

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Ефимова Ксения Владимировна

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

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор
Брыков Владимир Алексеевич

Владивосток – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Характеристика исследуемых объектов.....	13
1.2. Основные характеристики и особенности исследуемых групп водорослей.....	15
1.2.1. <i>Ostreopsis</i> Shmidt, 1902.....	19
1.2.2. <i>Scripsiella trochoidea</i> (Stein) Balech ex A.R and Loeblich III, 1976.....	23
1.2.3. <i>Dinophysis</i> Ehrenberg, 1839.....	24
1.2.4. <i>Prorocentrum</i> Ehrenberg, 1834.....	26
1.2.5. Гаптофитовые водоросли (Haptophyta), или Примнезиофиты – Prymnesiophyta.....	27
1.2.6. Красные водоросли (Rhodophyta): <i>Porphyridium purpureum</i> (Bory de Saint-Vincent) K.M.Drew et R.Ross, 1965.....	29
1.2.7. Отдел Цианобактерии (Cyanobacteria, Cyanophyta, Cyanoprokaryota)	30
1.3. Степень изученности и проблематика молекулярно-генетической идентификации у микроводорослей и цианобактерий.....	34
1.4. Молекулярно-генетические маркёры в идентификации и установлении родственных связей морских микроводорослей и цианобактерий.....	41
1.5. Методы, используемые в установлении родственных связей и филогенетического положения у микроводорослей и цианобактерий...	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Материал исследования.....	56
2.2. Выделение ДНК.....	56
2.2.1. Выделение ДНК с применением СТАВ по Doyle, Doyle (1990) с модификациями.....	56
2.2.2. Выделение ДНК на основе HotSHOT.....	61
2.2.3. Выделение ДНК на основе хелатирующей смолы Chelex® 100...	61

2.2.4. Выделение ДНК из одной клетки «single-cell»	62
2.3. ПЦР.....	63
2.4. Электрофорез в агарозном геле.....	65
2.5. Приготовление компетентных клеток <i>Escherichia coli</i> для молекулярного клонирования.....	66
2.6. Молекулярное клонирование.....	68
2.7. Секвенальная реакция.....	70
2.8. Редактирование и сборка хроматограмм, выравнивание последовательностей.....	71
2.9. Парное и множественное выравнивание последовательностей.....	72
2.10. Реконструкции филогенетических деревьев.....	72
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	76
3.1. <i>Ostreopsis</i> sp. ORUS.....	76
3.2. <i>Scrippsiella trochoidea</i>	86
3.3. <i>Dinophysis acuminata</i>	89
3.4. <i>Prorocentrum foraminosum</i>	90
3.5. <i>Tisochrysis lutea</i>	97
3.6. <i>Porphyridium purpureum</i>	103
3.7. Cyanobacteria.....	107
3.8. Возможные причины внутривидовой, внутрииндивидуальной (внутригеномной) вариативности рДНК, затрудняющих молекулярно-генетический анализ микроводорослей.....	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	120
ВЫВОДЫ.....	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	125
ПРИЛОЖЕНИЯ I – XIV.....	167–184

ВВЕДЕНИЕ

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. Практически в каждом исследовании, начиная от подготовительного этапа и до его полного завершения, учитываются особенности изучаемого организма. Поэтому для эффективности проводимых исследований, верной интерпретации результатов, качественного и достоверного анализа, а также сравнения с мировыми данными необходимо знать точный статус объекта.

Специфика метаболизма ряда представителей микроальгофлоры, связанная с продуцированием метаболитов с ценными для человека свойствами, сделала микроводоросли одним из важных объектов целого ряда научных областей, особенно для биотехнологии. Однако, вместе с тем, существуют классы микроводорослей, способные синтезировать широкий спектр токсинов и антибиотиков (Hallegraeff, 2014), накопление которых в органах и тканях других организмов приводит к прямым или опосредованным патологическим явлениям в отношении конечных или промежуточных звеньев трофической цепи (Гольдин, 2013). Повышение температуры воды, негативное антропогенное загрязнение прибрежных вод и внесение с балластными водами патогенных и чужеродных видов-вселенцев способствуют массовому развитию про- и эукариотической микробиоты (Smayda, 1997). «Цветения» микроводорослей имеют различный характер и степень воздействий на экосистему, тем не менее, последствия ущерба, вызванного за короткий срок, уже приравнивают явления вредоносного цветения водорослей (ВЦВ, от «*HAB – harmful algae bloom*») к экологическим катастрофам (Zhang et al., 2014). В случае токсичных ВЦВ, установлено, что степень токсичности микроорганизма может варьировать в зависимости от его физиологического состояния и условий среды, которые являются своеобразным

триггером, стимулирующим или подавляющим продукцию токсических метаболитов. Таким образом, присутствие в среде токсигенных клеток не обязательно означает, что они несут эквивалентную угрозу, тем не менее, интегрированная детекция таких микроводорослей важна для оценки статуса ВЦВ (HARRNESS, 2005).

Эколого-флористические исследования фитопланктона дальневосточных морей России были начаты в 30-е гг. XX века. История исследования морских микроводорослей, главным образом, Японского моря приведена в следующих работах Киселева, Коноваловой и др. (Киселев, 1935; 1947; 1953; 1969; 1980; Коновалова, 1972; 1979; 1984а; 1984б; Коновалова, Орлова, 1988; 1991; Коновалова и др., 1989; Коновалова, 1998; Кусморская, 1949; 1950; Мещерякова, 1954а; 1954б; Мещерякова 1960; Орлова, 1990; Паутова, 1984; Рура, 1971; Селина, 1988; 1998; Стоник, Орлова, 1998). Позднее, когда были установлены причинно-следственные связи вспышек цветения и их негативное воздействие на здоровье животных и людей, в том числе с летальным исходом, влияние на окружающую среду и экономические потери, дальнейшие флористические исследования перешли на мониторинговый уровень. Полученные ранее материалы стали корректироваться и дополняться, появлялись работы с описанием новых видов. В итоге, параллельно с активными во всём мире флористико-систематическими исследованиями, базировавшимися только на морфологических критериях, в литературе стало увеличиваться число работ с выявлением скрытых видов и видовых комплексов. Встал вопрос о том, как действовать, когда криптические виды или клоны обнаруживаются в таксонах при экологически контролируемых исследованиях, где идентификация должна быть быстро проведена в полевых условиях, где доступ к современной молекулярной лаборатории невозможен. В связи с этим, морфологически сходные клетки стали описывать как «морфы» и тем самым относить к единому видовому комплексу (López-García et al., 2001). Такая оценка полевого материала в определённый период времени послужила причиной накопившейся неточной, либо неверной информации, поскольку стала ссылкой как на первоисточник. Тем не менее, проверить достоверность таких

исследований не представляется возможным. Однако, свидетельства того, что одни только морфологические различия (по крайней мере, рассматриваемые в традиционной таксономии) не отражают не только молекулярного разнообразия, но также и основных эволюционных событий, были получены для многих групп организмов (Caron et al., 2012).

В отношении экологического мониторинга видовая идентификация играет также ключевую роль, определяющую дальнейшую правильную оценку биоразнообразия, а далее и понимание распределения, взаимодействия всех компонентов планктонного сообщества и влияние на экосистему в целом.

Случаи вредоносного «цветения» водорослей, сопровождавшиеся отравлениями и гибелью людей и морских животных, зарегистрированы и на Дальнем Востоке РФ (Орлова, 2005). В связи с этим, на базе Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (ИБМ ДВО РАН) в 2007 году был создан Центр мониторинга вредоносных микроводорослей и биотоксичности прибрежных морских акваторий Дальнего Востока РФ. Мониторинг биоразнообразия планктона, в том числе вредоносных видов, как и во всём мире, проводится традиционными микроскопическими методами, основываясь на морфологии видов. Однако известно, что многие виды не имеют отличительных особенностей, видимых в световой, а порой и в электронный микроскопы, либо их численность в пробе недостаточна для обнаружения. Недостаточность информации, на основании которой ведется видовая идентификация, в свою очередь, может привести к ошибке и неточности в оценке обилия, тем самым препятствовать полному пониманию экологической значимости отдельных видов, соответствующего экологического прогнозирования и принятия природоохранных мер. Одной из ключевых организационно-методических принципов мониторинга является разработка экспресс-методов оценки состава компонентов, к которым уверенно можно отнести молекулярные методы диагностики (Medlin, Kooistra, 2010). Использование современных технологий, в частности – генетических методов, существенно улучшает эффективность и точность работ по сбору полевой информации о состоянии исследуемой среды.

Эта технология позволяет эффективно решать задачи, связанные со сбором качественно и количественно новой информации, необходимой для выполнения устойчивого контроля за биоразнообразием, марикультурным хозяйством, рекреационной деятельностью и охраной природы. Принимая во внимание, что Дальний Восток России является, с одной стороны, уникальным в плане морских экосистем, а с другой стороны, перспективным для развития марикультурного хозяйства, важность подобных исследований для региона очевидна.

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. В результате проведённых долгосрочных проектов ими успешно исследован состав микробиоты оз. Байкал и водохранилищ Иркутской области (Тихонова и др., 2006; Анненкова, Беликов, 2010; Белых и др., 2013), а также оз. Котокель в Республике Бурятия, Берешского водохранилища (Красноярский край) и Куршского залива Балтийского моря (Калининградская область) (Белых и др., 2013). Аналогичные исследования в отношении морей дальневосточного региона России ранее не проводились.

В результате многолетних исследований дальневосточных морей России на базе ИБМ ДВО РАН поддерживаются культуры морских микроводорослей, что позволяет изучать их жизненные циклы, особенности экологии и физиологии. 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. Тем не менее, содержащиеся в культурах клоны никогда не были рассмотрены с помощью молекулярно-генетических методов, данные которых на сегодняшний день обязательны для создания культуральных паспортов микроорганизмов, и соответственно для решения общебиологических вопросов и прикладного использования их в селекции, биотехнологии, промышленности. Более того, прогрессирующие в последние годы сезонные вспышки массовых цветений микроводорослей 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.

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 Института биологии моря им. А.В. Жирмунского, 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.

Были поставлены следующие **задачи**:

1. С использованием анализа генов рДНК провести видовую идентификацию и установить риботипы поддерживающихся в коллекции ИБМ ДВО РАН клеточных культур и 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 разнообразия 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. Получение отечественных штаммов и их точная идентификация имеют большое практическое значение для проведения прикладных и инновационных работ с использованием культур микроводорослей на территории РФ. 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. Анализ и полученные результаты будут полезны в изучении молекулярно-генетических особенностей других видов одноклеточных организмов, а также в решении проблем, связанных с идентификацией на основе морфологических характеристик, и в вопросе выбора стратегии и методов исследований представителей данных разнородных групп. Применение молекулярно-генетических методов в практике экологического мониторинга альгологических исследований акватории залива Петра Великого (Японское море) позволило перейти российским исследованиям биоразнообразия фитопланктона, в частности, видов-продуцентов токсинов и видов, вызывающих ВЦВ, на современный мировой уровень. 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. Настоящая работа была выполнена современными молекулярно-генетическими методами,

соответствующими поставленным цели и задачам. Общая стратегия исследований представлена на рисунке 1.

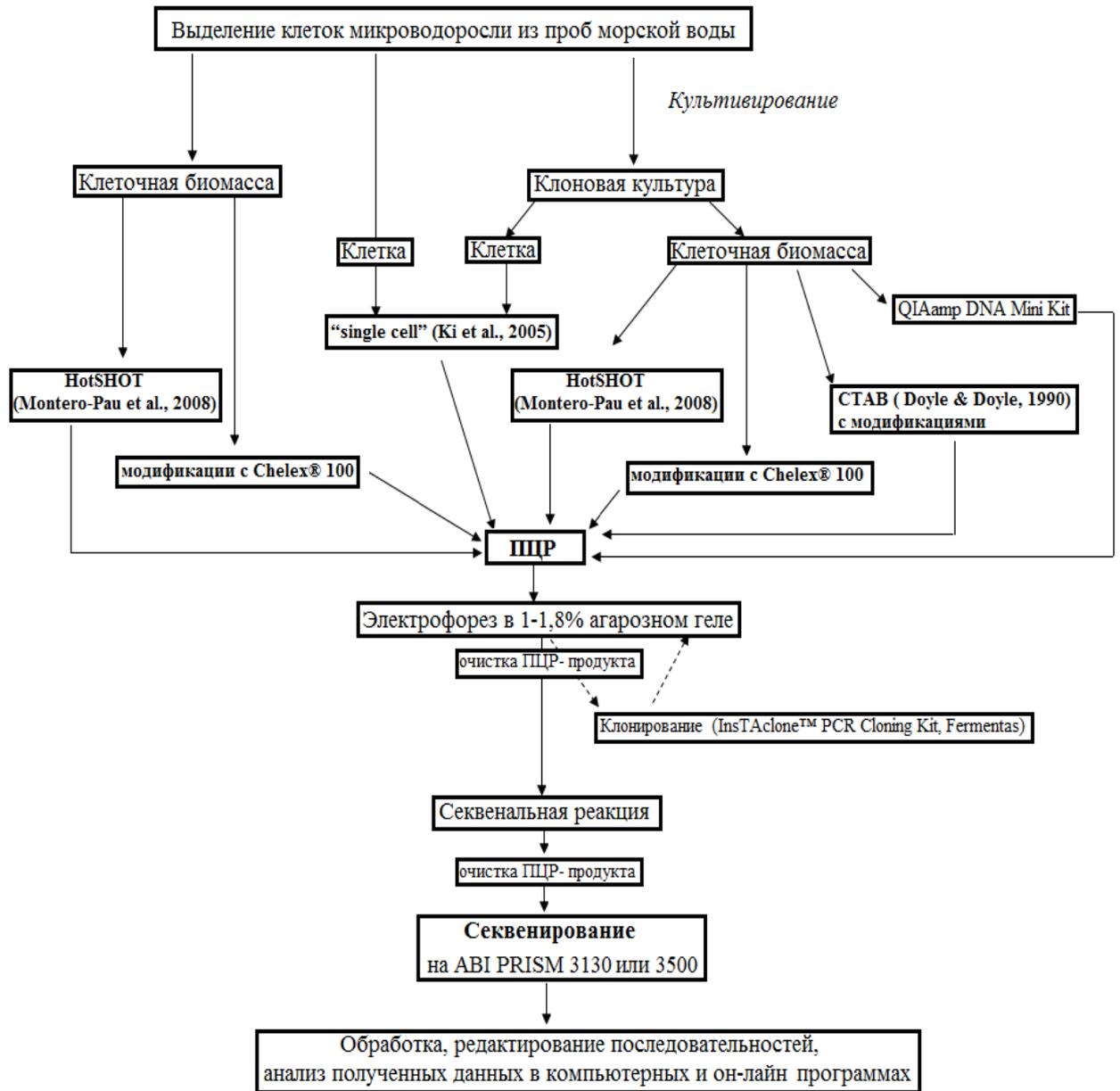


Рисунок 1 – Основные этапы проводимых исследований.

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 стандартном 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.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Виды *Prorocentrum foraminosum*, *Tisochrysis lutea* и *Porphyridium purpureum* являются новыми для Японского моря и морей России в целом.
2. Обнаруженная в пределах генома одной клетки *Ostreopsis* внутрииндивидуальная гипервариабельность копий генов 28S рДНК и ITS-региона доказывает то, что они не могут быть использованы в качестве видовых маркёров и маркёров количественного состава.
3. Гены рДНК не позволяют анализировать внутривидовые различия на филогеографической шкале у видов рода *Ostreopsis*, а также *Scrippsiella trochoidea*, *Dinophysis acuminata*, *Tisochrysis lutea* и *Porphyridium purpureum*.

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных данных 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 результатов идентификации и топологии выводимых филогенетических реконструкций.

Интерпретация результатов, научных положений и выводов подкреплена данными, приведенными в таблицах и рисунках.

Апробация результатов и публикаций. 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).

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. Работа выполнена в лаборатории генетики ИБМ ДВО РАН.

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.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика исследуемых объектов

В морских экосистемах водоросли играют ключевую роль продуцентов первичной продукции, аналогично растениям на суше, и большинство из них относятся к фитопланктону по биомассе и разнообразию (Falkowski et al., 1998). Микроводоросли широко распространены и способны к жизни практически во всех условиях и местах обитания на Земле, однако наиболее характерной для них считается водная система. В морской среде микроводоросли являются частью планктона, распределённого в толще воды, тем не менее, также они могут составлять сообщество микрофитобентоса и являться эпифитами в ассоциации с макрофитами. Питание микроводорослей варьировано, и не всегда зависит от облигатного фотосинтеза – характеристики, которая используется для разграничения «растений» и «животных» (Keith, 1816). В действительности, «микроводоросли» скорее подходят под описание «протистов» – одноклеточных эукариот, чем под описание «водорослей», к тому же многие виды способны к движению и не способны к фотосинтезу (Hawksworth, 2003). Особенно это касается динофлагеллят, классификация которых строилась ботаниками и протозоологами независимо друг от друга (Хаусман, 1988; Горбунова, 1991). Согласно данным последнего филогенетического анализа динофлагеллят выявлено, что ближайшей сестринской группой для них являются апикомплексы (Bachvaroff et al., 2014). Совокупность молекулярных, морфологических и физиологических признаков указывает на сродство и филогенетическое место динофлагеллят среди протистов. Несмотря на то, что большинство микроводорослей – одноклеточные организмы, некоторые могут формировать колонии и цепочки, или являться эндосимбионтами (Wehrtmann, Cortés, 2008). Тем не менее, большинство признаков тех и других имеют достаточно отклонений, т.е. по каким-то причинам виды или генетические линии могут

утрачивать функциональные гены, определяющие признак (Aravind et al., 2000), поэтому считать абсолютным критерием каждый из признаков не совсем верно.

В традиционной систематике водоросли относят к трём разным царствам: эубактериальные прокариоты, или Cyanobacteria (сине-зелёные цианобактерии, или цианеи, или цианопрокариоты); хромисты, Chromista (диатомовые, бурые водоросли), и протисты, Protista (зелёные, красные, динофлагелляты, эвгленовые) (Singh, 2010). В настоящее время водоросли относят к двум Царствам эукариот: Chromista и Protista, а цианеи (Cyanobacteria), ранее называемые сине-зелёные водоросли и, показавшие признаки прокариот, впоследствии были выделены из состава эукариот (Chatton, 1925). С точки зрения генетики цианеи являются бактериями, однако их способность к кислородному фотосинтезу и роль в теории эндосимбиогенеза в качестве предков хроматофоров красных водорослей, достаточно продолжительное время определяли их место среди водорослей. По мнению Комарека и Анагностидиса, относить цианей только к Cyanophyceae, либо только к Cyanobacteria, было бы неверно (Komárek, Anagnostidis, 2005). В основе классификации водорослей по таксономическим группам заложен ряд признаков: пигментный и химический состав, строение клеточных оболочек, наличие двигательного аппарата (жгутики, их количество и строение), состав запасательных веществ и способ размножения. Вместе с тем, виды из таксономически отдалённых групп водорослей могут сочетать общие друг для друга характеристики, а разные представители одного и того же вида могут демонстрировать чрезвычайное разнообразие по форме, размеру, структуре, составу и окраске. Известно также, что один и тот же вид может переходить на разные способы размножения в зависимости от окружающих условий. Так, при благоприятных условиях размножение может идти по половому пути, а с наступлением неблагоприятных условий, микроводоросли могут использовать один и более способов бесполого размножения: клеточное деление, фрагментация или образование спор. Также у миксотрофных водорослей переход на определённый тип питания (автотрофный, миксотрофный или гетеротрофный) обусловлен состоянием самой клетки и окружающими условиями. Более того, в

процессе культивирования один вид водорослей может претерпевать изменения формы клетки, состава веществ и пигментации в течение одного дня на основе культуральных переменных, таких как питательные вещества, доступ энергии света, температура и pH среды (Lakeman et al., 2009). Как и все живые организмы, водоросли, подвергаясь воздействиям стресса, переходят на режим выживания, который, в свою очередь, регулирует скорость и состав клеточного метаболизма. Стресс может повлиять и на накопление большего количества липидов, как запасных веществ, в ущерб накоплению белков или углеводов для преобразования их в энергию через более длительное время (Roessler, 1988; Bigogno et al., 2002; Mansour et al., 2003; Basova, 2005; Khozin-Goldberg, Cohen, 2006).

1.2. Основные характеристики и особенности исследуемых групп водорослей

Большинство исследуемых в работе водорослей принадлежат к типу *Dinoflagellata* Bütschli, 1885. Динофлагелляты (*Dinophyta* или *Dinoflagellata*) – большая и очень разнообразная группа эукариотических жгутиковых микроводорослей, являющиеся важными продуцентами первичной продукции. Они играют важную роль в трофических связях в морской и пресноводной средах, могут вести свободно живущий (планктон и бентос), паразитический или эндосимбиотический образ жизни, являться гетеротрофами, автотрофами или миксотрофами (Gómez, 2012). Динофлагелляты-фаготрофы могут питаться не только другими микроводорослями, но и нематодами, личинками полихет, икрой рыб, захват которых осуществляется при помощи педунклей (стебельки), тентаклей (щупальца), пистонов (поршни) и паллиумов (вуалей) (Белякова и др., 2006). Ископаемые находки динофлагеллят известны из Юрского и Мелового периодов Мезозоя (245 млн. лет). Тем не менее, морфологический анализ совместно с современными генетическими данными указывают на Докембрий (более 570 млн. лет), а проведённый геохимический анализ пород указывает, по

крайне мере, на существование динофлагеллят ещё до Каменноугольного периода (более 362.5 млн. лет) (Moldowan et al., 1996).

Динофлагелляты также обладают уникальными биологическими характеристиками, такими как наличие жидкокристаллических хромосом, внеядерного веретена деления и постоянно конденсированных хромосом, соединённых с ядерной оболочкой в течение клеточной пролиферации (Rizzo, 2003; Bachvaroff, Place, 2008). Отсутствие деконденсации хромосом у динофлагеллят при редупликации не является препятствием. И, несмотря на отсутствие деконденсации, всё же большие изменения в двойном лучепреломлении и оптических свойствах их хромосом были зарегистрированы как среди различных видов, так и между отдельными кариотипами динофлагеллят (Chow et al., 2010). В динокарионе содержится необычное соотношение белка к ДНК 1:10, в то время как для других организмов эта пропорция составляет 1:1. Основные ядерные белки динокариона, подобные гистонам, компактизирующим бактериальный нуклеоид, обнаружены на периферии хромосом, где, как предполагается, они могут соединять ДНК-цепи для стабилизации внехромосомных ДНК петель, с которых идёт экспрессия генов (Sala-Rovira et al., 1991; Chan, Wong, 2007). Долгое время, отсутствие гистонов считалось настолько необычным, что динофлагеллят выделяли в отдельную промежуточную группу между про- и эукариотами (Dodge, 1965). Тем не менее, современная молекулярная филогенетика чётко сгруппировала динофлагеллят с апикомplexами и инфузориями, поместив их в общую группу Альвеолят из-за кортикальных альвеолей (плоских пузырьков), обнаруженных в плазматической мембране во всех трёх группах (Cavalier-Smith, 1991). Благодаря ряду молекулярно-генетических проектов было выявлено, что динофлагелляты на самом деле кодируют гистоны (Gornik et al., 2012; Hackett et al., 2005a; Jaeckisch et al., 2011; Roy, Morse, 2012; Bayer et al., 2012). А сравнительные филогенетические анализы между динофлагеллятами позволили обнаружить, что на молекулярном древе раньше ответвляются динофлагелляты, обладающие ядром с небольшим геномом (~5 пкг), а далее уже происходит ответвление представителей,

обладающих динокарионом с избыточным геномом (Fensome et al., 2007). Это и последующие многочисленные исследования позволили понять эволюцию ядра и то, что детектируемые у более древних динофлагеллят гистоны были эволюционно утрачены у современных видов. Уникальной особенностью генома динофлагеллят является замещение тимина на другое пиримидиновое основание – 5-гидроксиметилурацил, так у вида *Gyrodinium cohnii* доля замещённого тимина составляет 37% (Rae, 1973). Ряд фотосинтезирующих видов в пластидах содержит флюоресцирующий пигмент перидинин. Большинство пластидных генов у динофлагеллят были обнаружены в составе ядерного генома (Bachvaroff et al., 2004; Hackett et al., 2004b), а собственно пластидный геном сильно фрагментирован, и та небольшая часть генов, кодируемых пластидами, сформировала миникольцевые структуры (Laatsch et al., 2004). Геном динофлагеллят характеризуется большим размером, который почти в 100 раз превышает человеческий (до 278 пкг на клетку) (Erdner, Anderson, 2006), что ограничивает проведение полногеномного секвенирования. Помимо этого, в геноме содержатся многочисленные нуклеотидные повторы и мобильные элементы, которые при геномном ассемблировании (полногеномная сборка из коротких «ридов») даже теоретически могут приводить к невозможности восстановления полной последовательности (Романенков и др., 2015). Более того, фрагментарность и механизм транс-сплайсинга препятствуют проведению полной сборки геномов, в том числе цитоплазматических органелл, что не позволяет узнать размеры и общую организацию данных геномов (Waller, Jackson, 2009).

1.2.1. *Ostreopsis* Schmidt, 1902

Динофлагеляты рода *Ostreopsis* обитают в тропических и умеренных эпибентосных сообществах микроводорослей и впервые были описаны из донных сообществ динофлагеллят в эндемичных для сигуатеры районах (Tindall et al., 1984). Этот род имеет широкий масштаб распространения (Рисунок 2, дополнен к Penna et al., 2010), хотя большинство описанных видов были обнаружены в тропических водах. Девять видов, описанных на сегодняшний день,

охарактеризованы только на основе морфологических признаков: *O. siamensis* Schmidt 1901; *O. ovata* Fukuyo 1981; *O. lenticularis* Fukuyo 1981; *O. heptagona* Norris et al., 1985; *O. mascarenensis* Quod 1994; *O. labens* Faust & Morton, 1995; *O. marinus* Faust, 1999; *O. belizeanus* Faust, 1999 и *O. caribbeanus* Faust, 1999. Тем не менее, систематика рода требует тщательного пересмотра, так как различные виды, обладающие идентичными морфологическими характеристиками, показывают значительную генетическую дифференциацию. Паттерны пластин схожи у всех видов рода, за исключением *O. heptagona* (Faust et al., 1996). Ещё больше разграничение видов осложняет вариабельность клеточного размера в пределах одного вида как в свежесобранных образцах (Aligizaki, Nikolaidis, 2006; Accoroni et al., 2012), так и в лабораторных культурах (Guerrini et al., 2010; Pezzolessi et al., 2012; Bravo et al., 2012). Таксономические исследования рода *Ostreopsis*, проводившиеся до 2000-х годов на основе морфологии, постепенно перешли на молекулярно-генетический уровень с использованием анализа генов 18S рДНК, 28S рДНК, ITS1–5.8S рДНК–ITS2 (Pin et al., 2001; Penna et al., 2005; Penna et al., 2010; Laza-Martinez et al., 2011; Sato et al., 2011; Kang et al., 2013; David et al., 2013).

В течение последнего десятилетия, вдоль средиземноморского побережья было зарегистрировано распространение *Ostreopsis* spp. и связано с неоднократными случаями человеческого отравления (Tubaro et al., 2011). Цветения, возникающие в летне-осенний период, были вызваны в большинстве случаев либо только *O. cf. ovata*, либо ассоциировано с небольшой концентрацией *O. cf. siamensis* (Mangialajo et al., 2011). Такие периодические цветения, приводящие к человеческим отравлениям, послужили причиной начала множества исследований по этим двум видам, и внесли новые представления по экологии, токсикологии и филогении обоих видов в Средиземном море.

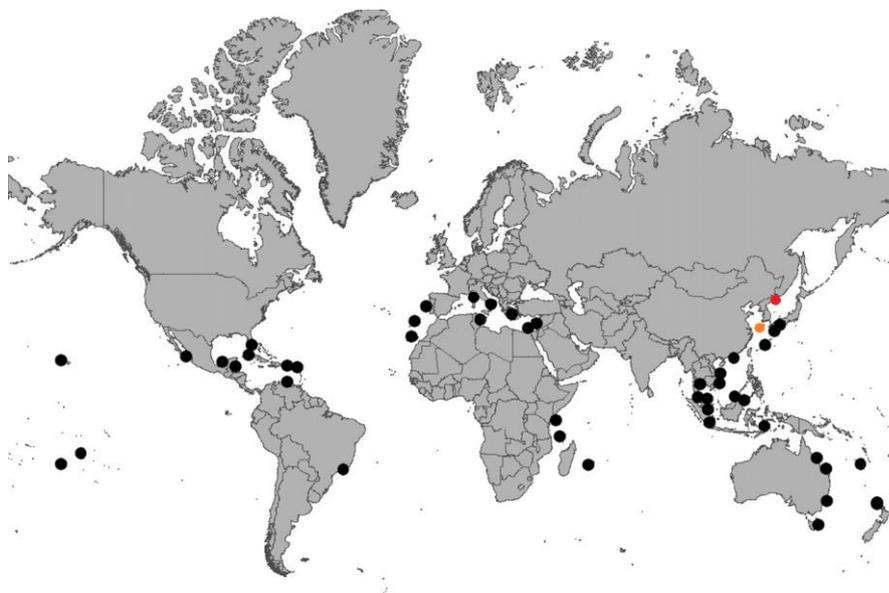


Рисунок 2 – Ареал рода *Ostreopsis* (по: Penna et al., 2010). Места последних обнаружений были дополнены (цветные точки: оранжевая – южно-корейский о. Чжеджу, красная – российское побережье акватории Японского моря (Уссурийский залив)).

Тем не менее, тропические виды *Ostreopsis* до сих пор остаются слабо изученными, хотя видовое разнообразие рода отмечено выше в тропических широтах, чем в умеренных областях (Carnicer et al., 2015). В 2006 году впервые виды рода *Ostreopsis* в высокой концентрации были зарегистрированы в бухте Соболев залива Петра Великого (Selina, Orlova, 2010). Это первый случай появления видов данного рода в российских водах. Ежегодно, с августа по октябрь, регистрируются обильные цветения *Ostreopsis* spp. и отмечается тенденция роста их численного доминирования в эпифитоне, отмечена жизнеспособность клеток при $t = 4^{\circ}\text{C}$, что не характерно для видов из других географических районов. Фенотипически клетки проявили себя как *O. cf. ovata* и *O. cf. siamensis* (Selina, Orlova, 2010). Было сделано предположение, что штаммы микроводоросли *Ostreopsis* spp. из залива Петра Великого являются видами-сиблингами, принадлежащими морфологическому комплексу видов *O. ovata*. Виды-сиблинги, как правило, не несут собственных видовых названий и обозначаются как видовые комплексы с употреблением названия морфологического вида, в пределах которого они были выделены.

К сожалению, отсутствие генетических данных для девяти типовых видов *Ostreopsis*, описанных на основе морфологии, не позволяет с полной уверенностью отнести последовательности, полученные в проводимых исследованиях, к какому-то конкретному виду. Для примера, после первых филогенетических исследований рода *Ostreopsis* из Средиземного моря (наиболее изученного до сих пор), диагностируемые виды были предварительно названы *O. cf. siamensis* (Penna et al., 2005) и *O. cf. ovata* (Penna et al., 2010), однако с рекомендацией на последующее таксономическое подтверждение.

В то же время, Сато с соавторами провели обобщённый филогенетический анализ рода, на основе которого были выделены несколько клад (Sato et al., 2011). Ясно показано, что реконструкция рода *Ostreopsis* образована 7 дифференцированными кладами, чья монофилия была подтверждена высокими поддержками ветвей. Говоря о филогеографии рода, то проведённый анализ Пенной с соавторами (Penna et al., 2012), показал чёткую дифференциацию между *O. cf. ovata* из атлантического и тихоокеанского регионов. Далее, Сато в своём анализе выявил кластеризацию 4-х японских клонов совместно с атлантическими, тем самым отметив, что географическое расстояние необязательно связано с генетическим расстоянием у *O. cf. ovata*; в частности, японский *O. cf. ovata* мог мигрировать в Средиземноморье и/или в Атлантический океан, или наоборот. Авторы предположили, что кустоподобная дивергенция и короткие ветви в кладе «Med/Atl» свидетельствуют о быстром и недавнем распространении *O. cf. ovata*, по сравнению с частично разрешённой кладой «S China/Mal/Ind» (Южно-Китайское море/ Малайзия/ Индия). Несмотря на отсутствие морфологических различий между видами, полученные клады имели высокие значения генетических различий, а виды соответствующих клад проявили чёткую дифференциацию по физико-экологическим характеристикам и токсичности (Sato et al., 2011). Дальнейшие исследования сосредоточились на изучении экологических, физиологических, токсикологических особенностей изолятов выявленных клад (Hariganeya et al., 2013; Tanimoto et al., 2013). Несмотря на необходимость ревизии рода, клады всё же условно были названы «*O. cf. ovata*

species-complex», «*Ostreopsis* sp. 1», «*Ostreopsis* sp. 2», «*O. cf. siamensis*», «*Ostreopsis* sp. 4», «*Ostreopsis* sp. 5», «*Ostreopsis* sp. 6», где видовой комплекс *O. cf. ovata* строго дифференцирован от остальных клад. С тех пор проводимые таксономические исследования рода сопоставляются с данными Сато с обозначением таксономического статуса соответственно наименованиям клад (Sato et al., 2011).

1.2.2. *Scrippsiella trochoidea* (Stein) Balech ex A.R & Loeblich III, 1976

Морские динофлагелляты *Scrippsiella*, принадлежащие к подсемейству Calciodinelloideae (порядка Peridinales Ehrenberg), морфологически однородная, но экологически гетерогенная группа панцирного автотрофного морского фитопланктона. Род *Scrippsiella* включает 25 видов, которые способны образовывать кальцинированные цисты, что делает данный род особенно интересным, поскольку известно, что всего около 16% существующих в настоящее время динофлагеллят способны формировать покоящиеся стадии (цисты) в течение своего жизненного цикла (Head, 1996). Эта способность обеспечивает такие важнейшие функции, как генетическая рекомбинация, защита, размножение и распространение (Dale, 1983). С помощью подвижной и покоящейся стадий жизненного цикла динофлагелляты могут обитать как в водной среде, так и в бентосе, что позволяет адаптироваться к неблагоприятным условиям окружающей среды (Fryxell, 1983; Pfiester, Anderson, 1987). *S. trochoidea* (Stein) Balech ex Loeblich III – космополитный вид динофлагеллят, который внесён в список ЮНЕСКО. Вид способен пролиферировать в температурном диапазоне от 10°C до 30°C и солёности от 5 до 55‰ (Braarud, 1951; Silva, 1962; Kim, Han, 2000), оставаясь жизнеспособными даже при 5°C (Ishikawa, 1995). Цисты *S. trochoidea* широко распространены и зарегистрированы в Западной Пацифике, Средиземном море, Карибском регионе, на западном и восточном побережьях Северной Америки, побережье Перу, западном побережье Европы, на западе Африки и Ирана (Wall et al., 1970; Montresor et al., 1994; Nehring, 1994; Morquecho, Lechuga-Devéze, 2003; Orlova et al., 2004; Attaran-Fariman, Bolch,

2012). В Амурском заливе Японского моря, вегетативные клетки динофлагеллят с морфотипом *S. trochoidea* встречаются в течение всего года, и их концентрация может достигать миллиона клеток на литр (Орлова и др., 2009). В начале 2000-х гг. прошлого века Монтресор с соавторами, проводя молекулярно-филогенетический анализ рДНК генов, наряду с высокой морфологической и физиологической обнаружили и высокую генетическую изменчивость в пределах одной морфы *S. trochoidea*, предположив наличие нескольких неразрешенных скрытых видов (Montresor et al., 2003). Разграничение видов внутри группы, основанное только на морфологии клеток, провести невозможно; в этой связи, объединённые молекулярные данные и морфологический анализ цист и проросших клеток на сегодняшний день являются наиболее надёжными критериями видовой диагностики данной группы динофлагеллят (Attaran-Fariman, Bolch, 2012).

1.2.3. *Dinophysis* Ehrenberg, 1839

Динофлагелляты рода *Dinophysis* включают свыше 75 описанных видов (Gomez, 2012), 10 из которых – известные продуценты окадаевой кислоты (okadaic acid, OA) и её производных, ассоциированных с диарейным отравлением моллюсками (DSP, diarrhetic shellfish poisoning) (Wilkerson, Grunseich, 1990; Johnson, 2011; Reguera et al., 2012; 2014). Массовое развитие и отдельные динофизоидные виды ежегодно регистрируются в дальневосточных морях России, а их видовая идентификация до настоящего исследования традиционно проводилась на основе морфологических характеристик. Всего в регионе обнаружено 32 вида (Коновалова, 1998), в российской части Японского моря – 23. Большинство из этих видов и по сей день остаются слабо изученными, отчасти из-за трудностей в культивировании (Scholin, 1998). Обычно, в традиционных методах идентификации проблем не вызывают виды с ярко-выраженными специфическими чертами, такими как *D. tripos* Gourret, *D. caudata* Saville Kent, *D. hastata* F. Stein. Тем не менее, основные массовые цветения в прибрежных водах Японского моря формируют более опасные виды, имеющие ряд

перекрывающихся морфологических черт видового комплекса *Dinophysis* «*acuminata*» (*D. acuminata* Claparède & Lachmann, *D. saccula* Stein, *D. ovum* Schütt) (Hargraves, Maranda 2002). Микроскопическая идентификация клеток основана на таких характеристиках как контур клетки и ряд борозд (Larsen, Moestrup, 1992). Однако, градация между определёнными видоспецифическими чертами, угол под которым происходит наблюдение за отдельными клетками и существование различных стадий жизненного цикла осложняют дифференциацию некоторых видов рода *Dinophysis* (Reguera, González-Gil, 2001; Escalera, Reguera, 2008). Ранее было показано, что высокая морфологическая изменчивость *D. acuminata* связана как с полиморфным жизненным циклом, так и/или с близкородственной межвидовой гибридизацией (Edvardsen et al., 2003; 2013). Исследования филогенетических отношений между видами *Dinophysis* показали различную разрешающую способность генов рибосомной и митохондриальной ДНК. Как 28S рДНК и 18S рДНК, так и цитохромоксидаза 1 – *cox1*, цитохромоксидаза 3 – *cox3* и цитохром *b* – *cob* мтДНК обладают низким таксономическим разрешением в отношении представителей рода *Dinophysis*, по сравнению с ITS регионом (Qiu et al., 2011; Raho et al., 2013). Несмотря на активное изучение рода во всём мире, последовательности для 18S рДНК рДНК, опубликованные в базе NCBI, до сих пор слабо представлены (на 2015 год – 12 последовательностей для 6 видов). Последовательности для 28S рДНК в базе, напротив, представлены в достаточном количестве, тем не менее, анализ по данному гену не позволяет дифференцировать представителей рода *Dinophysis*. Гены мтДНК и хлДНК оказались несостоятельны в качестве маркёров для видов рода *Dinophysis*, поскольку высокая внутривидовая и внутрииндивидуальная изменчивость по таким генам является результатом явлений клептопластии (включение и сохранение в собственном составе клетки чужих симбиотических органелл митохондрий и хлоропластов) (Takishita et al., 2002) и гетеротрофности. Несмотря на множество неясностей в исследованиях рода, для обеспечения более достоверного анализа необходимо привлечение всех возможных подходов. В настоящем исследовании из-за известных сложностей в культивировании видов

рода *Dinophysis* и экономии времени анализа был выбран метод выделения ДНК из одной клетки. Также, несмотря на разную эффективность генных маркёров рДНК, в анализ 28 российских изолятов были привлечены все три используемые в таксономии гена рДНК.

1.2.4. *Prorocentrum* Ehrenberg, 1834

Род *Prorocentrum* был открыт Эренбергом (Ehrenberg, 1834), с выделением вида *P. micans* как типового. После чего, были описаны ещё около 60 видов (Murray et al., 2009). Представители этого рода практически все являются морскими, за исключением двух видов, описанных из пресных вод (Croome, Tyler, 1987). *Prorocentrum* spp. считаются космополитами, и, в зависимости от вида, обнаруживаются либо в планктоне, либо в бентосе. За последние два десятилетия исследования бентосных видов *Prorocentrum* приняли масштабный характер, особенно после того, как выяснилось, что некоторые из них являются токсичными (Glibert et al., 2012). Классификация видов была основана на размерах и форме клетки, морфологии поверхности текальных пластин (орнаментация и паттерны пор), детальная архитектура перифлагеллярной области. Основные ультраструктурные различия заключаются в наличии или отсутствии трихоцист и мукоцист, а также в наличии и организации пиреноидов в пластидах (Hoppenrath et al., 2013). Высокий уровень морфологической вариабельности был отмечен для *P. lima* (Faust, 1991; Yoo, 2004; Aligizaki et al., 2009; Nagahama et al., 2011). Молекулярные данные также оказались гетерогенными. Внутривидовая изменчивость, включающая по крайней мере две отдельные клады, была получена на основе участков ITS, 18S и 28S рДНК, тем не менее, данные не соответствовали представленным морфологическим различиям (Aligizaki et al., 2009). В связи с тем, что таксон показал криптическое разнообразие, Алигизаки для данной группы видов ввела в употребление термин «видовой комплекс *P. lima*» (*P. lima*-species complex) (Aligizaki et al., 2009; Hoppenrath et al., 2013). Однако, последний детальный систематический пересмотр, проведённый

Хоппенра с коллегами (Hoppenrath et al., 2013), позволяет провести максимально точную видовую идентификацию представителей рода *Prorocentrum*.

1.2.5. Гаптофитовые водоросли (Haptophyta), или Примнезиофиты – Prymnesiophyta

Представители порядка Haptophyta являются одними из самых распространенных организмов из группы океанического фитопланктона и важными продуцентами первичной продукции (Thomsen et al., 1994; Field et al., 1998). Они отличаются от других эукариот наличием уникальной жгутикоподобной органеллы, гаптонемы, которая, как полагают, играет роль в захвате пищи у некоторых видов (Kawachi et al., 1991). Некоторые гаптофитовые, члены родов *Emiliana*, *Gephyrocapsa*, *Phaeocystis*, *Chrysochromulina* и *Prymnesium*, ответственны за массовые ВЦВ, имеющие крупные биогеохимические, экологические и экономические последствия (Brown, Yodar, 1994; Robertson et al., 1994; Edvardsen, Paasche, 1998; Lancelot et al., 1998).

В сочетании с морфологическими, физиологическими и экологическими данными, молекулярные подходы позволили выделить четыре основные клады (Prymnesiales, Cocco-sphaerales, Isochrysidales Pascher, 1910 и Phaeocystales) внутри класса Prymnesiophyceae (Edvardsen et al., 2000).

Семейство Isochrysidaceae включает некальцинированные микроводоросли внутри порядка Isochrysidales и до недавнего времени содержало 3 рода и только 6 описанных видов (Pascher, 1910; Edvardsen et al., 2000; Bendif et al., 2013). Характерная особенность членов порядка заключается в способности продуцировать алкеноны, длинноцепочечные ненасыщенные метиловые и этиловые кетоны, которые являются достаточно устойчивыми и сохраняются в древних отложениях. Первое появление алкенонов в осадочных породах указывало на середину мелового периода, приблизительно 120 млн. лет назад, предполагая, что эволюционное происхождение Isochrysidales произошло до этого периода (Brassell, Dumitrescu, 2004).

За последние годы таксономия гаптофитовых микроводорослей (Haptophyta) претерпела значительные изменения, включая пересмотр состава существующих и выделение новых родов, открытие новых видов (Edwardsen et al., 2011; Bendif, et al. 2011; Bendif, et al. 2012; Bendif, et al. 2013; Bendif, Young 2014). В частности, в порядке Isochrysidales была проведена ревизия, в результате которой штамм T-ISO Haines, 1977 вида *Isochrysis galbana* Parke, 1949 был переименован в вид *Tisochrysis lutea* с выделением его в самостоятельный род *Tisochrysis* (Bendif et al., 2013). Именно штамм T-ISO, ещё под видовым названием *I. galbana*, привлек к себе особое внимание как модельный объект благодаря своему преимуществу перед остальными штаммами в качественном и количественном составе аминокислот, жирных кислот и углеводов (Brown et al., 1989; Brown, 1991; Grima et al., 1992; Patterson et al., 1994), и до сих пор активно используется в разного рода исследованиях (Jeffrey et al. 1994; Saoudihelis et al., 1994; Thinh, 1994; Babarro et al., 2001; Valenzuela-Espinoza et al., 2002; Bougaran et al. 2003; 2012; Custodio et al., 2014; Carrier et al., 2014; Garnier et al., 2014; Charrier et al., 2015). Помимо существенных различий по физико-химическим признакам (Ewart, Pruder, 1981), было отмечено, что типовые штаммы *I. galbana* были выделены из умеренных районов, в то время как штамм T-ISO выделен из тропических вод о. Таити. Выделенные клоны штамма T-ISO десятилетиями успешно поддерживаются и исследуются в различных мировых коллекциях культур (CCAP Culture Collection of Algae and Protozoa, CCMP Provasoli-Guillard Center for Culture of Marine Phytoplankton, CS Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, NEPCC North East Pacific Culture Collection, KMMCC-Korea Marine Microalgae Culture Center, PLY Plymouth Culture Collection, RCC Roscoff Culture Collection, UTEX University of Texas, SAG Culture Collection of Algae at Goettingen University).

В настоящее время общепринято, что биохимические и молекулярно-генетические характеристики являются единственными надёжными критериями для родовой и видовой идентификации представителей родов *Isochrysis* и *Tisochrysis*. Многими авторами в отношении микроводорослей отмечалось, что

содержание, класс и состав жирных кислот у любого штамма колеблется в зависимости от условий культивирования (Emdadi, Berland, 1989; Peeler et al., 1989; Reitan et al., 1994; Khozin-Goldberg, Cohen, 2006). Вариабельность у *T. lutea* наблюдается в подвижной и неподвижной клеточных стадиях, тогда как у *I. galbana* только в подвижной стадии. Все морфологические и ультраструктурные характеристики перекрываются между представителями данных родов.

1.2.6. Красные водоросли (Rhodophyta)

Древнейший отдел водорослей, включающий как многоклеточные, так и одноклеточные формы упрощенного строения, обитающие в основном в морской среде. Среди небольшого количества одноклеточных красных водорослей, введенных в культуру, *Porphyridium purpureum* (Bory de Saint-Vincent) K.M.Drew et R.Ross, 1965 (синоним *Porphyridium cruentum* (C. A. Agardh) Nägeli) представляет особый научный и практический интерес, обусловленный тем, что данный вид является источником разнообразных биологически активных веществ (фикобилипротеинов, внеклеточных сульфополисахаридов, ненасыщенных жирных кислот, особенно эйкозапентаеновой кислоты), имеющих широкое практическое использование (Antia et al., 1970; Ahern et al., 1983; Arad et al., 1985; Minkova et al., 1996; Fuentes et al., 2000; Гудвилович, 2010). Этот вид представляет интерес и как модельный объект для изучения физиологии микроводорослей, обладая исключительной экологической пластичностью и толерантностью. До настоящего времени отечественные исследования, в том числе имеющие биотехнологическую направленность, проводили с использованием штаммов этого вида, изолированных из прибрежных вод Европы и США (Айздайчер и др., 2014).

