

УДК 574.5;577.29

МЕТАГЕНОМИКА ПИКОВОДОРΟΣЛЕЙ БЕЛОГО МОРЯ: ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ

© 2015 Т.А. Белевич¹, Л.В. Ильяш¹, И.А. Милюткина²,
М.Д. Логачева², Д.В. Горюнов², А.В. Троицкий^{2*}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва; факс: +7(495)939-3181,
электронная почта: bobr@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 06.07.15

После доработки 23.07.15

Пиководоросли (размер клеток менее 2–3 мкм) включают представителей разных таксономических групп. Они являются важнейшей составляющей морского планктона и биоты льда, а также играют существенную роль в биогеохимических циклах. Несмотря на значимость пиководорослей, представление об истинных масштабах их разнообразия стало формироваться совсем недавно благодаря использованию молекулярных методов. Сведения о таксономическом составе пиководорослей в Белом море, сочетающем черты умеренных и арктических водоемов, до настоящего времени отсутствовали. Метагеномный анализ был проведен с пробами подледной воды и льда, отобранных в марте 2014 г. в Кандалакшском заливе Белого моря. Выявлены представители следующих отделов водорослей: Chlorophyta, Katablepharidophyta, Naptophyta, Dinophyta, Cercozoa, Bacillariophyta, Cryptophyta и Ochrophyta. В планктоне наиболее многочисленными оказались представители порядка Pedinellales и родов *Paraphysomonas* и *Micromonas*, во льду – *Paraphysomonas*, *Micromonas* и *Metopion*. Число редких таксонов составляло 80 (вода) и 112 (лед). Выявлены также новые для Белого моря таксоны водорослей размерных групп нано- и микро-. Полученные данные могут рассматриваться как основа для дальнейших исследований мельчайших фотоавтотрофов в российской Арктике.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сезонный лед, подледный планктон, пиководоросли, метагеномный анализ, Белое море.

К пикоформам относят водоросли и циано-бактерии с размерами клеток менее 2–5 мкм [1–3]. Эукариотические пиководоросли – важнейший компонент планктонных и ледовых сообществ в морских экосистемах. В их состав входят как фотоавтотрофные и миксотрофные, так и гетеротрофные водоросли. Фотосинтезирующие пикоэукариоты могут давать существенный вклад в первичную продукцию [4]. При наблюдаемом климатическом тренде прогнозируется возрастание роли пикоформ в создании первичной продукции и увеличение доли мельчайших фотоавтотрофов в суммарном обилии фитопланктона [5]. Миксотрофные и гетеротрофные пикоэукариоты, являясь потребителями бактерий и пикоцианобактерий, играют существенную роль в функционировании микробной пищевой петли [3, 6].

Принятые сокращения: ОТЕ – операционная таксономическая единица, н.о. – нуклеотидный остаток.

* Адресат для корреспонденции.

До недавнего времени оценка видового богатства планктонных и ледовых водорослей базировалась в основном на морфологическом подходе. Малый размер, отсутствие у многих таксонов выраженных морфологических признаков, скрытое видовое разнообразие, разрушение нежных форм при фиксации, наличие некультивируемых таксонов – все это ведет к недооценке видового богатства мельчайших водорослей [7]. Идентификация видов пикофотоавтотрофов традиционными методами практически невозможна. Современные молекулярно-генетические методы позволяют решить эту проблему и в настоящее время с успехом применяются для оценки таксономического состава, богатства и разнообразия природного фитопланктона и ледовой флоры [2]. Особенно перспективными являются методы секвенирования нового поколения (NGS) [8].

Белое море расположено в субарктической зоне, однако абиотические условия в нем характеризуются рядом черт, свойственных арктичес-

ким морям. С другой стороны, по температуре поверхностного слоя в летний период Белое море приближается к умеренным морям [9]. Сведения о таксономическом составе пикоэукариот Белого моря до настоящего времени отсутствовали. Практически ничего не известно о составе пикоэукариот морей российской Арктики. Исследования таксономического состава пиководорослей как Белого моря, так и российских арктических морей современными молекулярными методами до настоящего времени не проводились.

В данной работе представлены результаты первого исследования таксономического состава эукариотических пиководорослей планктона и льда Белого моря с использованием метагеномного подхода.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. Материалом для работы послужили пробы, отобранные в Ругозерской губе Кандалакшского залива Белого моря в районе Беломорской биологической станции МГУ им. Н.А. Перцова (66°34' с.ш., 33°08' в.д.) в 2014 г., в марте, когда толщина ледового покрова максимальна.

Температура воздуха в период отбора проб колебалась от -6° днем до -10° ночью, температура подледной воды составляла $-1,2^{\circ}$. Толщина льда достигала 490 мм. Глубина снежного покрова не превышала 30 мм. Температура керна в верхнем и нижнем слоях (от $-3,0$ до $-3,2^{\circ}$) была ниже, чем в среднем слое (от $-1,8$ до -2°). Соленость подледной воды составляла 24,5‰.

Для анализа были отобраны керн льда и подледная вода. Для удаления нано- и микропланктона пробу подледной воды объемом 10 л пропускали через камеру обратной фильтрации, оснащенную ядерным мембранным фильтром (Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна) с диаметром пор 2 мкм. Полученный фильтрат пропускали через картридж Sterivex («Millipore, Durgapore», США) с диаметром пор 0,2 мкм, заполняли его лизирующим раствором (50 мМ Tris-HCl, 0,75 М сахарозы и 40 мМ EDTA; pH 8,3), замораживали и хранили в жидком азоте до дальнейшего анализа.

