

На правах рукописи

ЕФИМОВА

Ксения Владимировна

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО
РАЗНООБРАЗИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ И ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ
АКВАТОРИИ ЯПОНСКОГО МОРЯ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Владивосток – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения
Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор **Брыков Владимир Алексеевич**

Официальные оппоненты:

Кокшарова Ольга Алексеевна, доктор биологических наук, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, ведущий научный сотрудник отдела биоэнергетики

Корень Ольга Геннадьевна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, ученый секретарь, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится « 27 » мая 2016 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17. Факс: (423)2310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.imb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/soviet-d-005-008-01/24-efimova-kseniya-vladimirovna>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат биологических наук

Вашенко

Вашенко Марина
Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Видовая диагностика является одной из важнейших задач в оценке биоразнообразия, экологического мониторинга и паспортизации видов. Важность результата данной процедуры значительна, так как точная идентификация это основа дальнейшего фундаментального или практического исследования объекта.

За последние десятилетия молекулярные методы стали незаменимым инструментом в изучении представителей микробиоты и оценке эволюционных отношений между ними. Они позволяют провести паспортизацию и депонирование штаммов микроводорослей, поддерживающихся в лабораторных условиях. Известно, что отсутствие генетического анализа зачастую приводит к недостоверной и ошибочной таксономической информации культур, поскольку известно, что морфологический критерий у одноклеточных на сегодняшний день не является надёжным и позволяет только предварительно диагностировать максимально возможный таксономический статус (Темралеева и др., 2013). Молекулярно-генетические методы позволяют не только решить задачу в короткие сроки, но также являются единственным возможным инструментом в установлении видовой принадлежности большинства микроводорослей (Perini et al., 2011).

Прогрессирующие в последние годы сезонные вспышки массовых вредоносных цветений водорослей (ВЦВ) в прибрежных зонах Японского моря, в том числе в черте г. Владивостока, расширение их географического распространения ставит анализ видового состава в режиме мониторинга в число неотложных приоритетных задач, выполняемых в рамках программ по биологической безопасности дальневосточных морей России.

Степень разработанности. Региональные и международные научные программы и проекты развитых стран по исследованию вод мирового океана включают молекулярно-генетические методы с использованием генов рДНК как неотъемлемый аналитический модуль экологического мониторинга и контроля над видовым составом фитопланктона (Anderson, 2008). В отечественной практике идентификации и молекулярной экологии бактерио- и фитопланктона генетические методы впервые были применены специалистами Лимнологического института СО РАН (Тихонова и др., 2006; Анненкова, Беликов, 2010; Белых и др., 2013). Аналогичные исследования в отношении морей дальневосточного региона России ранее не проводились.

В результате многолетних исследований дальневосточных морей России на базе Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (ИБМ ДВО РАН) поддерживаются культуры морских микроводорослей. Коллекция на сегодня не имеет официального статуса, тем не менее, многие из культур очень популярны в различного рода исследованиях (Zhukova, Aizdaicher, 1995; Boroda et al., 2014; Айздайчер и др., 2014; Крещеновская, Орлова, 2014). На сегодняшний день коллекция включает множество видов и штаммов микроводорослей, собранных из дальневосточных морей РФ, преимущественно из акватории залива Петра Великого Японского моря, и поддерживающихся для исследований, направленных на решение многих фундаментальных и прикладных задач. Некоторые из содержащихся культур требуют валидации таксономического статуса, для некоторых микроводорослей необходима полная видовая диагностика. Более того, прогрессирующие в последние годы сезонные вспышки массовых цветений микроводорослей в прибрежных зонах Японского моря, в том числе в черте

г. Владивостока, ставит анализ видового состава в режиме мониторинга в число неотложных приоритетных задач, выполняемых в рамках программ по биологической безопасности дальневосточных морей России.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы заключалась в проведении молекулярно-генетической идентификации с использованием рибосомных генов (18S рДНК, ITS1–5.8S рДНК–ITS2, 28S рДНК) ядерной ДНК морских одноклеточных водорослей, поддерживающихся в коллекции ИБМ ДВО РАН, а также выделенных из морской воды клеток представителей микробиоты, массовые цветения которых регистрировались в период мониторинга акватории залива Петра Великого (Японское море) 2012–2015 гг.

Основные задачи:

1. С использованием анализа генов рДНК провести видовую идентификацию и установить риботипы, поддерживающихся в коллекции ИБМ ДВО РАН клеточных культур, а также различных клеток динофлагеллят (*Ostreopsis* sp., *Dinophysis* cf. *acuminata*, *Scrippsiella* cf. *trochoidea*, *Prorocentrum* sp.), гаптофитовых (*Prymnesium* sp.), одноклеточных красных водорослей (*Porphyridium purpureum*) и цианобактерий, выделенных из экологических проб морской воды в период мониторинга акватории залива Петра Великого (Японское море) 2012–2015 гг.

2. Провести сравнительный и филогенетический анализ каждого анализируемого объекта с установлением близкородственных связей с известными популяциями других регионов мирового океана.

3. Выявить внутривидовое и межвидовое разнообразие исследуемых объектов, оценить возможные внутривидовые отличия на популяционном уровне.

Научная новизна работы. Впервые в практике отечественных экологических исследований и видовой идентификации морских микроводорослей российской акватории Японского моря были применены современные молекулярно-генетические методы. С их помощью идентифицированы риботипы динофлагеллят *Ostreopsis* sp., а также потенциально-опасные виды *Scrippsiella trochoidea*, *Dinophysis acuminata* и новый для Тихого океана токсичный вид *Prorocentrum foraminosum*. Идентифицирован первый для умеренного региона, и для дальневосточных морей, в частности, вид и штамм гаптофитовой микроводоросли *Tisochrysis lutea*. Подтверждена видовая принадлежность трёх исследованных культур *Porphyridium purpureum*, две из которых – единственные на сегодняшний день из российских вод. В ходе исследования впервые была отмечена внутригеномная гипервариабельность копий генов 28S рДНК (D1-D2 регион) и ITS1–5.8S рДНК–ITS2 для динофлагеллят *Ostreopsis* sp. Доказано, что обнаруженные различные внутригеномные варианты этих генов не могут быть отнесены к разным самостоятельным операционным таксономическим единицам, ранее предложенным для условного обозначения неидентифицированных видов *Ostreopsis* sp. из вод Японии: «*Ostreopsis* sp.1» и «*Ostreopsis* sp.2».

В результате работы для некоторых видов впервые определены частичные или полноразмерные последовательности ряда генов: 28S рДНК (D8-D10 регион) – *P. foraminosum*, *T. lutea*; 28S рДНК (D1-D2 регион) – *P. purpureum*; ITS1–5.8S рДНК–ITS2 – *P. purpureum*, *P. foraminosum*, *T. lutea*. Рассмотрена возможность их использования в качестве маркерных для

идентификации и изучения филогенетических отношений между близкородственными видами и их филогеографии.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные молекулярно-генетические данные обеспечили проведение паспортизации и депонирования единственных на сегодняшний день отечественных экологически и экономически важных штаммов водорослей, поддерживающихся в коллекции ИБМ ДВО РАН. Проведение генетического исследования коллекционных штаммов с выявлением их генетических особенностей и создание паспортов микроводорослей является актуальной задачей, решение которой позволит усовершенствовать и стандартизировать контроль над средствами специфической профилактики вредоносных цветений микроводорослей, в совокупности к этому позволит исследовать и решать различные биотехнологические задачи в отечественном производстве.

Методология и методы диссертационного исследования. В работе использовались монокультуры одноклеточных водорослей из коллекции ИБМ ДВО РАН, клоны которых были предоставлены сотрудниками лаборатории экологии шельфовых сообществ: *Ostreopsis* sp., *Prorocentrum* sp. – Н.Г. Литвиновой; *Porphyridium purpureum*, cf. *Prymnesium* sp., цианобактериальный изолят – Н.А. Айздайчер; *Scrippsiella trochoidea* – Т.В. Морозовой. Для анализа отбирали отдельные клеточные изоляты из культур *Ostreopsis* sp. Также отдельные клетки *Dinophysis acuminata*, *Ostreopsis* sp. и *Prorocentrum* sp. из проб морской воды зал. Петра Великого в период массового развития этих видов.

Настоящая работа была выполнена современными молекулярно-генетическими методами, соответствующими поставленным цели и задачам. Общая стратегия исследований представлена на рисунке 1. Выделение ДНК проводилось с использованием нескольких методик в зависимости от типа материала (клетка или клеточная биомасса) и известных в литературе данных о химическом составе клеток исследуемых объектов. Апробация и оптимальные условия выделения ДНК подбирались путем многократных повторов эксперимента. Подбор универсальных и таксон-специфических праймеров осуществлялся согласно известным данным по одноклеточным и низшим многоклеточным организмам. Серия реакций амплификаций основывалась на классическом методе ПЦР. В случае анализа объектов из экологических образцов, а также для частичного выяснения причины внутригеномного полиморфизма генных фрагментов, очищенные продукты амплификации подвергали молекулярному клонированию. Таргетное (целевое) автоматическое секвенирование проводили по методу Сэнгера. Обработку, редактирование и анализ полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли в компьютерных молекулярно-генетических программах и на доступных интернет-ресурсах.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечена современными молекулярно-генетическими методами исследования, в том числе применением молекулярного клонирования, дополнительными повторами экспериментов и использованием множества методов обработки информации, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Применение одних и тех же алгоритмов и методов обработки данных на базе разных компьютерных программ и интернет-ресурсов позволило обеспечить наибольшую убедительность для идентификации и топологии

выводимых филогенетических реконструкций. Интерпретация полученных результатов, научных положений и выводов подкреплена данными, приведенными в таблицах и рисунках.

