УДК 582.272.46 (571.66) DOI: 10.15853/2072-8212.2018.51.60-72

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ И ГЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ПРИ ОПИСАНИИ НОВЫХ ДЛЯ НАУКИ РОДОВ И ВИДОВ

Т.А. Клочкова[1], Г.Х. Ким[2], А.В. Климова[1], Н.Г. Клочкова[1]

[1] Профессор кафедры, д. б. н.; н. с., к. б. н.; дир. центра науч. образования, д. б. н.;
Камчатский государственный технический университет
683003 Петропавловск-Камчатский, Ключевская, 35. Тел.: (4152) 300-929, 420-501
E-mail: tatyana_algae@mail.ru, annaklimovae@mail.ru, ninakl@mail.ru
[2] Зав. лаб., профессор, доктор философии биологии;
Национальный университет Конджу, факультет биологических наук
32588 Конджу, Республика Корея. E-mail: ghkim@kongju.ac.kr

ПОРЯДОК LAMINARIALES, МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ, ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ СИСТЕМАТИКА, ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ СИСТЕМАТИКА

Приводится анализ полученных авторами результатов молекулярно-генетического изучения старых образцов некоторых видов ламинариевых водорослей российского Дальнего Востока, хранившихся в гербарных коллекциях от 6 до 44 лет. Для выделения у них ДНК авторы использовали два набора реактивов: Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek, Berlin-Buch, Германия) и Plant DNA Mini Kit (WizPrep™, Республика Корея), а также детергент CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide). В качестве ДНК-маркеров использовали Rubisco, рДНК (включая ITS1 и ITS2) и COI. Показано, что после 26 лет хранения образцов ДНК из них уже не выделяется. При этом даже у образцов <26 лет ДНК может быть значительно поврежденной, что позволяет амплифицировать только неполные участки ITS1 и ITS2, но не Rubisco и COI. Сравнение данных генотипической и фенотипической систематики ламинариевых дает основание полагать, что чрезмерное увлечение генетическими методами не вполне оправданно, и подходы к описанию новых для науки таксонов следует пересмотреть, особенно если сбор свежих образцов для выделения ДНК невозможен, а в изучаемом материале она полностью разрушена.

TAXONOMIC SIGNIFICANCE OF PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERS TO DESCRIBE NEW GENERA AND SPECIES

Tatyana A. Klochkova[1], Gwang Hoon Kim[2], Anna V. Klimova[1], Nina G. Klochkova[1]

[1] Professor, Dr. of Science (Biology); Researcher, Ph. D. (Biology); Dir. of Centre for Scientific Education, Dr. of Science (Biology); Kamchatka State Technical University
683003 Petropavlovsk-Kamchatsky, Klyuchevskaya, 35. Tel.: (4152) 300-929, 420-501
E-mail: tatyana_algae@mail.ru, annaklimovae@mail.ru, ninakl@mail.ru
[2] Head of Lab., Professor, Ph. D. (Biology); Kongju National University, Department of Biology
32588 Kongju, Korea. E-mail: ghkim@kongju.ac.kr

ORDER LAMINARIALES, MOLECULAR PHYLOGENY, PHENOTYPIC SYSTEMATICS, GENOTYPIC SYSTEMATICS

Analysis of the molecular-genetic study using old laminarialean samples collected from Russian Far East and stored in herbarium collections from 6 to 44 years is reported. To isolate algal DNA, we used two reagent kits: Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek, Berlin-Buch, Germany) and Plant DNA Mini Kit (WizPrep™, Republic of Korea), and CTAB detergent (Cetyltrimethyl ammonium bromide). Rubisco, rDNA (including ITS1 and ITS2) and COI were used as DNA markers. As our data showed, after 26 years of storage of the herbarium specimens, DNA can no longer be isolated. Even in samples <26 years old, DNA can be significantly damaged, which allows to amplify only partial ITS1 and ITS2, but not Rubisco and COI. Based on comparison of genotypic and phenotypic systematics of laminarialean algae, we suggested that overreliance on genetic methods is not completely justified and approaches to describe new taxa need to be reconsidered, especially if it is impossible to collect fresh samples for the DNA extraction, and DNA is competely degraded in the material under study.

Морские бурые водоросли порядка Laminariales играют ключевую роль в формировании прибрежной морской растительности и в связи с этим имеют высокую экологическую значимость (T. Klochkova et al., 2017; Klimova et al., 2018). Многие представители этой группы и получаемые из них ценные химические соединения широко используются в медицине, биотехнологии, разных отраслях промышленного производства (Суховеева, Подкорытова, 2006). Потребность в ламинариевом сырье в мире постоянно возрастает (Charrier et al., 2017), поэтому их всестороннему изучению, в том числе разработке систематики, уточнению ареалов видов, уделяется большое внимание. В силу своего мультизонального распространения, узости родовых и видовых ареалов, региональные альгофлоры ламинариевых разных районов Мирового океана значительно различаются между собой, и каждая из них обычно включает в свой состав определенное число узкоэндемичных видов и ро-

дов. Значительное биоразнообразие и высокая хорологическая дифференциация порядка Laminariales являются надежной предпосылкой для его широкого использования в фитогеографических и флорогенетических исследованиях, необходимых для понимания истории формирования морской биоты и тенденций ее современного развития. Это особенно важно в условиях глобальных изменений климата, возрастающего антропогенного загрязнения Мирового океана, глобальных процессов сокращения биоразнообразия, опустынивания дна за счет сокращения площадей, занятых зарослями ламинариевых и фукусовых водорослей, формирующих высокопродуктивные фитосообщества и подводные леса. Эти процессы, к сожалению, имеют место и в морях российского Дальнего Востока (далее по тексту: РДВ) (Клочкова, Березовская, 2001; Очеретяна и др., 2015).

