов зеленых водорослей с помощью вторичной структуры ITS2 необходимо использовать данные об общей структуре спейсера, суммарном количестве нуклеотидов, количестве шпилей и нуклеотидов в них, наличии компенсаторных и полукompенсаторных замен в целом и в каждой шпильке в отдельности, а также в консервативных мотивах. Приведем примеры успешного использования *CBC*-критерия для разграничения видов зеленых водорослей, размножающихся половым и(ли) бесполым путем. При ревизии зеленых водорослей рода *Chloromonas* Matsuzaki с соавт. (2013) описали новый вид рода – *C. kasaiae*. По морфологии он был близок к *C. reticulata* и *C. serbinowii*, но отличался по ультраструктуре стигмы и


молекулярным данным. Авторы отметили, что именно *CBC*-критерий, а не мультигенный анализ, разделил все исследованные виды. Krienitz с соавт. (2011) показали, что морфологическое различие между родами *Mychonastes* и *Pseudodictyosphaerium*, основанное на свободноживущем и колониальном образе жизни, не подтверждается молекулярными данными и, следовательно, не может применяться в качестве диакритического признака. Используя сравнение вторичной структуры ITS2 и поиск компенсаторных замен, авторы разделили 8 новых видов рода *Mychonastes*, пять из которых различаются по морфологическим характеристикам (форма и размер слизистых тяжей, форма колоний, размер и количество клеток в колониях). И только для 3-х видов (*M. homosphaera*, *M. pusillus*, *M. rotundus*) пока не найдено морфологических разграничивающих признаков. Bock с соавт. (2011) на основе филогенетического анализа гена 18S рРНК, наличия компенсаторных замен в ITS2 и морфологии описали новый род зеленых водорослей – *Mucidosphaerium*, представленный 4-мя новыми видами (*M. sphagnale*, *M. pulchellum*, *M. palustre*, *M. planctonicum*). Ma с коллегами (2013) на основе наличия 1 *CBC* в третьей шпильке ITS2 разделили 2 вида *Heveochlorella*: *H. hainangensis* и *H. roystonensis*. Для оценки разнообразия внутри клады морфологически сходных, но генетически отличных зеленых микроводорослей рода *Pseudomuriella*, Fucíková с соавт. (2011) использовали *CBC*-критерий и обнаружили 2 компенсаторные замены в консервативных участках ITS2, разделяющих виды *Pseudomuriella aurantiaca* и *P. cubensis*; 1 *CBC*, разделяющую *P. cubensis*, *P. schumacherensis* и *P. engadinensis*, а между *P. aurantiaca* и *P. engadinensis* компенсаторных замен в спаренных консервативных регионах не было обнаружено. Подобный результат получили чешские альгологи при работе с родом *Asterochloris*: из 7 видов рода только у 3-х (*A. italiana*, *A. magna* и *A. excentrica*) во вторичной структуре ITS имелись компенсаторные замены. Тем не менее, используя первичные структуры ITS и последовательность гена, кодирующего актин, авторам удалось разделить все виды (Škaloud, Peksa, 2010).

7.3 Программное обеспечение для предсказания вторичной структуры ITS2 и поиска *CBC*

Для использования молекулярного маркера ITS2 для таксономической идентификации зеленых водорослей можно использовать следующий алгоритм действий с разработанным программным обеспечением (Schultz, Wolf, 2009):

1. Предсказание вторичной структуры ITS2

ITS2 DataBase (см. главу 4.3) позволяет выполнить поиск вторичной структуры среди имеющихся, а при отсутствии предсказать ее, смоделировать структуру в соответствии с выбранным шаблоном,



THE RNA INSTITUTE
 COLLEGE OF ARTS AND SCIENCES
UNIVERSITY AT ALBANY State University of New York

The mfold Web Server

Home

DINAMelt Application

Mfold Application

Forum

Applications

- [RNA Folding Form](#)
- [DNA Folding Form](#)
- [Structure Display and Free Energy Determination](#)
- [RNA Folding Form \(version 2.3 energies\)](#)

View Folding Results

- [Folding Results](#)

Documentation

- [Mfold References](#)
- [FAQs](#)
- [Folding & output options](#)
- [Folding with constraints](#)

Software

RNA Folding Form

M. Zuker
 Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.
 Nucleic Acids Res. 31 (13), 3408-15, (2003)
[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[Supplementary Material\]](#) [\[Additional Information\]](#)

The folding temperature is fixed at 37°. You may still fold with the older version 2.3 RNA parameters, which allow the temperature to be varied.
[DNA mfold server](#) [Quikfold](#). Fold many short RNA or DNA sequences at once.

Enter sequence name:

Enter the sequence to be folded in the box below. All non-alphabet characters will be removed.
 FASTA format may be used.

```

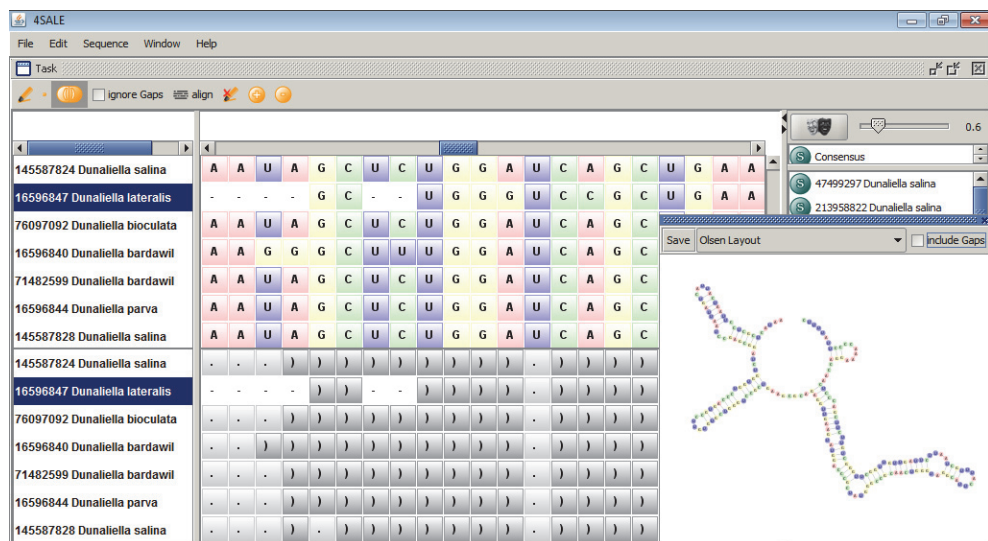
10      20      30      40      50
AAUACUCGCGU CCUUAUACU UACUGAUUAA UCCAGAGCGA UCUGGUGGUC
60      70      80      90      100
CCAGUGUCUUT GUUUGUGGG UCCGCGUAGG CCGAGAGGUT GAGUAUGAGA
110     120     130     140     150
CCGCUAUGG GCGCAACUG GUUAGGACU CAUUGUCUAA UCUUUGAUU
160     170     180     190     200
UUCGUGGAGG CUGUUGUUGG AGCUUAGAG AGUAAAGAG CUGUUGUUGG

```

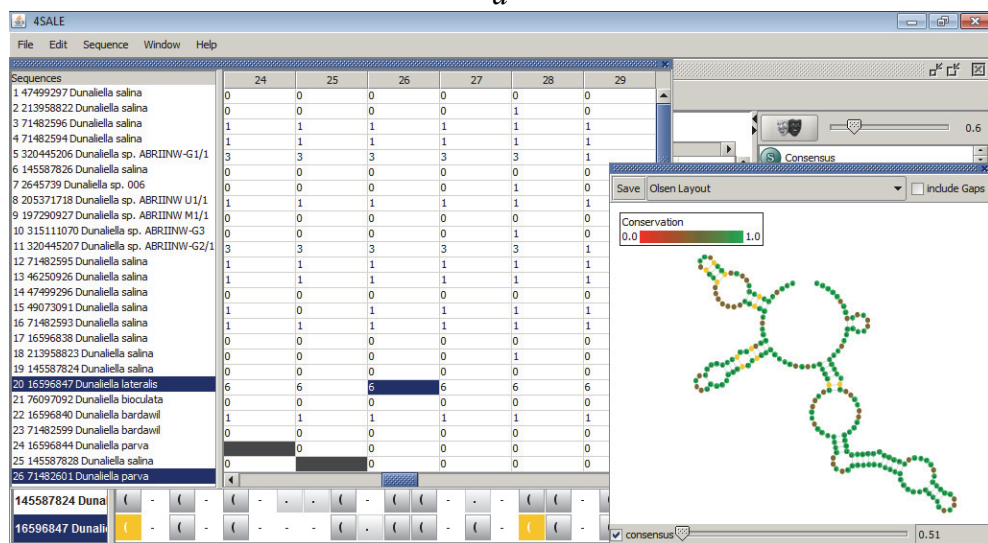
2. Множественное выравнивание с учетом вторичной структуры ITS2

3. Поиск СВС

181



a



б

Рис. 7.5. Интерфейсное окно в программе 4SALE.

Примечание. *a* - выровненные последовательности ITS2 некоторых видов рода *Dunaliella* с учетом вторичной структуры. В правом нижнем углу визуализирована вторичная структура ITS2 *Dunaliella lateralis* (GI 16596847).