Керн льда, отобранный с помощью корончатого бура с внутренним диаметром 180 мм, делили на фрагменты высотой ~100 мм. Каждый фрагмент был помещен в стерильный контейнер с добавлением предварительно отфильтрованной и стерилизованной морской воды объемом, составляющим ~30% от общего объема пробы, для предотвращения разрушения орга-

низмов в результате осмотического стресса. Таяние проходило в темном месте при $3-5^{\circ}$ в течение 24 ч. Затем пробы растаявших фрагментов льда объединяли. Полученную суммарную пробу проводили через этапы пробоподготовки, описанные выше для подледной воды.

Выделение, амплификация и секвенирование ДНК. Для выделения ДНК использовали набор «Nucleospin Plant» («Macherey-Nagel», Германия). Амплификация была проведена с праймерами на область V4 гена 18S рРНК: прямой – EuF-V4 (5'-CCAGCASC CGCGGTAATWCC-3') и обратный – picoR2 (5'-AKCCCCYAACTTTC-GTTCTTGAT-3', специфичный для эукариотических групп пикофитопланктона). Количество ДНК в амплификационной смеси каждой пробы составляло ~10 нг. Для амплификации использовали набор Encyclo Plus PCR Kit (ЗАО «Евроген», Россия). Условия амплификации следующие: начальная денатурация 94° – 3 мин; 28 циклов: 94° – 15 с, отжиг праймеров 64° – 15 с, элонгация 72° – 30 с; заключительная элонгация 5 мин. Продукты амплификации были отделены от праймеров препаративным электрофорезом в 1%-ном агарозном геле с последующим выделением из агарозы с помощью набора MinElute Gel Extraction Kit («Qiagen», США).

В результате амплификации были получены ПЦР-продукты длиной не более 500 н.о. Очищенные ПЦР-продукты использовали для приготовления библиотек (по одной для проб воды и льда) для секвенирования на платформе «Illumina» (США) с использованием набора реагентов TruSeq Nano DNA («Illumina», США). Эффективную концентрацию библиотек проверяли с помощью количественной ПЦР с праймерами I-qPCR-1.1 (5'-AATGATACGGCGAC-CACCGAGAT-3') и I-qPCR-2.1 (5'-CAAGCAG-AAGACGGCATA CGA-3'), в качестве стандарта использовали контрольную библиотеку PhiX Control v3 («Illumina», США). Затем библиотеки разводили до 12 пМ и секвенировали с помощью набора Miseq Reagent Kit v.2 на секвенаторе Illumina MiSeq («Illumina», США). Длина прочтения составляла 250 н.о., чтение проводили с обоих концов фрагмента.

Идентификация операционных таксономических единиц (ОТЕ), оценка таксономического состава. Полученные прямые и обратные прочтения были объединены, отфильтрованы по качеству и проверены на наличие химер при помощи программного продукта MOTHUR [10]. Нуклеотидные последовательности были проанализированы пакетом программ SILVAngs 1.2 [11], в котором для выравнивания полученных прочтений используется база нуклеотидных последовательностей SINA v1.2.10 для ARB SVN (версия

21008) [12], для кластеризации последовательностей (порог 97%) – CD-HIT-est (version 3.1.2) [13]. Классификация последовательностей проводилась при помощи BLASTn (version 2.2.30+) со стандартными установками.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общий анализ всех прочтений. Суммарное число прочтений при секвенировании проб подледной воды (планктона) и льда составило 67 167 нуклеотидных последовательностей (табл. 1). В результате предварительной обработки (удаления низкокачественных нуклеотидных последовательностей, адаптеров и химер) число качественных последовательностей составило в пробе воды 27%, в керне льда – 16% от общего числа прочтений. Кластеризация OTE (порог 97%) выявила в обеих пробах сходное число OTE, однако число таксонов разного ранга в пробах существенно различалось. Доля неклассифицированных последовательностей составила в подледной воде 5%, во льду – 10%.

Выявленные таксоны соответствовали не только группам, включающим фотоавтотрофные организмы и традиционно относимые к водорослям [14], но и высшим растениям (Embryophyta), и исключительно гетеротрофным протистам. Также выявлены организмы с неясным систематическим положением (*incertae sedis*).

Водоросли были представлены следующими группами: Chloroplastida (Chlorophyta), Cryptophyta, Haptophyta, Alveolata (Dinophyta), Rhizaria (Cer-

cozoa), Stramenopila (Bacillariophyta, Bolidophyceae, Chrysophyceae, Dictyochophyceae, Xanthophyceae, Pelagophyceae). Из гетеротрофных протистов обнаружены Centrohelida, Opisthokonta, Ciliophora, а также гетеротрофные протисты из группы страменоцилы MAST 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 12, Labyrinthulomycota и Peronosporomycota.

Анализ всех последовательностей показывает, что наибольшее их количество соответствует организмам супергруппы SAR (Stramenopila, Alveolata, Rhizaria). Основная доля последовательностей в подледной воде принадлежала Stramenopila (43%) и Chloroplastida (23%), в то время как во льду преобладали Rhizaria (27%), а страменоцилы оказались вторыми по числу прочтений (24%).

Вклад последовательностей, относящихся к водорослям, в их общее число в подледной воде выше (88%), чем во льду (79%). Аналогично доля выявленных OTE водорослей в общем числе идентифицированных OTE выше в воде (83%), чем во льду (71%). Вклад таксонов водорослей в суммарное число таксонов в воде и во льду составил 65 и 61% соответственно.