Среди ламинариевых лишь несколько политипических родов, включающих четыре и более видов (*Laminaria*, *Saccharina*, *Alaria*, *Agarum*), имеют широкие амфипацифические и амфибореальные ареалы (Guiry, Guiry, 2018). Их представителям, особенно видам двух первых родов, свойственна слабая морфологическая дифференциация слоевищ. По этой причине они имеют незначительное количество не перекрывающихся между собой ценных с таксономической точки зрения морфологических признаков видового уровня, а то и вовсе не имеют их. Олиготипические и монотипические роды ламинариевых имеют, как правило, узкие ареалы. Оценка их генотипических признаков важна для понимания особенностей исторического развития данной группы водорослей и выявления центров происхождения и формирования ее биоразнообразия в Мировом океане.

В дальневосточных морях с помощью молекулярно-филогенетических методов исследований изучено только 26,5% таксонов ламинариевых от общего состава ламинариевых РДВ (National Center.., 2018). Одним из факторов, препятствующих более широкому их вовлечению в молекулярные исследования, являются трудности сбора свежего материала во многих районах столь обширного и малонаселенного региона, каким является РДВ. Большая часть его побережья, особенно беринговоморского и охотоморского, а также у Курильских островов, безлюдна. Посещение таких мест и организация там водолазных исследований требуют больших финансовых затрат и возможны только во время проведения специальных экспедиционных судовых исследований, а таковые в дальневосточных морях России в течение трех последних десятилетий, к сожалению, не проводятся.

Дальний Восток РФ, как и другие районы Тихого океана, богат эндемичными родами и видами. Значительная их часть распространена у северных и средних Курильских островов и материкового побережья Охотского моря (N. Klochkova, T. Klochkova, 2010; T. Klochkova et al., 2012, 2017; Klimova et al., 2018). Этому в значительной мере способствовала их длительная в историческом плане географическая изоляция (Ушаков, 1953). Отметим, что последние альгофлористические исследования в вышеуказанных и многих других районах РДВ были проведены более 20–50 лет назад. Собранные в ходе этих работ образцы уже не пригодны для выделения ДНК. Основанием для данного утверждения служит накопленный нами в ходе проведения ревизии ламинариевых водорослей РДВ опыт работы с образцами, собранными в разные годы и хранящимися в фондах российских и зарубежных научных организаций. Самые старые из них к моменту выделения нами из них ДНК хранились там более 40 лет. Среди них были типовые образцы и изотипы одного из описанных видов, а также образцы, по всем признакам принадлежащие к новому, еще не описанному в науке роду. Следуя сложившимся в современной альготаксономии нормам, описать его без предъявления данных секвинирования невозможно, поскольку принадлежащие к нему образцы были собраны в 1972 г. в сублиторали средних Курил, и ДНК в них уже разрушено.

В настоящей статье обсуждаются результаты, полученные при выделении ДНК из разных по срокам хранения образцов ламинариевых водорослей и высказывается позиция авторов по поводу привлечения к таксономическим исследованиям гербарных образцов, непригодных для молекулярно-генетических исследований. Эта позиция, на наш взгляд, позволяет выходить из тупиковых ситуаций, связанных с использованием подобного материала для описания новых для науки таксонов водорослей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Информация о гербарных образцах, использованных для выделения ДНК, приводится в таблице 1. Во время гербаризации все эти растения были

высушены без силикагеля и не подвергались обработке растворами спирта или формалина. В большинстве случаев их хранили в традиционных для альгологических коллекций бумажных пакетах в закрытых шкафах, при комнатной температуре и изменяющейся в зависимости от сезона года влажности воздуха.

Выделение ДНК проводили с использованием двух наборов реактивов: Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek, Berlin-Buch, Германия) и Plant DNA Mini Kit (WizPrep™, Республика Корея), а также метода с использованием детергента CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) (Clarke, 2009). В качестве ДНК-маркеров использовали Rubisco,

Таблица 1. Образцы видов ламинариевых водорослей, использованных для выделения ДНК и ПЦР-анализов и полученные результаты
Table 1. Specimens of laminarialean algae that were used for DNA extraction and PCR analyzes and the results obtained

Вид Species	Информация об образце Information about specimen	Способ и температура хранения образца Specimen storage method and temperature	Возраст образца в момент выделения ДНК Specimen age at the time of DNA extraction	Целостность ДНК DNA integrity	Амплифицированный участок Amplified region
Agarum sp.	Юг о-ва Ушишир, глубина 43 м, август 1989 г. Сборщик: неизвестен South of Ushishir Island, depth 43 m, August 1989. Collector: Unknown	Гербарный образец, при комнатной температуре Herbarium specimen, room temperature	26 лет years old	+	ITS1, ITS2
Alaria esculenta	О. Свальбард, Ню-Олесунн, выбросы, 17 июня 2009 г. Сборщик: Т.А. Клочкова Svalbard, Ny-Alesund, cast ashore, June 17, 2009. Collector: T.A. Klochkova	Гербарный образец, при комнатной температуре Herbarium specimen, room temperature	6 лет years old	+	Rubisco
Alaria paradisea	О. Уруп, 4 июля 1971 г. Сборщик: И.С. Гусарова Urup Island, July 4, 1971. Collector: I.S. Gusarova	Гербарный образец, при комнатной температуре Herbarium specimen, room temperature	44 года years old	–	–
Laminaria appressirhiza	Охотское море, Тауйская губа, глубина 8 м, 14 июля 2008 г. Сборщик: М.Н. Белый, Н.Г. Клочкова Sea of Okhotsk, Taui Bay, depth 8 m, July 14, 2008. Collector: M.N. Belij, N.G. Klochkova	Образец в силикагеле, 4 °C / Silica gel-preserved specimen, 4 °C	7 лет years old	+	ITS1, ITS2, COI, Rubisco
Laminaria multiplicata	Охотское море, Еринейская губа, Большая Мольта, глубина 3 м, 27 июня 1974 г. Сборщик: М.В. Суховеева Sea of Okhotsk, Yerineyskaya Bay, Bolshaya Molta, depth 3 m, June 27, 1974. Collector: M.V. Sukhoveeva	Гербарный образец, при комнатной температуре Herbarium specimen, room temperature	41 год years old	–	–
Tauya basicrassa	Охотское море, Тауйская губа, о. Недоразумения, глубина 8 м, июль 2008 г. Сборщик: М.Н. Белый, Н.Г. Клочкова Sea of Okhotsk, Taui Bay, Nedorazumeniya Island, depth 8 m, July 2008. Collector: M.N. Belij, N.G. Klochkova	Образец в силикагеле, 4 °C / Silica gel-preserved specimen, 4 °C	7 лет years old	+	ITS1, ITS2, COI, Rubisco
Неизвестная для науки ламинариевая водоросль Novel species of laminarialean alga (gen. et sp. nov.)	Северные Курилы, скалы Ловушки, скала Котиковая, глубина 4,5 м, 24 июля 1975 г. Сборщик: неизвестен Northern Kuriles, Lovushka Rocks, Kotikovaya Rock, depth 4.5 m, July 24, 1975. Collector: Unknown	Гербарный образец, при комнатной температуре Herbarium specimen, room temperature	40 лет years old	–	–

