

УДК 577.21:582.263:57.065

А.Д. ТЕМРАЛЕЕВА¹, Е.В. МИНЧЕВА², Д.Ю. ЩЕРБАКОВ^{2,3}, Д.Л. ПИНСКИЙ¹¹ФГБУН Ин-т физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,

ул. Институтская, 2, Пушкино 142290, Московская обл., Россия

e-mail: temraleeva.anna@gmail.com

²ФГБУН Лимнологический институт СО РАН,

ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск 664033, Россия

³ФГБОУ ВПО Иркутский госуниверситет, Биолого-почвенный факультет.,

ул. Сухэ-Батора, 5, Иркутск 664003, Россия

ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЕ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ: ОБЗОР

Обсуждаются особенности и проблемы таксономической идентификации зеленых водорослей (*Chlorophyta*). Приведены примеры полифилии родов зеленых водорослей и сложности подбора диагностических признаков, основанных на морфологии. Рассматривается новый подход к изучению биоразнообразия органического мира — ДНК-штрихкодирование, описаны его этапы и требования к ДНК-штрихкодам. Дана характеристика основных молекулярных маркеров: преимущества и недостатки в качестве потенциальных ДНК-штрихкодов. Для целого ряда таксонов зеленых водорослей представлена обобщенная информация об их успешном использовании с примерами конкретных праймеров.

Ключевые слова: ДНК-штрихкодирование, зеленые водоросли, молекулярные маркеры.

Зеленые водоросли — самый крупный отдел водорослей, характеризующийся сходным с высшими растениями пигментным составом. Происхождение наземных растений от предковой зеленой водоросли было ключевым событием в истории жизни и привело к значительным изменениям окружающей среды, вызвав развитие наземных экосистем (Kenrick, Crane, 1997). Предковые зеленые водоросли возникли в результате эндосимбиоза гетеротрофных эвкариотов и цианобактерий (*Cyanobacteria/Cyanoprokaryota*), которые интегрировались в хозяйскую клетку и, в конечном счете, превратились в пластиды (Archibald, 2009; Keeling, 2010). Этот первичный эндосимбиоз, который случился по приблизительным оценкам 1–1,5 млрд лет назад (Hedges et al., 2004; Yoon et al., 2004), привел к образованию самых первых окислительных фотосинтетических эвкариотов. В настоящее время известно более 14 000 видов зеленых водорослей, в основном описанных по морфологическим и ультраструктурным характеристикам (Norton et al., 1996; Pröschold, Leliaert, 2007). Представители отдела *Chlorophyta* являются неотъемлемым компонентом биоразнообразия различных экосистем, многие виды

© А.Д. Темралеева, Е.В. Минчева, Д.Ю. Щербаков, Д.Л. Пинский, 2013

этого таксона широко применяются для решения ряда биотехнологических задач (биотопливо, биоремедиация, производство биологически активных добавок и удобрений), а также как модельные научные объекты в фотобиологии, генетической инженерии и т.д. (например, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Volvox* и др.) (Leliaert et al., 2012). Несмотря на то, что история изучения зеленых водорослей насчитывает уже не одно столетие, открытие новых видов и выявление неожиданных филогенетических взаимосвязей происходит ежегодно, тем не менее, систематика и филогения данной группы все еще не ясна.

Видовая идентификация зеленых водорослей на основе морфологии

Микроскопические зеленые водоросли – «маленькие зеленые шарики», которые повсеместно встречаются в водных и воздушно-наземных местообитаниях, различаются на основе размеров вегетативных клеток, формы и положения хлоропластов и пиреноидов, ультраструктурных признаков, а также особенностей жизненного цикла (ЖЦ) (Костиков та ін., 2001; Ettl, Gärtner, 1995; Watanabe, Floyd, 1996; Škaloud et al., 2006). Например, зеленые микроводоросли рода *Muriella* отличаются от рода *Bracteacoccus* отсутствием подвижных репродуктивных стадий. Однако вегетативные клетки обоих родов отличить практически невозможно. Отличительной особенностью рода *Lobosphaeropsis* является продолжительный период клеточного деления. Неделяющиеся клетки данной водоросли напоминают вегетативные клетки рода *Chlorella*, а делящиеся, содержащие несколько хлоропластов и пиреноидов, – представителей рода *Planktosphaerella*. Последняя, в свою очередь, сходна с родом *Planktosphaeria*, от которого отличается только отсутствием подвижных репродуктивных клеток (Андреева, 1998). Таким образом, во многих случаях быстрое определение зеленых водорослей, особенно из аэрофитных и почвенных местообитаний, невозможно без перевода в культуру, длительного наблюдения за ЖЦ и достаточных таксономических знаний.

Выбор морфологического критерия для точной видовой диагностики является достаточно сложной задачей. Некоторые морфологические признаки связаны с приспособлением организмов к условиям окружающей среды и могут быть достаточно вариабельны (Krienitz et al., 2004; Luo et al., 2006). Так, в работе В. Люо с соавт. (Luo et al., 2010) было показано, что формирование игл у водных видов *Micractinium* может быть связано с их защитной функцией против поедания зоопланктоном, в то время как у почвенных видов этого же рода иглы не образуются. Следовательно, этот морфологический признак не может являться надежным критерием разграничения таксонов. Еще одним примером служат работы Ф. Трейнора с соавт. (Trainor, 1991; Trainor, Egan, 1991), которые при изучении культур зеленых водорослей рода *Scenedesmus* обнаружили, что некоторые диагностические признаки видов (присутствие и форма шипов, величина колонии) зависят от температуры окружающей среды. Таким образом, изучение исключительно морфологии зеленых водорослей и предположение о том, что сходная

морфология свидетельствует о близком генетическом родстве, может привести к неточностям и даже ошибкам в систематике таксонов. Многие морфологически сходные таксоны зеленых водорослей вследствие конвергентной эволюции и упрощения морфологии до одноклеточных или простых нитчатых форм являются полифилетическими (Lewis, McCourt, 2004). За последнее десятилетие была показана полифилия ряда родов зеленых водорослей: *Coccomyxa* (Rodríguez et al., 2008), *Trebouxia* (Škaloud, Peksa, 2010), *Trentepohlia* (Rindi et al., 2009), *Scenedesmus* (An et al., 1999; Hegewald, Wolf, 2003), *Chlamydomonas* (Pröschold et al., 2001; Pröschold, Leliaert, 2007), *Chaetophora* и *Stigeoclonium* (Caisova et al., 2011). Виды морфологически различных родов *Neochloris*, *Characium* и *Planophila* были обнаружены во всех трех классах зеленых водорослей (Watanabe, Floyd, 1989; Lewis et al., 1992; Watanabe et al., 2000; Friedl, O'Kelly, 2002). Аналогично морфовиды рода *Chlorococcum* присутствуют и в классе *Chlorophyceae*, и в классе *Ulvophyceae* (Watanabe et al., 2001; Krienitz et al., 2003; Leliaert et al., 2009).

Наиболее яркий и показательный пример недостаточности использования морфологических критериев для разграничения видов зеленых водорослей связан с ревизией рода *Chlorella*. Различные представители этого рода были описаны в пресноводных, морских и наземных условиях, среди которых есть как свободноживущие виды, так и эндосимбиотические и паразитические. Большое количество научных исследований посвящено систематике данного рода, основанной на морфологии (Андреева, 1975; Fott, Nováková 1969; Nozaki et al., 1995b), биохимии и физиологии (Atkinson et al., 1972; Kessler, 1976, 1982, 1984; Kessler, Huss, 1992; Ikeda, Takeda, 1995; Kapaun, Reisser, 1995; Němcová, Kalina, 2000), а также молекулярной филогении (Huss et al., 1989, 1999; Huss, Sogin, 1990; Krienitz et al., 2004; Eliaš, Neustupa, 2009; Darienko et al., 2010; Bock et al., 2011). Традиционный род зеленых водорослей *Chlorella* представлен одноклеточными коккоидными видами шаровидной или эллипсоидной формы, размножающимися посредством автоспор. Представители рода характеризовались также наличием одного хлоропласта и тонкой, гладкой оболочки без слизи. Тем не менее, этот морфологически определенный род оказался полифилетическим, и, согласно молекулярно-генетическому анализу, разные представители рода оказались в разных классах – *Chlorophyceae* и *Trebouxiophyceae* (Huss, Sogin, 1990; Friedl, 1995; Huss et al., 1999; Luo et al., 2010; Neustupa et al., 2013). В классе *Trebouxiophyceae* *Chlorella*-подобные микроводоросли образуют несколько независимых линий. Порядок *Chlorellales* включает такие роды, как *Chlorella*, *Marinichlorella*, *Meyerella*, *Parachlorella* и *Picochlorum* (Henley et al., 2004; Krienitz et al., 2004; Fawley et al., 2005; Aslam et al., 2007; Bock et al., 2011; Pröschold et al., 2011). Дополнительные *Chlorella*-подобные линии были недавно классифицированы как отдельные роды *Elliptochloris*, *Pseudochlorella* и *Xylochloris* (Rindi et al., 2007; Letsch et al., 2009; Darienko et al., 2010; Neustupa et al., 2011). Несколько других традиционных представителей рода *Chlorella*, а согласно современной сис-