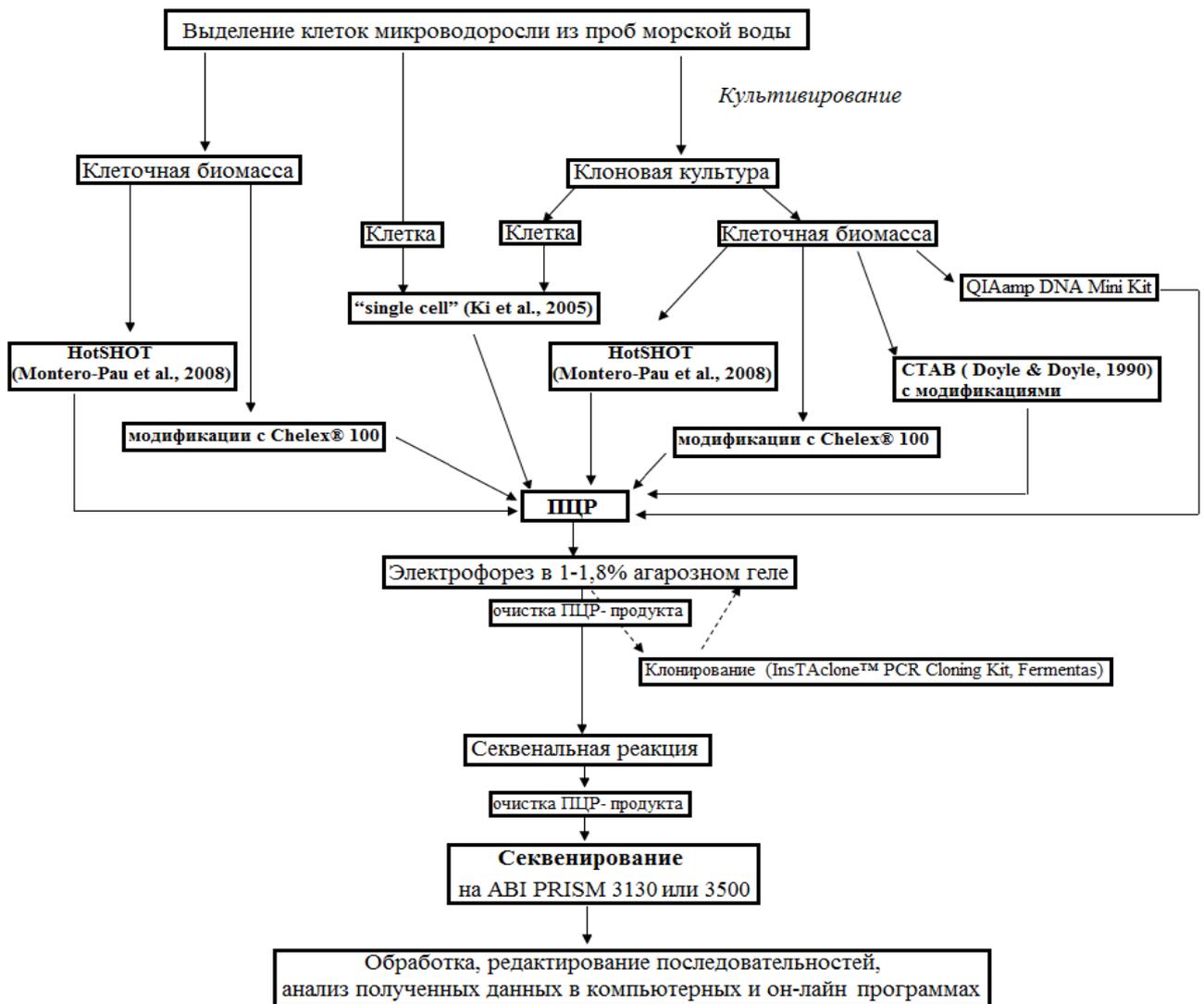


Рисунок 1 – Основные этапы проводимых исследований.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на I межрегиональной молодежной школе-конференции «Актуальные проблемы биологических наук», г. Владивосток (2013); VI Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия–2013», г. Иркутск (2013); VI Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров и ассоциированных генетических симпозиумов, г. Ростов-на-Дону (2014); ежегодных научных конференциях Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток (2013, 2015).

Теоретические положения и результаты исследований использованы при подготовке научно-исследовательских отчетов по следующим проектам: РФФИ 10-04-01438-а; ДВО1 -12-I-П30; CRDF-12-010 RUB1-7063-VL-12; ДВО1 - № 12-I-П30-08; ДВО3 - 12-III-A-06-093; ДВО4 - № 15-I-6-014 о /15-II-6-009; РФФИ (14-04-00860); целевая комплексная программа ДВО РАН «Биологическая безопасность дальневосточных морей Российской Федерации», грант фонда APN ARCP2006-FP14; РФФИ №14-50-00034.

По теме диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 184 страницах, включает 17 таблиц и 21 рисунок. Материал представлен в виде общего введения, 3-х глав, которые включают «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования» и «Результаты и обсуждение», а также «Заключение» и практические рекомендации, «Выводы», «Список литературы» (388 наименований, из них 338 на иностранных языках) и 14 приложений.

Благодарности. Выражаю искреннюю признательность своему научному руководителю профессору, д.б.н. Брыкову Владимиру Алексеевичу, а также к.б.н. Орловой Татьяне Юрьевне за предоставленную мне возможность работать и выполнять научные исследования под Вашим руководством, за ценные советы, наставления и поддержку. Благодарю директора ИБМ ДВО РАН академика Адрианова Андрея Владимировича за возможность выполнять исследования на базе Института биологии моря. Глубокую признательность выражаю рецензенту д.б.н., ведущему научному сотруднику ИБМ ДВО РАН Евгению Станиславовичу Балакиреву за ознакомление с текстом рукописи, ценные рекомендации, справедливые замечания. Выражаю благодарность всем соавторам совместных публикаций, с которыми были получены и опубликованы результаты комплексных работ. Отдельную благодарность выражаю коллективам лабораторий генетики и экологии шельфовых сообществ, в особенности к.б.н., ст.н.с. Кухлевскому А.Д. и к.б.н., н.с. Шариной С.Н. за советы, консультации, всяческую поддержку на протяжении выполнения диссертационной работы, за предварительное ознакомление с текстом рукописи и ценные замечания. Особую благодарность выражаю своим родителям за постоянную и всестороннюю поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 «Обзор литературы» приведены литературные данные по исследуемым таксонам. Описаны основные характеристики и особенности про- и эукариотических одноклеточных организмов. Отдельным параграфом приведены степень изученности и проблематика молекулярно-генетической идентификации исследуемых таксонов, где кратко рассматриваются основные и наиболее используемые в мировой практике молекулярные методы и подходы идентификации и изучения разнообразия микроорганизмов. В обзоре литературы также приведён параграф по общепринятым в мире молекулярно-генетическим маркерам, где в той или иной степени отмечены их эффективность и/или недостатки, а также обоснование выбора рибосомальных генов. Также в главе рассмотрены методы анализа, используемые в установлении родственных связей и филогенетического положения у микроводорослей и цианобактерий. В главе 2 «Материалы и методы исследования» приводится детальное, последовательное описание используемых в исследовании методов и маркёров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ostreopsis sp. ORUS

Компьютерный анализ секвенированных клонированных фрагментов яДНК *Ostreopsis* sp. ORUS позволил установить наличие нескольких различающихся копий генов 28S рДНК и

ITS-региона, в том числе с существенной (20%) величиной дифференциации в пределах одного генома. Разнообразие выявленных риботипов по генам 28S рДНК и ITS-региону наблюдалось не только между разными культурами, клоновыми культурами от общей материнской клетки, но и между клонированными последовательностями этих генов в пределах генома одной культуры и генома отдельно взятых клеток из этих культур, и, более того, клеток, анализируемых без культивирования. Высокая внутригеномная гетерогенность генных последовательностей 28S рДНК и ITS-региона ранее не была отмечена в анализируемых культурах *Ostreopsis* из Атлантического региона. Значительная дифференциация изученных на сегодня популяций наряду с обнаруженной гетерогенностью затрудняют идентификацию *Ostreopsis* в тихоокеанском регионе. Результатом высокого внутривидового/штаммового морфологического, генетического и токсического разнообразия рода *Ostreopsis* стало появление условного таксономического статуса согласно филогенетическому положению (принадлежности к кладам «*Ostreopsis ovata* species-complex», «*Ostreopsis* sp.1» – «sp.6» обозначенным в работах Penna et al., 2005; 2007 и Sato et al., 2011, соответственно). Тем не менее, авторы не обнаруживали в исследуемых культурах и клетках внутригеномного аллелизма генов рДНК.

С помощью филогенетического анализа данных 28S рДНК были выявлены два значительно отличающихся друг от друга генотипа *Ostreopsis* sp. из российского побережья Японского моря: один из которых близок к токсичному корейскому штамму (о. Чжеджу), другой – к японскому штамму OdoOst6 («*Ostreopsis* sp.2») с юга Окинавы (Рисунок 2).

Генетическая гетерогенность 28S рДНК между субкладами В1/В2 составила 0.139, что указывает как минимум на межвидовой уровень дифференциации. Усреднённое генетическое расстояние между кладами А и В составило 0.130 (13%).

Филогенетический анализ ITS-региона кроме двух названных генотипов, выявил ещё один генотип, аналогичный токсичному генотипу другого японского штамма, принадлежащего кладе «*Ostreopsis* sp.1», распространённого практически по всем прибрежным районам Японских островов (Рисунок 3).

Генетическое расстояние внутри клады В ITS-региона составило 0.058 ± 0.012 . Величина p между субкладами В1/В2 составила 0.158, а между кладами А/В1 и А/В2 p было 0.107 и 0.160, соответственно, что указывает на видовой уровень различий. Обнаруженная внутригеномная гипервариабельность генных копий у клонов ORUS может обуславливать высокую фенотипическую и экологическую пластичность вида. Более того данный факт доказывает, что филогенетически различные фрагменты генов, кластеризовавшиеся в *Ostreopsis* sp.1 и *Ostreopsis* sp.2, являются аллельными вариантами гена у одного и того же вида/ОТЕ (операционной таксономической единицы), а не у разных, как предполагали Сато с коллегами (2011). Возможно, эта стратегия необходима в постоянно меняющихся окружающих условиях, предполагая, что каждый вариант копии рРНК будет синтезироваться в зависимости от соответствующих условий. Вероятно, синтез происходит одновременно с нескольких гипервариабельных копий гена.