рДНК (включая ITS1 и ITS2) и COI (цитохромоксидаза). Для ПЦР-анализа использовали универсальные для ламинариевых водорослей праймеры (T. Klochkova et al., 2017; Klimova et al., 2018). В качестве основы для подготовки образцов для ПЦР-анализа использовали полимеразу TaKaRa Ex TaqTM (Takara Biomedicals, Otsu). Для визуализации ДНК и продуктов ПЦР на фореграмме использовали 1,5%-й полиакриламидный гель с этидиумом бромидом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение таксономии ламинариевых водорослей началось практически с самых первых шагов формирования биологической систематики как науки, и им занимались альгологи почти всех прибрежных стран, в альгофлоре которых присутствовали представители данной группы. Лидерами в этих исследованиях до 70-х гг. XX века были ученые Европы (Evans, 1965; Kain, 1969; Gerard, Mann, 1979) и Японии (Yendo, 1919; Myabe, Nagai, 1933; Kanda, 1936, 1938; Hasegawa, 1963). С конца XX века эти исследования продолжают ученые Японии (Yotsukura et al., 1999, 2006, 2008, 2016; Kawai, Sasaki, 2000; Kawai et al., 2008, 2017) и стали активно проводить альгологи Южной Кореи (Lee, Yoon, 1998; Yoon et al., 2001; Cho et al., 2006; Boo et al., 2011), Канады и Америки (Druehl, 1968, 1970, 1979; Widdowson, 1971; Wynne, 1982; Saunders, Druehl, 1993; Ar Gall et al., 1996; Lane, Saunders, 2005; Lane et al., 2006, 2007).

Принципиально новым этапом развития систематики ламинариевых было внедрение в нее методов молекулярной систематики и филогении (Fang, Dai, 1980; Saunders, Druehl, 1993; Yoon, Boo, 1999; Yoon et al., 2001; Kawai et al., 2008; Boo et al., 2011; Lane et al., 2006, 2007). В силу методических трудностей выделения ДНК из старых образцов бурых водорослей (T. Klochkova et al., 2010, 2012; Климова и др., 2016) для секвенирования стараются использовать свежесобранный материал. Это, в свою очередь, приводит к утрате интереса к формированию и поддержанию альгологических коллекций.

Многие представители новой генерации исследователей, изучающих филогению водорослей, в большей степени сосредоточены на успехе проведения этапа молекулярных исследований. Очень часто это магистранты и докторанты зарубежных вузов, большинство из которых не имеют достаточной альгофлористической и альготаксономической подготовки и не владеют традиционными методами фенотипической систематики, использующей для систематического деления видов морфолого-анатомические и эколого-географические признаки. В результате в Генбанке NCBI увеличивается объем загруженных сиквенсов образцов водорослей, правильность определения которых ничем не подтверждена и вызывает большие сомнения (National Center.., 2018). В ряде случаев научная несостоятельность представленных в международном генбанке видов совершенно очевидна. Это возникает, например, когда в него загружаются данные секвенирования генов или их участков у образцов, собранных на очень большом удалении от типовых местообитаний тех видов, под именем которых они зарегистрированы, или даже за пределами их ареалов. Для примера можно указать работы (Lane et al., 2006, 2007). В дальнейшем при проведении сравнительных молекулярно-филогенетических исследований эти данные могут быть использованы другими малоопытными исследователями как эталон таксономической принадлежности вида.

Не все методики выделения ДНК одинаково эффективны для бурых водорослей. Некоторые вносят искажения в результат, поскольку при их применении может иметь место неэффективный лизис клеток, наличие в препарате ингибиторов (полисахаридов, фенолов, пигментов), что, в свою очередь, вызывает потерю ДНК на стадии элюирования или нарушение ее целостности. В своих исследованиях мы протестировали три разные методики: с использованием наборов реактивов Invisorb Spin Plant Mini Kit и WizPrep™ Plant DNA Mini Kit, а также широко применяемый в молекулярных исследованиях метод с использованием детергента CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide). Наши исследования показали, что из старых сухих образцов ламинариевых водорослей наиболее качественную ДНК можно выделить с использованием набора реактивов Invisorb Spin Plant Mini Kit. При использовании детергента CTAB количество ДНК в пробе, как правило, было больше, однако ее качество было заметно хуже. Так, при использовании ДНК, полученной методом выделения в CTAB, в сиквенсах появлялись «ложные петли» (т. е. дополнительные «ложные» участки из нуклеотидов) или же имело место выпадение отдельных нуклеотидов или целых участ-

ков. При использовании набора реактивов WizPrep™ Plant DNA Mini Kit имело место ошибочное определение нуклеотидов, что становилось очевидным при анализе сиквенсов. Выявить факт наличия подобных ошибок легко, если замена нуклеотида регистрируется в участках, консервативных у всех родов в порядке Laminariales. Учитывая это, можно предполагать наличие аналогичных ошибок на участках сиквенса, которые не являются консервативными и отображают разницу между анализируемыми таксонами. Таким образом, использование детергента CTAB и набора реактивов WizPrep™ Plant DNA Mini Kit для выделения ДНК из бурых водорослей является неэффективным.

