

© Е. В. Романова, Л. С. Кравцова,
Л. А. Ижболдина, И. В. Ханаев,
Д. Ю. Щербаков

Лимнологический институт
Сибирского отделения
Российской академии наук
(ЛИН СО РАН), Иркутск

✿ В заливе Лиственничный озера Байкал впервые наблюдается явление локального эвтрофирования. С помощью морфологического и молекулярно-генетического методов определены роды и виды нитчатых водорослей, которые формируют обильные зоны обрастания дна участка озера, подверженного антропогенному воздействию. Присутствие видов рода *Spirogyra* Link., не характерного для этой части озера, а также распространение их вместе с видом *Ulothrix zonata* (Web. et Mohr) Kütz. на нетипично большой глубине говорит о серьезном нарушении структуры фитоценоза исследованного участка Байкала.

✿ **Ключевые слова:** эвтрофирование; нитчатые водоросли; молекулярно-генетический анализ; молекулярный маркер; 18S рДНК.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЗЕЛЕННЫХ НИТЧАТЫХ ВОДОРосЛЕЙ ИЗ РАЙОНА ЛОКАЛЬНОГО БИОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОЗЕРА БАЙКАЛ (ЗАЛИВ ЛИСТВЕННИЧНЫЙ) С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКЕРА 18S рДНК

ВВЕДЕНИЕ

Идентификация видов водорослей различных водных экосистем необходима для решения многих фундаментальных и прикладных задач современной биологии. Водоросли — индикаторы трофического статуса водоема и различных видов загрязнения (Mohapatra, Mohanty, 1992; Prasanna et al., 2011; Rai et al., 2008). Традиционно используемый способ идентификации водорослей по их морфологическим признакам имеет ряд недостатков. Часто такое определение трудоемко за счет того, что требует специального оборудования и условий, а также высокой квалификации исследователя. Поэтому представителей некоторых таксонов водорослей удается определить только до рода. Такая проблема возникает в частности при определении нитчатых водорослей (Pang et al., 2010; Prasanna et al., 2011).

С развитием методов молекулярной биологии появилась возможность использовать для определения видов нуклеотидные последовательности различных генов, интронов и спейсеров — молекулярные маркеры (Hebert et al., 2003). В настоящее время для идентификации водорослей используют пластидные (*rbcL*, *tufA*, *atpB*, *matK*, *UPA*) и ядерные (18S и 28S рДНК, ITS1 и ITS2) маркеры. Выбор маркера зависит от генетических особенностей исследуемой группы водорослей (Andreakis et al., 2004; Buchheim et al., 2011; Hayden et al., 2002; Leliaert et al., 2007; Saunders, Kucera, 2010).

Данные о нуклеотидных последовательностях позволяют получать новые сведения о биологическом разнообразии, решать проблемы систематики и эволюции отдельных видов и таксонов. В частности, быстрая молекулярная идентификация видов водорослей оказалась полезной для оценки изменения экосистемы под воздействием антропогенного загрязнения (Prasanna et al., 2011; Rai et al., 2008).

В 2011 г. в прибрежной зоне залива Лиственничный южного Байкала возле поселка Листвянка было отмечено зарастание дна зелеными нитчатыми водорослями, вызванное высоким содержанием биогенных элементов в придонных слоях воды озера (Кравцова и др., 2012). Эвтрофирование водных экосистем — часто наблюдаемое явление в современном мире (Auer et al., 2010; Depew et al., 2011; Higgings et al., 2005; Lowe, Pillsbury, 1995; Ostendorp et al., 2004; Skubinna et al., 1995; Smith et al., 1999). При эвтрофировании наблюдается цветение зеленых водорослей как в пресноводных, так и в морских экосистемах (Hiraoka et al., 2011; Nozaki et al., 2003; Smith et al., 2006). Как правило, увеличение биогенной нагрузки приводит к изменению структуры фитоценозов, массовому развитию нитчатых водорослей, чуждых естественному состоянию водоемов (Покровская и др., 1983). Озеро Байкал является крупнейшим природным резервуаром пресной воды на планете, поэтому наблюдаемый в настоящее время процесс обильного зарастания дна требует всестороннего изучения.

Цель работы заключалась в определении видов зеленых нитчатых водорослей, в массе развивающихся на дне залива Лиственничный озера Байкал, с использованием морфологических и молекулярно-генетических методов исследования.

Поступила в редакцию 30.10.2012
Принята к публикации 24.09.2013

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В июле—сентябре 2011 г. сотрудниками Лимнологического института СО РАН проведены исследования донных фитоценозов в прибрежной зоне Лиственничного залива озера Байкал. Для определения границ распространения нитчатых водорослей были проложены трансекты, протяженностью 100 м по дну озера. Трансекты располагались на глубинах от 0 до 10 м напротив крайних точек залива: мыс (м.) Толстый (трансекта № 1) и м. Березовый (трансекта № 7), а также напротив пос. Листвянка (трансекты № 2—6) и в фоновом районе в 5 км севернее м. Березовый (трансекта № 8) (рис. 1).

В зарослях макрофитов из учетной рамки площадью 0,16 м² (трансекты № 3 и 4) было собрано 18 количественных проб водорослей для определения их видового состава и фитомассы (г/м²). Пробы промывали через сито из мельничного газа № 35 и фиксировали 4 % формалином. В лабораторных условиях видовой состав водорослей определяли под световым микроскопом Amplival при увеличении 8×40 и 8×100.

Дополнительно, для морфологического анализа и молекулярно-генетических исследований, были собраны живые образцы нитчатых водорослей в зоне их обильной вегетации на глубине 3 м (трансекты № 3 и 4). Строение хлоропластов живых водорослей (20 образцов нитей) исследовали с помощью микроскопа Axiovert 200 при увеличении 8×40, а также конфокального микроскопа LSM-710 (Carl Zeiss, Germany) с тем же увеличением в спектре от 610 до 726 нм с последующим их фотографированием.

Для молекулярно-генетических исследований были отобраны морфологически различные нити живых водорослей в количестве 30 образцов. Выделение ДНК проводили по модифицированному методу Дойля и Диксона (Doyle, Dickson, 1987). Фрагмент 18S рДНК (около 1800 п. н.) амплифицировали с помощью наборов АмплиСенс-200—1 («АмплиСенс», Россия) с использованием праймеров F: 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3', R: 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACACCTACG-3' (Katana et al., 2001). Полимеразная цепная реакция проводилась в следующем режиме: первичная денатурация при 95 °С — 3 мин; последующие 30 циклов — денатурация при 95 °С — 20 с, отжиг при 56 °С — 20 с, элонгация при 72 °С — 2 мин. Продукты амплификации очищали от неспецифических фрагментов электрофорезом в 0,8 %-м агарозном геле с бромистым этидием.