б – таблица *CBC* в ITS2 некоторых видов рода *Dunaliella*. В правом нижнем углу визуализирована консенсусная вторичная структура ITS2 *Dunaliella lateralis* (GI 16596847) и *Dunaliella parva* (GI 71482601). Желтым цветом обозначены *CBC*.

В заключение отметим, что, несмотря на успешность и распространенность *CBC*-подхода в последние годы, стоит обратить внимание на некоторые трудности и неоднозначность интерпретации данного критерия. Во-первых, в работе Caisová с соавт. (2011) показано,

что фенетический (= визуальный) способ определения типа замен и сравнения нуклеотидных последовательностей *H2* и *H3* ITS2 может дать ошибочную информацию. Например, замена $A-U \rightarrow G-U$ может рассматриваться как полукомпенсаторная, т.к. произошла замена одного нуклеотида, а, следовательно, одно эволюционное событие. Однако таких событий могло быть два: $A-U \rightarrow G-C$ (*CBC*) $\rightarrow G-U$ (*hCBC*). Во-вторых, в той же работе было продемонстрировано, что для зеленых водорослей порядка Ulvales (Ulvophyceae, Chlorophyta) наличие даже 1 *CBC* не связано ни с одним из таксономических уровней (Caisová et al., 2011). В-третьих, согласно исследованию Müller с соавт. (2007) только в 93% исследованных случаев наличие хотя бы 1 *CBC* (для растений и грибов) указывало на их принадлежность к разным видам, и только в 77% случаев отсутствие *CBC* между двумя таксонами свидетельствовало, что они принадлежат одному виду. Другими словами, данный критерий не абсолютный, и всегда есть риск оказаться в 7% и 23% случаев, когда это правило не работает.

Таким образом, таксономическая идентификация и установление филогенетических отношений зеленых водорослей является краеугольным камнем альгологии как фундаментальной науки, так и ее прикладных аспектов. Согласно современным представлениям из-за отсутствия однозначного и абсолютного критерия вида для оценки биоразнообразия зеленых водорослей необходимо использовать полифазный подход, учитывающий морфологические, ультраструктурные, биохимические, физиологические, экологические и молекулярные данные. Использование последних на практике бывает ограничено отсутствием или неполнотой информации о типичных представителях зеленых водорослей в генетических базах данных. Тем не менее, применение не только дистанционного подхода, но и *CBC*-критерия может увеличить объективность выделения и описания новых таксонов, а также позволит создать реалистичную и естественную классификационную систему зеленых водорослей.

Литература

1. Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование – новое направление в сравнительной геномике растений // Генетика. 2009. Т. 45. № 11. С. 1436–1448.
2. Álvarez I., Wendel J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Mol. Phylogenet. Evol. 2003. Vol. 29. Iss. 3. P. 417–434.
3. An S.S., Friedel T., Hegewald E. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparsion // Plant Biol. 1999. V. 1. Iss. 4. P. 418–428.

4. Bock C., Proschöld T., Krienitz L. Updating the genus *Dictyosphaerium* and description of *Mucidosphaerium* gen. nov. (Trebouxiophyceae) based on morphological and molecular data // J. Phycology. 2011. V. 47. Iss. 3. P. 638–652.

5. Buchheim M.A., Keller A., Koetschan C. et al. Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: towards an automated reconstruction of the green algal tree of life // PLoS One. 2011. V. 6. Iss. 2. P. e16931.

6. Buchheim M.A., Kirkwood A.E., Buchheim J.A. et al. Hypersaline soil supports a diverse community of *Dunaliella* (Chlorophyceae) // J. Phycology. 2010. V. 46. Iss. 5. P. 1038–1047.

7. Buckler E.S., Ippolito A., Holtsford T.P. The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications // Genetics. 1997. V. 145. Iss. 3. P. 821–832.

8. Caisová L., Marin B., Melkonian M. A close-up view on ITS2 evolution and speciation – a case study in the Ulvophyceae (Chlorophyta, Viridiplantae) // BMC Evolutionary Biology. 2011. V. 11. Iss. 1. P. 262.

9. Chen S., Yao H., Han J. et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species // PLoS ONE. 2010. V. 5. P. e8613.

10. Coleman A.W. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure // Nucleic Acids Res. 2007. V. 35. Iss. 10. P. 3322–3329.

11. Coleman A.W. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide // Mol. Phyl. Evol. 2009. V. 50. Iss. 1. P. 197–203.

12. Coleman A.W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons // Trends Genet. 2003. V. 19. Iss. 7. P. 370–375.

13. Coleman A.W. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence // Protist 2000. V. 151. Iss. 1. P. 1–9.

14. Coleman A.W., Vacquier V.D. Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: A test case for abalone (*Haliotis*) // J. Mol. Evol. 2002. V. 54. Iss. 2. P. 246–257.

15. Feliner G.N., Rosseló J.A. Better the devil to know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants // Mol. Phyl. Evol. 2007. V. 44. Iss. 2. P. 911–919.

16. Fuciková K., Rada J.S., Lukesová A., Lewis L.A. Cryptic diversity within the genus *Pseudomuriella* Hanagata (Chlorophyta, Chlorophyceae, Sphaeropleales) assessed using four barcode markers // Nova Hedwigia. B. 93. H. 1-2. 2011. P. 29–46.

17. Hamaji T., Ferris P.J., Coleman A.W. et al. Identification of the minus-dominance gene ortholog in the mating-type locus of *Gonium pectoral* // Genetics. 2008. V. 178. Iss. 1. P. 283–294.

18. Hegewald E., Wolf M. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Acutodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae) as inferred from 18S rDNA and ITS-2 sequence comparisons // Plant Syst. Evol. 2003. V. 241. Iss. 3-4. P. 185–191.

19. Keller A., Schleicher T., Förster F. et al. ITS2 data corroborate a monophyletic chlorophycean DO-group (Sphaeropleales) // BMC Evol Biol 2008. 8. P. 218.

20. Koetschan C., Förster F., Keller A. et al. The ITS2 Database III – sequences and structures for phylogeny. Nucleic Acids Res. 2010. V. 38. Sp. sect. p 1. P. D275-D279.

21. Krienitz L., Bock C., Dadheech P.K., Proschöld T. Taxonomic reassessment of the genus *Mychonastes* (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species // Phycologia. 2011. V. 50. Iss. 1. P. 89–106.

22. Mai J.C., Coleman A.W. The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants // J. Mol. Evol. 1997. V. 44. Iss. 3. P. 258–271.

23. Matsuzaki R., Nakada T., Hara Y., Nozaki H. Description of *Chloromonas kasaiae* sp. nov. (Volvocales, Chlorophyceae), based on comparative electron microscopy and molecular data // Phycologia. 2013. V. 52. Iss. 3. P. 239–245.

24. Mayr E. The growth of biological thought. Harvard University Press, Cambridge, MA. 1982. 992 p.

25. Müller T., Philippi N., Dandekar T. et al. Distinguishing species // RNA. 2007. V. 13. № 9. P. 1469–1472.

26. Nielsen R., Matz M. Statistical approaches for DNA barcoding // Syst. Biol. 2006. V. 55. Iss. 1. P. 162–169.

27. Poczai P., Hyvärinen J. 2010. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects // Mol. Biol. Rep. V. 4. № 4. P. 1897–1912.

28. Pöll G., Braun T., Jakovljevic J. et al. rRNA maturation in yeast cells depleted of large ribosomal subunit proteins // PLoS One. 2009. V. 4. Iss. 12. P. e8249.

29. Rubinoff D., Cameron S., Will K. Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail? // Trends Ecol. Evol. 2006. V. 21. Iss. 1. P. 1–2.

30. Schultz J., Maisel S., Gerlach D. et al. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota // RNA. 2005. V. 11. № 4. P. 361–364.

31. Schultz J., Wolf M. ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics: a how-to manual for molecular systematics // Mol. Phylog. Evol. 2009. V. 52. Iss. 2. P. 520–523.

