

Сравнительный анализ молекулярных маркеров для идентификации зеленых микроводорослей (Chlorophyta)

Н.В. Кулакова¹, И.Н. Егорова²

1 – Лимнологический институт СО РАН, kulakova@lin.irk.ru

2 – Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН

Comparative analysis of molecular markers for identification of green microalgae (Chlorophyta)

N.V. Kulakova¹, I.N. Egorova²

1 – Limnological Institute, SB RAS, kulakova@lin.irk.ru

2 – Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS

Аннотация

Молекулярно-генетические методы находят все более широкое применение в изучении микроводорослей. Исследование молекулярных маркеров позволяет идентифицировать микроводоросли, определять их эволюционные взаимоотношения, анализировать видовое разнообразие в составе сообществ. Значительное пополнение баз данных нуклеотидных последовательностей эукариотических микроводорослей в последние годы способствует расширению спектра ядерных и пластидных молекулярных маркеров, необходимых для определения и уточнения их таксономического положения.

Видовая идентификация микроводорослей с помощью молекулярно-генетических маркеров является важным инструментом для уточнения и определения таксономического положения и филогенетических взаимоотношений организмов, в дополнение к установлению видовой принадлежности по морфологическим признакам. Среди большого многообразия молекулярных маркеров для идентификации и баркодинга эукариот, их применение для микроводорослей имеет некоторые особенности. Универсальными для всех эукариот являются молекулярные маркеры ядерного генома, малой субъединицы рРНК, ITS1 и ITS2, ввиду множественности копий рРНК в клетке и консервативности праймеров для их амплификации.

В базе данных GenBank для водорослей филума Chlorophyta наибольшее количество последовательностей представлено для гена малой субъединицы рибосом 18S (>16 тыс.). Анализ 18S рРНК позволяет проследить филогенетические отношения на уровне рода, тогда как на видовом уровне его разрешающая способность часто бывает недостаточна. Следует отметить, что ген 18S рРНК существенно варьирует по длине у различных видов микроводорослей, благодаря присутствию вставок, что часто затрудняет его амплификацию и усложняет выравнивание нуклеотидных последовательностей для филогенетического анализа.

Спейсеры ITS1–ITS2 достаточно вариабельны для видовой идентификации и популяционных исследований. Они хорошо представлены в базах данных. Так, в GenBank для Chlorophyta имеется >15 тыс. последовательностей ITS.

Все большее применение в исследованиях находит и хлоропластный ген большой субъединицы RuBisCO (rbcL), ранее предложенный для баркодинга высших растений Medlin (Medlin et al., 2007). В GenBank насчитывается >7,5 тыс. последовательностей rbcL для зеленых микроводорослей. Сравнение ITS и rbcL для идентификации пресноводных микроводорослей (Nadi et al., 2016) указывает на преимущество использования маркера ITS2, ввиду его более эффективной амплификации и лучшей представленности в базах данных.

В работе Vieira с соавторами (Vieira et al., 2016) было показано, что наибольшее число штаммов Chlorophyceae успешно амплифицируется с помощью праймеров для гена фактора элонгации *tufA*, по сравнению с *rbcL* и ITS, но применение маркера *tufA* ограничивается лишь небольшим числом исследований.

Для оценки биоразнообразия и анализа эволюционных отношений микроводорослей успешно используются пластидные гены 16S, 23S, *tufA*, спейсер гена RuBisCO, *psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbC*, *psbD*, митохондриальные *cox1*, *cox2*, ядерный ген 28S рРНК и их комбинации. Однако эти маркеры менее представлены в базах данных, что усложняет их использование для видовой идентификации.

Выбор молекулярных маркеров зависит от условий и задач исследования. Для анализа разнообразия микроводорослей в сообществах применение пластидных маркеров может иметь преимущество в виду того, что позволяет амплифицировать только организмы с хлоропластами и избегать сопутствующей амплификации других доминирующих организмов сообщества, таких как бактерии и грибы, как это происходит при использовании универсальных рибосомальных маркеров.

С активным развитием методов массового параллельного секвенирования, анализ полногеномных геномов хлоропластов, а также других генов и межгенных районов, полученных в результате полногеномного секвенирования (более 31 тыс. сборок депонировано в базы данных), находит все более широкое применение для молекулярной идентификации организмов и исследования их эволюционных отношений. Данные полногеномного секвенирования позволяют одновременно анализировать новые и универсальные молекулярные маркеры (Lin et al., 2017) и исследовать несколько генов и межгенных районов ядерного, пластидного и митохондриального происхождения.

Список литературы

- Hadi S.I., Santana H., Brunale P.P., Gomes T.G., Oliveira M.D., Matthiensen A., Oliveira M.E., Silva F.C., Brasil B.S. 2016. DNA Barcoding Green Microalgae Isolated from Neotropical Inland Waters. *PLoS One*. **11**(2): e0149284.
- Lin G.M., Lai Y.H., Audira G., Hsiao C.D. 2017. A Simple Method to Decode the Complete 18-5.8-28S rRNA Repeated Units of Green Algae by Genome Skimming. *Int. J. Mol. Sci.* **18**(11). pii: E2341.
- Medlin L., Metfies K., John U., Olsen, J. 2007. Alga Molecular Systematics: A review of the past and prospects for the future. In: *Unravelling the algae : the past, present, and future of algal systematics* (ed. Brodie J., Raton J.L.B.): 341–353.
- Vieira H.H., Bagatini I.L., Guinart C.M., Vieira A.A.H. 2016. *TufA* gene as molecular marker for freshwater Chlorophyceae. *Algae* **31**(2): 155–165.