В 1972 г. Отт разделил виды рода *Porphyridium* на основе единственного отличительного признака – окраске пластид (Ott, 1972). Однако таксономический статус видов рода *Porphyridium* на сегодняшний день остаётся неясен из-за отсутствия выраженных морфологических характеристик (Gaikwad et al., 2009).

С появлением молекулярно-генетических методов были получены последовательности 18S рДНК для трёх известных видов рода *Porphyridium*: *P. purpureum*, *P. aerugineum* и *P. sordidum*. В 2013 году было проведено полногеномное секвенирование *P. purpureum* (Bhattacharya et al., 2013). Тем не менее, в генетическом банке не хватает данных по другим молекулярно-генетическим маркерам, которые дополнительно использовались бы для сравнительного анализа и установления филогенетических связей представителей рода *Porphyridium*. Доступные последовательности ограничиваются лишь участками ядерных генов 18S рДНК и ITS1–5.8S рДНК–ITS2 для *P. purpureum* и 18S рДНК для *P. aerugineum* и *P. sordidum*, что осложняет исследования, направленные на выявление генетического сходства между видами. Одно из немногих исследований филогенетических взаимоотношений между одноклеточными и близкими к ним многоклеточными красными водорослями было проведено на основе ядерного гена 18S рДНК и гена фотосистемы II хлоропластной ДНК – *psb A*. Показано, что род *Porphyridium* является эволюционно более древним среди остальных представителей красных водорослей (Naga et al., 2000).

1.2.7. Отдел Цианобактерии (Cyanobacteria, Cyanophyta, Cyanoprokaryota)

Цианобактерии – разнообразная древнейшая группа микроорганизмов, которые населяют нашу планету на протяжении 2.5 млрд лет (Summons et al., 1999). Цианеи представляют собой кислородные фотосинтезирующие прокариотические микроорганизмы, обладающие хлорофиллом *a*, которые распространены во всех типах экологических ниш от экстремальных низкотемпературных условий Антарктиды до горячих источников Японии, Новой Зеландии, Кении, Таиланда и Италии (McGregor, Rasmussen, 2008; Sompong et al., 2005). Плотные микробные маты, образуемые бентосными формами цианобактерий, известны для различных сред, включая литоральные прибрежные

отложения, морские солонцы, гиперсоленые водоемы и озера, термальные источники, сухие и жаркие пустыни и антарктические озера (Jørgensen et al., 1983; Taton et al., 2006). Они формируют сложные трехмерные микроструктуры, характеризующиеся крутыми и зачастую сложными физическими и химическими градиентами (Stal, 1995; Stolz, 2000). Подобно планктонным формам, матформирующие бентосные цианобактерии привлекают интерес из-за своей способности синтезировать большое разнообразие вторичных метаболитов, многие из которых известны как сильные токсины. Так, цианобактериальные маты, известные продуценты гепатотоксинов – микроцистинов и нейротоксина – анатоксина-а, из кенийских горячих источников на берегу озера Богория явились причиной массовой гибели малого фламинго (Krienitz et al., 2003). Аналогичный эффект наблюдали на мышах после внутрибрюшинного введения экстрактов из бентосных цианобактерий *Phormidium formosum* и *Phormidium amoenum* (Oscillatoriales) (Baker et al., 2001). Также показано, что пять распространённых европейских видов *Phormidium* выделяют ряд биологически активных соединений, часть из которых нейротоксичные/гепатотоксичные *in vivo* (Teneva et al., 2005). Систематика цианобактерий в настоящее время находится в стадии развития (Ефимова, Ефимов, 2007). Таксономисты признали, что идентификация любого вида, основанная исключительно на морфологии весьма сомнительна и непрактична. Помимо номенклатурных трудностей, цианобактерии, поддерживаемые в лабораторных условиях, могут терять или вовсе не выражать определенные признаки, наблюдаемые в природе (Palinska et al., 1996; Garcia-Pichel et al., 1996).

К сожалению, порядок Oscillatoriales считается одним из самых таксономически проблематичных. Род *Leptolyngbya* в настоящее время признается недостаточно описанным. Исторически сложилось, что определение Oscillatoriales, включающей рода *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Schizothrix* и *Plectonema* было основано на характеристиках оболочки и наличии ложных ветвлений (Gomont, 1892; Geitler, 1932). Некоторые из этих родов содержат проблемные виды с упрощённой морфологией и тонкими трихомами (до 3 мкм в

ширину), некоторые виды Rippka et др. (1979) отнесли их в LPP-группу В (*Lyngbya*, *Phormidium*, *Plectonema*), несмотря на то, что эти виды демонстрируют высокий уровень изменчивости по таксономически важным признакам. В дальнейшем Анагностидис и Комарек (Anagnostidis, Komárek, 1988) пересмотрели род *Leptolyngbya*, создав более 75 новых комбинаций, типированных по ряду признаков, включая наличие тонких оболочек, формы клеток, неподвижных трихом, организации тилакоидов, перетяжек клеточной стенки и фрагментарности трихом. Далее было показано, что многие из этих диагностических признаков зависимы от внешних условий, и, таким образом, филогенетически не информативны (Alberto, Kováčik, 1994). Последующие исследования всё же выявили стабильность некоторых из этих признаков для небольшого числа видов (Komárek, Čáslavská, 1991; Casamatta et al., 2005), однако морфологические (Alberto, Kováčik, 1994) и филогенетические данные (Payne, 2001) предполагают, что род *Leptolyngbya* не монофилетичен. Совокупность многолетних авторских данных подчёркивают полифилетичность порядка Oscillatoriales (McGregor, Rasmussen, 2008). Генерические (родовые) различия в пределах Oscillatoriaceae не были полностью решены, и таким образом остались такие комплексы как LPP-группа А и В (для *Lyngbya-Phormidium-Plectonema*). Эта система была принята с незначительными изменениями и добавлением нескольких, хорошо охарактеризованных общих описаний, полученных из исследований природных популяций в первом и втором изданиях Берджи по систематической бактериологии (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (Castenholz, 2001). Основное различие между этими двумя изданиями, тем не менее, заключалось в валидности родов *Leptolyngbya* Anagnostidis, Komárek, *Geitlerinema* Anagnostidis и *Microcoleus* Desmazières и некоторых их членов, ранее отнесённых к LPP-группе В. Основная таксономическая ревизия цианопрокариот была начата Анагностидисом и Комареком (Anagnostidis, Komárek, 1985; 1988; Komárek, Anagnostidis, 2005). Система сложившихся комплексов родов, включавшая *Phormidium*, *Lyngbya*, *Plectonema* («LPP-group» из Rippka et al., 1979) и *Oscillatoria* была пересмотрена с введением новых критериев в видовой диагностике, такие

как пропорции клетки, характер деления клеток, возникновение газовых везикул (аэротопов), подвижность, и способ дезинтеграции трихом. Ранее делавшийся акцент на оболочках является устаревшим (Marquardt, Palinska, 2007). Как следствие, большое число видов (около 440) были переведены из вышеупомянутых четырех родов в 18 вновь определенных генерических субъектов, большинство из которых приобрели соответствующие изменения в названиях. Примечательно, что род *Phormidium* был определен Анагностидис и Комарек как имеющий, среди прочих характеристик, радиально ориентированные тилакоиды в поперечном срезе клетки (Komárek, Anagnostidis, 2005). К сожалению, наличие этой характеристики до сих пор не было доказано для большинства многочисленных видов, описанных из природы и культур. *Leptolyngbya* и *Geitlerinema* были созданы в качестве нового рода и подрода *Phormidium*, соответственно (Anagnostidis, Komarek, 1988), чтобы включить большое число осцилаториевых видов с трихомами до 3 микрон в ширину. «Узкоклеточные» филаментозные виды, характеризующиеся слабой подвижностью или её полным отсутствием, относятся к родам: *Phormidium*, *Plectonema* и *Lynngbya*, объединённые во вновь созданный род *Leptolyngbya*. Виды с аналогичными размерами клеток, но обладающие подвижностью путём быстрого скольжения за счёт вращения, имеющие периферийные тилакоиды, были отнесены к роду *Geitlerinema* (Anagnostidis, 1989). Основываясь на текущих фенотипических признаках, используемых для дискриминации родов, сочетания морфологических, ультраструктурных и экологических особенностей в настоящее время недостаточны и не позволяют установить ни видовую, ни родовую принадлежность представителей порядка Oscillatoriales (McGregor, Rasmussen, 2008). Большинство молекулярно-филогенетических работ по цианобактериям используют таксон-специфические для данной группы организмов молекулярно-генетические маркёры (Lu et al., 1997; Frias-Lopez et al., 2003; Kim et al., 2004). Несмотря на успешность получаемых результатов, большие трудности возникают на этапе поиска гомологии в базах данных. Морфологические признаки различных таксономических единиц должны быть сводимы с молекулярными

данными, и в результате хорошо вписываться в соответствующую им филогению. Первые молекулярные исследования показали эффективность, но возникли трудности в отношении принципа сводимости молекулярно-генетических и морфологических данных. Причина в том, что многие секвенированные штаммы были депонированы с неверной таксономической принадлежностью, однако, после пересмотра номенклатуры и реконструкции филогенетических деревьев, полученные кластеры позволили успешно охарактеризовывать природные таксономические единицы (Komarek, 2010).

1.3. Степень изученности и проблематика молекулярно-генетической идентификации у микроводорослей и цианобактерий

На сегодняшний день молекулярно-генетические методы прочно вошли и закрепились во многих фундаментальных и прикладных исследованиях как один из успешных, быстрых и экономически эффективных инструментов биологической оценки и экологического прогнозирования. Они позволяют максимально точно и быстро оценить качественный и количественный состав микроводорослей, установить статус ВЦВ, таким образом предотвратить угрозу и избежать возможных негативных последствий. Эти методы способны также прогнозировать ожидаемое развитие или спад многих видов альгофлоры, живущих в системе тесных, зависимых друг от друга форм межвидовых взаимоотношений (антагонизм, аллелопатия, конкуренция, симбиоз и др.) (Саут, Уиттик, 1990; Телитченко, Остроумов, 1990; Subba Rao et al., 1995; Lelong et al., 2012).

В последние годы в анализ экологических образцов (морской воды, мягких тканей и внутренней жидкости моллюсков и копепод) привлекают различные молекулярно-генетические методы, основанные на ПЦР (полимеразно-цепной реакции) для детекции и количественного состава микроводорослей, которые позволяют быстро и надёжно получить значительный объём информации. Метод ПЦР даёт более высокую эффективность обнаружения, чем методы микроскопического анализа, показывая более достоверные процентные значения

наличия целевых таксонов в природных образцах. Качественные методы, основанные на ПЦР в сочетании с количественными (ПЦР в режиме реального времени) представляют собой надёжные методы обнаружения клеток до периода «цветения» (Penna et al., 2007). Постоянно развивающиеся методы молекулярной генетики уже позволяют проводить анализ отобранных клеток микроводорослей напрямую, до введения в культуру, что значительно сокращает время анализа и, таким образом, позволяет вводить в лабораторные культуры только целевые виды или штаммы микроводорослей–продуцентов хозяйственно и коммерчески ценных соединений для решения многих фундаментальных и биотехнологических задач. В этом же смысле молекулярно-генетический анализ эффективен в случае редких, некультивируемых или сложно культивируемых микроводорослей, таких как динофлагелляты рода *Dinophysis*, *Prorocentrum* и др. (Gómez, 2012) и разнообразных прокариотических микроорганизмов. К тому же несомненным плюсом генетической идентификации является возможность её применения к объектам на разной стадии жизненного цикла (Richardson, 2011). Молекулярно-генетические методы необходимы для прогнозирования видоспецифических потенциальных объектов цветения, для определения возможных экологических факторов, которые влияют или инициируют цветение, и для оценки потенциальных источников видоспецифичного «рассева» клеток через природные или антропогенные транспортные механизмы (Penna et al., 2007).

С помощью ПЦР методов было обнаружено, что мидии могут сохранять следы микроводорослей даже после снижения массового цветения и отсутствия клеток в морской среде через 2-3 недели после цветения, что позволяет токсинам в течение более длительного времени оставаться доступными для передачи другим организмам (Furlan et. al, 2013). Также с помощью наборов рДНК маркёров для ПЦР обнаружены токсины и клетки динофлагеллят *O. cf. ovata* в морском воздухе, приводящие к сильным респираторным отравлениям на Средиземноморском побережье (Ciminiello et al., 2014).

Качественный и полуколичественный анализ, основанный на ПЦР, был ранее разработан для обнаружения нескольких потенциально опасных видов и

родов, вызывающих ВЦВ, принадлежащих к Dinophyceae, Bacillariophyceae и Raphidophyceae, в период выполнения мониторинговой программы 2002–2005 гг. в Средиземноморском регионе. Видо- и родоспецифичные олигонуклеотидные последовательности к (ITS)–5.8S рДНК, подобранные как целевые на основе последовательностей доступных в международной базе данных GenBank, позволили увеличить эффективность обнаружения, в отличие от микроскопических методов, и т.о. обнаруживать весь состав вредоносных микроводорослей присутствующих в природных образцах (Penna et al., 2007).

Особенно отметим, что в отношении некоторых групп микроводорослей, в частности динофлагеллят и диатомовых, своевременное видовое определение чрезвычайно важно из-за их отрицательного воздействия с медицинской, экологической и экономической точек зрения. В этом смысле, молекулярно-генетические методы позволяют не только решить задачу в короткие сроки, но также являются единственным возможным инструментом в установлении видовой принадлежности криптических микроводорослей (Monti et al., 2007; Penna et al., 2007; Perini et al., 2011), таких как *Ostreopsis* sp., *Prorocentrum* sp., *Dinophysis* sp., *Scrippsiella* sp., *Tisochrysis* sp. и др., а также цианобактерий.

За последние десятилетия молекулярные методы стали незаменимым инструментом в изучении цианопрокариот и оценке эволюционных отношений между ними. Прямое секвенирование различных генов является наиболее распространенным из используемых методов. Вместе с тем, также широко применяется метод ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), особенно для более детального изучения генетической изменчивости близкородственных таксонов (Ernst et al., 1995; Postius et al., 1996; Bolch et al., 1996; Lyra et al., 1997; Bolch et al., 1999; Scheldeman et al., 1999; Comte et al., 2007) или для выявления существующего цианобактериального разнообразия в природе. Кроме того, метод случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD) иногда используется в целях дискриминации близкородственных генотипов (Neilan, 1995; Nishihara et al., 1997; Bolch et al., 1999). Гораздо менее распространенным является аллозимный анализ (Stulp, Stam, 1984; Kato et al., 1991; Nishihara et al.,

1997) или полноклеточный анализ белкового состава (Palinska et al., 1996; Lyra et al., 1997). Несмотря на свою фундаментальную роль в видовом определении бактерий (Wayne et al., 1987), ДНК-ДНК гибридизация всё же редко использовалась, поскольку является достаточно трудоёмкой процедурой (Lokmer, 2007). Важно также понимать, что величина сходства, полученная путем ДНК-ДНК гибридизации, не отражает реальную степень сходства последовательностей на уровне первичной структуры – филогенетическая связь между штаммами с более чем 20% расхождением в геномных последовательностях не может быть определена с помощью этого метода (Rossello-Mora, Amann, 2001). Также было показано, что дискриминация на различных таксономических уровнях обнаруживается по наличию и структуре тандемных повторов (Mazel et al., 1990; Asayama et al., 1996; Lyra et al., 1997; Rasmussen, Svenning, 1998; Chonudomkul et al., 2004; Lyra et al., 2005) или целых генных семейств в геноме (Bhaya et al., 2002). Рост числа секвенированных цианобактериальных геномов в общедоступных базах данных позволяет довольно подробно рассматривать распределение генов. Мартин с коллегами идентифицировали 151 уникальный цианобактериальный ген в 8 изученных геномах и обнаружили несколько примеров в значительной степени консервативных генов, которые могли бы оказаться эффективными для решения проблем в изучении эволюции цианобактерий (Martin et al., 2003).

С применением молекулярно-генетических инструментов и разработкой эффективных генетических маркёров в идентификации микроводорослей, разграничение видов в некоторых случаях облегчилось. Однако вместе с тем, оно усложнилось для тех случаев, когда молекулярно-генетические данные несопоставимы с морфологическими данными. Это несоответствие до сих пор возникает из-за сформированных видовых комплексов (*Alexandrium tamarense*, *Dinophysis acuminata*, *Ostreopsis ovata*, *Scrippsiella trochoidea*, *Prorocentrum lima*, *Skeletonema costatum* и др.) и видов, описанных на основе 1) единственной иллюстрации типового материала, 2) варьирующих морфометрических характеристик и отсутствия генетических отличий, либо наоборот, 3)

недостаточного числа или отсутствия надёжных дискриминирующих морфологических признаков при чёткой генетической дифференциации (Zinssmeister et al., 2011; Reguera et al., 2011; Stern et al., 2014). Нередки случаи, когда одни и те же формы описывались разными авторами в одно и то же время под разными названиями, одними – по одним признакам, другими – по другим. Кроме того, описание видов могло строиться на основании диагностических признаков, далеко не равнозначных между собой (Маркова, 1964). Нужно отметить, что проблема «криптических видов» касается не только микроводорослей, данный феномен широко распространён практически во всех группах живых организмов. Тем не менее, для микроорганизмов проблема усложнена из-за их микроскопических размеров. Важно, что основное число сложившихся видовых комплексов приходится на потенциально-опасные виды, активные исследования которых сейчас направлены в основном на изучение вторичных метаболитов. Однако, таксономический пересмотр на основе комплексного анализа и с применением ядерных рДНК генов успешно разрешает данную проблему (John et al., 2014).

Ген малой рДНК был краеугольным камнем филогенетического исследования в течение десятилетий по нескольким причинам. Прежде всего, эволюция генов малой субъединицы рРНК контролируется и сдерживается из-за выполняемых ею важных функций, что зачастую приводит к невозможности различать близко родственные таксоны. Было показано, что 2 штамма *Bacillus*, отнесённые к различным видам на основе данных ДНК-ДНК гибридизации, имеют практически идентичные последовательности 16S рРНК (Fox et al., 1992). В противоположность этому, крайне большая внутривидовая изменчивость 16S рДНК также не позволяла однозначно решить таксономический статус прокариот (Harrington, 1999). Таким образом, нет никакой строго определённой величины дифференциации 16S рРНК для видовой идентификации бактерий (Coenye et al., 2005), хотя штаммы с менее 97% сходства в последовательностях 16S рРНК могут рассматриваться как различные виды (Stackebrandt, Gebel, 1994). Кроме того, огромное количество организмов имеют более одного рибосомного оперона, что

вызывает вопрос о полиморфизме этого гена в геноме (Tourova, 2003). Однако, известно, что последовательности множественных рибосомных оперонов, как правило, практически идентичны, таким образом, проблемы идентификации возникали бы лишь в случаях близких видов (Acinas et al., 2004). Таковую внутригеномную однородность гена 16S рДНК можно считать доказательством редкости событий горизонтального переноса генов (Coenye et al., 2005). Тем не менее, проблема, связанная с горизонтальным переносом генов 16S рДНК и его влияние на бактериальную филогению, является гораздо более сложной (Gogarten et al., 2002).

В конце 1980-х годов, развитие независимых от культивирования молекулярных методов, основанных на анализе последовательностей малой субъединицы рРНК, амплифицированных непосредственно из смеси ДНК микробных сообществ, революционизировало область экологии и филогении микроорганизмов (Woese, 1987). Молекулярные исследования доказали, что в природе существуют тысячи новых видов микроорганизмов, что простые морфологические характеристики микроорганизмов маскируют огромное генетическое разнообразие, и что культивируемые микроорганизмы представляют собой лишь малую часть видов в природе (Pace, 1997).

Так, за последнее десятилетие, метагеномный анализ генных последовательностей рРНК, впервые предложил экологам инструмент, позволяющий определить практически весь состав микроорганизмов из естественной среды обитания и таксономически оценить филогенетические отношения между ними.

Применение молекулярно-генетических маркёров и внедрение технологии метагеномного анализа, как наиболее современного на сегодняшний день метода генетического анализа биоразнообразия сообществ позволяет обнаружить присутствующие в биотопе организмы. До недавнего времени, исследование планктонного разнообразия проводилось на основе универсального маркёра 18S рДНК путём суб-клонирования ПЦР-продуктов с последующим секвенированием по методу Сэнгера (Sanger et al., 1977). Данная техника трудоёмка для данного

рода исследований и позволяет получить информацию примерно для 200-300 видов из разных образцов с одного участка (Beatriz et al., 2001; Benhnke et al., 2010). Технологии высокопроизводительного секвенирования (ранее, секвенирование нового поколения), такие как пиросеквенирование на платформе Roche 454, делает возможным получение миллионов последовательностей за 1 проход, а также массовое параллельное секвенирование (MPS) – революционизированные исследования разнообразия эукариот. Данные технологии – наиболее рекомендуемые методы для молекулярно-экологических исследований, поскольку позволяют обнаруживать даже малочисленные клеточные популяции в сложных эукариотических сообществах. Таким образом, дают выход в 2000-3000 ОТЕ (операционные таксономические единицы – англ., OTU – «operational taxonomic unit», формально принимаемые за отдельные виды) из нескольких образцов с одного участка (Nagai et al., 2016). Основными целевыми генами метагеномного анализа являются 18S рДНК и 16S рДНК. В структуры их последовательностей входят как консервативные участки, так и переменные области, и присутствуют они в геномах всех эукариот и прокариот, соответственно (Klappenbach et al., 2001; Petrosino et al., 2009). Всё же недостатком метагеномного анализа является наличие в полученных данных большого количества неидентифицируемых последовательностей (до 60% всех полученных ампликонов), для которых отсутствуют известные референтные последовательности, в связи с чем они подвергаются удалению из анализа (Sul et al., 2011). По этой причине, было принято объединять такие последовательности в ОТЕ согласно установленному 97% критерию гомологии (Maier et al., 2009). Однако такая оценка также является не всегда объективной, поскольку величина порогового разделения может меняться в большую сторону внутри вида, а может, наоборот, не иметь различий между разными видами. Конечный результат будет зависеть и от выбора алгоритма для анализа метагеномных данных, и в свою очередь от модулей, составляющих данный алгоритм.

До сих пор секвенирование конкретного участка или полного гена по методу Сэнгера является традиционным «золотым стандартом»

широкодоступным и приемлемым для выполнения задач идентификации и глубокого анализа целевых объектов (Chen et al., 2014; De Wilde et al., 2014).

Для описания новых таксонов и пересмотра существующих, на сегодняшний день требуется полифазный подход, сочетающий применение морфологии, ультраструктуры, генетики, биохимии, экологии и физиологии.

1.4. Молекулярно-генетические маркёры в идентификации и установлении родственных связей морских микроводорослей

Использование молекулярных маркеров необходимо, чтобы решить неоднозначность в таксономии на основе морфологических признаков, где, как в случае фенотипической пластичности и конвергентной морфологии, может маскироваться истинное разнообразие (Carnicer et al., 2015).

Основными востребованными генами, используемыми в молекулярной экологии для микроводорослей, в зависимости от степени установления таксономического уровня, являются ядерные гены, кодирующие рибосомную РНК (рДНК) (18S рДНК, 28S рДНК, ITS-регион) (Bhattacharya, Medlin, 1995; Guillou et al., 2002; Penna, Galluzzi, 2013). В отличие от простого механизма наследования генов органелл, рибосомные гены не только зависят от ретикулярной эволюции, характерной для всех ядерных генов у видов с половым размножением, но они также подвержены действию согласованной эволюции (Schlötterer et al., 1994; Schlötterer, Tautz, 1994). Согласованная эволюция является характеристикой мультигенных семейств. Члены таких семейств подвергаются внутригеномной гомогенизации, феномену, проявляющемуся через неравный кроссинговер и генную конверсию (Li, 1997), который сохраняет членов генных семейств подобными в геномах и в популяциях. Хотя выше описанное и выступает в качестве основного аргумента в пользу рДНК как молекулярного маркера, тем не менее, в некоторых случаях данное общепринятое свидетельство может стать проблематичным (Álvarez, Wendel, 2003). Наличие разошедшихся вариантов рДНК в составе генома может явиться причиной межвидовой

гибридизации (Muir et al., 2001). Рибосомная ДНК имеет аддитивный характер наследования, что делает её мощным инструментом для обнаружения последних событий гибридизации (Sang et al., 1995; Quijada et al., 1997). Тем не менее, эволюционная судьба дивергирующих вариантов рДНК после таких событий может отличаться. Отличающиеся варианты рДНК могут сосуществовать в геномах в течение некоторого времени, также как могут в одном или другом исчезнуть. Если различные наборы исчезают из разных, тесно связанных линий, то рДНК филогения не отразит видовой филогенез (Wendel et al., 1995). В то время как эти проблемы могут привести к ложным выводам в филогенетических исследованиях, они не способны серьёзно повлиять на исследования видовой диагностики. Такие работы, тем не менее, должны рассматривать возможность того, что внутригеномная гомогенизация вариантов рДНК не обязательно завершена: если бы это было, виды могли бы быть определены просто на основе присутствия различий в нуклеотидных последовательностях рДНК.

Ранее предложенные рекомендации при выборе молекулярно-генетического маркера предполагают использование варибельной последовательности, ограниченной консервативными участками, которая не должна горизонтально передаваться между видами и должна иметь разрешающую способность во внутривидовом разграничении для типирования разных штаммов одного вида (Olive, Bean, 1999). Для одноклеточных микроорганизмов, в том числе водорослей, данные критерии в том или ином случае не соответствуют в полной мере. Тем не менее, несмотря на все недостатки, выбор определённого маркера будет зависеть от степени решаемой задачи и собственно специфики исследуемой таксономической группы. Дифференцирующая способность одного и того же гена у разных групп микроводорослей не универсальна, так, ядерный ген большой субъединицы рибосомной ДНК (28S рДНК) может дифференцировать некоторые виды динофлагеллят, диатомовых, в равной же степени он не способен различать определённые виды в этих же группах (Edwardsen et al., 2003; Hart et al., 2007). Разрешающая способность 28S рДНК даже между видами одного рода может существенно различаться. Например, в роде *Dinophysis* виды *D. acuminata*, *D.*

dens, *D. saccula* и *D. acuta* не имеют по данному гену межвидовых различий, в то время как другие виды чётко отличаются друг от друга (Edwardsen et al., 2003). Ген 5.8S рДНК, ограниченный внутренними транскрибируемыми спейсерами ITS1 и ITS2, высоко вариабелен в пределах одного генома у некоторых видов динофлагеллят, что создаёт трудности в интерпретации полученных данных. Ген 18S рДНК, считающийся надёжным молекулярно-генетическим маркёром в дифференциации на родовом уровне, у некоторых видов микроводорослей позволяет проводить диагностику на видовом и более глубоком штаммовом уровне.

Различные ядерные и митохондриальные генетические маркёры были использованы для оценки генетической изменчивости у микроводорослей. Малая субъединица 18S рДНК интенсивно используется для филогенетического анализа и определения разнообразия фитопланктона в коллекциях культур и экологических пробах (Lin et al., 2006; Hong et al., 2008; Handy et al., 2009). Отмечено, что гены 18S рДНК и 28S рДНК оказались востребованными в анализе некультивируемых или сложнокультивируемых водорослей благодаря сравнительно быстрому и успешному получению их из отдельных клеток (Lynn, Pinheiro, 2009). 18S рДНК также широко используется в метагеномном анализе планктона при экологическом мониторинге. Другим маркёром метагеномного анализа послужил ITS–5.8S рДНК, который показал высокую эффективность и специфичность в ПЦР-детекции потенциально опасных видов микроводорослей (Penna et al., 2007).

ITS-регион широко используются в качестве филогенетического маркёра для анализа одноклеточных организмов на разном систематическом уровне. Известная высокая скорость эволюции, соответственно - высокая степень изменчивости данного генного участка позволяет чётко разграничивать близкородственные виды и широко используется в биогеографических исследованиях (Baldwin et al., 1995; Álvarez, Wendel, 2003). Тем не менее, в ряде случаев, высокая степень различий этого генного участка даже между близкими видами не позволяет корректно провести выравнивание анализируемого набора

последовательностей, в результате чего ограничивает использование ITS-маркёра в филогенетическом анализе (Банникова, 2004; Ефимова и др., 2014).

Альварес и Вендель, обсуждая рибосомный ITS-регион в качестве маркёра для филогенетического анализа, отметили его высокую степень гомоплазии. Они предположили, что гомоплазия может быть вызвана ортолого-паралогическим слиянием, компенсационными изменениями оснований, накоплениями вставок/делеций (InDel, от «insertion/deletion»), ошибками последовательностей, или какой-либо комбинацией этих явлений (Álvarez, Wendel, 2003). Несмотря на традиционное использование данных ITS последовательностей в филогенетических исследованиях, сложное и непредсказуемое эволюционное поведение снижает полезность данного маркёра для анализа. Авторы предположили, что лучшие результаты могут быть получены при использовании одно- или низкокопийных ядерных генов (Álvarez, Wendel, 2003). Тем не менее, было установлено, что все активно используемые ядерные гены в молекулярно-генетическом анализе у одноклеточных водорослей, как правило, многокопийны (Rowan et al., 1996) и не соответствуют данному требованию.

Митохондриальная ДНК, несмотря на свою популярность в идентификации, филогенетическом и популяционном анализе разных групп организмов (Lara et al., 2010; Gao et al., 2011; Nijman, Aliabadian, 2010; и др.), по-прежнему довольно слабо зарекомендована для одноклеточных водорослей по целому ряду причин. В силу особенностей строения геномов митохондрий и хлоропластов (фрагментарность), генного состава ядерного генома (обмен генетического материала между органеллами и ядром), способность некоторых видов динофлагеллят к клептопластии, наличие более одной митохондрии в клетке (часто имеющих разное происхождение), широко используемые гены мтДНК (цитохром *c* оксидаза 1 – *cox1*, цитохром *c* оксидаза 3 – *cox3* и цитохром *b* – *cob*) в идентификации и оценке разнообразия у микроводорослей могут привести к ошибочным результатам, переоценить данные (например, Lin et al., 2009), либо вовсе оказаться неинформативными (Onda et al., 2013). Также, митохондриальный геном у динофлагеллят подвержен рекомбинации, которая приводит к

возникновению многочисленных копий каждого гена и генных фрагментов, которые, как правило, перекомбинированы в несколько различных сочетаний (Norman, Gray, 2001; Jackson et al., 2007; Nash et al., 2007; Slamovits et al., 2007; Kamikawa et al., 2009). Показано, что даже в одной клетке динофлагеллят рода *Dinophysis* обнаружено несколько существенно различающихся типов митохондрий, что, соответственно, могло явиться причиной вывода высокого видового разнообразия и результатом присутствия одних и тех же видов в разных филогенетических кластерах (*D. acuminata* и *D. norvegica*) (Raho et al., 2008). Показана несостоятельность митохондриальных рибосомных генов (мтДНК) в анализе представителей рода *Ostreopsis* (Penna et al., 2014). А в случае других представителей динофлагеллят, например, двух дифференцированных родов *Alexandrium* и *Coolia*, наоборот, не выявлено каких-либо различий по гену *cox1*. Использование генов хлДНК (рибулозобисфосфаткарбоксилаза, *RuBisCO*) для аналогичных задач, также ограничено, поскольку используется лишь в случае автотрофных видов, у которых, тем не менее, не всегда имеет высокую разрешающую способность. Соответственно, для миксотрофов, у которых так же как у автотрофов, имеются пластиды, показано, что маркёры способны выявить несколько различных типов органелл (Schnepf, Elbraechter, 1999). Для морских динофлагелят *Peridinium balticum* и *P. follaceum* особенностью является отсутствие перидин-содержащих пластид, функцию которых выполняют внутриклеточные симбиотические диатомеи (Chesnick et al., 1997; Inagaki et al., 2000). Более того, для представителей динофлагеллят, диатомей (Bowler et al., 2008), криптофитов и хлорарахниофитов (Curtis et al., 2012) показано наличие функциональных генов хлДНК и мтДНК в ядерном геноме. Наряду с этим, как и у высших эукариот (Song et al., 2008), у одноклеточных организмов не исключено наличие ядерных митохондриальных псевдогенов, т.е. нефункциональных копий мтДНК в ядре, которые могут быть коамплифицированы с ортологами мтДНК.

Надо отметить, что за последние несколько лет, ряд молекулярно-филогенетических работ выявили несостоятельность митохондриальных генов в видовой идентификации и филогенетическом анализе и у высших организмов.

Как оказалось, наследование этих генов гибридогенное (аллополиплоидное или гомоплоидное) и сопряжено либо с межвидовой гибридизацией, либо с механизмом интрогрессии. Так, для *Tupiaoctomys barrerae* (красная вискашевая крыса), у которой было первоначально выявлено функционирование рРНК генов только одного родительского типа, показан гетероморфизм мультивалентов синаптонемного комплекса. Филогения по генам 12S рРНК мтДНК и ядерному *GHR* («Growth Hormone Receptor», гормон роста), выявила близкие взаимоотношения с представителем другого рода – золотой вискашевой крысой *Pipanaoctomys aureus*, а ближайшим таксоном к ним стал представитель из третьего рода – *Octomys mimax* (Gallardo et al., 2007). Далее в геноме *T. barrerae* было выявлено сосуществование ДНК-повторов, характерных для обоих видов *P. aureus* и *O. mimax*. Также с помощью *in situ* гибридизации в кариотипе *T. barrerae* идентифицированы хромосомы, гомологичные таковым *P. aureus* и *O. mimax*, а также хромосомы смешанной гомологии обоих родительских геномов (Suárez-Villota et al., 2012). Также один из многочисленных примеров гомоплоидного видообразования показан в отношении приматов. Так, было выявлено, что митохондриальный геном горного мангобея кипунджи *Rungwecebus kipunji* произошёл в результате интрогрессии митохондриального генома путём межродовой гибридизации жёлтого павиана *Papio cynocephalus* с представителями чёрных мангобеев *Lophocebus* (Burrell et al., 2009; Zinner et al., 2009). На основе анализа генома мтДНК было выявлено происхождение рыжего волка *Canis rufus* в результате межвидовой гибридизации, чей геном состоял из комбинации генов от обыкновенного волка *C. lupus* и койота *C. latrans* (Kays et al., 2010).

Всё же для некоторых групп водорослей гены хлДНК и мтДНК весьма успешно используются в виду специфических таксономических характеристик. Так, например, Сандерс (Saunders, 2005) оценил *cox1* как надёжный молекулярно-генетический маркер для красных водорослей, а Робба с коллегами (Robba et al., 2006) сравнил результаты многочисленных образцов этой группы водорослей и заключил, что *cox1* является более успешным маркером, чем пластидный ген

RuBisCO. Тем не менее, некоторые исследования позволили выявить ряд геномных особенностей микроводорослей, главным образом для динофлагеллят, ограничивающих использование в идентификации гены, приобретённые посредством горизонтального переноса, таких как II форма *RuBisCO*, гистоноподобные и большое число пластидных генов (Morse et al., 1995; Hackett et al., 2005; Waller et al., 2006).

Альтернативным гену 18S рДНК эукариотических микроводорослей является ген 16S рДНК у цианей и в целом прокариот. Однако не существует общепринятых принципов в отношении степени сходства последовательностей 16S рДНК в идентификации бактерий. 97% уровень сходства был предложен для видовой дискриминации бактерий по гену 16S рДНК (Stackebrandt, Goebel, 1994), но эта рекомендация была подвергнута сомнению (Fox et al., 1992). Ранее было высказано предположение, что величина нуклеотидных различий $> 0.5\%$ вероятно может считаться показателем принадлежности к новому виду в пределах известного рода (Palys et al., 1997). В то время как введение этих значений было необходимо, чтобы проанализировать большую коллекцию неизвестных изолятов, принадлежащих к разным родам, дальнейший анализ должен быть направлен на определение степени достоверности этих значений. Поскольку бактериальные таксоны не эволюционируют с одинаковой скоростью, может оказаться необходимым использовать различные значения порогового уровня в зависимости от исследуемого рода бактерий (Сомма, 2006). Обычно, большинство исследований из-за отсутствия установленных значений для таксономического разграничения используют 99% сходства в соответствии с видовым уровнем и 97% сходства для идентификации на уровне рода (Drancourt et al., 2000).

Для достижения лучшей разрешающей способности между близко родственными таксонами, в филогении начали широко использовать область внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) между 16S рДНК -23S рДНК. ITS-регион является полиморфным как в нуклеотидных последовательностях, так и по длине и вторичной структуре, иногда даже между копиями в пределах генома (Gugger et al., 2002). ITS, как правило, содержит гены транспортной РНК, тРНК^{Le}

и тРНК^{Ala} (Williamson, Doolittle, 1983), хотя есть несколько примеров ITS либо с единственным геном, тРНК^{Le} (Nelissen et al., 1994), либо полностью без тРНК генов (Iteman et al., 2000; Boyer et al., 2001; Taton et al., 2003). Данный генный маркер позволил выявить существование экотипов одноклеточных цианей из различных микросред горячих источников (Ferris et al., 2003; Ward et al., 2006). Кроме того, он был использован для решения некоторых вопросов, касающихся биогеографии цианобактерий (Parke et al., 2003; Gugger et al., 2005; Taton et al., 2006). Вследствие высокой степени дивергенции участков ITS, проведение филогенетического анализа возможно только между близкородственными штаммами, поскольку процедура выравнивания последовательностей между более отдалёнными таксонами в таком случае значительно затруднена (Taton et al., 2006). Белок-кодирующие генные последовательности также были использованы для построения филогенетических отношений между цианобактериями. Палис с коллегами предположили, что такие белковые гены следует рассматривать в качестве основного критерия для разграничения бактериальных таксонов (Palys et al., 1997, 2000). Они утверждали, что белок-кодирующие гены эволюционируют быстрее, чем 16S рДНК, обеспечивая, таким образом, лучшую видовую дифференциацию. Тем не менее, существует только один ген 16S рРНК, а белков множество, поэтому, вероятно, будет трудно установить точные критерии для видового разграничения на основе белок-кодирующих генов. Также, возможно, что различные наборы генов будут использованы для видовой дифференциации в различных группах бактерий (Gevers et al., 2005). Белок-кодирующие гены, рассмотренные у цианобактерий включают ДНК-зависимую РНК-полимеразу – *rpoB*, *rpoC* и *rpoD* (Palenik, Swift, 1996; Seo, Yokota, 2003; Gugger et al., 2005; Rajaniemi et al., 2005; Lyra et al., 2005; Everroad et al., 2006), большую субъединицу *RubisCO* и/или шаперонин-подобный белок X – *rbcL* и *rbcX* (Rudi et al., 1998; Gugger et al., 2002; Shimada et al., 2003; Lyra et al., 2005; Rajaniemi et al., 2005; Tomitani et al., 2006), различные участки фикоцианинового оперона (Bolch et al., 1996; 1999, Bittencourt-Oliveira et al., 2001; Manen, Falqet, 2002; Crosbie et al., 2003; Ballot et al., 2004; Teneva et al., 2005; Abed

et al., 2006), нитрогеназный комплекс – *nifD*, *nifK*, *nifH* (Kallas et al., 1985; Ben-Porath et al., 1993; Ben-Porath, Zehr, 1994; Henson et al., 2002; Zehr et al., 1997; Henson et al., 2004; Gugger et al., 2005; Abed et al., 2006), регуляторные гены дифференциации гетероцист – *hetR* (Janson et al., 1999; Carpenter, Janson, 2001; Lundgren et al., 2005; Tomitani et al., 2006), каталитическую субъединицу гена РНКазы Р – *rnpB* (Vioque, 1997; Schon et al., 2002), субъединицу В ДНК-гиразы – *gyrB* (Seo, Yokota, 2003), гены реакционного центра фотосистемы II белка D1 – *psbA* (Hess et al., 1995), микроцистин-кодирующие гены – *mscA* (Hisbergues et al., 2003; Yoshida et al., 2005; Rinta-Kanto et al., 2006), межгенный спейсер фикоэритрина (Abed et al., 2006). Все эти генные маркёры у цианобактерий обладают неравноценной разрешающей силой, все способны определить количество генотипов (и/или линий) изолятов для оценки генетического разнообразия в месте сбора, их популяционную или филогеографическую структуру. Иные цели маркёров заключаются в решении вопросов таксономии родового или видового уровня, а также для создания биогеографических паттернов. Подобно другим исследованиям, использующим эти маркёры, последние применялись по отдельности или в ассоциации (мультигенный анализ) с использованием до семи генетических маркёров (Tanabe et al., 2007; Wu et al., 2011). Выбор лучшего филогенетического маркёра является в какой-то степени спорным, так как в некоторых исследованиях, использующих больше одного генетического маркёра, результаты оказываются противоречивы (Dyble et al., 2002), в то время как в других есть чёткое соответствие между тестируемыми маркёрами (Ballot et al., 2008; Gugger et al., 2002; Naande et al., 2008). В тех исследованиях, которые основаны на мультигенном анализе (Tanabe et al., 2016; Wu et al., 2011), точность и надежность филогенетического выхода возрастает, поскольку есть возможность проанализировать больше генетической информации (Gadagkar et al., 2005). Тем не менее, этот вид анализа имеет свои недостатки, поскольку он требует проведения большего числа дорогостоящих молекулярно-генетических анализов, в частности, ПЦР и секвенирования, чем при использовании одного генетического маркера. Преимущества гена 16S рДНК

среди всех остальных маркёров заключается в его успешном применении в любом молекулярно-генетическом исследовании, он оказался единственным используемым маркёром в таксономии, филогении, филогеографии, эволюции и биогеографии цианобактерий (Moreira et al., 2013). Топологии деревьев, полученных на основе различных последовательностей рДНК и белков, в большинстве случаев оказывались конгруэнтными между собой (Zehr et al., 1997; Honda et al., 1999; Ernst et al., 2003; Everroad et al., 2006; Tomitani et al., 2006), хотя также выявлялись противоречия из-за обнаруженного явления горизонтального переноса генов (HGT) в фикоцианиновом опероне у *Athrospira* (Manen, Falquet, 2002) и рекомбинации генов *RuBisCO* у ряда представителей других родов (Rudi et al., 1998).

Не менее важно, для сравнительного молекулярно-генетического анализа учитывать наличие в геномном банке сравниваемых последовательностей. Этому требованию удовлетворяют гены рДНК, поскольку большая часть последовательностей представлена рибосомными генами яДНК. Несмотря на некоторые недостатки, индивидуальные для определённых таксономических групп микроводорослей, гены рибосомного кластера имеют преимущества по сравнению с другими ядерными, митохондриальными и хлоропластными генами и являются наиболее успешными и востребованными в установлении таксономической принадлежности, количественной оценке видового разнообразия и выявлении эволюционных связей. Особенно значимое место занимают гены рДНК в молекулярно-экологическом анализе видов, вызывающих ВЦВ (Adachi et al., 1996; Scholin et al., 1994, 1997; Miller, Scholin, 1998; John et al., 2005).

1.5. Методы, используемые в установлении родственных связей и филогенетического положения у микроводорослей и цианобактерий

Генетические взаимоотношения между видами микроводорослей могут быть выявлены через реконструкцию филогенетических связей с помощью трёх

традиционных методов: ближайшего связывания (NJ), максимального правдоподобия (ML) и метода Байеса (BI).

Для более глубокого анализа, например, на уровне штамма одного вида, чаще используется метод ближайшего связывания (NJ). NJ метод дает хороший результат в ситуации, когда с момента межвидовой (межпопуляционной) изоляции прошел достаточно небольшой промежуток времени (Темралеева и др., 2014). Методы дискретного анализа основаны на оценке правдоподобия, или вероятности нахождения каждого конкретного нуклеотида в каждой конкретной позиции (расчет вероятностей различных эволюционных трансформаций признаков) (Лухтанов, 2013). Реконструкция деревьев на основе ML-метода находится в прямой зависимости от выбора модели нуклеотидных замен. Несмотря на то, что подход устойчив даже к существенным отклонениям выбираемых моделей от оптимальных (Felsenstein, 2004), использование принципиально отличающейся модели может привести к серьёзным ошибкам. Поэтому выбор оптимальной модели для метода максимального правдоподобия является ключевым этапом анализа (Лухтанов, 2013).

Достоверность филогенетических реконструкций оценивают непараметрическим бутстрэп-анализом (bootstrap analysis) (Hedges, 1992) для NJ и ML, а также методом байесовского оценивания соответственно для BI. Таким образом, поддержки узлов ветвей, рассчитанные с помощью бутстрэп-метода, называются бутстрэпными вероятностями (BP), а рассчитанные методом байесовского оценивания называются апостериорными вероятностями (PP). Точность оценки BP зависит количества заданных бутстрэп-реплик. Отмечено, что при 200 бутстрэп-репликах относительная ошибка определения BP может составлять 9%, при 1000 – 4%, а при 2000 – 1-2%. Считается, что бутстрэп-анализ из 1000 реплик является достаточным (Темралеева и др., 2014).

Байесов подход позволяет более эффективно рассчитывать вероятности в условиях недостатка информации. Позволяет суммировать информацию, извлекаемую из предварительных гипотез, с информацией, получаемой из опытов, для расчета апостериорных вероятностей (априорных вероятностей),

скорректированных с учетом проведенных эмпирических испытаний, далее используемых для оценки достоверности тестируемых гипотез (Лухтанов, 2013).

Почти все филогенетические методы предполагают, что эволюция представляет собой процессы строгой дивергенции, которые могут быть смоделированы с помощью филогенетического дерева (Than et al., 2007). Однако главный недостаток реконструкции филогенетического древа и заключается в предположении, что эволюция его ветвей не может образовывать сеть, то есть, ветви могут расходиться, но не могут появляться за счет пересечения. Тем не менее, данные принципы алгоритмов не могут корректно использоваться для видов со случаями рекомбинации, горизонтального переноса генов и межвидовой гибридизации. Все три механизма характерны для одноклеточных водорослей. Таким образом, визуализация полученных деревьев не будет соответствовать фактическому анализируемому положению таксонов и их взаимоотношениям. Поэтому в таких случаях рекомендованы филогенетические сети как лучшая форма представления взаимоотношений между таксонами (Hallett, Lagergren, 2001; Moret et al., 2004).

В случае идентификации неизвестного таксона, анализ филогенетического положения и установления родственных связей начинают с более простого дистанционного метода NJ, с подсчетом бутстрэп-индексов достоверности узлов ветвей. При получении низких значений BP в узлах дерева, применяют более сложные методы, метод ML с бутстрэп-анализом и/или байесовский метод и расчет апостериорных вероятностей (PP). В данном случае топология дерева может измениться, однако при увеличении значения BP анализируемого узла, принадлежность можно установить до более низкого ранга.