Анализ последовательностей, соответствующих таксонам, традиционно относимым к водорослям. Дальнейший анализ полученных результатов был проведен только для таксонов, традиционно относимых к водорослям.

Отметим, что разные водоросли были идентифицированы до таксонов разного ранга: рода (87 таксонов), семейства (11 таксонов), порядка (8 таксонов), класса (33 таксона), отдела (14 таксонов), надотдела (2 таксона). Всего идентифи-

Таблица 1. Результаты молекулярно-генетического анализа проб подледной воды и льда, отобранных в марте 2014 г. в Кандакшском заливе Белого моря

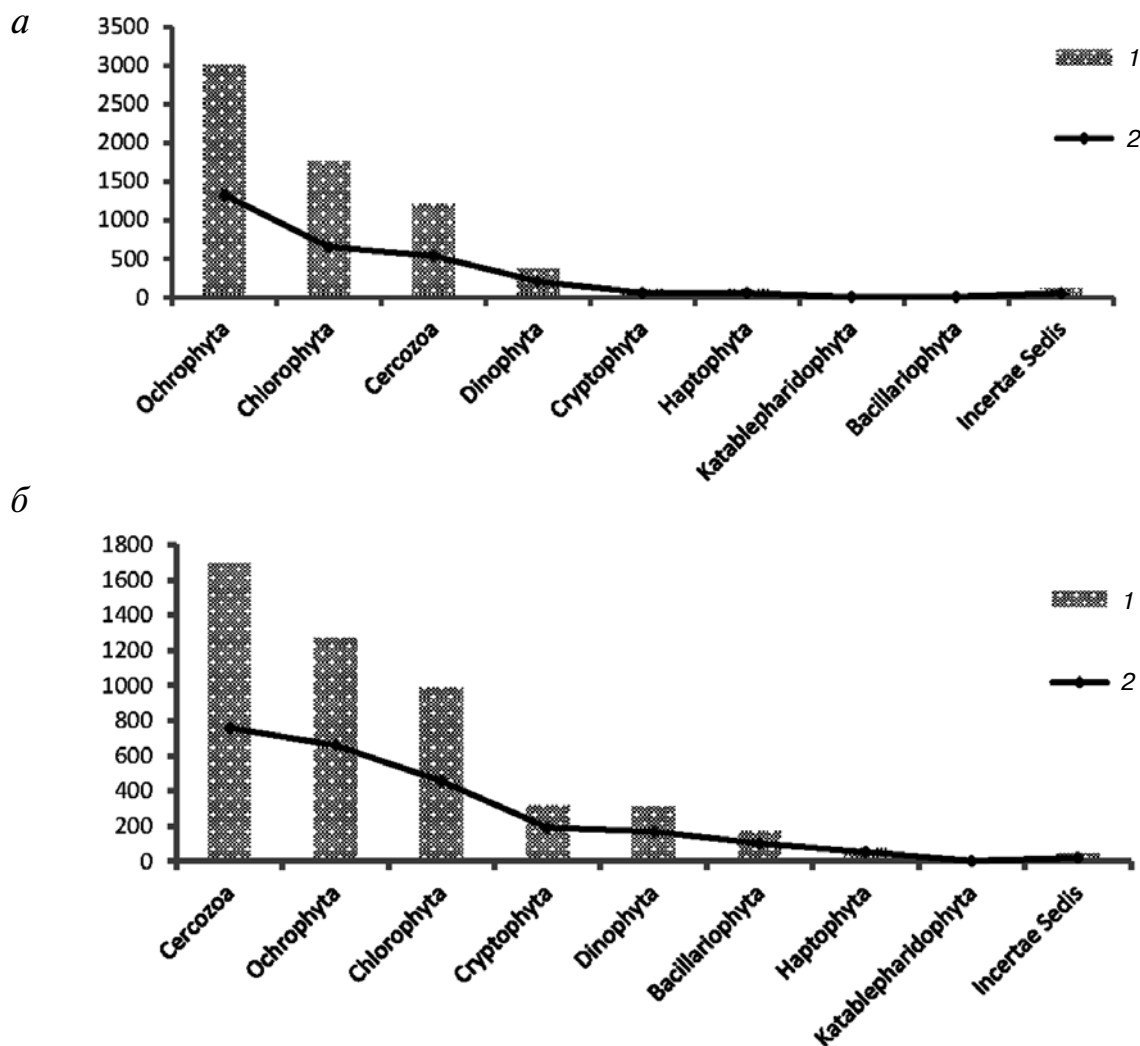
	Подледная вода	Лед
Общее число последовательностей	28 525	38 642
Число качественных последовательностей	7653	6232
Число неклассифицированных последовательностей	395	624
Общее число OTE, выявленных после кластеризации (сходство 97%)	3480	3377
Число таксонов разного ранга	140	226
<i>Последовательности таксонов, традиционно относимых к водорослям</i>		
Число последовательностей	6728	4902
Число OTE, выявленных после кластеризации (сходство 97%)	2897	2414
Число выявленных таксонов разного ранга	89	135

цировано 155 надвидовых таксонов, из них в подледной воде выявлено 89, а во льду – 135 таксонов.