тематике — виды отдельных родов *Heterochlorella*, *Heveochlorella* и *Kalinella*, были определены в т.н. *Watanabea*-клату (Zhang et al., 2008; Neustupa et al., 2009), представители которой имеют автоспоры разного размера. В работе чешских альгологов под руководством И. Неуступы (Neustupa et al., 2013) два штамма зеленых водорослей, обнаруженные на коре деревьев, имели *Chlorella*-подобную морфологию. Однако, используя молекулярный анализ последовательностей 2 генов (18S рДНК и *rbcL*), авторы классифицировали данные штаммы как новый род и вид — *Leptochlorella corticola* и *Kalinella apyrenoidosa*. Согласно биохимическим и молекулярным данным, род *Chlorella* класса *Trebouxiophyceae* включает 5 «истинных» хлорелл: *Chlorella vulgaris*, *Ch. lobophora* Andreyeva, *Ch. sorokiniana* Shihira et Krauss, *Ch. heliozoae* Pröschold et Darienko и *Ch. variabilis* Shihira et Krauss (Huss et al., 1999; Krienitz et al., 2004; Pröschold et al., 2011). Кроме того, оказалось, что внутри клаты «истинных» хлорелл, характеризующихся одинаковыми по размеру и форме автоспорами, которые развиваются внутри одного спорангия, выделяются колониальные виды со слизистыми оболочками. В. Люо с коллегами (Luo et al., 2010) показали, что штаммы, предварительно идентифицированные как виды родов *Dictyosphaerium* и *Lobosphaeropsis*, принадлежат роду *Chlorella* и что слизь, а также соединительные тяжи не имеют диакритического значения. В недавнем исследовании К. Бок с соавт. (Bock et al., 2011) выделили 6 штаммов, по морфологии сходных с *Dictyosphaerium*, но находящихся в близком родстве с *Ch. vulgaris* (*Ch. coloniales*, *Ch. pituita*, *Ch. pulchelloides*, *Ch. singularis*, *Ch. elongata* и *Ch. chlorelloides*). Кроме того, в этой же работе было описано еще 3 новых вида хлорелл без слизи: *Ch. lewinii*, *Ch. rotunda* и *Ch. volutis*. Используя в качестве молекулярных маркеров 5.8S рДНК и спейсер ITS2, авторы разделили не только 5 уже известных «истинных» хлорелл, но и все новые виды.

В близком родстве с родом *Chlorella* находятся 5 различных родов: *Micractinium* (шаровидные клетки с иглами в колониях), *Didymogenes* (эллипсоидные клетки в двухклеточных ценобиях, с 2 шипиками на клетку или без них), *Actinastrum* (эллипсоидные клетки в ценобиях в форме звезд), *Dictyosphaerium* (шаровидные клетки с толстой слизистой оболочкой в колониях), *Meyerella* (шаровидные клетки, одиночные, без пиреноида) и *Hegewaldia* (шаровидные клетки, колониальные, с или без игл, половой процесс — оогамия), которые формируют клату *Chlorella* (Krienitz et al., 2004; Fawley et al., 2005; Pröschold et al., 2009). Еще один представитель с морфологией, типичной традиционному роду *Chlorella*, описан как новый род *Jenufa* в составе класса *Chlorophyceae* (Němcová et al., 2011). Таким образом, точное видовое определение *Chlorella*-подобных микроводорослей без молекулярного анализа невозможно (Neustupa et al., 2013). И в любом таксономическом исследовании морфовид — это всего лишь гипотеза о валидности вида, которую необходимо проверить другими методами, в первую очередь, молекулярными.

ДНК-штрихкодирование: новый подход к изучению биоразнообразия

В 2003 г. канадским ученым Полом Хебертом был предложен новый подход к изучению биоразнообразия – ДНК-таксономия, а затем и глобальная международная программа «Штрихкод жизни» (Barcode of Life Initiative), которая стала продолжением программы «Геном человека». Суть данного подхода и программы состоит в раскрытии и молекулярной классификации видового разнообразия всего живого мира на основе расшифровки одного и того же участка генома, последовательность которого будет одинаковой у особей одного вида, но различна для разных видов. Такой участок называется ДНК-штрихкод (DNA-barcode) и должен удовлетворять следующим требованиям (Шнеер, 2009а):

1. Короткая длина – не более 700-800 п.н. для облегчения выделения, амплификации и секвенирования ДНК.

2. Консервативность, чтобы штрихкоды можно было амплифицировать с широкоспецифичными праймерами (или они должны быть фланкированы консервативными участками для работы универсальных праймеров), но достаточно дивергентными, чтобы различить близкородственные виды.

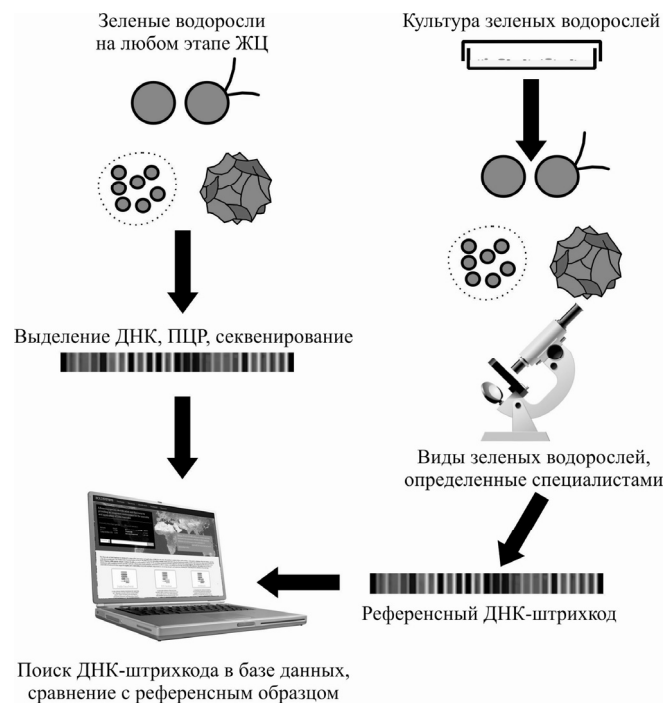
3. Легкое выравнивание, т.е. штрихкод должен содержать мало инделей (вставок-удалений).

Таким образом, ген, участок которого мог бы стать потенциальным ДНК-штрихкодом, должен быть хорошо изучен. В настоящее время молекулярные данные о зеленых водорослях быстро накапливаются. Так, например, секвенированы полные геномы 3 прازیнофитовых водорослей: *Ostreococcus tauri* (Derelle et al., 2006), *O. lucimarinus* (Palenik et al., 2007) и *Micromonas pusilla* (Worden et al., 2009), 2 хлорофитовых водорослей: *Chlamydomonas reinhardtii* (Merchant et al., 2007) и *Volvox carteri* (Prochnik et al., 2010) и одной требуксиофитовой водоросли *Chlorella variabilis* (Blanc et al., 2010). Продолжаются несколько геномных проектов, результатами которых должна стать полная расшифровка геномов зеленых водорослей родов *Coccomyxa*, *Dunaliella*, *Bathycoccus*, *Botryococcus* и дополнительных штаммов *Ostreococcus* и *Micromonas* (Tirichine, Bowler, 2011). Открытие и изучение свойств генов зеленых водорослей расширят список потенциальных ДНК-штрихкодов для надежной таксономической идентификации этих организмов.

Этапы ДНК-штрихкодирования любого биологического объекта схематично отражены на рисунке. Первый этап состоит из сбора, определения и сохранения ваучерного биологического образца (природный образец, культивируемый штамм, гербарный экземпляр и т.д.). На втором этапе происходит выделение ДНК из биопробы с помощью подобранных праймеров, амплификация необходимого фрагмента ДНК и его секвенирование. Заключительный этап состоит из сравнения ДНК-штрихкода с базой данных и ее пополнение новой записью.

Таким образом, можно сравнить электронную базу молекулярных данных с традиционным бумажным определителем: таксономическая идентификация штамма зеленой водоросли может быть успешна только

в случае наличия ключа — записи об исследуемой последовательности вида в базе данных.



Процесс видовой идентификации зеленых водорослей с помощью ДНК-штрихкодирования

Выбор молекулярного маркера

Для таксономической идентификации зеленых водорослей и определения их филогенетических взаимоотношений используют целый ряд молекулярных маркеров. Однако не все из них могут быть надежными и удобными ДНК-штрихкодами.