Расшифровку нуклеотидных последовательностей осуществляли в Межинститутском центре секвенирования ДНК в г. Новосибирске (<http://sequest.niboch.nsc.ru/>). Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в базу данных GenBank под номерами: JX491142—JX491160. Из них для построения филогенетических древ использовали только различающиеся последовательности, а также следующие фрагменты 18S рДНК зеленых водорослей из базы данных GenBank: AB049418, AB025423, AJ428072, AJ416103, AJ428074, AJ428075, AJ428076, AJ549231, AJ853448, AJ853449, AY303600, AY476827, AY476808, DQ821514, DQ821515, DQ821516, EU099917, FN562430, FR765755, GQ477052, GQ477056, JQ290270, JQ290271, JQ290272, JQ290273, JQ290274, JQ290275, X70705, Z47999. Выравнивание



Рис. 1. Схема залива Лиственничного озера Байкал. 1—8 — трансекты

последовательностей и вычисление генетических дистанций проводили с помощью программы MEGA5 (Tamura et al., 2011). Модель нуклеотидных замен (GTR+G) определили программой jModelTest ver. 3.8 (Posada, 2008). Филогенетические деревья строили байесовским методом (BI) с использованием программы MrBayes v.3.2 (Ronquist et al., 2011). Запускали «горячую» и «холодную» Марковские цепи в течение 1,5 млн циклов. Программа записывала каждое 1000 сгенерированное дерево, при этом отбрасывала первые 25 % из выборки и на основе остальных строила финальное дерево.

Филогенетические деревья строили отдельно для представителей каждого рода байкальских водорослей. Для построения дерева рода *Ulothrix* Kütz. кроме последовательностей байкальских водорослей были использованы последовательности видов из семейства Ulotrichaceae (порядок Ulotrichales) и несколько видов рода *Mychonastes* Simp. et Van Valk. семейства Scotiellocoystoidaceae (порядок Chlamydomonadales).

Для построения дерева представителей рода *Spirogyra* использовали пять уникальных гаплотипов из озера Байкал. *Spirogyra* sp. 1 включает три гаплотипа, первый из которых представлен последовательностью JX491143, второй — последовательностями JX491150 и JX491155, третий — JX491153, JX491159, JX491160. Гаплотип *Spirogyra* sp. 2 представлен одной последовательностью — JX491157, а гаплотип *Spirogyra* sp. 3 включает пять последовательностей: JX491146, JX491147, JX491148, JX491149, JX491156. В качестве аутгруппы взят вид *Mougeotia scalaris* Hassall. С целью определения филогенетических взаимоотношений байкальских видов с известными видами рода *Spirogyra* было построено сетчатое дерево на основе последовательностей 18S рДНК длиной 1630 п. н. Сетчатое дерево строили с помощью программы SplitsTree v.4.12.6 (Huson, Bryant, 2006).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Картирование зоны распространения мейо- и макрофитов показало, что зеленые нитчатые водоросли интенсивно развиваются на глубинах 0–10 м на протяжении 4 км вдоль береговой линии от м. Березовый до истока р. Ангара (трансекты № 2–7). Напротив пос. Листвянка на глубинах 3–10 м нитчатые водоросли образуют маты (сомкнутые заросли в виде тяжей нитей около 50–70 см в длину) и отсутствуют у м. Толстого и в фоновом районе (трансекты № 1 и 8). В составе нитчатых водорослей были выявлены представители родов *Ulothrix* и *Spirogyra*. Фитомасса водорослей рода *Spirogyra* в отдельных пробах достигала 50 г/м², а *Ulothrix* — 137 ± 39 г/м². В целом на долю нитчатых водорослей приходилось 63 % общей фитомассы мейо-макрофитов.

Согласно морфологическому анализу, проведенному Л. А. Ижболдиной с использованием светового микроскопа, среди нитчатых водорослей отмечены морфоло-

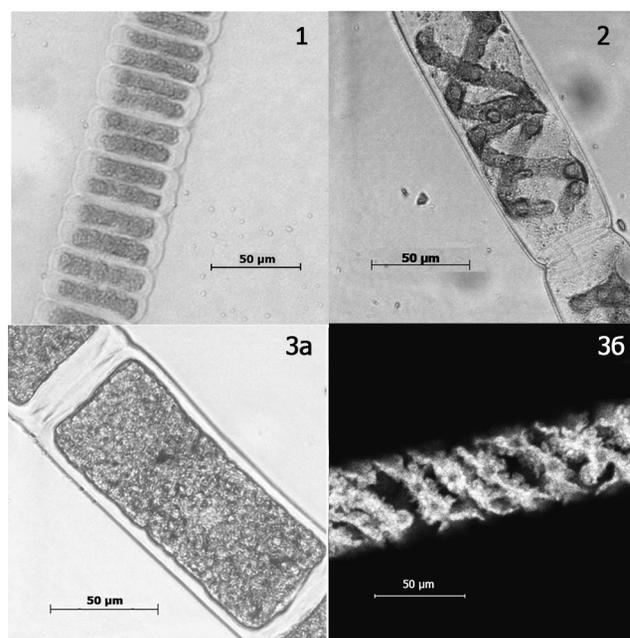


Рис. 2. Форма хлоропластов представителей родов *Ulothrix* (1) и *Spirogyra* (2, 3а) под световым и конфокальным (3б) микроскопами

гически различные представители рода *Spirogyra*, имеющие клетки с плотным пластинчатым хлоропластом, и клетки с одним или несколькими спиральными хлоропластами, а также три вида рода *Ulothrix*: *U. zonata*, *U. tenerrima* (Kütz.) Kütz., *U. tenuissima* Kütz. Среди представителей рода *Ulothrix* доминировал *U. zonata*.

Живые нити водорослей обоих родов были дополнительно исследованы с использованием светового и конфокального микроскопов. Спиральная структура хлоропласта некоторых образцов рода *Spirogyra* более отчетливо просматривалась под конфокальным микроскопом (рис. 2).

Поскольку в результате исследования морфологических признаков байкальских водорослей рода *Spirogyra* невозможно было идентифицировать виды, и в определении видов рода *Ulothrix* также имелись трудности из-за слабых морфологических отличий молодых нитей *U. zonata* и *U. tenerrima* (Ижболдина, 2007), мы провели молекулярно-генетический анализ образцов. В данной работе были получены 19 последовательностей 18S рДНК из образцов живых нитей водорослей. Сопоставление их с базой данных GenBank, проведенное программой BLAST, показало, что семь из них имеют наибольшее сходство с последовательностями, принадлежащими видам рода *Ulothrix*, а остальные двенадцать — представителям рода *Spirogyra*.