32. Seibel P.N., Müller T., Dandekar T. et al. 4SALE – A tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. BMC Bioinformatics. 2006. V. 7. P. 1. P. 498.
33. Seibel P.N., Müller T., Dandekar T., Wolf M. Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE // BMC Research Notes. 2008. V. 14. № 1. P. 91–97.
34. Škaloud P., Peksa O. Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxioophyceae, Chlorophyta) // Mol. Phylog. Evol. 2010. V. 54. Iss. 1. P. 36–46.
35. Swanson W.J., Vacquier V.D. The rapid evolution of reproductive proteins // Nat. Rev. Genet. 2002. V. 3. № 2. P. 137–144.
36. Thomson E., Tollervey D. The final step in 5.8S rRNA processing is cytoplasmic in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Cell. Biol. 2010. V. 30. Iss. 4. P. 976–984.
37. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR Protocols. San Diego: Acad. Press, 1990. Pt. 3. P. 315–322.
38. Yao H., Song J., Liu C. et al. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals // PLoS One. 2010. V. 5. P. e13102.
39. Zakrzewska-Placzek M., Souret F.F., Sobczyk G.J et al. *Arabidopsis thaliana* XRN2 is required for primary cleavage in the pre-ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 2010. V. 38. Iss. 13. P. 4487–4502.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Альгология как наука существует и развивается не одну сотню лет. Тем не менее, считается, что в настоящий момент описано не более половины таксономического разнообразия зеленых водорослей. Интенсификация оценки разнообразия водорослей с целью мониторинга и индикации природных сред, выявления новых таксонов перспективных в биотехнологическом плане, установление свойств штаммов в аспекте биобезопасности бросает вызов традиционным методам и темпам таксономического определения организмов данной группы. Молекулярно-филогенетические методы видовой диагностики зеленых водорослей прочно заняли свои позиции в современной науке, т.к. их признаки многочисленны, легко формализуемы и удобны для лабораторной работы. Усовершенствование, упрощение и удешевление методов и подходов молекулярной биологии открывают новые горизонты перед учеными, позволяя решать как массовые рядовые задачи экспресс-идентификации организмов, так и проблемы филогенетики, молекулярной систематики и эволюции конкретных таксонов. Однако чтобы ДНК-технологии стали именно технологиями, отработанными и повседневными, а таксономическая диагностика перешла из области *«slow science»* в разряд быстрого рутинного лабораторного анализа, необходимо массовое использование молекулярно-филогенетических методов специалистами-альгологами. Создание и постоянное пополнение международных генетических баз данных, организация междисциплинарных научных проектов, разработка бесплатного специализированного программного обеспечения для молекулярно-филогенетического анализа, проведение тематических мероприятий (конференций, совещаний, школ, курсов и др.) создает дружественную атмосферу для применения этих методов. Мы надеемся, что данная монография также внесет свою скромную лепту в этот процесс и будет особенно полезна начинающим исследователям.

От лица всех авторов
А.Д. Темралеева

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Рецепты приготовления сред для культивирования зеленых водорослей

Общие правила приготовления сред для культивирования водорослей:

1. Используйте химические реактивы высокой степени очистки (хч, чда) и только дистиллированную воду (dH_2O).
2. В работе удобно приготовить стоковые растворы отдельных компонентов среды объемом 100, 200 или 400 мл, которые хранятся в холодильнике, а их аликвоты применять для приготовления рабочих растворов.
3. Если в среде отсутствует буфер (*HEPES*, *MES*), то pH регулируют путем добавления 1М HCl или NaOH.
4. Для приготовления 1 л агаризованных сред обычно используют от 5 до 20 г агара (0.5-2%).
5. Стандартный режим автоклавирования сред объемом до 0.5 л и 5 л: 121°C (1 атм.) в течение 15-20 и 35-40 мин., соответственно.

Протокол 1. Приготовление модифицированной среды BG-11

(используется для большинства зеленых водорослей)

Для приготовления 1 л жидкой среды:

1. добавить первые 9 компонентов среды в указанном порядке (табл. 1) к 900 мл dH_2O , перемешать,
2. довести общий объем среды dH_2O до 1 л и автоклавировать,
3. остудить среду при комнатной температуре и хранить в холодильнике.

Табл. 1. Компоненты для приготовления среды BG-11

№	Компонент	Количество, мл/л	Стоковая концентрация, г/200 мл dH_2O
1	NaNO ₃	10	30
2	K ₂ HPO ₄	10	0.8
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10	1.5
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	10	0.72
5	Лимонная кислота	10	0.12
6	FeNH ₄ цитрат	10	0.12
7	Na ₂ ЭДТА·2H ₂ O	10	0.02
8	Na ₂ CO ₃	10	0.4
9	Раствор микроэлементов	1	-
10	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O (стерильный, для агаризованной среды)	1	49.8

Для приготовления 1 л 1.5% агаризованной среды:

1. добавить первые 9 компонентов среды объемом по 10 мл в указанном порядке (табл. 1) к 400 мл dH_2O , перемешать,
2. довести общий объем среды dH_2O до 500 мл,
3. в отдельной колбе смешать 15 г агара и 500 мл dH_2O ,
4. автоклавировать оба раствора и охладить на водяной бане до 50°C,
5. добавить стерильный тиосульфат натрия (10 компонент) к раствору агара и хорошо перемешать,
6. объединить агаризованную и жидкую среды и хорошо перемешать,
7. остудить среду при комнатной температуре и хранить в холодильнике.

Для приготовления 1 л раствора микроэлементов:

1. добавить все компоненты в указанном порядке (табл. 2) к 900 мл dH_2O , перемешать,
2. довести общий объем раствора dH_2O до 1 л,
3. хранить в холодильнике.

Табл. 2. Компоненты для приготовления раствора микроэлементов

№	Компонент	Количество, г/л	Стоковая концентрация
1	H_3BO_3	2.86	-
2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.81	-
3	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.22	-
4	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.39	-
5	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.079	-
6	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.0494	-

Протокол 2. Приготовление среды BG-11+1% NaCl

(используется для зеленых водорослей из соленых мест обитаний)

Для приготовления 1 л жидкой среды:

1. приготовить среду BG-11, как описано в протоколе 1,
2. добавить 10 г NaCl, довести общий объем среды dH_2O до 1 л и автоклавировать,
3. остудить среду при комнатной температуре и хранить в холодильнике.

Для приготовления 1 л 1.5% агаризованной среды:

1. приготовить среду BG-11, как описано в протоколе 1 (для агаризованной среды),
2. добавить 10 г NaCl, довести общий объем среды dH_2O до 500 мл,
3. в отдельной колбе смешать 15 г агара и 500 мл dH_2O ,
4. автоклавировать оба раствора и охладить на водяной бане до 50°C,
5. добавить стерильный тиосульфат натрия (10 компонент, табл. 1) к раствору агара и хорошо перемешать,

6. объединить агаризованную и жидкую среды и хорошо перемешать,
7. остудить среду при комнатной температуре и хранить в холодильнике.

Протокол 3. Приготовление модифицированной среды Болда (*Bold INV Medium*)

(используется для большинства зеленых водорослей)

Для приготовления 1 л жидкой среды:

1. добавить первые 7 компонентов среды в указанном порядке (табл. 3) к 900 мл dH_2O , перемешать,

! Для приготовления 1.5% агаризованной среды добавить 15 г агара.

2. довести общий объем среды dH_2O до 1 л,
3. автоклавировать, остудить среду при комнатной температуре,
4. добавить витамины, перемешать и хранить в холодильнике.

Табл. 3. Компоненты для приготовления среды Болда (INV)

№	Компонент	Количество, мл/л	Стоковая концентрация, г/400 мл dH_2O
1	$NaNO_3$	10	10
2	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	10	1
3	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10	3
4	K_2HPO_4	10	3
5	KH_2PO_4	10	7
6	$NaCl$	10	1
7	Раствор микроэлементов	6	-
8	Раствор витамина B_{12}	1	-
9	Раствор биотина	1	-
10	Раствор тиамина	1	-

Для приготовления 1 л раствора микроэлементов:

1. добавить все компоненты в указанном порядке (табл. 4) к 950 мл dH_2O , перемешать,

! Na_2EDTA следует полностью растворить до добавления других компонентов,

2. довести общий объем раствора dH_2O до 1 л,
3. хранить в холодильнике.

Табл. 4. Компоненты для приготовления раствора микроэлементов

№	Компонент	Количество, г/л	Стоковая концентрация
1	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.75	-
2	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.097	-
3	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.041	-
4	ZnCl ₂	0.005	-
5	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.002	-
6	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.004	-

Для приготовления 200 мл раствора витамина В₁₂:

1. приготовить 200 мл HEPES-буфера: растворить 2.4 г HEPES в 200 мл dH₂O, довести pH до 7.8,
2. добавить 0.027 г витамина В₁₂, перемешать,
3. стерилизовать раствор через фильтр с диаметром пор не более 0.45 мкм. Хранить в темноте при -20°C.

Для приготовления 200 мл раствора биотина:

1. приготовить 200 мл HEPES-буфера: растворить 2.4 г HEPES в 200 мл dH₂O, довести pH до 7.8,
2. добавить 0.005 г биотина, перемешать,
3. стерилизовать раствор через фильтр с диаметром пор не более 0.45 мкм. Хранить в темноте при -20°C.

Для приготовления 200 мл раствора тиамина:

1. приготовить 200 мл HEPES-буфера: растворить 2.4 г HEPES в 200 мл dH₂O, довести pH до 7.8,
2. добавить 0.067 г биотина, перемешать,
3. стерилизовать раствор через фильтр с диаметром пор не более 0.45 мкм. Хранить в темноте при -20°C.

Протокол 4. Приготовление модифицированной среды Болда (*Bold 3NV Medium*)

(используется для большинства почвенных зеленых водорослей)

Для приготовления 1 л жидкой среды:

1. добавить первые 8 компонентов среды в указанном порядке (табл. 5) к 850 мл dH₂O, перемешать,
! Для приготовления 1.5% агаризованной среды добавить 15 г агара.
2. довести общий объем среды dH₂O до 1 л,
3. автоклавировать, остудить среду при комнатной температуре,
4. добавить витамин В₁₂, перемешать и хранить в холодильнике.