Число выявленных ОТЕ водорослей возрастало с увеличением числа прочтений (рисунок). Одни выявленные ОТЕ были представлены значительным числом прочтений (многочисленные таксоны), тогда как другие таксоны – их единственным числом (редкие таксоны). Из общего числа всех выявленных таксонов 69 (45%) встречались как во льду, так и в подледной воде. Только во льду выявлено 66 таксонов (43%), только в воде – 20 таксонов (13%). Среди планктонных и ледовых водорослей найдены представители следующих отделов: Chlorophyta, Katablepharidophyta, Haptophyta, Dinophyta, Cercozoa, Bacillariophyta, Cryptophyta и Ochrophyta (рисунок, табл. 2). Выявлены также ОТЕ организмов с не-

ясным систематическим положением (*Telonema* и *Ebria*), а также ОТЕ Alveolata, не идентифицируемые до более низкого таксономического ранга и, возможно, соответствующие водорослям, входящим в эти группы. Наибольшим числом последовательностей в планктоне были представлены Ochrophyta и Chlorophyta (рисунок, а). Во льду преобладали Cercozoa и Ochrophyta, многочисленными также были Chlorophyta и Cryptophyta (рисунок, б).

Отдел Chlorophyta был представлен классами Mamiellophyceae (роды *Micromonas*, *Bathycoccus*, *Crustomastix*, *Mamiella*, *Ostreococcus*), Chlorophyceae (*Chlamydomonas*, *Carteria*), Pyramimonadophyceae (*Pyramimonas*, *Prasinoderma*), Trebouxiophyceae (*Trebouxia*, *Nannochloris*, *Choricystis*), Ulvophyceae (*Pseudendoclonium*, *Ulva*, *Capsosiphon*, *Protoderma*). Наибольшим числом ОТЕ (275 в планктоне и



Число прочтений (1) и выявленных ОТЕ (2) планктонных (а) и ледовых (б) водорослей

149 во льду) был представлен род *Micromonas*. Вторым по числу ОТЕ во льду оказался род *Pyramimonas* (60), а в подледной воде – род *Chlamydomonas* (65). Из обнаруженных родов Chlorophyta такие роды, как *Micromonas*, *Chlorocystis*, *Crustomastix*, *Bathycoccus*, *Ostreococcus*,

Pyramimonas и *Nannochloris*, имеют в своем составе виды, которые по размерам соответствуют пикофракции.

Отдел Ochrophyta был представлен шестью классами – Bolidophyceae, Chrysophyceae, Dictyochophyceae, Phaeophyceae, Xanthophyceae и

Таблица 2. Относительный вклад прочтений последовательностей различных таксонов в общее число последовательностей в подледной воде и во льду

Таксон		%
В подледной воде		
<i>Paraphysomonas</i>	Ochrophyta, Chrysophyceae	21
Pedinellales	Ochrophyta, Dictyochophyceae	14
<i>Micromonas</i>	Chlorophyta, Mamiellophyceae	13
Thecofilosea	Cercozoa	11
Mamiellophyceae	Chlorophyta	9
Syndiniales	Dinophyta, Syndiniophyceae	4
Imbricatea	Cercozoa	4
Chrysophyceae	Ochrophyta	2
<i>Bolidomonas</i>	Ochrophyta, Bolidophyceae	2
Остальные 80 таксонов		20
Во льду		
<i>Paraphysomonas</i>	Ochrophyta, Chrysophyceae	11
<i>Micromonas</i>	Chlorophyta, Mamiellophyceae	7
<i>Metopion</i>	Cercozoa	7
<i>Gyromitus</i>	Cercozoa	6
Thecofilosea	Cercozoa	6
Mamiellophyceae	Chlorophyta	5
Imbricatea	Cercozoa	4
Chrysophyceae	Ochrophyta	4
Pedinellales	Ochrophyta, Dictyochophyceae	3
<i>Goniomonas</i>	Cryptophyta	3
<i>Chlamydomonas</i>	Chlorophyta, Chlorophyceae	3
<i>Bolidomonas</i>	Ochrophyta, Bolidophyceae	2
<i>Pyramimonas</i>	Chlorophyta, Pyramimonadophyceae	2
Cercozoa Novel Clade Gran-3	Cercozoa	2
Cryptomonadales FV18-2G7	Cryptophyta	2
Glissomonadida	Cercozoa	2
Perkinsidae	Dinophyta, Perkinsea	2
Syndiniales	Dinophyta, Syndiniophyceae	2
Thaumatomonadidae	Cercozoa	2
<i>Ochromonas</i>	Ochrophyta, Chrysophyceae	2
<i>Nitzschia</i>	Bacillariophyta, Bacillariophyceae	1
<i>Hemiselmis</i>	Cryptophyta	1
<i>Nannochloris</i>	Chlorophyta, Trebouxiophyceae	1
Остальные 80 таксонов		20

Примечание. Систематика приведена согласно AlgaeBase (<http://www.algaebase.org>; searched on 01 June 2015) за исключением родов с противоречивым таксономическим положением: *Gyromitus* и *Metopion* – по работам Вилезич с соавт. [15] и Басс и Кавальер-Смит [16] соответственно.

Pelagophyceae. Из класса Bolidophyceae выявлен один род *Bolidomonas*, включающий только два вида — *B. mediterranea* и *B. pacifica*. Размеры клеток обоих видов не превышают 1,7 мкм [17], что соответствует пикофракции.

В классе Chrysophyceae было выявлено 16 таксонов, шесть из них были идентифицированы до рода: *Phaeoplaca*, *Spumella*, *Uroglena*, *Epiryxis*, *Ochromonas* и *Paraphysomonas*. Представители этих родов не попадают в размерную группу пиководорослей. Основной вклад в общее число ОТЕ Chrysophyceae как в воде, так и во льду вносили ОТЕ рода *Paraphysomonas* — 82 и 57% соответственно. Представители рода *Paraphysomonas* являются гетеротрофными нанофлагеллятами.