Для успешного выделения ДНК ламинариевых водорослей нами в стандартный протокол набора реактивов Invisorb Spin Plant Mini Kit были внесены некоторые изменения. Во-первых, перемолотый в пудру водорослевый материал, помещенный в лизирующий раствор, термостатировали при 65 °C в течение двух часов, а не 10 мин, как указано в протоколе, поскольку максимально разрушить толстые клеточные стенки ламинариевых удается только за столь продолжительное время. Вес сухого образца (т. е. перемолотой в пудру на шаровой мельнице части таллома растения) подбирался опытным путем, т. к. степень вязкости образца в лизирующем растворе зависела от количества в нем альгиновых кислот и их производных, а оно, как известно, варьирует в разные сезоны года и у разных видов ламинариевых. Также опытным путем подбирали части таллома (т. е. стволик, ризоиды, верхняя/нижняя часть пластины, спорофиллы), в которых сохранилась наиболее неповрежденная ДНК. Как правило, наиболее сохранной ДНК остается в нижней части пластины, что неудивительно, поскольку там находится базальная меристема.

После лизиса образцы центрифугировали в течение 5 мин при 13 000 об/мин, супернатант переносили в новую пробирку и добавляли стандартный буферный раствор для очистки от ингибиторов, включающих фенольные соединения, полисахариды и пигменты. Затем образец выдерживали на льду в течение 40–60 мин, а не 5 мин, как указано в протоколе. На завершающем этапе ДНК элюировали в 50 мкл дистиллированной воды, подогретой до температуры 50 °C, а не в 100 мкл буфера TE, как указано в протоколе. Как показывают наши исследования, выделенная таким способом ДНК может храниться при минусовой температуре (от –18 до –70 °C) без потери своего качества по крайней мере в течение 6 лет. Для ПЦР-анализа ее необходимо разбавить в дистиллированной воде в соотношении 1:100 или 1:1000 (в случае, если для ее выделения использовали старые гербарные или относительно свежие, высушенные в силикагеле образцы соответственно). Концентрированную элюированную ДНК использовать не рекомендуется, поскольку это вызывает ингибицию ПЦР. Однако в случае если образцы очень старые и ДНК в них практически полностью разрушилось (рис. 1, полосы 3–5, 20–23), для ПЦР наряду с разбавленной можно использовать и неразбавленную элюированную ДНК. Именно поэтому мы предлагаем элюировать ее в дистиллированную воду вместо буфера TE, т. к. он содержит стабилизаторы для деградации нуклеиновых кислот (1 M Tris-HCl pH 8,0 и 200 мкл 0,5 M ЭДТА), высокая концентация которых может ингибировать ПЦР.

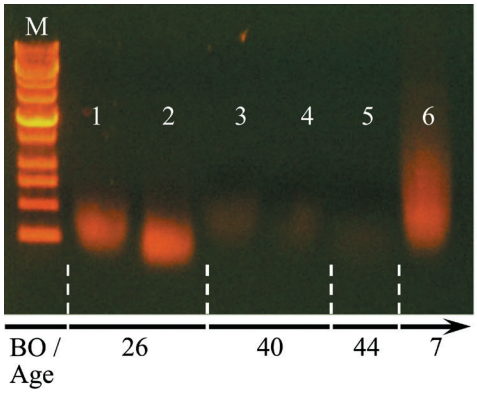
Как показывают наши исследования, гербарный материал, собранный в 1970-е годы, практически не пригоден для выделения неповрежденной ДНК из-за общей деградации тканей и микробиологического разрушения. На представленной на рисунке 1 фореграмме видно, что ДНК в образцах, собранных 40–44 года назад, практически не сохранилась (полосы 3–5, 20–23). ПЦР-анализ может дать положительный результат даже в случаях, когда на фореграмме ДНК практически не видно, однако в обсуждаемом нами случае его многократный повтор с использованием ее разбавленной и неразбавленной пробы дал отрицательный результат. Например, в 2010 г. нам удалось выделить ДНК из изотипа охотоморского эндема *Laminaria multiplicata*, собранного в 1974 г., однако ПЦР-анализ участков ITS1 и ITS2 показал, что она была значительно повреждена и уже совершенно непригодна для анализа. Так, в участках ITS1 и ITS2 количество неизвестных/неопределенных нуклеотидов составляло 29,6 и 17% соответственно (рис. 2).

Гербарный образец *Agarum* sp. 1989 г. сбора оказался пригодным для выделения ДНК, однако она была значительно поврежденной. На представленной на рисунке 1 фореграмме видно, что соответствующие ДНК этого образца полосы распределены в геле не равномерно, а сконцентриро-