Табл. 5. Компоненты для приготовления среды Болда (3NV)

№	Компонент	Количество, мл/л	Стоковая концентрация, г/400 мл dH_2O
1	$NaNO_3$	30	10
2	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	10	1
3	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10	3
4	K_2HPO_4	10	3
5	KH_2PO_4	10	7
6	$NaCl$	10	1
7	Раствор микроэлементов	6	
8	Почвенная вытяжка	40	
9	Раствор витамина B_{12}	1	

Для приготовления 1 л раствора микроэлементов:

1. добавить все компоненты в указанном порядке (протокол 2, табл. 4) к 950 мл dH_2O , перемешать,
! Na_2EDTA следует полностью растворить до добавления других компонентов,
2. довести общий объем раствора dH_2O до 1 л,
3. хранить в холодильнике.

Для приготовления 200 мл почвенной вытяжки:

1. высушить воздушно-сухую почву (лучше ту, из которой выделяете водоросли, или садовую) при $150^\circ C$ в течение 2 часов. Охладить, накрыть емкость алюминиевой фольгой и хранить в темном сухом месте при комнатной температуре.
2. добавить к 3 г подготовленной почвы 1 мг $CaCO_3$ (0.05 мМ) и растворить смесь в 200 мл dH_2O ,
! Добавление $CaCO_3$ опционально. При приготовлении более концентрированных культуральных сред необходимо увеличить количество почвы.
3. пастеризовать суспензию при $95^\circ C$ в течение 15 минут. Затем увеличить температуру до $98^\circ C$ и пастеризовать еще 3 часа. Эту процедуру необходимо проводить подряд два дня с промежутками в 24 ч. За это время споры бактерий и грибов, выжившие при $98^\circ C$ прорастают, и вышедшие из них вегетативные клетки погибают при следующем нагревании. Для почв с высокой долей обилия грибов и бактерий (например, лесные почвы) рекомендуется добавить еще 1-2 этапа пастеризации.
4. охладить почвенную вытяжку до комнатной температуры и профильтровать через фильтр «красная лента»,

5. хранить в холодильнике не более 2-х недель, при обнаружении грибного или бактериального присутствия использовать почвенную вытяжку не следует.

Для приготовления 200 мл раствора витамина В₁₂ для среды Болда (3NV):

1. приготовить 200 мл *HEPES*-буфера: растворить 2.4 г *HEPES* в 200 мл *dH₂O*, довести pH до 7.8,
2. добавить 0.027 г витамина В₁₂, перемешать,
3. стерилизовать раствор через фильтр с диаметром пор не более 0.45 мкм. Хранить в темноте при -20°C.

Протокол 5. Приготовление среды Бристоль (*Bristol Medium*)

(используется для большинства зеленых водорослей)

Для приготовления 1 л жидкой среды:

1. добавить все компоненты среды в указанном порядке (табл. 6) к 900 мл *dH₂O*, перемешать,
! Для приготовления 1.5% агаризованной среды добавить 15 г агара.
2. довести общий объем среды *dH₂O* до 1 л,
3. автоклавировать, остудить среду при комнатной температуре, хранить в холодильнике.

Табл. 6. Компоненты для приготовления среды Бристоль (*Bristol*)

№	Компонент	Количество, мл/л	Стоковая концентрация, г/400 мл <i>dH₂O</i>
1	NaNO ₃	10	10
2	CaCl ₂ ·2H ₂ O	10	1
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10	3
4	K ₂ HPO ₄	10	3
5	KH ₂ PO ₄	10	7
6	NaCl	10	1

Протокол 6. Приготовление модифицированной среды Бристоль (*Bristol-NaCl Medium*)

(используется для зеленых водорослей из соленых мест обитаний)

Для приготовления 1 л жидкой среды:

1. добавить все компоненты среды в указанном порядке (табл. 6) к 900 мл *dH₂O*, перемешать,
2. дополнительно добавить в раствор 3.6 г NaCl, перемешать,
! Для приготовления 1.5% агаризованной среды добавить 15 г агара.
3. довести общий объем среды *dH₂O* до 1 л,
4. автоклавировать, остудить среду при комнатной температуре, хранить в холодильнике.

Протокол 7. Приготовление среды *Botryococcus* (*Botryococcus Medium*)

(используется для зеленых водорослей рода *Botryococcus*)

Для приготовления 1 л жидкой среды:

1. приготовить 940 мл среды Бристоль (протокол 5),
2. добавить $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (табл. 7), перемешать,
2. довести общий объем среды $d\text{H}_2\text{O}$ до 1 л,
3. автоклавировать, остудить среду при комнатной температуре, хранить в холодильнике.

Табл. 7. Компоненты для приготовления среды *Botryococcus*

№	Компонент	Количество, мл/л	Стоковая концентрация, г/100 мл $d\text{H}_2\text{O}$
1	Среда Бристоль	940	
2	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1	2

Протокол 8. Приготовление среды с солодовым экстрактом (*Malt Medium*)

(используется для зеленых водорослей рода *Prototheca*)

Для приготовления 0.5 л жидкой среды:

1. добавить 33.6 г солодового экстракта к 500 мл $d\text{H}_2\text{O}$,
! Для приготовления 1.5% агаризованной среды добавить 7.5 г агара.
2. автоклавировать не больше 15 мин., чтобы избежать карамелизации сахаров,
3. остудить при комнатной температуре, хранить в холодильнике.

Протокол 9. Приготовление среды *Polytomella* (*Polytomella Medium*)

(используется для зеленых водорослей родов *Polytoma*, *Polytomella* и *Scenedesmus*)

Для приготовления 1 л жидкой среды:

1. добавить 1 г дрожжевого экстракта, 1 г триптона и 2 г ацетата натрия к 950 мл $d\text{H}_2\text{O}$, тщательно перемешать,
2. довести общий объем среды $d\text{H}_2\text{O}$ до 1 л,
! Для приготовления 1.5% агаризованной среды добавить 15 г агара.
3. автоклавировать, остудить при комнатной температуре, хранить в холодильнике.

Протокол 10. Приготовление среды P49 (*P49 Medium*)

(используется для зеленых водорослей родов *Chlamydomonas* и *Pandorina*)

Для приготовления 1 л жидкой среды:

1. добавить все компоненты среды в указанном порядке (табл. 8) к 900 мл $d\text{H}_2\text{O}$,

- добавить 0.2 г дрожжевого экстракта и 0.4 г триптона, перемешать, довести рН до 7.0,
! Для приготовления 1.5% агаризованной среды добавить 15 г агара.
- довести общий объем среды dH_2O до 1 л,
- автоклавировать, остудить среду при комнатной температуре,
- добавить по 1 мл стерильных растворов витамина В₁₂, биотина и тиаминa,
- перемешать и хранить в холодильнике.

Табл. 8. Компоненты для приготовления среды Р49

№	Компонент	Количество, мл/л	Стоковая концентрация, г/100 мл dH_2O
1	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1	4
2	Глицерофосфат натрия	1	5
3	KCl	1	5
4	Глицилглицин	10	5
5	Раствор микроэлементов	6	
6	NH_4NO_3	10	1
7	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	10	0.74

Приготовление раствора микроэлементов описано в протоколе 3.

Протокол 11. Приготовление среды *Trebouxia* (*Trebouxia Medium*)

(используется для зеленых водорослей родов *Trebouxia*, *Pseudotrebouxia*, *Trentepohlia* и *Cephaleuros*)

Для приготовления 1 л жидкой среды:

- приготовить 1 л среды Бристоль (протокол 5),
- поместить 825 мл среды Бристоль в колбу, добавить 140 мл почвенной вытяжки (протокол 4),
- добавить 10 г протеозопептона и 20 г глюкозы,
- довести общий объем среды до 1 л оставшейся средой Бристоль,
! Для приготовления 1.5% агаризованной среды добавить 15 г агара.
- автоклавировать, остудить среду при комнатной температуре и хранить в холодильнике.

Протокол 12. Приготовление среды для водорослей, изолированных из снега (*Snow Algae Media*)

Для приготовления 1 л жидкой среды:

- добавить все компоненты среды в указанном порядке (табл. 9) к 500 мл dH_2O ,
- довести общий объем среды dH_2O до 1 л, перемешать (рН=5.1-5.3),
! Для приготовления 1.5% агаризованной среды добавить 15 г агара.

3. автоклавировать, охладить среду при комнатной температуре, хранить в холодильнике.

Табл. 9. Компоненты для приготовления среды *Snow Algae Media*

№	Компонент	Количество, мл/л	Стоковая концентрация, г/100 мл dH_2O
1	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1	0.5
2	$NaNO_3$	1	2.5
3	NH_4Cl	1	0.5
4	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	1	0.4
5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1	0.5
6	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	1	0.2
7	Раствор Fe-ЭДТА	250	
8	Раствор микроэлементов	10	
9	K_2HPO_4	2	3.48
10	KH_2PO_4	98	2.72

Для приготовления 1 л раствора Fe-ЭДТА:

1. растворить 0.66 г $Na_2ЭДТА \cdot 2H_2O$ в 700 мл dH_2O , довести pH до 7.5.
2. растворить 0.7 г $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ в 100 мл dH_2O .
3. оба раствора смешать и довести конечный объем до 1 л dH_2O .

Для приготовления 1 л раствора микроэлементов:

1. добавить все компоненты среды в указанном порядке (табл. 10) к 950 мл dH_2O , перемешать.
2. довести общий объем раствора dH_2O до 1 л.
3. хранить в холодильнике.