Трудности, возникающие при анализе микроводорослей, как правило, связаны с репрезентативностью описанных таксонов и/или достаточным набором последовательностей для таксона в базе данных GenBank. Например, секвенированные последовательности не более чем 150 видов из 2500 известных на сегодня динофлагеллят доступны в базе с существенным численным преобладанием таксонов-фотосинтетиков (Murray et al., 2005). Начиная от

применимости к одноклеточным понятию «вид», попытках в определённых случаях дискриминировать «вид» от «штамма» стоит множество трудностей. Для анализа популяционной структуры также предстаёт множество несоответствий традиционным критериям. Зачастую в анализ включают свежие молекулярно-генетические данные, полученные из единственной клетки с помощью современных методов напрямую из естественной среды, т. е. без применения ранее необходимых промежуточных этапов, в частности культивирования, в течение которого могут происходить кардинальные геномные перестройки, отражающиеся на морфологии и биохимии. В таком случае, для клетки из естественных условий, являющейся единицей популяции, характерны соответствующие преимущества: естественная открытая система, в которой она существует, позволяет обмениваться веществом и полноценно эволюционировать. В частности, ей свойственно половое размножение, позволяющее производить поколения с новыми геномными комбинациями; действие естественного отбора позволяет сохранять выгодные и отбраковывать нежелательные признаки. В случае культивируемых изолятов, клоновая культура представляет собой совокупность клеток, или чистую линию, полученную в результате бесполого воспроизведения. Хотя на сегодняшний день для некоторых видов микроводорослей показаны случаи полового размножения в лабораторных условиях (Lakeman et al., 2009; Lirdwitayaprasit, 2015).

Очевидно, что для видов, преимущественно или полностью бесполой, характерно отсутствие популяционной структуры, поскольку высокая скорость клонального размножения теоретически должна уменьшать генетическое разнообразие (Balloux et al., 2003; Arnaud-Haond et al., 2005). Соответственно клональность – не является ограничением для популяционного анализа. Тем не менее, культура изолирована от окружающих условий, являясь в некотором смысле замкнутой. Хотя, культуры будут также подвержены давлению отбора, и претерпевать молекулярно-генетические изменения, в основном имеющие редуцированный характер, поскольку клонам не нужно приспосабливаться к меняющимся и стрессовым условиям. После определённого числа генераций

«лабораторный» вид может разительно отличаться от такого же вида из естественных условий (Richlen, Barber, 2005). Более того, известно, что клоны одной монокультуры зачастую не являются однородными, а в результате длительного эксперимента по эволюционным изменениям популяций *E. coli*, проводимого под руководством Ленски, было показано, что клоны одного штамма через определённое число поколений (0 (предковый штамм), 2000, 5000, 10000, 15000, 20000 и 40000) фиксируют полезные мутации $1,6 \times 10^{-10}$ нуклеотидов на поколение. В результате, к 20000 поколению относительно предкового штамма было обнаружено 45 закрепившихся в популяции мутаций (Barrick et al., 2009). Отличия клонов регистрировались на уровне морфологии, генетики, химическом составе, физиологии и свойствам. В итоге всё это способно привести к тому, что внутривидовой генетический уровень различий превысит межвидовой уровень. Результаты таких исследований можно поставить под сомнение из-за так называемых «бутылочных эффектов», где культурные штаммы не являются репрезентативными своим природным аналогам (Richlen, Barber, 2005).

Несмотря на рекомендуемые более релаксационные требования в методах, критериях и оценках молекулярно-генетического анализа микроорганизмов (от принятых для высших организмов), остаётся под вопросом: насколько справедливо в рамках одного анализа сравнивать данные полученные от различных типов образцов? Тем не менее, если изолят необходимо культивировать, то основной комплекс молекулярно-генетических анализов должен проводиться на культуре, поддерживающейся не более двух недель в лабораторных условиях. Данная временная граница весьма условна, тем не менее, она была рекомендована как пороговая (Lakeman et al., 2009).

Более того, для морских организмов, живущих в динамических водных условиях, в отличие от рассматриваемых на суше, меняющихся в режиме «реального времени», понятие «популяции» снова усложняется. Морские системы являются более открытыми, чем наземные, и распространение видов происходит на гораздо больший диапазон, нежели на суше (Killian, Gaines, 2003). В связи с непродолжительным периодом существования совокупность микроорганизмов

одного вида за короткое время может смениться совокупностью других микроорганизмов того же вида, но с отличающимися генетическими характеристиками, поэтому объективно говорить о популяции будет проблематично (Medlin, Kooistra, 2010). Однако, в микробиологии в качестве популяции всё же рассматривают чистую культуру, предполагая, что в этом случае популяция представляет собой микропопуляцию.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал 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* cf. *trochoidea* – Т.В. Морозовой. Для анализа отбирали отдельные клеточные изоляты из культур *Ostreopsis* sp. Также отдельные клетки *Dinophysis* cf. *acuminata*, *Ostreopsis* sp. и *Prorocentrum* sp. из проб морской воды зал. Петра Великого в период массового развития этих видов. Перечень анализируемых видов с штаммовой маркировкой, местом и временем сбора, в том числе координатами, возрастом образцов на момент проведения настоящего анализа, видом анализируемых образцов (клетка/культура), а также способом выделения ДНК и номерами нуклеотидных последовательностей в GenBank представлены в сводной таблице – Таблица 1.

2.2. Выделение ДНК

Выделение ДНК в зависимости от культур проводилось согласно методике СТАВ, описанной Doyle, Doyle (1990), с небольшими модификациями; методом HotSHOT («hot sodium hydroxide and Tris», щелочной лизис NaOH- Tris) (Montero-Pau et al., 2008); методиками на основе хелатирующей смолы Chelex® 100 (Bio-Rad, США), а также с помощью коммерческих наборов QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия). Выделение ДНК из одной клетки проводили по методу «single-cell», описанному в работе Ки с соавторами (Ki et al., 2005).

2.2.1. Выделение ДНК с применением СТАВ по Doyle, Doyle (1990) с модификациями

Детергент цетилтриметиламониум бромид (СТАВ) широко используется для выделения ДНК из растительных объектов и из большого количества

материала, поскольку позволяет успешно растворять мембраны клеток, разделять ДНК и полисахариды/полифенолы (Остроумов и др., 2010).

Суспензию клеток в культивированной среде или фиксированную этанолом центрифугировали 10 мин при 5000-8000 об/мин. Супернатант удаляли, а клеточный осадок 10-30 мкл промывали в 50-70 мкл однократного ТЕ-буфера, центрифугировали 10 мин при 5000-8000 об/мин. Супернатант удаляли, полученную биомассу замораживали до -20°C.

Для разрушения клеточных стенок к клеточной биомассе добавляли 100 мкл 2%-СТАВ буфера, предварительно прогретого до 65°C. Пробирки переносили в твердотельный термостат, добавляли на кончике микрошпателя (или с помощью пинцета) стеклянный порошок и с помощью ошлифованного стеклянного пестика растирали течение 1-2 мин. Добавляли в пробирки 2 мкл протеиназы *K* (20 мг/мл) (5Prime, Германия) и еще 50 мкл 2%-СТАВ буфера и оставляли инкубироваться при 65°C на 30 мин, периодически перемешивая пробирки. Остудив пробы до комнатной температуры, добавляли равный объем смеси хлороформ: изоамиловый спирт (24:1), тщательно встряхивали пробирки в течение 10 минут, затем центрифугировали 10 минут при 13000 об/мин (разделение органической и водной фаз). Супернатант аккуратно переносили в чистую пробирку, снова добавляли равный объем смеси хлороформ: изоамиловый спирт (24:1), тщательно взбалтывали пробирки в течение 10 мин, затем центрифугировали 10 мин при 13000 об/мин. Супернатант аккуратно переносили в чистую пробирку, для осаждения ДНК добавляли $\frac{2}{3}$ объема холодного изопропилового спирта, тщательно перемешали на вортексе. Центрифугировали 10 мин при максимальной скорости 13000 об/мин. Процедуру осаждения ДНК необходимо проводить быстро, чтобы предотвратить осаждение полисахаридов и пигментов с осадком ДНК. Изопропанол аккуратно сливали и к осажденной ДНК добавляли 70% этиловый спирт. Центрифугировали 15 мин при 13000 об/мин. Спирт сливали и ДНК подсушивали под вакуумом 10 мин для удаления паров спирта. Далее пробы растворяли в 50 мкл автоклавированного 1x ТЕ-буфера.

Таблица 1 – Сводная таблица по идентифицируемым видам

Таксон	Маркировка культуры/морфотип	Установленный статус	Штамм (культура/изолят)	Вид анализируемого материала (культура-клетка) возраст на момент анализа	Место и год сбора	Координаты	Способ выделения ДНК (наиболее успешный выделен жирным шрифтом)	Номер последовательности в GenBank		
								18S рДНК (16S рДНК)	ITS-регион	28S рДНК
Dinoflagellatae	<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	<i>Ostreopsis sp. 1,</i> <i>Ostreopsis sp. 2</i>	ORUS	Культура (~2 года), клетка из клоновой культуры (~2 года), клетка из экологического образца (1-24 ч.)	Японское море, Залив Петра Великого, Уссурийский залив, б. Соболев сентябрь-октябрь 2010, 2012гг.	43.07° N, 131.96° E	Коммерческий набор QIAamp DNA Mini Kit, CTAB , « single cell »	KF359996- KF360004	KC991331- KC991352	KC848711- KC848738
	<i>Prorocentrum lima</i>	<i>P. foraminosum</i>	№7, №16	Культура, клетка из клоновой культуры (~3 месяца)	Японское море, Залив Петра Великого, Залив Босфор Восточный, б. Житкова, июнь 2013	43.02° N, 131.93° E	HotSHOT « single cell »	KT203864- KT203865	KT203870- KT203871	KT203866- KT203869

Dinoflagellatae	<i>Scrippsiella trochoidea</i>	<i>Scrippsiella trochoidea</i>	AB-2010 AB-2013	Культура пророщенная из цист (~2 мес)	Японское море, Залив Петра Великого, Амурский залив, 2010 (октябрь), 2013 (март)	43.199° N, 131.919° E	HotSHOT	-	KJ996096	
	<i>Dinophysis acuminata</i>	<i>Dinophysis acuminata</i>	DARU-13	Клетки из экологических образцов (1-48 ч.)	Японское море, Залив Петра Великого, Амурский залив, 2013 (25 августа)	43.199° N, 131.919° E	«single cell»	KJ508017	KJ508016	KJ508015
Нантофиты	<i>Prymnesium</i> sp.	<i>Tisochrysis lutea</i>	Vostok08	Культура (~6 лет)	Японское море, Залив Петра Великого, залив Восток	42.893° N, 132.75° E	HotSHOT	KM365435	KM365434	KM365436
Суанопиты	-	<i>Leptolyngbya</i> sp.		2 недели	Японское море, Залив Петра Великого, Амурский залив	43.20° N, 131.92° E	HotSHOT, Chelex 100	KU645398		

Rhodop hyta	<i>Porphyri- dium purpureum</i>	<i>Porphyri- dium purpureum</i>	PC-85 (“ <i>Porph yridium cruentu m</i> (Ag.) Naeg. str.Visch er; Texas- 161. CALU- 39, среда №12”)	(более 30 лет)	Культура передана в 1985г. из института БНИИ ЛГУ (ныне СПбГУ)	-	СТАВ	KF766115	KF766118
			PP-V08	Культура (~5 лет)	Японское море, Залив Петра Великого, залив Восток	42.893° N, 132.75° E		KF766116	KF766119
			PP- AB11	Культура (~2 г.)	Японское море, Залив Петра Великого, Амурский залив	43.160° N, 131.892° E		KF766117	KF766120

2.2.2. Выделение ДНК на основе HotSHOT (*hot sodium hydroxide and Tris, щелочной лизис NaOH- Tris*)

Метод на основе щелочного лизиса широко используется для экстрагирования ДНК из взрослых форм, личинок и яиц зоопланктона. В рамках данного исследования метод HotSHOT с модификациями был успешно применён в отношении морских микроводорослей.

До выделения ДНК, клоновые культуры микроводорослей центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин, удалили надосадочную жидкость. Культуры, имеющие крепкую клеточную оболочку, на 30 мин помещали на -20°C , затем растирали пестиком. К 20 мкл клеточного пеллета добавили 50 мкл стерильной бидистиллированной воды, аккуратно перемешали и снова центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин. С помощью автоматической пипетки, не касаясь осадка, отбирали водный супернатант. Пробирки с полученной клеточной биомассой ставили на 10-20 мин на -20°C . Далее в образцы добавляли 50 мкл щелочного лизирующего буфера (pH 12) (NaOH 25 mM, Na₂EDTA 0,2 mM, pH 8.0), стерилизованного фильтрованием через 0.2-микронный фильтр, и тщательно перемешали на вортексе. Обматывали крышки пробирок парафильмом для минимизации испарения раствора и во избежание открывания крышек вследствие воздействия высокой температурой. Ставили пробирки в твердотельный термостат при 95°C на 30 мин. В течение инкубации пробы периодически перемешивали. После чего, пробы охлаждали, поместив на лёд или криоштатив на 5 мин и в коротком режиме откручивали пробирки в центрифуге (10 сек). Далее добавили 50 мкл нейтрализующего буфера (pH 5) (40 mM Tris-HCl), перемешивали на вортексе и центрифугировали. На ПЦР брали по 1-2 мкл.

2.2.3. Выделение ДНК на основе хелатирующей смолы Chelex® 100

Для удаления морской воды и внешней контаминации образец цианобактериального мата помещали в 1.5 мл центрифужную пробирку, содержащую 100 мкл однократного автоклавированного буфера TE, аккуратно перемешивали переворачиванием и центрифугировали при 7000 об/мин 2 мин.

Далее, удаляли раствор из пробы, и ставили пробирку на 30 мин на -20°C , затем добавляли 100 мкл 5% Chelex® 100 (Bio-Rad, USA). Перемешивали цианобактериальный пеллет на вортексе, обматывали крышку пробирки парафильмом и инкубировали 5 мин при 95°C в твердотельном термостате. После чего добавляли 1 мкл протеиназы *K* (10 мкг/мкл), перемешивали на вортексе, и инкубировали 30 мин при 55°C . Для инактивации фермента, температуру увеличивали до 100°C и инкубировали в течение 8 мин. Далее образец центрифугировали при 10000 об/мин 3 мин, охлаждали до 4°C и ставили ПЦР, или отбирали супернатант в новую пробирку и сохраняли до анализа при -20°C .

2.2.4. Выделение ДНК из одной клетки «single-cell»

С момента разработки первой методики выделения ДНК из одной клетки, многочисленные её модификации и альтернативные методы (Marín et al., 2001; Edvardsen et al., 2003; Hart et al., 2007; Ki et al., 2005; Ki et al., 2007) продолжают оптимизироваться.

Отбор клеток проводился под инвертированным микроскопом ВХ41 (Olympus, Токио, Япония). Захват клеток из образца проводили с помощью микропипетки, каждый изолят переносили в стерильную каплю морской воды на чашке Петри, откуда осуществлялся новый захват клетки и её перенесение в новую стерильную каплю. Процесс повторяли от 3 до 5 раз до тех пор, пока одиночная клетка водоросли полностью не освободится от контаминации. Далее клетку переносили в каплю автоклавированного однократного ТЕ буфера. Затем каплю с клеткой переносили в 200-мкл ПЦР-пробирку, куда добавляли 3-6 мкл протеиназы *K* (200 мкг/мкл). Во избежание испарения содержимого на следующем этапе экстракции ДНК крышку пробирки обматывали парафильмом и ставили пробирки в твердотельный термостат при 55°C на 90 мин. Для инактивации протеиназы *K* температуру увеличивали до 95°C и инкубировали в течение 10 мин. В коротком режиме откручивали пробирки в центрифуге, охлаждали до 4°C или сохраняли до анализа при -20°C .

2.3. ПЦР

С выделенными образцами ДНК проводили классическую ПЦР с праймерами, представленными в Таблице 2. Амплификацию проводили на приборах Bio-Rad C1000, DNA Engine Tetrad 2 (Bio-Rad, США), GeneAmp System 9700 Life Technologies (Applied Biosystems) и ABI Veriti (Applied Biosystems). Общая смесь для ПЦР готовилась либо в формате мастер-миксов согласно рекомендациям производителя: набор Exact Polymerase Kit (5PRIME, GmbH) для высокоточной ПЦР, 5PRIME MasterMix и ScreenMix (Евроген, Россия); либо в формате набора отдельных компонентов по следующей прописи:

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация
Деионизованная вода	–	–
10X DreamTaq Buffer на основе KCl и (NH ₄) ₂ SO ₄ (с 20 мМ MgCl ₂)	10X	1X
dNTPs	10мМ смесь (2.5мМ каждого из dATP, dTTP dCTP, dGTP) дезоксинуклеотидтрифосфатов (мМ)	0.2 мМ каждый
Праймер F (прямой)	2.5мкМ (μМ)	0.25мкМ
Праймер R (обратный)	2.5мкМ (μМ)	0.25мкМ
DreamTaq DNA- полимераза	5 ед/мкл	1 ед
ДНК	–	1-3 мкл
Общий объем смеси	–	25мкл

Таблица 2 – Праймеры использованные в анализе и условия ПЦР к ним

№ пары	Праймеры		Условия реакции (°C/время)	Ген (участок)
	Название/ источник	Последовательность (5'→3')		
1	ITS A (Adachi et al., 1994)	ССААГСТТСТАГАТСГТААСА АГГТНТССГТАГГТ	95 – 5 мин 94 – 30 сек 54 – 1 мин 72 – 1: 15 сек 72– 5 мин 12– ∞ } 35 циклов	ITS1-5.8S рДНК- ITS2
	ITS B (Adachi et al., 1994)	ССТГСАГТГСАСАКАТГСТТА АРТТАСАГСА		
2	DIR (Scholin et al., 1994)	АСССГСТГААТТТААГСАТА	95 – 5 мин 94 – 30 сек 52 – 1 мин 72 – 1: 15 сек 72– 5 мин 12– ∞ } 35 циклов	28S рДНК (D1-D2 регион)
	D2C (Scholin et al., 1994)	ГТГТТАТТТТГАТТТЦСТТГ		
3	28S zoox-F (Loi, 1998)	ССТСАГТААТГГСААТГААСА	95 – 5 мин 94 – 30 сек 56 – 1 мин 72 – 1: 15 сек 72– 5 мин 12– ∞ } 35 циклов	28S рДНК (D1-D3 регион)
	28S zoox-R (Loi, 1998)	ССТТГГТССГТГТТТААГА		
4	F08 (Chinain et al., 1999)	ГГАТТГГСТСТГАГГГТТГГГ	95 – 5 мин 94 – 30 сек 56 – 1 мин 72 – 1: 15 сек 72– 5 мин 12– ∞ } 35 циклов	28S рДНК (D8-D10 регион)
	RB (Chinain et al., 1999)	ГАТАГГААГАГССАГАТСА		
5	1F (Giribet, Ribera, 2000)	ТАССТГГТТАТСТГССАГТАГ	95 – 5 мин 94 – 30 сек 56 – 1 мин 72 – 1: 15 сек 72– 5 мин 12– ∞ } 35 циклов	18S рДНК (V1-V5 регион)
	5R (Giribet et al., 1996)	СТТГГСАААТГСТТТЦСГ		

Таблица 2 (Продолжение)

6	3F (Giribet et al., 1996)	GTTCGATTCCGGAGAGGG	95 – 5 мин 94 – 30 сек 54 – 1 мин 72 – 1: 15 сек 72 – 5 мин 12 – ∞	} 35 циклов	18S рДНК (V3-V8 регион)
	18Sbi (Giribet et al., 1996)	GAGTCTCGTTCGTTATCGGA			
7	18Sa2.0 (Giribet et al., 1996)	ATGGTTGCAAAGCTGAAAC	95 – 5 мин 94 – 30 сек 54 – 1 мин 72 – 1: 15 сек 72 – 5 мин 12 – ∞	} 35 циклов	18S рДНК (V6-V9 регион)
	9R (Giribet et al., 1996)	GATCCTTCCGCAGGTTACCTAC			
8	CYA106F (Nubel et al., 1997)	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	95 – 5 мин 94 – 30 сек 60 – 1 мин 72 – 1: 15 сек 72 – 5 мин 12 – ∞	} 39 циклов	16S рДНК (V2-V3 регион)
	CYA781R (a) (Nubel et al., 1997)	GACTACTGGGGTATСТААТСС САТТ			
9	CYA359F (Nubel et al., 1997)	GGGGAATYTTCCGCAATGGG	95 – 5 мин 94 – 30 сек 60 – 1 мин 72 – 1: 15 сек 72 – 5 мин 12 – ∞	} 39 циклов	16S рДНК (V2-V3 регион)
	CYA781R (b) (Nubel et al., 1997)	GACTACAGGGGTATСТААТСС СТТТ			

2.4. Электрофорез в агарозном геле

Результаты амплификации регистрировали после проведения электрофореза в 1-1.5% агарозном геле в 0.5x TBE pH=8.3 (трис-боратный электродный буфер) (89мМ трис, 89мМ борная кислота, 2мМ ЭДТА pH=8.0) или в 1x TAE pH=7.6

(трис-ацетатный электродный буфер) (40мМ трис-ацетат, 1мМ ЭДТА, уксусная кислота, CH_3COOH), окрашенном этидием бромидом, EtBr (3.8-диамино-6-этил-5-фенилфенантридиумбромид) ($\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ нм}$) под трансиллюминатором в проходящем УФ-свете (365 нм).

Готовили раствор EtBr до конечной концентрации 1.5 мкг/мл: брали 150 мкл из стокового раствора EtBr с концентрацией 10 мг/мл на 1л бидистиллированной воды. Хранили в бутылке с тёмным стеклом (EtBr быстро разрушается под действием света).

Взвешивали рассчитанное количество порошка агарозы (1 г для подготовки 100 мл 1% геля) и высыпали в химическую термостойкую колбу. Добавляли в колбу 100 мл 0.5x TBE/1x TAE. Нагревали смесь в СВЧ-печи до полного расплавления. Охлаждали расплав до $\approx 60^\circ\text{C}$. Устанавливали гребёнки \approx в 1 см от края формы. Заливали расплав в плашки. После того, как гель полностью полимеризуется (30 мин), осторожно удаляли гребёнки, а плашки помещали в электрофорезные камеры с 0.5x TBE/ 1x TAE.

10x буфер для нанесения образцов: 0.025 г бромфенолового синего БФС; 4 мл глицерина; 5 мл 0.5М ЭДТА, рН 8.0; доводили до 10 мл бидистиллированной водой.

Смешивали 6 мкл 10xбуфера и 1 мкл каждого ПЦР-продукта в лунках малого иммунологического планшета и вносили каждый образец в лунки геля. Наносили маркер молекулярного веса. Электрофорез проводили при напряжении 100 В, после чего окрашивали гель в камере с раствором EtBr 1.5 мкг/мл в течение 10-15 мин, далее просматривали гель под трансиллюминатором ESX-F15.C (Vilber Lourmat) в проходящем УФ-свете.

2.5. Приготовление компетентных клеток *Escherichia coli* для молекулярного клонирования

Среда LB (Лурия-Бертани): 1% триптон; 0.5% дрожжевой экстракт; 1% NaCl. Добавить ddH₂O. рН довести до 7.5 с помощью 2М NaOH. Для среды с

агаром добавляется 1.2% агар. В среде с агаром pH доводится после добавления и расплавления агара. Далее – среды автоклавируются.

1М CaCl₂ (на 1л): 147 г CaCl₂·2H₂O (дегидратированный) и 938.48 мл ddH₂O, или 111г CaCl₂ (негидратированный) и 1л ddH₂O. Стерилизация фильтрованием через 0.22 микронный фильтр.

0.1М CaCl₂ (на 1л): 100мл 1М CaCl₂ и 900мл ddH₂O. Стерилизация фильтрованием через 0,22 микронный фильтр.

50% глицерин (100 мл): 50 мл глицерина и 50 мл ddH₂O. Стерилизация на водяной бане.

0.1М CaCl₂ +15% глицерин: 100 мл 1М CaCl₂, 300 мл 50% глицерин, 600 мл ddH₂O.

1. Среду LB с агаром расплавляли на водяной бане, охлаждали до 55°C, заливали чашку Петри. После того, как среда застывала, высевали «затравку» клеток *E. coli* штамм *DH5α*. Брали 1 каплю и растирали на среде с помощью шпателя. Инкубировали чашку 12-14 часов при 37°C в Environmental Shaker-Incubator ES-20.
2. Отдельную колонию с чашки переносили в стеклянную пробирку с 2 мл жидкой LB среды с помощью бактериальной петли. Ставили инкубироваться при 37°C на 200 об/мин в Environmental Shaker-Incubator ES-20 на ночь.
3. 500 мкл ночной *DH5α* культуры добавляли в стеклянную круглодонную колбу с 50 мл жидкой LB среды. Ставили инкубироваться при 37°C на 200 об/мин в Environmental Shaker-Incubator ES-20 до оптической плотности OD₆₀₀=0.4 (~ 2-3 часа). Оптическую плотность проверяли на спектрофотометре SmartSpec 3000 (Bio-Rad), в сравнении с отрицательным контролем «blank» (чистая LB среда).
4. По 25 мл культуры переносили в две 50-мл полипропиленовые пробирки с коническим дном, охлаждали во льду в течение 20 мин.

5. Центрифугировали клетки при 4°C 2500 об/мин 10 мин. Удаляли среду, а осадок аккуратно ресуспендировали в 6 мл холодного 0,1М CaCl₂. Далее помещали пробирки в лёд на 30 мин.
6. Центрифугировали клетки при 4°C 2500 об/мин 10 мин. Удаляли раствор 0.1М CaCl₂, а клеточный осадок аккуратно ресуспендировали пипетированием в 2-3 мл холодного раствора 0.1М CaCl₂+15% глицерин. Переносили по 100 мкл клеток в 1.5-мл пробирки Ependorff и ставили в лёд. Замораживали клетки в жидком азоте и хранили при -80°C.

2.6. Молекулярное клонирование

Для реакции лигирования было взято ДНК в количестве 15 нг в 5 мкл смеси. Клонирование фрагментов проводили с использованием T/A Clone System ("Fermentas").

Смесь для лигирования готовилась по следующей прописи и очередности и вносилась в стрипы для каждого фрагмента: ПЦР-фрагмент – 3.33 мкл; плазмидный вектор *pTZ57R/T DNA* – 0.5 мкл; 5хбуфер – 1 мкл; лигаза – 0.17 мкл (Вобщий = 5 мкл). Инкубировали лигирующую смесь 2 часа при комнатной температуре (22°C). После чего проводили трансформацию.

1. Каждую лигирующую смесь трансформировали в 100 мкл химически компетентных клеток *E.coli DH5α*. Клетки должны оттаять до состояния «снежка».

2. Инкубировали 30 минут при 4°C (в кювете со льдом).

3. Поместили пробирки на 1-1,5 мин в твердотельный термостат на 42°C, затем снова в лёд на 2 минуты.

4. Добавили 800 мкл жидкой среды LB без агара.

5. Инкубировали в термостате при 37°C в течение 1 часа. Растопили среду LB с агаром на водяной бане в Water thermostat WB-4MS, дали остыть до 55°C, затем добавили 100 мкл IPTG 100 мМ, 100мкл антибиотика (ампициллин 50 мг/мл), 200 мкл X-gal 2 % (на 100 мл среды). Залили чашки Петри.

6. Центрифугировали пробирки с трансформированными бактериями 2 минуты при 5000 об/мин.

7. Сливали жидкость из пробирок, аккуратно ресуспендировали микропипеткой осадок клеток со 150 мкл супернатанта.

8. Переносили смесь на чашки, размазывали шпателем, указывали номер пробы.

9. Инкубировали чашки ночь при 37°C в Environmental Shaker-Incubator ES-20.

После проводили проверку ПЦР-колоний фрагментов. Планировали брать по 5 колоний на каждый фрагмент.

1. Отбирали и пронумеровывали на каждой чашке колонии белого цвета (со вставкой).

2. ПЦР-смесь готовилась по следующей прописи:

Компонент	Исходная концентрация	Объем
Стерильная бидистиллированная (деионизованная) вода	–	10.3мкл
Буфер на основе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ с MgCl_2	10-кратный	2мкл
dNTPs	10 мМ смесь (mM)	2мкл
M13 for	2.5 мкМ (μM)	2мкл
M13 rev	2.5 мкМ (μM)	2мкл
<i>Taq</i> -полимераза	5000 ед/мл	0.1мкл
Общий объем смеси	–	20мкл

3. С помощью зубочистки переносили колонии в соответствующие ПЦР-пробирки со смесью.

4. Ставили амплификацию, включающую следующие параметры: 94°C – 1 мин (разрушение клеточной стенки); последующие 27 циклов: 94°C – 10 сек (денатурация), 50°C – 10 сек (отжиг праймеров), 72°C – 45 сек (элонгация); финальная достройка цепей 72°C – 5 мин; охлаждение до 12°C.

Далее проводили электрофорез на проверку фрагментов в колониях с маркером молекулярного веса 100 п.н. в агарозном геле. Препараты, которые обнаруживали вставку, осадили 96% спиртом, убрали на 12-14 часов на -20°C (или на 1 час на -80°C), затем провели очистку ДНК-фрагментов с ПЦР-колониями:

- а) все пробы центрифугировали при 10500 об/мин при 4°C 16 мин;
 - б) сливали и добавляли спирт 70% 100 мкл, аккуратно перемешали, перевернув 3 раза;
 - в) центрифугировали при 10500 об/мин при 4°C 16 мин;
 - г) сливали и в планшете ставили сушиться в эксикатор;
 - д) добавляли по 8 мкл 1xTE, откручивали на центрифуге;
 - е) проводили электрофорез продуктов амплификации на проверку концентрации;
 - ж) добавляли соответствующее количество 1xTE в стрипы для уравновешения концентрации;
 - з) встряхивали на Vortex, центрифугировали 5-10 сек.
- Далее ставили секвенальную реакцию.

2.7. Секвенальная реакция

Смесь для секвенальной реакции готовили по следующей прописи:

- 1.5 мкл BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit;
- 1.25 мкл 5x Sequencing Buffer;
- 0.64 мкл M13for праймер (2.5 мкМ) или 0.64 мкл M13rev (2.5 мкМ) праймер*

* Отдельно готовили смесь с прямым праймером и отдельно с обратным.

- деионизованная вода 5.61 мкл;

-1 мкл ДНК.

Программа амплификации включала следующие параметры: 96°C – 1 мин (предварительная денатурация); последующие 25 циклов: 96°C – 10 сек, 50°C – 10 сек (отжиг праймеров), 60°C – 4 мин (элонгация); охлаждение до 4°C.

Далее переосаждали ПЦР-продукт и осуществляли очистку после амплификации:

1 способ:

а) добавляли 2.5мкл 0.125М ЭДТА и 75 мкл 96% этанол;

б) встряхивали на Vortex и оставляли на 20 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали 10500 об/мин 35 мин при 4°C; слили и добавили 100 мкл 75% этанол, аккуратно перемешали и снова центрифугировали, сливали спирт и высушивали под вакуумом.

2 способ:

К каждому образцу добавляли 30 мкл воды, перемешивали, добавляли 45 мкл изопропанола. Оставляли при комнатной температуре не менее 15 мин. Далее центрифугировали на максимуме 35 мин, удаляли супернатант, промывали осадок 70% спиртом и подсушивали под вакуумом.

В стрипы вносили по 8 мкл формамида (HCONH_2), встряхивали на шейкере и центрифугировали 30 сек. Переносили в планшет весь объём, центрифугировали 30 секунд для удаления пузырьков.

Затем, ставили образцы в секвенатор. Капиллярный электрофорез проводили в автоматических генетических анализаторах ABI Prism GA3130 или ABI Prism GA3500 (на базе ИБМ ДВО РАН), или GA3130xl (на базе Дальневосточного Федерального Университета, ДВФУ) на 50-см капиллярной сборке в полимере POP-7.

2.8. Редактирование и сборка хроматограмм, выравнивание последовательностей

Хроматограммы, полученные в результате секвенирования, визуально проверяли на наличие ошибок и конфликтных моментов в нуклеотидных

последовательностях при помощи программ SeqScape Software v2.5 (Applied Biosystems), ChromasPro (Technelysium Pty, Ltd), Unipro UGENE: 1.12 (Okonechnikov et al., 2012), DNA Baser Sequence Assembler v3.x (2012-trial), Geneious trial (www.geneious.com). Последовательности, полученные через клонирование, проверяли более тщательно на наличие химерных вставок и на положение праймеров. Далее проводили сравнительный анализ между последовательностями клонов одного фрагмента, а также с последовательностями, депонированными в международной базе. Последовательности полученных фрагментов сопоставлялись с депонированными в GenBank NCBI с помощью алгоритма BLASTn (Altschul et al., 1990), что дало возможность уточнить видовую принадлежность нескольких штаммов, ошибочно идентифицированных с помощью морфологического анализа.

2.9. Парное и множественное выравнивание последовательностей

Парное и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей для каждой идентифицируемой культуры и клетки осуществляли в программах MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011), Unipro UGENE: 1.12, SeaView 4.5.4 (Gouy et al., 2010) и на интернет-ресурсе <http://phylogeny.lirmm.fr/>. Скорректированные *p*-дистанции рассчитывали согласно выбранным моделям нуклеотидных замен в программе MEGA 5.05. Оптимальные модели нуклеотидных замен выбирали согласно информационному критерию Акаике (AIC) в программах jModelTest 2.1.1 (Darriba et al., 2012) и Modeltest 3.7 (Posada, Crandall, 1998).

2.10. Реконструкции филогенетических деревьев

Филогенетические реконструкции генов проводили по дистанционным методам кластеризации: метод ближайшего связывания (NJ) и дискретным методам: максимального правдоподобия (ML) и Байеса (BI) с помощью программ MrBayes (v. 3.1.2) (Ronquist, Huelsenbeck, 2003), MEGA 5.05, интернет-ресурсов T-REX (Woc et al., 2012), Phylogeny.fr (<http://phylogeny.lirmm.fr/>). Значимость филогенетических реконструкций оценивали непараметрическим бутстрэп-

анализом (bootstrap analysis) (Hedges, 1992) для NJ и ML в 1000 реплик, а также методом байесовского оценивания соответственно для BI.

Для филогенетического построения всех известных риботипов некоторых анализируемых видов, выявления их географической локализации и связей был использован метод медианных сетей (median joining) в программе SplitsTree 4.12.3 (Huson, Bryant, 2006).

***Ostreopsis* sp.**

Для построения филогенетических реконструкций использовали близкие к полученным нами последовательности из геномного банка. Выравнивание проводили по алгоритмам Clustal W, MAFFT встроенным в программу Unipro UGENE: 1.16.1 и MEGA 5.05, и MUSCLE. Оценки генетических различий рассчитывали на основе p -расстояний. Скорректированные p -расстояния рассчитывали согласно выбранным моделям нуклеотидных замен в программе MEGA 5.05. В качестве оптимальной модели нуклеотидных замен была выбрана модель TN93+G (Тамура-Ней с гамма-распределением) согласно информационному критерию Акаике (AIC) в программе jModelTest 2.1.1 (Darriba et al., 2012). Модель предполагает различные вероятности для обоих видов транзиций ($A \leftrightarrow G$ по сравнению с $C \leftrightarrow T$), и трансверсий. Частоты встречаемости нуклеотидов различаются (Tamura, Nei, 1993). Филогенетические реконструкции гена 18S рДНК проводили по методу ближайшего связывания (NJ), максимального правдоподобия (ML) и Байеса (BI) и программы MEGA 5.05. Для укоренения деревьев использованы последовательности внешней группы *Coolia monotis* VGO783.

***Scrippsiella* sp.**

Для построения филогенетических реконструкций использовали нуклеотидные последовательности к гомологичным генным фрагментам для видов рода *Scrippsiella* из геномного банка. Множественное выравнивание последовательностей анализируемого штамма с опубликованными в GenBank NCBI проводили по алгоритму MAFFT. Небольшие несоответствия в выравнивании редактировались вручную. Оптимальная модель нуклеотидных

замен согласно критерию AIC выбрана GTR+G+I. Филогенетические реконструкции проводили по объединённым последовательностям генов 28S рДНК (D1-D2) и ITS региона по методу ближайшего связывания (NJ), максимального правдоподобия (ML) и Байеса (BI). Для укоренения деревьев использованы последовательности внешней группы *Pentaparsodinium tyrrhenicum*.

***Dinophysis* sp.**

Видовой статус штамма DARU-13 определяли с помощью алгоритма BLASTn, доступного на сайте NCBI. Филогенетическое положение и связи устанавливали по последовательностям ITS-региона (ITS1–5.8S рДНК–ITS2) на основе BI, NJ и ML. В анализ включали опубликованные последовательности видов рода *Dinophysis*. Множественное выравнивание последовательностей анализируемого штамма с опубликованными в GenBank NCBI проводили по алгоритму MAFFT. Оптимальная модель нуклеотидных замен согласно критерию AIC выбрана GTR+G+I.

Tisochrysis lutea

Для построения филогенетических реконструкций использовали близкие к полученным нами последовательности из генного банка. Выравнивание проводили по алгоритмам Clustal W, MAFFT встроенным в программе Unipro UGENE: 1.16.1 и MEGA 5.05, и MUSCLE с опцией «Gblocks alignment trimmer» на интернет-ресурсе <http://phylogeny.lirmm.fr/>. Оценки генетических различий рассчитывали на основе *p*-расстояний. Скорректированные *p*-расстояния рассчитывали согласно выбранным моделям нуклеотидных замен в программе MEGA 5.05. В качестве оптимальной модели нуклеотидных замен была выбрана модель TN93+I.

Филогенетические реконструкции гена 18S рДНК проводили по методу ближайшего связывания (NJ), максимального правдоподобия (ML) и Байеса (BI) с помощью интернет-ресурсов T-REX, <http://phylogeny.lirmm.fr/> и программы MEGA 5.05. Для укоренения деревьев использованы последовательности внешней группы *Gephyrocapsa oceanica*.

Porphyridium purpureum

Филогенетические реконструкции гена 18S рДНК проводили по методу Байеса (BI) в программе MrBayes (v. 3.1.2) (Ronquist, Huelsenbeck, 2003), методами ML (максимального правдоподобия), NJ (ближайшего связывания) в программе MEGA 5.05. Для укоренения филограм использованы последовательности ближайших внешних групп Harpophyta, Chlorophyta и Scruptophyta. В качестве оптимальной модели нуклеотидных замен была выбрана модель K2+G+I (двухпараметрическая модель Кимуры с неравномерной частотой оснований и гамма-распределением) согласно информационному критерию Акаике (AIC) в программе jModelTest 2.1.1 (Darriba et al., 2012). Устойчивость кластеризации ML и NJ филогенетических деревьев оценивалась бутстреп-тестами в 500 и 1000 реплик, соответственно.

Cyanobacteria

Согласно результатам, полученным после процедуры поиска степени гомологии нуклеотидных последовательностей с помощью алгоритма BLASTn, в дальнейший анализ из международной базы NCBI были отобраны последовательности 16S рДНК с наибольшим % нуклеотидного сходства и % покрытия. Множественное выравнивание набора последовательностей проводили с помощью алгоритма MAFFT. Небольшие несоответствия в выравнивании редактировались вручную. Оптимальная модель нуклеотидных замен согласно критерию AIC выбрана GTR+G+I.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. *Ostreopsis* sp. ORUS

С 2012 года систематика рода *Ostreopsis* находится под пересмотром (Parsons et al., 2012). В нашем исследовании по результатам анализа трёх генных последовательностей рДНК видовую принадлежность установить не удалось из-за отсутствия надёжных таксономических данных для сравниваемых последовательностей. Практически все наиболее близкие последовательности из базы NCBI были опубликованы без видовой принадлежности с обозначением «*Ostreopsis* sp.» и номером штамма. Более того, попытки получить амплификацию с видо-специфическими праймерами к ITS-региону для *O. cf. ovata* и *O. cf. siamensis*, разработанными Пенной с соавторами (Penna et al., 2005), оказались безуспешными. Тем не менее, амплификация ITS-региона анализируемых нами культур и клеток была получена с помощью универсальных для динофлагеллят праймеров.

В результате обработки и анализа полученных данных по 28S рДНК была обнаружена крайне высокая степень полиморфизма в последовательностях образцов как клоновых культур, так и отдельно отобранных клеток.

Компьютерный анализ секвенированных клонированных фрагментов яДНК изолятов *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.

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») (юг о. Окинава). 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. Разнообразие выявленных риботипов по генам 28S рДНК и ITS-региону наблюдалось не только между разными культурами и клоновыми культурами от общей материнской клетки, но и между клонированными фрагментами этих генов в пределах генома одной культуры и индивидуальных клеток из тех же культур, и более того, свежесыведенных из природной среды изолятов (то есть не подвергшихся лабораторному культивированию). Таким образом, определённой тенденции при сравнении клонированных генных фрагментов в пределах геномов в случаях анализа одной клетки и клоновой биомассы не было выявлено. Все полученные варианты последовательностей 28S рДНК и ITS-региона распределились в две и три группы (риботипа), соответственно. Последовательности 28S рДНК имели множество одно-, дву- и более нуклеотидных замен, протяжённые делеции/вставки, и их длина сильно варьировала (Рисунок 3).

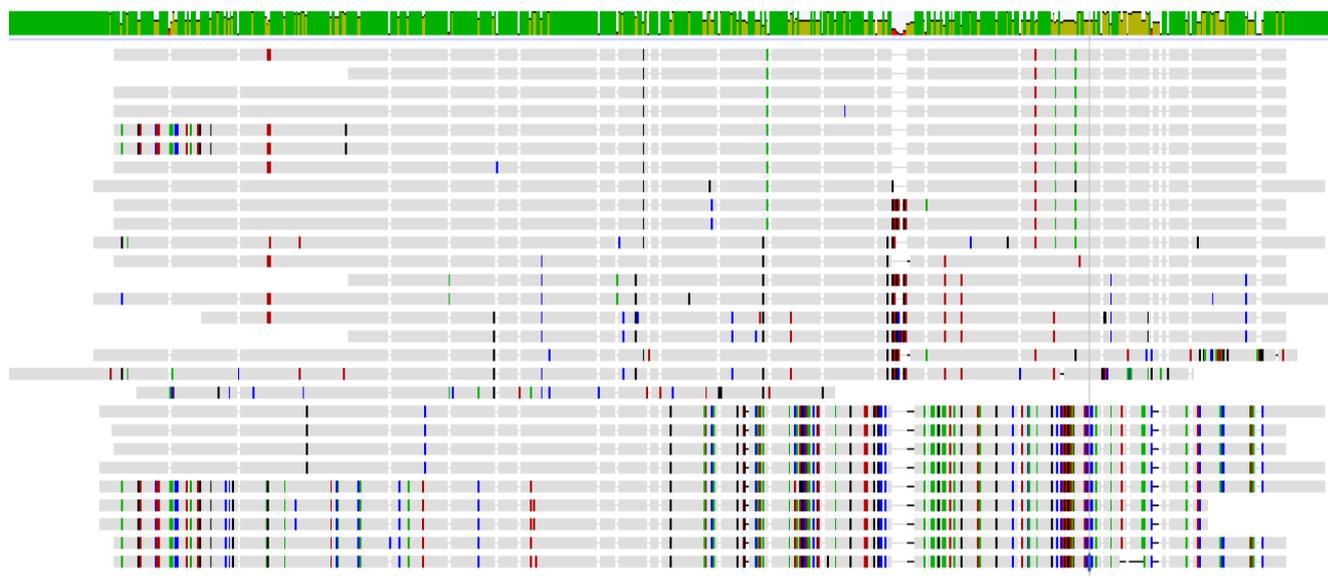


Рисунок 3 – Демонстрация выровненных последовательностей 28S рДНК (D1-D2 регион) *Ostreopsis* sp. ORUS

По комплексу ITS-региона наблюдаемая гетерогенность последовательностей выражена в меньшей степени. Наблюдались однонуклеотидные замены как в участках ITS1 и ITS2, так и в консервативных 5.8S рДНК, а также делеции и вставки.

Несмотря на высокую степень гетерогенности последовательностей, образцы *Ostreopsis* sp. ORUS из российских вод формировали единый

филогенетический кластер. Противоположная картина наблюдалась при анализе полного гена 18S рДНК. Генные последовательности оказались полностью гомогенными между образцами клеточных культур и индивидуальными клеточными изолятами *Ostreopsis* sp. ORUS. В результате анализа гена 18S рДНК между известными популяциями *Ostreopsis* был выявлен низкий уровень различий, который, тем не менее, позволил дифференцировать популяции из разных географических регионов. Можно предполагать, что данный генный маркер позволит достоверно оценить различия между популяциями и однородность в пределах одной популяции. Однако, из-за отсутствия данных в GenBank по гену 18S рДНК для рода *Ostreopsis* практически по всем известным ареалам (местам распространения), либо из-за недостаточного набора данных (2 последовательности – штаммы малазийской и южно-корейской популяции *Ostreopsis ovata*) и отсутствия данных для других видов рода, достоверно проверить разрешающую способность 18S рДНК маркера пока не представляется возможным.

Разработанные ранее (Penna et al., 2007) видоспецифичные маркеры к участку ITS-1 для идентификации и мониторинга *O. ovata* и *O. siamensis* в атлантическом регионе не обнаружили гомологичных участков ни на этапе амплификации, ни в анализе сиквенированных последовательностей в отношении культур и клеток *Ostreopsis* sp. ORUS. В связи с этим и на основе полного молекулярно-генетического анализа культур и клеток *Ostreopsis* sp. ORUS предполагаемая ранее принадлежность виду *O. cf. ovata* не подтверждена. В пользу такого вывода можно привести предположения, приводимые Пенной с соавторами (Penna et al., 2010) и Парсонсом с соавторами (Parsons et al., 2012) о том, что атлантические и тихоокеанские популяции *O. ovata* в силу своих молекулярных и токсикологических особенностей могут являться разными видами. Авторы отметили также, что необходимо учитывать и то, что атлантические штаммы являются бентосным видом, а большинство тихоокеанских штаммов – эпифиты, что в результате может отражаться на геном

уровне. Поскольку между эпифитами всегда существует высокий уровень генного потока, в отличие от бентосных форм (Penna et al., 2010).

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 вышеуказанной гетерогенностью затрудняет 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 Пенны с соавторами (2005; 2007) и Сато с соавторами (2011), соответственно). Тем не менее, авторы не обнаруживали в исследуемых культурах и клетках внутригеномного аллелизма генов рДНК. Видовой статус в случае тихоокеанской популяции *Ostreopsis* sp. ORUS в силу таксономических неясностей рода установить не удалось. Тем не менее, данные исследования окажутся полезными для дальнейшего суммирования данных по таксономии и проведении общего пересмотра рода *Ostreopsis*.

Филогенетический анализ

Топология деревьев по D1-D2 региону 28S рДНК согласовывалась между собой по всем используемым алгоритмам – BI, ML, и NJ. Фрагмент 28S рДНК позволил получить деревья с чётко обособленными основными кладами с достаточно высокими поддержками ветвей (Рисунок 4). Все последовательности российских изолятов ORUS вошли в одну общую кладу В, которая строго разделена на две субклады: В1 (красный кластер) совместно с корейским штаммом (Korean/Russian) и В2 (голубой кластер) совместно с «*Ostreopsis* sp.2» с побережья о. Окинавы (Japan/Russian). Клада В оказалась статистически слабо поддержана, при этом субклады В1 и В2, напротив, имеют высокие поддержки.