Все фрагменты 18S рДНК байкальских водорослей рода *Ulothrix* (JX491142, JX491144, JX491145, JX491151, JX491152, JX491154, JX491158) имеют одинаковую последовательность нуклеотидов в анализируемой области и представлены на филогенетическом древе единым гаплотипом. Исследованный вид бай-

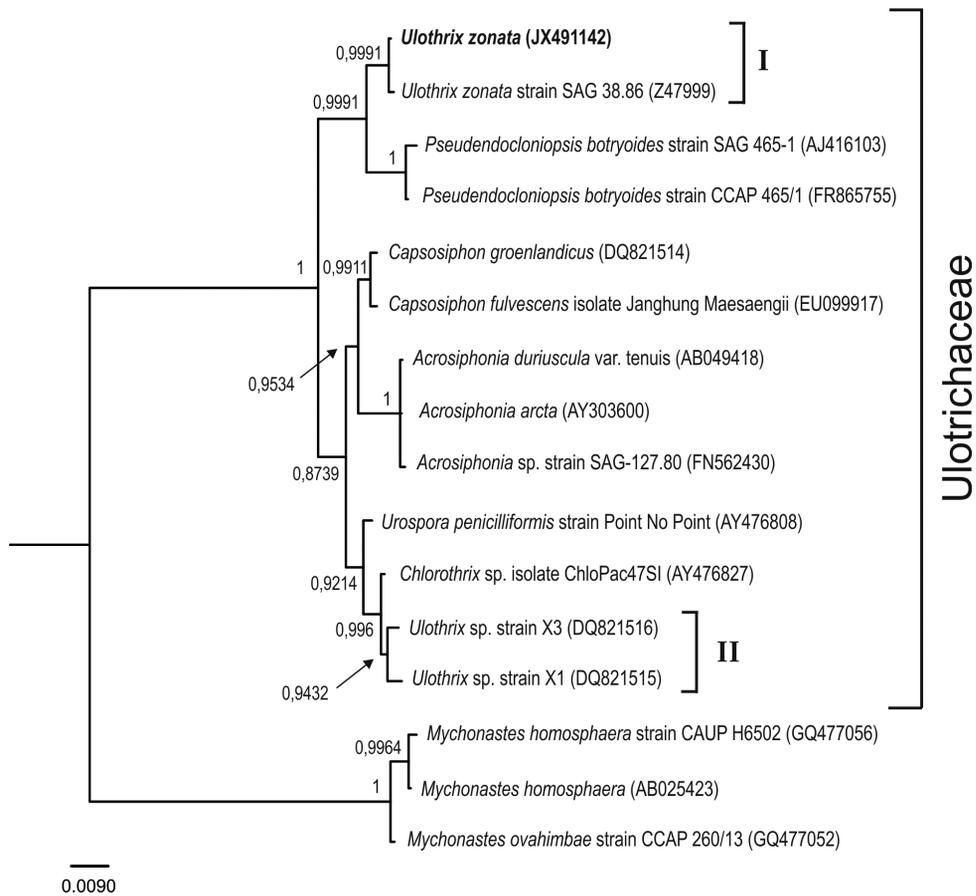


Рис. 3. Филогенетическое древо, построенное методом Байеса (BI) на основе фрагментов 18S рДНК байкальских водорослей и других представителей семейства Ulotrichaceae. Жирным шрифтом выделен байкальский вид *Ulothrix zonata*, в скобках указан номер одной из идентичных последовательностей в GenBank. Цифры на древе — апостериорные вероятности. Масштабная линия отражает число замен на нуклеотидную позицию

кальских водорослей с высокой степенью достоверности кластеризуется с видом *Ulothrix zonata* штамм SAG 38.86 (Чешская Республика) (рис. 3). Таким образом, результаты идентификации молодых нитей, сходных по морфологическим признакам с *U. tenerrima*, совпали с результатом молекулярно-генетического анализа. Род *Ulothrix*, судя по топологии полученного древа, не является монофилетичным (рис. 3). *Ulothrix zonata* образует кладу с высокой поддержкой со штаммами вида *Pseudendoconiopsis botryoides* Vischer, а два других вида *Ulothrix sp.* (штамм X1 и X3 с острова Амакнак, США) кластеризуются с видом *Chlorothrix sp.* (изолят ChloPac47SI).

На филогенетическом древе все исследованные таксоны рода *Spirogyra*, за исключением *Spirogyra sp.* штамм M 1810, с высокой степенью вероятности разделились на две клады (рис. 4).

Кладу I образуют байкальские гаплотипы *Spirogyra sp.* 1 (JX491143, JX491150, JX491160) и *Spirogyra sp.* 2 (JX491157), имеющие нити с четко различимой спиральной формой хлоропласта, а также разные штаммы *Spirogyra sp.* из базы данных GenBank,

и вид *Sirogonium sticticum* (Smith) Kütz. Байкальские водоросли, входящие в кладу I, генетически не однородны. Внутривидовые дистанции между разными гаплотипами *Spirogyra sp.* 1 составляет 0,1–0,2 %, в то время как между ними и гаплотипом *Spirogyra sp.* 2 они достигают 1,0–1,1 %. Между видами *Sirogonium sticticum* и *Spirogyra sp.* 1 генетические расстояния составляют 3,8–3,9 %, а между данным видом и разными штаммами *Spirogyra sp.* — 2,0–3,8 % соответственно.

Кладу II, с генетическими дистанциями между таксонами 0,8–5,7 %, образуют байкальский вид *Spirogyra sp.* 3 (JX491146), полученный из нитей с плотно упакованным хлоропластом в виде пластинки с неровными краями (рис. 2), и два штамма из базы данных GenBank: *Spirogyra sp.* SVCK 253 и *Spirogyra sp.* M-2157. Генетическая дистанция между гаплотипами *Spirogyra sp.* 1 и *Spirogyra sp.* 3 составляет от 9,1 до 9,3 %, а между *Spirogyra sp.* 2 и штаммами *Spirogyra sp.* 3,0–9,0 % соответственно (рис. 4).

На сетчатом древе (рис. 5) показано положение байкальских гаплотипов рода *Spirogyra* и шести известных видов этого рода.