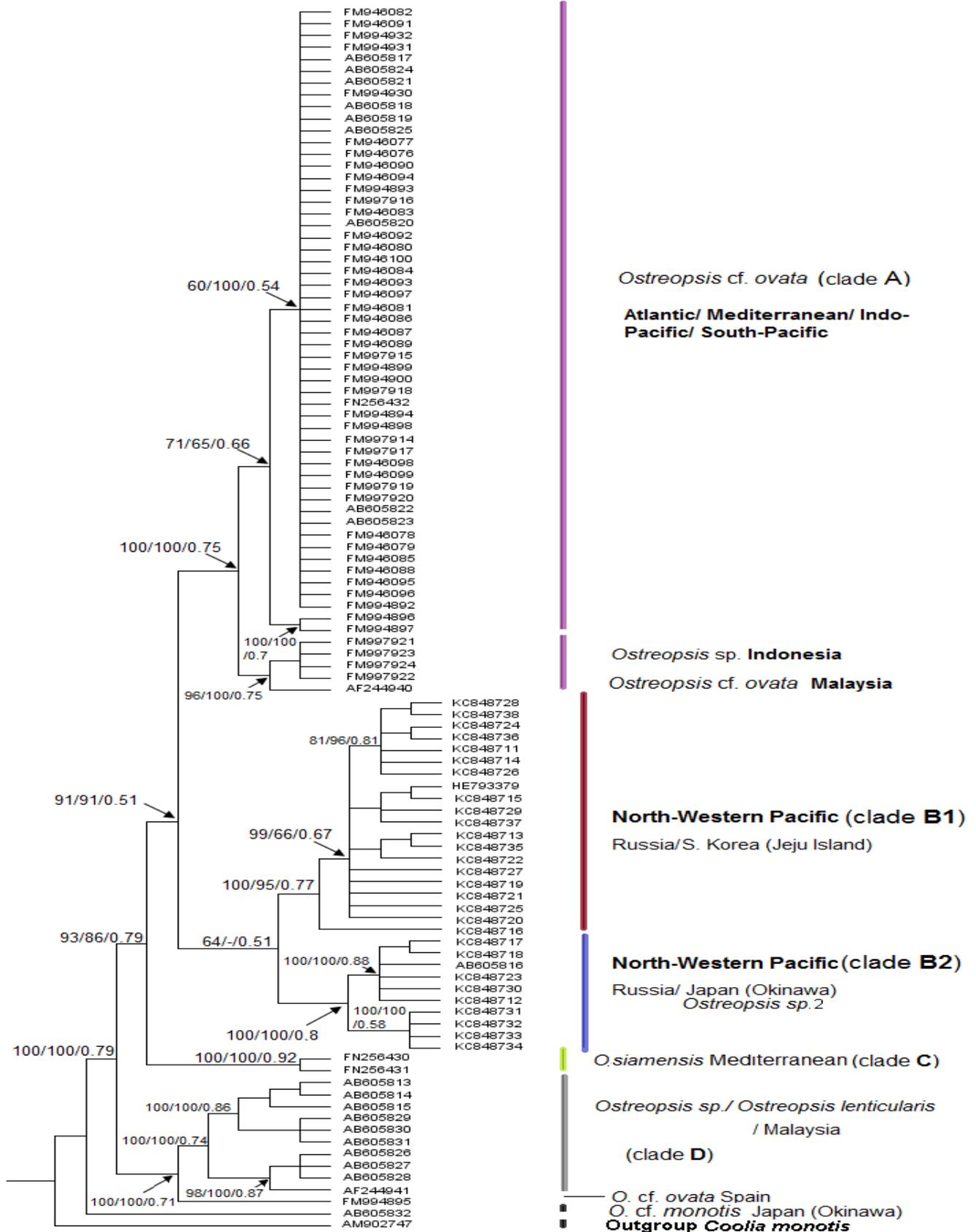


Рисунок 2 – Консенсусное ML-дерево представителей рода *Ostreopsis* на основе последовательностей 28S рДНК (D1-D2), выровненных алгоритмом MUSCLE, и полученное с применением модели T92+G. Достоверность ветвления указана в виде поддержек: бутстреп-индексы максимального правдоподобия (ML) и объединения соседей (NJ), а также байесовские апостериорные вероятности (BP /BP/ PP). *Coolia monotis* VGO783 была использована в качестве внешней группы.

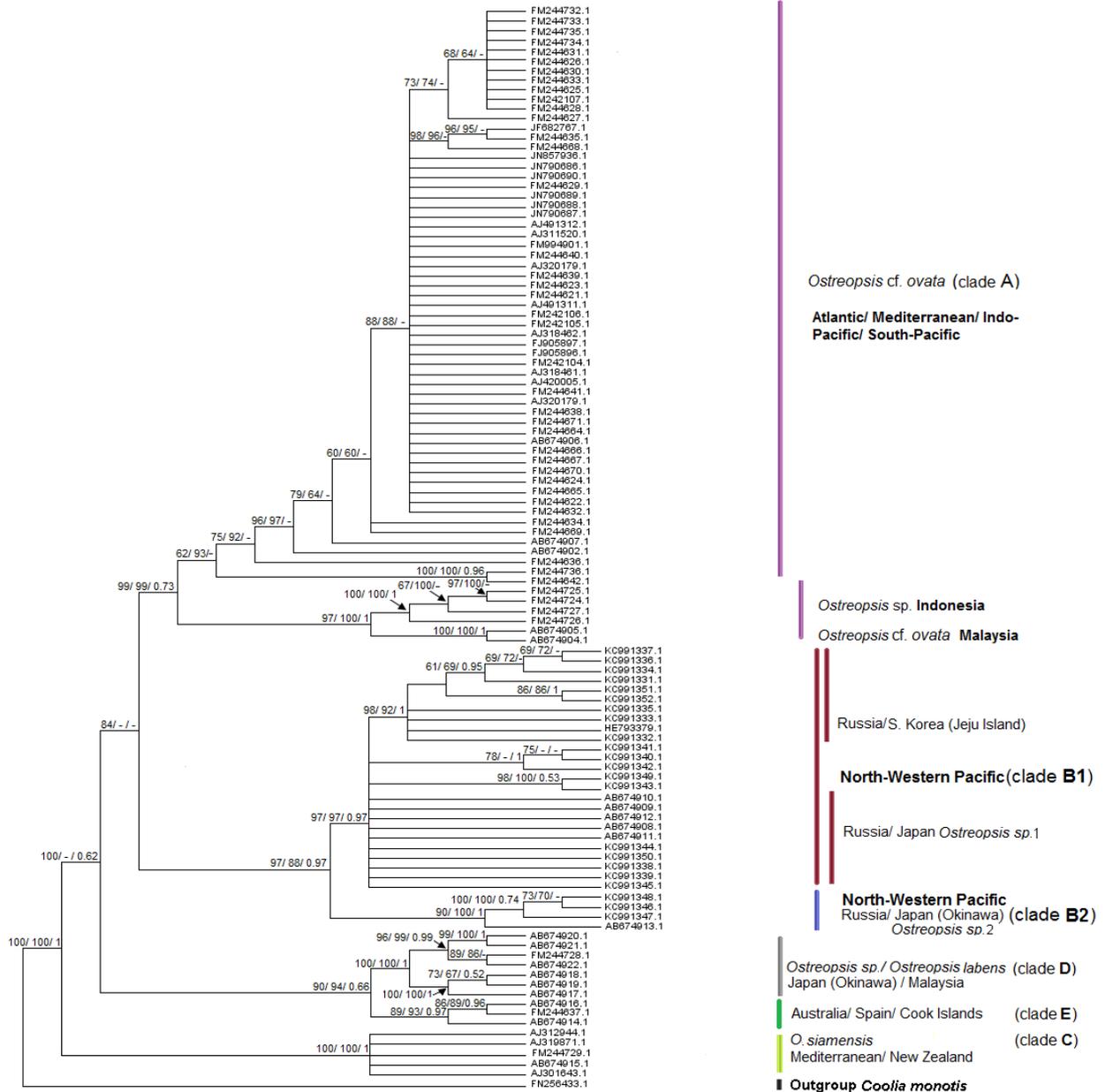


Рисунок 3 – Консенсусное ML-дерево представителей рода *Ostreopsis* на основе последовательностей ITS-региона, выровненных алгоритмом MAFFT, и полученное с применением модели T92+G. Достоверность ветвления указана в виде поддержек: ML/NJ/BI.

Противоположная картина наблюдалась при анализе полного гена 18S рДНК. Генные последовательности оказались полностью гомогенными между образцами клеточных культур и индивидуальными клетками *Ostreopsis* sp. ORUS. Величина генетической дивергенции 1.9% была обнаружена между последовательностями 18S рДНК *Ostreopsis* sp. ORUS и корейским штаммом (HE793379), и 5.9% между *Ostreopsis* sp. ORUS и малазийским штаммом (AF244939). Видовой статус в случае тихоокеанской популяции *Ostreopsis* sp. ORUS в силу таксономических неясностей рода установить не удалось.

Scrippsiella trochoidea

Объектом исследования явились две клеточные монокультуры морских динофлагеллят с морфотипом *Scrippsiella trochoidea*, пророщенных из цист из 30-см осадков Амурского залива

(Японское море). В результате проведенного молекулярно-генетического анализа культур 2010 и 2013 гг. были секвенированы последовательности D1-D2 региона 28S рДНК и полный ITS-регион (ITS1-5.8S-ITS2) общей длиной 1297 п.н. Нуклеотидные последовательности по отдельности рассматриваемым культурам были полностью идентичны друг другу. В GenBank депонирована последовательность штамма АВ-2010 (KJ996096). 95% область покрытия этой последовательности была наиболее близка к *S. trochoidea* GeoB 335 (северная часть Ионического моря, KF751926). Обнаружено 5.69% (70 п.н.) различий, в том числе 17 п.н. в ITS1, 21 п.н. в ITS2, и 29 п.н. в виде замен и 3 п.н. в виде вставки в D1-D2 области 28S рДНК. Топология реконструированных деревьев (Рисунок 4) соответствовала байесовскому дереву семейства Thoracosphaeraceae, представленному в работе Готчлинга и Сознера (Gottschling, Soehner, 2013).