Анализ ITS-региона находился в согласовании с данными японских исследователей (Sato et al., 2011). Топология деревьев так же, как и в случае 28S

рДНК, была конгруэнтна между алгоритмами BI, ML, и NJ, а кластеризация разрешена с достаточно высокими значениями поддержек (Рисунки 5 и 6). Было обнаружено, что последовательности клонированных фрагментов от одной культуры, также как и в случае 28S, кластеризовывались в разные субклады, демонстрируя высокую степень дивергенции. Клада *Ostreopsis* sp. из северной Пацифики (клада В) также дифференцирована на 2 основные В1 и В2 из российских вод и хорошо обособлена от видового комплекса *Ostreopsis ovata* атлантических и малайзийских видов (Греция, Португалия, Индонезия, Малайзия и острова Кука) клады А, клады С (*O. siamensis*) и клады D/E (*O. labens* и *Ostreopsis* sp.). Субклада В1 включает российские, корейскую и японские последовательности и соответствует кладе «*Ostreopsis* sp.1» (Sato et al., 2011), субклада В2 – российский и японский OdoOst6 «*Ostreopsis* sp.2». Топология клады А не всегда оказывалась разрешена по ITS-региону, в частности – в анализе BI. А все разнообразие клонированных фрагментов 28S рДНК и ITS-региона *Ostreopsis* sp. ORUS, вошедших в 2 обособленные субклады совместно с корейским и японскими штаммами, доказывает их принадлежность одной операционной таксономической единице.

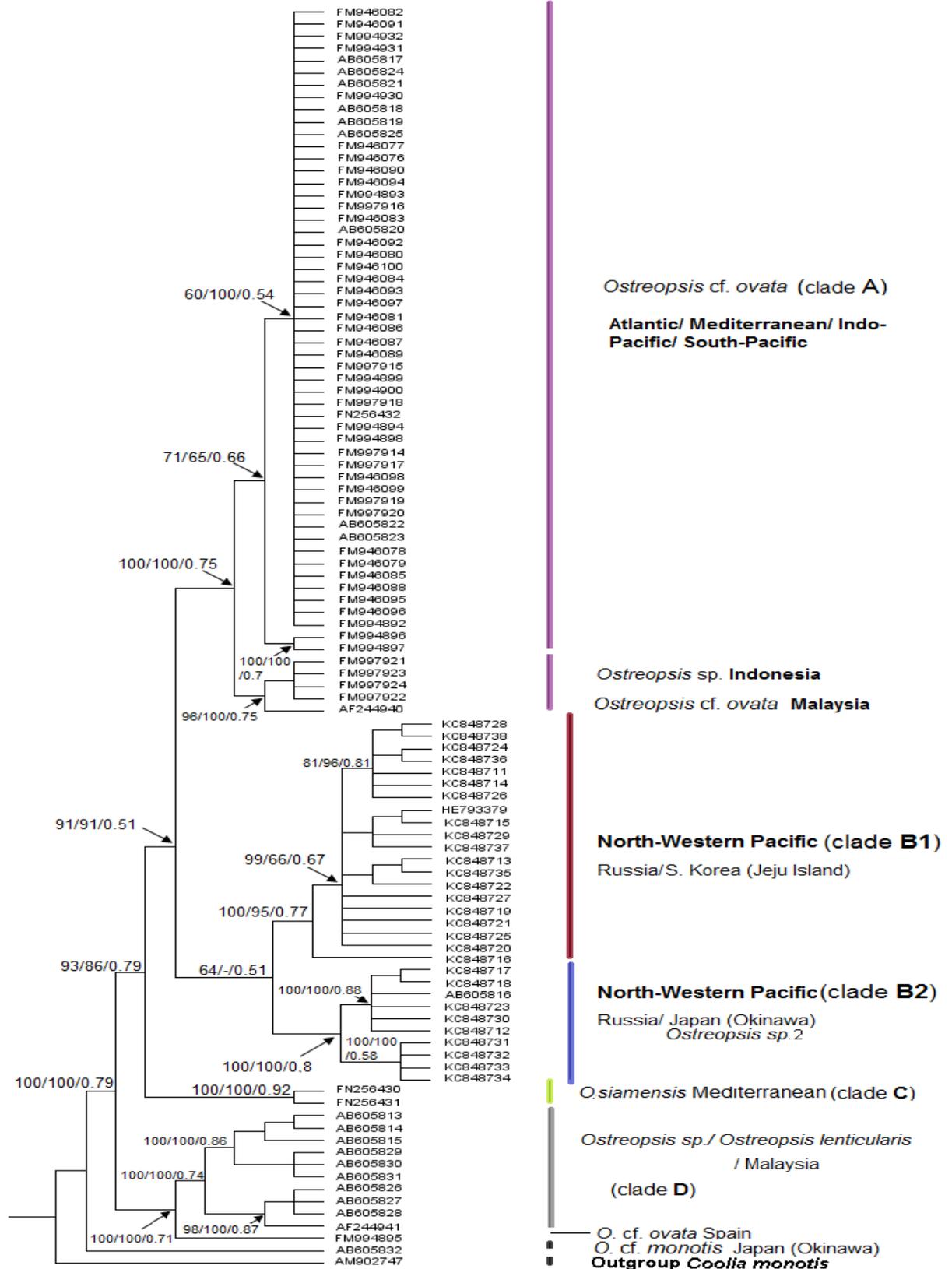


Рисунок 4 – Консенсусное ML-дерево представителей рода *Ostreopsis* на основе последовательностей 28S рДНК (D1-D2), выровненных алгоритмом MUSCLE, и полученное с применением модели нуклеотидных отличий T92+G. Достоверность ветвления указана в виде поддержек: бутстреп-индексы максимального правдоподобия (ML) и объединения соседей (NJ), а также байесовские апостериорные вероятности (BP /BP/ PP). *Coolia monotis* VGO783 была использована в качестве внешней группы.

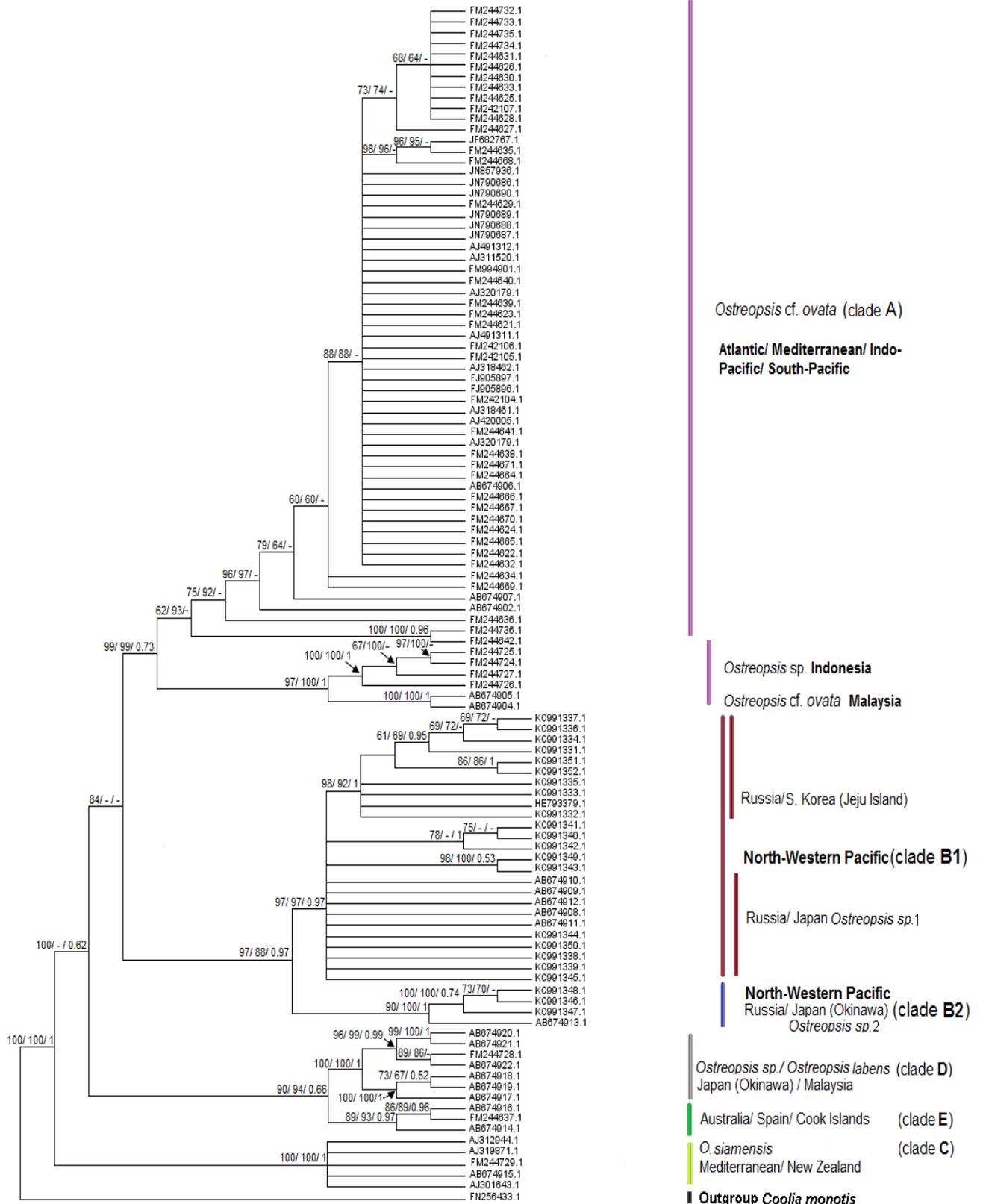


Рисунок 5 – Консенсусное ML-дерево представителей рода *Ostreopsis* на основе последовательностей ITS-региона выровненных алгоритмом MAFFT, и полученное с применением модели нуклеотидных отличий T92+G.

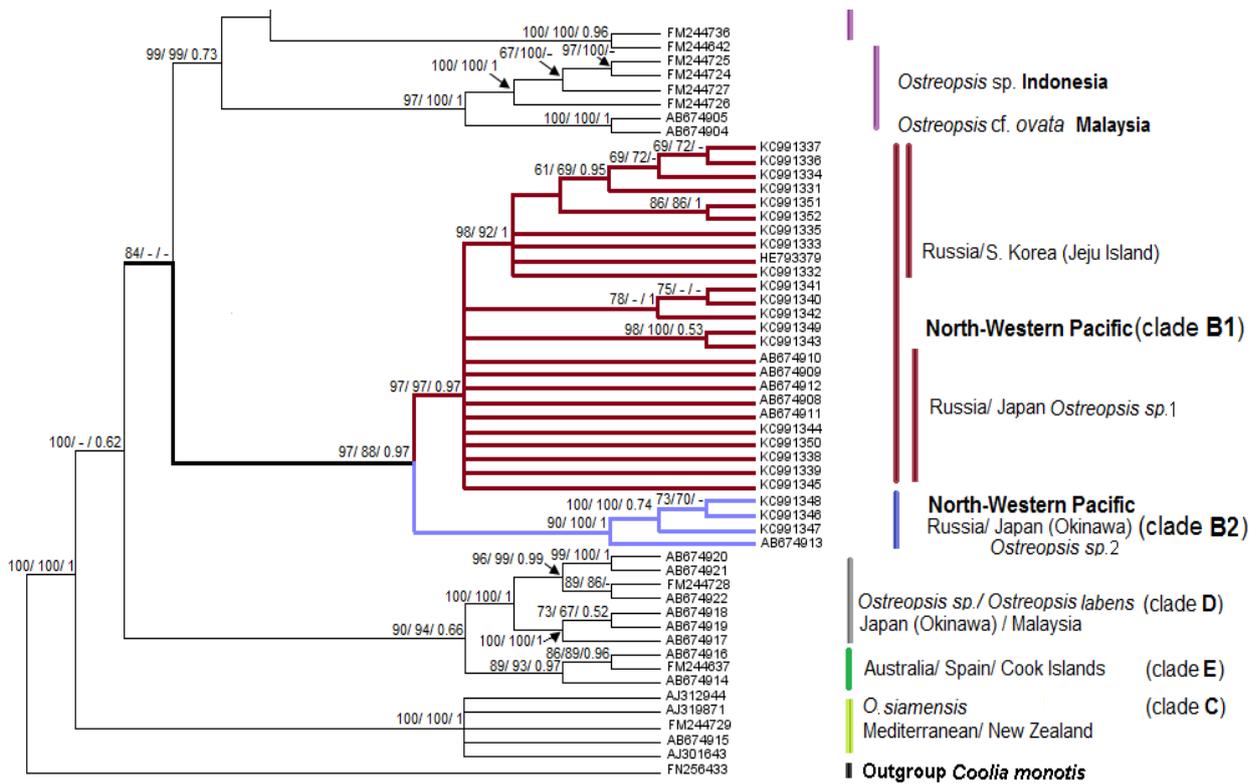


Рисунок 6 – Часть консенсусного ML-дерева представителей рода *Ostreopsis* на основе последовательностей ITS-региона. Ветви клад, сформированные последовательностями *Ostreopsis* sp. ORUS и ближайшими к ним последовательностям из генного банка, выделены цветом: бордовый – Russia/ S. Korea/ Japan *Ostreopsis* sp.1, голубой – Russia/ Japan *Ostreopsis* sp.2.

Генетические расстояния

Генетическое разнообразие оценивалось с помощью нескорректированных p -расстояний между последовательностями внутри клад и между сформированными кладами для 28S рДНК и ITS-региона, а также между последовательностями 18S рДНК. Оценки ITS-региона сравнивались с величинами p -расстояний, рассчитанными для динофлагеллят (Litaker et al., 2007).

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). Оценки эволюционной дивергенции между последовательностями 18S рДНК приведены в приложении I. Поскольку в GenBank опубликованы только две 18S рДНК последовательности для *Ostreopsis* (не считая полученных в настоящей работе), филогенетические реконструкции не проводились.

Широкий спектр генетической изменчивости между последовательностями наблюдался в ITS1 и ITS2 регионах и 28S рДНК. Величины p среди клад *Ostreopsis* соответствовали видовому уровню Dinophyta согласно расчётам Литакера с коллегами (Litaker et al., 2007). 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%).

Генетическое расстояние внутри клады В ITS-региона составило 0.058 ± 0.012 . Генетическое расстояние между субкладами В1/В2 составило 0.158, а между кладами А/В1 и А/В2 p было 0.107 и 0.160, соответственно, что указывает на видовой уровень различий. Все оценки p -расстояний среди и внутри клад показаны в таблицах приложений II-V.

Межвидовая дифференциация может существенно варьировать в зависимости от скорости эволюции внутри каждой линии эукариот (Caron et al., 2009), и не существует единого правильного уровня сходства (Majaneva, 2013). Следовательно, не существует строго определенного диапазона p -расстояний родового и видового уровней для динофлагеллят. Полученные величины генетических расстояний не позволяют однозначно интерпретировать результаты. Более того, обнаруженное разнообразие последовательностей 28S рДНК (D1-D2) и ITS-региона не может быть объяснено ни различиями в дате сбора, ни местом сбора, ни возрастом, ни типом образца (культивированные биомассы, индивидуальные клоны культур и единичные свежееотобранные клетки).

Противоположная ситуация наблюдалась в анализе последовательностей 18S рДНК, где образцы оказались полностью идентичными друг другу, в то время как в аналогичных исследованиях различных организмов (Rooney, 2004; Xu et al., 2009; Mentewab et al., 2011; Pillet et al., 2012) была выявлена гипервариабельность по данному маркеру. Географическое распределение риботипов *Ostreopsis* sp., зарегистрированных в Японском море, представлены на Рисунке 7.



Рисунок 7 – Географическое распределение риботипов *Ostreopsis* sp., зарегистрированных в Японском море. ▲ = B1, *Ostreopsis* sp.1; ◆ = clade B1, *O.cf. ovata* корейский штамм (о. Чжеджу); ★ = B2, *Ostreopsis* sp.2.

Недавно было выявлено, что среднее число 28S рДНК копий на клетку *O. cf. ovata* и *Ostreopsis* sp.1 в экологических пробах превышает число копий, выявленное в лабораторных культурах, и соответствует $36.000 \pm 8.000 / 24.000 \pm 5.000$ и $88.000 \pm 22.000 / 58.000 \pm 12.000$, соответственно (Hariganeya et al., 2013). Обнаруженная внутригеномная гетерогенность 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, а не у разных, как предполагали Сато и др. (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.

3.2. *Scrippsiella trochoidea*

В результате долгосрочного наблюдения распределения цист в донных осадках акватории Амурского залива, было обнаружено в общей сложности 40 типов цист динофлагеллят. Среди них основной доминирующий тип цист принадлежал видовому комплексу *Scrippsiella trochoidea*, в среднем 39% от общей концентрации цист (Morozova et al., in press). Идентификация *S. trochoidea* в дальневосточных морях была впервые проведена с помощью генетических методов.

Несмотря на усиленное изучение таксономии рода *Scrippsiella* и видового комплекса *S. trochoidea*, в частности, на данный момент невозможно выявить специфические и одновременно надёжные характеристики, конгруэнтные, по крайней мере, генетическим данным. Штаммы одного и того же риботипа демонстрируют значительную морфологическую изменчивость, а разные виды демонстрируют генетические (но не морфологические) отличия (одинаковый рисунок пластин и похожие шипы у покоящихся стадий) (Montresor et al., 2003; Gottschling et al., 2005; Tang et al., 2010; Zinssmeister et al., 2011).

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 проведённого молекулярно-генетического анализа культур 2010 и 2013 гг. были секвенированы последовательности D1-D2 региона 28S рДНК и полный ITS регион (ITS1–5.8S рДНК–ITS2) общей длиной 1297 п.н. Нуклеотидные последовательности по отдельно 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 (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. Матрицы генетических расстояний ($p \pm S.E.$, стандартная ошибка) между видами рода *Scrippsiella* были оценены индивидуально для регионов ITS1, ITS2 и 28S рДНК

(представлены в приложениях VI-VIII). Межвидовые *p*-расстояния для каждого анализируемого генного региона были значительно выше, чем соответствующие внутривидовые *p*-расстояния.

Топология реконструированных деревьев (Рисунок 8) соответствовала байесовскому дереву семейства Thoracosphaeraceae, представленному в работе Готчлинга и Соэнера (Gottschling, Soehner, 2013). Во всех анализах, штамм АВ-2010 входил в общую кладу видового комплекса *S. trochoidea* и кластеризовался совместно с атлантическим штаммом GeoB 335 (северная часть Ионического моря, KF751926) с высокими значениями поддержек узла (1.0 PP/99 BP/100 BP). Согласно полученным молекулярно-генетическим данным, подтверждена принадлежность анализируемых культур видовому комплексу *S. trochoidea*. В результате анализа, вопреки распространенному мнению о зависимости между риботипом и географическим происхождением у организмов, для *S. trochoidea* такой связи обнаружено не было. Вероятно, отсутствие прямой связи географически близких штаммов объясняется различными экотипами у вида, как и в обратном случае, близкая связь географически обособленных штаммов, характеризующихся не идентичным, а по крайней мере близким экотипом. Риботип не всегда согласуется (совпадает) с географической принадлежностью, поскольку показывает степень родственных связей между видами, а географическая принадлежность характеризуется экотипом, то есть специфическими функциональными характеристиками (Заварзин, 1987). Это может объяснять выявленную для некоторых видов микроводорослей внутривидовую генетическую подразделённость относительно сезона, т.е. формирование уже не столько популяций, сколько рас. Возможно, существует и другое объяснение обнаруженному ближайшему сходству риботипов двух не контактирующих штаммов АВ-2010 и GeoB 335. Криптическая природа всех известных членов видового комплекса *S. trochoidea*, высокая степень различий между ними и достоверно высокие значения сгруппировавшихся клад на дереве (Рисунок 8) могут указывать на таксономическую самостоятельность этих видов. Это подкрепляется и отсутствием где-либо ещё в мире зарегистрированных подобных

AB-2010 и GeoB 335 риботипов. То есть, видовое единство штаммов AB-2010 и GeoB 335 не вызывает сомнения, однако общность всех известных на сегодня видов и штаммов, заявленных как *S. trochoidea*, остаётся под вопросом, и очередной раз требует таксономического пересмотра состава видового комплекса.

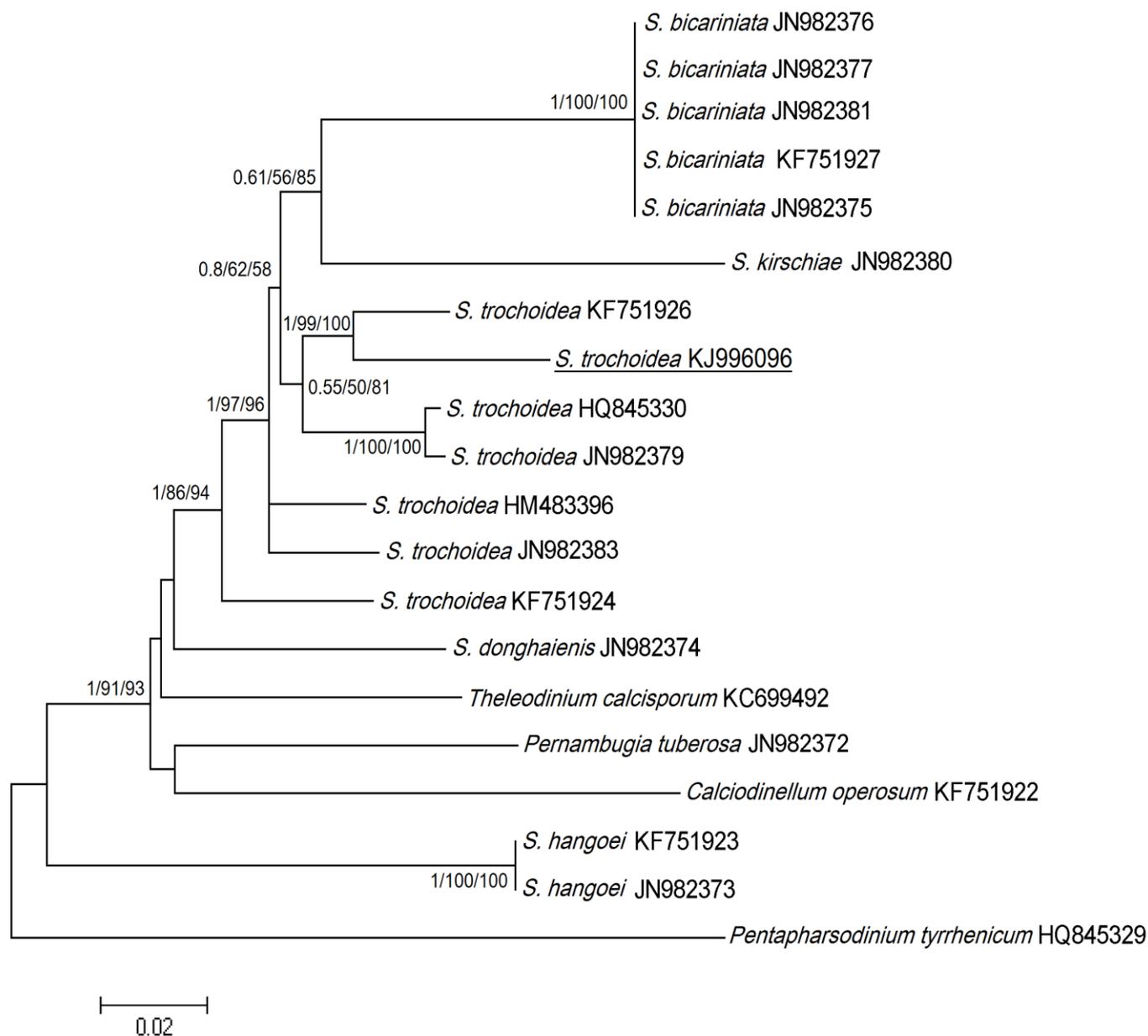


Рисунок 8 – Консенсусное ML-дерево на основе ITS региона и 28S рДНК (D1-D2), достоверность ветвления указана в виде поддержек ветвей: байесовские апостериорные вероятности, бутстреп-индексы максимального правдоподобия (ML) и ближайшего связывания (NJ) (PP/BP /BP). Дерево укоренено последовательностью *Pentapharsodinium tyrrhenicum* HQ845329 в качестве внешней группы.

3.3. *Dinophysis acuminata*

В результате анализа удалось успешно выделить и проанализировать 24 свежевыделенные клетки с морфотипом *D. acuminata*. Согласно полученным нами данным по всем анализируемым генам, последовательности проявили полную гомогенность между собой. Генный фрагмент 28S проявил 100% сходство со всеми представителями видового комплекса *D. acuminata*. Маркёр 18S рДНК позволил обособить виды *D. dens*, *D. norvegica*, *D. miles* и *D. caudata* от представителей видового комплекса *Dinophysis acuminata*. ITS регион считается наиболее эффективным генным маркёром 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*. Следует отметить, что морфология этих видов также имеет высокое сходство. На филогенетическом дереве (Рисунок 9) 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 средиземноморских прибрежных вод Франции, Великобритании и Испании с величиной генетической дифференциации 0.017. Во всех случаях рассчитанные генетические расстояния (p) не смогли достоверно дифференцировать *D. acuminata* от *D. ovum* и *D. sacculus*.

По реконструкции дерева и расположению таксонов в кластерах можно сделать вывод, что причиной неразрешённой топологии клады «*D. acuminata* species-complex» может являться полифилия видов – в одном случае, и близость по времени разделения видов от общего предка – в другом. Известно, что накопление нуклеотидных замен носят случайный вероятностный характер, а в случае коротких промежутков времени характерен широкий разброс по заменам, что, следовательно, может являться причиной возникновения нечётких филогенетических сигналов (Темралеева и др., 2014). Другой причиной

неразрешённой топологии может являться некорректная идентификация видов, чьи нуклеотидные последовательности представлены в GenBank NCBI.

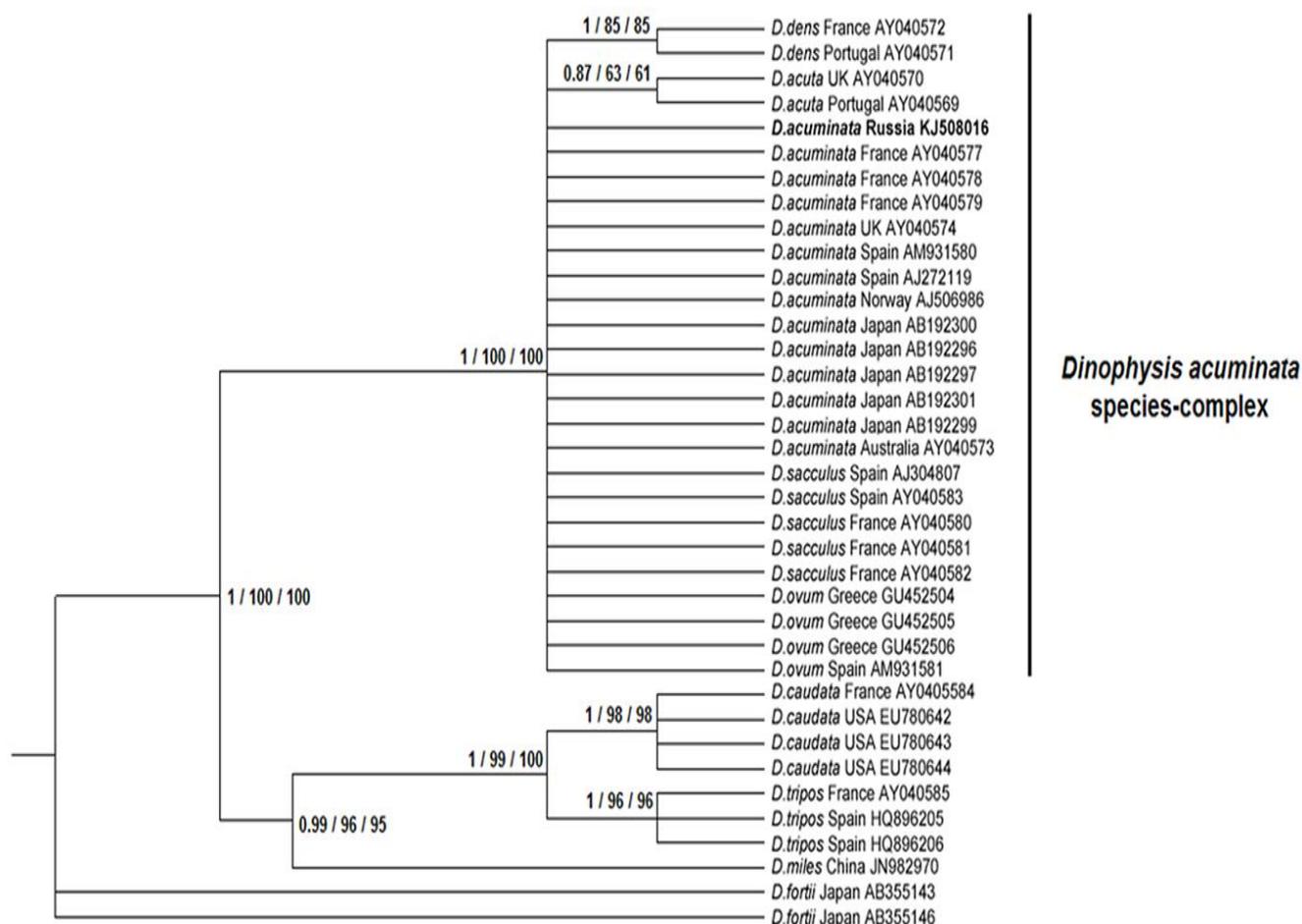


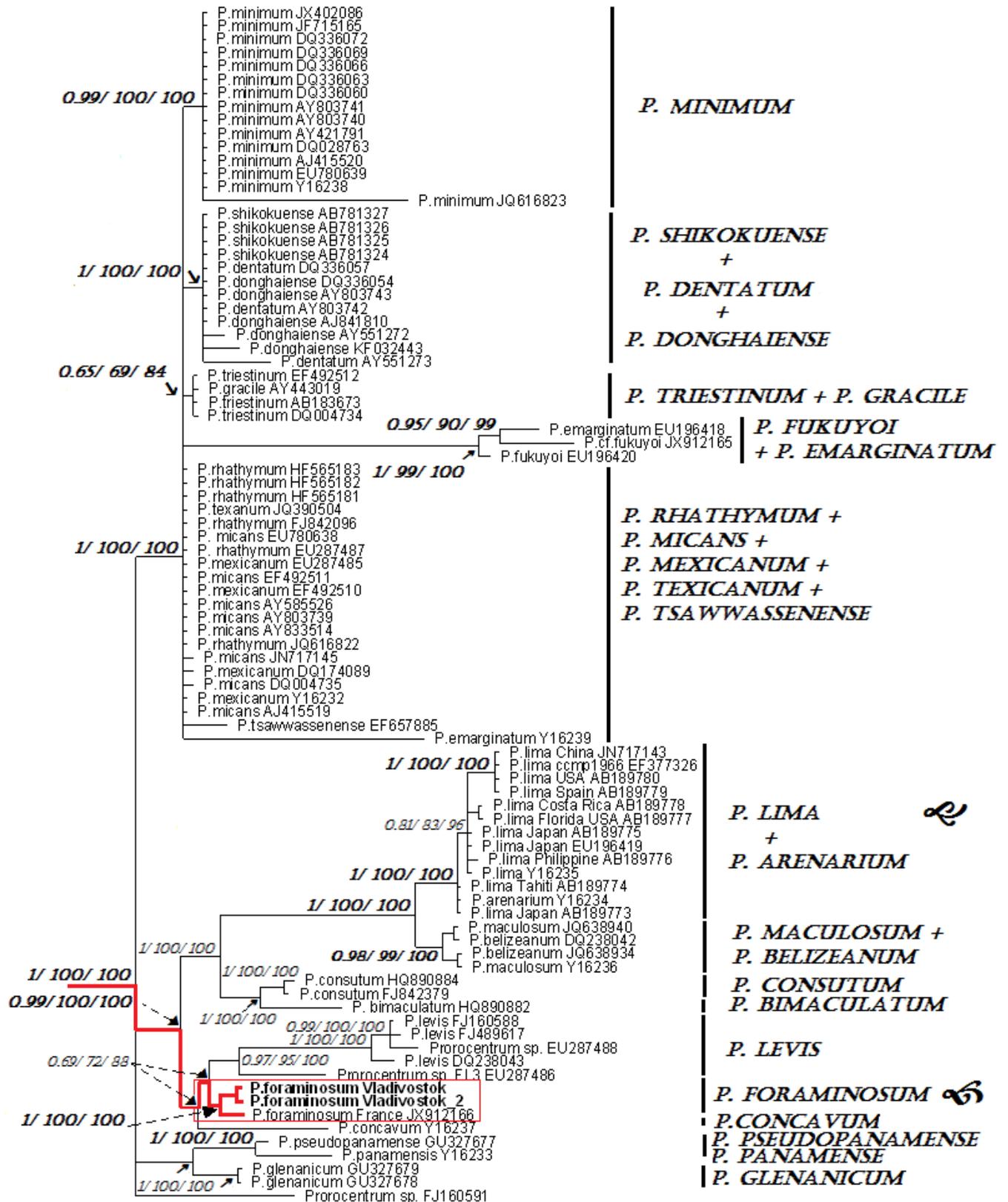
Рисунок 9 – Филогенетическое положение *D. acuminata* DARU-13 (выделена жирным) в роде *Dinophysis*, определённое по последовательностям ITS-региона (ITS1-5.8S рДНК-ITS2) на основе BI, NJ и ML. Достоверность топологии представлена поддержками ветвей BI/ NJ/ ML, соответственно.

3.4. *Prorocentrum foraminosum*

На основании полученных данных по двум молекулярным маркерам (фрагменты генов 18S рДНК и D1-D2 регион 28S рДНК) установлено, что отобранные в генетический анализ отдельные клетки и культуры, морфологически определённые как *P. lima*, проявили высокую степень сходства с *P. foraminosum* –видом, официально зарегистрированным в южных водах Кельтского моря (о. Груа, Бискайский залив) и южных водах Северного моря (о. Зильт). Вид проявил 99% степень сходства по фрагменту 18S рДНК с

единственной представленной в геномном банке последовательностью *P. foraminosum* (о. Груа, Бискайский залив).

В свою очередь, несмотря на морфологическое сходство, *P. lima* и *P. foraminosum* имеют высокие генетические различия, а сравнение с морфологическим видом-сиблингом *P. lima* показало максимальный процент гомологии в 95%. *P. foraminosum* чётко генетически дифференцируется по гену 18S рДНК относительно других 27 видов рода, представленных в геномном банке. Нужно отметить, что по данному гену последовательности большей части самостоятельных видов рода полностью идентичны друг другу. На представленном ML-дереве (Рисунок 10 и 11) по гену 18S рДНК виды рода чётко кластеризуются с высокими бутстреп-поддержками ветвей. Обе анализируемые нами культуры сформировали общую кладу с атлантическим *P. foraminosum* (JX912166).



0.003

Рисунок 10 – Реконструкция филогенетического положения и связей представителей рода *Prorocentrum* по гену 18S рДНК на основе алгоритма ML. Прямоугольником отмечена клада *P. foraminosum*, красным цветом выделены ветви кластеризации последовательностей вида из Японского моря и из Бискайского залива.

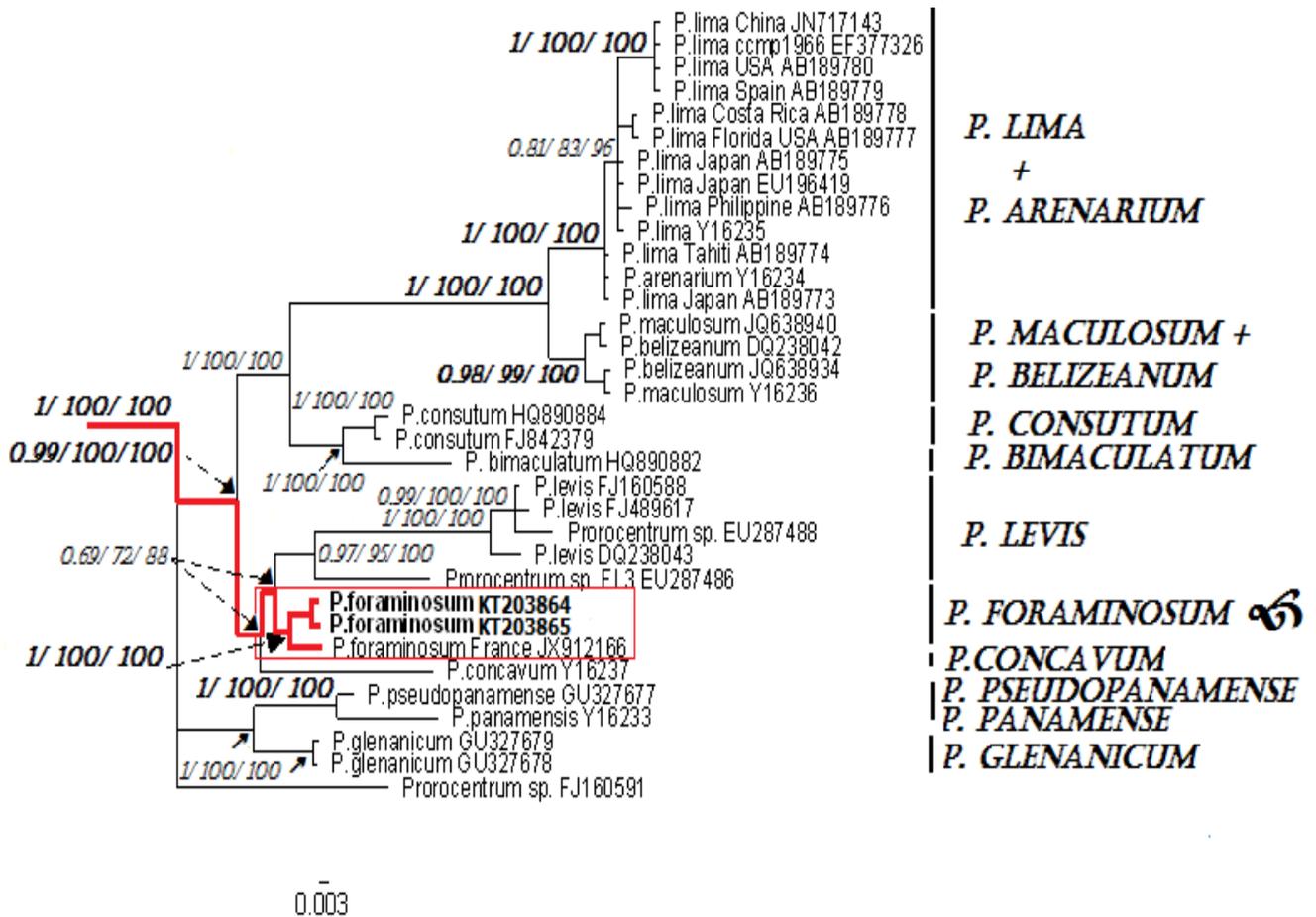


Рисунок 11 – Увеличенная часть реконструкции филогенетического положения и связей ближайших представителей *P. foraminosum* по гену 18S рДНК на основе алгоритма ML.

В отношении D1-D2 региона 28S рДНК, гомология между тихоокеанским *P. foraminosum* Vladivostok и атлантическим штаммом составила 95% и рассчитанной величиной генетических расстояний между штаммами равной 0.010, что соответствует уровню внутривидовой изменчивости для видов рода *Prorocentrum* по данному фрагменту и существенно ниже величины 0.116 между *P. foraminosum* Vladivostok и генетически близким видом *P. levis*. Различия тихоокеанского и атлантического *P. foraminosum* характеризуется нуклеотидными заменами и вставками/делециями по D1-D2 региону 28S рДНК. Реконструкция филогенетических связей D1-D2 региона 28S рДНК представлена на Рисунке 12.

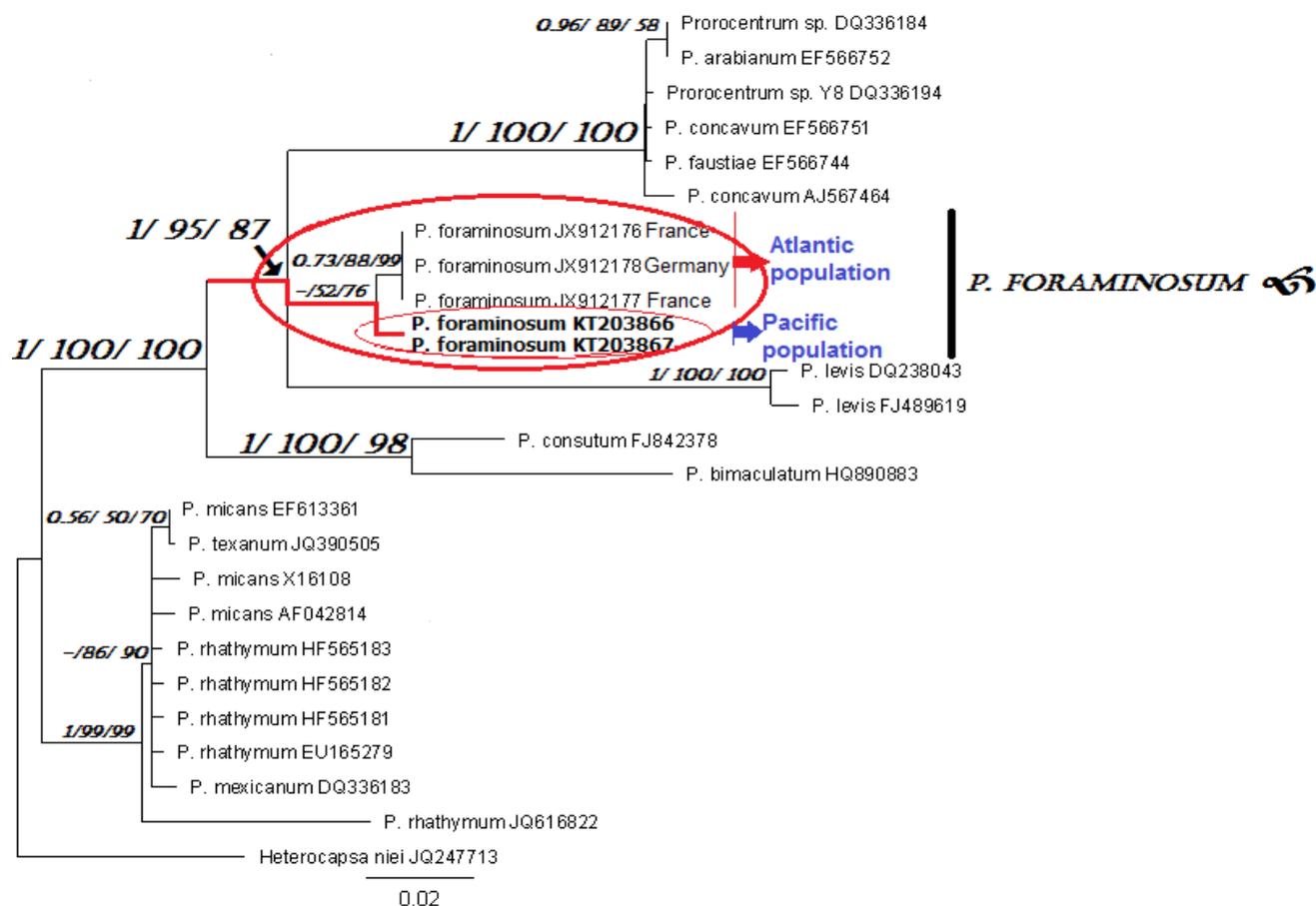


Рисунок 12 – Реконструкция филогенетического положения и связей представителей рода *Prorocentrum* по D1-D2 региону 28S рДНК на основе алгоритма ML. Цветом выделена область кластеризации атлантической и тихоокеанской популяций *P. foraminosum*. Жирным выделены последовательности тихоокеанской популяции из Японского моря.

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. Демонстрация нуклеотидных различий выровненных последовательностей гена 5.8S рДНК между видами *P. foraminosum*/ *P. lima*/ *P. levis* показана на рисунке 13.

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* (Таблица 3). Реконструкция филогенетического положения и связей

представителей рода *Prorocentrum* по гену 5.8S рДНК на основе алгоритма ML представлено на рисунке 14.



Рисунок 13 – Демонстрация нуклеотидных различий выровненных последовательностей гена 5.8S рДНК между видами *P. foraminosum*/ *P. lima*/ *P. levis*.

Таблица 3 – Межвидовые генетические расстояния (в долях) между последовательностями участка 5.8S рДНК (111 п.н.).

<i>P. micans</i>		0.011	0.009	0.010	0.004	0.004	0.004	0.032	0.032	0.032	0.032	0.034	0.035
<i>P. triestinum</i>	0.015		0.013	0.013	0.010	0.010	0.010	0.031	0.031	0.031	0.031	0.033	0.034
<i>P. rhathymum</i>	0.015	0.020		0.002	0.009	0.009	0.009	0.031	0.031	0.031	0.031	0.033	0.035
<i>P. cassubicum</i>	0.015	0.020	0.003		0.010	0.010	0.010	0.032	0.032	0.032	0.032	0.034	0.035
<i>P. minimum</i>	0.005	0.010	0.010	0.010		0.000	0.000	0.032	0.032	0.032	0.032	0.034	0.035
<i>P. donghaiense</i>	0.005	0.010	0.010	0.010	0.000		0.000	0.032	0.032	0.032	0.032	0.034	0.035
<i>P. rostratum</i>	0.005	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000		0.032	0.032	0.032	0.032	0.034	0.035
<i>P. lima</i>	0.140	0.125	0.125	0.125	0.135	0.135	0.135		0.004	0.004	0.004	0.024	0.026
<i>P. belizeanum</i>	0.135	0.120	0.120	0.120	0.130	0.130	0.130	0.005		0.000	0.000	0.025	0.027
<i>P. hoffmannianum</i>	0.135	0.120	0.120	0.120	0.130	0.130	0.130	0.005	0.000		0.000	0.025	0.027
<i>P. maculosum</i>	0.135	0.120	0.120	0.120	0.130	0.130	0.130	0.005	0.000	0.000		0.025	0.027
<i>P. foraminosum</i>	0.143	0.130	0.130	0.130	0.140	0.140	0.140	0.067	0.070	0.070	0.070		0.019
<i>P. levis</i>	0.170	0.158	0.159	0.158	0.168	0.168	0.168	0.092	0.095	0.095	0.095	0.045	

Значения ниже диагонали – генетические расстояния, выше диагонали – стандартная ошибка.