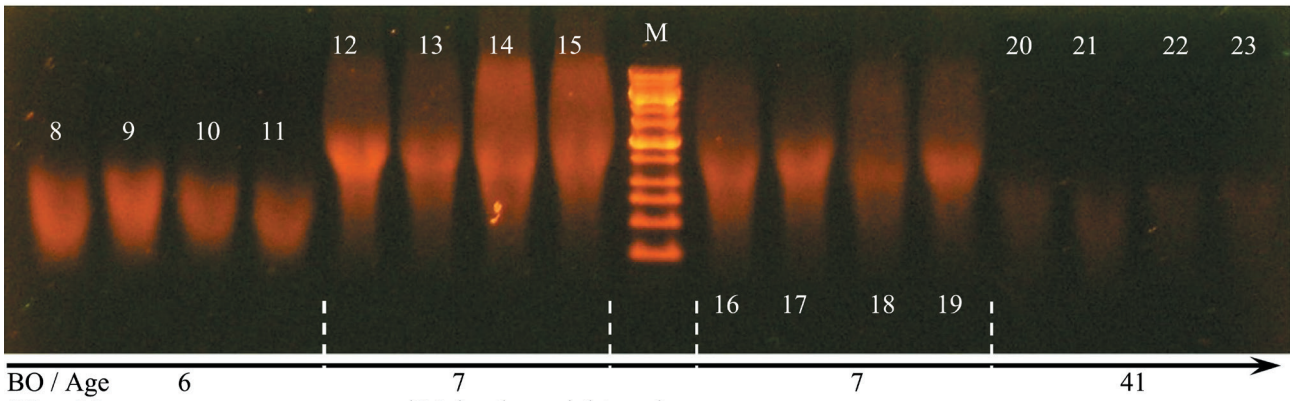
ваны только в его нижней части (полосы 1–2). В момент выделения ДНК возраст этого уникального курильского образца составлял 26 лет. В ходе ПЦР-анализа нам удалось амплифицировать ITS1 и ITS2 и составить из них целостный контиг рДНК, однако амплификация Rubisco и COI дала отрицательный результат.

Неповрежденной ДНК сохранилась в относительно свежих образцах: например, *Laminaria appressirhiza* и *Tauya basicrassa*, собранных в 2008 г. (T. Klochkova et al., 2017). Вероятнее всего, это связано с тем, что растения были собраны со дна, а не из выбросов (рис. 1, полосы 8–11), высушены за относительно короткое время, а также постоянно хранились в силикагеле при температуре 4 °C. В ходе ПЦР-анализа нам удалось амплифицировать ITS1, ITS2, Rubisco и COI. В момент выделения ДНК возраст этих образцов составлял 7 лет. Таким образом, мы предполагаем, что большинство старых образцов бурых ламинариевых водорослей, хранящихся в фондовых гербариях, не пригодны для выделения ДНК. Судя по нашим данным, максимальный возраст образцов ламинариевых, теоретически пригодных для ее выделения, составляет 26 лет.

В последние десятилетия в таксономических исследованиях разных групп водорослей лидирующие позиции прочно заняла генотипическая систематика. Она откровенно потеснила, а в случае изучения систематики и филогении ламинариевых водорослей практически вытеснила из области этих исследований традиционную фенотипическую систематику. Так, например, только по результатам секвенирования, при отсутствии устойчивых родоспецифических морфологических признаков для этой группы были описаны



M — Маркер молекулярного веса / Molecular weight marker
BO / Age — Возраст образца в момент выделения ДНК, лет / Specimen age at the time of DNA extraction, years
1–2 — Гербарный образец *Agarum* sp. Растение собрано в 1989 / Herbarium specimen of *Agarum* sp., collected in 1989
3–4 — Гербарный образец неизвестной и, вероятнее всего, новой для науки ламинариевой водоросли. Растение собрано в 1975 / Novel species of laminarialean algae, collected in 1975
5 — Гербарный образец *Alaria paradisea*. Растение собрано в 1971 / Herbarium specimen of *Alaria paradisea*, collected in 1971
6 — Гербарный образец *Tauya basicrassa*. Растение собрано в 2008 / Herbarium specimen of *Tauya basicrassa*, collected in 2008



M — Маркер молекулярного веса / Molecular weight marker
BO / Age — Возраст образца в момент выделения ДНК, лет / Specimen age at the time of DNA extraction, years
8–11 — Гербарный образец *Alaria esculenta*. Растение собрано в 2009 / Herbarium specimen of *Alaria esculenta*, collected in 2009
12–19 — Гербарные образцы *Laminaria appressirhiza*. Растения собраны в 2008 / Herbarium specimen of *Laminaria appressirhiza*, collected in 2008
20–23 — Гербарный образец (изотип) *Laminaria multiplicata*. Растение собрано в 1974 / Herbarium specimen (isotype) of *Laminaria multiplicata*, collected in 1974

Рис. 1. Результаты выделения ДНК (электрофорез в агарозном геле) из образцов разных видов ламинариевых водорослей со сроком хранения от 6 до 44 лет
Fig. 1. Results of DNA extraction (electrophoresis in agarose gel) from specimens of various laminarialean algae, which were preserved from 6 to 44 years

новые для науки роды *Saccharina* (Lane at al., 2006), *Pseudolessonia* (Cho et al., 2006), *Neoagarum* (Kawai et al., 2017). Несмотря на значительные морфологические различия, были объединены роды *Thalassiophyllum* и *Agarum* (Boo et al., 2011), включены в род *Saccharina* представители родов *Kjellmaniella* и *Cymathaere* (Lane et al., 2006). С игнорированием требований ботанической номенклатуры было восстановлено семейство Arthrothamnaceae (Jackson et al., 2017). Примеры несогласования данных генотипической и фенотипической систематики можно продолжать. Важнее отметить другое: усилиями приверженцев генотипических методов изучения филогении ламинариевых обесценены признаки традиционной фенотипической систематики семейственного и родового уровней, в связи с чем она утратила логическую стройность, а новая система, основанная на признаках генотипической систематики, еще очень далека от завершения.

Формирование перекосов в оценке значимости фенотипических и генотипических признаков наблюдается не только для ламинариевых, аналогичные ситуации возникают и при изучении других таксономических групп. Во многом этому способствовала политика зарубежных высокорейтинговых журналов, редакторы и рецензенты которых, работая, как правило, в хорошо оснащенных современным оборудованием лабораториях, не рекомендуют к печати статьи с результатами таксономических ревизий и описанием по морфолого-анатомическим признакам новых для науки родов и видов, не подкрепленных молекулярно-генетическими данными.