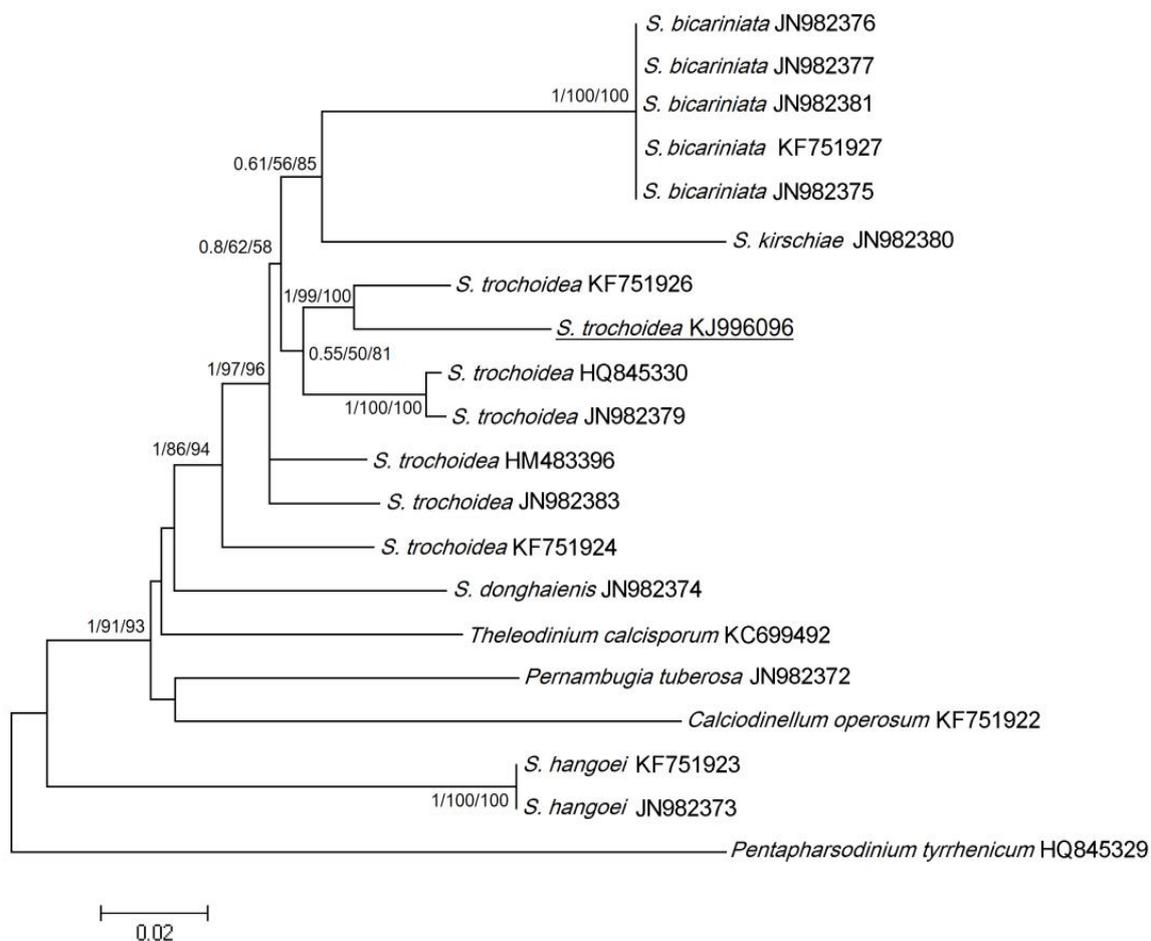


Рисунок 4 – Консенсусное ML-дерево на основе ITS региона и 28S рДНК (D1-D2), достоверность ветвления указана в виде поддержек ветвей: байесовские апостериорные вероятности, бутстреп-индексы максимального правдоподобия (ML) и ближайшего связывания (NJ) (PP/BP/BP). Дерево укоренено последовательностью *Pentapharsodinium tyrrhenicum* HQ845329 в качестве внешней группы.

Во всех анализах, штамм АВ-2010 входил в общую кладу видового комплекса *S. trochoidea* и кластеризовался совместно с атлантическим штаммом GeoB 335 с высокими значениями поддержек узла (1.0 PP/99 BP/100 BP). Криптическая природа всех известных членов видового комплекса *S. trochoidea*, высокая степень различий между ними и достоверно высокие значения сгруппировавшихся клад на дереве могут указывать на таксономическую

самостоятельность этих видов. Это подкрепляется и отсутствием где-либо ещё в мире зарегистрированных подобных АВ-2010 и GeoВ 335 риботипов. Видовое единство этих штаммов не вызывает сомнения, однако общность всех известных на сегодня штаммов, заявленных как *S. trochoidea*, остаётся под вопросом, и очередной раз требует таксономического пересмотра состава видового комплекса.

Dinophysis acuminata

В результате анализа удалось успешно выделить и проанализировать 24 клетки с морфотипом *D. acuminata* из экологических образцов морской воды. Согласно полученным нами данным по всем анализируемым генам, последовательности проявили полную гомогенность между собой. Генный фрагмент 28S рДНК проявил 100% сходство со всеми представителями видового комплекса *D. acuminata*. ITS регион считается наиболее эффективным генным маркером для видовой дифференциации рода. Тем не менее, как в ранних исследованиях, так и в отношении анализа с DARU-13 не позволил в полной мере разрешить межвидовые отношения в комплексе *D. acuminata*. Последовательности оказались идентичны между видами *D. acuminata*, *D. ovum* и *D. sacculus*. На филогенетическом дереве (Рисунок 5) показано, что последовательности *D. acuta* и *D. dens* сформировали две независимые субклады внутри видового комплекса. Попарное сравнение последовательностей видов рода *Dinophysis* выявило, что риботип *D. acuminata* DARU-13 из Амурского залива наиболее близок к риботипам из Франции, Великобритании и Испании с величиной генетической дифференциации 0.017.

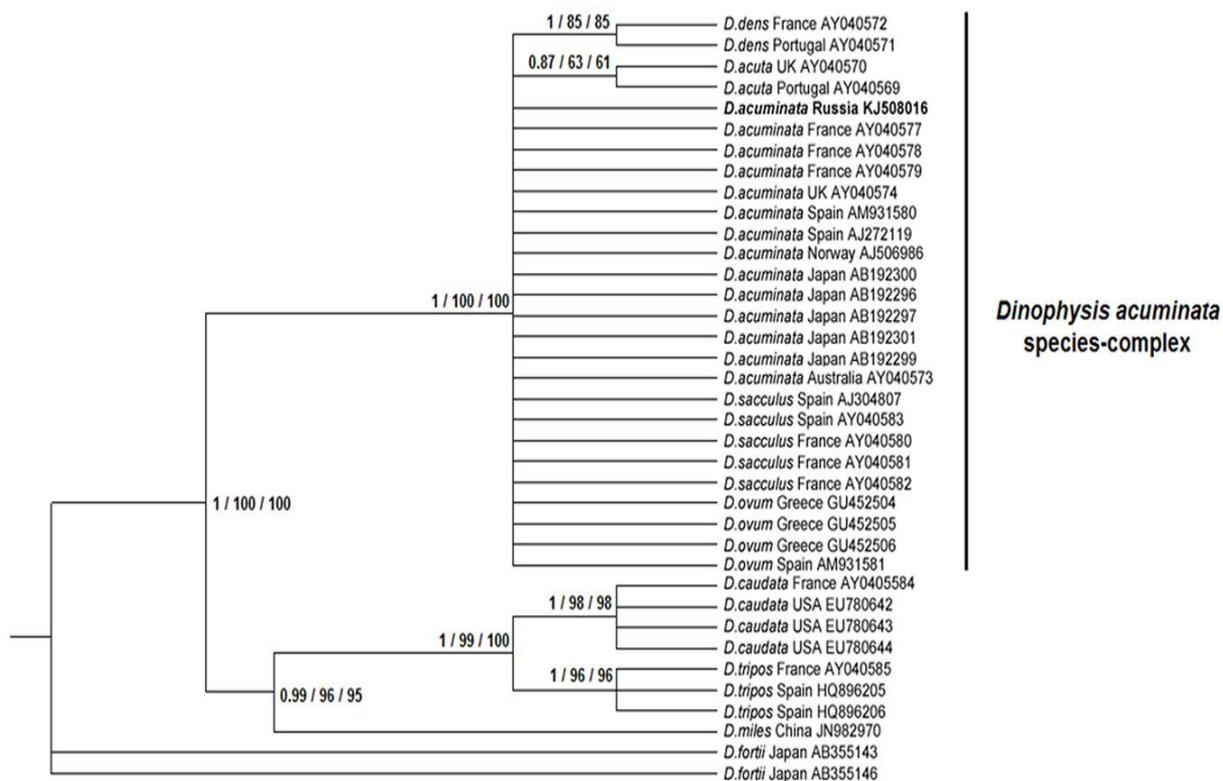


Рисунок 5 – Филогенетическое положение *Dinophysis acuminata* DARU-13 (выделен жирным) в роде *Dinophysis*, определённое по последовательностям ITS-региона (ITS1–5.8S рДНК–ITS2) на основе BI, NJ и ML. Достоверность топологии представлена поддержками ветвей BI/NJ/ML, соответственно.

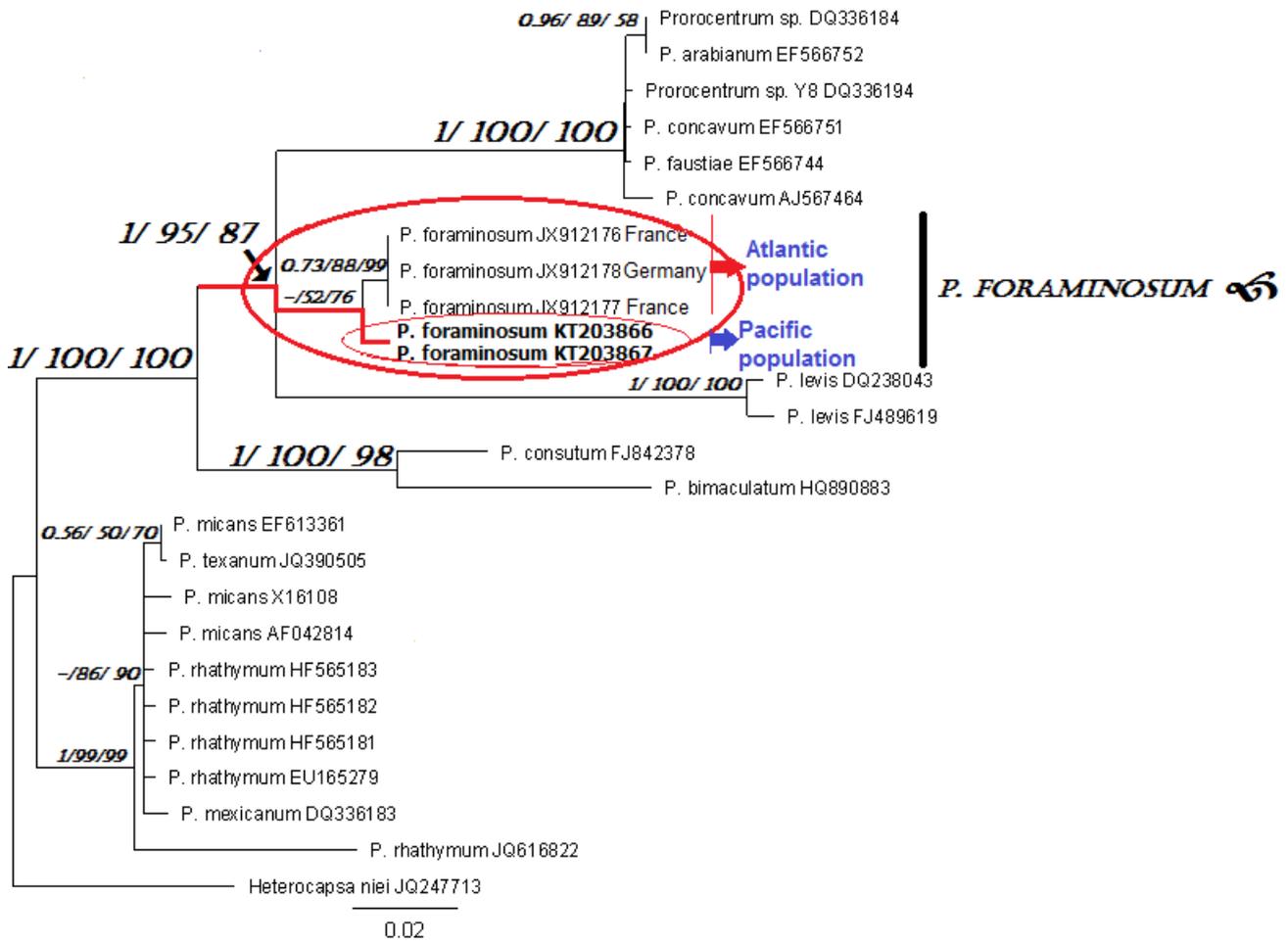


Рисунок 7 – Реконструкция филогенетического положения и связей представителей рода *Prorocentrum* по D1-D2 региону 28S рДНК на основе алгоритма ML. Цветом выделена область кластеризации атлантической и тихоокеанской популяций *Prorocentrum foraminosum*. Жирным шрифтом выделены последовательности тихоокеанской популяции из Японского моря.