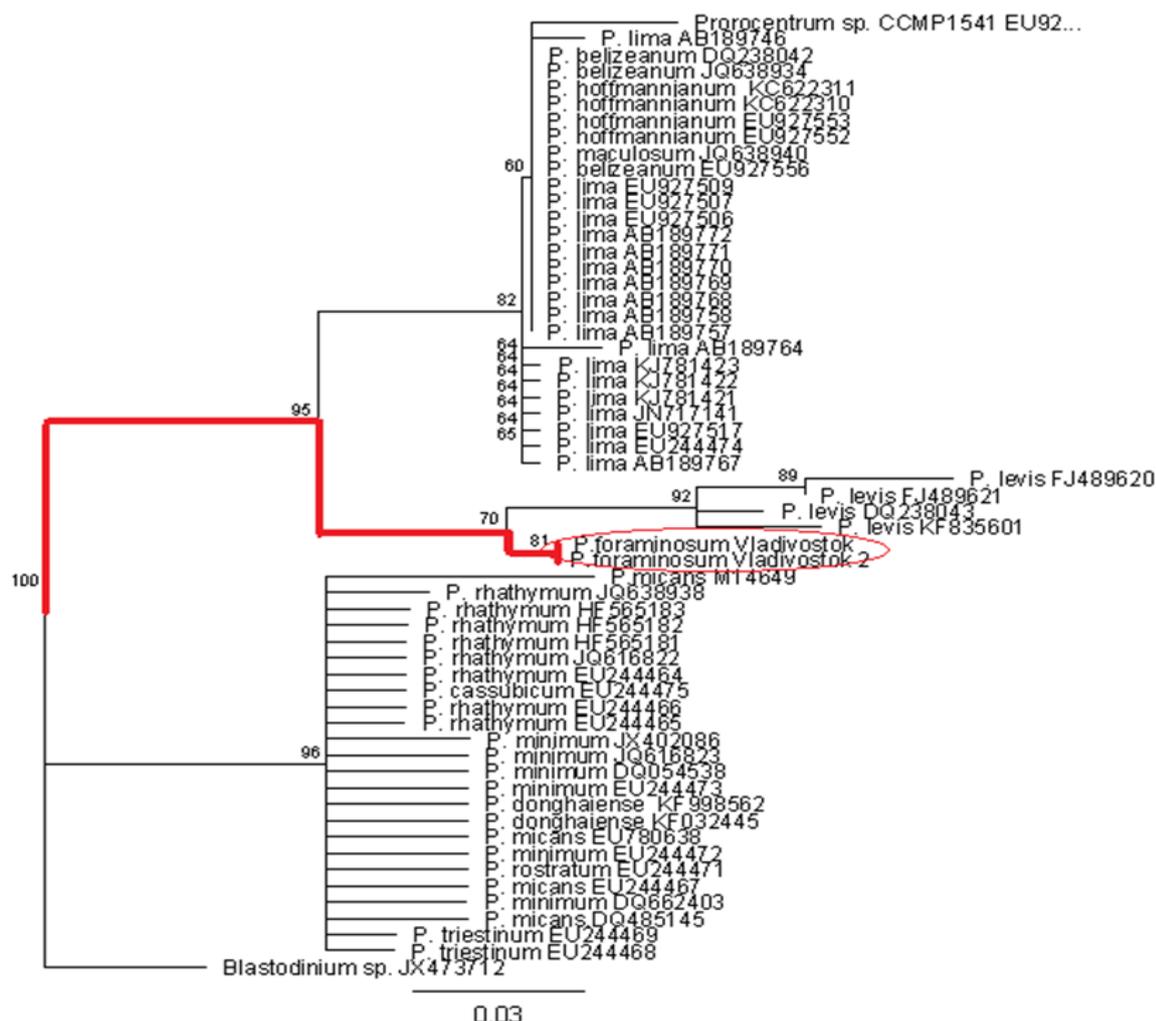


Рисунок 14 – Реконструкция филогенетического положения и связей представителей рода *Prorocentrum* по гену 5.8S рДНК на основе алгоритма ML. Цветом выделена клада и ветви кластеризации тихоокеанской популяции *Prorocentrum foraminosum* из Японского моря.

Анализ D8-D10 региона 28S рДНК после процедуры выравнивания ограничился длиной 336 п.н. из-за небольшого количества доступных для рода *Prorocentrum* последовательностей. В результате была выявлена наибольшая межвидовая изменчивость, локализованная в участке D8. Наименьшие генетические расстояния проявились между *P. foraminosum*/*P. micans* (AY822609) и *P. foraminosum*/*P. rhathymum* (JQ616833) с величиной $p=0.054$; наибольшие межвидовые генетические расстояния среди видов, анализируемых с *P. foraminosum*, показаны между последним и *P. lima* (JQ616843) с величиной $p=0.115$.

В результате работы 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). Также получены первые молекулярно-генетические данные для единственного на сегодня тихоокеанского токсичного штамма *P. foraminosum* по всем четырём рибосомным генам ядерной ДНК: 18S рДНК, ITS1–5.8S рДНК–ITS2, D1-D2 и D8-D10 регионов 28S рДНК.

3.5. *Tisochrysis lutea*

Длина полученных последовательностей по исследуемым рибосомным генам составила для участка 18S рДНК – 726 п.н., ITS-регион – 462 п.н., 28S рДНК (D1-D2 регион) – 547 п.н. Сравнение всех доступных данных по этому виду и видам этого рода приведены в таблицах приложений XI–XIV. На рисунке 15 приведена реконструкция по 18S рДНК гену, для которого имеется наибольшее число данных по видам и исследованным штаммам.

Как видно, все рода (*Isochrysis*, *Chrysotila* и *Tisochrysis*) хорошо дифференцируются с высоким уровнем поддержки. Это подтверждает возможность использования данного молекулярного маркера для исследования филогенетических отношений и идентификации таксономической принадлежности. Таксономическая ревизия изохризидовых, проведенная авторами работы (Bendif et al., 2013), способствовала объективной видовой диагностике исследуемой нами культуры. 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). Таким образом, результаты продемонстрировали наибольшее сходство гена 18S рДНК исследуемого клона с таковым вида *T. lutea* CCMР1324 (T-ISO, 1977 г. сбора, о. Таити, южная Пацифика). Этот факт представляет интерес, поскольку штамм Vostok08 был выделен из умеренных вод Японского

моря (бухта Восток), а согласно сводной таблице в работе (Vendif et al., 2013), зона обитания *T. lutea* ограничивается тропическими водами.

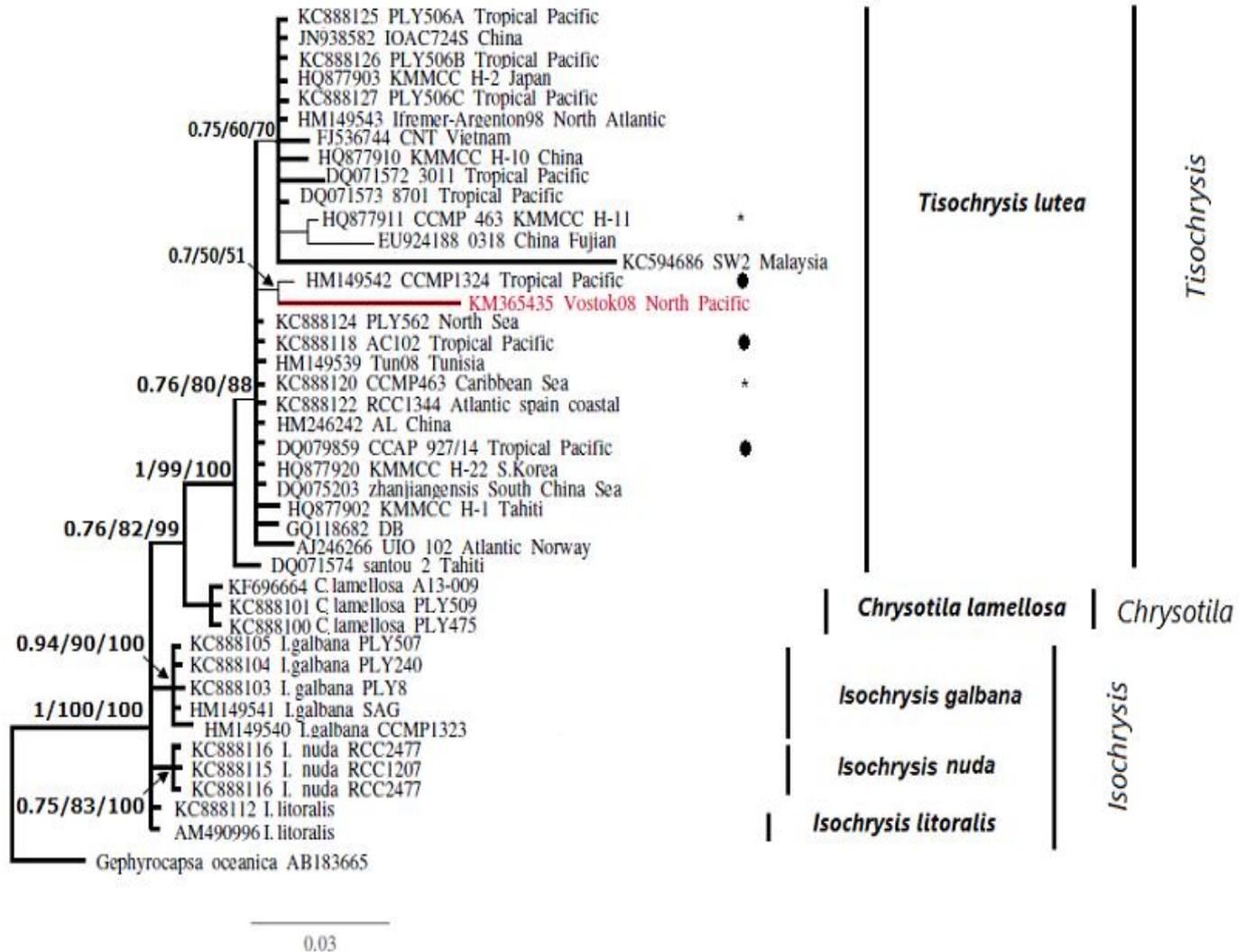


Рисунок 15 – Байесовское консенсусное филогенетическое дерево, реконструированное по фрагменту гена 18S рДНК представителей *Isochrysidiales*. На ветвях указаны апостериорные вероятности (PP) для BI анализа, значения бутструп индексов, превышающие 50% для ML и NJ анализов. Длина ветвей пропорциональна числу нуклеотидных замен на сайт. Клоны одной линии отмечены одинаковыми символами.

Топология ML-деревьев по 18S рДНК с MAFFT-выравниванием, построенных в разных программах, полностью повторялась, но отличалась положением штамма SW2 (Malaysia, KC594686) относительно двух субклад. При таком построении SW2 кластеризовался совместно с исследуемым нами штаммом Vostok08 и штаммом CCMP1324 внутри клады *Tisochrysis*. В ML-деревьях 18S рДНК, полученных с использованием опции «Gblocks alignment trimmer» при MAFFT-выравнивании последовательностей, топология соответствовала BI, где

штамм SW2 кластеризовался в соседнюю от штаммов Vostok08 и CCMP1324 субкладу. Учитывая выявленное сходство топологий в последнем варианте (ML+Gblocks и BI), приведенное нами дерево является результатом, полученным с удалением гэпов (gaps), тем не менее, InDels (от «insertion/ deletion» вставки/делеции) являются таким же вариантом полиморфизма, как и нуклеотидные замены, и их необходимо учитывать в анализе. В данном случае, из всех анализируемых последовательностей основное число протяженных и точечных замен пар оснований, как и InDels, пришлось на последовательность штамма SW2.

Другие исследованные нами последовательности представлены в базе данных для меньшего числа видов и штаммов. Тем не менее, сравнительный анализ подтверждает идентификацию исследованного нами штамма как *T. lutea* (Приложения XI–XIV). Наименее изменчивой внутри вида оказалась последовательность гена 28S рДНК, диапазон внутривидовых генетических *p*-расстояний у исследованного нами клона составил от 0 до 0.002. Для последовательностей других генов этот показатель был выше: 0.018–0.028 для 18S рДНК (Приложение XI), 0.015–0.026 для ITS-региона (Приложение XII), 0.012–0.018 отдельно для гена 5.8S рДНК (Приложение XIII).

В роде *Tisochrysis* описан единственный вид *T. lutea* (Bendif et al., 2013). Однако, анализ по 18S рДНК на основе методов BI, ML выявляет явную дифференциацию последовательностей в общей кладе *Tisochrysis*. Топология деревьев по 18S рДНК в основном соответствовала ML/BI 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 как по 18S рДНК, так и по другим маркерам (28S рДНК, ITS1–5.8S рДНК–ITS2), и они близки к межвидовым различиям. 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 регион) 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 15 и группы риботипов на рисунке 16 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, и последовательности отличаются существенно ($p = 0.001$). 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). Высокая изменчивость

клонов одного штамма у микроводорослей были выявлены в культурах Bacillariophyta Engler & Gilg, 1919; Haptophyta и Chlorophyta Reichenbach, 1828, emend. Pascher, 1914, emend. Lewis & McCourt, 2004 (Montresor, Lewis, 2005). Еще одной причиной высокого уровня внутривидовых различий может быть обусловлено вовлечением в анализ аллельных вариантов или генов из разных кластеров рибосомных генов. Согласно значениям генетических расстояний по гену 18S рДНК на внутривидовом уровне *T. lutea* оказался более изменчивым (0.007 ± 0.001) по сравнению с *Chrysotila lamellosa*, *I. litoralis*, *I. nuda* (0.000 ± 0.000) и *I. galbana* (0.001 ± 0.001) (Приложение XI). Высокая величина внутривидовых отличий обусловлена последовательностями штаммов Vostok08 (Russia, KM365435), santou 2 (Tahiti), SW2 (Malaysia, KC594686) и 0318 (China, Fujian, EU924188). Также прослеживается существенная дифференциация *T. lutea* относительно представителей других родов изохризидовых по генам 18S рДНК и 28S рДНК (Приложения XI и XIV). Так, по гену 28SpДНК наименьший уровень генетической дифференциации отмечен между *T. lutea*/ *C. lamellosa* и *T. lutea*/ *I. galbana* и составляет 0.053 ± 0.010 , тогда как между *I. galbana*/ *C. lamellosa* $p = 0.002$.

Согласно литературным данным, высокая внутривидовая и индивидуальная изменчивость генов рДНК отмечается у видов в разных таксономических группах, обладающих широкой адаптационной способностью (Gong et al., 2013; Pillet et al., 2012). Широкие адаптационные возможности микроводорослей связаны с высоким уровнем разнообразия морфолого-генетических форм и способов питания (Гольдин, 2012), а количество и функциональные характеристики генов рРНК связывают с адаптационными возможностями организма и фенотипическим эффектом (Klarpenbach et al., 2000).

При построении сети риботипов было выявлено значительное преобладание двух основных групп (Рисунок 16) включающих 10 и 7 последовательностей, соответственно. Оставшиеся 11 производных риботипов оказались уникальными, 3 из которых (штаммы Vostok08, SW2 и 0318) показали значительную удаленность от большинства.

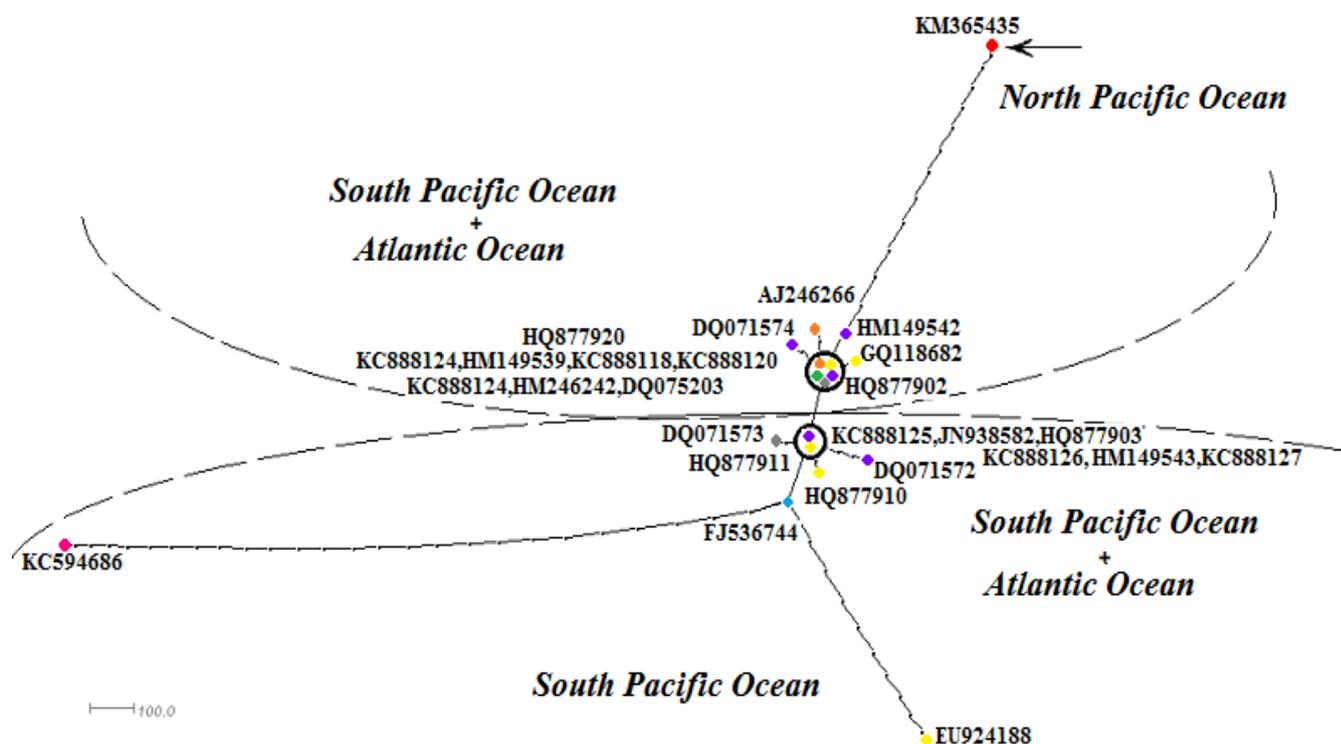


Рисунок 16 – Сеть риботипов 18S рДНК *Tisochrysis lutea* построенная по методу median-joining. Стрелкой указано положение штамма Vostok08. Цвет узла соответствует определённому региону на карте (Рисунок 16). Каждый узел представляет отдельный риботип, размер которого пропорционален числу вошедших в него последовательностей.

Однако распределение даже центральных риботипов не зависело от географической принадлежности (это видно по цветовому распределению последовательностей на рисунке 16, соответствующих географической принадлежности на карте – Рисунок 17). Наиболее полиморфные штаммы, расположившиеся на удалении от центральных, напротив, могли бы свидетельствовать о факторе географической зависимости. Тем не менее, недостаточность материала по данным зонам, отсутствие разделения атлантических и тихоокеанских изолятов по риботипам и, наоборот, распределение некоторых индивидуальных риботипов одного и того же штамма в разные группы (Рисунок 16) не позволяют выявить филогеографию риботипов.

Как указывалось выше, некоторая часть депонированных в геномном банке последовательностей были получены от клонов, поддерживающихся длительное время в разных лабораториях.

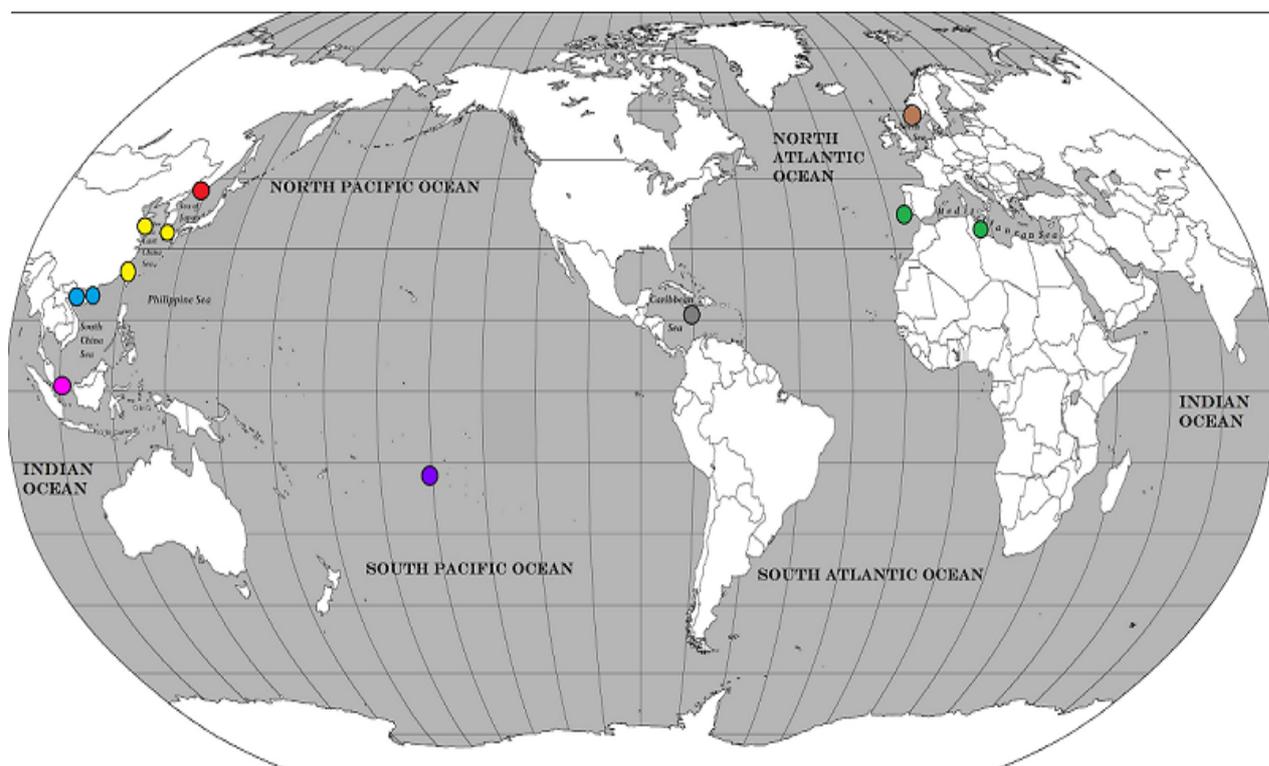


Рисунок 17 – Географическое распределение известных штаммов *Tisochrysis lutea* в Мировом океане. Анализируемые образцы отмечены цветом соответственно их географической принадлежности: красный – Японское море, фиолетовый – район о. Таити, жёлтый – Жёлтое + Восточно-Китайское моря, голубой – северная часть Южно-Китайского моря, розовый – южная часть Южно-Китайского моря (Вьетнам), зелёный – Средиземноморский регион, коричневый – Северное море, серый – Карибское море.

Теоретически, последовательности клонов общего происхождения должны быть идентичны и исключены, как дублирующиеся. В настоящей работе показано, что практически все они отличаются между собой, что ставит вопрос о причинах этого явления. Представляется вероятным, что это может быть обусловлено горизонтальным переносом генетического материала, рекомбинациями и геной конверсией (Koonin, Wolf, 2008; Mira et al., 2001).

3.6. *Porphyridium purpureum*

Полученные последовательности всех трёх культур *P. purpureum* оказались однородными по каждому из анализируемых генов. Длина полученных последовательностей по комплексу рибосомных генов 18S рДНК – ITS1– 5.8S рДНК– ITS2 составила 1372 п.н., по гену 28S рДНК (D1-D2 регион) – 586 п.н. В результате сравнения полученных данных с последовательностями из генного

банка/NCBI, было установлено, что все три исследуемые культуры водорослей по 18S рДНК наиболее близки виду *P. purpureum*. Длина последовательностей 18S рДНК после процедуры выравнивания составила 638 п.н. Средняя величина внутривидового *p*-расстояния для *P. purpureum* составила 0.009. Уровень межвидовой генетической дифференциации по гену 18S рДНК составил 0.039 – 0.040 (*P. aeruginosa*/ *P. sordidum*), 0.042 – 0.059 (*P. sordidum*/ *P. purpureum*). Средняя величина *p* между *P. aeruginosa* и *P. purpureum* составила 0.083 (0.072 – 0.095), что существенно выше (в 1.24 раза) величины 0.067 (0.063 – 0.072) между *P. purpureum* и представителями рода *Flintiella*.

Значения генетических расстояний по гену 18S рДНК представлены в приложении IX. Филогенетическое положение штаммов *P. purpureum* по данным анализа гена 18S рДНК представлено на рисунке 18 на основе BI и ML методов. Дерево, построенное по методу NJ, не соответствовало топологиям BI и ML и поэтому не учитывалось в представленном консенсусном дереве. Филогенетические связи между родами *Porphyridium* и *Flintiella* разрешены неоднозначно: узел дивергенции рода *Flintiella* поддержан слабо (0.63/50). Последовательность ITS-региона трёх исследуемых культур сравнивалась с единственной для рода последовательностью из генетической базы данных *P. purpureum* (EU818942) и последовательностями других ближайших представителей отделов Rhodophyta и Chlorophyta. Длина последовательностей после выравнивания составила 159 п.н., представляющих лишь ген 5.8S рДНК. Существенная вариабельность ITS1 и ITS2 между анализируемыми последовательностями затруднила процедуру выравнивания, в связи с этим они не были включены в анализ. Доля нуклеотидных различий внутри вида *P. purpureum* составила 0.015, при этом последовательности анализируемых культур не имели различий, а полиморфизм наблюдался лишь в сравнении с *P. purpureum* (EU818942). Род *Ahnfeltia* по отношению к *Porphyridium* по данному гену показал наименьшую величину межродовой дивергенции, которая составила 0.085 (0.077 – 0.094). Значения генетических расстояний по гену 5.8S рДНК представлены в приложении X.

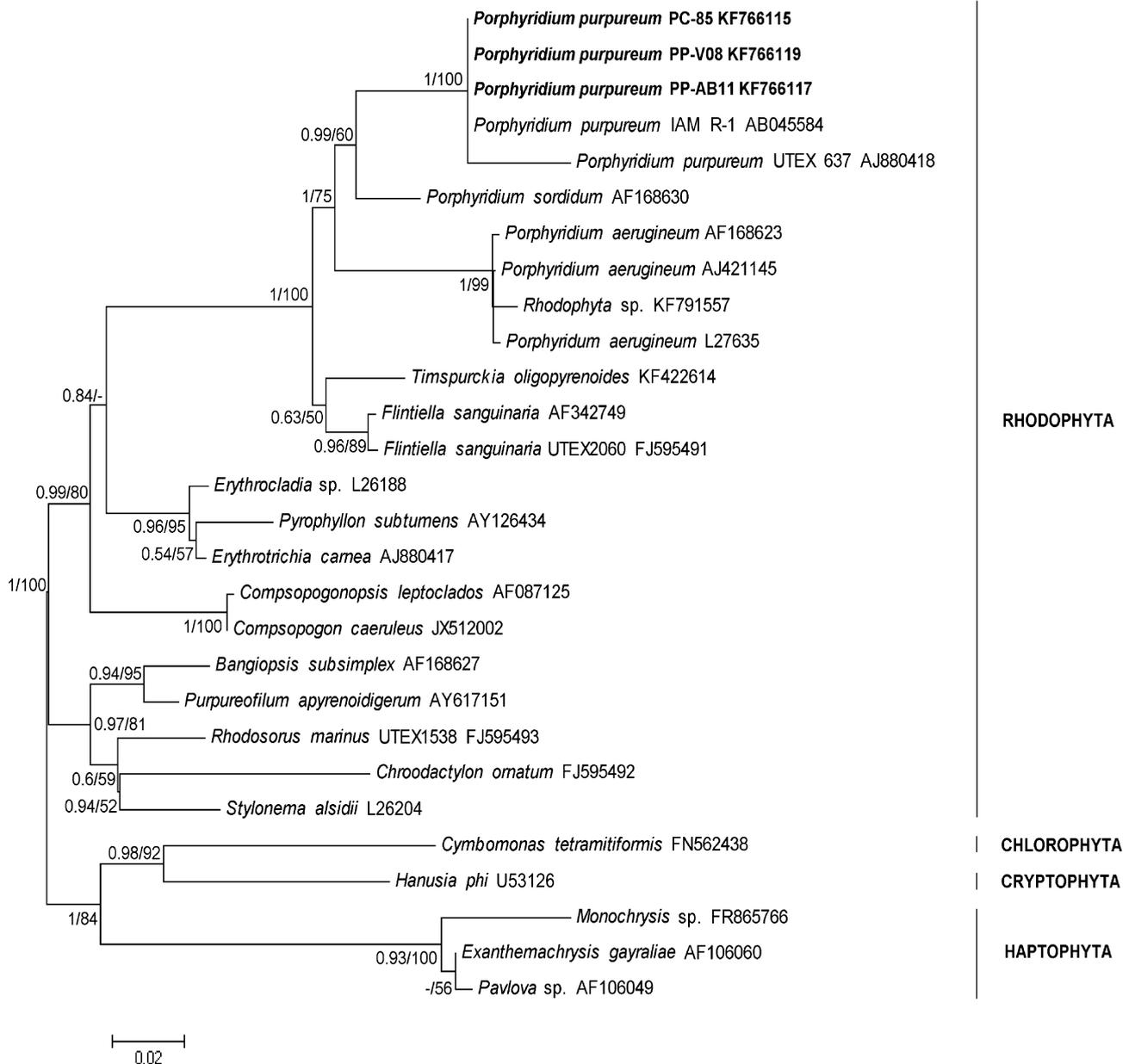


Рисунок 18 – Байесовское консенсусное филогенетическое дерево, основанное на данных 18S рДНК представителей Rhodophyta. В качестве внешних групп включены последовательности представителей отделов Haptophyta, Chlorophyta и Cryptophyta. На ветвях указаны апостериорные вероятности (PP) для ВІ анализа и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

В рамках проведённого исследования впервые были получены последовательности участка D1-D2 28S рДНК для водоросли *P. purpureum* и в целом для рода *Porphyridium*.

На основании проведенных исследований было установлено, что клоны PC-85, PP-AB11 и PP-V08, содержащиеся в коллекции ИБМ, принадлежат одному виду *Porphyridium purpureum*. Показано, что все исследованные клоны, имеющие

разные районы происхождения демонстрируют высокую степень сходства как по трём исследуемым рибосомным генам, так и по ультраструктуре.

Сравнительное исследование ультраструктуры не выявило различий в строении протопласта и его элементов у исследуемых клонов. Так, строение ядра, оболочки, хлоропласта, митохондрии, аппарата Гольджи полностью совпадает с описаниями, приводимыми в литературе не только для *P. purpureum*, но и для представителей отдела Rhodophyta в целом, и рода *Porphyridium* в частности (Ефимова и др., 2014).

Согласно анализу генетических расстояний по 18S рДНК, *P. purpureum* существенно дифференцировался от других видов рода *Porphyridium*: *P. sordidum* и *P. aerugineum*, 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 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, 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 клады, образованная четырьмя видами трёх родов: *P. aerugineum*, *P.*

sordidum, *F. sanguinaria* и *T. oligopyrenoides*. Если сравнить морфологическое строение рассматриваемых видов то, согласно работе Скотта (Scott, 1986), *F. sanguinaria* сходна с *P. purpureum*. Существенной отличительной особенностью являются различия в процессе митоза, на основании чего автор заключил, что *F. sanguinaria* не является близким видом *Porphyridium*. В качестве отличительных особенностей отмечено также расположение ядер в клетке и отсутствие пиреноидов у *F. sanguinaria*, наличие одного у *Porphyridium* spp., двух и более у *T. oligopyrenoides* (Yang et al., 2011).

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 при сравнении 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.

В результате филогенетического анализа 18S рДНК выявлено, что топология Байесова и ML деревьев в целом соответствует традиционному пониманию и сложившейся системе межвидовых и межродовых связей представителей отдела Rhodophyta.

3.7. Cyanobacteria

Предварительный анализ морфологии исследуемого изолята не позволил установить таксономический статус объекта из-за отсутствия каких-либо надёжных диагностических признаков (Рисунок 19). Изолят представлял собой

изоцентрические неветвящиеся (в массе розовые), тонкие, но прочные, длинные, неподвижные трихомы; толщина трихом около 1.36 микрон, бесцветные факультативные оболочки открыты в апикальном конце. Трихомы цилиндрические, равномерной толщины, слегка суженные на концах. Гетероцисты и акинеты обнаружены не были.

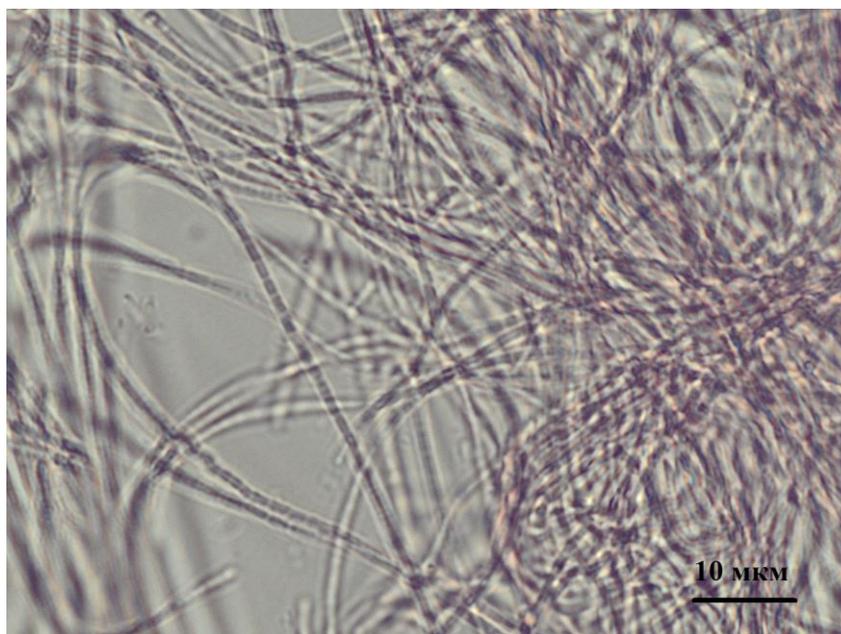


Рисунок 19 – Микрофотография филаментов трихом. Увеличение $\times 100$. Общий вид (фотография предоставлена м.н.с. лаборатории экологии шельфовых сообществ ИБМ ДВО РАН Сабуцкой М. А.)

Для растущих клеточных масс отмечено изменение насыщенности пигментации: от ярко-розового (в 3–5-дневной клеточной массе) (Рисунок 20 А) до тёмно-бордового цвета (10-дневная зрелая масса) (Рисунок 20 Б). Отмечалось резкое и быстрое увеличение биомассы при повышении температуры (от $+21^{\circ}\text{C}$).

Были сделаны попытки найти визуально схожие обрастания, позволяющие максимально сузить круг предполагаемых кандидатов на видовой статус. Для предварительной систематической идентификации цианобактерии из Амурского залива, осуществлялся поиск схожих видов в различных литературных источниках и электронных интернет-базах. Высокое сходство отмечалось в той или иной степени лишь в отношении определённых признаков (в отдельности по форме трихом, либо их размеру, либо пигментации), но не в целом. Более того, виды, формирующие внешне схожие цианобактериальные маты с матами изолята

из Амурского залива, показали очень высокий уровень генетических различий (15-20%).

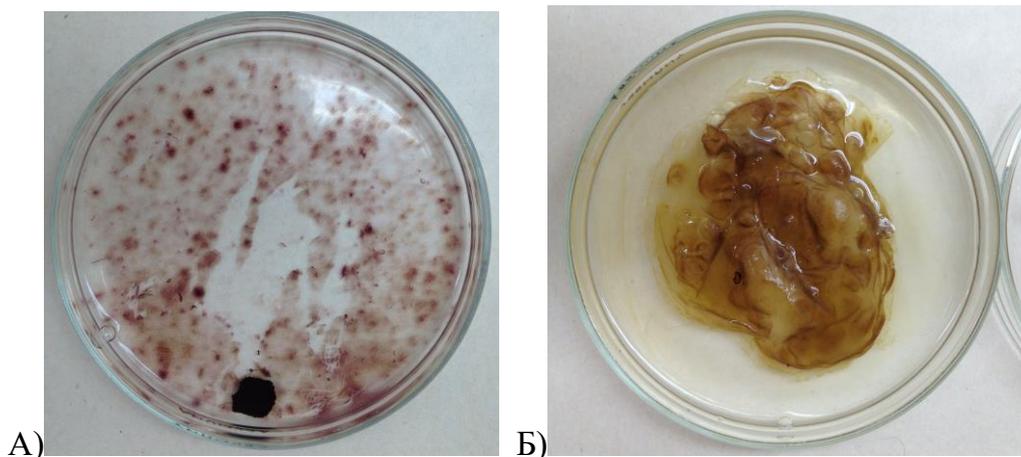


Рисунок 20 – Филаментозные биомассы в чашках Петри с морской водой на разных сроках роста, образованные цианобактерией (фотография предоставлена ст.н.с. ИБМ ДВО РАН, к.б.н. Т.Ю. Орловой).

На основе двух пар праймеров CYA106F/ CYA781R(a) и CYA359F/ CYA781R(b) были получены 10 последовательностей длиной 662 п.н. 2 последовательности имели отличия в 2 позициях по соответствующим нуклеотидам в зависимости от используемых праймеров CYA781R(a) и CYA781R(b). 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. В результате поиска дополнительных данных по штамму MBIC10070 позднее была найдена информация по культуре *Phormidium* sp. RCC 2993 (маркировка паспорта «Ishigaki 7-12-1-D4; Ishigaki island, Pacific Ocean»), содержащейся в коллекции культур морских микроводорослей, простейших, бактерий и вирусов института Роскофа. В паспорте отмечено, что данный вид имеет 99% сходства по гену 16S рДНК с *Phormidium* sp. MBIC10070. Также в каталоге Биотехнологического центра Национального института технологии и технической экспертизы (NITE) Японии был найден клон *Phormidium* sp. NBRC 102724, в паспорте которого отмечены два других наименования в коллекциях других институтов, один из

которых – MBIC10070 (типовой клон), другой – B10-C. В характеристиках клона была указана лишь жёлтая пигментация. Однако, из-за отсутствия нуклеотидных последовательностей для RCC 2993, NBRC 102724 и B10-C в международной базе данных NCBI, сравнение наших данных невозможно. Отметим, что все три изолята имеют единый регион происхождения – северная часть Тихого океана.

Изолят продемонстрировал также 96% степень сходства по 16S рДНК с последовательностью неидентифицированной цианобактерии – штамм A11 (GQ484044), из микробиального состава розовых тромболитовых матов из Багамских островов, возрастом 1.92 млрд. лет. Сравнение генетических расстояний между анализируемыми последовательностями по гену 16S рДНК указывает на близкое родство Суано АВ-2014 с *Phormidium* sp. MBIC10070 (AB058219), что отражено в топологиях NJ и ML деревьях, то есть как в дистанционном анализе, так и в вероятностном. Величина дифференциации между последовательностями составила 0.022.

Филогенетические деревья, построенные тремя различными методами, имели частично сходную топологию, различия обнаруживались в кластеризации исследуемой нами цианеи Суано АВ-2014 с близкородственными видами из базы NCBI между VI и ML/NJ деревьями (Рисунок 21).

Согласно VI реконструкции, исследуемый изолят кластеризовался со штаммом A11 (GQ484044) в общую субкладу, которая была базальной для ветви *Phormidium* sp. MBIC10070. Величина дифференциации между последовательностями Суано АВ-2014 и A11 (GQ484044) составила 0.039. Напротив, в ML/NJ деревьях Суано АВ-2014 группировался сначала с *Phormidium* sp. MBIC10070, затем от полученной клады ответвлялась последовательность штамма A11 (GQ484044). Низкие поддержки данных субклад, вероятно, обусловлены недостаточной репрезентативностью, короткой длиной (602 п.н.) и разнообразием последовательностей (Банникова, 2004).

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*.

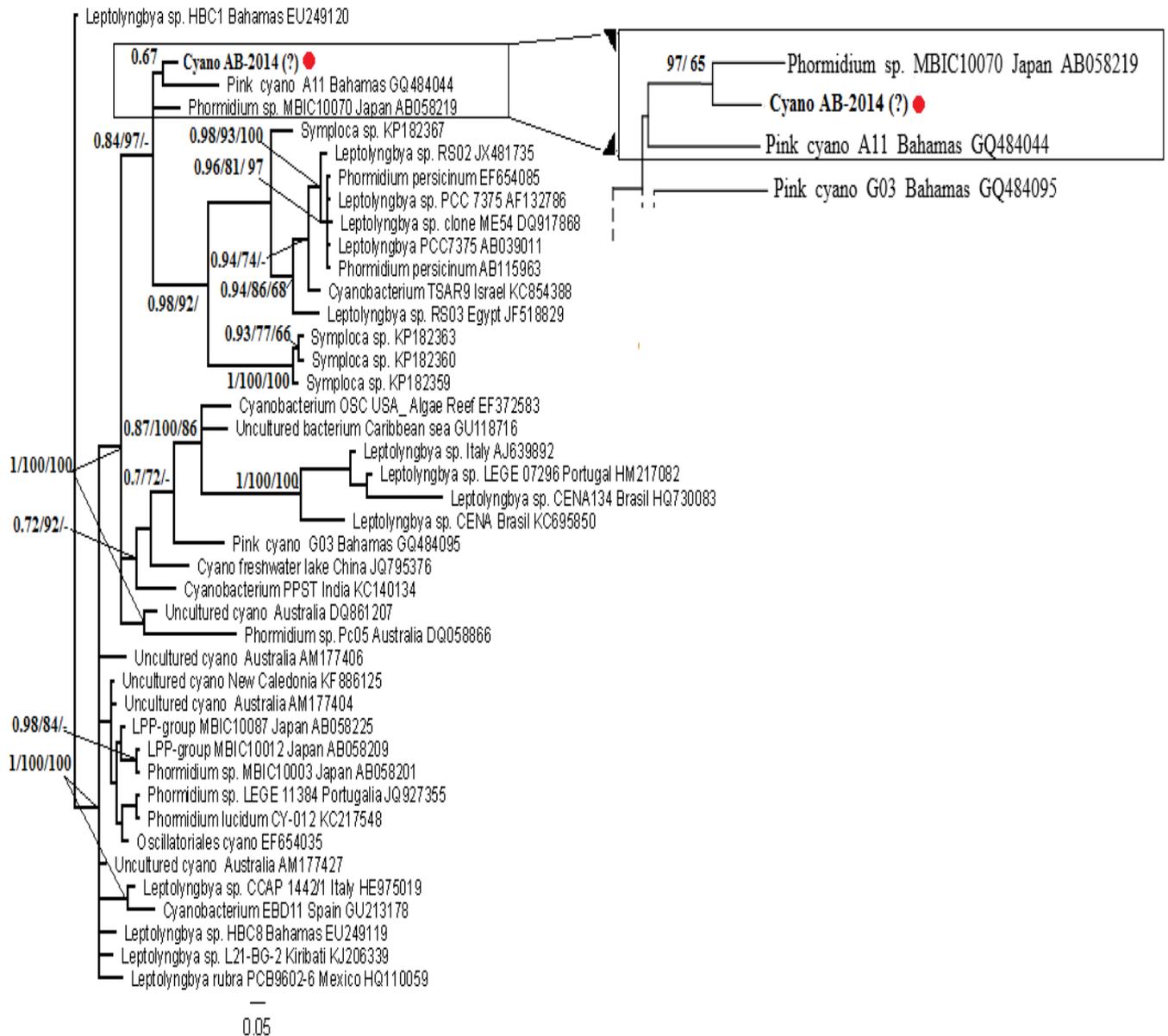


Рисунок 21 – Филогенетическое положение *Cyano* AB-2014, основанное на данных 16S рДНК ближайших представителей порядка Oscillatoriales. На ветвях указаны апостериорные вероятности (PP) для VI анализа и значения бутстреп поддержек (BP/VP), превышающие 50% для ML и NJ. Прямоугольником отмечена область VI-дерева и показана соответствующая ей область с несогласующейся топологией в ML/NJ-деревах.

Филогенетический анализ выявил общую кластеризацию исследуемого таксона с неидентифицируемыми видами родов *Leptolyngbya* и *Phormidium*, а

также в целом порядка Oscillatoriales, взятых из GenBank. 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. Многие виды были описаны под родовыми названиями «*Lyngbya*», «*Phormidium*» и «*Plectonema*», согласно филогенетическим реконструкциям, род относится к кладе «LPP-group B» (Rippka et al., 1979; Anagnostidis, Komárek, 1988; Komárek, 1992). При анализе с использованием морфологии исследуемого изолята в литературе не удалось выявить полностью соответствующих ему видов/штаммов цианобактерий. Более того, максимальная степень генетического сходства была выявлена лишь с одной последовательностью (*Phormidium* sp. MBIC10070) из огромного массива в базе данных. Недостаточность полной информации относительно опубликованных данных по сравниваемым культурам *Phormidium* sp. MBIC10070 и RCC 2993 в морфологии, экологии, генетике, 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. Обнаруженная 97% гомология последовательностей между анализируемым изолятом и опубликованной последовательностью *Phormidium* sp. MBIC10070 позволяет предполагать, что они являются одним видом (одной ОТЕ).

Очевидно, что результат видовой диагностики фрагмента цианобактериального мата на основе одного гена (16S рДНК) невозможно однозначно интерпретировать, даже несмотря на специфичность используемых молекулярных маркёров. Для более точной оценки нужно выполнить комплексный (полифазный) анализ, в том числе дополнительный молекулярно-генетический анализ. Тем не менее, полученные данные достаточны для того, чтобы определить предварительное таксономическое положение вида, цветения

которого были впервые отмечены в Амурском заливе, и предварительно ассоциированы с гибелью гидробионтов в аквариуме ИБМ ДВО РАН. Результаты анализа будут необходимы для последующих процедур ведения ежегодного экологического мониторинга акватории Амурского залива.

3.8. Возможные причины внутривидовой, внутрииндивидуальной (внутригеномной) вариабельности рДНК, затрудняющих молекулярно-генетический анализ микроводорослей

Высокая внутригеномная изменчивость 28S рДНК и ITS-региона обнаруженная между клонированными фрагментами культур и отдельных клеток *Ostreopsis* sp. ORUS позволила выделить несколько различных вариантов одного и того же гена, что вероятно объясняет столь высокое разнообразие риботипов, отмеченное в работе Сато с соавторами (Sato et al., 2011). В своём анализе авторы, выделившие несколько клад, приравнивали их к самостоятельным ОТЕ. Тот факт, что в настоящем анализе обнаруженные в пределах генома одной клетки *Ostreopsis* sp. ORUS отличающиеся варианты генных фрагментов 28S рДНК (D1-D2 регион) кластеризовались в разные филогруппы, обозначенные в работе Сато как «*Ostreopsis* sp.1» и «*Ostreopsis* sp.2», позволяет опровергнуть таксономическую самостоятельность клад и указывает на их принадлежность одной ОТЕ. Та же тенденция показана и в случае ITS-региона. Поэтому считать каждый отдельно взятый риботип как самостоятельный вариант, характерный только одному анализируемому геному, в том числе с биогеографическим подтекстом, было бы неверно. Случаи множественных внутрииндивидуальных вариантов рДНК генов были отмечены для многих организмов, в том числе для 28S рДНК и транскрибируемого спейсера человека (Gonzalez et al., 1990). Однако активное изучение данного феномена с точки зрения функциональности и влияния на геномные процессы было продолжено пока только в отношении человека. Из 7 отобранных клонов 6 показали существенные межиндивидуальные различия в участке V5 28S рДНК (Kuo et al., 1996). С помощью молекулярного клонирования и сиквенс-анализа внутригеномная гипервариабельность множественных рДНК

генов была обнаружена у инфузорий (Gong et al., 2013), грибов (Simon, Weiß, 2008) и фораминифер (Pillet et al., 2012). Впервые у динофлагеллят вариабельность копий рДНК была обнаружена в геномах *Protoperidinium*, *Diplopsalis* и *Preperidinium* (Gribble, Anderson, 2007) по 28S рДНК (D1-D6), и позднее для 18S рДНК в геноме азиатской популяции *Alexandrium catenella* («Atama complex») (Miranda et al., 2012). Несмотря на значимость данного обнаружения, как для таксономии, так и для экологического мониторинга за контролем токсичных микроводорослей (использующих гены рДНК), обнаруженное явление остается практически не изученным. Существование такого явления в геномах, ставит под сомнение результаты многих исследований, поскольку ведёт к качественной и количественной переоценке разнообразия, особенно это касается широко используемого в молекулярно-экологическом мониторинге метагеномного анализа, а также некоторые исследования на основе количественной ПЦР.