1. Традиционно ядерный ген 18S рДНК является главным филогенетическим маркером для зеленых водорослей. Однако использование этого консервативного гена часто не может обеспечить достаточной вариабельности для разделения близкородственных видов, а следовательно, надежно определить их таксономическую принадлежность. Так, например, в статье Е.В. Минчевой с соавт. (2013) показано, что использование маркера 18S не позволяет подтвердить таксономический статус зеленых водорослей родов *Draparnaldioides*, *Draparnaldia* и *Chaetophora*, в отличие от ITS. Разграничение видов рода *Chlorosarcinopsis* с помощью 18S маркера также невозможно, в отличие от видов рода *Bracteacoccus* (Hall et al., 2010). Таким образом, использование 18S рДНК целесообразно именно в филогенетических работах: для разделения более эволюционно древних родов (например, в работах Aboal, Werner, 2011; Neustupa et al., 2011) или выявления новых филогенетических линий (De

Wever et al., 2009; Horath, Bachofen, 2009). В то время как для целей видовой идентификации он может оказаться неуспешным ДНК-штрихкодом.

2. Ген хлоропластной рибосомальной большой субъединицы 23S (универсальный пластидный ампликон UPA) также используется в молекулярно-генетических исследованиях зеленых водорослей. Однако последние исследования подтвердили, что он является менее варибельным, чем другие штрихкоды, в т.ч. и другие хлоропластные маркеры (Sherwood et al., 2008; Clarkston, Saunders, 2010).

3. Хлоропластный ген *rbcL*, кодирующий большую субъединицу фермента рибулозобифосфат-карбоксилазы, постепенно становится стандартным вторым маркером для зеленых водорослей после 18S, и, как правило, топологии филогенетических деревьев, построенных на основе этих двух маркеров, совпадают (Neustupa et al., 2013). Однако существуют и исключения. Например, топология дерева на основе данных по гену *rbcL* отличается от таковой по гену 18S рДНК: семейство *Oocystaceae* не образует кластер внутри порядка *Chlorellales* (Thüs et al., 2011; Novis, Visnovsky, 2012; Neustupa et al., 2013). Кроме того, не разработаны универсальные праймеры, комплиментарные фрагменту данного гена, которые бы успешно амплифицировались у всех представителей отдела *Chlorophyta* (Nozaki et al., 1995a, 1999, 2000; Buchheim et al., 2010). Вследствие чрезвычайной варибельности *rbcL* у зеленых водорослей он не является, по сути, универсальным геном.

Как альтернатива *rbcL* в качестве кандидатов в штрихкоды были предложены другие пластидные гены: *matK*, кодирующий матуразу *K*, *rpoB* и *rpoC1*, кодирующие субъединицы РНК-полимераз, и межгенный спейсер *trnH-psbA*, расположенный между генами гистидиновой тРНК и геном, контролирующим синтез белка D1 фотосистемы II (Матвеева и др., 2011). В работе Л. Келли с соавт. (Kelly et al., 2010) показано, что локусы *matK* и *rpoC1* являются наиболее варибельными у водных растений семейства *Podostemaceae*. Рабочая группа по изучению ДНК-штрихкодирования растений (CBOL Plant Working Group, 2009) рекомендовала использовать в качестве молекулярных штрихкодов наземных растений *rbcL* и *matK*. Однако пока не удалось амплифицировать *matK* у зеленых водорослей (Pombert et al., 2005; Buchheim et al., 2011) и мхов (von Cräutlein et al., 2011).

4. Ген *tufA*, кодирующий фактор элонгации белкового синтеза хлоропластов, был предложен относительно недавно и исследован в основном у морских зеленых водорослей (Fama et al., 2002). В целом, геномы хлоропластов полезны для филогенетических реконструкций вследствие относительно высокого содержания генов и более плотной их упаковки. Кроме того, в отличие от многих ядерных генов, которые являются по своей природе мультикопийными и могут запутать филогенетическую реконструкцию, гены органелл, как правило, являются однокопийными и не вызывают таких проблем (Leliaert et al., 2012).

5. Внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2) ядерного рибосомального оперона широко используются для разделения зеленых

водорослей на видовом уровне (Verbruggen et al., 2006; Coleman, 2007; Mei et al., 2007; Keller et al., 2008; O’Kelly et al., 2010). ITS1 расположен между геном малой ядерной рибосомальной субъединицей (18S) и геном 5.8S рДНК, ITS2 – между геном 5.8S рДНК и геном большой ядерной рибосомальной субъединицей (28S). Длина локуса в зависимости от таксона варьирует от нескольких сотен до более тысячи пар нуклеотидов. Штрихкоды ITS1 и ITS2 переменны и многокопийны, что позволяет их легко амплифицировать у практически всех Viridiplantae с помощью одного набора универсальных праймеров (White et al., 1990). Кроме того, они примыкают к консервативному участку 5.8S рДНК и фланкированы консервативными генами 18S и 28S рДНК, что облегчает создание праймеров (Шнеер, 2009б). По эффективности амплификации у зеленых водорослей ген ITS2 предпочтительнее *rbcL* (Buchheim et al., 2011). Однако к недостаткам ITS1 и ITS2 можно отнести высокую переменность длины и инделей, сложность в выравнивании и определении ортологии (Feliner, Rossely, 2007; Poczai, Nyvхnen, 2010).

6. Широко используемый для животных (Moore, 1995; Ferri et al., 2009; Wilson, 2010), некоторых таксонов красных (Sherwood et al., 2008; Le Gall, Saunders, 2010), бурых (McDevit, Saunders, 2010) и диатомовых водорослей (Evans et al., 2007) 5'-фрагмент субъединицы 1 митохондриального белкокодирующего гена цитохром С оксидазы (CO1 или *cox1*) наиболее детально изучен из всех молекулярных маркеров. Однако для зеленых водорослей этот ген сложен для амплификации (Hall et al., 2010).

В табл. 1 представлена сводная информация о наиболее широко используемых молекулярных маркерах и праймерах для различных таксонов зеленых водорослей. Если сравнивать между собой все предложенные локусы, то *rbcL*, ITS2 и *tufA* являются наиболее вероятными кандидатами в ДНК-штрихкоды зеленых водорослей благодаря умеренной и сильной переменности (Hall et al., 2010). CO1, 18S и 23S (UPA) меньше подходят в качестве молекулярных маркеров: 18S и 23S недостаточно переменные, а CO1 не амплифицируется у большинства таксонов. Поэтому, очевидно, для молекулярно-генетического анализа зеленых водорослей необходимо использовать мультилокусный или двухэтапный подход. Так, например, монофилия зеленых водорослей порядка *Sphaeropleales* не вызывает сомнения, т.к. была подтверждена как данными по вторичной структуре ITS2 (Keller et al., 2008), так и филогенетическим анализом ядерной рДНК и пластидных генов *atpB* и *rbcL* (Verghese, 2007). В то время как филогенетические отношения между тремя классами зеленых водорослей – *Chlorophyceae*, *Trebouxiophyceae* и *Ulvophyceae* – являются спорными (Pröschold, Leliaert, 2007; Zuccarello et al., 2009) и отражают, очевидно, их древнее происхождение и быструю дивергенцию (O’Kelly, 2007; Cosquyt et al., 2010). Анализ окаменелостей показывает присутствие данных классов в среднем неопротерозое, а молекулярные часы оценивают дивергенцию данных классов в раннем неопротерозое (Butterfield et al., 1994; Douzery et al., 2004; Herron et al., 2009).

Применение молекулярных маркеров и праймеров для

Локус	Название праймера: последовательность (5'-3')	
	Прямой	Обратный
18S	ChloroF: TGGCCTATCTTGTTGGTCTGT	ChloroR: GAATCAACCTGACAAGGCAAC
	SSU1: TGGTTGATCCTGCCAGTAG	SSU2: TGATCCTTCCGCAGGTTAC
	F: AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	R: TGATCCTTCTGCAGGTTACCT ACG
	P1038F: GACTCAACACGGGAAACTTACC	P1038R: GGTAAGTTTTCCCGTGTTCGCTC
	P73: AATCAGTTATAGTTTATTTGRTGGTACC	P47: TCTCAGGCTCCCTCTCCGGA
23S	23SU1: AGGGGTAAAGCACTGTTTCG	23SU2: CCTTCTCCCGAAGTTACG
	p23SrV_f1: GGACAGAAAGACCCTATGAA	p23SrV_r1: TCAGCCTGTTATCCCTAGAG
<i>rbcL</i>	rbcL M28: GGTGTGGATTAAAGCTGGTGT	rbcL M1390: CTTTCAAAYTTCACAAGCAGCAG
	PRASF1: ATGGTTCCACAAACAGAAAC	ellaR2: TCACGACCTTCATTACGAGCTTG
	PRASF1: ATGGTTCCACAAACAGAAAC	PRASR1: TTGTCAATAGTATCAAATTC
	650PRASF2: GTAAATTCTCAACCATTTATGCG	650PRASR2: CAGTGAAACCACCAGTTAAATAG
	rbcL RH1: ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGC	1385: AATTCAAATTTAATTTCTTTCC
<i>tufA</i>	tufAF: TGAAACAGAAMAWCGTCATTATGC	tufAR: CCTTCNCGAATMGCRAAWCGC
	tufA.50F: TGGATGGTGCTATTYTAGTTG	tufA.870R: ATAGTGTCTRCCTGGCATAGC
<i>ITS</i>	ITS1F: TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS4F: TCCTCCGCTTATTGATATGC
	ITS1 (modified): AGGAGAAGTCGTAACAAGGT	ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC
	ITS4F: TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS5R: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
<i>cox1</i>	cox1.50F: TGGTCTGGGTWATWGCTAC	cox1.650R: TCACCWCCACCWGCWGGC