В результате работы также были получены первые для *P. foraminosum* последовательности к D8-D10 региону 28S рДНК и участку ITS1–5.8S рДНК–ITS2, имеющие высокую разрешающую способность для дифференциации низкого таксономического уровня (вид, штамм). Анализ участка ITS1–5.8S рДНК–ITS2 ограничился лишь частью 5.8S рДНК (111 п.н.), поскольку процедура выравнивания была затруднена из-за высокой степени полиморфизма внутренних транскрибируемых спейсеров между видами и отсутствием полных последовательностей данного гена у большинства видов из генного банка. Средняя величина p -расстояния между тихоокеанским *P. foraminosum* и наиболее близким к нему видом *P. levis* по гену 5.8S рДНК составила 0.045, что в 1.5 раза ниже величины $p=0.067$ между *P. foraminosum* и видом-двойником *P. lima*.

Tisochrysis lutea

Согласно результатам анализа генов, кодирующих 18S рДНК, полученные последовательности исследуемого клона *Prymnesium* sp., штамм Vostok08, составляют единую филогенетическую группу внутри рода *Tisochrysis* с поддержками ветвей 1/99/100 (BI/ML/NJ, соответственно) (Рисунок 8).

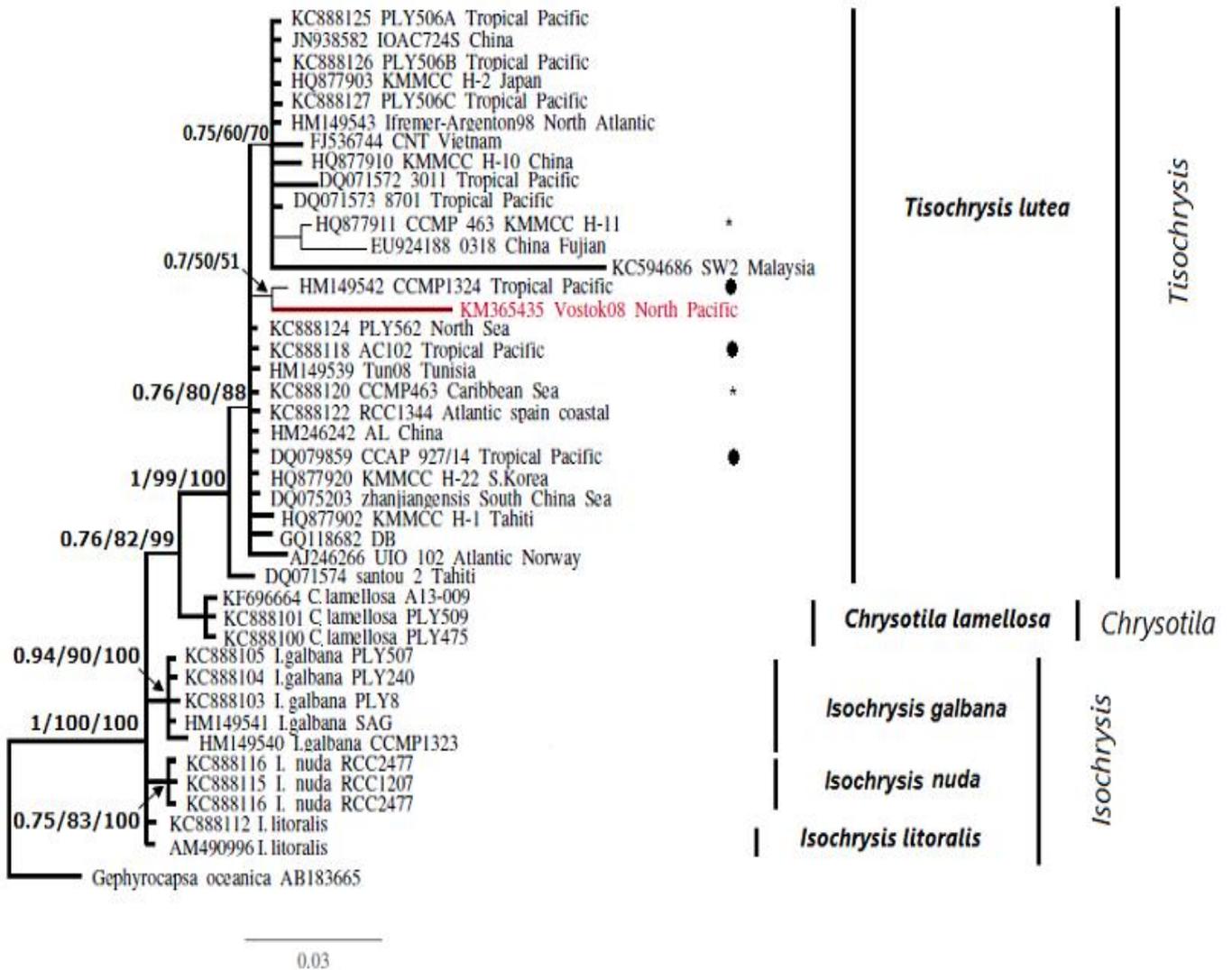


Рисунок 8 – Байесовское консенсусное филогенетическое дерево, реконструированное по фрагменту гена 18S рДНК представителей *Isochrysidiales*. На ветвях указаны апостериорные вероятности (PP) для ВІ анализа, значения бутструп индексов, превышающие 50% для ML и NJ анализов. Длина ветвей пропорциональна числу нуклеотидных замен на сайт. Клоны одной линии отмечены одинаковыми символами.

Результаты продемонстрировали наибольшее сходство гена 18S рДНК исследуемого клона с таковым вида *T. lutea* CCMP1324 (T-ISO, 1977 г., о. Таити, южная Пацифика). В роде *Tisochrysis* описан единственный вид *T. lutea* (Bendif et al., 2013). Однако, анализ по 18S рДНК на основе методов ВІ, ML выявляет явную дифференциацию последовательностей в общей кладе *Tisochrysis*.

Топология деревьев по 18S рДНК в основном соответствовала ML/ВІ дереву, приводимому в работе Бендифа и соавторов (Bendif et al., 2013). С высоким уровнем поддержки отделяется штамм santou 2 (Tahiti). Все остальные проанализированные штаммы *T. lutea* на представленных филограммах распределились в 2 субклады внутри общей клады также с высоким уровнем поддержки. Внутри клады в ряде случаев обнаруживается достаточно высокий уровень дифференциации на основе расчетов генетических дистанций по 18S рДНК, 28S рДНК и ITS1–5.8S рДНК–ITS2, и они близки к межвидовым различиям. Средние

генетические расстояния между *T. lutea* и другими видами *Isochrysidiales* по генам 18S, 28S (D1-D2), гену 5.8S рДНК и участка ITS1–5.8S рДНК–ITS2 представлены в таблице.

Таблица – Средние генетические расстояния (p) \pm стандартное отклонение (S.d.) между *Tisochrysis lutea* и другими видами *Isochrysidiales* по генам 18S, 28S (D1-D2), гену 5.8S рДНК и участка ITS1–5.8SpДНК–ITS2

№	Вид/ клада	<i>Tisochrysis lutea</i>			
		18S рДНК (726 п.н.)	28S рДНК (D1-D2) (547 п.н.)	5.8S рДНК (166 п.н.)	ITS-регион (462 п.н.)
1	<i>Isochrysis nuda</i>	0.009 \pm 0.003	-	-	-
2	<i>Isochrysis litoralis</i>	0.011 \pm 0.003	0.062 \pm 0.011	-	-
3	<i>Isochrysis galbana</i>	0.013 \pm 0.004	0.053 \pm 0.010	0.034 \pm 0.013	0.192 \pm 0.018
4	<i>Chrysotila lamellosa</i>	0.010 \pm 0.003	0.053 \pm 0.010	-	-
5	<i>Gephyrocapsa oceanica</i>	0.026 \pm 0.005	-	-	-

Примечание: «-» – данные отсутствуют

Можно предполагать, что в данном случае мы имеем дело с криптическими видами. Но, для подтверждения этого недостаточно данных по другим молекулярным маркерам, ITS1–5.8S рДНК–ITS2 и/или 28S рДНК (D1-D2) для большинства штаммов, представленных в геномном банке. Против такого предположения свидетельствует также тот факт, что не обнаруживается какой-либо зависимости между кластеризацией штаммов и их географической принадлежностью. Так, например, в обе субклады на рисунке 8 и группы риботипов на рисунке 9 входят как атлантические, так и тихоокеанские штаммы. Высокий уровень внутривидовой гетерогенности может быть обусловлен спецификой условий культивирования микроводорослей. Так, многие генные последовательности, депонированные под разными штаммовыми маркировками, являются синонимами, и принадлежат клонам либо от общей аутентичной культуры T-Iso, выделенной Хейнс (Hanes, 1977), либо выделенной Глэйзер (Glazer, 1985). При сравнительном анализе последовательностей из геномного банка были отмечены различия между последовательностями таких клонов. Так, однонуклеотидные замены присутствуют в 18S рДНК штаммов AC102 (KC888118)/CCAP 927/14 (DQ079859) и CCMP1324 (HM149542) Hanes, 1977, с дифференциацией между ними = 0.001. Еще более высокий уровень различий наблюдается между последовательностями штамма CCMP463 (HQ877911 и KC888120) Glazer, 1985, равный 0.004, что больше межвидового уровня относительно двух других видов: *I. galbana* (HM14954)/*I. litoralis* (KC888112) ($p = 0.003$). Таким образом, последовательности от одного клона попадают в разные субклады, которые на сети риботипов относятся к двум разным вариантам. Можно предположить, что различия между клонами общей материнской линии могут являться результатом самого процесса культивирования на базах коллекций различных институтов и, соответственно, зависят от продолжительности и условий поддержания клона с момента выделения в самостоятельную культуру. Ранее отмечались случаи значительной фенотипической и генетической изменчивости клеток от одного клонового штамма в процессе культивирования микроводорослей, включая полную утрату некоторых функциональных генов (Lakeman et al., 2009). При построении сети риботипов было выявлено значительное преобладание двух основных групп (Рисунок 9) включающих 10 и 7 последовательностей, соответственно. Оставшиеся 11 производных риботипов оказались синглетными, 3 из которых (штаммы Vostok08, SW2 и 0318) показали значительную удаленность от большинства. Однако распределение даже центральных

риботипов не зависело от географической принадлежности (это видно по цветовому распределению последовательностей на рисунке 9, соответствующих географической принадлежности на карте – Рисунок 10).