В случае микроводорослей *T. lutea*, наблюдалась изменчивость в сравнительном анализе общих клональных линий, различающихся как по возрасту, так и по месту их содержания (лаборатории различных мировых институтов). Длительность культивирования для некоторых групп микроводорослей является ключевым моментом в любом молекулярно-генетическом анализе, начиная с этапа видовой/штаммовой идентификации и изучения отдельных генов и до полногеномного анализа. За последнее десятилетие достаточно часто отмечаются случаи значительной фенотипической и генетической изменчивости изолятов одного клонового штамма в процессе культивирования, в том числе с полной потерей функциональных генов. Для экспериментальных исследований это весьма важно и необходимо учитывать в работах. Одним из таких серьёзных примеров может послужить потеря токсичности, как экологически важной характеристики, одним из клонов динофлагелляты *Alexandrium lusitanicum*, культуры которого поддерживались в одинаковых условиях (Martins et al., 2004). По концепции штамма длительное культивирование приводит к серьёзным изменениям, затрагивающим все уровни

организации организма (Lakeman et al., 2009). На сегодняшний день известно, что лабораторные культуры таких микроводорослей, как динофлагелляты и диатомовые, в процессе культивирования за короткое время могут накапливать мутации даже в высоко консервативных рибосомных генах ядерной ДНК (Beszteri et al., 2005; Masseret et al., 2009; Lowe et al., 2010; Sato et al., 2011; и др.), далее дублировать их в своём геноме, что в результате приводит к экстремально высокому уровню разнообразия в пределах клона. Спонтанные мутации могут возникать как следствие ошибок репликации и репарации ДНК. В этом случае полиморфизм будет наблюдаться в виде локальных точковых мутаций или сравнительно коротких нуклеотидных вставок/делеций; за большие геномные модификации ответственны транспозоны или ретротранспозоны. Так, 5.8% генома диатомеи *Phaeodactylum tricornutum* состоит из ретротранспозонов с длинными концевыми повторами (*LTR*, long terminal repeats) (Bowler et al., 2008). Высокая изменчивость субклонов одного штамма микроводорослей может быть объяснена многочисленными случаями рекомбинации и генной конверсией в процессе амфимиксиса (полового размножения), что было выявлено в культурах Bacillariophytes, Haptophytes и Chlorophytes (Montresor, Lewis, 2005). Тем не менее даже в митотически-размножающихся (путём апомиксиса) культурах микроводорослей эффект рекомбинации может быть вызван транспозонными элементами, приводящими к появлению новых генотипов (Wilke, Adams, 1992; Wilke et al., 1992). Одной из причин изменчивости может являться распространённый горизонтальный перенос генов, который, в свою очередь, происходит из-за вирусной инфекции или векторных бактериальных систем (Lawrence, 2005), внося в хозяйский геном так называемые ксенологи (Koonin, Wolf, 2008). Не исключено, что на скорость мутаций у микроводорослей влияет тип питания: чем больше происходит контактов между клетками, тем эффективней происходит перенос генов. Особенно результативны такие процессы в многокомпонентных сообществах (с бактериями, вирусами), где взаимодействуют различные организмы, метаболически связанные между собой (Шестаков, 2003).

У некоторых альвеолят рРНК гены организованы в линейной или в кольцевых внехромосомных (экстра-хромосомных) рДНК молекулах (Findly, Gall, 1978; Engberg et al., 1976). Известно, что *Euglena* sp. может содержать в геноме от 800 до 4000 копий кольцевых рДНК на клетку в зависимости от фазы роста и условий культивирования (Ravel-Chapuis et al., 1985; Bertaux et al., 1991). У динофлагеллят *Alexandrium catenella* содержание рРНК составляет от 190 тыс. до 2 млн.490 тыс. копий. Содержание генов варьирует между штаммами независимо от географической принадлежности последних. Причиной этого могут являться нестабильные рРНК псевдогены присутствующие в видовом комплексе «*A. tamarense/ catenella/ fundyense*» (Yeung et al., 1996; Scholin et al., 1993) и/или возникать из-за различных условий культивирования (световой/темновой цикл, температура, состав сред для роста культур) и возраст культур, что может привести к нуклеотидной вариабельности в копиях рРНК генов. Также, предполагается, что присутствие внехромосомных рДНК молекул могут являться причиной высокой гетерогенности в копиях рРНК (Erdner, Anderson, 2006). Ранее внехромосомные рДНК копии были обнаружены в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, в геноме которых содержится более 100 рДНК-повторов, которые могут рекомбинировать между собой. После нескольких актов деления, материнская клетка вычлняет из генома избыточные рДНК-копии в виде кольцевых молекул, поскольку их накопление является токсичным для клетки. Репликация данных структур сопряжена с репликацией ядерной хромосомы, но при последующем клеточном делении остаются в ядре исходной клетки. (Gottlieb, Esposito, 1989; Sinclair, Guarente, 1997). Внеядерные ДНК были обнаружены и у близкородственной динофлагеллятам группы протистов – инфузориях *Tetrahymena thermophila* (Din, Engberg, 1979).

Известно о так называемых циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислотах (Galeazzi et al., 2003). По сути, это молекулы ДНК или РНК, заключённые в мембраны, длина которых может варьировать в диапазоне от менее 200 до более 23000 п.н. Подобные структуры в крови человека стали недавно активно изучать в терапевтических целях. Существуют две основные гипотезы

возникновения данных структур – «гипотеза клеточной гибели» и гипотеза «метаболической ДНК» (Pisetsky, 2006; Gahan et al., 2008). Аналогично структурам цкДНК из крови, было доказано автономное избыточное существование таких же липидных везикул цианобактериальной ДНК, РНК и белками в образцах морской воды из Атлантического океана (Biller et al., 2014). Показано, что везикулы способны поддерживать рост гетеротрофных бактериальных культур, передавая содержимое клеток от доноров реципиентам даже на значительном расстоянии, также являясь своеобразными сигнальными молекулами. Их высвобождение происходит во время нормального роста многих видов, а их концентрация может зависеть от стрессовых факторов и структуры мембраны.

Естественно, что данные молекулы могут значительно влиять на результаты анализа, поскольку в случае выделения геномной ДНК, стадии специфического разделения разных молекул ДНК не происходит, по сути, на выходе получается смесь ядерной, циркулирующей и ДНК органелл. Разработанные методы специфического выделения цкДНК также не всегда позволяют получить её в чистом виде из-за обогащения продукта фрагментами геномной ДНК (El Messaoudi et al., 2013). С помощью сиквенс-анализа удалось обнаружить, что последовательности цкДНК содержат повышенную концентрацию ГЦ-богатых участков и фрагменты транскрибируемой области рибосомного промотора (Вейко и др., 2006). Было показано, что культивирование мезенхимных стволовых клеток человека в присутствии гена 18S РНК, накапливающейся в составе внеклеточной ДНК, способствует выживанию клеток при неблагоприятных и губительных воздействиях среды микроокружения (Костюк, 2014)

Разные варианты одного гена в пределах генома могут возникнуть вследствие комплекса событий: эндосимбиоз – инкорпорация генов симбионта в геном хозяина (например, HGT) – частичная редукция генома симбионта. Согласно гипотезе эндосимбиоза, одноклеточные водоросли разделены на две группы, в зависимости от происхождения приобретённых в процессе вторичного или третичного эндосимбиоза пластид (Margulis, 1981). Группа Гетероконт

(Heteroconta), предшественник-симбионт которых представлен красными водорослями, включает динофлагеллят, диатомовых, бурых, гаптофитовых, криптофитовых и глаукофитовых водорослей. Пластиды симбиотических зеленых водорослей, в свою очередь, были приобретены эвгленовыми и хлорарахниофитовыми водорослями (Palmer, Delwiche, 1996; Barbrook et al., 1996; Curtis et al., 2012). Большая часть генов ядерного генома хозяина со временем дублировалась, и одна из генных копий продолжила функционировать на хозяйский организм, другой вариант хозяйской копии принял альтернативную функцию для поддержания симбионта. Оба или более аллельных вариантов существующие в разных формах, то есть функционирующие для разных организмов, вероятно, будут независимо и в разной степени эволюционировать, следствием этого, будут иметь различия. Вероятные причины множественного генного аллелизма охватывают обширное число явлений от тандемных дубликаций, которые часто приводят к копии только одного гена, к хромосомным перестройкам, которые дублируют и комбинируют (перестраивают) большие участки генома, до полиплоидизации, при которой дублируется весь геном. Рассматриваются несколько возможных версий того, как происходит дубликация генов, закрепившихся в популяции. Классическая модель предполагает две возможные судьбы для пары дублированных генов: наиболее вероятно (Ohno, 1970), что один ген приобретает вредные мутации, которые приводят его к сайленсингу (молчание), но в редких случаях мутация может оказаться выгодной и одна из копий приобретает новую функцию (Force et al., 1999; Lynch, Force, 2000). Недавно был предложен третий вариант: мутации накапливаются в обеих копиях, частично обогащая вредными мутациями каждого из них до тех пор, пока в определённый момент не разделят функции исходного варианта гена. Эта новая модель, названа «DDC» (от англ. «duplication, degeneration, complementation») – дубликация, вырождение и комплементация – которая объясняет тот факт, что на самом деле существует гораздо большее число дублированных функционирующих генов в ныне живущих организмах, которые могут быть объяснены классической моделью. Также она согласуется с наблюдением, что

многие гены имеют модульную структуру, которая обеспечивает независимое изменение подфункций (Conery, Lynch, 2001). Однако, учитывая нахождение этих вариантов в составе общего генома, различия не должны превышать внутривидовой уровень.

Одной из основных сложностей, с которыми приходится сталкиваться при генетической идентификации, являются некорректные названия депонированных последовательностей в геномном банке, а также отсутствие любой другой информации, опубликованной в статьях, культуральных паспортах, т.е. в любых доступных источниках. Весьма большой массив последовательностей в геномном банке принадлежит так называемым «неклассифицированным»/«некультивируемым» видам, полученным, как правило, в результате метагеномных исследований. Тем не менее, такие данные могут оказаться полезными в будущих исследованиях. В ином случае, к путанице приводят последовательности видов, прошедших таксономический пересмотр, но не изменивших статус в базе NCBI и, либо долгое время, либо совсем не редактирующиеся самими авторами. Поэтому необходимо отслеживать последние опубликованные работы и сопоставлять всю доступную информацию.

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. Соболя 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 РС-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 рДНК 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 *Prorocentrum 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 свежесобранные 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анненкова Н.В., Беликов С.И. Обнаружение в озере Байкал динофлагеллят, филогенетически близких к семейству Pfiesteriaceae // Вода: химия и экология. 2010. № 11. С. 40–46.
2. Айздайчер Н.А., Стоник И.В., Борода А.В. Развитие *Porphyridium purpureum* (Bory de Saint-Vincent, 1797) Drew et Ross, 1965 (Rhodophyta) из Амурского залива Японского моря в лабораторной культуре // Биология моря. 2014. Т. 40, № 5. С. 384–390.
3. Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная система млекопитающих // Журнал общей биологии. 2004. Т. 65, № 4. С. 278–305.
4. Белых О.И., Гладких А.С., Сороковикова Е.Г., Тихонова И.В., Потанов С.А., Фёдорова Г.А. Микроцистин-продуцирующие цианобактерии в водоёмах России, Белоруси и Украины // Химия в интересах устойчивого развития. 2013. № 21. С. 363–378.
5. Белякова Г.А. Ботаника: в 4 т. Т.2. Водоросли и грибы: учебник для студентов высших учебных заведений / Г.А. Белякова, Ю.Т. Дьяков, К.Л. Тарасов. М.: Академия. 2006. – 320 с.
6. Вейко Н.Н., Калашикова Е.А., Кокаровцева С.Н., Костюк С.В., Ермаков А.В., Иванова С.М., Рязанцева Т.А., Еголина Н.А., Ляпунова Н.А., Спитковский Д.М. Стимулирующее действие фрагментов транскрибируемой области рибосомного повтора на лимфоциты периферической крови человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006. Т. 10. С. 410–414.
7. Гольдин Е.Б. Массовые виды цианобактерий и микроводорослей в экосистемах: межвидовые взаимоотношения и ко-эволюционный процесс // Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2012. №. 7. С. 114–125.
8. Гольдин Е.Б. Биологическая активность микроводорослей и её значение в межвидовых взаимоотношениях // Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2013. №. 9. С. 49–76.

9. *Ефимова М.В., Ефимов А.А.* Синезеленые водоросли или цианобактерии? Вопросы систематики // Современные проблемы науки и образования. 2007. № 6. С. 34-39.
10. *Ефимова К.В., Крещеновская М.А., Айздайчер Н.А., Орлова, Т.Ю.* Генетическое и ультраструктурное исследование трех 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.
11. *Заварзин Г.А.* Особенности эволюции прокариот. Эволюция и биоценотические кризисы. М.: Наука. 1987. С. 144–158.
12. *Киселев И.А.* Состав и периодичность фитопланктона бухты Патрокл Японского моря // Исследования морей СССР. 1935. Вып. 22. С. 82–118.
13. *Киселев И.А.* Фитопланктон дальневосточных морей как показатель некоторых особенностей их гидрологического режима // Труды Государственного океанографического института. 1947. Вып. 1, № 13. С. 189–215.
14. *Киселев И.А.* Периодичность планктонных водорослей одной из гаваней Японского моря // Диатомовый сборник. Л.: ЛГУ. 1953. С. 173–179.
15. *Киселев И.А.* Планктон морей и континентальных водоемов. Л.: Наука. 1969. Т. 1. 658 с.
16. *Киселев И.А.* Планктон морей и континентальных водоемов. Л.: Наука. 1980. Т. 2. 439 с.
17. *Коновалова Г.В.* Сезонная характеристика фитопланктона в Амурском заливе Японского моря // Океанология. 1972. Т. 12, № 1. С. 123–128.
18. *Коновалова Г.В.* Видовой состав и численность фитопланктона залива Посъета (Японское море) // Исследование пелагических и донных организмов дальневосточных морей. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1979. С. 6–16.
19. *Коновалова Г.В.* Структура планктонного фитоценоза залива Восток Японского моря // Биология моря. 1984а. № 1. С. 13–23.

20. Коновалова Г.В. Видовой состав фитопланктона залива Восток // Гидробиологические исследования заливов и бухт Приморья. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1984б. С. 93–98.
21. Коновалова Г.В., Орлова Т.Ю. Структура фитопланктона мелководий северо-западной части Японского моря // Биология моря. 1988. № 5. С. 10–20.
22. Коновалова Г.В., Орлова Т.Ю., Паутова Л.А. Атлас фитопланктона Японского моря. М.: Наука. 1989. 160 с.
23. Коновалова Г.В., Орлова Т.Ю. Список видов фитопланктона бухты Мелководная (Японское море) // Экосистемные исследования прибрежных сообществ залива Петра Великого, Владивосток. 1991. С. 146–152.
24. Коновалова Г.В. Динофлагелляты (Dinophyta) дальневосточных морей России и сопредельных акваторий Тихого океана. Владивосток: Дальнаука, 1998. 299 с.
25. Крещеновская М.А., Орлова Т.Ю. Ультраструктура динофлагелляты *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo, 1981 (Dinophyceae), обитающей в Японском море // Биология моря. 2014. Т. 40, № 4. С. 286–292.
26. Костюк С.В. Роль внеклеточной ДНК в функциональной активности генома человека: Дис. ... док. биол. наук. М: Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Медико-генетический Научный Центр» РАМН. 2014. 450 с.
27. Кусморская А.П. О весеннем планктоне северо-западной части Японского моря // Известия АН СССР. Серия биологическая. 1949. № 3. С. 375–380.
28. Кусморская А.П. Состав и распределение планктона северо-западной части Японского моря в первую половину лета 1941 г. // Труды Всесоюзного гидробиологического общества. 1950. Т. 2. С. 253–280.
29. Ладыгина Л.В. Каротиноидный состав кормовых микроводорослей // Альгология. 2010. Т. 20, № 1. С. 33–41.
30. Лухтанов В.А. Принципы реконструкции филогенезов: признаки,

модели эволюции и методы филогенетического анализа // Труды Зоологического института РАН. Приложение № 2. 2013. С. 39–52.

31. *Маркова Л.Г.* Значимость морфологических признаков при описании и определении ископаемых пыльцы и спор // Систематика и методы изучения ископаемых пыльцы и спор / Под. ред. В.Н Сакс, А.Ф Хлонова. – М.: Наука, 1964. – С. 39–44.

32. *Мещерякова И.М.* Зимний планктон центральной части Японского моря // Изв. ТИНРО. 1954а. Т. 39. С. 84–96.

33. *Мещерякова И.М.* Летний планктон Японского моря // Изв. ТИНРО. 1954б. Т. 42. С. 288–293.

34. *Мещерякова И.М.* Сезонные изменения планктона в открытых водах Японского моря // Изв. ТИНРО. 1960. Т. 46. 95–144.

35. *Орлова Т.Ю.* Диатомовые водоросли планктона неритических вод Южного Приморья: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: ИБМ ДВО АН СССР. 1990. 26 с.

36. *Орлова Т.Ю.* Красные приливы и токсичные микроводоросли в дальневосточных морях России // Вестник ДВО РАН. 2005. № 1. С. 27–31.

37. *Орлова Т.Ю., Стоник И.В., Шевченко О.Г.* Флора микроводорослей планктона Амурского залива Японского моря // Биол. моря. 2009. Т. 35, № 1. С. 48–61.

38. *Остроумов Л.А., Просеков А.Ю., Архипов А.Н., Мудрикова О.В.* Метод выделения растительной ДНК из растений и продуктов питания на их основе // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2010. Т. 12, № 4-3. С. 722–724.

39. *Паутова Л.А.* Видовой состав фитопланктона пролива Старка (залив Петра Великого) // Гидробиологические исследования заливов и бухт Приморья. Владивосток: ДВЦ АН СССР. 1984. С. 99–103.

40. *Романенков К.В., Сальников А.Н., Алексеевский А.В.* Параллельный метод объединения результатов работы программ по сборке генома //

Параллельные вычислительные технологии (ПаВТ'2015): Труды международной научной конференции. Екатеринбург. 2015. С. 456–462.

41. *Пура А.Д.* Список фауны и флоры залива Посъета Японского моря // Исслед. фауны морей. 1971. Т. 8, № 16. С. 302–303.

42. *Саут Р.* Основы альгологии / *Р. Саут, А. Уиттик.* М.: Мир. 1990. 597 с.

43. *Селина М.С.* Весенне-осенний фитопланктон в заливах Японского моря// Тр. ДВНИ ГМИ. 1988. С. 60–68.

44. *Селина М.С.* Фитопланктон залива Восток Японского моря: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: ИБМ ДВО АН СССР. 1998. 125 с.

45. *Сомма М.* Практическое руководство: Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов. Сессия 4. Выделение и очистка ДНК // Всемирная организация здравоохранения. Европейское региональное бюро. 2006. 20 с.

46. *Стоник И.В., Орлова Т.Ю.* Летне-осенний фитопланктон в Амурском заливе Японского моря // Биол. моря. 1998. Т. 24, № 4. С. 205–211.

47. *Телитченко М.М.* Введение в проблемы биохимической экологии / *М.М. Телитченко, С.А. Остроумов.* М.: Наука. 1990. 288 с.

48. *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.

49. *Тихонова И.В., Гладких А.С., Белых О.И., Сороковикова Е.Г.* Выявление потенциально токсичных цианобактерий в озере Байкал и водохранилищах Иркутской области с помощью полимеразной цепной реакции // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. 2006. № 2. С. 202–205.

50. *Шестаков С.В.* Роль горизонтального переноса генов в эволюции. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.evolbiol.ru/shestakov.htm>

51. *Abed R.M.M., Palinska K.A., Camoin G., Golubic S.* Common evolutionary origin of planktonic and benthic nitrogen-fixing oscillatoriacean cyanobacteria from tropical oceans // FEMS Microbiology Letters. 2006. Vol. 260, № 2. P. 171–177.

52. Accoroni S., Colombo F., Pichierri S., Romagnoli T., Marini M., Battocchi C., Penna A., Totti C. Ecology of *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms in the northwestern Adriatic Sea // *Cryptogamie Algologie*. 2012. Vol. 33. P. 191–198.
53. Adachi M., Sako Y., Ishida Y. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae) // *Journal of Phycology*. 1994. Vol. 30. P. 857–865.
54. Adachi M., Sako Y., Ishida Y. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions // *Journal of Phycology*. 1996. Vol. 32. P. 424–432.
55. Albertano P., Kováčik L. Is the genus *Leptolyngbya* (Cyanophyte) a homogeneous taxon? // *Algological Studies*. 1994. V. 75. P. 37–51.
56. Aligizaki K., Nikolaidis G. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece // *Harmful algae*. 2006. Vol. 5. P. 717–730.
57. Aligizaki K., Nikolaidis G., Katikou P., Baxevanis A.D., Abatzopoulos T.J. Potentially toxic epiphytic *Prorocentrum* (Dinophyceae) species in Greek coastal waters // *Harmful Algae*. 2009. Vol. 8. P. 299–311.
58. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.J. Basic local alignment search tool // *Journal of Molecular Biology*. 1990. Vol. 215. P. 403–410.
59. Al-Kandari M., Highfield A., Hall M., Hayes P., Schroeder D. Molecular tools separate harmful algal bloom species, *Karenia mikimotoi*, from different geographical regions into distinct sub-groups // *Harmful Algae*. 2011. Vol. 10. P. 636–643.
60. Álvarez I., Wendel J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2003. Vol. 29. P. 417–434.
61. Anagnostidis K., Komárek J. Modern approach to the classification system of the Cyanophytes 3: Oscillatoriales // *Archiv fur Hydrobiologie/ Algological Studies*. 1988. 50-53. P. 327–472.

62. *Anderson D.M.* Harmful algal blooms and ocean observing systems: needs, present status and future potential // *Fisheries for Global Welfare and Environment*, 5th World Fisheries Congress. 2008. P. 317–334.

63. *Aravind L., Watanabe H., Lipman D.J., Koonin E.V.* Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes // *PNAS*. 2000. Vol. 97, № 21. P. 11319–11324.

64. *Asayama M., Kabasawa M., Takahashi I., Aida T., Shirai M.* Highly repetitive sequences and characteristics of genomic DNA in unicellular cyanobacterial strains // *FEMS Microbiology Letters*. 1996. Vol. 137. P. 175–181.

65. *Attaran-Fariman G., Bolch C.* Morphology and Phylogeny of *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) a potentially harmful bloom forming species isolated from the sediments of Iran's south coast // *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 2012. Vol. 11, № 2. P. 252–270.

66. *Bachvaroff T.R., Concepcion G.T., Rogers C.R., Herman E.M., Delwiche C.F.* Dinoflagellate expressed sequence tag data indicate massive transfer of chloroplast genes to the nuclear genome // *Protist*. 2004. Vol. 155, № 1. P. 65–78.

67. *Bachvaroff T.R., Place A.R.* From stop to start: tandem gene arrangement, copy number and Trans-splicing sites in the dinoflagellate *Amphidinium carterae* // *PLoS ONE*. 2008. Vol. 3, № 8. e2929.

68. *Baker P.D., Steffensen D.A., Humpage A.R., Nicholson B.C., Falconer I.R., Lanthois B., Fergusson K.M., Saint C.P.* Preliminary evidence of toxicity associated with the benthic cyanobacterium *Phormidium* in South Australia // *Environmental Toxicology*. 2001. Vol. 16. P. 506–511.

69. *Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F., Campbell C.S., Donoghue M.J.* The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny // *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 1995. Vol. 82. P. 247–277.

70. *Ballot A., Dadheech P.K., Haande S., Krienitz L.* Morphological and phylogenetic analysis of *Anabaenopsis abijatae* and *Anabaenopsis elenkinii*

(Nostocales, Cyanobacteria) from tropical inland water bodies // *Microbial Ecology*. 2008. Vol. 55, № 4. P. 608-618.

71. *Barbrook A.C., Lockhart P.J., Howe C.J.* Phylogenetic analysis of plastid origins based on *secA* sequences // *Current Genetics*. 1996. Vol. 34. P. 336–341.

72. *Basova M.M.* Fatty acid composition of lipids in microalgae // *International Journal of Algae*. 2005. Vol. 7. P. 33–57.

73. *Bass D., Howe A.T., Mylnikov A.P., Vickerman K., Chao E.E., Smallbone J.E., Snell J., Cabral Jr C., Cavalier-Smith T.* Phylogeny and Classification of Cercomonadida (Protozoa, Cercozoa): *Cercomonas*, *Eocercomonas*, *Paracercomonas*, and *Cavernomonas* gen. nov. // *Protist*. 2009. Vol. 160. P. 483–521.

74. *Bayer T., Aranda M., Sunagawa S., Yum L.K., Desalvo M.K., Lindquist E., Coffroth M.A., Voolstra C.R., Medina M.* *Symbiodinium* transcriptomes: genome insights into the dinoflagellate symbionts of reef-building corals // *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7. e35269.

75. *Bendif E., Probert I., Herve A., Billard C., Goux D., Lelong C., Cadoret J.P., Véron B.* Integrative Taxonomy of the Pavlovophyceae (Haptophyta): A Reassessment // *Protist*. 2011. Vol. 162. P. 738–761.

76. *Bendif E., Probert I., Schroeder D.C., de Vargas C.* On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of *Dicrateria* to the Prymnesiales (Haptophyta) // *Journal of Applied Phycology*. 2013. Vol. 25. P. 1763–1776.

77. *Bendif E.M., Young J.* On the ultrastructure of *Gephyrocapsa oceanica* (Haptophyta) life stages // *Cryptogamie Algologie*. 2014. Vol. 35, № 4. P. 379–388.

78. *Ben-Porath J., Carpenter E.J., Zehr J.P.* Genotypic relationships in *Trichodesmium* (Cyanophyceae) based on *nifH* sequence comparisons // *Journal of Phycology*. 1993. Vol. 29, № 6. P. 806–810.

79. *Behnke A., Barger K.J., Bunge J., Stoeck T.* Spatio-temporal variations in protistan communities along an O₂/H₂S gradient in the anoxic Framvaren Fjord (Norway) // *FEMS Microbiology Ecology*. 2010. Vol. 72, № 1. P. 89–102.

80. *Ben-Porath J., Zehr J.P.* Detection and characterization of cyanobacterial *nifH* genes // *Applied and Environmental Microbiology*. 1994. Vol. 60, № 3. P. 880–887.
81. *Bertaux O., Mederic C., Valencia R.* Amplification of ribosomal DNA in the nucleolus of vitamin B12-deficient *Euglena* cells // *Experimental Cell Research*. 1991. Vol. 195. P.119–128.
82. *Bhaya D., Dufresne A., Vaultot D., Grossman A.* Analysis of the *hli* gene family in marine and freshwater cyanobacteria // *FEMS Microbiology Letters*. 2002. Vol. 215. P. 209–219.
83. *Bigogno C., Khozin-Goldberg I., Boussiba S., Vonshak A., Cohen Z.* Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid // *Phytochemistry*. 2002. Vol. 60. P. 497–503.
84. *Biller S.J., Berube P.M., Berta-Thompson J.W., Kelly L., Roggensack S.E., Awad L., Roache-Johnson K.H., Ding H., Giovannoni S.J., Rocap G., Moore L.R., Chisholm S.W.* Genomes of diverse isolates of the marine cyanobacterium *Prochlorococcus* // *Scientific data*. 2014. Vol. 1, № 140034. doi: 10.1038/sdata.2014.34
85. *Bittencourt-Oliveira M.D., de Oliveira M.C., Bolch C.J.S.* Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (*cpcBA*) // *Journal of Phycology*. 2001. Vol. 37, № 5. P. 810–818.
86. *Boc A., Diallo, Alpha B., Makarenkov V.* T-REX: a web server for inferring, validating and visualizing phylogenetic trees and networks // *Nucleic Acids Research*. 2012. Vol. 40, № 1. P. 573–579.
87. *Bolch C.J.S., Blackburn S.I., Neilan B.A., Grewe P.M.* Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR-RFLP of the *cpcBA* intergenic spacer and flanking regions // *Journal of Phycology*. 1996. Vol. 32, № 3. P. 445-451.
88. *Bolch C.J.S., Orr P.T., Jones G.J., Blackburn S.I.* Genetic, morphological and toxicological variation among globally distributed strains of *Nodularia* (Cyanobacteria) // *Journal of Phycology*. 1999. Vol. 35, № 2. P. 339–355.

89. Boroda A.V., Aizdaicher N.A., Odintsova N.A. The influence of ultra-low temperature storage on marine microalgal cells // *Journal of Applied Phycology*. 2014. Vol. 26. P. 387–397.

90. Boyer S.L., Flechtner V.R., Johansen J.R. Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria // *Molecular Biology and Evolution*. 2001. Vol. 18, № 6. P. 1057–1069.

91. Bowler C., Allen A.E., Badger J.H., Grimwood J., Jabbari K., Kuo A., Maheswari U., Martens C., Maumus F., Otiillar R.P., Rayko E., Salamov A., Vandepoele K., Beszteri B., Gruber A., Heijde M., Katinka M., Mock T., Valentin K., Verret F., Berges J.A., Brownlee C., Cadoret J.-P., Chiovitti A., Choi C.J., Coesel S., De Martino A., Detter J.C., Durkin C., Falciatore A., Fournet J., Haruta J., Huysman M.J.J., Jenkins B.D., Jiroutova K., Jorgensen R.E., Joubert Y., Kaplan A., Kröger N., Kroth P.G., La Roche J., Lindquist E., Lommer M., Martin-Jézéquel V., Lopez P.J., Lucas S., Mangogna M., McGinnis K., Medlin L.K., Montsant A., Oudot-Le Secq M.-P., Napoli C., Obornik M., Parker M.S., Petit J.-L., Porcel B.M., Poulsen N., Robison M., Rychlewski L., Ryneerson T.A., Schmutz J., Shapiro H., Siaut M., Stanley M., Sussman M.R., Taylor A.R., Vardi A., von Dassow P., Vyverman W., Willis A., Wyrwicz L.S., Rokhsar D.S., Weissenbach J., Armbrust E.V., Green B.R., Van de Peer Y., Grigoriev I.V. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes // *Nature*. 2008. Vol. 456, № 7219. P. 239–244.

92. Braarud T. Salinity as an ecological factor in marine phytoplankton // *Physiologia Plantarum*. 1951. Vol. 4. P. 28–34.

93. Brassell S.C., Dumitrescu M. Recognition of alkenones in a lower Aptian porcellanite from the west-central Pacific // *Organic Geochemistry*. 2004. Vol. 35. P. 181–188.

94. Bravo I., Vila M., Casablanca S., Rodriguez F., Rial P., Riobó P., Penna A. Life cycle stages of the benthic palytoxin-producing dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae) // *Harmful algae*. 2012. Vol. 18. P. 24–34.

95. *Brown C.W., Yodar J.A.* Coccolithophorid blooms in the global ocean // *Journal of Geophysical Research*. 1994. Vol. 99. P. 7467–7482.
96. *Brown M.R.* The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol. 145. P. 79–99.
97. *Brown M.R., Jeffery S.W., Garland C.D.* Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review // *CSIRO Marine Laboratories Report, Australia: CSIRO Hobart*. 1989. 44 p.
98. *Burrell A.S., Jolly C.J., Tosi A.J., Disotell T.R.* Mitochondrial evidence for the hybrid origin of the *kipunji*, *Rungwecebus kipunji* (Primates: Papionini) // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2009. Vol. 51, № 2. P. 340–348.
99. *Caron D.A., Countway P.D., Jones A.C., Kim D.Y., Schnetzer A.* Marine protistan diversity // *Annual Review of Marine Science*. 2012. Vol. 4. P. 467–493.
100. *Caron D.A., Countway P.D., Savai P., Gast R.J., Schnetzer A., Moorthi S.D., Dennett M.R., Moran D.M., Jones A.C.* Defining DNA-based operational taxonomic units for microbial-eukaryote ecology // *Applied and Environmental Microbiology*. 2009. Vol. 75. P. 5797–5808.
101. *Casamatta D.A., Johansen J.R., Vis M.L., Broadwater S.T.* Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria) 1 // *Journal of Phycology*. 2005. Vol. 41, № 2. P. 421–438.
102. *Castenholz R.W.* Phylum BX. Cyanobacteria, Oxygenic Photosynthetic Bacteria // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Springer-Verlag, New York-Berlin-Heidelberg. 2001. 721 p.
103. *Cavalier-Smith T.* Cell diversification in heterotrophic flagellates // *The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates*, D.J. Paterson and J. Larson, eds. Oxford: Clarendon Press. 1991. P. 113–131.
104. *Chan Y.H., Wong J.T.* Concentration-dependent organization of DNA by the dinoflagellate histone-like protein HCc3 // *Nucleic Acids Research*. 2007. № 35. P. 2573–2583.

105. Charrier A., Bérard J.B., Bougaran G., Carrier G., Lukomska E., Schreiber N., Fournier F., Charrier A.F., Rouxel C., Garnier M., Cadoret J.-P., Saint-Jean B. High-affinity nitrate/nitrite transporter genes (*Nrt2*) in *Tisochrysis lutea*: identification and expression analyses reveal some interesting specificities of Haptophyta microalgae // *Physiologia Plantarum*. 2015. doi: 10.1111/ppl.12330.
106. Chatton É. *Pansporella perplexa*. Réflexions sur la biologie et la phylogénie des protozoaires // *Annales des Sciences Naturelles - Zoologie et Biologie Animale*. 1925. Vol. 10, № 7. P. 1-84.
107. Chen L., Cai Y., Zhou G., Shi X., Su J., Chen G., Lin K. Rapid Sanger Sequencing of the 16S rRNA Gene for Identification of Some Common Pathogens // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, № 2. e88886.
108. Chesnick J.M., Kooistra W.H.C., Wellbrock U., Medlin L.K. Ribosomal RNA analysis indicates a benthic pennate diatom ancestry for the endosymbionts of the dinoflagellates *Peridinium foliaceum* and *Peridinium balticum* (Pyrrophyta) // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1997. Vol. 44. P. 314–320.
109. Chinain M., Faust M.A., Paullac S. Morphology and molecular analyses of three species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae): *G. pacificus*, sp. nov., *G. australes*, sp. nov., and *G. polynesiensis*, sp. nov. // *Journal of Phycology*. 1999. № 35. P. 1282–1296.
110. Chonudomkul D., Yongmanitchai W., Theeragool G., Kawachi M., Kasai F., Kaya K., Watanabe M.M. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan // *FEMS Microbiology Ecology*. 2004. Vol. 48. P. 345–355.
111. Chow M., Yan K., Bennett M., Wong J. Birefringence and DNA condensation of liquid crystalline chromosomes // *Eukaryotic Cell*. 2010. Vol. 9. P. 1577–1587.
112. Ciminiello P., Dell'Aversano C., Iacovo D.E., Fattorusso E., Forino M., Tartaglione L., Benedettini G., Onorari M., Serena F., Battocchi C., Casabianca S., Penna A. First finding of *Ostreopsis* cf. *ovata* toxins in marine aerosols // *Environmental Science & Technology*. 2014. Vol. 18, № 48 (6). P. 3532–3540.

113. Comte K., Šabacká M., Carre-Mlouka A., Elster J., Komárek J. Relationships between the Arctic and the Antarctic cyanobacteria; three *Phormidium*-like strains evaluated by a polyphasic approach // FEMS Microbiology Letters. 2007. Vol. 59, № 2. P. 366–376.

114. Gottlieb S., Esposito R.E. A new role for a yeast transcriptional silencer gene, *SIR2*, in regulation of recombination in ribosomal DNA // Cell. 1989. Vol. 56. P. 771–776.

115. Croome R.L., Tyler P.A. *Prorocentrum playfairi* and *Prorocentrum foveolata*, two new dinoflagellates from Australian waters // British Phycological Journal. 1987. Vol. 22. P. 67–75.

116. Conery J.S., Lynch M. Nucleotide substitutions and evolution of duplicate genes // Pacific Symposium on Biocomputing. 2001. № 6. P. 167–178.

117. Curtis A.B., Tanifuji G., Burki F., Gruber A., Irimia M., Maruyama S., Arias M.C., Ball S.G., Gile G.H., Hirakawa Y., Hopkins J.F., Kuo A., Rensing S.A., Schmutz J., Symeonidi A., Elias M., Eveleigh R.J.M., Herman E.K., Klute M.J., Nakayama T., Oborník M., Reyes-Prieto A., Armbrust E.V., Aves S.J., Beiko R.G., Coutinho P., Dacks J.B., Durnford D.G., Fast N.M., Green B.R., Grisdale C.J., Hempel F., Henrissat B., Höppner M.P., Ishida K.-I., Kim E., Kořený L., Kroth P.G., Liu Y., Malik S.-B., Maier U.G., McRose D., Mock T., Neilson J.A.D., Onodera N.T., Poole A.M., Pritham E.J., Richards T.A., Rocap G., Roy S.W., Sarai C., Schaack S., Shirato S., Slamovits C.H., Spencer D.F., Suzuki S., Worden A.Z., Zauner S., Barry K., Bell C., Bharti A.K., Crow J.A., Grimwood J., Kramer R., Lindquist E., Lucas S., Salamov A., McFadden G.I., Lane C.E., Keeling P.J., Gray M.W., Grigoriev I.V., Archibald J.M., Hopkins J.F. Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs // Nature. 2012. Vol. 492. P. 59–65.

118. Dale B. Marine dinoflagellate cyst as indicators of eutrophication and industrial pollution: a discussion // Science of the Total Environment. 2001. Vol. 264. P. 235–240.

119. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // Nature Methods. 2012. Vol. 9. P. 772.

120. David H., Laza-Martinez A., Miguel I., Orive E. *Ostreopsis* cf. *siamensis* and *Ostreopsis* cf. *ovata* from the Atlantic Iberian Peninsula: Morphological and phylogenetic characterization // Harmful algae. 2013. Vol. 30. P. 44–55.

121. De Wilde B., Lefever S., Dong W., Dunne J., Husain S., Derveaux S., Hellemans J., Vandensompele J. Target enrichment using parallel nanoliter quantitative PCR amplification // BMC Genomics. 2014. Vol. 15, № 184. P. 1–14.

122. Díez B., Pedrós-Alió C., Massana R. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing // Applied and Environmental Microbiology. 2001. Vol. 67, № 7. P. 2932–2941.

123. Din N., Engberg J. Extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena* structure and evolution // Journal of molecular biology. 1979. Vol. 134, № 3. P. 555–574.

124. Dodge J.D. Chromosome structure in the dinoflagellates and the problem of the mesocaryotic cell // Excerpta Medica International Congress Series. 1995. № 91. P. 339–345.

125. Drancourt M., Bollet C., Carlioz A., Martelin R., Gayral J.P., Raoult D. 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates // Journal of Clinical Microbiology. 2000. Vol. 38, № 10. P. 3623–3630.

126. Dyble J., Paerl H.W., Neilan B.A. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on *nifH* and *cpcBA-IGS* nucleotide analysis // Applied Environmental Microbiology. 2002. Vol. 68. P. 2567–2571.

127. Edvardsen B., Dittami S.M., Groben R., Brubak S., Escalera L., Rodríguez Hernández F., Reguera B., Chen J., Medlin L.K. Molecular probes and microarrays for the detection of toxic algae in the genera *Dinophysis* and *Phalacroma* (Dinophyta) // Environmental Science and Pollution Research. 2013. Vol. 20, № 10. P. 6733–6750.

128. Edvardsen B., Eikrem W., Green J.C., Andersen R.A., Moon-van der Staay, S.Y., Medlin L.K. Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from 18S

ribosomal DNA sequences and available morphological data // *Phycologia*. 2000. Vol. 39, № 1. P. 19–35.

129. *Edwardsen B., Eikrem W., Throndsen J., Sáez A.G., Probert I., Medlin L.K.* Ribosomal DNA phylogenies and a morphological revision provide the basis for a revised taxonomy of the Prymnesiales (Haptophyta) // *European Journal of Phycology*. 2011. Vol. 46, № 3. P. 202–228.

130. *Edwardsen B., Paasche E.* Bloom dynamics and physiology of *Prymnesium* and *Chrysochromulina* // *Nato Asi Series G Ecological Sciences*. 1998. Vol. 41. P. 193–208.

131. *Edwardsen B., Shalchian-Tabrizi K., Jakobsen K.S., Medlin L.K., Dahl E., Brubak S., Paasche E.* Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from norwegian waters inferred from single cell analyses of rDna1 // *Journal of Phycology*. 2003. Vol. 39, № 2. P. 395–408.

132. *El Messaoudi S., Rolet F., Mouliere F., Thierry A.R.* Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations // *Clinica Chimica Acta*. 2013. V. 424. P. 222–230.

133. *Emdadi D., Berland B.* Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri* // *Marine Chemistry*. 1989. Vol. 26, № 3. P. 215–225.

134. *Engberg J., Andersson P., Leick V., Collins J.* Free ribosomal DNA molecules from *Tetrahymena pyriformis* GL are giant palindromes // *Journal Molecular Biology*. 1976. Vol. 104. P. 455–470.

135. *Erdner D.L., Anderson D.M.* Global transcriptional profiling of the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* using massively parallel signature sequencing // *BMC Genomics*. 2006. Vol. 7, № 88. P. 1–11.

136. *Ernst A., Becker S., Wollenzien U.I.A., Postius C.* Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis // *Microbiology-SGM*. 2003. Vol. 149, № 1. P. 217–228.

137. *Escalera L., Reguera B.* Planozygote division and other observations on the sexual cycle of several species of *Dinophysis* (Dinophyceae, Dinophysiales) // *Journal of Phycology*. 2008. Vol. 44, № 6. P. 1425–1436.

138. Ewart J.W., Pruder G.D. Comparative growth of *Isochrysis galbana* Parke and *Isochrysis* aff. *galbana*, clone T-ISO at four temperatures and three light intensities // Journal of the World Mariculture Society. 1981. Vol. 12, № 1. P. 333–339.
139. Faust M.A. Morphology of ciguatera-causing *Prorocentrum lima* (Pyrrophyta) from widely differing sites // Journal of Phycology. 1991. Vol. 27. P. 642–648.
140. Felsenstein J. Inferring phylogenies. Sunderland: Sinauer Associates. 2004. 664 p.
141. Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T., Falkowski P. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components // Science. 1998. Vol. 281, № 5374. P. 237–240.
142. Findly R.C., Gall J.G. Free ribosomal RNA genes in *Paramecium* are tandemly repeated // PNAS USA. 1978. Vol. 75. P. 3312–3316.
143. Force A., Lynch M., Pickett F.B., Amores A., Yan Y.L., Postlethwait J. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations // Genetics. 1999. V. 151, № 4. P. 1531–1545.
144. Fox G.E., Wisotzkey J.D., Jurtshuk P. How close is close - 16S ribosomal-RNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity // International Journal of Systematic Bacteriology. 1992. Vol. 42, № 1. P. 166–170.
145. Fryxell G.A. Introduction. Survival strategies of the algae. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 1983. P. 1–22.
146. Furlan M., Antonioli M., Zingone A., Sardo A., Blason C., Pallavicini A., Umani S.F. Molecular identification of *Ostreopsis* cf. *ovata* in filter feeders and putative predators // Harmful Algae. 2013. Vol. 21. P. 20–29.
147. Gadagkar S.R., Rosenberg M.S., Kumar S. Inferring species phylogenies from multiple genes: Concatenated sequence tree versus consensus gene tree // Journal of Experimental Zoology B (Molecular and Developmental Evolution). 2005. Vol. 304B. P. 64–74.

148. *Gahan P.B., Anker P., Stroun M.* Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008. Vol. 1137. P. 7–17.

149. *Galeazzi M., Morozzi G., Piccini M., Chen J., Bellisai F., Fineschi S., Marcolongo R.* Dosage and characterization of circulating DNA: present usage and possible applications in systemic autoimmune disorders // *Autoimmunity reviews*. 2003. Vol. 2, № 1. P. 50–55.

150. *Gallardo M.H., Ojeda R.A., Gonzalez C.A., Rtos C.A.* The Octodontidae revisited. In: *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson* (D.A. Kelt, E.P. Lessa, J. Salazar-Bravo, and J.L. Patton, eds.) // *University of California Publications in Zoology*. 2007. Vol. 134. P. 695–719.

151. *Gao T.X., Ji D.P., Xiao Y.S.* Description and DNA Barcoding of a New *Sillago* Species, *Sillago sinica* (Perciformes: Sillaginidae), from Coastal Waters of China // *Zoological Studies*. 2011. Vol. 50, № 2. P. 254–263.

152. *Geitler L.* Cyanophyceae // *Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. 1932. Vol. 14. 1196 p. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig. Reprinted 1971. [New York: Johnson Reprint Co].

153. *Giribet G., Carranza S., Baguñà J., Riutort M., Ribera C.* First molecular evidence for the existence of a Tardigrada + Arthropoda clade // *Molecular Biology and Evolution*. 1996. Vol. 13. P. 76–84.

154. *Giribet G., Rambla M., Carranza S., Baguñà J., Riutort M., Ribera C.* Phylogeny of the arachnid order Opiliones (Arthropoda) inferred from a combined approach of complete 18S and partial 28S ribosomal DNA sequences and morphology // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1999. Vol. 11. P. 296–307.

155. *Giribet G., Ribera C.* A review of arthropod phylogeny: New data based on ribosomal DNA sequences and direct character optimization // *Cladistics*. 2000. Vol. 16. P. 204–231.

156. *Glibert P., Burkholder J., Kana T.* Recent insights about relationships between nutrient availability, forms, and stoichiometry, and the distribution,

ecophysiology, and food web effects of pelagic and benthic *Prorocentrum* species // Harmful Algae. 2012. Vol. 14. P. 231–259.

157. *Gómez F.* Problematic biases in the availability of molecular markers in protists: the example of the Dinoflagellates // Acta Protozoologica. 2012. Vol. 52. P. 21–33.

158. *Gomont M.* Monographie des Oscillariées // Annales des Sciences Naturelles; Botanique. 1892. Paris. Vol. 15. P. 263–368.

159. *Gong J., Dong J., Liu X., Massana R.* Extremely High Copy Numbers and Polymorphisms of the rDNA Operon Estimated from Single Cell Analysis of Oligotrich and Peritrich Ciliates // Protist. 2013. Vol. 164, № 3. P. 369–379.

160. *Gonzalez I.L., Sylvester J.E., Smith T.F., Stambolian D., Schmickel R.D.* Ribosomal RNA gene sequences and hominoid phylogeny // Molecular Biology and Evolution. 1990. Vol. 7. P. 203–219.

161. *Gornik S.G., Ford K.L., Mulhern T.D., Bacic A., McFadden G.I., Waller R.F.* Loss of nucleosomal DNA condensation coincides with appearance of a novel nuclear protein in dinoflagellates // Current Biology. 2012. Vol. 22. P. 2303–2312.