Зеленые водоросли	Ссылка
<i>Chlorella, Coelastrum, Scenedesmus, Stichococcus, Watanabea</i>	Moro et al., 2009; Scalzi et al., 2012; Temraleeva et al., unpubl.
<i>Bracteacoccus, Chlamydomonas, Chlorosarcinopsis, Dictyochloris, Dunaliella, Heterochlamydomonas, Scenedesmus</i>	Wilcox et al., 1992; Shoup, Lewis, 2003; Pocock, Lachance, 2004; Hall et al., 2010
<i>Actinastrum, Catena, Chlorella, Closteriopsis, Diclostera, Dictyosphaerium, Didymogenes, Elliptochloris, Heynigia, Hindakia, Jenufa, Koliella, Meyerella, Micractinium, Mychonastes, Parachlorella, Parietochloris, Stichococcus, Watanabea, Xylochloris</i>	Katana et al., 2001; Eliáš et al., 2008; Bock et al., 2011; Krienitz et al., 2011; Nemcová et al., 2011; Neustupa et al., 2011; Temraleeva et al., unpubl.
<i>Prasiola, Rosenvingiella</i>	Sherwood et al., 2000
<i>Chlamydomonas, Chlorella, Stichococcus</i>	Bérard et al., 2004
<i>Asterochloris, Chlamydomonas, Coccomyxa, Dictyochloropsis, Dilabifilum, Elliptochloris, Heterochlorella, Leptosira, Lobosphaeropsis, Myrmecia, Picochlorum, Stichococcus, Trentepohlia, Tetrasselmis, Trebouxia, Trochiscia</i>	del Campo et al., 2010
<i>Bracteacoccus, Chlorosarcinopsis, Scenedesmus</i>	Hall et al., 2010
<i>Bracteacoccus, Chlorosarcinopsis, Hydrodictyon, Monactinus, Neochloris, Parapediastrum, Pediastrum, Pseudopediastrum, Scenedesmus, Sorastrum, Stauridium</i>	Hall et al., 2010; McManus, Lewis, 2011
<i>Kalinella, Leptochlorella, Prasiola, Rosenvingiella</i>	Sherwood et al., 2000; Neustupa et al., 2013
<i>Chlamydomonas, Eudorina, Gonium, Pandorina, Volvox</i>	Nozaki et al., 1995a
<i>Prasiola, Rosenvingiella</i>	Sherwood et al., 2000
<i>Ulva</i>	Mares et al., 2011
<i>Bracteacoccus, Caulerpa, Chlorosarcinopsis, Scenedesmus</i>	Fama et al., 2002; Hall et al., 2010
<i>Bracteacoccus</i>	Hall et al., 2010
<i>Caulerpa</i>	Fama et al., 2000
<i>Bracteacoccus, Chlorosarcinopsis, Scenedesmus</i>	Hall et al., 2010
<i>Mychonastes</i>	Yuan et al., 2011
<i>Bracteacoccus</i>	Hall et al., 2010

В некоторых ранних филогенетических работах с использованием 18S рДНК показаны сестринские взаимоотношения между классами *Chlorophyceae* и *Trebouxiophyceae* (например, Krienitz et al., 2001), в то время как последние исследования с большей выборкой таксонов выявили бóльшую генетическую близость между классами *Chlorophyceae* и *Ulvophyceae* (например, Friedl, O'Kelly, 2002; Watanabe, Nakayama, 2007; DeWever et al., 2009). Филогенетический анализ на основе хлоропластных генов, как правило, поддерживает сестринские взаимоотношения между *Ulvophyceae* и *Trebouxiophyceae* (Pombert et al., 2005; Turmel et al., 2009). Другой пример мультилокусного исследования зеленых водорослей семейства *Hydrodictyaceae*, систематика которых до недавнего времени основывалась практически целиком на морфологических данных, также не внес ясности: М. Бухгейм с коллегами, используя молекулярные маркеры 18S рДНК, 26S рДНК и ITS2, подтвердили полифилетичность рода *Pediastrum* Meyen и предположили существование еще 4 дополнительных родов: *Stauridium*, *Pseudopediastrum*, *Monactinus* и *Parapediastrum* (Buchheim et al., 2005). Однако Х. Макманус и Л. Левис (McManus, Lewis, 2011), применяя для молекулярно-филогенетического анализа два молекулярных маркера (26S рДНК и *rbcL*), выделили только 2 рода — *Stauridium* и *Monactinus*, а систематика родов *Pediastrum*, *Pseudopediastrum* и *Parapediastrum* требует уточнения и комплексного изучения.

Последние два примера свидетельствуют о том, что до сих пор вопросы: «Как перевести топологию дерева в таксономический ключ? Всегда ли клады, выделенные по отдельным генам, соответствуют самостоятельным видам или другим таксонам? Какова должна быть мера различий между видами? Существует ли универсальный ДНК-штрихкод для зеленых водорослей?» — остаются открытыми и требуют дальнейших исследований.

В целом, при выборе молекулярного маркера для зеленых водорослей исследователю следует руководствоваться следующими принципами:

1. Для получения надежного результата необходимо использовать несколько независимо эволюционирующих маркеров, например ядерных и хлоропластных. Как правило, молекулярный анализ одного гена не обеспечивает достаточного разрешения для таксономического определения большинства организмов, а иногда дает противоречивые результаты (как отмечено в примерах выше), которые часто связывают с ограниченным числом выровненных нуклеотидов или с различной скоростью генетической эволюции организмов. Молекулярный анализ, основанный на использовании нескольких генов, увеличивает филогенетическое разрешение и лучше согласуется с морфологическими признаками таксона (Gontcharov et al., 2004).

2. Для анализа таксонов со значительным уровнем дивергенции (семейства, порядки) нужен менее изменчивый маркер (например, 18S) по сравнению с тем, который потребуется для изучения внутривидовой изменчивости. То есть, если в молекулярном анализе использовать

очень изменчивый штрихкод, то в случае популяционно-генетических исследований он будет работать хорошо, но на видовом уровне плохо. Существует риск случайного проявления завышенных оценок генетического расстояния и, как следствие, подвиды становятся видами. В работах часто можно наблюдать дробление одного вида на несколько, без подкрепления межвидовых различий морфологическими, физиологическими и цитологическими характеристиками, а также экологическими особенностями.

Преимущества использования ДНК-штрихкодирования для исследований зеленых водорослей очевидны: в первую очередь, данная технология даст возможность установить видовую принадлежность организма на любой стадии ЖЦ, используя только фрагмент ДНК, что позволит различать криптические виды (виды-двойники) зеленых водорослей и открывать новые виды для изучения биоразнообразия планеты. Кроме того, использование молекулярного анализа увеличит надежность и точность видовой идентификации зеленых водорослей. Исследование и занесение в базу данных штрихкодов типовых штаммов водорослей, даже при потере ваучерного вида, как, например, произошло с *Mychonastes ruminatus*, позволит решить таксономические трудности. Филогенетические деревья, построенные по данным баркодов, с разделенными по степени генетического родства видами зеленых водорослей на совершенно четкие клады, позволит экспертам сосредоточиться на поиске дополнительных диагностических признаков: морфологических, биохимических, физиологических, экологических и др., по которым данные виды наиболее различимы. Таким образом, ДНК-штрихкодирование не конкурирует и не исключает традиционные подходы к определению вида и изучению биологического разнообразия, а способствует дальнейшим исследованиям на новом уровне.

Для успешного использования ДНК-штрихкодирования зеленых водорослей в качестве инструмента таксономической идентификации и оценки их биоразнообразия должны выполняться **3 условия**:

1. Для различных таксонов *Chlorophyta* должны быть разработаны и утверждены молекулярные маркеры – ДНК-штрихкоды.
2. Должна быть создана полная, выверенная и открытая база данных ДНК-штрихкодов для данного отдела со строгими требованиями к качеству данных. Проблема ошибок и неточностей в существующих геномных банках озвучивалась уже не раз (Clark, Whittam, 1992; Bridge et al., 2003; Harris, 2003; Vilgalys, 2003), в то время как эффективность любого молекулярного анализа напрямую зависит от качества и количества данных, а следовательно, от полноты и точности базы данных.
3. Рутинный молекулярный анализ должен быть массовым и дешевым. Так, по данным Н.В. Ивановой с коллегами (Ivanova et al., 2006), затраты на получение последовательности штрихкода длиной до 350 п.н. должны укладываться в диапазон цен от 3.60 до 5.19 \$.

Однако на сегодняшний день ДНК-штрихкод для зеленых водорослей официально не утвержден. Малочисленность молекулярных данных зеленых водорослей представлена табл. 2.

Таблица 2

**Видовое богатство таксонов зеленых водорослей и степень наполнения
базы данных по ДНК-штрихкодированию**

Род (класс)	Количество таксономически принятых видов ¹	Количество видов с баркодами ²
<i>Asterochloris</i> (Trebouxiophyceae)	8	5
<i>Chlorococcum</i> (Chlorophyceae)	34	2
<i>Chloroidium</i> (Trebouxiophyceae)	4	1
<i>Chlorosarcinopsis</i> (Chlorophyceae)	20	3
<i>Cladophora</i> (Ulvophyceae)	183	13
<i>Cymbomonas</i> (Prasinophyceae)	3	1
<i>Pseudendoclonium</i> (Ulvophyceae)	10	1
<i>Rosenvingiella</i> (Trebouxiophyceae)	5	4
<i>Scenedesmus</i> (Chlorophyceae)	81	5
<i>Tetracystis</i> (Chlorophyceae)	21	1
<i>Ulothrix</i> (Ulvophyceae)	42	2

¹Согласно данным <http://www.algaebase.org> на 9.12.12

²Согласно данным <http://www.boldsystems.org> на 9.12.12

Следовательно, на современном этапе развития молекулярных технологий любой альголог при использовании филогенетического анализа наверняка столкнется с устойчивой проблемой большинства молекулярно-филогенетических исследований – малым объемом и неравномерностью охвата выборок по эколого-географическим ареалам с последующей недооценкой внутривидовой изменчивости, что может привести к ошибочным филогенетическим реконструкциям (Leliaert et al., 2012). Как и в любом молекулярном анализе, результаты ДНК-штрихкодирования можно считать убедительными лишь тогда, когда подробно исследована внутривидовая изменчивость – индивидуальная и географическая. Так как возможность различать близкородственные виды зеленых водорослей друг от друга может быть осложнена высоким полиморфизмом внутри каждого из видов или, наоборот, высоким межвидовым морфологическим сходством (в случае криптических видов). Кроме того, ДНК-штрихкодирование само по себе недостаточно для описания нового таксона, однако совместно с другими данными (морфологическими, биохимическими, физиологическими, экологическими и т.д.) может быть его основой (Hebert, Gregory, 2005). В настоящее время ясно, что для построения надежной филогении такой древней и разнообразной группы как зеленые водоросли, нужно проанализировать огромное количество генов многих видов (Philippe, Telford, 2006).

Таким образом, ДНК-штрихкоды могут быть использованы для таксономической идентификации зеленых водорослей независимо от их жизненной стадии и квалификации специалиста в области альгологии, что позволит исследователям найти криптические виды, оценить биоразнообразие *Chlorophyta*, связанное с их географическим распределением и экологическими особенностями. Поиск идеального молекулярного маркера для всех зеленых водорослей осложняется древностью и вариабельностью представителей отдела *Chlorophyta*. Поэтому все большим признанием пользуется утверждение, что анализ одного гена не в состоянии разрешить взаимосвязи между главными линиями зеленых водорослей, и точная филогенетическая реконструкция этого отдела требует использования ряда молекулярных маркеров, современных филогенетических методов и широкого набора таксонов. Проблема концепции вида зеленых водорослей и поиск диагностически значимых видовых признаков (молекулярных, морфологических, биохимических, экологических и др.) пока остаются нерешенными, и более чем 150-летнее высказывание Ч. Дарвина (Цит.: по Дарвин, 1991): «нет непогрешимого критерия, позволяющего различить виды и хорошо выраженные разновидности ... размеры различия, признаваемые необходимыми для возведения двух форм в степень видов, не поддаются определению», является как нельзя актуальным.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (грант 12-04-90811-мол_рф_нр) и Федеральной Целевой программы "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 гг." (соглашение № 8099).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева В.М. Род *Chlorella*. Морфология, принципы классификации. – Л.: Наука, 1975. – 88 с.
- Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (*Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales*). – С.Пб.: Наука, 1998. – 351 с.
- Дарвин Ч. Происхождение видов путем естественного отбора или сохранение благоприятных рас в борьбе за жизнь: Пер. с 6-го изд. (Лондон, 1872 г.) / Отв. ред. А.Л. Тахтаджян. – С.Пб.: Наука, 1991. – 540 с.
- Костіков І.Ю., Романенко П.О., Демченко Е.М. та ін. Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, конспект флори). – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 300 с.
- Матвеева Т.В., Павлова О.А, Богомаз Д.И. и др. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // Экол. генетика. – 2011. – 9, № 1. – С. 32–43.
- Минчева Е.В., Перетолчина Т.Е., Ижболдина Л.А. и др. Эволюционные связи эндемичной зеленой водоросли озера Байкал *Draparnaldioides simplex* с небайкальскими таксонами семейства *Chaetophoraceae* (*Chlorophyta*) // Молекуляр. биология. – 2013. – 47, № 1 – С. 181–184.

- Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений – способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия // Журн. общ. биол. – 2009а. – **70**, № 4. – С. 296–315.
- Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование – новое направление в сравнительной геномике растений // Генетика. – 2009б. – **45**, № 11. – С. 1436–1448.
- Aboal M., Werner O. Morphology, fine structure, life cycle and phylogenetic analysis of *Phyllosiphon arisari*, a siphonous parasitic green alga // Eur. J. Phycol. – 2011. – **46**. – P. 181–192.
- An S.S., Friedl T., Hegewald E. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons // Plant Biol. – 1999. – **1**. – P. 418–428.
- Archibald J.M. The puzzle of plastid evolution // Curr. Biol. – 2009. – **19**. – P. R81–R88.
- Aslam Z., Shin W.G., Kim M.K. et al. *Marinichlorella kaistiae* gen. et sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) based on polyphasic taxonomy // J. Phycol. – 2007. – **43**. – P. 576–584.
- Atkinson A.W., John P.C.L., Gunning B.E.S. Sporopollenin in the cell-wall of *Chlorella* and other algae: ultrastructure, chemistry, and incorporation of ¹⁴C–acetate, studied in synchronous cultures // Planta. – 1972. – **107**. – P. 1–32.
- Bérard A., Dorigo U., Humbert J.F., Martin-Laurent F. Microalgae community structure analysis based on 18S rDNA amplification from DNA extracted directly from soil as a potential soil bioindicator // Agronomie. – 2005. – **25**. – P. 1–7.
- Blanc G., Duncan G., Agarkova I. et al. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex // Plant Cell. – 2010. – **22**. – P. 2943–2955.
- Bock C., Krienitz L., Pröschold T. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (*Trebouxiophyceae*) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species // Fottea. – 2011. – **11**, N 2. – P. 293–312.
- Bridge P.D., Spooner B.M., Roberts P.J., Panchal G. On the unreliability of published DNA sequences // New Phytol. – 2003. – **160**. – P. 43–48.
- Buchheim M., Buchheim J., Carlson T. et al. Phylogeny of the *Hydrodictyaceae* (*Chlorophyceae*): inferences from rDNA data // J. Phycol. – 2005. – **41**. – P. 1039–1054.
- Buchheim M.A., Keller A., Koetschan C. et al. Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: towards an automated reconstruction of the green algal tree of life // PLoS ONE. – 2011. – **6**, N 2. – P. e16931.
- Buchheim M.A., Kirkwood A., Buchheim J.A. et al. Hypersaline soil supports a diverse community of *Dunaliella* (*Chlorophyceae*) // J. Phycol. – 2010. – **46**. – P. 1038–1047.
- Butterfield N.J., Knoll A.H., Swett K. Paleobiology of the neoproterozoic Svanbergfjellet formation, Spitsbergen // Fossils and Strata. – 1994. – **34**. – P. 1–84.
- Caisova L., Marin B., Sausen N., Pröschold T., Melkonian M. Polyphyly of *Chaetophora* and *Stigeoclonium* within the *Chaetophorales* (*Chlorophyceae*), revealed by sequence comparisons of nuclear-encoded SSU rRNA gene // J. Phycol. – 2011. – **47**. – P. 164–177.
- CBOL Plant Working Group, Hollingsworth P.M., Forrest L.L., Spouge J.L. et al. A DNA barcode for land plants // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2009. – **106**, N 31. – P. 12794–12797.

- Clark A.G., Whittam T.S. Sequencing errors and molecular evolutionary analysis // Mol. Biol. Evol. — 1992. — 9. — P. 744–752.
- Clarkston B.E., Saunders G.W. A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family *Kallymeniaceae* (*Gigartinales*, *Florideophyceae*), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. // Botany. — 2010. — 88, N 2. — P. 119–131.
- Cocquyt E., Verbruggen H., Leliaert, F., De Clerck O. Evolution and cytological diversification of the green seaweeds (*Ulvophyceae*) // Mol. Biol. Evol. — 2010. — 27. — P. 2052–2061.
- Coleman A.W. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure // Nucl. Acids Res. — 2007. — 35. — P. 3322–3329.
- Darienko, T., Gustavs, L., Mudimu, O. et al. *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) // Eur. J. Phycol. — 2010. — 45. — P. 79–95.
- De Wever A., Leliaert F., Verleyen E. et al. Hidden levels of phylodiversity in Antarctic green algae: further evidence for the existence of glacial refugia // Proc. Roy. Soc. B Biol. Sci. — 2009. — 276. — P. 3591–3599.
- del Campo E.M., del Hoyo A., Royo C. et al. A single primer pair gives a specific ortholog amplicon in a wide range of cyanobacteria and plastid-bearing organisms: Applicability in inventory of reference material from collections and phylogenetic analysis // Mol. Phyl. Evol. — 2010. — 57. — P. 1323–1328.
- Derelle E., Ferraz C., Rombauts S. et al. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 2006. — 103. — P. 11647–11652.
- Douzery E.J.P., Snell E.A., Baptiste E. et al. The timing of eukaryotic evolution: Does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils? // Ibid. — 2004. — 101. — P. 15386–15391.
- Eliáš M., Neustupa J., Škaloud P. *Elliptochloris bilobata* var. *corticola* var. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*), a novel subaerial coccal green alga // Biologia. — 2008. — 63, N 6. — P. 791–798.
- Eliáš M., Neustupa J. *Pseudomarvania*, gen. nov. (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*), a new genus for “budding” subaerial green algae *Marvania aerophytica* Neustupa et Šejnohová and *Stichococcus ampulliformis* Handa // Fottea. — 2009. — 9. — P. 169–178.
- Ettl H., Gärtner G. Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. — Stuttgart: Gustav Fischer, 1995. — 721 p.
- Evans K.M., Wortley A.H., Mann D.G. An assessment of potential diatom «barcode» genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and *ITS* rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (*Bacillariophyta*) // Protist. — 2007. — 158, N 3. — P. 349–364.
- Fama P., Olsen J.L., Stam W.T., Procaccini G. High levels of intra- and inter-individual polymorphism in the rDNA ITS1 of *Caulerpa racemosa* (*Chlorophyta*) // Eur. J. Phycol. — 2000. — 35. — P. 349–356.
- Fama P., Wysor B., Kooistra W.H.F.C., Zuccarello G.C. Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (*Caulerpales*, *Chlorophyta*) inferred from chloroplast *tufA* gene // J. Phycol. — 2002. — 38, N 5. — P. 1040–1050.

- Fawley M.W., Fawley K.P., Owen H.A. Diversity and ecology of small coccoid green algae from Lake Itasca, Minnesota, USA, including *Meyerella planktonica*, gen. et sp. nov. // Phycologia. – 2005. – **44**. – P. 35–48.
- Feliner G.N., Rossely J.A. Better the devil to know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants // Mol. Phyl. Evol. – 2007. – **44**, N 2. – P. 911–919.
- Ferri E., Barbuto M., Bain O. et al. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda) // Front. Zool. – 2009. – **6**. – P. 1.
- Fott B., Nováková M. A monograph of the genus *Chlorella*. The fresh water species // Studies in Phycology. – Praha: Academia, 1969. – P. 10–74.
- Friedl T. Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dicthyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae* cl. nov.) // J. Phycol. – 1995. – **31**. – P. 632–639.
- Friedl T., O'Kelly C.J. Phylogenetic relationships of green algae assigned to the genus *Planophila* (*Chlorophyta*): evidence from 18S rDNA sequence data and ultrastructure // Eur. J. Phycol. – 2002. – **37**. – P. 373–384.
- Gontcharov A.A., Marin B., Melkonian M. Are combined analyses better than single gene phylogenies? A case study using SSU rDNA and *rbcl* sequence comparisons in the *Zygnematophyceae* (*Streptophyta*) // Mol. Biol. Evol. – 2004. – **21**. – P. 612–624.
- Hall J.D., Fučnková K., Lo C. et al. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae // Cryptogamie Algol. – 2010. – **31**, N 4. – P. 529–555.
- Harris D.J. Can you bank on GenBank? // Trends Ecol. Evol. – 2003. – **18**, N 7. – P. 317–319.
- Hebert P.D.N., Gregory T.R. The promise of DNA barcoding for taxonomy // Syst. Biol. – 2005. – **54**, N 5. – P. 852–859.
- Hedges S.B., Blair J.E., Venturi M.L., and Shoe J.L. A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life // BMC Evol. Biol. – 2004. – **4**. – P. 2.
- Hegewald E., Wolf M. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Acutodesmus* (*Chlorophyta*, *Chlorophyceae*) as inferred from 18S rDNA and ITS-2 sequence comparisons // Plant Syst. Evol. – 2003. – **242**. – P. 185–191.
- Henley W.J., Hironaka J.L., Guillou L. et al. Phylogenetic analysis of the 'Nannochloris-like' algae and diagnoses of *Picochlorum oklahomensis* gen. et sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) // Phycologia. – 2004. – **43**. – P. 641–652.
- Herron M.D., Hackett J.D., Aylward F.O., Michod R.E. Triassic origin and early radiation of multicellular volvocine algae // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2009. – **106**. – P. 3254–3258.
- Horath T., Bachofen R. Molecular characterization of an endolithic microbial community in dolomite rock in the central Alps (Switzerland) // Microbiol. Ecol. – 2009. – **58**. – P. 290–306.
- Huss V.A.R., Frank C., Hartmann E. C. et al. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (*Chlorophyta*) // J. Phycol. – 1999. – **35**. – P. 587–598.

- Huss V.A.R., Scharpf T.K., Kessler E. Deoxyribonucleic-acid reassociation in the taxonomy of the genus *Chlorella*. V. *Chlorella vulgaris*, *C. luteoviridis*, *C. minutissima*, and *C. zofingiensis* // Arch. Microbiol. – 1989. – **152**. – P. 512–514.
- Huss V.A.R., Sogin M.L. Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the *Chlorococcales* based upon complete small-subunit ribosomal RNA sequences // J. Mol. Evol. – 1990. – **31**. – P. 432–442.
- Ikeda T., Takeda H. Species – specific differences of pyrenoids in *Chlorella* (*Chlorophyta*) // J. Phycol. – 1995. – **31**. – P. 813–818.
- Ivanova N.V., de Waard J.R., Hajibabaei M., Hebert P.D.N. / Protocols for high-volume DNA barcode analysis. – 2006. – P. 1–24. [http://barcoding.si.edu/PDF/Protocols_for_High_Volume_DNA_Barcode_Analysis.pdf]
- Kapaun E., Reisser W. A chitin-like glycan in the cell-wall of a *Chlorella* sp. (*Chlorococcales*, *Chlorophyceae*) // Planta. – 1995. – **197**. – P. 577–582.
- Katana A., Kwiatowski J., Spalik K. et al. Phylogenetic position of *Koliella* (*Chlorophyta*) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA // J. Phycol. – 2001. – **37**. – P. 443–451.
- Keeling P.J. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 2010. – **365**. – P. 729–748.
- Keller A., Schleicher T., Forster F. et al. ITS2 data corroborate a monophyletic chlorophycean DO-group (*Sphaeropleales*) // BMC Evol. Biol. – 2008. – **8**. – P. 218.
- Kelly L.J., Ameka G.K., Chase M.W. DNA barcoding of African *Podostemaceae* (riverweeds): a test of proposed barcode regions // Taxon. – 2010. – **59**, N 1. – P. 251–260.
- Kenrick P., Crane P.R. The origin and early evolution of plants on land // Nature. – 1997. – **389**. – P. 33–39.
- Kessler E. Comparative physiology, biochemistry, and taxonomy of *Chlorella* (*Chlorophyceae*) // Plant. Syst. Evol. – 1976. – **125**. – P. 129–138.
- Kessler E. Chemotaxonomy in the *Chlorococcales* // Progress in phycologica research. – North-Holland: Elsevier Biomed., 1982. – P. 111–135.
- Kessler E. A general review on the contributions of chemotaxonomy to the systematics of green algae // Systematics of the green algae. – London: Acad. Press, 1984. – P. 391–407.
- Kessler E., Huss V.A.R. Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (*Chlorophyceae*) strains of the culture collection of the University of Texas at Austin // J. Phycol. – 1992. – **28**. – P. 550–553.
- Krienitz L., Bock C., Dadheech P.K., Pröschold T. Taxonomic reassessment of the genus *Mychonastes* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) including the description of eight new species // Phycologia. – 2011. – **50**, N 1. – P. 89–106.
- Krienitz L., Hegewald E.H., Hepperle D. et al. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*) // Ibid. – 2004. – **43**. – P. 529–542.
- Krienitz L., Hegewald E., Hepperle D., Wolf M. The systematics of coccoid green algae: 18S rRNA gene sequence data versus morphology // Biologia. – 2003. – **58**. – P. 437–446.
- Krienitz L., Ustinova I., Friedl T., Huss V.A.R. Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family *Selenastraceae* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) // J. Phycol. – 2001. – **37**. – P. 852–865.

- Le Gall L., Saunders G.W. DNA barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the *Phyllophoraceae* (*Gigartinales*, *Rhodophyta*) in the Canadian flora // *Ibid.* – 2010. – **46**, N 2. – P. 374–389.
- Leliaert F., Smith D.R., Moreau H. et al. Phylogeny and molecular evolution of the green algae // *Crit. Rev. Plant Sci.* – 2012. – **31**. – P. 1–46.
- Leliaert F., Rueness J., Boedeker C. et al. Systematics of the marine microfilamentous green algae *Uronema curvatum* and *Urospora microscopica* (*Chlorophyta*) // *Eur. J. Phycol.* – 2009. – **44**. – P. 487–496.
- Letsch M.R., Muller-Parker G., Friedl T., Lewis L.A. *Elliptochloris marina* sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*), symbiotic green alga of the temperate Pacific Sea anemones *Anthopleura xanthogrammica* and *A. elegantissima* (Anthozoa, Cnidaria) // *J. Phycol.* – 2009. – **45**. – P. 1127–1135.
- Lewis L.A., McCourt R.M. Green algae and the origin of land plants // *Amer. J. Bot.* – 2004. – **91**. – P. 1535–1556.
- Lewis L.A., Wilcox L.W., Fuerst P.A., Floyd G.L. Concordance of molecular and ultrastructural data in the study of zoosporic chlorococcalean green algae // *J. Phycol.* – 1992. – **28**. – P. 375–380.
- Luo W., Pröschold T., Bock C., Krienitz L. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*) // *Plant Biol.* – 2010. – **12**. – P. 545–553.
- Luo W., Pflugmacher S., Pröschold T. et al. Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (*Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*) // *Protist.* – 2006. – **157**. – P. 315–333.
- Mares J., Leskinen E., Sitkowska M. et al. True identity of the European freshwater *Ulva* (*Chlorophyta*, *Ulvophyceae*) revealed by a combined molecular and morphological approach // *J. Phycol.* – 2011. – **47**, N 5. – P. 1177–1192.
- McDevit D.C., Saunders G.W. A DNA barcode examination of the *Laminariaceae* (*Phaeophyceae*) in Canada reveals novel biogeographical and evolutionary insights // *Phycologia.* – 2010. – **49**, N 3. – P. 235–248.
- McManus H.A., Lewis L.A. Molecular phylogenetic relationships in the freshwater family *Hydrodictyaceae* (*Sphaeropleales*, *Chlorophyceae*), with an emphasis on *Pediastrum duplex* // *J. Phycol.* – 2011. – **47**. – P. 152–163.
- Mei H., Luo W., Liu G.X., Hu Z.Y. Phylogeny of *Oedogoniales* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) inferred from 18S rDNA sequences with emphasis on the relationships in the genus *Oedogonium* based on ITS-2 sequences // *Plant Syst. Evol.* – 2007. – **265**, N 3-4. – P. 179–191.
- Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O. et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions // *Science.* – 2007. – **318**. – P. 245–251.
- Moore W.S. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees // *Evolution.* – 1995. – **49**, N 4. – P. 718–726.
- Moro C.V., Crouzet O., Rasconi S. et al. New design strategy for development of specific primer sets for PCR-based detection of *Chlorophyceae* and *Bacillariophyceae* in environmental samples // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – **75**, N 17. – P. 5729–5733.
- Němcová Y., Kalina T. Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C. sorokiniana* compared with *C. luteoviridis* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) // *Algol. Stud.* – 2000. – **100**. – P. 95–105.

- Němcová Y., Eliáš M., Škaloud P. et al. *Jenufa* gen. nov.: a new genus of coccoid green algae (*Chlorophyceae*, incertae sedis) previously recorded by environmental sequencing // J. Phycol. – 2011. – **47**. – P. 928–938.
- Neustupa J., Němcová Y., Veselá J. et al. *Leptochlorella corticola* gen. et sp. nov. and *Kalinella apyrenoidosa* sp. nov.: two new *Chlorella*-like green microalgae (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) from subaerial habitats // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2013. – **63**, N 1. – P. 377–387.
- Neustupa J., Eliáš M., Škaloud P. et al. *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*), a novel subaerial coccoid green alga // Phycologia. – 2011. – **50**. – P. 57–66.
- Neustupa J., Němcová Y., Eliáš M., Škaloud P. *Kalinella bambusicola* gen. et sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*), a novel coccoid *Chlorella*-like subaerial alga from Southeast Asia // Phycol. Res. – 2009. – **57**. – P. 159–169.
- Norton T.A., Melkonian M., Andersen R.A. Algal biodiversity // Phycologia. – 1996. – **35**, N 4. – P. 308–326.
- Novis P.M., Visnovsky G. Novel alpine algae from New Zealand: *Chlorophyta* // Phytotaxa. – 2012. – **39**. – P. 1–30.
- Nozaki H., Misawa K., Kajita T. et al. Origin and evolution of the colonial *Volvocales* (*Chlorophyceae*) as inferred from multiple, chloroplast gene sequences // Mol. Phyl. Evol. – 2000. – **17**. – P. 256–268.
- Nozaki H., Ohta N., Takano H., Watanabe M.M. Reexamination of phylogenetic relationships within the colonial *Volvocales* (*Chlorophyta*): An analysis of *atpB* and *rbcL* gene sequences // J. Phycol. – 1999. – **35**. – P. 104–112.
- Nozaki H., Itoh M., Sano R. et al. Phylogenetic relationships within the colonial *Volvocales* (*Chlorophyta*) inferred from *rbcL* gene sequence data // J. Phycol. – 1995a. – **31**. – P. 970–979.
- Nozaki H., Katagiri M., Nakagawa M. et al. Taxonomic reexamination of two strains labeled ‘*Chlorella*’ in the microbial culture collection at the National Institute for Environmental Studies (NIES–Collection) // Microbial Cult. Collect. – 1995b. – **11**. – P. 11–18.
- O’Kelly C.J. The origin and early evolution of green plants // Evolution of Primary Producers in the Sea. – Burlington: Elsevier Acad., 2007. – P. 287–309.
- O’Kelly C.J., Kurihara A., Shipley T.C., Sherwood A.R. Molecular assessment of *Ulva* spp. (*Ulvophyceae*, *Chlorophyta*) in the Hawaiian Islands // J. Phycol. – 2010. – **46**, N 4. – P. 728–735.
- Palenik B., Grimwood J., Aerts A. et al. The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2007. – **104**. – P. 7705–7710.
- Philippe H., Telford M.J. Large-scale sequencing and the new animal phylogeny // Trends Ecol. Evol. – 2006. – **21**. – P. 614–620.
- Pocock T., Lachance M.-A. Identification of a psychrophilic green alga from lake Bonney Antarctica: *Chlamydomonas raudensis* Ettl. (UWO 241) *Chlorophyceae* // J. Phycol. – 2004. – **40**. – P. 1138–1148.
- Poczai P., Hyvxnen J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects // Mol. Biol. Rep. – 2010. – **4**, N 4. – P. 1897–1912.

- Pombert J.F., Otis C., Lemieux C., Turmel M. The chloroplast genome sequence of the green alga *Pseudendoclonium akinetum* (Ulvophyceae) reveals unusual structural features and new insights into the branching order of chlorophyte lineages // Mol. Biol. Evol. – 2005. – **22**. – P. 1903–1918.
- Prochnik S.E., Umen J., Nedelcu A.M. et al. Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri* // Science. – 2010. – **329**. – P. 223–226.
- Pröschold T., Bock C., Luo W., Krienitz L. Polyphyletic distribution of bristle formation in *Chlorellaceae*: *Micractinium*, *Diacanthos*, *Didymogenes* and *Hegewaldia* gen. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) // Phycol. Res. – 2009. – **58**, N 1. – P. 1–8.
- Pröschold T., Darienko T., Silva P.C. et al. The systematics of “*Zoochlorella*” revisited employing an integrative approach // Environ. Microbiol. – 2011. – **13**. – P. 350–364.
- Pröschold T., Leliaert F. Systematics of the green algae: Conflict of classic and modern approaches // Unravelling the Algae: the Past, Present, and Future of the Algae Systematics. – London: Taylor and Francis, 2007. – P. 123–153.
- Pröschold T., Marin B., Schlösser U.G., Melkonian M. Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (*Chlorophyta*). I. Emendation of *Chlamydomonas* Ehrenberg and *Chloromonas* Gobi, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. // Protist. – 2001. – **152**. – P. 265–300.
- Rindi F., Lam D.W., Lopez-Bautista J.M. Phylogenetic relationships and species circumscription in *Trentepohlia* and *Printzina* (*Trentepohliales*, *Chlorophyta*) // Mol. Phyl. Evol. – 2009. – **52**, N 2. – P. 329–339.
- Rindi F., McIvor L., Sherwood A.R. et al. Molecular phylogeny of the green algal order *Prasiolales* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) // J. Phycol. – 2007. – **43**. – P. 811–822.
- Rodríguez F., Feist S.W., Guillou L. et al. Phylogenetic and morphological characterisation of the green algae infesting blue mussel *Mytilus edulis* in the North and South Atlantic oceans // Dis. Aq. Org. – 2008. – **81**. – P. 231–240.
- Scalzi G., Selbmann L., Zucconi L. et al. LIFE Experiment: Isolation of cryptoendolithic organisms from Antarctic colonized sandstone exposed to space and simulated Mars conditions on the International Space Station // Orig. Life Evol. Biosph. – 2012. – **42**. – P. 253–262.
- Sherwood A.R., Vis M.L., Entwisle T. J. et al. Contrasting intra versus interspecies DNA sequence variation for representatives of the *Batrachospermales* (*Rhodophyta*): Insights from a DNA barcoding approach // Phycol. Res. – 2008. – **56**, N 4. – P. 269–279.
- Sherwood A.R., Garbary D.J., Sheath R.G. Assessing the phylogenetic position of the *Prasiolales* (*Chlorophyta*) using *rbcL* and 18S rRNA gene sequence data // Phycologia. – 2000. – **39**. – P. 139–146.
- Shoup S., Lewis L.A. Polyphyletic origin of parallel basal bodies in swimming cells of chlorophycean green algae (*Chlorophyta*) // J. Phycol. – 2003. – **39**, N 4. – P. 789–796.
- Škaloud P., Neustupa J., Radochová B., Kubínová L. Confocal microscopy of chloroplast morphology and ontogeny in three strains of *Dictyochloropsis* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) // Phycologia. – 2006. – **44**, N 3. – P. 261–269.
- Škaloud P., Peksa O. Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) // Mol. Phylogen. Evol. – 2010. – **54**. – P. 36–46.
- Thüs H., Muggia L., Pérez-Ortega S. et al. Revisiting photobiont diversity in the lichen family *Verrucariaceae* (*Ascomycota*) // Eur. J. Phycol. – 2011. – **46**. – P. 399–415.

- Tirichine L., Bowler C.* Decoding algal genomes: tracing back the history of photosynthetic life on Earth // *Plant J.* – 2011. – **66**. – P. 45–57.
- Trainor F.R.* The format for a *Scenedesmus* monograph // *Algol. Stud.* – 1991. – **61**. – P. 47–53.
- Trainor F.R., Egan P.F.* Discovering the various ecomorphs of *Scenedesmus* // *Arch. Protistenk.* – 1991. – **139**. – P. 125–132.
- Turmel M., Otis C., Lemieux C.* The chloroplast genomes of the green algae *Pedinomonas minor*, *Parachlorella kessleri*, and *Oocystis solitaria* reveal a shared ancestry between the *Pedinomonadales* and *Chlorellales* // *Mol. Biol. Evol.* – 2009. – **26**. – P. 2317–2331.
- Verbruggen H., De Clerck O., N'Yeurt A.D.R. et al.* Phylogeny and taxonomy of *Halimeda incrassata*, including descriptions of *H. kanaloana* and *H. heteromorpha* spp. nov. // *Eur. J. Phycol.* – 2006. – **41**, N 3. – 337–362.
- Vergheze B.* Phylogeny and evolution of the *Chlorophyceae* and *Trebouxiophyceae*. Abstr. Ph.D. (Biol.): Thesis. – Tulsa: Univ. Press, 2007.
- Vilgalys R.* Taxonomic misidentification in public DNA databases // *New Phytol.* – 2003. – **160**, N 1. – P. 4–5.
- von Cräutlein M., Korpelainen H., Pietiläinen M., Rikkinen J.* DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity // *Biodiver. Conserv.* – 2011. – **20**. – P. 373–389.
- Watanabe S., Floyd G.L.* Ultrastructure of the quadriflagellate zoospores of the filamentous green algae *Chaetophora incrassata* and *Pseudoschizomeris caudata* (*Chaetophorales*, *Chlorophyceae*) with emphasis on the flagellar apparatus // *Bot. Mag. (Tokyo)*. – 1989. – **102**. – P. 533–546.
- Watanabe S., Nakayama T.* Ultrastructure and phylogenetic relationships of the unicellular green algae *Ignatius tetrasporus* and *Pseudocharacium americanum* (*Chlorophyta*) // *Phycol. Res.* – 2007. – **55**. – P. 1–16.
- Watanabe S., Himizu A., Lewis L.A. et al.* *Pseudoneochloris marina* (*Chlorophyta*), a new coccoid ulvophycean alga, and its phylogenetic position inferred from morphological and molecular data // *J. Phycol.* – 2000. – **36**. – P. 596–604.
- Watanabe S., Kuroda N., Maiwa F.* Phylogenetic status of *Helicodictyon planctonicum* and *Desmochloris halophila* gen. et comb. nov. and the definition of the class *Ulvophyceae* (*Chlorophyta*) // *Phycologia*. – 2001. – **40**. – P. 421–434.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR Protocols*. – San Diego: Acad. Press, 1990. – P. 315–322.
- Wilcox L.W., Lewis L.A., Fuerst P.A., Floyd G.L.* Group I introns within the nuclear-encoded small-subunit rRNA gene of three green algae // *Mol. Biol. Evol.* – 1992. – **9**, N 6. – 1103–1118.
- Wilson J.J.* Assessing the value of DNA barcodes and other priority gene regions for molecular phylogenetics of Lepidoptera // *PlosONE*. – 2010. – **5**. – e10525.
- Worden A.Z., Lee J.H., Mock T. et al.* Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas* // *Science*. – 2009. – **324**. – P. 268–272.
- Yoon H.S., Hackett J.D., Ciniglia C. et al.* A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes // *Mol. Biol. Evol.* – 2004. – **21**. – P. 809–818.

- Yuan C., Liu J., Fan Y. et al. Mychonastes afer HSO-3-1 as a potential new source of bio-diesel // Biotechnol. Biof. – 2011. – 4. – P. 47.*
- Zhang J.M., Huss V.A.R., Sun X.P. et al. Morphology and phylogenetic position of a trebouxiophycean green alga (*Chlorophyta*) growing on the rubber tree, *Hevea brasiliensis*, with the description of a new genus and species // Eur. J. Phycol. – 2008. – 43. – P. 185–193.*
- Zuccarello G.C., Price N., Verbruggen H., Leliaert F. Analysis of a plastid multigene data set and the phylogenetic position of the marine macroalga *Caulerpa filiformis* (*Chlorophyta*) // J. Phycol. – 2009. – 45. – P. 1206–1212.*

Поступила 4 апреля 2013 г.

Подписал в печать С.П. Вассер

A.D. Temraleeva¹, E.V. Mincheva², D.Yu. Sherbakov^{2,3}, D.L. Pinsky¹

¹Institute of physico-chemical and biological problems of soil sci. RAS,
2, Institutskaya St., Pushchino 142290, Moscow Region, Russia
e-mail: temraleeva.anna@gmail.com

²Limnological institute SB RAS,
3, Ulan-Batorskaya St., Irkutsk 664033, Russia

³Irkutsk State University,
5, Sukhe-Bator St., Irkutsk 664003, Russia

DNA-BARCODING OF GREEN ALGAE: A REVIEW

The features and problems of taxonomical identification of green algae are discussed in this review. The examples of the polyphyly in some genera of *Chlorophyta* and the difficulties of selection of diagnostic morphological properties are given. The new approach to study of biodiversity – DNA-barcoding are considered, its steps and requirements to DNA-barcodes are described. The advantages and disadvantages of eventual DNA-barcodes for green algae are shown. The data on successful usage of certain primers are presented for a number of green algae.

Key words: DNA-barcoding, green algae, molecular markers.