Класс Dictyochophyceae был представлен одной ОТЕ, идентифицированной на уровне порядка Pedinellales, и тремя ОТЕ, идентифицированными на уровне рода — *Pedinella*, *Pseudopedinella* и *Pteridomonas*. Число ОТЕ, идентифицированных на уровне порядка Pedinellales, было существенным и составляло почти 90% в подледной воде и 86% во льду от общего числа ОТЕ Dictyochophyceae. Очевидно, что такая большая доля этих организмов связана с идентификацией на уровне высокого таксономического ранга.

Класс Pelagophyceae был представлен тремя таксонами, один из которых определен до рода — *Ankylochrysis*. Этот род имеет в своем составе только один вид — *A. lutea*, размеры клеток которого превышают 2 мкм [18].

Класс Phaeophyceae, объединяющий макроводоросли, был представлен одной ОТЕ рода *Halothrix* и выявлен только в подледной воде. Наличие ОТЕ бурых водорослей, очевидно, обусловлено присутствием в воде половых продуктов макрофита.

Класс Xanthophyceae был представлен одной ОТЕ рода *Trachydiscus*, выявленной только в подледной воде.

Отдел Cryptophyta был представлен пятью таксонами разного ранга, три из которых определены до рода — *Hemiselmis*, *Goniomonas* и *Rhodomonas*. Ни один из этих родов не имеет представителей с размерами клеток ≤ 2 мкм. Кроме того, выявлены ОТЕ более высокого таксономического ранга — порядка Cryptomonadales и ОТЕ организмов, относящихся к группе Cryptomonadales FV18-2G7. Судить о размерах представителей этих групп не представляется возможным.

Отдел Katablepharidophyta был представлен классом Katablepharidophyceae. Выявлены ОТЕ двух родов — *Katablepharis* и *Leucocryptos*. Род *Leucocryptos* обнаружен только во льду, а род *Katablepharis* — и в воде, и во льду. Число выявленных ОТЕ обоих родов не превышало двух.

Отдел Haptophyta был представлен девятью таксонами, принадлежащими к двум классам: Pavlovophyceae и Coccolithophyceae. Восемь из них определены до рода — *Pavlova*, *Dicrateria*, *Syracosphaera*, *Emiliana*, *Isochrysis*, *Phaeocystis*, *Chrysochromulina* и *Chrysoculter*. Наибольшее число выявленных ОТЕ в подледной воде соответствовало роду *Dicrateria* — 83% от общего числа ОТЕ гаптофитовых водорослей. Во льду большая часть ОТЕ принадлежала роду *Pavlova* — 31% от общего числа ОТЕ отдела Haptophyta. Оба рода имеют в своем составе пикопланктонные формы.

Отдел Dinophyta был представлен 32 таксонами разного ранга, относящимися к трем классам: Dinophyceae, Perkinsea и Syndiniophyceae, 16 из них определены до рода. Число выявленных таксонов в подледной воде (15) было ниже, чем во льду (26). Таксоны класса Dinophyceae были представлены в основном единичными ОТЕ, как во льду, так и в воде. Род *Polarella* представлен только одним известным видом *P. gracialis*, размеры клеток которого превышают 2 мкм. В целом в настоящее время неизвестны представители свободноживущих динофлагеллят с размерами клеток, не превышающими 2 мкм [19]. Представители классов Perkinsea и Syndiniophyceae являются паразитами простейших, беспозвоночных, а также других динофлагеллят. Так, например, выявлен род *Parvilucifera*, в состав которого входит один вид *P. sinerae*, являющийся паразитом динофлагеллят из родов *Alexandrium*, *Dinophysis*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium*, *Heterocapsa* и многих других. Зооспоры *P. sinerae* по своему размеру попадают в пикофракцию [20]. Доля ОТЕ класса Syndiniophyceae в общем числе ОТЕ типа Dinophyta была выше в подледной воде (78%), чем во льду (28%).

Отдел Cercozoa был представлен 39 таксонами, из которых 14 определены до рода. Выявлены представители классов Sarcomonadea, Proteomyxidea, Thecofilosea, Chlorarachnea (Chlorarachniophyta) и Imbricatea. В подледной воде ОТЕ класса Chlorarachnea не выявлены, а во льду были встречены в единичном экземпляре. Наибольшая доля Cercozoa во льду (41%) относилась к классу Imbricatea.

Отдел Bacillariophyta был представлен в общей сложности 14 таксонами, из которых восемь относились к классу Bacillariophyceae и четыре — к классу Mediophyceae. В подледной воде выявлено всего два таксона, относящихся к родам *Cylindrotheca* и *Thalassiosira* и представленных единичными ОТЕ. Во льду преобладали представители родов *Navicula*, *Nitzschia* и *Attheya*, которые имеют в своем составе клетки с шириной створки ~ 2 мкм, однако другие линейные размеры клеток превышают эту величину.

В составе ледового сообщества также выявлены ОТЕ родов *Telonema* и *Ebria* (*incertae sedis*), в то время как в планктоне ОТЕ рода *Ebria* не обнаружены.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Представленные в работе данные являются результатами метагеномного анализа, впервые проведенного с пробами подледной воды и льда Белого моря. Выявленное нами общее число ОТЕ в пробах льда и воды сопоставимо с результатами, полученными для вод центрального Арктического бассейна [21], где число выявленных ОТЕ на разных станциях колебалось от 164 до 3126.