162. *Gottschling M., Keupp H., Plotner J., Knop R., Willems H., Kirsch M.* Phylogeny of calcareous dinoflagellates as inferred from ITS and ribosomal sequence data // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2005. Vol. 36. P. 444–455.

163. *Gottschling M., Soehner S.* An updated list of generic names in the Thoracosphaeraceae // Microorganisms. 2013. Vol. 1, № 1. P. 122–136.

164. *Gouy M., Guindon S., Gascuel O.* SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building // Molecular Biology and Evolution. 2004. Vol. 27, № 2. P. 221–224.

165. *Gribble K.E., Anderson D.M.* High intraindividual, intraspecific, and interspecific variability in large-subunit ribosomal DNA in the heterotrophic dinoflagellates *Protoperidinium*, *Diplopsalis*, and *Preperidinium* (Dinophyceae) // Phycologia. 2007. Vol. 46, № 3. P. 315–324.

166. *Guerrini F., Pezolesi L., Feller A., Riccardi M., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Tartaglione L., Iacovo D.E., Fattorusso E., Forino M., Pistocchi R.*

Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas // *Toxicon*. 2010. Vol. 55. P. 211–220.

167. *Gugger M., Lyra C., Henriksen P., Coute A., Humbert J.F., Sivonen K.* Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002. Vol. 52, № 5. P. 1867–1880.

168. *Gugger M., Molica R., Leberre B., Dufour P., Bernard C., Humbert J.F.* Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents // *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. Vol. 71, № 2. P. 1097–1100.

169. *Guillou L., Nézan E., Cueff V., Erard-Le Denn E., Cambon-Bonavita M.A., Gentien P., Barbier G.* Genetic diversity and molecular detection of three toxic dinoflagellate genera (*Alexandrium*, *Dinophysis*, and *Karenia*) from French coasts // *Protist*. 2002. Vol. 153. P. 223–238.

170. *Haande S., Rohrlack T., Ballot A., Røberg K., Skulberg R., Beck M., Wiedner C.* Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe // *Harmful Algae*. 2008. Vol. 7, № 5. P. 692–701.

171. *Hackett J.D., Anderson D.M., Erdner D.L., Bhattacharya D.* Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment // *American Journal of Botany*. 2004a. Vol. 91, № 10. P. 1523–1534.

172. *Hackett J.D., Yoon H.S., Soares M.B., Bonaldo M.F., Casavant T., Scheetz T.E., Nosenko T., Bhattacharya D.* Migration of the plastid genome to the nucleus in a peridinin dinoflagellate // *Current Biology*. 2004b. Vol. 14, № 3. P. 213–218.

173. *Hackett J.D., Scheetz T.E., Yoon H.S., Soares M.B., Bonaldo M.F., Casavant T.L., Bhattacharya D.* Insights into a dinoflagellate genome through expressed sequence tag analysis // *BMC Genomics*. 2005. Vol. 6. P. 80.

174. *Hallegraeff G.M.* Harmful Algae and their Toxins: Progress, Paradoxes and Paradigms Shifts // *Toxins and Biologically Active Compounds from Microalgae*. Vol. 1. CRC Press. 2014. P. 3-20.

175. Hallett M.T., Lagergren J. Efficient algorithms for lateral gene transfer problems // Proc. 5th Annu. Int'l Conf. Comput. Mol. Biol. (RECOMB01). New York: ACM Press. 2001. P. 149–156.
176. Handy S.M., Bachvaroff T.R., Timme R.E., Wayne Coats D., Kim S., Delwiche C.F. Phylogeny of four dinophysiacean genera (Dinophyceae, Dinophysiales) based on rDNA sequences from single cells and environmental samples // Journal of Phycology. 2009. Vol. 45. P. 1163–1174.
177. Hariganeya N., Tanimoto Y., Yamaguchi H., Nishimura T., Tawong W., Sakanari H., Yoshimatsu T., Sato S., Preston C.M., Adachi M. Quantitative PCR method for enumeration of cells of cryptic species of the toxic marine dinoflagellate *Ostreopsis* spp. in Coastal Waters of Japan // PLoS ONE. 2013. Vol. 8, № 3. e57627.
178. HARRNESS 2005. Harmful Algal Research and Response: A National Environmental Science Strategy 2005–2015 // Ramsdell, J.S., D.M. Anderson and P.M. Glibert (Eds.). Washington DC: Ecological Society of America. 2005. 96 p.
179. Hart M.C., Green D.H., Bresnan E., Bolch C.J. Large subunit ribosomal RNA gene variation and sequence heterogeneity of *Dinophysis* (Dinophyceae) species from Scottish coastal waters // Harmful Algae. 2007. Vol. 6. P. 271–287.
180. Head M.J. Modern dinoflagellate cysts and their biological affinities. Palynology: principles and applications // American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation. 1996. Vol. 3. P. 1197–1248.
181. Hedges S.B. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies // Molecular Biology and Evolution. 1992. V. 9. P. 366–369.
182. Henson B.J., Hesselbrock S.M., Watson L.E., Barnum S.R. Molecular phylogeny of the heterocystous cyanobacteria (subsections iv and v) based on *nifd* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2004. Vol. 54, № 2. P. 493–497.
183. Henson B.J., Watson L.E., Barnum S.R.O.V. Molecular differentiation of the heterocystous cyanobacteria, *Nostoc* and *Anabaena*, based on complete *nifD* sequences // Current Microbiology. 2002. Vol. 45, № 3. P. 161–164.

184. *Honda D., Yokota A., Sugiyama J.* Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains // *Journal of Molecular Evolution*. 1999. Vol. 48, № 6. P. 723–739.
185. *Hong D.D., Hien H.T., Thu N.H., Anh H.L., Luyen Q.H.* Phylogenetic analyses of *Prorocentrum* spp. and *Alexandrium* spp. isolated from northern coast of Vietnam based on 18S rDNA sequences // *Journal of Environmental Biology*. 2008. Vol. 29, № 4. P. 535–542.
186. *Hoppenrath M., Chomérat N., Horiguchi T., Schweikert M., Nagahama Y., Murray S.* Taxonomy and phylogeny of the benthic *Prorocentrum* species (Dinophyceae). A proposal and review // *Harmful algae*. 2013. Vol. 27. P. 1–28.
187. *Humbert J.F., Quiblier C., Gugger M.* Molecular approaches for monitoring potentially toxic marine and freshwater phytoplankton species // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010. Vol. 397. P. 1723–1732.
188. *Huson D.H., Bryant D.* Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies // *Molecular Biology and Evolution*. 2006. Vol. 23, №2. P. 254–267.
189. *Iteman I., Rippka R., Demarsac N.T., Herdman M.* Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria // *Microbiology-SGM*. 2000. Vol. 146, № 6. P. 1275–1286.
190. *Inagaki Y., Dacks J.B., Doolittle W.F., Watanabe K.I., Ohama T.* Evolutionary relationship between dinoflagellates bearing obligate diatom endosymbionts: insight into tertiary endosymbiosis // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000. V. 50. P. 2075–2081.
191. *Ishikawa A.* Population dynamics of *Scrippsiella* spp. and other cyst-forming armored dinoflagellates with special reference to the role of cysts ... PhD thesis. Tohoku University, Sendai. 1995. 184 p.

192. Jackson C.J., Norman J.E., Schnare M.N., Gray M.W., Keeling P.J., Waller R.F. Broad genomic and transcriptional analysis reveals a highly derived genome in dinoflagellate mitochondria // BMC Biology. 2007. Vol. 5, № 1. P. 41.
193. Janson S., Bergman B., Carpenter E.J., Giovannoni S.J., Vergin K. Genetic analysis of natural populations of the marine diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium* // FEMS Microbiology Ecology. 1999. Vol. 30, № 1. P. 57–65.
194. Jaeckisch N., Yang I., Wohlrab S., Glöckner G., Kroymann J., Vogel H., Cembella A., John U. Comparative genomic and transcriptomic characterization of the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* // PLoS ONE. 2011. Vol. 6. e28012.
195. John U., Litaker R.W., Montresor M., Murray S., Brosnahan M.L., Anderson D.M. Formal revision of the *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae) taxonomy: the introduction of five species with emphasis on molecular-based (rDNA) classification // Protist. 2014. Vol. 165, № 6. P. 779–804.
196. John U., Medlin L.K., Groben R. Development of specific rRNA probes to distinguish between geographic clades of the *Alexandrium tamarense* species complex // Journal of Plankton Research. 2005. Vol. 27. P. 199–204.
197. Jørgensen B.B., Revsbech N.P., Cohen Y. Photosynthesis and structure of benthic microbial mats: microelectrode and SEM studies of four cyanobacterial communities // Limnology and Oceanography. 1983. Vol. 28. P. 1075–1093.
198. Kallas T., Coursin T., Rippka R. Different organization of *nif* genes in non-heterocystous and heterocystous cyanobacteria // Plant Molecular Biology. 1985. Vol. 5, № 5. P. 321–329.
199. Kamikawa R., Nishimura H., Sako Y. Analysis of the mitochondrial genome, transcripts, and electron transport activity in the dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Gonyaulacales, Dinophyceae) // Phycological Research. 2009. Vol. 57. P. 1–11.
200. Kang N.S., Jeong H.J., Lee S.Y., Lim A.S., Lee M.J., Kim H.S., Yih W. Morphology and molecular characterization of the epiphytic benthic dinoflagellate

Ostreopsis cf. *ovata* in the temperate waters off Jeju Island, Korea // Harmful Algae. 2013. Vol. 27. P. 98–112.

201. Kato T., Watanabe M.F., Watanabe M. Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic inference // Archiv für Hydrobiologie // Algological Studies. 1991. Vol. 92. P. 129–140.

202. Kawachi M., Inouye I., Maeda O., Chihara M. The haptonema as a food-capturing device: observations on *Chrysochromulina hirta* (Prymnesiophyceae) // Phycologia. 1991. Vol. 30. P. 563–573.

203. Kays R., Curtis A., Kirchman J.J. Rapid evolution of northeastern coyotes via hybridization with wolves // Biology Letters. 2010. Vol. 6. P. 89–93.

204. Keith P. A system of physiological botany. Vol. 2. London: Baldwin, Cradock, and Joy; W. Blackwood. 1816. 526 p. [Оцифрованный оригинал Оксфордского университета].

205. Khozin-Goldberg I., Cohen Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus* // Phytochemistry. 2006. Vol. 67. P. 696–701.

206. Kim Y.O., Han M.S. Seasonal relationships between cyst germination and vegetative population of *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) // Marine Ecology Progress Series. 2000. Vol. 204. P. 111–118.

207. Ki J.-S., Jang G.Y., Han M.S. Integrated Method for Single-Cell DNA Extraction, PCR Amplification, and Sequencing of Ribosomal DNA from Harmful Dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoides* and *Alexandrium catenella* // Marine Biotechnology. 2005. Vol. 6. P. 587–593.

208. Ki J.-S., Han M.S. Rapid molecular identification of the harmful freshwater dinoflagellate *Peridinium* in various life stages using genus-specific single-cell PCR // Journal of Applied Phycology. 2007. Vol. 19. P. 467–470.

209. Klappenbach J.A., Dunbar J.M., Schmidt T.M. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria // Applied and environmental microbiology. 2000. Vol. 66, № 4. P. 1328–1333.

210. *Klappenbach J.A., Saxman P.R., Cole J.R., Schmidt T.M.* rrndb: The ribosomal RNA operon copy number database // *Nucleic Acids Research*. 2001. Vol. 29, № 1. P. 181–184.
211. *Komárek J., Anagnostidis K.* Cyanoprokaryota 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales // *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/2. Elsevier/Spektrum, Heidelberg. 2005. 759 p.
212. *Komárek J., Anagnostidis K.* Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2: Chroococcales - *Archiv für Hydrobiologie // Algological Studies*. 1986. Vol. 43. P. 157–226.
213. *Komárek J., Anagnostidis K.* Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4: Nostocales // *Archiv für Hydrobiologie / Algological Studies*. 1989. Vol. 56. P. 247–345.
214. *Komárek J., Anagnostidis K.* Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales // *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/1. Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 1998. 548 p.
215. *Komárek J., Čáslavská J.* Thylakoid patterns in oscillatorialean cyanophytes // *Algological Studies*. 1991. Vol. 64. P. 267–270.
216. *Koonin E.V., Wolf Y.I.* Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world // *Nucleic Acids Research*. 2008. Vol. 36. P. 6688–6719.
217. *Krienitz L., Ballot A., Kotut K., Wiegand C., Pütz S., Metcalf J.S., Codd G.A., Stephan P.* Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya // *FEMS Microbiology Ecology*. 2003. Vol. 43. P. 141–148.
218. *Kuo B.A., Gonzalez I.L., Gillespie D.A., Sylvester J.E.* Human ribosomal RNA variants from a single individual and their expression in different tissues // *Nucleic Acids Research*. 1996. Vol. 24. P. 4817–4824.
219. *Laatsch T., Zauner S., Stoebe-Maier B., Kowallik K.V., Maier U.G.* Plastid-derived single gene minicircles of the dinoflagellate *Ceratium horridum* are localized in the nucleus // *Molecular Biology and Evolution*. 2004. Vol. 21, № 7. P. 1318–1322.

220. *Lakeman M.B., von Dassow P.V., Cattolico R.A.* The strain concept in phytoplankton ecology // *Harmful Algae*. 2009. V. 8, № 5. P. 746–758.
221. *Lancelot C., Keller M.D., Rousseau V., Smith W.O.* Autecology of the marine haptophyte *Phaeocystis* sp. // *Physiological ecology of harmful algal blooms*, NATO-ASI series 41. Berlin: Springer. 1998. P. 209–224.
222. *Lara A., Leon J.L.P.D., Rodriguez R.* DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts // *Molecular Ecology Resources*. 2010. Vol. 10. P. 421–430.
223. *Laza-Martinez A., Orive E., Miguel I.* Morphological and genetic characterization of benthic dinoflagellates of the genera *Coolia*, *Ostreopsis* and *Prorocentrum* from the south-eastern Bay of Biscay // *European journal of phycology*. 2011. Vol. 46. P. 45–65.
224. *Lelong A., Hegaret H., Soudant P., Bates S.* *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms // *Phycologia*. 2012. V. 51, № 2. P. 168–216.
225. *Li W.H.* *Molecular Evolution*. Sunderland: Sinauer Associates. 1997. 487 p.
226. *Lin S., Zhang H., Hou Y., Miranda L., Bhattacharya D.* Development of a dinoflagellate-oriented PCR primer set leads to detection of picoplanktonic dinoflagellates from Long Island Sound // *Applied Environmental Microbiology*. 2006. Vol. 72, № 8. P. 5626–5630.
227. *Lin S., Zhang H., Hou Y., Zhuang Y., Miranda L.* High-level diversity of dinoflagellates in the natural environment, revealed by assessment of mitochondrial *cox1* and *cob* genes for dinoflagellate DNA barcoding // *Applied Environmental Microbiology*. 2009. Vol. 75, № 5. P. 1279–1290.
228. *Litaker R.W., Vanderseam W., Reece K.S., Stokesn A., Yonish B.A., Kibler S.R., Black M.N.D., Steidinger K.A., Lutzoni F.M., Tester P.A.* Recognizing dinoflagellate species using ITS rDNA sequences // *Journal of Phycology*. 2007. Vol. 43. P. 344–355.

229. *Loi T.* Molecular diversity of the predominant clade C zooxanthellae from scleractinian corals of the Great Barrier Reef: Honour's thesis... Department of Microbiology, Univ. of Sydney, Sydney. 1998.

230. *Lokmer A.* Polyphasic approach to the taxonomy of the selected oscillatorian strains (Cyanobacteria): Thesis... University of South Bohemia, Ceske Budejovice. 2007, 61 p.

231. *López-García P., Rodríguez-Valera F., Pedrós-Alió C., Moreira D.* Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton // *Nature*. 2001. Vol. 409. P. 603–607.

232. *Lowe C.D., Montagnes D.J.S., Martin L.E., Watts P.C.* Patterns of genetic diversity in the marine heterotrophic flagellate *Oxyrrhis marina* (Alveolata: Dinophyceae) // *Protist*. 2010. Vol. 161. P. 212–221.

233. *Lundgren P., Janson S., Jonasson S., Singer A., Bergman B.* Unveiling of novel radiations within *Trichodesmium* cluster by *hetR* gene sequence analysis // *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. Vol. 71, № 1. P. 190–196.

234. *Lynch M., Force A.* The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization // *Genetics*. 2000. Vol. 154, № 1. P. 459–473.

235. *Lynn D.H., Pinheiro M.A.* Survey of polymerase chain reaction (PCR) amplification studies of unicellular protists using single-cell PCR // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2009. Vol. 56, № 5. P. 406–412.

236. *Lyra C., Hantula J., Vainio E., Rapala J., Rouhiainen L., Sivonen K.* Characterization of cyanobacteria by SDS-PAGE of whole-cell proteins and PCR/RFLP of the 16S rRNA gene // *Archives of Microbiology*. 1997. Vol. 168, № 3. P. 176–184.

237. *Lyra C., Laamanen M., Lehtimäki J.M., Surakka A., Sivonen K.* Benthic cyanobacteria of the genus *Nodularia* are non-toxic, without gas vacuoles, able to glide and genetically more diverse than planktonic *Nodularia* Source // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005. Vol. 55, № 2. P. 555–568.

238. *Majaneva M.* Linking taxonomy and environmental 18S-rRNA-gene sequencing of Baltic Sea protists Walter and Andree de Andree de Nottbeck Foundation Scientific Reports, 2013. 40 p.

239. Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C.P. Environmental microbiology. 2nd edition. London: Academic press. 2009. Vol. 397. 598 p.

240. Manen J.F., Falquet J. The *cpcB-cpcA* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 52, № 3. P. 861–867.

241. Mangialajo L., Ganzin N., Accoroni S., Asnaghi V., Blanfuné A., Cabrini M., Cattaneo-Vietti R., Chavanon F., Chiantore M., Cohu S., Costad E., Fornasarof D., Grosselb H., Marco-Mirallesb F., Masóg M., Reñég A., Rossid A.M., Salag M.M., Thibauta T., Tottic C., Vilag M., Lemée R. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts // Toxicon. 2011. Vol. 57, № 3. P. 408–420.

242. Manning S.R., La Claire J.W. Multiplex PCR methods for the species-specific detection and quantification of *Prymnesium parvum* (Haptophyta) // Journal of Applied Phycology. 2010. № 22. P. 587–597.

243. Mansour M.P., Volkman J.K., Blackburn S.I. The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. in batch culture // Phytochemistry. 2003. Vol. 63. P. 145–153.

244. Marín I., Aguilera A., Reguera B., Abad J.P. A method for preparation of DNA suitable for molecular biology applications from single cells of dinoflagellates // Biotechniques. 2001. Vol. 30. P. 88–93.

245. Margulis L. Symbiosis in Cell Evolution. San Francisco: W. H. Freeman and Company. 1981. 419 p.

246. Marquardt J., Palinska K.A. Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites // Archives of Microbiology. 2007. Vol. 187, № 5. P. 397–413.

247. Martin K.A., Siefert J.L., Yerrapragada S., Lu Y., McNeill T.Z., Moreno P.A., Weinstock G.M., Widger W.R., Fox G.E. Cyanobacterial signature genes // Photosynthesis Research. 2003. Vol. 75, № 3. P. 211–221.

248. *Martins C.A., Kulis D., Franca S., Anderson D.M.* The loss of PSP toxin production in a formerly toxic *Alexandrium lusitanicum* clone // *Toxicon*. 2004. Vol. 43. P. 195–205.
249. *Mazel D., Houmard J., Castets A.M., Tandeau de Marsac N.* Highly repetitive DNA sequences in cyanobacterial genomes // *Journal of Bacteriology*. 1990. Vol. 172. P. 2755–2761.
250. *McGregor G.B., Rasmussen J.P.* Cyanobacterial composition of microbial mats from an Australian thermal spring: a polyphasic evaluation // *FEMS Microbiology Ecology*. 2008. Vol. 63, № 1. P. 23–35.
251. *Medlin L.K., Kooistra W.H.C.F.* Methods to Estimate the Diversity in the Marine Photosynthetic Protist Community with Illustrations from Case Studies: A Review // *Diversity*. 2010. № 2. P. 973–1014.
252. *Mentewab A.B., Jacobsen M.J., Flowers R.A.* Incomplete homogenization of 18S ribosomal DNA coding regions in *Arabidopsis thaliana* // *BMC Research Notes*. 2011. Vol. 4, № 93. P. 1–7.
253. *Miller P.E., Scholin C.A.* Identification of cultured *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) using species-specific *LSU* rRNA-targeted fluorescent probes // *Journal of Phycology*. 1999. Vol. 32. P. 646–655.
254. *Mira A., Ochman H., Moran N.A.* Deletional bias and the evolution of bacterial genomes // *Trends in Genetics*. 2001. Vol. 17. P. 589–596.
255. *Miranda L.N., Zhuang Y., Zhang H., Lin S.* Phylogenetic analysis guided by intragenomic *SSU* rDNA polymorphism refines classification of “*Alexandrium tamarense*” species complex // *Harmful Algae*. 2012. № 16. P. 35–48.
256. *Moestrup Ø., Larsen J.* Potentially toxic phytoplankton. 1. Haptophyceae (Prymnesiophyceae) // *ICES Identification leaflets for plankton*. International Council for the exploration of the sea. Copenhagen. 1992. P. 1–11.
257. *Moret B.M.E., Nakhleh L., Warnow T., Linder C., Tholse A., Padolina A., Sun J., Timme R.* Phylogenetic networks: modeling, reconstructibility, and accuracy // *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*. 2004. Vol. 1, № 1. P. 13–23.

258. Morozova T.V., Orlova T.Yu., Efimova K.V., Lazaryuk A.Yu., Burov B.A. *Scrippsiella trochoidea* cysts, dominant type in recent sediments from Amur Bay, Sea of Japan // *Botanica Marina*. 2016 (*in press*).

259. Morquecho L., Lechuga-Devéze C.H. Dinoflagellate cysts in recent sediments from Bahía Concepción, Gulf of California // *Botanica Marina*. 2003. Vol. 46. P. 132–141.

260. Monti M., Minocci M., Beran A., Ivesa L. First record of *Ostreopsis* cf. *ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea // *Marine Pollution Bulletin*. 2007. Vol. 54, № 5. P. 598–601.

261. Moldowan J.M., Dahl J., Jacobson S.R., Huizinga B.J., Fago F.J., Shetty R., Watt D.S., Peters K.E. Chemostratigraphic reconstruction of biofacies: Molecular evidence linking cyst-forming dinoflagellates with pre-Triassic ancestors // *Geology*. 1996. Vol. 24. P. 159–162.

262. Montero-Pau J., Gómez A., Muñoz J. Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs // *Limnology and Oceanography. Methods*. 2008. Vol. 6. P. 218–222.

263. Montresor M., Sgrosso S., Procaccini G., Kooistra W. Intraspecific diversity in *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae): evidence for cryptic species // *Phycologia*. 2003. Vol. 42. P. 56–70.

264. Montresor M., Lewis J. Phases, stages and shifts in the life cycles of marine phytoplankton // *Algal Cultures, Analogues of Blooms and Applications* / Ed. D.V. Subba Rao. USA: Science Publishers Enfield. 2005. P. 91–129.

265. Montresor M., Montesarchio E., Marino D., Zingone A. Calcareous dinoflagellate cysts in marine sediments of the Gulf of Naples (Mediterranean Sea) // *Review of Palaeobotany and Palynology*. 1994. Vol. 84. P. 45–56.

266. Morse D., Salois P., Markovic P., Hastings J.W. A nuclear-encoded form II *RuBisCO* in dinoflagellates // *Science*. 1995. Vol. 268. P. 1622–1624.

267. Muir G., Fleming C.C., Schlotterer C. Three divergent rDNA clusters predate the species divergence in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. // *Molecular Biology and Evolution*. 2001. Vol. 18, № 2. P. 112–119.

268. Murray S., Flø Jørgensen M., Ho S.Y.W., Patterson D.J., Jermin L.S. Improving the analysis of dinoflagellate phylogeny based on rDNA // *Protist*. 2005. Vol. 156. P. 269–286.

269. Murray S., Ip C.L.C., Moore R., Nagahama Y., Fukuyo Y. Are prorocentroid dinoflagellates monophyletic? A study of 25 species based on nuclear and mitochondrial genes // *Protist*. 2009. Vol. 160. P. 245–264.

270. Nagahama Y., Murray S., Tomaru A., Fukuyo Y. Species boundaries in the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Dinophyceae, Prorocentrales), based on morphological and phylogenetic characters // *Journal of Phycology*. 2011. Vol. 47. P. 178–189.

271. Nagai S., Hida K., Urushizaki S., Onitsukac G., Yasuieka M., Nakamura Y., Fujiwaraa A., Tajimid S., Kimotoe K., Kobayashia T., Gojoborif T., Ototakea M. Influences of diurnal sampling bias on fixed-point monitoring of plankton biodiversity determined using a massively parallel sequencing-based technique // *Gene*. 2016. Vol. 576, № 2. P. 667–675.

272. Nash E.A., Barbrook A.C., Edwards-Stuart R.K., Bernhardt K., Howe C.J., Nisbet R.E.R. Organization of the mitochondrial genome in the dinoflagellate *Amphidinium carterae* // *Molecular Biology and Evolution*. 2007. Vol. 24, № 7. P. 1528–1536.

273. Nehring S. *Scrippsiella* spp. resting cysts from the German Bight (North Sea): a tool for more complete check-lists of dinoflagellates // *Netherlands Journal of Sea Research*. 1994. Vol. 33, № 1. P. 57–63.

274. Nelissen B., Wilmotte A., Neefs J.M., Dewachter R. Phylogenetic relationships among filamentous helical Cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosomal-RNA gene sequence-analysis // *Systematic and Applied Microbiology*. 1994. Vol. 17, № 2. P. 206–210.

275. Nijman V., Aliabadian M. Performance of distance-based DNA barcoding in the molecular identification of Primates // *Comptes Rendus Biologies*. 2010. Vol. 333. P. 11–16.

276. Nishihara H., Miwa H., Watanabe M., Nagashima M., Yagi O., Takamura Y. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses for discriminating genotypes of *Microcystis cyanobacteria* // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1997. Vol. 61. P. 1067–1072.

277. Norman J.E., Gray M.W. A complex organization of the gene encoding cytochrome oxidase subunit 1 in the mitochondrial genome of the dinoflagellate, *Cryptothecodinium cohnii*: homologous recombination generates two different *cox1* open reading frames // *Journal of Molecular Evolution*. 2001. Vol. 53. P. 351–363.

278. Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. № 63. P. 3327–3332.

279. Ohno S. *Evolution by Gene Duplication*. Heidelberg: Springer-Verlag. 1970. 167 p.

280. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28. P. 1166–1167.

281. Olive D.M., Bean P. Principles and application of methods for DNA-based typing of microbial organisms // *Journal of Clinical Microbiology*. 1999. Vol. 37. P. 1661–1669.

282. Onda D.F.L., Benico G., Sulit A.F., Gaite P.L., Azanza R.V., Lluisma A.O. Morphological and molecular characterization of some HAB-forming dinoflagellates from Philippine waters // *Philippine Science Letters*. 2013. Vol. 6, № 1. P. 1–10.

283. Orlova T.Yu., Morozova T.V., Gribble K.E., Kulis D.M., Anderson D.M. Dinoflagellate cysts in recent marine sediments from the east coast of Russia // *Botanica Marina*. 2004. Vol. 47, № 3. P. 184–201.

284. Palinska K.A., Liesack W., Rhiel E., Krumbein W.E. Phenotype variability of identical genotypes: The need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on *Merismopedia*-like isolates // *Archives of Microbiology*. 1996. Vol. 166, № 4. P. 224–233.

285. Palmer J.D., Delwiche C.F. Second-hand chloroplasts and the case of the disappearing nucleus // PNAS USA. 1996. Vol. 93. P. 7432–7435.

286. Palys T., Berger E., Mitrica I., Nakamura L.K., Cohan F.M. Protein-coding genes as molecular markers for ecologically distinct populations: the case of two *Bacillus* species // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2000. Vol. 50, № 3. P. 1021–1028.

287. Palys T., Nakamura L.K., Cohan F.M. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data // International Journal of Systematic Bacteriology. 1997. Vol. 47, № 4. P. 1145–1156.

288. Papke R.T., Ramsing N.B., Bateson M.M., Ward D.M. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria // Environmental Microbiology. 2003. Vol. 5, № 8. P. 650–659.

289. Pascher A. Chrysomonaden aus dem Hirschberger Grossteiche // Monographien und Abhandlungen zur Internationale Revue a' er gesamten Hydrobiologie und Hydrographie. 1910. Vol. 1. P. 1–66.

290. Patterson G.W., Tsitsa-Tzardis E., Wikfors G.H., Ghosh P., Smith B.C., Gladu P.K. Sterols of Eustigmatophytes // Lipids. 1994. Vol. 29. P. 661–664.

291. Payne M. Taxonomic resolution of *Leptolyngbya* utilizing the 16S rRNA gene sequences: Master's Thesis... John Carroll University, University Heights, OH. – 2001.

292. Peeler T.C., Stephenson M.B., Einsphar K.J., Thompson G.A. Lipid characterization of enriched plasma membrane fraction of *Dunaliella salina* grown in media of varying salinity // Plant Physiology. 1989. Vol. 89. P. 970–976.

293. Penna A., Battocchi C., Capellacci S., Fraga S., Aligizaki K., Lemée R., Vernesi C. Mitochondrial, but not rDNA, genes fail to discriminate dinoflagellate species in the genus *Ostreopsis* // Harmful Algae. 2014. Vol. 40. P. 40–50.

294. Penna A., Bertozzini E., Battocchi C., Galluzzi L., Giacobbe M.G., Vila M., Garces E., Lugliè A., Magnani M. Monitoring of HAB species in the Mediterranean Sea through molecular methods // Journal of Plankton Research. 2007. Vol. 29, № 1. P. 19–38.

295. Penna A., Fraga S., Battocchi C., Casabianca S., Perini F., Capellacci S., Casabianca A., Riobó P., Giacobbe M.G., Totti C., Accoroni S., Vila M., Reñé A., Scardi M., Aligizaki K., Nguyen-Ngoc L., Vernesi C. Genetic diversity of the genus *Ostreopsis* Schmidt: phylogeographical considerations and molecular methodology applications for field detection in the Mediterranean Sea // *Cryptogamie Algologie*. 2012. Vol. 33. P. 153–163.

296. Penna A., Galluzzi L. The quantitative real-time PCR applications in the monitoring of marine harmful algal bloom (HAB) species // *Environmental Science and Pollution Research*. 2013. Vol. 20, № 10. P. 6851–6862.

297. Penna A., Vila M., Fraga S., Giacobbe M.G., Andreoni F., Riobó P., Vernesi C. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences // *Journal of Phycology*. 2005. Vol. 41. P. 212–225.

298. Perini F., Casabianca A., Battocchi C., Accoroni S., Totti C., Penna A. New approach using the Real-Time PCR method for estimation of the toxic marine dinoflagellate // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, № 3. e17699.

299. Petrosino J.F., Highlander S., Luna R.A., Gibbs R.A., Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification // *Clinical chemistry*. 2009. Vol. 55, № 5. P. 856–866.

300. Pezzolesi L., Guerrini F., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Dello Iacovo E., Fattorusso E., Forino M., Tartaglione L., Pistocchi R. Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis* cf. *ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays // *Water research*. 2012. Vol. 46. P. 82–92.

301. Pfister L.A., Anderson D.M. Dinoflagellate reproduction. // *The biology of dinoflagellates*. Botanical monographs. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987. P. 611–648.

302. Pillet L., Fontaine D., Pawlowski J. Intra-genomic ribosomal RNA polymorphism and morphological variation in *Elphidium macellum* suggests inter-specific hybridization in Foraminifera // *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, № 2. e32373.

303. *Pin L.C., Teen L.P., Ahmad A., Usup G.* Genetic diversity of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) from Malaysia // *Marine Biotechnology*. 2001. Vol. 3. P. 246-255.
304. *Pisetsky D.S., Jiang N.* The generation of extracellular DNA in SLE: the role of death and sex // *Scandinavian Journal of Immunology*. 2006. Vol. 64. P. 200–204.
305. *Qiu D., Huang L., Liu S., Lin S.* Nuclear, mitochondrial and plastid gene phylogenies of *Dinophysis miles* (Dinophyceae): evidence of variable types of chloroplasts // *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6, № 12. e29398.
306. *Quijada A., Liston A., Robinson W., Alvarez-Buylla E.* The ribosomal ITS region as a marker to detect hybridization in pines // *Molecular Ecology*. 1997. Vol. 6. P. 995–996.
307. *Rae P.M.* 5-Hydroxymethyluracil in the DNA of a dinoflagellate // *PNAS*. 1973. Vol. 70, № 4. P. 1141–1145.
308. *Rajaniemi P., Hrouzek P., Kastovska K., Willame R., Rantala A., Hoffmann L., Komárek J., Sivonen K.* Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria) // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 55, P. 11–26.
309. *Raho N., Pizarro G., Escalera L., Reguera B., Marín I.* Morphology, toxin composition and molecular analysis of *Dinophysis ovum* Schutt, a dinoflagellate of the *Dinophysis acuminata* complex // *Harmful Algae*. 2008. Vol. 7. P. 839–848.
310. *Raho N., Rodríguez F., Reguera B., Marín I.* Are the mitochondrial *cox1* and *cob* genes suitable markers for species of *Dinophysis* Ehrenberg? // *Harmful Algae*. 2013. Vol. 28. P. 64–70.
311. *Rasmussen U., Svenning M.M.* Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences // *Applied and Environmental Microbiology*. 1998. Vol. 64. P. 265–272.
312. *Ravel-Chapuis P., Nicolas P., Nigon V., Neyret O., Freyssinet G.* Extrachromosomal circular nuclear rDNA in *Euglena gracilis* // *Nucleic Acids Research*. 1985. Vol. 13. P. 7529–7537.

313. *Reguera B., González-Gil S.* Small cell and intermediate cell formation in species of *Dinophysis* (Dinophyceae, Dinophysiales) // *Journal of Phycology*. 2001. Vol. 37. P. 318–333.
314. *Reguera B., Velo-Suárez L., Raine R., Park M.* Harmful *Dinophysis* species: A review // *Harmful Algae*. 2012. Vol. 14. P. 87–106.
315. *Reitan K.I., Rainuzzo J.R., Olsen Y.* Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae // *Journal of Phycology*. 1994. Vol. 30, № 6. P. 972–979.
316. *Rinta-Kanto J.M., Wilhelm S.W.* Diversity of microcystin-producing cyanobacteria in spatially isolated regions of Lake Erie // *Applied and Environmental Microbiology*. 2006. Vol. 72, № 7. P. 5083-5085.
317. *Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // *Journal of General Microbiology*. 1979. Vol. 111. P. 1–61.
318. *Rizzo P.J.* Those amazing dinoflagellate chromosomes // *Cell Research*. 2003. Vol. 13, № 4. P. 215–217.
319. *Robba L., Russell S.J., Barker G.L., Brodie J.* Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta) // *American Journal of Botany*. 2006. Vol. 93. P. 1101–1108.
320. *Robertson J.E., Robinson C., Turner D.R., Holligan P., Watson A.J., Boyd P., Fernandez E., Finch M.* The impact of a coccolithophore bloom on oceanic carbon uptake in the northeast Atlantic during summer 1991 // *Deep Sea Research, Part I*. 1994. Vol. 41. P. 297–314.
321. *Roessler P.G.* Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1988. Vol. 267. P. 521–528.
322. *Ronquist F., Huelsenbeck J.P.* MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics*. 2003. Vol. 19. P. 1572–1574.

323. *Rooney A.P.* Mechanisms underlying the evolution and maintenance of functionally heterogeneous 18S rRNA genes in Apicomplexans // *Molecular Biology and Evolution*. 2004. Vol. 21. P. 1704–1711.

324. *Rossello-Mora R., Amann R.* The species concept for prokaryotes // *FEMS Microbiology Reviews*. 2001. Vol. 25, № 1. P. 39–67.

325. *Rowan R., Whitney S.M., Fowler A., Yellowlees D.* Rubisco in marine symbiotic dinoflagellates: Form II enzymes in eukaryotic oxygenic phototrophs encoded by a nuclear multigene family // *Plant Cell*. 1996. Vol. 8. P. 539–553.

326. *Roy S., Morse D.* A full suite of histone and histone modifying genes are transcribed in the dinoflagellate *Lingulodinium* // *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7. e34340.

327. *Rudi K., Skulberg O.M., Jakobsen K.S.* Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains // *Journal of Bacteriology*. 1998. Vol. 180, № 13. P. 3453–3461.

328. *Sala-Rovira M., Geraud M.L., Caput D., Jacques F., Soyer-Gobillard M.O., Vernet G., Herzog M.* Molecular cloning and immunolocalization of two variants of the major basic nuclear protein (HCC) from the histone-less eukaryote *Cryptocodinium cohnii* (Pyrrophyta) // *Chromosoma*. 1994. № 100. P. 510–518.

329. *Sang T., Crawford D.J., Stuessy T.F.* Documentation of reticulate evolution in peonies (*Peonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA – Implications for biogeography and concerted evolution // *PNAS*. 1995. Vol. 92. P. 6813–6817.

330. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. // *PNAS*. 1977. Vol. 74, № 12. P. 5463–5467.

331. *Sato S., Nishimura T., Uehara K., Sakanari H., Tawong W., Hariganeya N., Smith K., Rhodes L., Yasumoto T., Taira Y., Suda S., Yamaguchi H., Adachi M.* Phylogeography of *Ostreopsis* along West Pacific coast, with special reference to a novel clade from Japan // *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6. e27983.

332. *Saunders G.W.* Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications // *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2005. Vol. 360. P. 1879–1888.

333. Scheldeman P., Baurain D., Bouhy R., Scott M., Mühling M., Whitton B.A., Belay A., Wilmotte A. *Arthrospira* ('*Spirulina*') strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer // FEMS Microbiology Letters. 1999. Vol. 172, № 2. P. 213–222.

334. Scholin C.A. Development of nucleic acid probe-based diagnostics for identifying and enumerating harmful algal bloom species // Nato Asi Series G Ecological Sciences. 1998. Vol. 41. P. 337–350.

335. Scholin C.A., Anderson D.M., Sogin M.L. Two distinct small-subunit ribosomal RNA genes in the North American toxic Dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) 1 // Journal of Phycology. 1993. Vol. 29, № 2. P. 209–216.

336. Scholin C.A., Herzog M., Sogin M., Anderson D.M. Identification of group-and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene1 // Journal of Phycology. 1994. Vol. 30, № 6. P. 999–1011.

337. Scholin C., Miller P., Buck K., Chavez F., Harris P., Haydock P., Howard J., Cangelosi G. Detection and quantification of *Pseudo-nitzschia australis* in cultured and natural populations using LSU rRNA-targeted probes // Limnology and oceanography. 1997. Vol. 42, № 5(2). P. 1265–1272.

338. Schlötterer C., Hauser M.T., von Haeseler A., Tautz D. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila* // Molecular biology and evolution. Vol. 11, № 3. P. 513–522.

339. Schlötterer C., Tautz D. Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution // Current Biology. Vol. 4, № 9. P. 777–783.

340. Schnepf E., Elbraechter M. Dinophyte plastids and phylogeny: a review // Grana. 1999. № 38. P. 81–97.

341. Scott J. Ultrastructure of cell division in the unicellular red alga *Flintiella sanguinaria* // Canadian Journal of Botany. 1986. Vol. 64, № 3. P. 516–524.

342. *Selina M.A., Orlova T.Yu.* First occurrence of the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae) in the Sea of Japan // *Botanica Marina*. 2010. Vol. 53. P. 243–249.
343. *Silva E.S.* Some observation on marine dinoflagellate cultures. III. *Gonyaulax spinifera* (Clap. and Lach) Dies., *Gonyaulax tamarensis* Leb., and *Peridinium trochoideum* (Stein) Lemm. *Notas Estud // Instituto Português do Mar e da Atmosfera*, Lisbon. 1962. Vol. 26. P. 1-24.
344. *Simon U.K., Weiß M.* Intragenomic variation of fungal ribosomal genes is higher than previously thought // *Molecular biology and evolution*. 2008. V. 25. P. 2251–2254.
345. *Sinclair D.A., Guarente L.* Extrachromosomal rDNA circles—a cause of aging in yeast // *Cell*. 1997. Vol. 91. P. 1033–1042.
346. *Singh G.* *Plant Systematics: An Intergrated Approach*. The 3rd Edition. CRC Press. 2010. 756 p.
347. *Slamovits C.H., Saldarriaga J.F., Larocque A., Keeling P.J.* The highly reduced and fragmented mitochondrial genome of the early-branching dinoflagellate *Oxyrrhis marina* shares characteristics with both apicomplexan and dinoflagellate mitochondrial genomes // *Journal of Molecular Biology*. 2007. Vol. 372. P. 356–368.
348. *Smayda T.J.* Harmful algal blooms? Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea // *Limnology and Oceanography*. 1997. Vol. 42, № 5. P. 1137.
349. *Song H., Buhay J.E., Whiting M.F., Crandall K.A.* Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified // *PNAS*. 2008. Vol. 105, № 36. P. 13486–13491.
350. *Stackebrandt E., Goebel B.M.* A place for DNA-DNA reassociation and 16S ribosomal-RNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology // *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1994. Vol. 44, № 4. P. 846–849.
351. *Stal L.J.* Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities // *New Phytologist*. 1995. Vol. 131. P. 1–32.

352. Stern R.F., Amorim A.L., Bresnan E. Diversity and plastid types in *Dinophysis acuminata* complex (Dinophyceae) in Scottish waters // Harmful Algae. 2014. Vol. 39. P. 223–231.
353. Stolz F.J. Structure of microbial mats and biofilms // Microbial Sediments. Berlin: Springer-Verlag. 2000. P. 1–8.
354. Stulp B.K., Stam W.T. Genotypic relationships between strains of *Anabaena* (Cyanophyceae) and their correlation with morphological affinities // British Phycological Journal. 1984. Vol. 19, № 3. P. 287–301.
355. Suárez-Villota E.Y., Vargas R.A., Marchant C.L. Distribution of repetitive DNAs and the hybrid origin of the red vizcacha rat (Octodontidae) // Genome. 2012. Vol. 55, № 2. P. 105–117.
356. Subba Rao D.V., Pan Y., Smith J.S. Allelopathy between *Rhizosolenia alata* (Brightwell) and the toxigenic *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseriis* (Hasle) // Harmful marine algal blooms. Paris: Lavoisier Publishing. 1995. P. 681–686.
357. Summons R.E., Jahnke L.L., Hope J.M., Logan G.A. 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis // Nature. 1999. Vol. 400, № 6744. P. 554–557.
358. Takishita K., Koike K., Maruyama T., Ogata T. Molecular evidence for plastid robbery (kleptoplastidy) in *Dinophysis*, a dinoflagellate causing diarrhetic shellfish poisoning // Protist. 2012. Vol. 153. P. 293–302.
359. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Molecular Biology and Evolution. 1993. Vol. 10. P. 512–526.
360. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Molecular Biology and Evolution. 2011. Vol. 28, № 10. P. 2731–2739.
361. Tanabe A.S., Nagai S., Hida K., Yasuike M., Fujiwara A., Nakamura Y., Takano Y., Katakura S. Comparative study of the validity of three regions of the 18S-

rRNA gene for massively parallel sequencing-based monitoring of the planktonic eukaryote community // *Molecular Ecology Resources*. 2016. Vol. 16. P. 402–414.

362. *Tanabe Y., Kasai F., Watanabe M.M.* Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* // *Microbiology*. 2007. Vol. 153. P. 3695–3703.

363. *Tang X., YU R., Zhang Q., Wang Y., Yan T., Zhou M.* Molecular phylogenetic analysis of dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea* isolated from the East Asian waters // *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 2010. Vol. 28, № 2. P. 323–328.

364. *Taton A., Grubisic S., Balthasart P., Hodgson D.A., Laybourn-Parry J., Wilmotte A.* Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes // *FEMS Microbiology Ecology*. 2006. Vol. 57, № 2. P. 272–289.

365. *Taton A., Grubisic S., Brambilla E., De Wit R., Wilmotte A.* Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo dry valleys, Antarctica): A morphological and molecular approach // *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. Vol. 69, № 9. P. 5157–5169.

366. *Teneva I., Dzhabazov B., Mladenov R., Schirmer K.* Molecular and phylogenetic characterization of *Phormidium* species (Cyanoprokaryota) using the *cpcBIGS-cpcA* locus // *Journal of Phycology*. 2005. Vol. 41, № 1. P. 188–194.

367. *Than C., Ruths D., Innan H., Nakhleh L.* Confounding Factors in HGT Detection: Statistical Error, Coalescent Effects, and Multiple Solutions // *Journal of Computational Biology*. 2007. Vol. 14, № 4. P. 517–535.

368. *Thomsen H.A., Buck K.R., Chavez F.P.* Haptophytes as components of marine phytoplankton // *The Haptophyte Algae, Systematics Association Special*. Vol. 51. New York: Oxford University Press. 1994. P. 187–208.

369. *Tomitani A., Knoll A.H., Cavanaugh C.M., Ohno T.* The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular-phylogenetic and paleontological perspectives // *PNAS*. 2006. Vol. 103, № 14. P. 5442–5447.

370. *Tourova T.P.* Copy number of ribosomal operons in prokaryotes and its effect on phylogenetic analyses // *Microbiology*. 2003. Vol. 72, № 4. P. 389-402.

371. *Tubaro A., Durando P., Del Favero G., Ansaldo F., Icardi G., Deeds J.R., Sosa S.* Case Definitions for Human Poisonings Postulated to Palytoxins Exposure // *Toxicon*. 2011. Vol. 57, № 3. P. 478–495.

372. *Valenzuela-Espinoza E., Millan-Nunez R., Nunez-Cebrero F.* Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium // *Aquacultural Engineering*. 2002. Vol. 25. P. 207–216.

373. *Vioque A.* The *RNase P* RNA from cyanobacteria: short tandemly repeated repetitive (STRR) sequences are present within the *RNase P* RNA gene in heterocyst-forming cyanobacteria // *Nucleic Acids Research*. 1997. Vol. 25, № 17. P. 3471–3477.

374. *Wall D., Guillard R.R.L., Dale B., Swift E., Watabe N.* Calcitic resting cysts in *Peridinium trochoideum* (Stein) Lemmermann, an autotrophic marine dinoflagellate // *Phycologia*. 1970. Vol. 9. P. 161–156.

375. *Waller R.F., Slamovitis C.H., Keeling P.* Lateral gene transfer of a multigene region from cyanobacteria to dinoflagellates resulting in a novel plastid-targeted fusion protein // *Molecular Biology and Evolution*. 2006. Vol. 23. P. 1437–1443.

376. *Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P., Truper H.G.* Report of the ad-hoc-committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics // *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1987. Vol. 37, № 4. P. 463–464.

377. *Wehrtmann I.S., Cortés J.* Marine Biodiversity of Costa Rica, Central America. Berlin: Springer Science & Business Media. 2008. 538 p.

378. *Wendel J.F., Schnabel A., Seelanan T.* Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*) // *PNAS*. 1995. Vol. 92. P. 280–284.