Табл. 10. Компоненты для приготовления раствора микроэлементов

№	Компонент	Количество, г/л	Стоковая концентрация
1	H_3BO_3	0.248	
2	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.184	
3	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.023	
4	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.007	
5	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.012	
6	KBr	0.015	
7	$NiSO_4(NH_4)SO_4 \cdot 6H_2O$	0.016	
8	$VO_4 \cdot 2H_2O$	0.0016	
9	$Al_2(SO_4)_3 \cdot K_2SO_4 \cdot 24H_2O$	0.0376	

Протокол 13. Приготовление модифицированной среды Чу-10 (*Chu-10*)

(используется для большинства зеленых водорослей)

Для приготовления 1 л жидкой среды:

1. добавить все компоненты среды в указанном порядке (табл. 11) к 900 мл dH_2O , перемешать,
! Для приготовления 1.5% агаризованной среды добавить 15 г агара.
2. довести общий объем среды dH_2O до 1 л,
3. автоклавировать, остудить среду при комнатной температуре, хранить в холодильнике.

Табл. 11. Компоненты для приготовления среды Чу-10

№	Компонент	Количество, мл/л	Стоковая концентрация, г/500 мл dH_2O
1	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	10	2.61
2	K_2HPO_4	10	0.5
3	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10	1.25
4	Na_2CO_3	10	1
5	Na_2SiO_3	10	1.25
6	Цитрат Fe	10	0.15
7	Лимонная кислота	10	0.15

Табл. 1. Использование молекулярных маркеров и праймеров для различных таксонов зеленых водорослей

Локус	Название праймера: последовательность (5'-3')		Зеленые водоросли	Ссылка
	Прямой	Обратный		
18S	ChloroF: TGGCCTATCTTGT TGGTCTGT	ChloroR: GAATCAACCTGA CAAGGCAAC	<i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus</i> , <i>Watanabea</i>	Moro et al., 2009; Scalzi et al., 2012; Temraleeva et al., unpubl.
	SSU1: TGGTTGATCCTGC CAGTAG	SSU2: TGATCCTTCCGC AGGTTAC	<i>Bracteacoccus</i> , <i>Chlamydomonas</i> , <i>Chlorosarcinopsis</i> , <i>Dictyochloris</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Heterochlamydomonas</i> , <i>Scenedesmus</i>	Wilcox et al., 1992; Shoup, Lewis, 2003; Pocock, Lachance, 2004; Hall et al., 2010
	F: AACCTGGTTGATC CTGCCAGT	R: TGATCCTTCTGC AGGTTACCTAC G	<i>Actinastrum</i> , <i>Catena</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Closteriopsis</i> , <i>Dicloster</i> , <i>Dictyosphaerium</i> , <i>Didymogenes</i> , <i>Elliptochloris</i> , <i>Heynigia</i> , <i>Hindakia</i> , <i>Jenufa</i> , <i>Koliella</i> , <i>Meyerella</i> , <i>Micractinium</i> , <i>Mychonastes</i> , <i>Parachlorella</i> , <i>Parietochloris</i> , <i>Stichococcus</i> , <i>Watanabea</i> , <i>Xylochloris</i>	Katana et al., 2001; Eliáš et al., 2008; Bock et al., 2011; Krienitz et al., 2011; Nemcová et al., 2011; Neustupa et al., 2011; Temraleeva et al., unpubl.
	P1038F: GACTCAACACGG GAAACTTACC	P1038R: GGTAAGTTTTC CGTGTGCGTC	<i>Prasiola</i> , <i>Rosenvingiella</i>	Sherwood et al., 2000
	P73:	P47:	<i>Chlamydomonas</i> , <i>Chlorella</i> ,	Bérard et al., 2004

	AATCAGTTATAGT TTATTTGRTGGTA CC	TCTCAGGCTCCC TCTCCGGA	<i>Stichococcus</i>	
23S	23SU1: AGGGGTAAAGCA CTGTTTCG	23SU2: CCTTCTCCCGAA GTTACG	<i>Asterochloris, Chlamydomonas, Cocomyxa, Dictyochloropsis, Dilabifilum, Elliptochloris, Heterochlorella, Leptosira, Lobosphaeraopsis, Myrmecia, Picochlorum, Stichococcus, Trentepohlia, Tetraselmis, Trebouxia, Trochiscia</i>	del Campo et al., 2010
	p23SrV_fl: GGACAGAAAGAC CCTATGAA	p23SrV_r1: TCAGCCTGTTAT CCCTAGAG	<i>Bracteacoccus, Chlorosarcinopsis, Scenedesmus</i>	Hall et al., 2010
<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> M28: GGTGTGGATTTA AAGCTGGTGT	<i>rbcL</i> M1390: CTTTCAAAAYTTC ACAAGCAGCAG	<i>Bracteacoccus, Chlorosarcinopsis, Hydrodictyon, Monactinus, Neochloris, Parapediastrium, Pediastrium, Pseudopediastrium, Scenedesmus, Sorastrum, Stauridium</i>	Hall et al., 2010; McManus, Lewis, 2011
	PRASF1: ATGGTTCCACAA ACAGAAAC	ellaR2: TCACGACCTTCA TTACGAGCTTG	<i>Kalinella, Leptochlorella, Prasiola, Rosenvingiella</i>	Sherwood et al., 2000; Neustupa et al., 2013
	PRASF1: ATGGTTCCACAA ACAGAAAC	PRASR1: TTGTCAATAGTA TCAAATTC	<i>Chlamydomonas, Eudorina, Gonium, Pandorina, Volvox</i>	Nozaki et al., 1995a
	650PRASF2: GTAAATTCTCAAC CATTTATGCG	650PRASR2: CAGTGAAACCA CCAGTTAAATAG	<i>Prasiola, Rosenvingiella</i>	Sherwood et al., 2000

	rbcl RH1: ATGTCACCCACAA ACAGAAACTAAA GC	1385: AATTCAAATTTA ATTTCCTTCC	<i>Ulva</i>	Mares et al., 2011
<i>tufA</i>	tufAF: TGAAACAGAAMA WCGTCATTATGC	tufAR: CCTTCNCGAATM GCRAAWCGC	<i>Bracteacoccus</i> , <i>Chlorosarcinopsis</i> , <i>Scenedesmus</i> <i>Caulerpa</i>	Fama et al., 2002; Hall et al., 2010
	tufA.50F: TGGATGGTGCTAT TYTAGTTG	tufA.870R: ATAGTGTCRCCT GGCATAGC	<i>Bracteacoccus</i>	Hall et al., 2010
ITS	ITS1F: TCCGTAGGTGAA CCTGCGG	ITS4F: TCCTCCGCTTAT TGATATGC	<i>Caulerpa</i>	Fama et al., 2000
	ITS1 (modified): AGGAGAAAGTCGT AACAAAGGT	ITS4: TCCTCCGCTTAT TGATATGC	<i>Bracteacoccus</i> , <i>Chlorosarcinopsis</i> , <i>Scenedesmus</i>	Hall et al., 2010
	ITS4F: TCCTCCGCTTATT GATATGC	ITS5R: GGAAGTAAAAG TCGTAACAAAGG	<i>Mychonastes</i>	Yuan et al., 2011
<i>cox1</i>	cox1.50F: TGGTCTGGGTGW ATWGCTAC	cox1.650R: TCACCWCCACC WGCWGGC	<i>Bracteacoccus</i>	Hall et al., 2010

Приложение 3. Протоколы приготовления реактивов и растворов для ПЦР-анализа

Общие правила и техника безопасности при приготовлении растворов:

1. Все манипуляции с бромистым этидием и его растворами требуется проводить в перчатках и под тягой.
2. При взвешивании ДСН под тягой наденьте на лицо маску, т.к. при попадании на слизистую оболочку носоглотки этот летучий порошок вызывает сильное раздражение.
3. Каждый последующий компонент следует добавлять только после полного растворения предыдущего.
4. Все приготовленные растворы должны быть подписаны (название, дата) и помещены в соответствующие условия хранения (табл. 1).