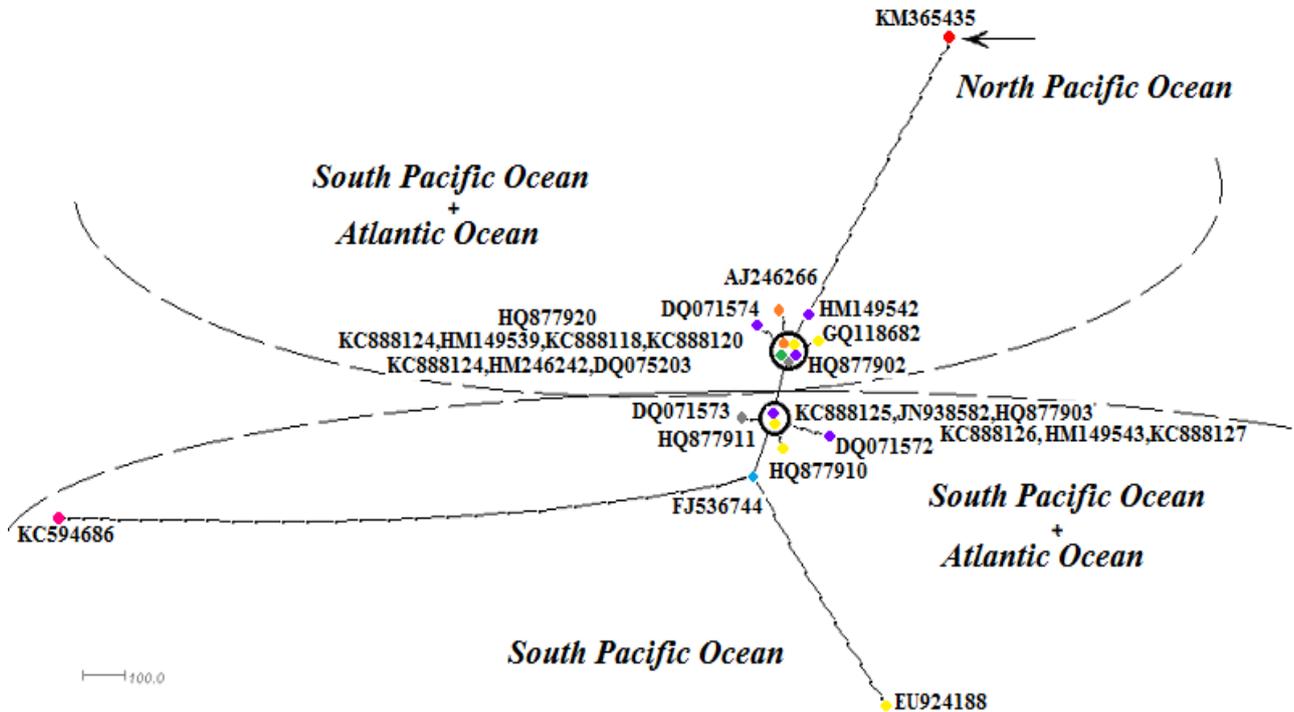


Рисунок 9 – Сеть риботипов 18S рДНК *Tisochrysis lutea* построенная по методу median-joining. Стрелкой указано положение штамма Vostok08. Цвет узла соответствует определённому региону на карте (рисунок10). Каждый узел представляет отдельный риботип, размер которого пропорционален числу вошедших в него последовательностей.

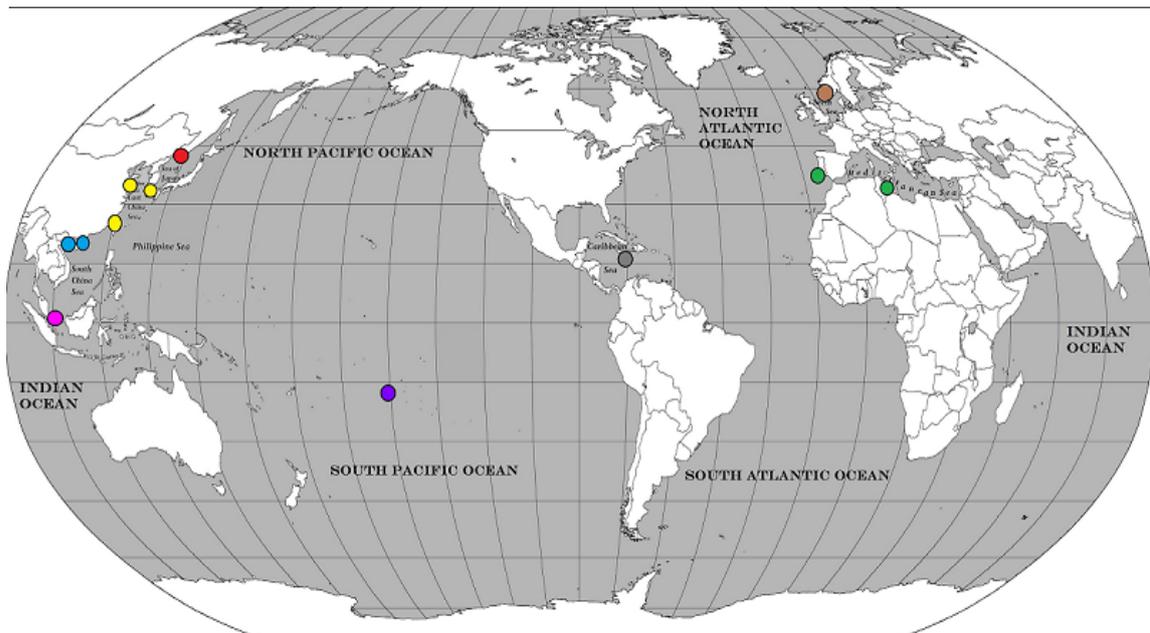


Рисунок 10 – Географическое распределение известных штаммов *Tisochrysis lutea* в Мировом океане. Анализируемые образцы отмечены цветом соответственно их географической принадлежности: красный – Японское море, фиолетовый – район о. Таити, жёлтый – Жёлтое + Восточно-Китайское моря, голубой – северная часть Южно-Китайского моря, розовый – южная часть Южно-Китайского моря (Вьетнам), зелёный – Средиземноморский регион, коричневый – Северное море, серый – Карибское море.

Porphyridium purpureum

На основании проведенных исследований было установлено, что клоны PC-85, PP-AB11 и PP-V08, содержащиеся в коллекции ИБМ, принадлежат одному виду *Porphyridium purpureum*. Согласно анализу генетических расстояний по 18S рДНК, *P. purpureum* существенно дифференцировался от других видов рода *Porphyridium*: *P. sordidum* и *P. aerugineum*, которые, в свою очередь, оказались более близки к *Flintiella sanguinaria* со средней величиной генетической дивергенции 0.04 между видами разных родов: *P. sordidum*/*F. sanguinaria* (что на межвидовом уровне в случае видов одного рода *P. aerugineum*/*P. sordidum*) и 0.049 для *P. aerugineum*/*F. sanguinaria*.

На основе Байесова и ML анализов (Рисунок 11) показано, что исследуемые клоны *P. purpureum* с высокой статистической поддержкой (1/100) сформировали общую кладу с *P. purpureum* IAM-R (Япония) и *P. purpureum* UTEX 637. Далее наблюдается дивергенция *P. sordidum* (0.99/60), от ветви которого отделяется клада *P. aerugineum* с апостериорной вероятностью 1/75. Неясности в BI и ML топологиях вызывает положение клады *F. sanguinaria* и *Timspurckia oligopyrenoides* с низкой поддержкой узла 0.63/50 и наблюдаемыми генетическими дистанциями относительно видов рода *Porphyridium*. Таким образом, оказалось, что топология филогенетического дерева на основе метода ближайшего связывания не соответствовала BI и ML топологиям. Основное отличие топологий состояло в положении *F. sanguinaria* и *T. oligopyrenoides* относительно представителей рода *Porphyridium*. В NJ-древе *F. sanguinaria* и *T. oligopyrenoides* дифференцировались внутри клады *Porphyridium*, которая, отделяясь от *P. sordidum*, стала основой для дивергенции *P. purpureum*. В результате на филограмме наблюдалось чёткое разделение клады на 2 субклады: собственно *P. purpureum* и кладу, образованную четырьмя видами трёх родов: *P. aerugineum*, *P. sordidum*, *F. sanguinaria* и *T. oligopyrenoides*.

Уровень внутривидовой генетической дивергенции *P. purpureum* по гену ITS-региона согласуется с тем же уровнем по гену 18S рДНК. Наименьшее усреднённое значение межродовой *p*-дистанции составило 0.085 (0.077–0.094) *Porphyridium* относительно рода *Ahnfeltia*. Дивергенция между *Porphyridium* и отделом Chlorophyta оказалась на межродовом уровне, выявленная с родом *Batrahospermum* и составила 0.137 (0.128–0.146), а с родом *Sirodotia* оказался ещё выше – 0.146 (0.137–0.155). Между видами родов *Lemanea* и *Paralemanea*, а также внутри рода *Ahnfeltia* не обнаружилось генетической изменчивости по анализируемому участку ITS-региона. Вероятно, высокий уровень внутривидовых различий у *P. purpureum* по гену ITS-региона и 18S рДНК свидетельствует о существенных эволюционных преобразованиях генома этого вида по сравнению с другими представителями отдела Rhodophyta, а также отдела Rhodophyta по сравнению с отделами Cryptophyta и Chlorophyta.