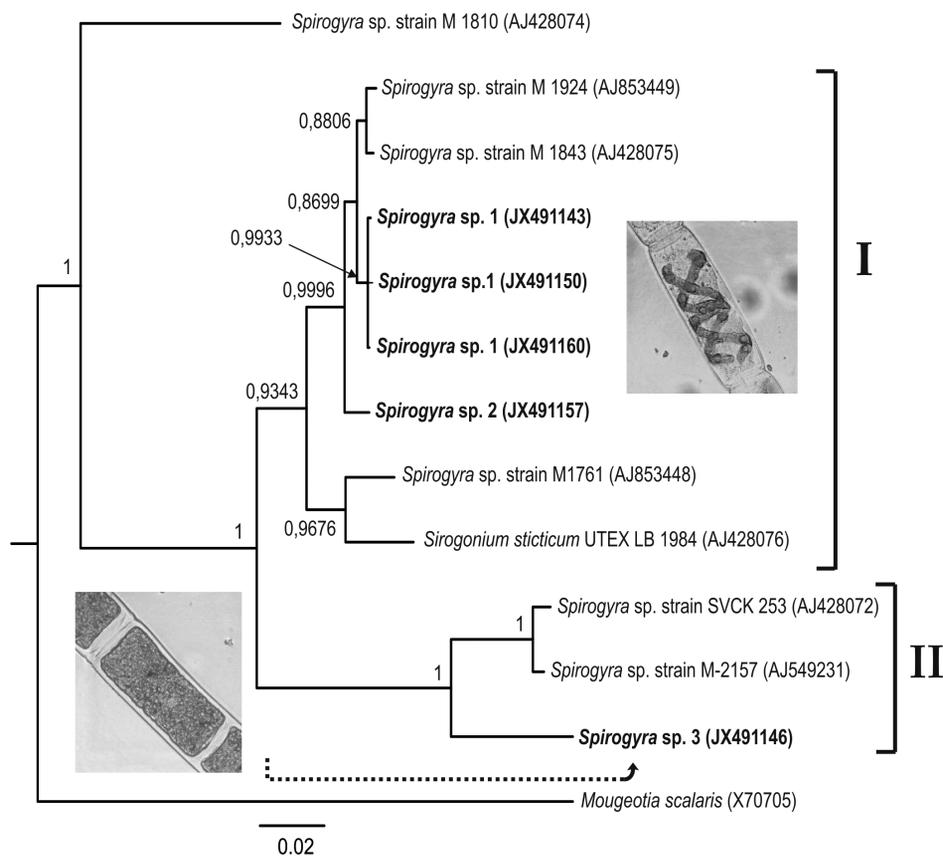


Рис. 4. Филогенетическое древо, построенное методом Байеса (BI) на основе фрагментов 18S рДНК видов рода *Spirogyra* и *Sirogonium*. Жирным шрифтом выделены байкальские виды рода *Spirogyra*. Напротив каждого вида в скобках указан номер одной из идентичных последовательностей в GenBank. Цифры на древе — апостериорные вероятности. Масштабная линия отражает число замен на нуклеотидную позицию

На сетчатом древе уникальные байкальские гаплотипы распределились на три ветви. На ветви I располагаются гаплотипы *Spirogyra* sp. 1 (JX491143, JX491150, JX491160), на ветви II — *Spirogyra* sp. 2 (JX491157), а на ветви III — *Spirogyra* sp. 3 (JX491146). Таксоны на ветвях I и II оказались наиболее генетически близкими к виду *S. maxima* (Hassall) Wittr. изолят UTEX LB 2495 (Флорида, США), а на ветви III — к виду *S. occidentalis* (Trautv.) Czur. изолят UTEX LB 1683 (Аризона, США) и *S. crassispina* C. C. Jao изолят UTEX LB 1273 (происхождение неизвестно).

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование морфологических признаков образцов нитчатых водорослей из загрязненного участка залива Лиственничный позволило определить присутствие в составе фитоценоза видов рода *Ulothrix*, среди которых доминирует вид *U. zonata*. Данный вид в Байкале растет на каменистом грунте на глубинах от 0 до 1,5 м прибрежной зоны, образуя первый пояс водной растительности в летний период, практически по всему побережью озе-

ра (Ижболдина, 1990, 2007). Данные морфологического анализа о доминировании в загрязненной части залива вида *U. zonata*, на несвойственной для него глубине, согласуются с результатами молекулярно-генетических исследований. Судя по небольшому генетическому расстоянию между европейским (штамм SAG 38.86) и байкальским видами *Ulothrix zonata* (рис. 3), а также высокой поддержке данной клады на филогенетическом древе, можно сказать, что идентификация байкальского вида не вызывает сомнений.

Стоит отметить, что представители рода *Ulothrix* на древе не образуют единой клады. Возможно, последовательности, находящиеся в разных кладах, из-за неточной идентификации, принадлежат видам разных родов. Однако для многих видов водорослей не исключена полифилетичность. Филогенетические отношения внутри рода *Ulothrix* в настоящее время мало исследованы. Тем не менее имеются литературные данные, свидетельствующие о существовании полифилетичности разных родов класса Ulvophyceae (порядок Ulvales), в частности, рода *Pseudendozonium* Wille и рода *Monostroma* Thur. по фрагменту 18S

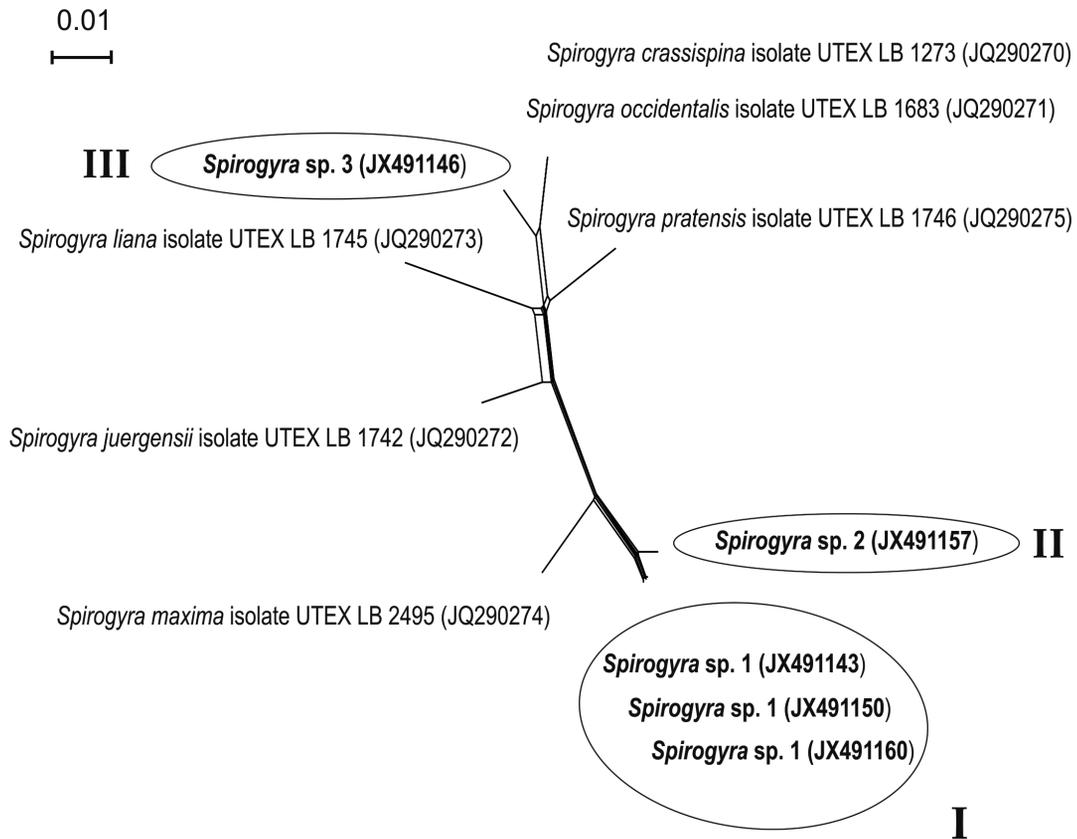


Рис. 5. Сетчатое древо, построенное программой SplitsTree ver. 4.12.6 на основе фрагментов 18S рДНК байкальских водорослей и известных видов рода *Spirogyra*. Жирным шрифтом выделены байкальские гаплотипы. Напротив каждого гаплотипа в скобках указан номер одной из идентичных последовательностей в GenBank. Масштабная линия отражает число замен на нуклеотидную позицию

рДНК и гену *rbcL* (Friedl, 1996; Hayden et al., 2002). Также по маркерам 18S и 28S рДНК была обнаружена полифилетичность родов *Cladophora* Kütz., *Anadyomene* J. V. Lamour., *Microdictyon* Decne, *Struvea* Sonder., *Valonia* C. Agardh, принадлежащих к порядку Cladophorales, а также парафилетичность рода *Dictyosphaeria* Decne. (Leliaert et al., 2007, 2009). Несоответствие генетической и морфологической систематик некоторых родов водорослей авторы объясняют тем, что последняя была основана на анализе ограниченного количества морфологических признаков в силу простой организации многих представителей низших растений (Leliaert et al., 2007).

Наряду с водорослями рода *Ulothrix*, в пробах из Лиственничного залива выявлены представители рода *Spirogyra*, различающиеся по морфологическим признакам (размеру клеток и форме хлоропласта) (рис. 2). В целом определение видов, относящихся к классу Zygnemataophyceae (Conjugatophyceae) сопряжено с определенными трудностями. Видоспецифичные признаки у вегетативных нитей (число хлоропластов и степень их скрученности, длина клеток и пр.) плохо

различимы и могут меняться в зависимости от продолжительности жизни водорослей, а также условий их произрастания (Ижболдина, 2007; Рундина, 1998; Hoshaw et al., 1985). Водоросли рода *Spirogyra*, распространенные повсеместно в пресных водоемах, в оз. Байкал, тем не менее встречаются только в закрытых мелководных, хорошо прогреваемых бухтах среди зарослей высших растений (Ижболдина, 1990, 2007). Для вод открытого Байкала этот род не типичен. Исключением был случай нахождения нитей водорослей этого рода в районе сброса теплых сточных вод целлюлозно-бумажного комбината в 1985 г. (Ижболдина, 1985). Лиственничный залив имеет характерный для открытых вод Байкала температурный режим (в середине лета температура в верхних слоях воды прогревается до 10–12 °С, а в толще составляет около 8–9 °С), который не является благоприятным для развития видов рода *Spirogyra* (Ижболдина, 1990). По-видимому, обильный рост видов этого рода и их распространение на глубинах от 3 до 10 м в восточной части Лиственничного залива можно объяснить избытком биогенных веществ (Кравцова и др. 2012).

Более надежным видовым признаком у водорослей класса Zygnematorphyceae является тип конъюгации. Конъюгация нитчатых водорослей — быстро протекающий процесс (Ижболдина, 2007). На момент сбора проб для данного исследования конъюгации не происходило, а наблюдать ее в искусственных условиях не было возможности, так как для этого требуется длительное и трудоемкое культивирование (Algal culturing techniques, 2005, p. 13; Ikegaya et al., 2012; Simons et al., 1984; Stabenau, Säftel, 1989). Данные молекулярного анализа позволили подтвердить принадлежность исследованных образцов нитей водорослей, различающихся по степени скрученности спиралевидного хлоропласта, к роду *Spirogyra*. Судя по филогенетическому древу, байкальские представители рода *Spirogyra* принадлежат трем видам с различной структурой хлоропласта (рис. 4). Так как генетическая дистанция между гаплотипами *Spirogyra* sp.1 и *Spirogyra* sp. 2 на порядок больше, чем данный показатель в группе гаплотипов *Spirogyra* sp.1, с большой долей вероятности можно предположить, что *Spirogyra* sp.1 и *Spirogyra* sp. 2 относятся к разным видам. Это предположение подтверждает также топология сетчатого древа, где представители *Spirogyra* sp.1, *Spirogyra* sp. 2 и *Spirogyra* sp. 3 образуют три отдельные ветви (рис. 5). Тем не менее достоверно отнести байкальских представителей к какому-либо известному виду данного рода сложно. Очевидно, что байкальские виды, находящиеся на ветвях I и II и имеющие четко различимый спиральный хлоропласт, генетически наиболее близки к виду *S. maxima*, а вид с плотным хлоропластом, образующий ветвь III, — близок к видам *S. occidentalis* и *S. crassispina* (рис. 5). Стоит отметить, что последовательности 18S рДНК, полученные Чен с соавторами (Chen et al., 2012) из образцов водорослей двух видов: *Spirogyra occidentalis* изолят UTEX LB 1683 и *Spirogyra crassispina* изолят UTEX LB 1273, оказались идентичными. Данные виды ранее были идентифицированы на основе их морфологических признаков, которые, как неоднократно подчеркивают эти авторы, не являются достаточно надежными для решения задач систематики рода *Spirogyra* (Chen et al., 2012).

Обращает на себя внимание достаточно высокая генетическая гетерогенность байкальских видов рода *Spirogyra*, составляющая от 1,1 до 9,3%. О степени генетической гетерогенности рода *Spirogyra* также говорят данные, полученные недавно Чен с соавторами на основании исследования 130 фрагментов 18S рДНК (1635 п. н.) различных видов и изолятов рода *Spirogyra*. Исследованные таксоны образуют восемь клад. Величина генетической дистанции внутри этих клад варьировала от 0,25% до 5,17%, а между кладами от 5,09% до 16,74%, что превышает подобные значения для видов из порядков Zygnematales и Desmidiaceae. Такая гетерогенность внутри рода *Spirogyra*, по мнению авторов, является следствием разницы в скоростях эволюции

в группе исследуемых видов (Chen et al., 2012). Величины генетических дистанций внутри и между кладами, вычисленные в нашем исследовании, входят в соответствующие интервалы, определенные в работе Чен с соавторами.

Интересным, на наш взгляд, является и тот факт, что в состав клады II, помимо представителей рода *Spirogyra*, входит также вид *Sirogonium sticticum* (Smith) Kütz. (рис. 4). Представители рода *Sirogonium* сходны по многим морфологическим признакам с представителями рода *Spirogyra*, но при этом отличаются по количеству и форме хлоропластов, структуре зигоспоры, типу конъюгации и др. признакам (Пундина, 1998; Drummond et al., 2005; Hoshaw, 1980; Hull et al., 1985). Результат филогенетического анализа, проведенного Драммонд с соавторами на основании последовательностей гена *rbcL*, позволил им предположить, что *Spirogyra* и *Sirogonium* являются разными родами (Drummond et al., 2005). Однако обоснованность разделения родов *Sirogonium* и *Spirogyra* у других исследователей вызывает сомнение (Chen et al., 2012; Gontcharov et al., 2003; Kim et al., 2006). Данные о топологии филогенетического древа по 18S рДНК и генетических дистанциях между последовательностями представителей этих родов, полученные в процессе работы, позволяют нам согласиться с мнением, что вид *Sirogonium sticticum* справедливо будет отнести к роду *Spirogyra*.

Проведенное нами исследование позволило определить таксоны нитчатых водорослей, получившие массовое развитие в северо-восточной части залива Лиственничный — зоны локального эвтрофирования озера Байкал. Нитчатые водоросли, доминирующие по биомассе в загрязненном участке, представлены видом *Ulothrix zonata*, распространившимся на нетипично большой для него глубине. Кроме того, в состав фитоценоза этой части залива входят три вида рода *Spirogyra*, представители которого ранее встречались лишь в акватории некоторых хорошо прогреваемых бухт озера Байкал. Таким образом, в связи с возросшей рекреационной нагрузкой на прибрежную зону залива Лиственничный, произошло изменение состава донной альгофлоры напротив поселка Листвянка. Результаты работы на основе комплексного подхода, совмещающего морфологический и молекулярно-генетический методы идентификации таксонов нитчатых водорослей, важны для дальнейшего исследования разнообразия флоры оз. Байкал и биологических особенностей видов.

Работа выполнена при поддержке госконтракта по Федеральной целевой программе № 2012-1.4-12-999-1016-006, мероприятие «Поддержка развития внутрироссийской мобильности научных и научно-педагогических кадров путем выполнения научных исследований молодыми учеными и преподавателями в научно-образовательных центрах», Федеральной Целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновацион-

ной России на 2009–2013 гг.» № 8099, а также программы СО РАН «Виварии, коллекции клеточных культур, уникальных штаммов бактерий, микроорганизмов, коллекции растений».

ЛИТЕРАТУРА

- Ижболдина Л. А. (1985) **Количественное распределение эндемичных видов макрофитов вдоль открытых побережий оз. Байкал**, Под ред. Галазия Г. И. *Круговорот вещества и энергии в водоемах: Структура и продуктивность растительных сообществ (фитопланктон, фитобентос, высшая водная растительность)*. Вып. 2. Иркутск; с. 31–32.
- Ижболдина Л. А. (1990) **Мейо- и макрофитобентос озера Байкал (водоросли)**. Иркутск: Изд-во ИГУ.
- Ижболдина Л. А. (2007) **Атлас и определитель водорослей бентоса и перифитона озера Байкал (мейо- и макрофиты) с краткими очерками по их экологии**. Новосибирск: Наука-Центр.
- Кравцова Л. С., Ижболдина Л. А., Ханаев И. В. и др. (2012) **Нарушение вертикальной зональности зеленых водорослей в прибрежной части залива Лиственничный озера Байкал**. *ДАН*. Т. 447(2): С. 227–229.
- Покровская Т. Н., Миронова Н. Я., Шилькрот Г. С. (1983) **Макрофитные озера и их евтрофирование**. М.: Наука.
- Рундина Л. А. (1998) **Зигнемовые водоросли России (Chlorophyta: Zygnematales)**. СПб: Наука.
- Algal culturing techniques (2005) In Andersen R. A., editor. San Diego: Academic Press.
- Andreakis N., Procaccini G., Kooistra W. H. C. F. (2004) **Asparagopsis taxiformis and Asparagopsis armata (Bonnemaisoniales, Rhodophyta): genetic and morphological identification of Mediterranean populations**. *Eur. J. Phycol.* V. 39: P. 273–283.
- Auer M. T., Tomlinson L. M., Higgins S. N., et al. (2010) **Great Lakes Cladophora in the 21st century: same algae-different ecosystem**. *J. Great Lakes Res.* V. 36: P. 248–255.
- Buchheim M. A., Keller A., Koetschan C. et al. (2011) **Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: towards an automated reconstruction of the green algal tree of life**. *PLoS One*. V. 6(2): e16931.
- Chen C., Barfuss M. H., Pröschold T., et al. (2012) **Hidden genetic diversity in the green alga Spirogyra (Zygnematales, Streptophyta)**. *BMC Evol. Biol.* V. 12: P. 1–13.
- Depew D. C., Houben A. J., Guildford S. J., Hecky R. E. (2011) **Distribution of nuisance Cladophora in the lower Great Lakes: Patterns with land use, near shore water quality and dreissenid abundance**. *J. Great Lakes Res.* V. 37: P. 656–671.
- Doyle J. J., Dickson E. (1987) **Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis**. *Taxon*. V. 36: P. 715–722.
- Drummond C. S., Hall J., Karol K. G., Delwiche C. F. (2005) **Phylogeny of Spirogyra and Sirogonium (Zygnematales) based on rbcL sequence data**. *J. Phycol.* V. 41: P. 1055–1064.
- Friedl T. (1996) **Evolution of the polyphyletic genus Pleurastrum (Chlorophyta): inferences from nuclear-encoded ribosomal DNA sequences and motile cell ultrastructure**. *Phycologia*. V. 35: P. 456–469.
- Gontcharov A. A., Marin B. A., Melkonian M. A. (2003) **Molecular phylogeny of conjugating green algae (Zygnematales, Streptophyta) inferred from SSU rDNA sequence comparisons**. *J. Mol. Evol.* V. 56: P. 89–104.
- Hayden H. S., Waaland J. R. (2002) **Phylogenetic systematics of the Ulvaceae (Ulvales, Ulvophyceae) using chloroplast and nuclear DNA sequences**. *J. Phycol.* V. 38: P. 1200–1212.
- Hebert P. D., Cywinska A., Ball S. L., et al. (2003) **Biological identifications through DNA barcodes**. *Proc. Biol. Sci.* V. 270: P. 313–321.
- Higgings S. N., Hecky R. E., Guildford S. J. (2005) **Modeling the growth, biomass, and tissue phosphorus concentration of Cladophora glomerata in eastern Lake Erie: Model description and field testing**. *J. Great Lakes Res.* V. 31: P. 439–455.
- Hiraoka M., Ichihara K., Zhu W., et al. (2011) **Culture and hybridization experiments on an Ulva clade including the Qingdao strain blooming in the Yellow Sea**. *Plos One*. V. 6(5): P. 1–6.
- Hoshaw R. W. (1980) **Systematics of the Zygnematales (Chlorophyceae). II. Zygosporangium wall structure in Sirogonium and a taxonomic proposal**. *J. Phycol.* V. 16: P. 242–250.
- Hoshaw R. W., Wang J.-C., McCourt R. M., et al. (1985) **Ploidal changes in clonal cultures of Spirogyra communis and implications for species definition**. *Am. J. Bot.* V. 72(7): P. 1005–1011.
- Hull H. M., Hoshaw R. W., Wang J.-C. (1985) **Interpretation of zygosporangium wall structure and taxonomy of Spirogyra and Sirogonium (Zygnematales, Chlorophyta)**. *Phycologia*. V. 24(2): P. 231–239.
- Huson D. H., Bryant D. (2006) **Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies**. *Mol. Biol. Evol.* V. 23(2): P. 254–267.
- Ikegaya H., Nakase T., Iwata K., et al. (2012) **Studies on conjugation of Spirogyra using monoclonal culture**. *J. Plant Res.* V. 125: P. 457–464.
- Katana A., Kwiatowski J., Spalik K., Zakrys B. (2001) **Phylogenetic position of Koliella (Chlorophyta)**

- as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA. *J. Phycol.* V. 37: P. 443–451.
27. Kim J.H., Kim Y.H., Cho G.Y., Boo S.M. (2006) **Plastid rbcL gene phylogeny of the genus *Spirogyra* (Chlorophyta, Zygnemataceae) from Korea.** *Korean J. Genet.* V. 28: P. 295–303.
 28. Leliaert F., De Clerck O., Verbruggen H., et al. (2007) **Molecular phylogeny of the Siphonocladales (Chlorophyta: Cladophorophyceae).** *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 44(3): P. 1237–1256.
 29. Leliaert F., Boedeker C., Pena V., et al. (2009) ***Cladophora rhodolithicola* sp. nov. (Cladophorales, Chlorophyta), a diminutive species from European maerl beds.** *Europ. Journal Phycol.* V. 44(2): P. 155–169.
 30. Lowe R.L., Pillsbury R.W. (1995) **Shifts in benthic algal community structure and function following the appearance of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in Saginaw Bay, Lake Huron.** *J. Great Lakes Res.* V. 21(4): P. 558–566.
 31. Mohapatra P.K., Mohanty R.C. (1992) **Determination of water quality of two water bodies using algal bioassay method.** *Phycos.* V. 31(1, 2): P. 77–84.
 32. Nozaki K., Darijav K., Akatsuka T., et al. (2003) **Development of green algae in the benthic algal community in a littoral sand-beach zone of Lake Biwa.** *Limnol.* V. 4: P. 161–165.
 33. Ostendorp W., Schmieder K., Jöhnk K. (2004) **Assessment of human pressures and their hydromorphological impacts on lake shores in Europe.** *Ecology Hydrobiol.* V. 4: P. 379–395.
 34. Pang S.J., Liu F., Shan T. F., et al. (2010) **Tracking the algal origin of the *Ulva* bloom in the Yellow Sea by a combination of molecular, morphological and physiological analyses.** *Mar. Environ. Res.* V. 69(4): P. 207–215.
 35. Posada D. (2008) **jModelTest: phylogenetic model averaging.** *Mol. Biol. Evol.* V. 25: P. 1253–1256.
 36. Prasanna R., Ratha S.K., Rojas C., et al. (2011) **Algal diversity in flowing waters at an acidic mine drainage “barrens” in central Pennsylvania, USA.** *Folia Microbiol. (Praha).* V. 56(6): P. 491–496.
 37. Rai U.N., Dubey S., Shukla O.P., et al. (2008) **Screening and identification of early warning algal species for metal contamination in fresh water bodies polluted from point and non-point sources.** *Environ. Monit. Assess.* V. 144(1, 3): P. 469–481.
 38. Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., et al. (2011) **MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space.** *Syst. Biol.* V. 61(3): P. 539–542.
 39. Saunders G.W., Kucera H. (2010) **An evaluation of rbcL, tufA, UPA, LSU and ITS as DNA barcode markers for the marine green macroalgae.** *Cryptogamie, Algologie.* V. 31(4): P. 487–528.
 40. Simons J., Van Beem A.P., de Vries P.J.R. (1984) **Induction of conjugation and spore formation in species of *Spirogyra*, Chlorophyceae, Zygnematales.** *Acta Bot. Neerl.* V. 33: P. 323–334.
 41. Skubinna J.P., Coon T.G., Batterson T.R. (1995) **Increased abundance and depth of submersed macrophytes in response to decreased turbidity in Saginaw Bay, Lake Huron.** *J. Great Lakes Res.* V. 21: P. 476–488.
 42. Smith V.H., Tilman G.D., Nekola J.C. (1999) **Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems.** *Environ. Pollut.* V. 100(1): P. 179–196.
 43. Smith V.H., Joye S.B., Howarth R.W. (2006) **Eutrophication of freshwater and marine ecosystems.** *Limnol. Oceanogr.* V. 51: P. 351–355.
 44. Stabenau H., Säftel W. (1989) **Induction of conjugation in *Mougeotia*.** *Canad. J. Bot.* V. 67(7): P. 2217–2218.
 45. Tamura K., Peterson D., Peterson N., et al. (2011) **MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods.** *Mol. Biol. Evol.* V. 28: P. 2731–2739.

IDENTIFICATION OF FILAMENTOUS GREEN ALGAE FROM AN AREA OF LOCAL BIOGENIC POLLUTION OF LAKE BAIKAL (LISTVENNICHNYY BAY) USING SSU 18S rDNA MOLECULAR MARKER

Romanova E. V., Kravtsova L. S., Izhboldina L. A., Khanaev I. V., Sherbakov D. Yu.

✳ **SUMMARY: Background.** A local eutrophication process is noted for the first time in Listvennichnyi bay in Lake Baikal. High level of biogenic elements in the water of the bay led to nuisance growth of filamentous algae. Rapid identification of these algae's taxa was necessary to assess ecosystem damage in the polluted area of the lake. **Materials and methods.** We determined a boundary of bottom fouling by locating transects ranging from 0 to 10 meters in different areas of the bay. Algae samples were examined using microscopic techniques as well as SSU 18S rDNA sequencing. Phylogenetic trees were estimated using Bayesian inference (BI) based on SSU alignment. **Results.** Our results showed intensive filamentous algae fouling in depth from 3 to 10 meters along the coastline of the eastern part of the bay. Morphological and molecular analysis demonstrated prevalence in samples of *Ulothrix zonata* (Web. et Mohr) Kütz. Using SSU 18S rDNA sequencing data we also showed presence of three species of *Spirogyra* Link. genus. **Conclusion.** Detection of *Spirogyra* species which are normally not typical for such areas of the lake along with *Ulothrix zonata* extended more deeply than usually observed reveals severe phytocenosis disturbance of the polluted part of Lake Baikal.

✳ **KEY WORDS:** eutrophication; filamentous algae; molecular analysis; molecular marker; SSU.

* REFERENCES (TRANSLITERATED)

1. Algal culturing techniques (2005). In Andersen R. A., editor. San Diego.: Academic Press.
2. Andreakis N., Procaccini G., Kooistra W. H. C. F. (2004) *Eur. J. Phycol.* V. 39: P. 273–283.
3. Auer M. T., Tomlinson L. M., Higgins S. N., et al. (2010) *J. Great Lakes Res.* V. 36: P. 248–255.
4. Buchheim M. A., Keller A., Koetschan C., et al. (2011) *PLoS One.* V. 6(2): e16931.
5. Chen C., Barfuss M. H., Pröschold T., et al. (2012) *BMC EV. Biol.* V. 12: P. 1–13.
6. Depew D. C., Houben A. J., Guildford S. J., Hecky R. E. (2011) *J. Great Lakes Res.* V. 37: P. 656–671.
7. Doyle J. J., Dickson E. (1987) *Taxon.* V. 36: P. 715–722.
8. Drummond C. S., Hall J., Karol K. G., Delwiche C. F. (2005) *J. Phycol.* V. 41: P. 1055–1064.
9. Friedl T. (1996) *Phycologia.* V. 35: P. 456–469.
10. Gontcharov A. A., Marin B. A., Melkonian M. A. (2003) *J. Mol. EV.* V. 56: P. 89–104.
11. Hayden H. V. S., Waaland J. R. (2002) *J. Phycol.* V. 38: P. 1200–1212.
12. Hebert P. D., Cywinska A., Ball S. L., et al. (2003) *Proc. Biol. Sci.* V. 270: P. 313–321.
13. Higgings S. N., Hecky R. E., Guildford S. J. (2005) *J. Great Lakes Res.* V. 31: P. 439–455.
14. Hiraoka M., Ichihara K., Zhu W., et al. (2011) *Plos One.* V. 6(5): P. 1–6.
15. Hoshaw R. W. (1980) *Journal Phycol.* V. 16: P. 242–250.
16. Hoshaw R. W., Wang J.-C., McCourt R. M., et al. (1985) *American Journal of Botany.* V. 72(7): P. 1005–1011.
17. Hull H. M., Hoshaw R. W., Wang J.-C. (1985) *Phycologia.* V. 24(2): P. 231–239.
18. Huson D. H., Bryant D. (2006) *Mol. Biol. EV.* V. 23(2): P. 254–267.
19. Ikegaya H., Nakase T., Iwata K., et al. (2012) *J. Plant Res.* V. 125: P. 457–464.
20. Izhboldina L. A. (1985) **Kolichestvennoe raspredelenie endemichnykh vidov makrofitov vdol' otkrytykh poberezhnykh ozera Baikal [Quantitative distribution of macrophytes' endemic species along open coasts of Lake Baikal]**. In: Galaziy G. I., editor. **Krugovorot veshchestva i energii v vodoemakh: Struktura i produktivnost' rastitel'nykh soobshchestv (fitopankton, fitobentos, vysshaya vodnaya rastitel'nost') [Cycle of matter and energy in water bodies: Structure and productivity of plant communities (phytoplankton, phytobenthos, high aquatic plants)]**. Irkutsk; V. 2: P. 31–32.
21. Izhboldina L. A. (1990) **Meio- i makrofitobentos ozera Baikal (vodorosli). [Meio- and macrophytobenthos of Baikal lake (algae)]**. Irkutsk: ISU publishing.
22. Izhboldina L. A. (2007) **Atlas i opredelitel' vodorosley bentosa i perifitona ozera Baikal (meyo- i makrofity) s kratkimi ocherkami po ikh ekologii. [Atlas and key of phytobenthos and phytoperiphyton of Baikal lake (meio- and macrophytes) with brief description of their ecology]**. Novosibirsk: Nauka-center.
23. Katana A., Kwiatowski J., Spalik K., Zakrys B. (2001) *J. Phycol.* V. 37: P. 443–451.
24. Kim J. H., Kim Y. H., Cho G. Y., Boo S. M. (2006) *Korean J. Genet.* V. 28: P. 295–303.
25. Kravtsova L. S., Izhboldina L. A., Khanaev I. V., et al. (2012) **Narushenie vertikal'noy zonal'nosti zelenykh vodorosley v pribrezhnoy chasti zaliva Listvennichnyy ozera Baikal [Disturbance of green algae vertical zonation in coastal water zone of Listvennichnyi bay of Baikal lake]**. *Docl. Biol. Sci.* V. 447(2): P. 227–229.
26. Leliaert F., De Clerck O., Verbruggen H., et al. (2007) *Mol. Phylogenet. EV.* V. 44(3): P. 1237–1256.
27. Leliaert F., Boedeker C., Pena V., et al. (2009) *Europ. J. Phycol.* V. 44(2): P. 155–169.
28. Lowe R. L., Pillsbury R. W. (1995) *J. Great Lakes Res.* V. 21(4): P. 558–566.
29. Mohapatra P. K., Mohanty R. C. (1992) *Phycos.* V. 31(1, 2): P. 77–84.
30. Nozaki K., Darijav K., Akatsuka T., et al. (2003) *Limnol.* V. 4: P. 161–165.
31. Ostendorp W., Schmieder K., Jöhnk K. (2004) *Ecohydrol. Hydrobiol.* V. 4: P. 379–395.
32. Pang S. J., Liu F., Shan T. F., et al. (2010) *Mar. Environ. Res.* V. 69(4): P. 207–215.
33. Pokrovskaya T. N., Mironova N. Ya., Shilkrot G. S. (1983) **Makrofitnye ozera i ikh evtrofirovaniye [Macrophytic lakes and their eutrophication]**. Moscow: Nauka.
34. Posada D. (2008) *Molecular Biology and Evolution.* V. 25: P. 1253–1256.
35. Prasanna R., Ratha S. K., Rojas C., et al. (2011) *Folia Microbiol. (Praha).* V. 56(6): P. 491–496.
36. Rai U. N., Dubey S., Shukla O. P., et al. (2008) *Environ. Monit. Assess.* V. 144(1, 3): P. 469–481.
37. Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P. (2011) *Syst. Biol.* V. 61(3): P. 539–542.
38. Rudnina L. A. (1998) **Zignemovye vodorosli Rossii (Chlorophyta: Zygnematomyceae, Zygnematales) [Zygnemophytes of Russia (Chlorophyta: Zygnematomyceae, Zygnematales)]**. St. Petersburg: Nauka.
39. Saunders G. W., Kucera H. (2010) *Cryptogamie, Algologie.* V. 31(4): P. 487–528.
40. Simons J., Van Beem A. P., de Vries P. J. R. (1984) *Acta Bot. Neerl.* V. 33: P. 323–334.
41. Skubinna J. P., Coon T. G., Batterson T. R. (1995) *J. Great Lakes Res.* V. 21: P. 476–488.
42. Smith V. H., Tilman G. D., Nekola J. C. (1999) *Environ. Pollut.* V. 100(1): P. 179–196.
43. Smith V. H., Joye S. B., Howarth R. W. (2006) *Limnol. Oceanogr.* V. 51: P. 351–355.

44. Stabenau H., Säftel W. (1989) *Canad. Journal Bot.* V. 67(7): P. 2217–2218.
45. Tamura K., Peterson D., Peterson N., et al. (2011) *Mol. Biol. Evol.* V. 28: P. 2731–2739.

✪ Информация об авторах

Романова Елена Владимировна — к. б. н., научный сотрудник. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН). 664033, Иркутск, Улан-Баторская ул., 3. E-mail: ERA_85@inbox.ru.

Romanova Elena Vladimirovna — research scientist, PhD. Limnological Institute, Siberian Division, Russian Academy of Sciences. 664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya St., 3. Russia. E-mail: ERA_85@inbox.ru.

Кравцова Любовь Сергеевна — к. б. н., старший научный сотрудник. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН). 664033, Иркутск, Улан-Баторская ул., 3. E-mail: lk@lin.irk.ru.

Kravtsova Lyubov Sergeevna — senior research scientist, PhD. Limnological Institute, Siberian Division, Russian Academy of Sciences. 664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya St., 3. Russia. E-mail: lk@lin.irk.ru.

Ижболдина Людмила Александровна — к. б. н., старший научный сотрудник. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН). 664033, Иркутск, Улан-Баторская ул., 3.

Izhboldina Lyudmila Aleksandrovna — senior research scientist, PhD. Limnological Institute, Siberian Division, Russian Academy of Sciences. 664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya St., 3. Russia.

Ханаев Игорь Вениаминович — старший научный сотрудник. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН). 664033, Иркутск, Улан-Баторская ул., 3. E-mail: igkhan@lin.irk.ru.

Khanaev Igor Veniaminovich — senior scientist, PhD. Limnological Institute, Siberian Division, Russian Academy of Sciences. 664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya St., 3. Russia. E-mail: igkhan@lin.irk.ru.

Щербаков Дмитрий Юрьевич — д. б. н., заведующий лабораторией геносистематики. Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН). 664033, Иркутск, Улан-Баторская ул., 3. E-mail: sherb@lin.irk.ru, dysh007@gmail.com.

Sherbakov Dmitriy Yuryevich — dr., Head of Laboratory of Molecular systematics. Limnological Institute, Siberian Division, Russian Academy of Sciences. 664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya St., 3. Russia. E-mail: sherb@lin.irk.ru, dysh007@gmail.com.