С одной стороны, это требование выглядит вполне уместным. Оно заставляет исследователей идти в ногу со временем и осваивать методы молекулярно-генетического анализа или вынуждает их искать другие возможности определения генотипических признаков у изучаемых ими образцов. С другой стороны, оно становилось препятствием для инвентаризации биоразнообразия и развития биологической систематики в целом. Попытаемся ниже обосновать это утверждение.

Биологическая систематика с момента своего становления оперирует такими понятиями, как типовое местообитание, тип вида. Последний является объективным носителем научного названия вида или подвида как систематической единицы живой материи. Образцы, выбранные в качестве голотипа, изотипы, синтипы, паратипы, неотипы бесценны для проведения таксономических ревизий, поскольку именно их использовали для составления протологов видов. Их привлечение к исследованию повышает доверие к полученным результатам, и порой только оно обеспечивает их достоверность. Но поскольку многие из типовых образцов были собраны в прошлые

Длина фрагмента / Fragment length — 1076 nt
Неизвестный/неопределенный нуклеотид (N) /
Unknown/unspecified nucleotide (N) — 319 nt (29.6%)

AACTGTCGNGGCNGAGTNNCTTNGTCGGCTNTGTGCGCTGNAAGAGCCAAACCCTGNTANANCTG
ATGAACNCNNTGTNCATCCNCATGCGCCNAAGGCTGANCTAGTAGCGTGCTCNNTTGGANCACGTT
ATGGTNNCTNGTCNAGANGCCCGCGACNANGAAANGCTTTGGACCNAGTCATTACTGCAGAGANT
GNNGTANNTCTGATTTNGCTCGANNCGAATAACGANGNGNTNATGACCGNTNNCNACGAACAANT
GCNGAGNNTCNAGGCNGANGANAAGTGTCNNNNNNNGGGAACNGNCNCNGGAAANGTTTATCNG
CTTACNGTGGGGNCNCTTCAGGAGTGTCNGTTGACANCANTNGACTGGNNAACNAANGNNGANGN
GANNNCNCNTCCTANAATGGNTNNNTNACCCGAATNATNTNTCAGGNCTNCNGNCANAAGTTTNC
GAGGNGNNACGNANNCTCTTCCANNNNATNCNNNTNCNANGTTAAAGCAGTNANTGGACCATTTA
TNAACTNANNTNATTTATCNNCCANNCCNNCTCNTCNANAGAANNNANNANTCTCANGCCNNNAA
NNNAATCNNCNNTGGNNCCNTCCTNNNCTTCCCAAANAATNNCANTCAANNTCNCAGANNCNCTN
NAANCCNNTCNNGGNNNAAANCNNCAANNAANNCCNTTCCANCTAANAANAAAATTNTCAANNA
CNCNNTTTTCCNAGANNTTNTTAATAATNTNNTANAANATNNNTTTGGTNCNATTTCTNNNAAGNT
NTTCNTCACNTNNNTTNTTTNNTCNNCANANAANTNNNTTNTANCCGAANCANNACTANAAAAAN
NNTTCCTNTCNNTANAANATNATAGANTACNTCNTTNCNNNAATNTCCNNTTTNATNTAAACCTCTT
CTCNNANANTATAACTNTNNAAAACNNNATNAANCCNATNATATTNNANTNTTATNCANGANNANA
ATTATTNNNTNNANCNNNACNNTNANTTTNTNNCCNCCTANCNTNTNCTNACNNNGTNTTNNTCTN
CANCTNTACNCTTNNAANNTTTNNTAANNTT

Длина фрагмента / Fragment length — 547 nt
Неизвестный/неопределенный нуклеотид (N) /
Unknown/unspecified nucleotide (N) — 93 nt (17%)

TCATCTCGAAGANGGGCAAATGCGCTTAAATTTNATAGACTAANCCACGATTNCNGNNAAAAAGCT
TCACGCACTTCAGGATTTNNGTTCATGAACCTAGGCATTCATCTGCGGTCTGGAGGANGCAAANGT
GNTNGTACNATACNCANATCGCNCCNNNGANANGAATACTNATCGCGCCCGACANGACNAATGAN
NGCNAANTCGGCNGACATANTGGGCNAACCGGGAGGAGCTTGGCGACNAGNACGGNAAGCAACG
CGGTGCCCAACCCGGACGCGGCCTTCANCGTCNCGACAAACAGCCCNATCGGAAAGGCTTCTCCG
ACNATCCCGTTGCCACGTTCCGATTGCACGCTCATCGCCAGAAGCGCCCANATGGCGGNGTTCATGC
CNGTCTGGTTTCCGCCAAGCAATGCNAGCTGATNANTNACGNCNGTCNANNNTNNGCTNTNGNCN
ANGATNNCAANNGNTATGATGAGGCNTTNTGANANNNGGNCNAANCNNTTCNNANTATCANTGNN
CNNTNNNATGATNATNANNANNNG

Рис. 2. Результаты секвенирования участков ITS1 и ITS2, амплифицированных из ДНК изотипа охотоморского эндема *Laminaria multiplicata*, собранного в 1974 г. N — неизвестный/не определенный нуклеотид (наложение пиков шума и основного сигнала в хроматограмме). Самые длинные неповрежденные участки в сиквенсах выделены подчеркиванием

Fig. 2. Sequencing results of the ITS1 and ITS2 regions amplified from the DNA of isotype of the Okhotsk endemic species, *Laminaria multiplicata*, collected in 1974. N – unknown/undetermined nucleotide (i. e. overlapping of noise peaks and main signal in the chromatogram). The longest intact areas in the sequences are underlined

века, выделить из них ДНК невозможно. Как быть в этих случаях?

Наиболее правильным выходом из подобной ситуации было бы использование образцов, аналогичных по морфологическим признакам типовым, из типовых местообитаний последних. Но в этой связи стоит другой вопрос: как быть исследователю, если посещение типового местообитания изучаемого им вида для него по ряду объективных причин невозможно. Это может быть большая географическая удаленность района, его зарубежное местонахождение, отсутствие финансов, необитаемость района, ограниченный режим его посещения, необходимость оформления разрешительных документов для посещения этого района, антропогенная трансформация его биоты, обусловившая исчезновение необходимого исследователю вида и т. д.

А как поступать в случаях, когда какой-нибудь редкий узкоареальный вид, описанный по единичной находке, в районе прежнего местонахождения уже не встречается? Ведь пульсация ареалов в условиях глобального изменения климата только усиливается, и некоторые виды в связи с этим сокращают свое присутствие или исчезают из мест былого произрастания. С такой ситуацией мы столкнулись при изучении таксономического положения, экологии и современного распространения *Alaria paradisea*, когда все наши попытки собрать вид в типовом местообитании, у небольшого острова Алаид (Северные Курилы), оказались безуспешными (Klimova et al., 2018). Все описанные выше ограничения не дают возможности использовать в таксономической работе материалы предыдущих исследователей. В связи с этим встает вопрос: нужно ли пользоваться старыми материалами и можно ли публиковать результаты исследований, не подтвержденные молекулярно-филогенетическими данными?

Итак, упомянутый выше односторонний подход к выбору для публикации таксономических статей, подкрепленных результатами молекулярно-филогенетического анализа, с одной стороны, оправдан, поскольку нередко только он дает возможность разобраться с внутривидовой дифференциацией политипических видов и «букетами» близкородственных родов. С другой стороны, он лишает исследователей возможности обнародования результатов ревизии старых коллекций, описания только на основе морфолого-анатомических признаков новых для науки родов и видов. Поэтому нам представляется, что политика уважаемых журналов, стремящихся быть в тренде, заботящихся о своем имидже и наукометрических показателях, на наш взгляд, не совсем верна.

Нам представляется, что выбор статей для печати должен осуществляться дифференцированно, особенно тогда, когда научному сообществу представляются результаты изучения образцов живых организмов, собранных в труднодоступных, редко посещаемых географических районах, или когда сборщики при сборе материала использовали особые навыки, например, умение использовать легководолазную технику или альпинистское снаряжение. Особую ценность при этом составляют статьи с описанием новых родов, поскольку родовые признаки более устойчивы и эксклюзивны.

Под родом в биологии понимается группа видов, более тесно связанных друг с другом, чем с любыми видами других родов. В настоящее время считается, что удовлетворительные доказательства их родства может предоставить только молекулярно-филогенетический анализ. Только выстроенные с его помощью молекулярные древа могут показать — в какую кладу попадает тот или иной таксон и кто его ближайшие соседи. При этом, как мы уже упоминали выше, отвергаются данные морфолого-анатомического анализа, интегрально отражающие генетическую близость видов, составляющих один род или даже одно семейство. И это несмотря на то, что понимание того, что генетически закрепленная морфология вида делает организм материальной сущностью за пределами его ДНК и является отражением его экологии, физиологии, биотических и биоценотических взаимоотношений и экосистемных функций, было выработано к концу 70-х годов XX столетия.

История систематики знает много случаев, когда разные формы одного вида описывались не только как разные виды, но даже как разные роды, и когда, напротив, разные виды объединялись в один. В некоторых случаях для таксономической дифференциации использовали неустойчивые признаки, изменяющиеся под воздействием экологии, типа питания, возраста, других причин. Если мы понимаем род как группу видов, объединяемых апоморфными признаками (т. е. характеризирующими только ее и полностью отсутству-

ющими у других видов), то должны считать приемлемым описание нового рода только по морфологии, особенно при изучении группы, для которой присуща монотипия, при которой к таксону вышестоящего ранга относится только один таксон нижестоящего ранга.

Что касается описания новых видов, особенно принадлежащих к политипным родам, то здесь уровень требований к достоверности результатов должен быть более жестким. Поскольку виды таких родов часто не имеют неперекрывающихся признаков и выделяются по неповторимым сочетаниям перекрывающихся признаков, которые к тому же имеют широкий размах изменчивости, их описание без молекулярной поддержки представляется неприемлемым. Рецензенты, предлагающие не описывать новые для науки роды без молекулярной филогении, казалось бы, преследуют цель свести к минимуму субъективность таксономии, определяемую предпочтениями исследователей, среди которых одни склонны к объединению и обобщению видов, а другие — к их чрезмерному дроблению. Однако таксономия — это наука, и новые таксоны, которые следует рассматривать как новые научные знания о биоразнообразии живой материи и новые научные открытия, как и все в науке, являются лишь гипотезами, которые впоследствии в ходе проведения более емких повторных исследований могут быть подтверждены или опровергнуты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Не умаляя огромного вклада генотипической систематики в развитие представлений о происхождении и родственных связях отдельных групп организмов, следует признать, что ее развитие сопровождается накоплением неудач и ошибок и нарастанием беспорядка в предъявлении генетических данных. Подробно эту ситуацию мы обсуждали в нашей предыдущей статье (Т. Клочкова, Н. Клочкова, 2018). В качестве основных недостатков генотипических исследований, требующих устранения, следует отметить некорректную идентификацию секвенируемых образцов, таксономическую инфляцию, приводящую к созданию таксономического хаоса, как это, например, произошло при изучении молекулярной филогении рода *Chlamydomonas* (Pröschold et al., 2001). Для отдельных групп организмов, в том числе для ламинариевых, стоит отметить растущий разрыв между молекулярной филогенией и морфологическими данными. Последний, с нашей точки зрения, является наиболее серьезной научной проблемой, требующей скорейшего разрешения и выработки новых подходов к уравновешиванию молекулярных данных и данных традиционной линнеевской систематики.