Табл.1. Условия хранения основных реактивов и растворов для молекулярно-генетических работ

Комнатная температура	+4°C	-20°C
Агароза	3-(триметоксилил)	Бетаин
Акриламид	пропилметакрилат	<i>milliQ</i> -вода
Аммиак (под тягой)	(в темноте)	Протеиназа К
«Антилипа» (под тягой)	70%- и 80%-ный	ДНК-полимераза
Бис-акриламид	этиловый спирт	Буфер для ПЦР
Бромистый этидий (в темноте)	3М ацетат натрия	дНТФ
Гидроксид натрия	4М гуанидин	Праймеры
Глицерин	тиоцианат	ДНК-матрица
ДМСО	Водно-спиртовой	ПЦР-продукты
ДСН	раствор ацетата	2%-ный ЦТАБ-буфер
Карбонат натрия	аммония	Фенол
«Липа» (под тягой)	Изопропанол	Формамидный буфер
Лиофильно высушенные праймеры	Персульфат натрия (аммония)	
Мочевина	Стоковые буферы (ТА, ТСБ, ТВЕ, ТЕ)	
Нитрат серебра (в темноте)	TEMED	
Рабочие буферы ТА, ТВЕ		
Смесь красителей (сахароза, БФС, КЦ)		
Соляная кислота (под тягой)		
Хлороформ (под тягой)		
ЦТАБ (порошок)		

Протокол 1. Приготовление 2%-ного ЦТАБ-буфера

1. растворить 0.88 г трис гидрохлорид ($C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$) и 0.53 г трис(гидроксиметил)аминометана ($NH_2C(CH_2OH)_3$) в небольшом количестве *milliQ*-воды,
2. регулировать pH раствора путем добавления 1 М HCl до pH 8.0,
3. добавить к раствору 8.18 г хлорида натрия, перемешать,
4. добавить 8 мл 0.5М ЭДТА, для приготовления которого 9.306 г ЭДТА необходимо растворить в 50 мл dH_2O ,
5. добавить 2 г ЦТАБ. ЦТАБ лучше растворяется при нагревании на водяной бане,
6. довести объем раствора до 100 мл dH_2O ,
7. разаликвотить приготовленный раствор лучше всего в пластиковые пробирки по 10 мл, хранить в морозильнике при $-20^{\circ}C$.

Протокол 2. Приготовление трис-солевого буфера (ТСБ)

1. 12.12 г трис(гидроксиметил)аминометана растворить в 80 мл *milliQ* - воды, перемешивая на магнитной мешалке,
2. оттитровать pH раствора до 8.0 1N HCl,
3. довести объем *milliQ*-водой до 100 мл в мерной колбе,
4. профильтровать через 0.22 мкм фильтр в стерильную стеклянную посуду. Хранить при температуре $+4^{\circ}C$.
5. 2.5 мл приготовленного вышеописанным способом 1 М трис гидрохлорида (pH 8.0) смешать с 1 мл 5 М NaCl,
6. добавить 10 мл 0.5 М ЭДТА (pH 8.0),
7. довести *milliQ*-водой до конечного объема 50 мл,
8. отрегулировать pH до 8.0 HCl, перемешивая на магнитной мешалке,
9. профильтровать через 0.22 мкм фильтр в стерильную стеклянную посуду. Хранить при температуре $+4^{\circ}C$.

Протокол 3. Приготовление 10%-ного ДСН

1. под тягой взвесить 10 г ДСН,
 2. растворить в 90 мл *milliQ*-воды, перемешивая на магнитной мешалке,
 3. довести объем в мерной колбе до 100 мл *milliQ*-водой,
 4. рабочий раствор хранить при комнатной температуре.
- Примечание. При пониженной температуре 10% ДСН выпадает в осадок, который можно растворить, разогрев раствор на водяной бане.

Протокол 4. Приготовление 3М раствора ацетата натрия (pH 5.0)

1. навеску ацетата натрия 24.6 г растворить в 80 мл *milliQ*-воды, перемешивая на магнитной мешалке,
2. оттитровать pH раствора до 5.0 10% ледяной уксусной кислотой (работать в вытяжном шкафу),
3. довести объем *milliQ*-водой до 100 мл в мерной колбе,

4. профильтровать через 0.22 мкм фильтр в стерильную стеклянную посуду.

Протокол 5. Приготовление 4М раствора гуанидин тиоцианата

1. растворить 23.67 г гуанидин тиоцианата в 50 мл ТЕ-буфера (последовательно растворить 0.4 г трис-НСl и 0.37 г ЭДТА в 50 мл *milliQ*-воды, довести рН раствора до 6.4, хранить буфер в холодильнике при +4°C),
1. тщательно перемешать раствор,
2. хранить в холодильнике при +4°C.

Протокол 6. Приготовление ТЕ-буфера

1. растворить в *milliQ*-воде 1 мл 1М трис-НСl (рН 7.4-8.0) и 0.2 мл 0.5 М Na₂ЭДТА (рН 8.0),
2. довести объем раствора до 100 мл *milliQ*-водой,
3. стерилизовать фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм или автоклавированием,
4. хранить в холодильнике при +4°C.

Протокол 7. Приготовление 50х ТА-буфера

1. для приготовления 200 мл 50-кратного ТА-буфера растворить 48.4 г трис(гидроксиметил)аминометана в 100 мл *dH₂O*,
2. добавить 11.4 мл ледяной уксусной кислоты,
3. довести объем раствора до 200 мл *dH₂O*,
4. приготовленный раствор профильтровать через бумажный фильтр «синяя лента», хранить при температуре +4°C,
5. для электрофореза достаточно использовать 0.5х раствор буфера, который можно хранить при комнатной температуре.

Примечание. Уксусная кислота должна быть перегнанной. Если такой возможности нет, нужно 2-3 раза заморозить ее в холодильнике при +4°C, сливая надсадочную жидкость.

Протокол 8. Приготовление 10х ТВЕ-буфера

1. для приготовления 500 мл 10-кратного ТВЕ-буфера растворить 54 трис(гидроксиметил)аминометана (NH₂C(CH₂OH)₃) в 300 мл *dH₂O*,
2. добавить 27 г борной кислоты и 4.2 г динатриевой соли ЭДТА,
3. далее довести объем раствора до 500 мл *dH₂O*,
4. отрегулировать рН буфера до 8.3 (борной кислотой или трис(гидроксиметил)аминометаном),
5. приготовленный раствор профильтровать через бумажный фильтр «синяя лента»,
6. стоковый раствор хранить в холодильнике при +4°C, а рабочий раствор – при комнатной температуре.

Примечание. Со временем в колбе выпадает нерастворимый осадок, который невозможно отмыть водой, поэтому для мытья посуды, в которой хранился 10xTBE, используют раствор щелочи.

Протокол 9. Приготовление буфера для нанесения ПЦР-продукта в карманы ПААГ в денатурирующих условиях

1. для приготовления 1 мл буфера смешать 900 мкл формамида и 100 мкл 1x TBE-буфер,
2. в смеси растворить 0.2 мкг БФС и 0.2 мкг КЦ,
3. хорошо перемешать, разаликвотить по 50 мкл. Хранить при температуре -20°C.

Протокол 10. Приготовление растворов для окраски ПААГ нитратом серебра

1. для приготовления 0.1% ЦТАБ растворить 0.5 г ЦТАБ в 500 мл dH_2O при нагревании,
2. для приготовления 1% аммиака растворить 5 мл NH_3 (конц.) в 500 мл dH_2O ,
3. для приготовления раствора нитрата серебра растворить 0.5 г нитрата серебра в 500 мл dH_2O . Затем добавить 2 мл 1M NaOH и титровать аммиаком (конц.) до прозрачности.

Примечание. Данный раствор можно использовать многократно.

4. для приготовления раствора проявителя растворить 10 г карбоната натрия в 500 мл dH_2O , после этого добавить 0.5 г параформальдегида и растворить при нагревании.

Протокол 11. Приготовление водно-спиртового раствора ацетата аммония

1. для приготовления 500 мкл такой смеси добавить 15 мкл 5M ацетата аммония, 47 мкл dH_2O и 438 мкл 96% этанола,
2. хорошо перемешать, хранить при температуре +4°C.

Приложение 4. Проблемы при амплификации ДНК и пути решения

Табл. 1. Пути решения проблем ПЦР-анализа

Проблема	Возможная причина	Способы исправления
Нет ПЦР-продукта	Один или несколько компонентов реакционной смеси не добавлен или испорчен	Проверьте правильность приготовления реакционной смеси. Используйте проверочный лист, чтобы гарантированно внести все компоненты в пробирку. Повторите реакцию, используя положительный контроль.
Нет ПЦР-продукта, слабый ПЦР-продукт	Недостаточное количество ДНК-матрицы	Увеличьте долю ДНК-матрицы в реакционной смеси.
Нет ПЦР-продукта	Неоптимальные концентрации магния, праймеров	При использовании коммерческого набора реактивов для ПЦР концентрации компонентов оптимизированы. Однако следует помнить, что рабочую концентрацию магния в смеси можно варьировать в диапазоне 1-5 mM, а праймеров – 0.2-0.5 мкМ.
Нет ПЦР-продукта	Неудачная структура праймеров	Пересмотрите структуру праймеров. Проверьте правильность последовательности праймеров, секвенировав их.
Нет ПЦР-продукта, слабый ПЦР-продукт	Неоптимальная температура или время отжига праймеров	Поставьте несколько реакций с разной температурой отжига или используйте температурный градиент. Увеличьте время отжига на 3-4 сек.
Нет ПЦР-продукта, слабый ПЦР-продукт	Недостаточное количество циклов	Увеличьте число циклов ПЦР, добавляя по 3-5 циклов каждый раз. Минимальное число циклов 25, максимальное 40.
Нет ПЦР-продукта	Сложная ДНК-матрица	Используйте буфер для сложных матриц, который содержит компоненты для усиления денатурации и дестабилизации ДНК-дуплекса (опционально поставляется в коммерческих наборах реактивов для ПЦР).

