

Слайд 1

Уважаемый Председатель и уважаемые члены ГЭК. Вашему вниманию предлагается курсовая работа на тему – ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ *ULNARIA ACUS* (KÜTZING) ABOAL.

Слайд 2

Цель работы – определение генетического разнообразия *Ulnaria acus* (Kützing) Aboal. на основе молекулярно-филогенетического анализа. Для достижения поставленной цели в настоящей работе необходимо последовательно решить ряд задач, представленных на слайде, как и актуальность исследования.

Слайд 3

Объектом данной работы являлся вид диатомовой флоры географически удаленных пресных водоемов: оз. Байкал (Россия), оз. Рица (Абхазия), оз. Голубое (Абхазия). В работе было использовано 15 моноклональных штаммов диатомовых водорослей из оз. Байкал (коллекция Отдела Ультраструктуры клетки ЛИН СО РАН), а также 12 штаммов из Коллекции диатомовых водорослей Мирового океана (WODC) Карадагской научной станции (Россия), отобранные в оз. Рица и оз. Голубого. Культивирование проводилось в ДМ - среде в 100 мл конические колбах Эрленмейера в холодильных шкафах, оснащенных лампами с контролируемым режимом освещения и температурным режимом 8°C.

Слайд 4

Методы исследования, представлены в списке на сайте:

- Выделение ДНК
- Амплификация фрагмента гена 18S рРНК
- Амплификация фрагмента гена *cox1*
- Электрофорез в агарозном геле
- Определение нуклеотидных последовательностей
- Филогенетический анализ.

Слайд 5

При работе со штаммами, отнесенных к роду *Ulnaria* по данным световой микроскопии, предварительно подбирали температуру гибридизации праймеров 18S_1F и 18S_1050R для амплификации фрагмента гена 18S рРНК содержащего переменные регионы V3-V4. В результате оптимальной температурой для

гибридизации данной пары праймеров решено было считать – 60 °С. Подобранные условия амплификации использовались для получения ампликонов 18S рРНК для всех исследуемых штаммов. Определения нуклеотидных последовательностей проводили с использованием праймера 18S_1050R. В результате было получено 15 фрагментов генов 18S рРНК из оз. Байкал (Россия) и 12 фрагментов из оз. Рица (Абхазия) и оз. Голубого (Абхазия).

Слайд 6

Филогенетический анализ фрагментов генов 18S рРНК показал, что все последовательности штаммов из оз. Байкал (Россия), оз. Рица и с оз. Голубого (Абхазия) образуют одну кладу с высокой степенью поддержки (99%), которая принадлежит роду *Ulnaria*. Клада *Ulnaria* содержит подкладу с степенью поддержки (85%), которая относится к видам *U. ulna* и *U. danica*, а также клада в которой находятся последовательности преимущественно относящиеся к *U. acus*. Полученные данные согласуются с результатами, которые были получены ранее в работах. Следует отметить, что штамм MS278 из оз. Байкал (Россия) при формировании коллекции культур был отнесен к роду *Ulnaria*, однако, во время секвенирования было показано, что он относится к *Fragilaria radians* (см. рис. 7). Некоторые рода *Ulnaria* и *Fragilaria* являются близкородственными и некоторые из видов имеют перекрывающиеся морфологические признаки, что затрудняет точность определения систематического положения представителей данных родов только посредством световой микроскопии. Таким образом, точная видовая идентификация таких видов как *U. acus* и *F. radians* невозможна без использования сканирующей электронной микроскопии или молекулярно-биологического анализа маркерных генов.

Слайд 7

С целью определения генетического разнообразия штаммов, отнесенных по данным анализа 18S рРНК к виду *U. acus* были подобраны условия амплификации фрагмента гена *cox1* (~750 п.н.) с праймерами *cox1_1F* и *cox1_714R*. Определения нуклеотидных последовательностей проводили с использованием праймера *cox1_714R*.

Слайд 8

С помощью филогенетического анализа фрагментов гена *cox1* штаммов *U. acus* было показано формирование трех клад. Клада 1 включает в себя штаммы, которые были выделены из проб отобранных из оз. Рица (Абхазия), оз. Байкал (Россия), оз. Фролиха (Россия). Клада 2 содержит последовательности штаммов из трех географически удаленных водоемов: оз. Голубое (Абхазия), оз. Байкал (Россия), р. Эрдер (Франция). Штамм *U. acus* выделенный из оз. Матана

(Индонезия) формирует отдельную 3 кладу. Результаты филогенетического анализа фрагментов гена *cox1* штаммов *U. acus* согласуются с ранее полученными. Географически оз. Рица и оз. Голубое удалены друг от друга на расстоянии 17,5 км. Два штамма выделенные из пробы фитопланктона оз. Рица принадлежат к 1 кладе. В свою очередь штамм Г.21.0309-ОС выделенный из оз. Голубое принадлежит ко 2 кладе. Однако, для того, чтобы говорить об однородности популяции в оз. Рица и оз. Голубое в настоящее время мы имеем недостаточное количество данных. Используя филогенетический анализ фрагментов гена *cox1* было показано, что штаммы *U. acus* 15K588 и 15K589 выделены из пробы фитопланктона отобранной в 15 км от р.п. Култук оз. Байкал относятся к разнымкладам. На основе полученных данных можно сделать предположение, что штаммы 15K588 и 15K589 относятся к разным генотипам одного вида, и что популяция *U. acus* в данной точке отбора является гетерогенной. Полученные в работе результаты подтверждают ранее полученные данные о гетерогенности популяции *U. acus* в оз. Байкал. Ранее возможность гетерогенности популяции диатомей была показана для других видов используя маркерные гены *cox1*, ITS1-5,8S-ITS2 и микросателлиты.

Слайд 9

Анализ фрагмента гена 18S рРНК содержащего вариабельные регионы V3-V4 показал, что среди 27 моноклональных штаммов 11 относятся к виду *Ulnaria acus* (Kützinger) Aboal. и 1 штамм - *Fragilaria radians*. Штаммы отнесенные к комплексу *Ulnaria ulna* и *Ulnaria danica* требуют дополнительных исследований с применением других генетических маркеров для установления точной видовой принадлежности. Анализ фрагмента гена *cox1* у штаммов *Ulnaria acus* (Kützinger) Aboal. показал гетерогенность популяции данного вида.

Слайд 10

Таким образом, Цель работы достигнута. Спасибо за внимание!