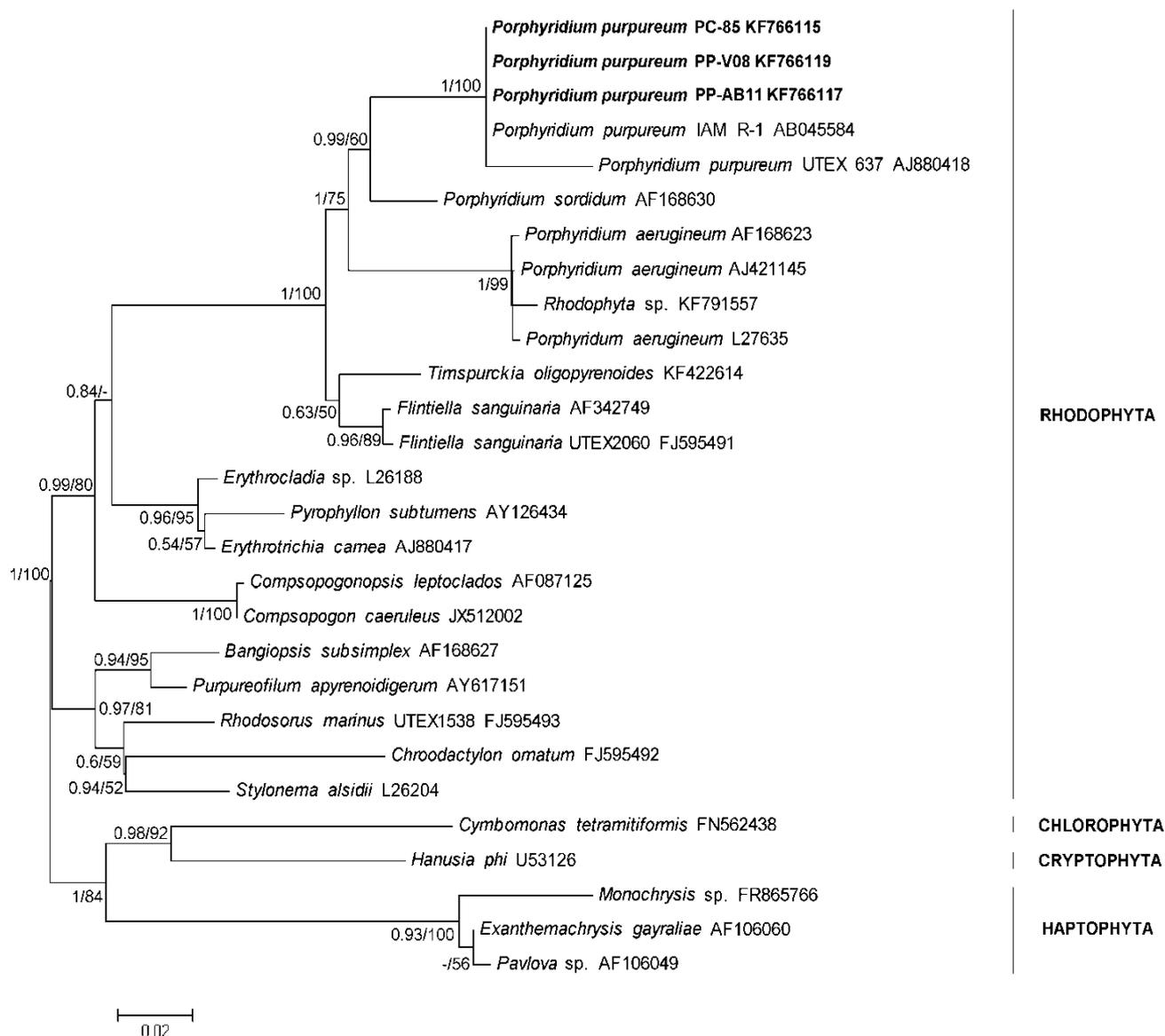


Рисунок 11 – Байесовское консенсусное филогенетическое дерево, основанное на данных 18S рДНК представителей Rhodophyta. В качестве внешних групп включены последовательности представителей отделов Haptophyta, Chlorophyta и Cryptophyta. На ветвях указаны апостериорные вероятности (PP) для ВІ анализа и значения бутстреп индексов, превышающие 50% для ML анализа. Жирным шрифтом выделены анализируемые культуры.

Cyanobacteria

Генетическая идентификация цианобактериального изолята Суано АВ-2014 была осуществлена методом определения нуклеотидной последовательности специфического для цианобактерий фрагмента 16S рДНК, с последующим сравнением её идентичности с последовательностями из GenBank, а также построением филогенетических деревьев с последовательностями референтных штаммов. На основе молекулярно-генетического анализа была подтверждена предполагаемая принадлежность изолята к типу Cyanobacteria. По номенклатуре бактерий (Castenholz, 2001): Субсекция III (Царство Bacteria, Порядок Oscillatoriales, Род *Leptolyngbya*). Согласно ботанической номенклатуре (www.algaebase.org, www.cyanodb.cz/Leptolyngbya): Отдел Cyanobacteria, Класс Cyanophyceae, Порядок

Pseudanabaenales, Семейство Pseudanabaenaceae, Род *Leptolyngbya*. Филогенетический анализ выявил общую кластеризацию исследуемого таксона с неидентифицируемыми видами родов *Leptolyngbya* и *Phormidium*, а также в целом порядка Oscillatoriales, взятых из GenBank. Максимальная степень гомологии полученных последовательностей в 97% по базе NCBI выявлена к последовательности AB058219 *Phormidium* sp. MBIC10070 из коллекции Морского биотехнологического института Японии, MBIC (Marine Biotechnology Institute Culture (collection)), информация по морфологии которого оказалась не доступна. Изолят продемонстрировал также 96% степень сходства с ископаемой неидентифицированной цианобактерией – штамм A11 (GQ484044), из микробильного состава розовых тромболитовых матов из Багамских островов, возрастом 1.92 млрд. лет. Филогенетические деревья, построенные тремя различными методами, имели частично сходную топологию, различия обнаруживались в кластеризации исследуемой нами Суано АВ-2014 с близкородственными видами из базы NCBI между VI и ML/NJ деревьями (Рисунок 12).

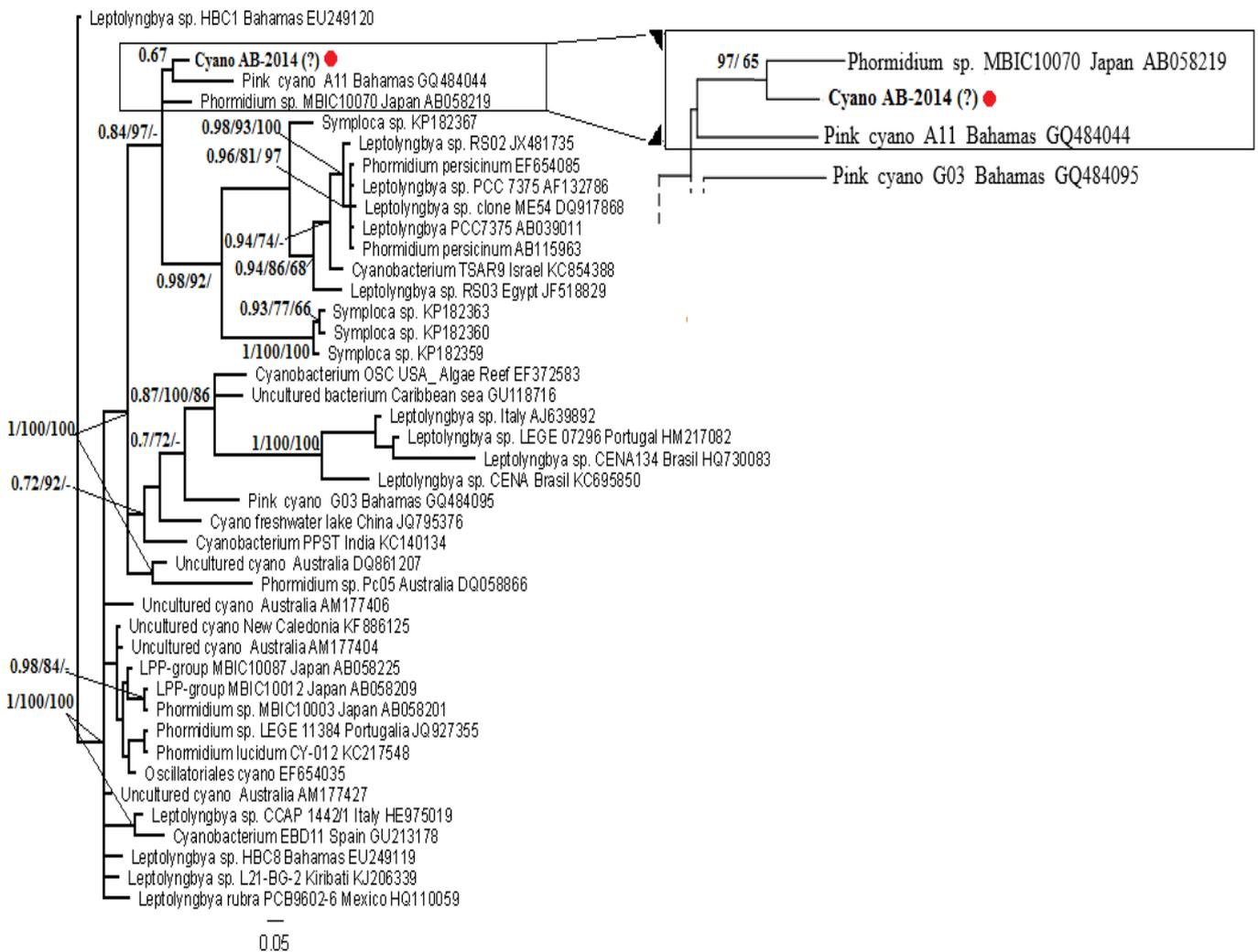


Рисунок 12 – Филогенетическое положение *Cyano* АВ-2014, основанное на данных 16S рДНК ближайших представителей порядка Oscillatoriales. На ветвях указаны апостериорные вероятности (PP) для VI анализа и значения бутструп поддержек (BP/BP), превышающие 50% для ML и NJ. Прямоугольником отмечена область VI-дерева и показана соответствующая ей область с несогласующейся топологией в ML/NJ-деревьях.

Согласно VI реконструкции, исследуемый изолят кластеризовался со штаммом A11 в общую субкладу, которая была базальной для ветви *Phormidium* sp. MBIC10070. Напротив, в ML/NJ деревьях Суано АВ-2014 группировался сначала с *Phormidium* sp. MBIC10070, затем от полученной клады ответвлялась последовательность штамма A11. Низкие поддержки данных субклад могут быть обусловлены недостаточной репрезентативностью, короткой длиной (602 п.н.) и разнообразием последовательностей (Банникова, 2004).