		Одновременно увеличьте температуру денатурации до 96°C, продолжительность предварительной денатурации до 2 мин. Уменьшите температуру отжига праймера на 2-5°C относительно расчетной величины, увеличьте количество циклов ПЦР на 2-7.
Нет ПЦР-продукта, слабый ПЦР-продукт	Короткое время элонгации	Увеличьте время элонгации с шагом 30 сек.
Нет ПЦР-продукта, слабый ПЦР-продукт	Наличие ингибиторов в смеси	Сделайте серию последовательных разведений ДНК-матрицы. Используйте присадки (Прил. 4, табл. 2).
Нет ПЦР-продукта, слабый ПЦР-продукт	Плохое качество ДНК-матрицы	Проверьте качество ДНК-матрицы с помощью электрофореза. Замените матрицу.
Нет ПЦР-продукта	Неисправная работа амплификатора	Проверьте соответствие реальных температур и количества циклов в амплификаторе.
Образование смазанных ПЦР-продуктов	Избыток ДНК- матрицы	Уменьшите долю ДНК-матрицы в реакционной смеси или сделайте серию последовательных разведений тотальной ДНК.
Образование смазанных ПЦР-продуктов	Избыток полимеразы	Если оптимизация параметров ПЦР не привела к успеху, попробуйте в два раза снизить концентрацию полимеразы.
Образование смазанных ПЦР-продуктов	Длинное время элонгации	Уменьшите время элонгации.
Образование смазанных ПЦР-продуктов	Низкая температура денатурации	Увеличьте температуру денатурации на 1°C.
Образование смазанных ПЦР-продуктов	Сложная ДНК-матрица	Используйте буфер для сложных матриц, который содержит компоненты для усиления денатурации и дестабилизации ДНК-

продуктов		<p>дуплекса (опционально поставляется в коммерческих наборах реактивов для ПЦР).</p> <p>Одновременно увеличьте температуру денатурации до 96°C, продолжительность предварительной денатурации до 2 мин.</p> <p>Уменьшите температуру отжига праймера на 2-5°C относительно расчетной величины, увеличьте количество циклов ПЦР на 2-7.</p> <p>Уменьшите количество циклов. Минимальное число циклов 25, максимальное 40.</p>
Образование множественных или смазанных ПЦР-продуктов	Избыток циклов	
Образование множественных ПЦР-продуктов	Низкая температура отжига	<p>Используйте процедуру горячего старта (<i>hot-start PCR</i>) и увеличьте температуру отжига праймера на 2-3°C с шагом 0.5°C. Если есть возможность, то используйте градиентный амплификатор.</p> <p>Попробуйте ступенчатую постановку ПЦР (<i>touchdown PCR</i>).</p>
Образование множественных ПЦР-продуктов	Неудачная структура праймеров	Пересмотрите структуру праймеров. Проверьте правильность последовательности праймеров, секвенировав их.
Образование множественных ПЦР-продуктов	Контаминация посторонней ДНК-матрицей	<p>Проконтролируйте возможность контаминации компонентов ПЦР, автоматических дозаторов и пробирок с помощью отрицательного контроля. В случае обнаружения контаминации замените загрязненный реактив и проведите очистку помещений и дозаторов.</p>

Табл. 2. Вещества, улучшающие специфичность и(или) выход ПЦР

Вещество	Стоковая концентрация	Рабочая концентрация	Механизм действия
Ацетамид	25%	~ 5%	Повышение растворимости
Бетаин	5M	0.5-2M	Стабилизация ДНК-полимеразы, понижение T_m ДНК, выравнивание T_m АТ - и ГЦ-богатых последовательностей
БСА	10 мкг/мкл	~ 0.1 мкг/мл	Стабилизация ДНК-полимеразы
ДМСО	100%	2-15% (opt. 5%)	Повышение растворимости
Формамид	100%	1-5%	Уменьшает неспецифическое связывание
Глицерол	100%	5-20% (opt. 10-15%)	Стабилизация ДНК-полимеразы
<i>NP-40, Tween 20, Triton X-100</i>	10%	0.1-0.5%	Стабилизация ДНК-полимеразы
<i>PEG 8000</i> (полиэтиленгликоль)	40%	5-20% (opt. 15%)	Повышение эффективности концентрации
Тетраметил-аммоний хлорид	5M	0.01-0.1 mM	Повышение специфичности
Термостабильная пирофосфатаза	5 ед./мкл	0.001-1 ед./реакцию	Устранение пирофосфатов, которые могут обрабатывать реакцию полимеризации
Однопочечный ДНК-связывающий белок <i>E. coli</i>	500 мкг/мл	5 мкг/мл	Стабилизация ДНК

Приложение 5. Молекулярно-биологические базы данных и другие интернет-ресурсы

Внимание. Приведенные ссылки являются рабочими на октябрь 2014 г.

Альгологические базы данных и тематические сайты

<http://www.algaebase.org/> – база данных, включающая информацию о современной номенклатуре, систематике и биогеографии водорослей и цианобактерий.

<http://www.algaterra.org/> – база таксономических, молекулярных и экологических данных по водорослям и цианобактериям.

<http://ucjeps.berkeley.edu/INA.html> – **Index Nominum Algarum:** альгологическая картотека.

<http://tolweb.org/tree/> – сайт проекта **Tree of Life**, посвященный описанию биоразнообразия различных групп организмов, живых или вымерших.

<http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/> – японская альгологическая база данных.

http://www.rbgsyd.nsw.gov.au/science/Plant_Diversity_Research/australian_freshwater_algae – **Australian freshwater algae:** сайт содержит информацию о методах сбора, сохранения и определения пресноводных водорослей, галерею фотографий водорослей (**ALGPIC**), диагностический ключ для разных групп (**ALGKEY**) и др.

http://protist.i.hosei.ac.jp/Protist_menuE.html – база данных по протистам, в т.ч. водорослям.

<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/biodiversity/uk-biodiversity/algaevision/index.html> – **AlgaeVision:** коллекция изображений пресноводных и наземных водорослей Великобритании.

<http://algae.su/> – русскоязычный сайт о водорослях, где размещена тематическая информация о научных событиях, специалистах и др.

Альгологические коллекции и поиск культур водорослей

<http://www.wfcc.info> – **World Federation for Culture Collection (WFCC):** сайт Всемирной федерации коллекций культур.

<http://gcm.wfcc.info/> – поиск штаммов микроорганизмов в коллекциях, зарегистрированных во Всемирной федерации коллекций культур (**WFCC**).

http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Protozoa/Algae_Alphanumeric.aspx – **American Type Culture Collection (ATCC):** коллекция типовых культур организмов, в т.ч. водорослей, США.

<http://web.biosci.utexas.edu/utex/default.aspx> – **The Culture Collection of Algae at The University of Texas at Austin:** альгологическая коллекция **UTEX**, США.

<http://sagdb.uni-goettingen.de/> – **The Culture Collection of Algae at the University of Göttingen:** альгологическая коллекция **SAG**, Германия.

<http://ccala.butbn.cas.cz/index.php> – **The Culture Collection of Autotrophic Organisms**: коллекция культур автотрофных организмов CCALA, Чехия.

<http://botany.natur.cuni.cz/algo/caup.html> – **The Culture Collection of Algae of Charles University**: альгологическая коллекция CAUP, Чехия.

<http://www.ccap.ac.uk/> – **The Culture Centre Algae and Protozoa**: коллекция водорослей и простейших CCAP, Великобритания.

<http://acoi.ci.uc.pt/index.php> – **Coimbra Collection of Algae**: альгологическая коллекция ACOI, Португалия.

<http://www.sccap.dk/> – **The Scandinavian Culture Collection of Algae and Protozoa at the University of Copenhagen**: коллекция водорослей и простейших SCCAP, Дания.

<http://mcc.nies.go.jp/> – **Microbial Culture Collection at the National Institute for Environmental Studies**: коллекция культур микроорганизмов NIES, Япония.

<http://chlamycollection.org/> – **Chlamydomonas Resource Center**: коллекция штаммов водорослей *Chlamydomonas reinhardtii*, США.

<http://www.keweenawalgae.mtu.edu/index.htm> – коллекция пресноводных водорослей полуострова Кевино, США.

<http://www.ccac.uni-koeln.de/> – **Culture Collection of Algae at the University of Cologne**: альгологическая коллекция CCAC, Германия.

<http://uwaterloo.ca/canadian-phycological-culture-centre/> – **Canadian Phycological Culture Centre**: центр культур водорослей CPCC, Канада.

<http://www.dunaliella.org/> – **Dunaliella Culture Collection at Brooklyn College**: коллекция культур рода *Dunaliella* DCCBC, США.

<http://www.chlamy.org/> – **Chlamydomonas Genetics Center**: центр генетических исследований *Chlamydomonas* CGC, США.

<http://www.csiro.au/Organisation-Structure/National-Facilities/Australian-National-Algae-Culture-Collection.aspx> – **CSIRO Collection of Living Microalgae**: коллекция живых культивируемых микроводорослей CCLM, Австралия.

<https://ncma.bigelow.org/> – **National Center for Marine Algae and Microbiota**: национальный центр по морским водорослям и микробиоте NCMA, США.

Тематические журналы и общества

<http://www.intphycsoc.org/> – Международное общество альгологов.

<http://www.psaalgae.org/> – Американское общество альгологов.

<http://www.brphycsoc.org/> – Британское общество альгологов.

<http://www.isaseaweed.org/> – Международная ассоциация по морским водорослям.

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1529-8817](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1529-8817) – англоязычный журнал «**Journal of Phycology**», импакт-фактор 2.529 (2013).

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1440-1835](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1440-1835) – англоязычный журнал «**Phycological Research**», импакт-фактор 0.955 (2013).

<http://www.phycologia.org/> – англоязычный журнал «**Phycologia**», импакт-фактор 1.82 (2013).

http://www.tandfonline.com/toc/tejp20/current#.VBgNwPl_tZk – англоязычный журнал «**European Journal of Phycology**», импакт-фактор 2.338 (2013).

http://www.schweizerbart.de/journals/algol_stud – англоязычный журнал «**Algological Studies**».

<http://fottea.czechphycology.cz/> – англоязычный журнал «**Fottea**», импакт-фактор 1.627 (2013).

<http://ijs.sgmjournals.org/> – англоязычный журнал «**International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**», импакт-фактор 2.798 (2013).

<http://www.mapress.com/phytotaxa/> – англоязычный журнал «**Phytotaxa**», импакт-фактор 1.376 (2013).

<http://www.springer.com/life+sciences/ecology/journal/10750> – англоязычный журнал «**Hydrobiologia**», импакт-фактор 2.212 (2013).

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/14344610> – англоязычный журнал «**Protist**», импакт-фактор 3.558 (2013).

<http://www.amjbot.org/> – англоязычный журнал «**American Journal of Botany**», импакт-фактор 2.586 (2012).

http://www.schweizerbart.de/journals/nova_hedwigia – англоязычный журнал «**Nova Hedwigia**», импакт-фактор 0.989 (2013).

http://www.botany.kiev.ua/Jour_alg.htm – журнал «**Альгология**», издается на украинском, русском и английском языках.

<http://www.binran.ru/science/periodicheskije-izdaniya/novosti-sistematiki-nizshyh-rastenij/> – русскоязычный журнал «**Новости систематики низших растений**», импакт-фактор РИНЦ 0.125 (2012).

<http://www.binran.ru/science/periodicheskije-izdaniya/botanicheskij-zhurnal/> – русскоязычный журнал «**Ботанический журнал**», импакт-фактор РИНЦ 0.257 (2012).

<http://www.maik.ru/cgi-perl/journal.pl?lang=rus&name=mikbio> – русскоязычный журнал «**Микробиология**», импакт-фактор РИНЦ 0.291 (2012).

<http://www.maik.ru/cgi-perl/journal.pl?lang=rus&name=biovv> – русскоязычный журнал «**Биология внутренних вод**», импакт-фактор РИНЦ 0.426 (2012).

<http://www.maik.ru/cgi-perl/journal.pl?lang=rus&name=pochved> – русскоязычный журнал «**Почвоведение**», импакт-фактор РИНЦ 0.523 (2012).

Молекулярно-генетические ресурсы

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> – **The National Center for Biotechnology Information**: база данных по аминокислотным и нуклеотидным последовательностям **NCBI**, каталог биологической литературы, таксономический браузер, программы для проведения анализов, руководства пользователям и др.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> – **Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)**: программный алгоритм для поиска гомологии между аминокислотными и нуклеотидными последовательностями.

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/> – **The DNA Data Bank of Japan (DDBJ)**: японская база данных нуклеотидных последовательностей.

<https://www.ebi.ac.uk/> – **The European Molecular Biology Laboratory (EMBL)**: европейская база данных нуклеотидных последовательностей.

<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/> – **The ITS2 Database**: база данных ITS2 с возможностью аннотировать, моделировать вторичную структуру ITS2, находить консервативные мотивы и др.

<http://www.jove.com/video/3806/the-its2-database> – видео-урок по работе с базой данных ITS2.

<http://www.boldsystems.org/> – **BOLDSYSTEMS**: база данных по ДНК-штрихкодам.

<http://www.molbiol.ru/> – русскоязычный сайт о методах классической и молекулярной биологии.

<http://www.phylogenetics.ru/> – русскоязычный сайт, содержащий практические руководства, обзоры статей и книг, скрипты и форум по филогенетике и эволюционной биологии.

<http://www.protocol-online.org/> – база данных по экспериментальным протоколам работы (биохимия, биоинформатика, клеточная биология, микробиология, молекулярная биология и др.).

<http://treethinkers.blogspot.ru/> – **Dechronization**: коллективный блог группы эволюционных биологов, посвященный различным аспектам использования филогенетического анализа.

<http://www.bioinformatics.org/> – сайт по биоинформатике: онлайн базы данных некоторых генов, программы для анализа нуклеотидных последовательностей, поиска консервативных позиций, конструирования праймеров и др.

<http://phyloseminar.org/> – сайт, целью которого является проведение интернет-семинаров по филогенетике.

<https://www.broadinstitute.org/scientific-community/software> – пакеты программ для химической биологии, анализа изображений, протеомики, генетического анализа и др.

<http://www.ibi.vu.nl/programs/#msa> – программы по биоинформатике.

<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html> – программы для молекулярно-филогенетического анализа.

http://humgen.nl/primer_design.html – база интернет-ресурсов и программ по конструированию олигонуклеотидных праймеров.

<http://molbiol-tools.ca/> – онлайн-анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

<http://oligo.net/> – **OLIGO Primer Analysis Software**: пакет программ для конструирования и анализа праймеров, а также иных нуклеотидных последовательностей.

<http://basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html> – **Oligonucleotide Properties Calculator (Oligo Calc)**: расчет свойств олигонуклеотидных праймеров.

<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> – **OligoAnalyzer**: дизайн праймеров, расчет разведения.

http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/ – **EMBOSS Transeq**: сервис для трансляции нуклеотидных последовательностей в аминокислотные с учетом выбора различных вариантов рамок считывания и различных вариантов генетического кода.

<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form2.3> – ресурс, позволяющий смоделировать вторичную структуру ДНК и РНК.

<http://4sale.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/> – программа **4SALE**.

<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/all.html> – **T-Coffee**: онлайн-ресурс для оценки и множественного выравнивания ДНК, РНК, последовательностей белков с учетом структуры.

<http://www.cbs.dtu.dk/services/RevTrans/> – **RevTrans 1.4 Server**: онлайн-сервис для выравнивания белок-кодирующих последовательностей ДНК.

http://www.phylogeny.fr/version2_cgi/index.cgi – сайт, посвященный методам и алгоритмам в биоинформатике.

<http://bodegaphylo.wikispot.org/Topics> – **Bodega Phylogenetics Wiki**: сайт с практическими упражнениями по филогенетике и эволюционной биологии, ссылки на программы и др.

http://www.phylogeny.fr/version2_cgi/index.cgi – веб-сервис, посвященный реконструкции и анализу филогенетических связей организмов, предоставляет онлайн-доступ к ряду филогенетических программ, есть возможность проводить анализ удаленно – на сервере разработчиков сайта.

<http://www.r-project.org/> – сайт разработчиков языка программирования **R**.

<http://cran.gis-lab.info/> – интерпретатор для языка программирования **R**.

<http://www.cran.r-project.org/web/packages/ape/index.html> – пакет **APE** для филогенетических реконструкций с полным описанием функций.

<http://blog.phytools.org/> – блог, в котором публикуются описания различных функций (на **R**) для филогенетического анализа.

<https://code.google.com/p/jmodeltest2/> – программа **jModelTest**.

<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> – программа **FigTree**.

<http://doua.prabi.fr/software/seaview> – программа **SeaView**.

<https://code.google.com/p/phyml/> – программа **PhyML**.
<http://mrbayes.sourceforge.net/> – программа **MrBayes**.
<http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/fasta2mrbayes.php> – онлайн-
конвертор **FABOX**, который переводит данные из формата *.fasta* в
пригодный для **MrBayes** формат *.nexus*.

Научное издание

Темралеева Анна Дисенгалиевна,
Минчева Елена Вячеславовна,
Букин Юрий Сергеевич,
Андреева Алла Михайловна.

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ,
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ
ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ (CHLOROPHYTA)**

Отв. ред. Темралеева А.Д.

*Издано при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований и ООО «Диа-М»*

Формат 70х100/16.
Гарнитура Times New Roman.
Бумага офсетная. Усл. печ. л. 17,55.
Тираж 40 экз. Заказ № 909.

Отпечатано в ООО «Костромской печатный дом»
156005 г. Кострома, ул. Мясницкая, 43 а



Анна Дисенгалиевна Темралеева

Кандидат биологических наук, младший научный сотрудник Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пущино. Научные интересы: биоразнообразие, экология и филогения почвенных водорослей.



Елена Вячеславовна Минчева

Кандидат биологических наук, научный сотрудник Лимнологического института СО РАН, Иркутск. Научные интересы: генетическое разнообразие и филогения зеленых водорослей и растений пресноводных водоемов.



Юрий Сергеевич Букин

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Лимнологического института СО РАН, Иркутск. Научные интересы: теоретическая биология, математическая биология и биоинформатика, молекулярная филогения.



Алла Михайловна Андреева

Доктор биологических наук, зав. лаб. экологической биохимии Института биологии внутренних вод имени И.Д. Папанина РАН, Борок. Научные интересы связаны с изучением структурно-функциональной организации белков и механизмов фильтрации внеклеточной жидкости организма у низших Vertebrata.