379. Wu Z., Shi J., Xiao P., Liu Y., Li R. Phylogenetic analysis of two cyanobacterial genera *Cylindrospermopsis* and *Raphidiopsis* based on multi-gene sequences // Harmful Algae. 2011. Vol. 10, № 5. P. 419–425.
380. Xu J., Zhang Q., Xu X., Wang Z., Qi J. Intragenomic variability and pseudogenes of ribosomal DNA in Stone flounder *Kareius bicoloratus* // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2009. Vol. 52. P. 157–166.
381. Yeung P.K., Kong K.F., Wong F.T., Wong J.T. Sequence data for two large-subunit rRNA genes from an Asian strain of *Alexandrium catenella* // Applied and Environmental Microbiology. 1996. Vol. 62. P. 4199–4201.
382. Yoo J.S., Lee J.H., Fukuyo Y. *Prorocentrum vietnamensis* sp. nov. (Prorocentraceae, Dinophyta): a new armoured dinoflagellate from Vietnam coastal waters // Journal Plant Biology. 2004. Vol. 47. P. 129–132.
383. Zamor R.M., Glenn K.L., Hambright K.D. Incorporating molecular tools into routine HAB monitoring programs: Using qPCR to track invasive *Prymnesium* // Harmful Algae. 2012. № 15. P. 1–7.
384. Zehr J.P., Mellon M.T., Hiorns W.D. Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: Evolutionary implications and potential applications to natural assemblages // Microbiology-UK. 1997. Vol. 143, № 4. P. 1443–1450.
385. Zhang B., Cai G., Wang H., Li D., Yang X., An X., Zheng X., Tian Y., Zheng W., Zheng T. *Streptomyces alboflavus* RPS and its novel and high algicidal activity against Harmful Algal Bloom species *Phaeocystis globose* // PLoS ONE. 2014. Vol. 9, № 3. e92907.
386. Zhukova N.V., Aizdaicher N.A. Fatty acid composition of 15 species of microalgae // Phytochemistry. 1995. Vol. 39. P. 351–356.
387. Zinner D., Arnold M.L., Roos C. Is the new primate genus *Rungwecebus* a baboon? // PLoS One. 2009. Vol. 4. e4859.
388. Zinssmeister C., Soehner S., Facher E., Kirsch M. Catch me if you can: the taxonomic identity of *Scrippsiella trochoidea* (F.Stein) A.R.Loebli. (Thoracosphaeraceae, Dinophyceae) // Systematics and Biodiversity. 2011. Vol. 9, № 2. P. 145–157.

ПРИЛОЖЕНИЕ I

Таблица

Матрица генетических расстояний (p) ± стандартное отклонение (S.d.) между *Ostreopsis* sp. ORUS и *Ostreopsis* cf. *Ovata* и представителем близкородственного рода *Alexandrium* по фрагменту гена 18S рДНК

№	Вид и GeneBank №												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	KF360004.1 <i>Ostreopsis</i> sp. ORUS J2		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.006	0.009
2	KF360003.1 <i>Ostreopsis</i> sp. ORUS J1	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.006	0.009
3	KF360002.1 <i>Ostreopsis</i> sp. ORUS O2	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.006	0.009
4	KF360001.1 <i>Ostreopsis</i> sp. ORUS O1	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.006	0.009
5	KF360000.1 <i>Ostreopsis</i> sp. ORUS K2	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.006	0.009
6	KF359999.1 <i>Ostreopsis</i> sp. ORUS H2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.003	0.006	0.009
7	KF359998.1 <i>Ostreopsis</i> sp. ORUS H1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.003	0.006	0.009
8	KF359997.1 <i>Ostreopsis</i> sp. ORUS A2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.003	0.006	0.009
9	KF359996.1 <i>Ostreopsis</i> sp. ORUS A1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.003	0.006	0.009
10	HE793379.2 <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i>	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019		0.005	0.009
11	AF244939.1 <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i>	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059	0.059	0.052		0.009
12	JF521619.1 <i>Alexandrium</i> <i>andersoni</i>	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180	0.180	0.171	0.173	

Alexandrium andersoni был использован в качестве внешней группы для оценки эволюционной дивергенции между родственными родами. Значения ниже диагонали – генетические расстояния, выше диагонали – стандартная ошибка.

ПРИЛОЖЕНИЕ II

Таблица

Матрица генетических расстояний (p) ± стандартное отклонение (S.d.) между кладами *Ostreopsis* и представителем близкородственного вида *Coolia monotis* по ITS-региону

Наименование								
№	клады	1	2	3	4	5	6	7
1	A		0.027	0.033	0.053	0.109	0.064	0.181
2	B1	0.107		0.034	0.066	0.107	0.071	0.184
3	B2	0.160	0.158		0.065	0.170	0.078	0.173
4	C	0.255	0.303	0.338		0.112	0.073	0.201
5	D	0.533	0.580	0.694	0.582		0.094	0.287
6	E	0.395	0.449	0.490	0.455	0.615		0.274
7	<i>Coolia monotis</i>	0.785	0.803	0.807	0.859	1.086	1.098	

ПРИЛОЖЕНИЕ III

Таблица

Усреднённые генетические расстояния (p) \pm стандартная ошибка (S.E.) внутри клад *Ostreopsis* по ITS-региону

Наименование клады	p	S.E.
A	0.007	0.002
B1	0.025	0.008
B2	0.047	0.013
C	0	0
D	0.334	0.057
E	0.438	0.073
<i>Coolia monotis</i>	n/c	n/c

n/c – нет общих сайтов (единственная последовательность в кладе)

S.E. – стандартная ошибка

ПРИЛОЖЕНИЕ IV

Таблица

Матрица генетических расстояний (p) \pm стандартное отклонение (S.d.) между кладами *Ostreopsis* и представителем близкородственного вида *Coolia monotis* по D1-D2 региону 28S рДНК.

№	Наименование клады							
		1	2	3	4	5	6	7
1	A		0.027	0.024	0.049	0.087	0.189	0.237
2	B1	0.136		0.026	0.050	0.091	0.175	0.172
3	B2	0.117	0.139		0.044	0.086	0.201	0.227
4	C	0.272	0.285	0.247		0.097	0.148	0.139
5	D	0.578	0.615	0.584	0.609		0.130	0.117
6	<i>O. cf. monotis</i>	0.916	0.842	0.924	0.764	0.752		0.027
7	<i>Coolia monotis</i>	1.057	0.863	1.001	0.733	0.731	0.121	

ПРИЛОЖЕНИЕ V

Таблица

Усреднённые генетические расстояния (p) \pm стандартная ошибка (S.E.) внутри клад *Ostreopsis* по D1-D2 региону 28S рДНК.

Наименование		
клады	p	S.E.
A	0.007	0.002
B1	0.019	0.005
B2	0.027	0.007
C	0	0
D	0.183	0.029
<i>O. cf. monotis</i>	n/c	n/c
<i>Coolia monotis</i>	n/c	n/c

ПРИЛОЖЕНИЕ VI

Таблица

Матрица генетических расстояний между видами рода *Scrippsiella* рассчитанная по последовательностям ITS1 региона. Величины *p*-расстояний для *Scrippsiella trochoidea* KJ996096 отмечены жирным шрифтом.

№	Вид и № GenBank №	P																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	<i>S. trochoidea</i> JN982383		0.019	0.027	0.030	0.033	0.033	0.056	0.058	0.073	0.073	0.073	0.073	0.073	0.022	0.039	0.086	0.086
2	<i>S. trochoidea</i> HM483396	0.053		0.037	0.039	0.039	0.039	0.061	0.063	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.029	0.048	0.073	0.073
3	<i>S. trochoidea</i> KJ996096	0.084	0.128		0.024	0.035	0.035	0.067	0.070	0.080	0.080	0.080	0.080	0.080	0.030	0.051	0.097	0.097
4	<i>S. trochoidea</i> KF751926	0.093	0.138	0.067		0.041	0.041	0.069	0.072	0.087	0.087	0.087	0.087	0.087	0.039	0.062	0.069	0.069
5	<i>S. trochoidea</i> JN982379	0.118	0.145	0.134	0.154		0.000	0.080	0.084	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.035	0.062	0.137	0.137
6	<i>S. trochoidea</i> HQ845330	0.118	0.145	0.134	0.154	0.000		0.080	0.084	0.078	0.078	0.078	0.078	0.078	0.035	0.062	0.137	0.137
7	<i>S. kirschiae</i> JN982378	0.218	0.240	0.261	0.270	0.326	0.326		0.006	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.060	0.116	0.184	0.184
8	<i>S. kirschiae</i> JN982380	0.229	0.251	0.273	0.282	0.339	0.339	0.006		0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.062	0.120	0.191	0.191
9	<i>S. bicarinata</i> JN982381	0.309	0.319	0.339	0.347	0.361	0.361	0.416	0.432		0.000	0.000	0.000	0.000	0.065	0.115	0.133	0.133
10	<i>S. bicarinata</i> JN982377	0.309	0.319	0.339	0.347	0.361	0.361	0.416	0.432	0.000		0.000	0.000	0.000	0.065	0.115	0.133	0.133
11	<i>S. bicarinata</i> JN982376	0.309	0.319	0.339	0.347	0.361	0.361	0.416	0.432	0.000	0.000		0.000	0.000	0.065	0.115	0.133	0.133
12	<i>S. bicarinata</i> JN982375	0.309	0.319	0.339	0.347	0.361	0.361	0.416	0.432	0.000	0.000	0.000		0.000	0.065	0.115	0.133	0.133
13	<i>S. bicarinata</i> KF751927	0.309	0.319	0.339	0.347	0.361	0.361	0.416	0.432	0.000	0.000	0.000	0.000		0.065	0.115	0.133	0.133
14	<i>S. trochoidea</i> KF751924	0.061	0.092	0.100	0.128	0.125	0.125	0.240	0.251	0.289	0.289	0.289	0.289	0.289		0.041	0.092	0.092
15	<i>S. donghaiensis</i> JN982374	0.144	0.168	0.197	0.228	0.253	0.253	0.447	0.463	0.475	0.475	0.475	0.475	0.475	0.152		0.100	0.100
16	<i>S. hangoei</i> KF751923	0.325	0.283	0.356	0.273	0.473	0.473	0.634	0.656	0.525	0.525	0.525	0.525	0.525	0.352	0.354		0.000
17	<i>S. hangoei</i> JN982373	0.325	0.283	0.356	0.273	0.473	0.473	0.634	0.656	0.525	0.525	0.525	0.525	0.525	0.352	0.354	0.000	

ПРИЛОЖЕНИЕ VII

Таблица

Матрица генетических расстояний между видами рода *Scripsiella* рассчитанная по последовательностям ITS2 региона. Величины *p*-расстояний для *Scripsiella trochoidea* KJ996096 отмечены жирным шрифтом.

№	Вид и № GenBank	P																S. E.															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17															
1	<i>S. trochoidea</i> JN982383		0.021	0.026	0.023	0.021	0.022	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.025	0.028	0.032	0.032															
2	<i>S. trochoidea</i> HM483396	0.116		0.026	0.023	0.022	0.022	0.027	0.027	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.024	0.027	0.033	0.033															
3	<i>S. trochoidea</i> KJ996096	0.161	0.151		0.022	0.026	0.025	0.030	0.030	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.030	0.034	0.034															
4	<i>S. trochoidea</i> KF751926	0.141	0.121	0.101		0.021	0.021	0.028	0.028	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.026	0.030	0.032	0.032															
5	<i>S. trochoidea</i> JN982379	0.116	0.106	0.146	0.101		0.012	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.029	0.032	0.032															
6	<i>S. trochoidea</i> HQ845330	0.126	0.111	0.136	0.101	0.030		0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.029	0.032	0.032															
7	<i>S. kirschiae</i> JN982378	0.211	0.206	0.236	0.211	0.176	0.176		0.000	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.031	0.034	0.034															
8	<i>S. kirschiae</i> JN982380	0.211	0.206	0.236	0.211	0.176	0.176	0.000		0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.031	0.034	0.034															
9	<i>S. bicarinata</i> JN982381	0.186	0.166	0.176	0.146	0.156	0.156	0.231	0.231		0.000	0.000	0.000	0.000	0.028	0.029	0.033	0.033															
10	<i>S. bicarinata</i> JN982377	0.186	0.166	0.176	0.146	0.156	0.156	0.231	0.231	0.000		0.000	0.000	0.000	0.028	0.029	0.033	0.033															
11	<i>S. bicarinata</i> JN982376	0.186	0.166	0.176	0.146	0.156	0.156	0.231	0.231	0.000	0.000		0.000	0.000	0.028	0.029	0.033	0.033															
12	<i>S. bicarinata</i> JN982375	0.186	0.166	0.176	0.146	0.156	0.156	0.231	0.231	0.000	0.000	0.000		0.000	0.028	0.029	0.033	0.033															
13	<i>S. bicarinata</i> KF751927	0.186	0.166	0.176	0.146	0.156	0.156	0.231	0.231	0.000	0.000	0.000	0.000		0.028	0.029	0.033	0.033															
14	<i>S. trochoidea</i> KF751924	0.161	0.146	0.191	0.181	0.171	0.171	0.256	0.256	0.201	0.201	0.201	0.201	0.201		0.027	0.033	0.033															
15	<i>S. donghaiensis</i> JN982374	0.221	0.186	0.251	0.236	0.226	0.236	0.307	0.307	0.241	0.241	0.241	0.241	0.241	0.181		0.035	0.035															
16	<i>S. hangoei</i> KF751923	0.327	0.352	0.372	0.352	0.342	0.352	0.407	0.407	0.357	0.357	0.357	0.357	0.357	0.337	0.372		0.000															
17	<i>S. hangoei</i> JN982373	0.327	0.352	0.372	0.352	0.342	0.352	0.407	0.407	0.357	0.357	0.357	0.357	0.357	0.337	0.372	0.000																

ПРИЛОЖЕНИЕ VIII

Таблица

Матрица генетических расстояний между видами рода *Scrippsiella* рассчитанная по последовательностям 28S рДНК (D1-D2).

Величины *p*-расстояний для *Scrippsiella trochoidea* KJ996096 отмечены жирным шрифтом.

№	Вид и № GenBank	P																	S. E.																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17																	
1	<i>S. trochoidea</i> JN982383		0.003	0.008	0.006	0.005	0.005	0.008	0.008	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.009	0.009																	
2	<i>S. trochoidea</i> HM483396	0.009		0.007	0.006	0.005	0.005	0.008	0.008	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.006	0.007	0.009	0.009																	
3	<i>S. trochoidea</i> KJ996096	0.049	0.049		0.007	0.008	0.008	0.009	0.009	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.009	0.009	0.010	0.010																	
4	<i>S. trochoidea</i> KF751926	0.028	0.028	0.043		0.006	0.006	0.008	0.008	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.006	0.008	0.010	0.010																	
5	<i>S. trochoidea</i> JN982379	0.016	0.022	0.051	0.030		0.000	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.007	0.008	0.010	0.010																	
6	<i>S. trochoidea</i> HQ845330	0.016	0.022	0.051	0.030	0.000		0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.007	0.008	0.010	0.010																	
7	<i>S. kirschiae</i> JN982378	0.045	0.048	0.082	0.052	0.052	0.052		0.000	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.010	0.010																	
8	<i>S. kirschiae</i> JN982380	0.045	0.048	0.082	0.052	0.052	0.052	0.000		0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.010	0.010																	
9	<i>S. bicarinata</i> JN982381	0.037	0.040	0.078	0.057	0.051	0.051	0.064	0.064		0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.009	0.011	0.011																	
10	<i>S. bicarinata</i> JN982377	0.037	0.040	0.078	0.057	0.051	0.051	0.064	0.064	0.000		0.000	0.000	0.000	0.009	0.009	0.011	0.011																	
11	<i>S. bicarinata</i> JN982376	0.037	0.040	0.078	0.057	0.051	0.051	0.064	0.064	0.000	0.000		0.000	0.000	0.009	0.009	0.011	0.011																	
12	<i>S. bicarinata</i> JN982375	0.037	0.040	0.078	0.057	0.051	0.051	0.064	0.064	0.000	0.000	0.000		0.000	0.009	0.009	0.011	0.011																	
13	<i>S. bicarinata</i> KF751927	0.037	0.040	0.078	0.057	0.051	0.051	0.064	0.064	0.000	0.000	0.000	0.000		0.009	0.009	0.011	0.011																	
14	<i>S. trochoidea</i> KF751924	0.033	0.027	0.058	0.033	0.034	0.034	0.061	0.061	0.052	0.052	0.052	0.052	0.052		0.008	0.009	0.009																	
15	<i>S. donghaiensis</i> JN982374	0.034	0.034	0.067	0.045	0.045	0.045	0.070	0.070	0.063	0.063	0.063	0.063	0.063	0.045		0.010	0.010																	
16	<i>S. hangoei</i> KF751923	0.075	0.069	0.090	0.079	0.076	0.076	0.097	0.097	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.073	0.078		0.000																	
17	<i>S. hangoei</i> JN982373	0.075	0.069	0.090	0.079	0.076	0.076	0.097	0.097	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.073	0.078	0.000																		

ПРИЛОЖЕНИЕ IX

Таблица

Матрица генетических расстояний (в долях) между последовательностями участка 18S рДНК (638 п.н.) представителей отделов
Rhodophyta, Cryptophyta и Chlorophyta

№	Название вида и номер последовательности из GenBank	Порядковый номер последовательности								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	<i>Exanthemachrysis gayraliae</i> AF106060	–	0.002	0.009	0.022	0.020	0.020	0.020	0.020	0.021
2	<i>Pavlova</i> sp. AF106049	0.003	–	0.009	0.022	0.020	0.020	0.020	0.020	0.022
3	<i>Monochrysis</i> sp. FR865766	0.038	0.036	–	0.025	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023
4	<i>Porphyridium purpureum</i> UTEX 637 AJ880418	0.155	0.155	0.180	–	0.005	0.005	0.005	0.005	0.014
5	<i>Porphyridium purpureum</i> IAM R-1 AB045584	0.138	0.143	0.168	0.019	–	0.000	0.000	0.000	0.012
6	<i>Porphyridium purpureum</i> PC-85 KF766115	0.138	0.143	0.168	0.019	0.000	–	0.000	0.000	0.012
7	<i>Porphyridium purpureum</i> PP-AB11 KF766117	0.138	0.143	0.168	0.019	0.000	0.000	–	0.000	0.012
8	<i>Porphyridium purpureum</i> PP-V08KF766119	0.138	0.143	0.168	0.019	0.000	0.000	0.000	–	0.012
9	<i>Timspurckia oligopyrenoides</i> KF422614	0.146	0.152	0.157	0.080	0.065	0.065	0.065	0.065	–
10	<i>Flintiella sanguinaria</i> AF342749	0.147	0.144	0.154	0.072	0.063	0.063	0.063	0.063	0.033
11	<i>Flintiella sanguinaria</i> UTEX2060 FJ595491	0.147	0.144	0.154	0.072	0.063	0.063	0.063	0.063	0.033
12	<i>Porphyridium sordidum</i> AF168630	0.154	0.160	0.171	0.063	0.045	0.045	0.045	0.045	0.052
13	Rhodophyta sp. KF791557	0.163	0.169	0.174	0.095	0.075	0.075	0.075	0.075	0.061
14	<i>Porphyridium aerugineum</i> AF168623	0.166	0.172	0.177	0.092	0.072	0.072	0.072	0.072	0.063
15	<i>Porphyridium aerugineum</i> AJ421145	0.163	0.169	0.174	0.095	0.075	0.075	0.075	0.075	0.061
16	<i>Porphyridium aerugineum</i> L27635	0.163	0.169	0.174	0.095	0.075	0.075	0.075	0.075	0.061
17	<i>Cymbomonas tetramitiformis</i> FN562438	0.128	0.126	0.133	0.147	0.141	0.141	0.141	0.141	0.128
18	<i>Hanusia phi</i> U53126	0.135	0.137	0.156	0.160	0.143	0.143	0.143	0.143	0.150
19	<i>Chroodactylon ornatum</i> FJ595492	0.130	0.128	0.141	0.134	0.118	0.118	0.118	0.118	0.123
20	<i>Bangiopsis subsimplex</i> AF168627	0.118	0.115	0.133	0.129	0.118	0.118	0.118	0.118	0.110
21	<i>Purpureofilum apyrenoidigerum</i> AY617151	0.120	0.118	0.130	0.127	0.116	0.116	0.116	0.116	0.113
22	<i>Stylonema alsidii</i> L26204	0.113	0.115	0.133	0.121	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111
23	<i>Rhodorus marinus</i> UTEX1538 FJ595493	0.115	0.115	0.130	0.126	0.124	0.124	0.124	0.124	0.114
24	<i>Compsopogonopsis leptocladus</i> AF087125	0.133	0.133	0.141	0.131	0.116	0.116	0.116	0.116	0.106
25	<i>Compsopogon caeruleus</i> JX512002	0.130	0.130	0.138	0.129	0.114	0.114	0.114	0.114	0.103
26	<i>Pyrophyllon subtumens</i> AY126434	0.123	0.128	0.133	0.149	0.130	0.130	0.130	0.130	0.082
27	<i>Erythrocladia</i> sp. L26188	0.129	0.134	0.138	0.136	0.118	0.118	0.118	0.118	0.073
28	<i>Erythrotrichia carnea</i> AJ880417	0.123	0.128	0.138	0.127	0.115	0.115	0.115	0.115	0.076

Таблица (Продолжение)

№	Порядковый номер последовательности																		
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1	0.022	0.021	0.022	0.022	0.023	0.023	0.023	0.019	0.020	0.020	0.018	0.018	0.021	0.018	0.019	0.019	0.019	0.020	0.019
2	0.021	0.021	0.022	0.023	0.023	0.023	0.023	0.019	0.020	0.019	0.018	0.017	0.022	0.018	0.019	0.019	0.019	0.020	0.019
3	0.022	0.022	0.023	0.023	0.024	0.023	0.023	0.019	0.022	0.021	0.019	0.019	0.023	0.019	0.020	0.020	0.019	0.020	0.020
4	0.013	0.013	0.011	0.015	0.014	0.015	0.015	0.020	0.022	0.019	0.019	0.019	0.021	0.018	0.018	0.018	0.021	0.019	0.018
5	0.012	0.012	0.009	0.012	0.012	0.013	0.013	0.019	0.020	0.017	0.017	0.018	0.021	0.019	0.017	0.017	0.019	0.018	0.017
6	0.012	0.012	0.009	0.012	0.012	0.013	0.013	0.019	0.020	0.017	0.017	0.018	0.021	0.019	0.017	0.017	0.019	0.018	0.017
7	0.012	0.012	0.009	0.012	0.012	0.013	0.013	0.019	0.020	0.017	0.017	0.018	0.021	0.019	0.017	0.017	0.019	0.018	0.017
8	0.012	0.012	0.009	0.012	0.012	0.013	0.013	0.019	0.020	0.017	0.017	0.018	0.021	0.019	0.017	0.017	0.019	0.018	0.017
9	0.008	0.008	0.010	0.011	0.011	0.011	0.011	0.018	0.021	0.018	0.017	0.017	0.021	0.018	0.016	0.016	0.014	0.012	0.013
10	–	0.002	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.018	0.020	0.017	0.016	0.015	0.018	0.017	0.015	0.015	0.015	0.014	0.015
11	0.003	–	0.009	0.010	0.010	0.010	0.010	0.018	0.020	0.017	0.016	0.015	0.019	0.017	0.015	0.015	0.015	0.014	0.015
12	0.040	0.040	–	0.009	0.009	0.009	0.009	0.020	0.020	0.017	0.016	0.016	0.021	0.018	0.016	0.016	0.016	0.014	0.014
13	0.048	0.048	0.046	–	0.003	0.002	0.002	0.021	0.022	0.019	0.018	0.017	0.021	0.018	0.017	0.016	0.018	0.016	0.015
14	0.050	0.050	0.040	0.005	–	0.002	0.002	0.021	0.022	0.018	0.017	0.017	0.021	0.018	0.017	0.017	0.018	0.016	0.016
15	0.048	0.048	0.042	0.003	0.002	–	0.000	0.021	0.022	0.019	0.018	0.017	0.021	0.018	0.017	0.016	0.018	0.016	0.016
16	0.048	0.048	0.042	0.003	0.002	0.000	–	0.021	0.022	0.019	0.018	0.017	0.021	0.018	0.017	0.016	0.018	0.016	0.016
17	0.049	0.118	0.138	0.149	0.151	0.148	0.148	–	0.014	0.016	0.014	0.014	0.020	0.015	0.016	0.016	0.017	0.016	0.017
18	0.050	0.142	0.142	0.160	0.156	0.159	0.159	0.090	–	0.016	0.016	0.016	0.019	0.015	0.017	0.017	0.018	0.017	0.018
19	0.051	0.118	0.118	0.136	0.133	0.136	0.136	0.108	0.113	–	0.011	0.011	0.014	0.010	0.013	0.013	0.015	0.013	0.014
20	0.052	0.104	0.108	0.123	0.120	0.123	0.123	0.080	0.108	0.063	–	0.006	0.015	0.008	0.013	0.013	0.012	0.012	0.013
21	0.053	0.094	0.108	0.121	0.118	0.120	0.120	0.082	0.103	0.065	0.021	–	0.014	0.009	0.013	0.013	0.012	0.012	0.013
22	0.054	0.092	0.111	0.118	0.120	0.118	0.118	0.094	0.103	0.047	0.052	0.046	–	0.013	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018
23	0.055	0.111	0.126	0.129	0.126	0.129	0.129	0.096	0.105	0.053	0.034	0.046	0.038	–	0.013	0.012	0.013	0.013	0.013
24	0.056	0.094	0.106	0.114	0.116	0.113	0.113	0.101	0.114	0.076	0.076	0.074	0.076	0.072	–	0.002	0.012	0.010	0.010
25	0.057	0.091	0.104	0.111	0.113	0.111	0.111	0.100	0.111	0.074	0.074	0.072	0.074	0.070	0.002	–	0.011	0.010	0.010
26	0.058	0.101	0.111	0.124	0.126	0.123	0.123	0.108	0.121	0.090	0.070	0.070	0.078	0.078	0.065	0.063	–	0.006	0.006
27	0.059	0.090	0.092	0.106	0.109	0.106	0.106	0.100	0.111	0.076	0.065	0.065	0.076	0.076	0.051	0.049	0.019	–	0.005
28	0.060	0.092	0.094	0.104	0.106	0.103	0.103	0.109	0.122	0.083	0.070	0.070	0.069	0.072	0.051	0.049	0.019	0.012	–

ПРИЛОЖЕНИЕ X

Таблица

Матрица генетических расстояний (в долях) между последовательностями участка 5.8S рДНК (159 п.н.)

№	Название вида и номер последовательности из GenBank	Порядковый номер последовательности										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	<i>P. purpureum</i> CCAP1380-3 EU818942	–	0.011	0.011	0.011	0.027	0.027	0.027	0.031	0.034	0.034	0.034
2	<i>P. purpureum</i> PP-AB11 KF766117	0.015	–	0.000	0.000	0.024	0.024	0.024	0.029	0.031	0.031	0.031
3	<i>P. purpureum</i> PP-V08 KF766119	0.015	0.000	–	0.000	0.024	0.024	0.024	0.029	0.031	0.031	0.031
4	<i>P. purpureum</i> PC-85 KF766115	0.015	0.000	0.000	–	0.024	0.024	0.024	0.029	0.031	0.031	0.031
5	<i>Ahnfeltia fastigiata</i> JN113138	0.094	0.077	0.077	0.077	–	0.000	0.000	0.021	0.018	0.017	0.017
6	<i>A. plicata</i> JN113148	0.094	0.077	0.077	0.077	0.000	–	0.000	0.021	0.018	0.017	0.017
7	<i>A. borealis</i> JN113155	0.094	0.077	0.077	0.077	0.000	0.000	–	0.021	0.018	0.017	0.017
8	<i>Psilosiphon scoparium</i> AF149030	0.128	0.111	0.111	0.111	0.061	0.061	0.061	–	0.018	0.017	0.017
9	<i>Palmaria palmata</i> FR744765	0.137	0.119	0.119	0.119	0.045	0.045	0.045	0.045	–	0.013	0.013
10	<i>Lemanea fluviatilis</i> AY575192	0.137	0.119	0.119	0.119	0.037	0.037	0.037	0.037	0.022	–	0.000
11	<i>L. fluviatilis</i> AY575195	0.137	0.119	0.119	0.119	0.037	0.037	0.037	0.037	0.022	0.000	–
12	<i>L. fucina</i> AY575200	0.137	0.119	0.119	0.119	0.037	0.037	0.037	0.037	0.022	0.000	0.000
13	<i>L. borealis</i> AY575202	0.137	0.119	0.119	0.119	0.037	0.037	0.037	0.037	0.022	0.000	0.000
14	<i>Paralemanea annulata</i> AY575206	0.137	0.119	0.119	0.119	0.037	0.037	0.037	0.037	0.022	0.000	0.000
15	<i>Psilosiphon scoparium</i> AF149025	0.137	0.120	0.120	0.120	0.053	0.053	0.053	0.015	0.038	0.030	0.030
16	<i>Pyramimonas parkeae</i> HE610154	0.138	0.120	0.120	0.120	0.103	0.103	0.103	0.128	0.128	0.119	0.119
17	<i>Mychonastes jurisii</i> GQ477038	0.146	0.128	0.128	0.128	0.110	0.110	0.110	0.145	0.145	0.136	0.136
18	<i>Batrachospermum arcuatum</i> KC511099	0.146	0.128	0.128	0.128	0.045	0.045	0.045	0.030	0.030	0.007	0.007
19	<i>Sirodotia suecica</i> AF126411	0.155	0.137	0.137	0.137	0.053	0.053	0.053	0.037	0.038	0.015	0.015

Таблица (Продолжение)

№	Название вида и номер последовательности из GenBank	Порядковый номер последовательности							
		12	13	14	15	16	17	18	19
1	<i>P. purpureum</i> CCAP1380-3 EU818942	0.034	0.034	0.034	0.033	0.034	0.036	0.035	0.037
2	<i>P. purpureum</i> PP-AB11 KF766117	0.031	0.031	0.031	0.031	0.032	0.033	0.033	0.034
3	<i>P. purpureum</i> PP-V08 KF766119	0.031	0.031	0.031	0.031	0.032	0.033	0.033	0.034
4	<i>P. purpureum</i> PC-85 KF766115	0.031	0.031	0.031	0.031	0.032	0.033	0.033	0.034
5	<i>Ahnfeltia fastigiata</i> JN113138	0.017	0.017	0.017	0.020	0.029	0.030	0.018	0.020
6	<i>A. plicata</i> JN113148	0.017	0.017	0.017	0.020	0.029	0.030	0.018	0.020
7	<i>A. borealis</i> JN113155	0.017	0.017	0.017	0.020	0.029	0.030	0.018	0.020
8	<i>Psilosiphon scoparium</i> AF149030	0.017	0.017	0.017	0.010	0.032	0.035	0.015	0.016
9	<i>Palmaria palmata</i> FR744765	0.013	0.013	0.013	0.017	0.032	0.035	0.015	0.017
10	<i>Lemanea fluviatilis</i> AY575192	0.000	0.000	0.000	0.015	0.031	0.034	0.007	0.010
11	<i>L. fluviatilis</i> AY575195	0.000	0.000	0.000	0.015	0.031	0.034	0.007	0.010
12	<i>L. fucina</i> AY575200	–	0.000	0.000	0.015	0.031	0.034	0.007	0.010
13	<i>L. borealis</i> AY575202	0.000	–	0.000	0.015	0.031	0.034	0.007	0.010
14	<i>Paralemanea annulata</i> AY575206	0.000	0.000	–	0.015	0.031	0.034	0.007	0.010
15	<i>Psilosiphon scoparium</i> AF149025	0.030	0.030	0.030	–	0.034	0.036	0.013	0.014
16	<i>Pyramimonas parkeae</i> HE610154	0.119	0.119	0.119	0.137	–	0.016	0.033	0.033
17	<i>Mychonastes jurisii</i> GQ477038	0.136	0.136	0.136	0.154	0.037	–	0.035	0.035
18	<i>Batrachospermum arcuatum</i> KC511099	0.007	0.007	0.007	0.022	0.128	0.145	–	0.007
19	<i>Sirodotia suecica</i> AF126411	0.015	0.015	0.015	0.030	0.128	0.145	0.007	–

ПРИЛОЖЕНИЕ XI

Таблица

Матрица генетических расстояний (p) ± стандартное отклонение (S.d.) между штаммами *Tisochrysis lutea* и видами ближайших родов по фрагменту гена 18S рДНК.

	№ последовательности из GenBank	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	KC888124 PLY562 North Sea		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
2	HM149539 Tun08 Tunisia	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
3	KC888118 AC102 Tropical Pacific	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
4	KC888120 CCMP463 Caribbean Sea	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
5	KC888122 RCC1344 Atlantic (spain) coastal	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
6	HM246242 AL China	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
7	DQ079859 CCAP 927/14 Tropical Pacific	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
8	HQ877920 KMMCC H-22 S.Korea	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
9	DQ075203 zhanjiangensis South China Sea	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
10	HQ877902 KMMCC H-1 Tahiti	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
11	HM149542 CCMP1324 Tropical Pacific	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003		0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
12	KC888125 PLY506A Tropical Pacific	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
13	JN938582 IOAC724S China	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
14	HQ877903 KMMCC H-2 Japan	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
15	KC888126 PLY506B Tropical Pacific	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.002
16	HM149543 Ifremer-Argenton98 North Atlantic	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.002
17	KC888127 PLY506C Tropical Pacific	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.002
18	FJ536744 CNT Vietnam	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.002
19	GQ118682 DB	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	
20	DQ071573 8701 Tropical Pacific	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
21	AJ246266 UIO 102 Atlantic (Norway) coastal	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
22	DQ071574 santou 2 Tahiti	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
23	HQ877911 CCMP 463 KMMCC H-11	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.006	0.006	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.006
24	HQ877910 KMMCC H-10 China	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.006	0.006	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
25	DQ071572 3011 Tropical Pacific	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.007	0.007	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.007
26	KC888116 <i>I. nuda</i> RCC2477	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
27	KC888115 <i>I. nuda</i> RCC1207	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
28	KC888114 <i>I. nuda</i> AC49	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
29	KF696664 <i>Chrysothila lamellosa</i> A13-009	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
30	KC888101 <i>Chrysothila lamellosa</i> PLY509	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
31	KC888100 <i>Chrysothila lamellosa</i> PLY475	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
32	KC888112 <i>I. litoralis</i> RCC1346	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
33	AM490996 <i>I. litoralis</i> ALGO HAP18	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
34	KC888105 <i>I. galbana</i> PLY507	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012
35	KC888104 <i>I. galbana</i> PLY240	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012
36	KC888103 <i>I. galbana</i> PLY8	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012
37	HM149541 <i>I. galbana</i> SAG	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012
38	HM149540 <i>I. galbana</i> CCMP1323	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013
39	EU924188 0318 China Fujian	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.013	0.013	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
40	KM365435 Vostok08 North Pacific	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.021	0.018	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021
41	KC594686 SW2 Malaysia	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.018	0.018	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.018
42	AB183665 <i>Gephyrocapsa oceanica</i>	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027

Таблица (Продолжение)

	№ последовательности из GenBank	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
1	KC888124 PLY562 North Sea	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
2	HM149539 Tun08 Tunisia	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
3	KC888118 AC102 Tropical Pacific	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
4	KC888120 CCMP463 Caribbean Sea	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
5	KC888122 RCC1344 Atlantic (spain) coastal	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
6	HM246242 AL China	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
7	DQ079859 CCAP 927/14 Tropical Pacific	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
8	HQ877920 KMMCC H-22 S.Korea	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
9	DQ075203 zhanjiangensis South China Sea	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
10	HQ877902 KMMCC H-1 Tahiti	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
11	HM149542 CCMP1324 Tropical Pacific	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
12	KC888125 PLY506A Tropical Pacific	0.000	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
13	JN938582 IOAC7248 China	0.000	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
14	HQ877903 KMMCC H-2 Japan	0.000	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
15	KC888126 PLY506B Tropical Pacific	0.000	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
16	HM149543 Ifremer-Argenton98 North Atlantic	0.000	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
17	KC888127 PLY506C Tropical Pacific	0.000	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
18	FJ536744 CNT Vietnam	0.000	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
19	GQ118682 DB	0.002	0.003	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
20	DQ071573 8701 Tropical Pacific		0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
21	AJ246266 UIO 102 Atlantic (Norway) coastal	0.004		0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.006	0.005	0.006	
22	DQ071574 santou 2 Tahiti	0.004	0.006		0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	
23	HQ877911 CCMP 463 KMMCC H-11	0.003	0.007	0.007		0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004	0.006	0.005	0.006	
24	HQ877910 KMMCC H-10 China	0.003	0.007	0.007	0.006		0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.004	0.006	0.005	0.006	
25	DQ071572 3011 Tropical Pacific	0.004	0.009	0.009	0.007	0.007		0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006	0.006	0.006	
26	KC888116 <i>I. nuda</i> RCC2477	0.009	0.01	0.007	0.012	0.012	0.013		0.000	0.000	0.003	0.003	0.003	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.005	0.006	0.006	0.005	
27	KC888115 <i>I. nuda</i> RCC1207	0.009	0.01	0.007	0.012	0.012	0.013	0.000		0.000	0.003	0.003	0.003	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.005	0.006	0.006	0.005	
28	KC888114 <i>I. nuda</i> AC49	0.009	0.01	0.007	0.012	0.012	0.013	0.000	0.000		0.003	0.003	0.003	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.005	0.006	0.006	0.005	
29	KF696664 <i>Chrysotila lamellosa</i> A13-009	0.009	0.01	0.007	0.012	0.012	0.013	0.006	0.006	0.006		0.000	0.000	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.006	0.006	0.006	
30	KC888101 <i>Chrysotila lamellosa</i> PLY509	0.009	0.01	0.007	0.012	0.012	0.013	0.006	0.006	0.006	0.000		0.000	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.006	0.006	0.006	
31	KC888100 <i>Chrysotila lamellosa</i> PLY475	0.009	0.01	0.007	0.012	0.012	0.013	0.006	0.006	0.006	0.000	0.000		0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.006	0.006	0.006	
32	KC888112 <i>I. litoralis</i> RCC1346	0.01	0.012	0.009	0.013	0.013	0.015	0.001	0.001	0.001	0.004	0.004	0.004		0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.005	0.006	0.006	0.005
33	AM490996 <i>I. litoralis</i> ALGO HAP18	0.01	0.012	0.009	0.013	0.013	0.015	0.001	0.001	0.001	0.004	0.004	0.004	0.000		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.005	0.006	0.006	0.005
34	KC888105 <i>I. galbana</i> PLY507	0.012	0.013	0.01	0.015	0.015	0.016	0.003	0.003	0.003	0.006	0.006	0.006	0.001	0.001		0.000	0.000	0.000	0.001	0.005	0.006	0.006	0.005	
35	KC888104 <i>I. galbana</i> PLY240	0.012	0.013	0.01	0.015	0.015	0.016	0.003	0.003	0.003	0.006	0.006	0.006	0.001	0.001	0.000		0.000	0.000	0.001	0.005	0.006	0.006	0.005	
36	KC888103 <i>I. galbana</i> PLY8	0.012	0.013	0.01	0.015	0.015	0.016	0.003	0.003	0.003	0.006	0.006	0.006	0.001	0.001	0.000	0.000		0.000	0.001	0.005	0.006	0.006	0.005	
37	HM149541 <i>I. galbana</i> SAG	0.012	0.013	0.01	0.015	0.015	0.016	0.003	0.003	0.003	0.006	0.006	0.006	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000		0.001	0.005	0.006	0.006	0.005	
38	HM149540 <i>I. galbana</i> CCMP1323	0.013	0.015	0.012	0.016	0.016	0.018	0.004	0.004	0.004	0.007	0.007	0.007	0.003	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001		0.006	0.006	0.006	0.006	
39	EU924188 0318 China Fujian	0.01	0.015	0.015	0.01	0.01	0.015	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.021	0.021	0.022	0.022	0.022	0.022	0.024		0.006	0.006	0.007	
40	KM365435 Vostok08 North Pacific	0.021	0.022	0.022	0.024	0.024	0.025	0.024	0.024	0.024	0.027	0.027	0.027	0.025	0.025	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.028		0.007	0.007
41	KC594686 SW2 Malaysia	0.015	0.019	0.019	0.018	0.018	0.019	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.025	0.025	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.025	0.034		0.008
42	AB183665 <i>Gephyrocapsa oceanica</i>	0.027	0.025	0.025	0.029	0.029	0.031	0.021	0.021	0.021	0.022	0.022	0.022	0.019	0.019	0.021	0.021	0.021	0.021	0.022	0.037	0.041	0.041		

ПРИЛОЖЕНИЕ XII

Таблица

Матрица генетических расстояний (p) \pm стандартное отклонение (S.d.) между штаммами *Tisochrysis lutea* и ближайшими видами *Isochrysis galbana* на основе последовательностей ITS-региона.

№	№ последовательности из GenBank	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	FJ946911 CCAP 927/14		0.005	0.004	0.004	0.000	0.002	0.005	0.000	0.004	0.017	0.017
2	FJ946912 Tunisia	0.011		0.005	0.005	0.005	0.005	0.007	0.005	0.006	0.018	0.018
3	KF998564 East China Sea	0.009	0.013		0.002	0.004	0.005	0.007	0.004	0.005	0.017	0.017
4	FJ946913 CCMP 1324	0.009	0.013	0.002		0.004	0.005	0.007	0.004	0.005	0.017	0.017
5	JX393298 IOAC724S	0.000	0.011	0.009	0.009		0.002	0.005	0.000	0.004	0.017	0.017
6	JX393297 IOAC683S	0.002	0.013	0.011	0.011	0.002		0.006	0.002	0.005	0.017	0.017
7	KM365434 Vostok08	0.015	0.026	0.022	0.024	0.015	0.017		0.005	0.007	0.018	0.018
8	KC800941 IOAC723S	0.000	0.011	0.009	0.009	0.000	0.002	0.015		0.004	0.017	0.017
9	FJ946914 Ifremer-Argenton98	0.009	0.019	0.011	0.013	0.009	0.011	0.022	0.009		0.0178	0.018
10	<i>Isochrysis galbana</i> CCMP 1323 FJ946909	0.196	0.209	0.191	0.194	0.195	0.197	0.204	0.195	0.199		0.003
11	<i>Isochrysis galbana</i> SAG 13.92 FJ946910	0.191	0.204	0.185	0.188	0.189	0.192	0.199	0.189	0.198	0.007	

ПРИЛОЖЕНИЕ XIII

Таблица

Матрица генетических расстояний (p) \pm стандартное отклонение (S.d.) между штаммами *Tisochrysis lutea* и ближайшими видами на основе последовательностей 5.8S рДНК.

	№ последовательности из GenBank	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Vostok08 KM365434		0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.010	0.014	0.015	0.016
2	IOAC723S KC800941	0.012		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	0.013	0.015	0.016
3	IOAC724S JX393298	0.012	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	0.013	0.015	0.016
4	IOAC683S JX393297	0.012	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	0.013	0.015	0.016
5	CCAP 927/14 FJ946911	0.012	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.006	0.013	0.015	0.016
6	East China Sea KF998564	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.006	0.013	0.015	0.016
7	Ifremer-Argenton98 FJ946914	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.006	0.013	0.015	0.016
8	Tunisia FJ946912	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.006	0.013	0.015	0.016
9	CCMP 1324 FJ946913	0.018	0.006		0.015	0.016	0.017						
10	<i>Isochrysis galbana</i> SAG13.92 FJ946910	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.036		0.006	0.016
11	<i>Isochrysis galbana</i> CCMP1323 FJ946909	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.042	0.006		0.017
12	<i>Coccolithus pelagicus</i> AJ544123	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.048	0.042	0.048	
13	<i>Coccolithus braarudii</i> AJ544122	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.048	0.042	0.048	0.000
14	<i>Pleurochrysis scherffellii</i> AM936922	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.055	0.061	0.067	0.036
15	<i>Pleurochrysis carterae</i> AM936918	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.055	0.061	0.067	0.036
16	<i>Pleurochrysis elongata</i> AM936919	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055	0.061	0.061	0.067	0.030
17	<i>Pleurochrysis roscoffensis</i> KC800939	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.067	0.067	0.073	0.042
18	<i>Prymnesium parvum</i> KJ756812	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.085	0.061	0.067	0.079
19	<i>Prymnesium patelliferum</i> AF289038	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.085	0.061	0.067	0.079
20	<i>Phaeocystis globosa</i> GQ118978	0.134	0.134	0.134	0.134	0.134	0.134	0.134	0.134	0.140	0.140	0.146	0.128

Таблица (Продолжение)

	№ последовательности из GenBank	13	14	15	16	17	18	19	20
1	Vostok08 KM365434	0.016	0.017	0.017	0.018	0.019	0.020	0.020	0.026
2	IOAC723S KC800941	0.016	0.017	0.017	0.018	0.018	0.020	0.020	0.026
3	IOAC724S JX393298	0.016	0.017	0.017	0.018	0.018	0.020	0.020	0.026
4	IOAC683S JX393297	0.016	0.017	0.017	0.018	0.018	0.020	0.020	0.026
5	CCAP 927/14 FJ946911	0.016	0.017	0.017	0.018	0.018	0.020	0.020	0.026
6	East China Sea KF998564	0.016	0.017	0.017	0.018	0.018	0.020	0.020	0.026
7	Ifremer-Argenton98 FJ946914	0.016	0.017	0.017	0.018	0.018	0.020	0.020	0.026
8	Tunisia FJ946912	0.016	0.017	0.017	0.018	0.018	0.020	0.020	0.026
9	CCMP 1324 FJ946913	0.017	0.017	0.017	0.018	0.019	0.020	0.020	0.026
10	<i>Isochrysis galbana</i> SAG13.92 FJ946910	0.016	0.018	0.018	0.018	0.019	0.017	0.017	0.026
11	<i>Isochrysis galbana</i> CCMP1323 FJ946909	0.017	0.019	0.019	0.019	0.020	0.018	0.018	0.027
12	<i>Coccolithus pelagicus</i> AJ544123	0.000	0.015	0.015	0.013	0.015	0.019	0.019	0.025
13	<i>Coccolithus braarudii</i> AJ544122		0.015	0.015	0.013	0.015	0.019	0.019	0.025
14	<i>Pleurochrysis scherffellii</i> AM936922	0.036		0.000	0.013	0.015	0.021	0.021	0.026
15	<i>Pleurochrysis carterae</i> AM936918	0.036	0.000		0.013	0.015	0.021	0.021	0.026
16	<i>Pleurochrysis elongata</i> AM936919	0.030	0.030	0.030		0.012	0.022	0.022	0.027
17	<i>Pleurochrysis roscoffensis</i> KC800939	0.042	0.042	0.042	0.024		0.022	0.022	0.028
18	<i>Prymnesium parvum</i> KJ756812	0.079	0.085	0.085	0.097	0.103		0.000	0.024
19	<i>Prymnesium patelliferum</i> AF289038	0.079	0.085	0.085	0.097	0.103	0.000		0.024
20	<i>Phaeocystis globosa</i> GQ118978	0.128	0.140	0.140	0.140	0.159	0.128	0.128	

ПРИЛОЖЕНИЕ XIV

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