Род *Leptolyngbya* Anagnostidis et Komárek (1988) является слишком общим родом с большим количеством описанных видов (около 80), каждому из которых необходим таксономический пересмотр с определением отличительных особенностей. Недостаточность или отсутствие опубликованной информации по морфологии, экологии и генетике для сравниваемых культур, а также отсутствие сложившейся систематики и слабоизученность порядка Oscillatoriales ограничивает проведение сравнительного анализа. Более того, корректная идентификация цианопрокариот родов *Lyngbya*, *Phormidium*, *Plectonema* и *Leptolyngbya* на основании фенотипических признаков затруднительна из-за их внутривидовой морфологической гетерогенности и межвидового сходства с представителями других родов. Тем не менее, полученные данные достаточны для того, чтобы определить предварительное таксономическое положение изолята, цветения которого были впервые отмечены в Амурском заливе и сопровождались гибелью гидробионтов в аквариуме ИБМ ДВО РАН. Поскольку представители родов *Leptolyngbya* и *Phormidium* относятся к группе экологически опасных видов, результаты анализа будут необходимы для процедур ведения ежегодного экологического мониторинга за ВЦВ акватории Амурского залива.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы с помощью молекулярно-генетических методов с использованием анализа генов рДНК были проанализированы лабораторные культуры, отдельно отобранные из них клетки, а также клетки, отобранные из экологических образцов морской воды. В соответствии со сложившейся на сегодняшний день систематикой видовой статус удалось определить для токсичной динолагелляты *Prorocentrum foraminosum*, гаптофитовой микроводоросли *Tisochrysis lutea* и красной водоросли *Porphyridium purpureum*, имеющих высокий биотехнологический потенциал. Видовые статусы в рамках видовых-комплексов были определены для динофлагеллят *Scrippsiella trochoidea* и *Dinophysis acuminata*. Из-за отсутствия сложившейся систематики и нахождения цианобактериальной группы «LLP» на этапе ревизии, таксономическая принадлежность цветений цианобактериального изолята из аквариума института (куда подача воды осуществляется из Амурского залива) определена до уровня рода *Leptolyngbya/Phormidium*.

Аналогичные таксономические неясности у динофлагеллят рода *Ostreopsis* в ряде исследований привели к оперированию условными обозначениями «*Ostreopsis* sp.1» и «*Ostreopsis* sp.2» для выведенных ОТЕ как альтернативы видовым названиям. Тем не менее, примененные в настоящей работе методы молекулярного клонирования и анализ на основе одной клетки позволили обнаружить, что генные фрагменты 28S рДНК и ITS-региона *Ostreopsis* sp. ORUS, проявившие высокую степень сходства к последовательностям этих ОТЕ,

находятся в составе одного и того же генома в изолятах из Японского моря. Это обнаружение опровергает выводы, сделанные в работе Sato et al., 2011 на основе полиморфизма 28S рДНК и ITS-региона между исследуемыми пробами, о таксономической самостоятельности «*Ostreopsis* sp.1» и «*Ostreopsis* sp.2», которые, по их мнению, являются новыми видами. Ранее поставленный с помощью традиционных микроскопических методов таксономический статус в качестве *O. cf. ovata* не подтвердился молекулярно-генетическими методами. Известные видо-специфические праймеры к ITS-региону для видов рода *Ostreopsis* не позволили амплифицировать тот же участок у исследуемых культур и клеток *Ostreopsis* spp. из б. Соболь Японского моря. Анализ секвенированных последовательностей также не обнаружил высокой степени сходства с последовательностями, заявленными в GenBank как *O. ovata*. В связи с обнаруженным явлением внутригеномной гипервариабельности 28S рДНК и ITS-региона и статусе ревизии рода *Ostreopsis* на сегодняшний день, таксономическая принадлежность изолятов ORUS из Японского моря не может быть отнесена ни к одному из 9 описанных видов рода.

Несмотря на разные районы происхождения и возраст, клоны культур PC-85, PP-AB11 и PP-V08 вида *Porphyridium purpureum*, содержащиеся в коллекции ИБМ ДВО РАН, полностью идентичны друг другу по трём исследуемым рибосомным генам, в отличие от гаптофитовых и динофлагеллят. Обнаруженные отличия по гену 18S рДНК и ITS-региону между анализируемыми культурами и опубликованными данными в GenBank по виду *P. purpureum* могут свидетельствовать о существенных эволюционных преобразованиях генома этого вида по сравнению с другими представителями отдела Rhodophyta.

Некоторые последовательности генов рДНК, впервые полученные для того или иного изученного вида, смогут помочь в реализации таксономического упорядочения и изучении родственных связей, а также в прослеживании эволюции данных генов.

Несмотря на то, что в работе не для всех изученных объектов удалось определить видовой статус, нами показано, что исследуемые рибосомальные гены яДНК в этом отношении имеют бóльшую разрешающую способность, в отличие от традиционных методов. Тем не менее, данные гены не могут быть использованы в качестве филогеографических маркёров для изучения внутривидовых различий у исследуемых одноклеточных организмов по одной или нескольким причинам: 1) из-за отсутствия внутривидовых различий; 2) из-за существенных различий, наблюдаемых между исследуемыми клонами общей линии, оказывающихся бóльше, чем при внутривидовом сравнении разных линий; или 3) из-за наличия внутригеномной гипервариабельности.

Практические рекомендации:

1. Выявленный внутригеномный множественный аллелизм 28S рДНК и ITS-региона – генов, рекомендуемых и используемых в экологическом мониторинге за контролем потенциально-опасных динофлагеллят рода *Ostreopsis*, ставит под сомнение результаты исследований, поскольку ведёт к качественной и количественной переоценке разнообразия, особенно это касается метагеномного анализа, а также некоторых исследований на основе количественной ПЦР. Необходимо более внимательно анализировать и с осторожностью интерпретировать полученные данные исследований на основе генов рДНК.

2. Первые нуклеотидные последовательности ITS-региона и D8-D10 региона 28S рДНК для *P. foraminosum*, совместно с полученными данными по генам 18S рДНК и D1-D2 региону 28S рДНК для тихоокеанской популяции, позволяет разработать экспресс-метод идентификации этого вида и штамма в среде.

ВЫВОДЫ

1) На основе анализа нуклеотидных последовательностей ядерных рибосомных генов установлены или подтверждены таксономические статусы 35 монокультур водорослей из коллекции культур морских микроводорослей Института биологии моря ДВО РАН, а также отдельных клеток динофлагеллят, гаптофитовых, одноклеточных красных водорослей и цианобактерии из проб морской воды.

2) Установлено, что виды *Prorocentrum foraminosum*, *Tisochrysis lutea* и *Porphyridium purpureum* являются новыми для Японского моря и морей России в целом.

3) Впервые в Японском море идентифицирован вид токсичной динофлагелляты *Prorocentrum foraminosum*. Таким образом, выявлена вторая (третья локальная) популяция вида в мире и первая для Тихого океана. Определены первые нуклеотидные последовательности ITS-региона и D8-D10 региона 28S рДНК для вида, которые совместно с полученными данными по генам 18S рДНК и D1-D2 региону 28S рДНК, позволяют разработать экспресс-метод идентификации этого вида/штамма в среде.

4) Полученные результаты по нуклеотидной последовательности гена 16S рДНК подтверждают тесное генетическое родство цианобактерии из Амурского залива с представителями рода *Leptolyngbya/Phormidium*.

5) Видовая принадлежность изолятов *Ostreopsis* sp. ORUS из Японского моря не может быть отнесена ни к одному из 9 описанных на сегодняшний день видов рода.

6) Впервые в культурах и клетках динофлагеллят рода *Ostreopsis* обнаружена внутригеномая гипервариабельность копий генов 28S рДНК и ITS-региона. Выявлено, что уровень различий по каждому гену соотносится с видовым. Обнаруженные в пределах одного генома варианты D1-D2 28S рДНК и ITS-региона опровергают самостоятельный таксономический статус «*Ostreopsis* sp.1» и «*Ostreopsis* sp.2», ранее условно обозначенных в литературе в качестве разных операционных таксономических единиц.

7) Внутригеномное разнообразие последовательностей 28S рДНК (D1-D2) и ITS-региона у *Ostreopsis* sp. ORUS не может быть объяснено ни различиями в дате сбора, ни местом сбора, ни продолжительностью культивирования, ни типом образца (культивированные биомассы, индивидуальные клоны культур и единичные свежееотобранные клетки).

8) Выявлено, что гены рДНК у видов рода *Ostreopsis*, а также *Scrippsiella trochoidea*, *Dinophysis acuminata*, *Tisochrysis lutea* и *Porphyridium purpureum* не позволяют анализировать внутривидовые различия на филогеографической шкале.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. **Ефимова К.В.**, Крещеновская М.А., Айздайчер Н.А., Орлова Т.Ю. Генетическое и ультраструктурное исследование трёх клонов *Porphyridium purpureum* (Bory de Saint-Vincent, 1797) Drew et Ross, 1965 (Rhodophyta) из коллекции морских микроводорослей Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН // Биология моря. 2014. Т. 40, № 5. С. 373–383.
2. Kameneva P.A., **Efimova K.V.**, Rybin V.G., Orlova T.Yu. Detection of dinophysistoxin-1 in clonal culture of marine dinoflagellate *Prorocentrum foraminosum* (Faust M.A., 1993) from the Sea of Japan // Toxins. 2015. Vol. 7, № 10. P. 3947–3959.
3. Orlova T.Yu., Kameneva P.A., Stonik I.V., Morozova T.V., **Efimova K.V.**, Moore L., Eberhart B.-T.L., Wells M.L., Trainer V.L. Diarrhetic shellfish toxins in Primorsky Krai, Russia // Journal of Shellfish Research. 2015. Vol. 34, № 3. P. 1–10.

Работы в других журналах и в материалах конференций:

4. **Efimova K.V.**, Orlova T.Yu., Brykov V.I.A. Phylogenetic characterization of cryptic species of the marine dinoflagellate, *Ostreopsis* sp. Schmidt, 1902, from Russian coastal waters, the Sea of Japan // Journal of Biodiversity and Environmental Sciences. 2014. Vol. 5, № 4. P. 317–332.
5. **Ефимова К.В.** Первые молекулярно-генетические данные по кластеру рибосомных генов яДНК морской токсичной микроводоросли *Ostreopsis* sp. из залива Петра Великого (Японское море) // Актуальные проблемы биологических наук. Материалы I Межрегиональной молодёжной школы-конференции, 13–18 мая 2013 г., Владивосток. – Владивосток: «Русский Остров», 2013. С. 96–101.
6. **Ефимова К.В.** Молекулярно-генетическая характеристика криптических видов морских токсичных динофлагеллят *Ostreopsis* sp. (Schmidt, 1902) из российских вод японского моря // Сборник тезисов VI Всероссийского с международным участием Конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз–Россия 2013». Материалы образовательной школы «Новый взгляд на актуальные проблемы биологии и медицины», 19–23 августа 2013 г., Иркутск. – Иркутск: ООО «Издательство «Аспринт», 2013. С. 270–272.
7. **Ефимова К.В.**, Брыков Вл.А. Идентификация и сравнительный молекулярно-генетический анализ микроводорослей *Porphyridium purpureum* из Японского моря // Тезисы докладов VI Съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы, 15–20 июня 2014 г., г. Ростов-на-Дону. – Новосибирск: ФГУП «Издательство СО РАН», 2014. С. 24.

Ефимова Ксения Владимировна

Молекулярная идентификация и особенности генетического разнообразия цианобактерий и
одноклеточных водорослей акватории Японского моря

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук