

УДК 577.212.3

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm. И *Euglena viridis* (Ehr.) НА ОСНОВЕ ГЕНА 18S рPHK

© Л.Л. Фролова, С.С. Фирсова

Ключевые слова: ген 18S рPHK, *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm., *Euglena viridis* (Ehr.), филогенетический анализ.

В данной работе приведены результаты сравнительного анализа гена 18S рPHK для двух видов *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm. и *Euglena viridis* (Ehr.) – индикаторных видов олигосапробных и полисапробных водоемов. На основе филогенетического анализа гена 18S рPHK этих видов рекомендованы к использованию эволюционно-близкие к ним виды в качестве индикаторных.

### ВВЕДЕНИЕ

Сообщества гидробионтов – своеобразные информационные системы, отражающие различные изменения в водной среде, т. к. они чутко реагируют на кумулятивное действие множества факторов, определяющих качество воды. Гидробиологический анализ основан на способности некоторых видов гидробионтов обитать в среде с той или иной степенью загрязненности.

Экологическое состояние многих природных объектов значительно ухудшается в связи с негативным влиянием деятельности человека. Антропогенное воздействие на водоемы приводит к снижению качества воды, в оценке которого используют альгологические показатели – индикаторы экологического состояния водных экосистем [1].

Методы биологической индикации в настоящее время признаны исключительно эффективными, т. к. дают непосредственную оценку состояния экосистем и их отдельных компонентов [2]. Даже поверхностное исследование гидробионтов позволяет получить быструю и надежную информацию о биологической полноценности воды [3]. Одним из важных интегральных показателей, характеризующих загрязнение воды, является сапробность [4].

Одним из методов оценки средней сапробности водоемов является метод индикаторных организмов Пантле и Букка в модификации Сладечека (1973) [5], рекомендованный, например, для использования в системе Роскомгидромета. В таблице индикаторных организмов по Сладечку приведены данные примерно по 600 видам фитопланктона.

В работе авторов Бариновой и др. (2006) таблица уже содержит 4058 индикаторов органического загрязнения, для 3448 из которых приводится видовой индекс сапробности. Кроме этого, приведены новые видовые индексы сапробности фитопланктонных организмов. Но авторы последние коррективы в значениях индексов не всегда удовлетворяли, поскольку эти значения входили в противоречие с их опытом использования

биоиндикаторов в оценке качества вод, в частности, индекс сапробности ряда видов существенно занижен. Например, для вида *Nitzschia palea* новый рассчитанный индекс составляет 0,7, в то время как прежний был 2,75 и, таким образом, вид превратился из индикатора загрязненных вод в индикатор природно-чистой воды [6].

Выяснение родственных связей и эволюции таксонов в различных группах организмов могло бы внести некоторую определенность в этом вопросе. Для решения подобных задач применяются молекулярно-генетические методы исследований.

В настоящей работе приведены первые, предварительные результаты исследований для двух альтернативно-индикаторных видов фитопланктона – *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm. и *Euglena viridis* (Ehr.) на основе сравнительного анализа гена 18S рPHK. Для исследуемых нами организмов значения индекса индивидуальной сапробности приведены в табл. 1.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы нуклеотидные последовательности 18S рPHK двух видов фитопланктона – *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm. (AM501994) и *Euglena viridis* (Ehr.) (AF090868), которые являются индикаторами олигосапробных и полисапробных водоемов по В. Сладечку и С. Бариновой и др. Эти последовательности получены из открытых Интернет-источников: БД нуклеотидных последовательностей GenBank/EMBL/DBJ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей 18S рPHK проведен программой BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей 18S рPHK проведено программой ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Филогенетические деревья построены с помощью программы Phylip методом максимальной экономии.

Сравнение индивидуальных видовых индексов сапробности по Сладечеку и Бариновой и др.

Вид	Индивидуальный видовой индекс сапробности	
	по Сладечеку (1973)	по Бариновой и др. (2006)
<i>Pinnularia cf. gibba</i>	0,2 (ксеносапробионт)	1,4 (олиго-бетамезосапробионт)
<i>Pinnularia microstauron</i>	2,2 (бета-мезосапробионт)	0,7 (олиго-ксеносапробионт)
<i>Pinnularia subcapitata</i>	1,0 (олигосапробионт)	0,4 (ксено-олигосапробионт)
<i>Pinnularia mesolepta</i>	1,15 (олигосапробионт)	0,7 (олиго-ксеносапробионт)
<i>Pinnularia viridis</i>	0,4 (ксено-олигосапробионт)	0,6 (олиго-ксеносапробионт)
<i>Pinnularia viridiformis</i>	–	– (олигосапробионт)
<i>Euglena spathirhyncha</i>	4,0 (полисапробионт)	3,5 (альфа-полисапробионт)
<i>Euglena spirogyra</i>	1,9 (бета-мезосапробионт)	2,1 (бета-мезосапробионт)
<i>Euglena tripteris</i>	1,8 (бета-мезосапробионт)	2,1 (бета-мезосапробионт)
<i>Euglena acus</i>	2,25 (бета-мезосапробионт)	2,2 (бета-мезосапробионт)
<i>Euglena stellata</i>	–	2,4 (бета-альфамезосапробионт)
<i>Euglena viridis</i>	4,5 (альфа-полисапробионт)	4,1 (полисапробионт)
<i>Euglena geniculata</i>	3,4 (поли-альфасапробионт)	2,9 (бета-полисапробионт)
<i>Euglena intermedia</i>	2,0 (олиго-альфамезосапробионт)	2,2 (бета-мезосапробионт)
<i>Euglena hiemalis</i>	–	2,0 (бета-мезосапробионт)
<i>Euglena agilis</i>	–	3,4 (альфа-полисапробионт)
<i>Euglena pisciformis</i>	2,5 (бета-альфамезосапробионт)	–
<i>Euglena anabaena</i>	–	1,9 (олиго-альфамезосапробионт)
<i>Euglena gracilis</i>	3,15 (бета-полисапробионт)	0,9 (ксено-бетамезосапробионт)

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве объектов исследования выбраны два вида фитопланктона – *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm. и *Euglena viridis* (Ehr.), используемых для индикации альтернативной сапробности водоемов.

Исследования нуклеотидных последовательностей 18S рРНК проводились отдельно для каждого индикаторного вида, гены которых секвенированы и опубликованы в базе данных нуклеотидных последовательностей GenBank.

**Сравнительный анализ гена 18S рРНК *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm.** Олигосапробная зона – практически чистые водоемы без цветения, в которых содержание кислорода и углекислоты не колеблется, растворенные органические вещества практически отсутствуют [1]. К преобладающим видам гидробионтов олигосапробных водоемов относится индикаторный вид *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm., семейство Pinnulariaceae D.G.Mann, отряд Naviculales Bessey, класс Bacillariophyceae, отдел Bacillariophyta [7].

Последовательность гена 18S рРНК *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm. длиной 2157 п.о. зарегистрирована под номером AM501994 в базе данных GenBank.

В результате поиска нуклеотидных последовательностей гомологичных гену 18S рРНК *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm., найдены 74 нуклеотидные последовательности разных видов фитопланктона с макси-

мальной степенью идентичности 90–99 %. Среди них 13 видов рода *Pinnularia* с максимальной степенью идентичности 93–99 %, 9 видов *Sellafora* – 94–95 %, 5 видов *Stauroneis*, 8 видов *Amphora* и 8 видов *Nitzschia* – 93%, 9 видов *Navicula* – 92% и остальные виды – 90%.

Множественное выравнивание показало, что из нуклеотидной последовательности 18S рРНК *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm. длиной 2157 п.о. для построения филогенетического дерева методом максимальной экономии имела значение последовательность длиной 1800 п.о. Филогенетическое дерево гена 18S рРНК *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm. приведено на рис. 1.

На филогенетическом дереве, построенном по нуклеотидной последовательности 18S рРНК, род *Pinnularia* формирует отдельную ветвь.

Внутри одного кластера вид *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm. сгруппировался с эволюционно-близкими видами – *Pinnularia obscura* с бутстреп поддержкой – 99,5, *Pinnularia sf. gibba*, *Pinnularia microstauron* и *Pinnularia subcapitata* с бутстреп поддержкой – 100, *Pinnularia viridiformis*, *Pinnularia viridis*, *Pinnularia substreptoraphe* и *Pinnularia rupestris* с бутстреп поддержкой – 87,5. Так как виды *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm., *Pinnularia sf. gibba*, *Pinnularia microstauron*, *Pinnularia subcapitata*, *Pinnularia viridiformis* и *Pinnularia viridis* являются индикаторами чистых водоемов, то виды *Pinnularia obscura*, *Pinnularia substreptoraphe* и *Pinnularia rupestris* также можно отнести к этому типу индикаторов.

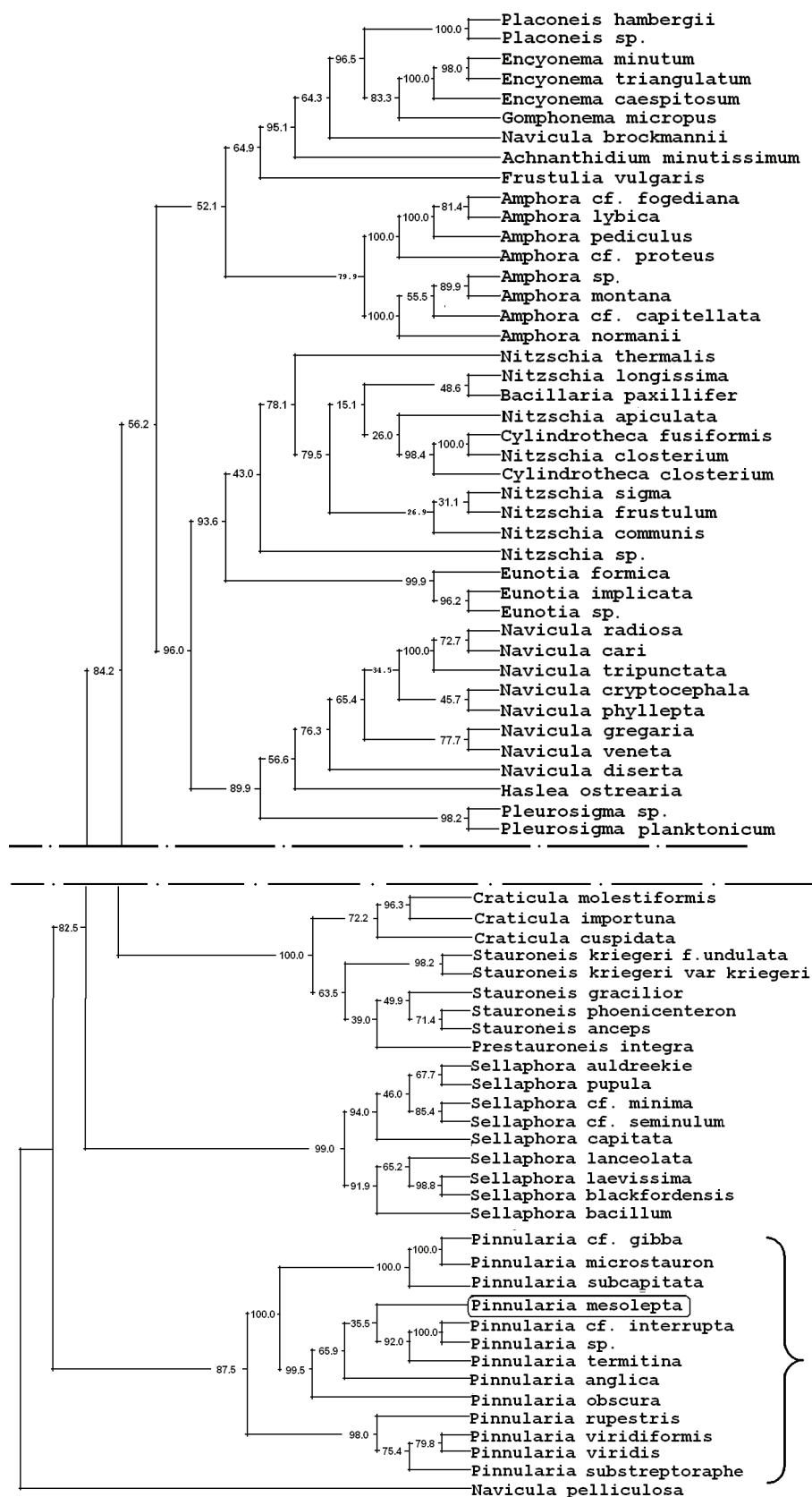


Рис. 1. Филогенетическое дерево *Pinnularia mesolepta* (Ehr.)W.Sm. на основе гена 18S pPHK

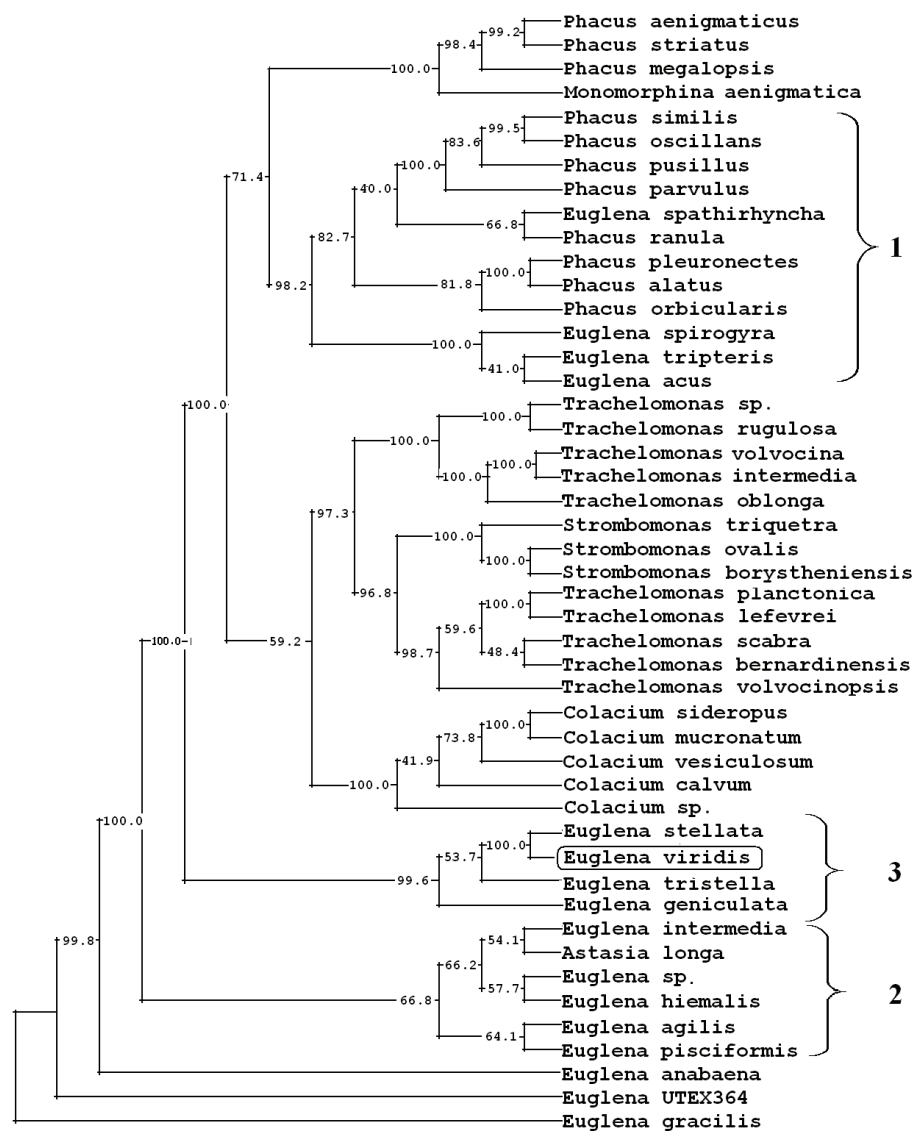


Рис. 2. Филогенетическое дерево *Euglena viridis* (Ehr.) на основе гена 18S рРНК

**Сравнительный анализ гена 18S рРНК *Euglena viridis* (Ehr.).** Полисапробная зона – загрязненные водоемы с дефицитом содержания кислорода, в воде которых содержится значительное количество нестойких органических веществ и продуктов их анаэробного распада, а также сероводород и метан, процессы фотосинтеза угнетены [1]. К преобладающим видам гидробионтов этого типа водоемов относится индикаторный вид *Euglena viridis* (Ehr.), семейство Euglenaceae, отряд Euglenales, класс Euglenophyceae, отдел Euglenophycota [8].

Последовательность гена 18S рРНК *Euglena viridis* (Ehr.) длиной 2531 п.о. зарегистрирована под номером AF090868 в базе данных GenBank.

Поиск последовательностей, гомологичных гену 18S рРНК *Euglena viridis* (Ehr.), показал наличие 47 нуклеотидных последовательностей разных видов фитопланктона с максимальной степенью идентичности 76–99 %. Среди них 16 видов рода *Euglena* – с максимальной степенью идентичности 76–99 %, 10 видов рода *Trachelomonas* – 76 %, 5 видов рода *Colacium* и 11 видов рода *Phacus* – 76–77 %, и остальные виды – 76 %.

Для вышеуказанных гомологичных нуклеотидных последовательностей длиной 2531 п.о. проведено множественное выравнивание, на основе которого построено филогенетическое дерево методом максимальной экономии (рис. 2).

На филогенетическом дереве, построенном по нуклеотидной последовательности 18S рРНК, род *Euglena* формирует три ветви (табл. 2).

В первом кластере *Euglena spirogyra*, *Euglena tripteris* и *Euglena acus* – индикаторы мезосапробных водоемов, сгруппированы с представителями рода *Phacus* – аналогичными индикаторными видами, с бутстреп-поддержкой – 98,2.

Второй кластер содержит разные виды рода *Euglena*, которые являются показателями разных зон водоемов: от мезо- до полисапробности, с мало- достоверным значением бутстреп-поддержки – 66,8.

Третий кластер содержит исследуемый вид *Euglena viridis* (Ehr.), который сгруппирован с эволюционно- близкими видами *Euglena stellata* с бутстреп поддержкой – 100 и *Euglena geniculata* с бутстреп поддержкой – 99,6. Вышеперечисленные виды являются индикатора-

ми мезо- и полисапробных водоемов. Вид *Euglena tristellata* имеет мало-достоверное значение бутстреп-поддержки (57,7) и не может быть отнесен к этому типу индикаторов. Надо заметить, что вид *Euglena stellata* отсутствует в списке индикаторных видов по Сладечку и содержится в списке по Бариновой и др. Филогенетический анализ подтвердил принадлежность этого организма к группе индикаторов загрязненных водоемов.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Филогенетический анализ гена 18S рРНК для двух видов фитопланктона – *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm. и *Euglena viridis* (Ehr.) показал:

1. Виды *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm., *Pinnularia sf. gibba*, *Pinnularia microstauron*, *Pinnularia subcapitata*, *Pinnularia viridiformis* и *Pinnularia viridis* являются эволюционно-близкими, что указывает на высокую достоверность их использования в существующих классификациях как индикаторов одной зоны сапробности водоемов.

2. Виды *Pinnularia obscura*, *Pinnularia substreptoraphe* и *Pinnularia rupestris* можно отнести к индикаторам олигосапробных водоемов на основании близкого родства к вышеперечисленным видам.