Получены первые сведения о таксономическом разнообразии эукариотических пиководорослей планктона и сезонного льда моря, сочетающего черты водоема умеренной зоны и арктических шельфовых морей, что актуально в свете наблюдаемых изменений морских экосистем Арктики под влиянием климатического тренда [22]. В частности, возможно изменение видового состава всех размерных групп фитопланктона, включая пикоформы, за счет проникновения в Арктику водорослей умеренных вод и исчезновения арктических эндемиков [23, 24]. Также прогнозируется возрастание роли пикоформ в создании первичной продукции и увеличение доли мельчайших фотоавтотрофов в суммарном обилии фитопланктона [4, 5]. Немаловажным является и то, что миксотрофные и гетеротрофные пикоэукариоты играют существенную роль в функционировании микробной пищевой петли [3, 6]. Размерный спектр первичных продуцентов существенно влияет на структуру пищевых сетей в пелагиали и во льду, на поток взвешенного органического вещества на дно [25]. Соответственно, изменение генетического разнообразия, абсолютного и относительного обилия мельчайших продуцентов скажется на функционировании арктических экосистем в целом [26]. С этой точки зрения полученные данные могут рассматриваться в качестве основы для дальнейших исследований мельчайших фотоавтотрофов в российской Арктике. Ранее нами были получены количественные оценки обилия пиководорослей и пикоцианобактерий в планктоне и льду Белого моря [27, 28], однако сведения о таксономическом составе пикоэукариот до настоящего времени отсутствовали.

Методические аспекты. При оценке как таксономического состава, так и обилия и функциональных характеристик пиководорослей крайне важен выбор верхнего размерного предела. К

настоящему времени единого подхода к размерному диапазону пикоформ не существует. Ряд авторов, следуя классификации, предложенной еще в 1978 г. [1], к пикофракции относят водоросли и цианобактерии с размерами клеток не более 2 мкм. В более поздних работах верхняя граница увеличена до 3 мкм [2] или даже 5 мкм [3, 29]. К тому же существуют виды с «пограничными» размерами. В популяции одного вида часть клеток меньших размеров может попадать в пикофракцию, а часть — выходить за ее пределы. Это же касается и видов, образующих колонии. Размер колонии, как правило, превышает верхнюю границу для пикоформ, тогда как отдельные клетки вполне соответствуют пикофракции, например, диатомовые водоросли рода *Skeletonema*.

Нами в качестве верхней границы пикофракции был выбран размер 2 мкм. Полученные результаты свидетельствуют о том, что, несмотря на фильтрационное фракционирование проб, значительная часть выявленных ОТЕ соответствует организмам, чьи размеры превышают 2–3 мкм. Такая картина отмечалась и в других работах с использованием дробной фильтрации и обусловлена как разрушением нежных форм даже при самой мягкой фильтрации, так и присутствием пула растворенной ДНК разных размерных групп организмов [30, 31].

В исследованных пробах воды и льда помимо водорослей были выявлены ОТЕ высших растений (<1%). Их присутствие в морской воде отмечается довольно часто и обусловлено поступлением спор и пыльцы растений из наземных экосистем [32].

Помимо водорослей также были выявлены ОТЕ гетеротрофных протистов *Centrohelida*, *Opisthokonta*, *Ciliophora*, *Rhizaria*, *Stramenopila* (MAST 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 12, *Labyrinthulomycota* и *Peronosporomycota*). Их доля была существенна в общем числе выявленных ОТЕ (34% в воде и 38% во льду).

Таксономический состав пикофитозеукариот. Как уже отмечалось выше, на оценку таксономического состава и числа таксонов пиководорослей существенно влияет выбор верхнего размерного предела. При установлении 2 мкм в качестве верхней границы пикофракции в состав фотоавтотрофных пикоэукариот планктона и льда Белого моря войдут представители не менее шести родов, три из которых относятся к зеленым водорослям (*Chlorophyta*): *Ostreococcus*, *Bathycoccus*, *Micromonas*. Пикофитозеукариоты из других отделов представлены *Bolidomonas* spp. (*Bolidophyceae*, *Ochrophyta*), *Dicrateria* spp. (*Coccolithophyceae*, *Haptophyta*) и *Thalassiosira* spp. (*Bacillariophyta*).

Полученные результаты дают первое представление о составе пиководорослей в планктоне и во льду Белого моря. Метагеномный анализ выявил довольно высокое таксономическое разнообразие пикоавтотрофов. Подчеркнем, что исследования были проведены в весенний период и только на одной станции. Для планктонных и ледовых пикоавтотрофов характерна выраженная пространственно-временная изменчивость состава и обилия [5, 29, 33–35]. Для полной оценки таксономического состава пикоавтотрофов необходимы исследования с использованием молекулярных методов в другие периоды и в других районах акватории моря.

Новые для Белого моря таксоны нано- и микроводорослей. Еще один важный результат проведенных исследований – выявление новых для Белого моря таксонов нано- и микроводорослей. Список планктонных водорослей Белого моря насчитывает 500 видов, ледовых – 413 видов [36, 37]. На основе метагеномного анализа выявлены ОТЕ родов, ранее в море не отмечавшиеся. Из Dinophyta новыми являются роды *Azadinium*, *Erythrospidinium*, *Lepidodinium*, *Chytriodinium*; из Chlorophyta – *Mamiella*, *Prasinoderma*, *Pseudendoclonium*, *Trebouxia*; из Cryptophyta –

Goniomonas; из Dictyochophyceae – *Pedinella*, *Pseudopedinella*, *Pteridomonas*; из Haptophyta – *Pavlova*, *Dicrateria*, *Chrysoculter*, *Isochrysis*, *Syracosphaera*, из Chrysophyceae – *Phaeoplaca*, *Spumella*, *Uroglena*, *Epipyxis*, *Paraphysomonas*. Род *Paraphysomonas* был представлен наибольшим числом последовательностей, как во льду, так и в планктоне. Значительная часть таксонов была представлена небольшим числом последовательностей, что говорит о редкости этих таксонов. Так, в подледной воде 80 из 89 таксонов, а во льду 112 из 135 давали всего 20% всех прочтений. Выявление редких таксонов – очевидное достоинство метагеномного анализа. Обнаруженные в единичных экземплярах таксоны могут играть существенную роль в функционировании сообществ. Они служат неисчерпаемым источником (депозитарием) генетического разнообразия планктонных и ледовых сообществ. Некоторые из редких таксонов могут стать многочисленными или даже доминирующими при изменении климата или возрастании антропогенной нагрузки на морские экосистемы [38].

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sieburth, J.M., Smetacek, V., and Lenz, J. (1978) Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationships to plankton size fractions, *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 1256–1263.
2. Massana, R. (2011) Eukaryotic picoplankton in surface oceans, *Annu. Rev. Microbiol.*, **65**, 91–110.
3. Hartmann, M., Zubkov, M.V., Scanlan, D.J., and Lepere, C. (2013) *In situ* interactions between photosynthetic picoeukaryotes and bacterioplankton in the Atlantic Ocean: evidence for mixotrophy, *Environ. Microbiol. Rep.*, **5**, 835–840.
4. Li, W.K., McLaughlin, F.A., Lovejoy, C., and Carmack, E.C. (2009) Smallest algae thrive as the Arctic Ocean freshens, *Science*, **326**, 539.
5. Kiliyas, E., Wolf, C., and Nothig, E.-A. (2013) Protist distribution in the western Fram Strait in summer 2010 based on 454-pyrosequencing of 18S rDNA, *J. Phycol.*, **49**, 996–1010.
6. Jurgens, K., and Massana, R. (2008) Protistan grazing on marine bacterioplankton, in *Microbial ecology of the oceans* (Kirchman, D.L., ed.), 2nd ed., Wiley, N.Y., pp. 383–441.
7. Patterson, D.J. (1999) The diversity of eukaryotes, *Amer. Nat.*, **154**, 96–124.
8. Kim, K.M., Park, J.-H., Bhattacharya, D., and Yoon, H.S. (2014) Applications of next-generation sequencing to unravelling the evolutionary history of algae, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64**, 333–345.
9. Berger, V., Dahle, S., Galaktionov, K., Kosobokova, X., Naumov, A., Ratkova, T., and Savinov, V. (2001) *White Sea: ecology and environment*, Derzavents Publisher, St. Petersburg/Tromso.
10. Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., and Weber, C.F. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 7537–7541.
11. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., and Glockner, F.O. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 590–596.
12. Pruesse, E., Peplies, J., and Glockner, F.O. (2012) SINA: accurate high throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes, *Bioinformatics*, **28**, 1823–1829.
13. Li, W., and Godzik, A. (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences, *Bioinformatics*, **22**, 1658–1659.
14. Guiry, M.D., and Guiry, G.M. (2015) AlgaeBase. World wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.
15. Wylezich, C., Mylnikov, A.P., Weitere, M., and Arndt, H. (2007) Distribution and phylogenetic relationships of freshwater thaumatomonads with a description of the new species *Thaumatomonas coloniensis* n. sp., *J. Euk. Microbiol.*, **54**, 347–357.
16. Bass, D., and Cavalier-Smith, T. (2004) Phylum-specific environmental DNA analysis reveals remarkably high global biodiversity of Cercozoa (Protozoa), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 2393–2404.

17. Guillou, L., Eikrem, W., Chretiennot-Dinnet, M.J., Le Call, F., Massana, R., Romari, K., Pedros-Alio, C., and Vaulot, D. (1999) Diversity of picoplanktonic prasynophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems, *Protist*, **15**, 193–214.
18. Kristiansen, J., and Preisig, H.R. (2001) Encyclopedia of Chrysophyte genera, *Biblioth. Phycol.*, **110**, 1–260.
19. Sorensen, N., Daugbjerg, N., and Gabrielsen, T.M. (2012) Molecular diversity and temporal variation of picoeukaryotes in two Arctic fjords, Svalbard, *Polar Biol.*, **35**, 519–533.
20. Garces, E., Alacid, E., Bravo, I., Fraga, S., and Figueroa, R.I. (2013) *Parvilucifera sinerae* (Alveolata, Myzozoa) is a generalist parasitoid of dinoflagellates, *Protist*, **164**, 245–260.
21. Kiliyas, E., Kattner, G., Wolf, C., Frickenhaus, S., and Metfies, K. (2014) A molecular survey of protist diversity through the central Arctic Ocean, *Polar Biol.*, **37**, 1271–1287.
22. IPCC, Intergovernmental Panel on climate change. Working group I 2007. *Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change* (Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., and Miller, H.L., eds), Cambridge University Press, N.Y., 996 pp.
23. Lovejoy, C., Vincent, W.F., Bonilla, S., Roy, S., Martineau, M.-J., Terrado, R., Potvin, M., Massana, R., and Pedros-Alio, C. (2007) Distribution, phylogeny, and growth of cold-adapted picoprasynophytes in arctic seas, *J. Phycol.*, **43**, 78–89.
24. Hamilton, A.K., Lovejoy, C., Galand, P.E., and Ingram, R.G. (2008) Water masses and biogeography of picoeukaryote assemblages in a cold hydrographically complex system, *Limnol. Oceanogr.*, **53**, 922–935.
25. Moran, S.B., Lomas, M.W., Kelly, R.P., Gradinger, R., Iken, K., and Mathis, J.T. (2012) Seasonal succession of net primary productivity, particulate organic carbon export, and autotrophic community composition in the eastern Bering Sea, *Deep Sea Res. II*, **65–70**, 84–97.
26. Wassmann, P., Duarte, C.M., Agusti, S., and Sejr, M.K. (2011) Footprints of climate change in the Arctic marine ecosystem, *Glob. Change Biol.*, **17**, 1235–1249.
27. Белевич Т.А., Ильяш Л.В. (2012) Обилие пикофитопланктона в проливе Великая Салма Белого моря, *Микробиология*, **3**, 389–395.
28. Ильяш Л.В., Белевич Т.А., Ступникова А.Н., Дриц А.В., Флинт М.В. (2015) Влияние локальных гидрофизических условий на пространственную изменчивость фитопланктона Белого моря, *Океанология*, **55**, 241–251.
29. Worden, A.Z. (2006) Picoeukaryote diversity in coastal waters of the Pacific Ocean, *Aquat. Microb. Ecol.*, **43**, 165–175.
30. Not, F., Massana, R., Latasa, M., Marie, D., Colson, C., Eikrem, W., Pedros-Alio, C., Vaulot, D., and Simon, N. (2005) Late summer community composition and abundance of photosynthetic picoeukaryotes in Norwegian and Barents Seas, *Limnol. Oceanogr.*, **50**, 1677–1686.
31. Lovejoy, C., and Potvin, M. (2011) Microbial eukaryotic distribution in a dynamic Beaufort Sea and the Arctic Ocean, *J. Plankton Res.*, **33**, 431–444.
32. Heusser, L., and Balsam, W.L. (1977) Pollen distribution in the northeast Pacific Ocean, *Quat. Res.*, **7**, 45–62.
33. Majaneva, M., Rintala, J.M., Piisila, M., Fewer, D.P., and Blomster, J. (2012) Comparison of wintertime eukaryotic community from sea ice and open water in the Baltic Sea, based on sequencing of the 18S rRNA gene, *Polar Biol.*, **35**, 875–889.
34. Piwosz, K., Wiktor, J.M., Niemi, A., Taterek, A., and Michel, C. (2013) Mesoscale distribution and functional diversity of picoeukaryotes in the first-year sea ice of the Canadian Arctic, *ISME J.*, **7**, 1461–1471.
35. Terrado, R., Scarcella, K., Thaler, M., Vincent, W.F., and Lovejoy, C. (2013) Small phytoplankton in Arctic seas: vulnerability to climate change, *Biodiversity*, **14**, 2–18.
36. Ильяш Л.В., Житина Л.С., Федоров В.Д. (2003) *Фитопланктон Белого моря*, Янус-К, Москва.
37. Poulin, M., Daugbjerg, N., Gradinger, R., Ilyash, L., Ratkova, T., and von Quillfeldt, C. (2011) The pan-Arctic biodiversity of marine pelagic and sea-ice unicellular eukaryotes: a first-attempt assessment, *Mar. Biodivers.*, **1**, 13–28.
38. Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., and Herndl, G.J. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **32**, 12115–12120.

METAGENOMIC ANALYSES OF WHITE SEA PICOALGAE: FIRST DATA

T. A. Belevich¹, L. V. Ilyash¹, I. A. Milyutina²,
M. D. Logacheva², D. V. Goryunov², A. V. Troitsky^{2*}

¹ *M. V. Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty,
Moscow 119991, Russia*

² *A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991,
Russia; fax: +7(495)939-3181, E-mail: bobr@belozersky.msu.ru*

Received July 6, 2015

Revision received July 23, 2015

Picoalgae (defined as cells smaller than 2–3 μm) compose of a wide diversity of taxonomic groups. They are an important constituent of the marine plankton and ice biota and perform essential ecological role in biogeochemical cycles. Despite their importance, the true extent of their diversity has only recently been uncovered by molecular surveys. No study on diversity of picoeukaryotes has been conducted so far in the White Sea – a unique marine environment that combined features of temperate and arctic seas. Here, we investigated the taxonomic composition of eukaryotic picoalgae in ice and under ice water at one station located in Kandalaksha Bay of the White Sea. We applied metagenomic survey using Illumina sequencing. Eight main algae phyla, namely, Chlorophyta, Katablepharidophyta, Haptophyta, Dinophyta, Cercozoa, Bacillariophyta, Cryptophyta and Ochrophyta were identified. The genera *Paraphysomonas* and *Micromonas*, and order Pedinellales were the most numerous in plankton, genera *Paraphysomonas*, *Micromonas* and *Metopion* – in ice. Number of «rare» phylotypes in under ice water was 80, in ice – 112. Some taxa of nano- and microalgae were identified for the first time in the White Sea phytoplankton. Our data provide a base for further research of tiny phototrophs in Russian Arctic.

Key words: seasonal ice, under ice plankton, picoalgae, NGS, metagenomic survey, the White Sea