3. Виды *Euglena spirogyra*, *Euglena tripteris* и *Euglena acus* являются эволюционно-близкими и составляют одну группу индикаторов мезосапробных водоемов в существующих классификациях.

4. Вид *Euglena stellata* имеет высокую гомологию по гену 18S рРНК с группой индикаторов загрязненных водоемов – *Euglena viridis* (Ehr.) и *Euglena geniculata*, что подтверждает его корректное использование в качестве индикатора по Бариновой и др.

Предложенные виды *Pinnularia obscura*, *Pinnularia substreptoraphe* и *Pinnularia rupestris* могут быть рекомендованы к использованию исследователями для оценки сапробности водоемов в качестве индикаторных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шитиков В.К., Розенберг Г.С., Зинченко Т.Д. Количественная гидроэкология: методы системной идентификации. Тольятти: ИЭВБ РАН, 2003.

2. Абакумов В.А. Гидробиологический анализ поверхностных вод и донных отложений // Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений. Л.: Гидрометеоздат, 1983.
3. Телитченко М.М. Гидробиологическая миграция пестицидов. М.: Изд-во МГУ, 1980.
4. Макрушин А.В. Биологический анализ качества вод. Л.: Зоол. ин-т АН СССР, 1974.
5. Sladeczek V. System of water quality from the biological point of view. Arch. Hydrobiol. Ergeb. Limnol., 1973.
6. Баринова С.С., Медведев Л.А., Анисимова О.В. Биоразнообразие водорослей-индикаторов окружающей среды. Тель Авив: PiliesStudio, 2006.
7. Patrick R.C., Reimer W. The diatoms of the United States, exclusive of Alaska and Hawaii. Pt. 1 // Academy of Natural Sciences. 1975.
8. Рейвн П., Эверт Р., Айхорн С. Современная ботаника в двух томах. М.: Изд-во «Мир», 1990.

Поступила в редакцию 16 ноября 2008 г.

Frolova L.L., Firsova S.S. Phylogenetic analysis of *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm. and *Euglena viridis* (Ehr.) based on 18S rRNA gene. This article provides the results of the comparative analysis of 18S rRNA gene of two types *Pinnularia mesolepta* (Ehr.) W.Sm. and *Euglena viridis* (Ehr.) - indicator species of oligosaprobic and polysaprobic. On the basis of phylogenetic analysis, 18S rRNA gene of two indicator species for oligosaprobity and polysaprobity reservoirs. On the basis of phylogenetic analysis of 18S rRNA gene of these types, it is recommended to use evolutionary close species as indicator ones.

Key words: gene 18S rRNA, *Pinnularia mesolepta* (Ehr.)W.Sm., *Euglena viridis* (Ehr.), phylogenetic analysis

#### LITERATURE

1. Shitikov V.K., Rosenberg G.S., Zinchenko T.D. Quantitative hydroecology: methods of system identification. Tolyatti: IEVB of RAS, 2003.
2. Abakumov V.A. Hydrobiological analysis of surface waters and bottom sediment // Instructions on the methods of hydrobiological analysis of surface waters and bottom sediment. L.: Hydrometeoizdat, 1983.
3. Telitchenko M.M. Hydrobiological migration of pesticides. M.: The Publishing House of MSU, 1980.
4. Makrushin A.V. Biological analysis of water quality. L.: Zool. Institute of AS USSR, 1974.
5. Sladeczek V. System of water quality from the biological point of view. Arch. Hydrobiol. Ergeb. Limnol., 1973.
6. Barinova S.S., Medvedev L.A., Anisimova O.V. Biodiversity of algae-indicators of the environment. Tel Aviv: PiliesStudio, 2006.
7. Patrick R.C., Reimer W. The diatoms of the United States, exclusive of Alaska and Hawaii. Pt. 1 // Academy of Natural Sciences. 1975.
8. Reivn P., Evert R., Aikhorn S. Modern botany in two volumes. M.: The Publishing House «Mir», 1990.