Учитывая угасание интереса к анатомо-морфологическому изучению живых организмов и формированию опыта практического использования накопленных в этом отношении знаний, при ускоряющемся сокращении в науке флористов и систематиков, решение поставленных выше вопросов становится все более актуальным. Чтобы привести к равновесию генотипическую и фенотипическую систематику, с одной стороны — не следует преувеличивать таксономическую ценность молекулярных признаков и не доверять данным морфолого-анатомического анализа, с другой стороны — необходимо, чтобы исследователи, чрезмерно увлеченные молекулярными исследованиями, при описании новых таксонов вернулись к изучению и учету морфологических признаков при обсуждении полученных ими молекулярно-филогенетических древ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ ПРОЕКТА

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, and Forestry (IPET) through Golden Seed Project (213008-05-2-SB810), funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA), Ministry of Oceans and Fisheries (MOF), Rural Development Administration (RDA) and Korea Forest Services (KFS), and also by the National Research Foundation of Korea Grant (NRF-2015M1A5A1041804).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Клочкова Н.Г., Березовская В.А. 2001. Макрофитобентос Авачинской губы и его антропогенная деструкция. Владивосток: Дальнаука. 208 с.

Клочкова Т.А., Клочкова Н.Г. 2018. Проблемы геносистематики и изменение родовой принадлежности и авторства у видов бурых ламинариевых водорослей *Saccharina bongardiana* и *Saccharina gurjanovae* // Вестник КамчатГТУ. № 43. С. 87–95.

Климова А.В., Клочкова Т.А., Клочкова Н.Г. 2016. О типовых образцах видов рода *Alaria* Greville Камчатской альгофлоры // Вестник КамчатГТУ. № 38. С. 51–62.

Очеретяна С.О., Клочкова Н.Г., Клочкова Т.А. 2015. Сезонный состав «зеленых приливов» в Авачинской губе и влияние антропогенного загрязнения на физиологию и рост некоторых зеленых водорослей // Вестник КамчатГТУ. № 33. С. 30–36.

Суховеева М.В., Подкорытова А.В. 2006. Промысловые водоросли и травы морей Дальнего Востока: Биология, распространение, запасы, технология переработки. Владивосток: ТИНРО-Центр. 243 с.

Ушаков П.В. 1953. Фауна *Охотского моря* и условия ее существования. М.: АН СССР. 461 с.

Ar Gall E. (Le Gall Y.), Asensi A., Marie D., Kloareg B. 1996. Parthenogenesis and apospory in the Laminariales: a flow cytometry analysis // Eur. J. Phycol. Vol. 31 (4). P. 369–380.

Boo G.H., Lindstrom S.C., Klochkova N.G., Yotsukura N., Yang E.C., Kim H.G., Waaland J.R., Cho G.Y., Miller K.A., Boo S.M. 2011. Taxonomy and biogeography of *Agarum* and *Thalassiophyllum* (Laminariales, Phaeophyceae) based on sequences of nuclear, mitochondrial, and plastid markers // Taxon. Vol. 60. P. 831–840.

Charrier B., Abreu M.H., Araujo R., Bruhn A., Coates J.C., De Clerck O., Katsaros C., Robaina R.R., Wichard T. 2017. Furthering knowledge of seaweed growth and development to facilitate sustainable aquaculture // New Phytol. Vol. 216 (4). P. 967–975.

Cho G.Y., Klochkova N.G., Krupnova T.N., Boo S.M. 2006. The reclassification of *Lessonia laminarioides* (Laminariaceae, Phaeophyta): *Pseudolessonia* gen. nov. // J. Phycol. Vol. 42 (6). P. 1286–1299.

Clarke J.D. 2009. Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation // Cold Spring Harb Protoc. doi:10.1101/pdb.prot5177.

Druehl L.D. 1968. Taxonomy and distribution of northeast Pacific species of *Laminaria* // Can. J. Bot. Vol. 46. P. 539–547.

Druehl L.D. 1970. The pattern of Laminariales distribution in the northeast Pacific // Phycologia. Vol. 9. P. 237–247.

Druehl L.D. 1979. Note: On the taxonomy of California *Laminaria* (Phaeophyta) // J. Phycol. Vol. 15. P. 337–338.

Evans L.V. 1965. Cytological studies in the Laminariales // Ann. Bot. Vol. 29. P. 541–562.

Fang Z.X., Dai J.X. 1980. Use of haploid phases in the genetic study of *Laminaria japonica* // Acta Genet. Sin. Vol. 7. P. 19–25.

Jackson C., Salomaki E.D., Lane C.E., Saunders G.W. 2017. Kelp transcriptomes provide robust support for interfamilial relationships and revision of the little known Arthrothamnaceae (Laminariales) (Letter) // J. Phycol. Vol. 53 (1). P. 1–6.

Gerard V.A., Mann K.H. 1979. Growth and production of *Laminaria longicruris* (Phaeophyta) populations exposed to different intensities of water movement // J. Phycol. Vol. 15. P. 33–41.

Guiry M.D., Guiry G.M. 2018. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. URL: http://www.algaebase.org.

Hasegawa Y. 1963. Problems relating to Hokkaido *Laminaria* // Fisheries. Vol. 1963. P. 113–126.

Kain J.M. 1969. The biology of *Laminaria hyperborea*. Comparison with early stages of competitors // J. Mar. Biol. Ass. U.K. Vol. 49. P. 455–473.

Kanda T. 1936. On the gametophytes of some Japanese species of Laminariales // Sci. Pap. Inst. Algol. Res. Fac. Sci., Hokkaido Imperial University. Vol. 1. P. 221–260.

Kanda T. 1938. On the gametophytes of some Japanese species of Laminariales II // Sci. Pap. Inst. Algol. Res. Fac. Sci., Hokkaido Imperial University. Vol. 2. P. 87–111.

Kawai H., Sasaki H. 2000. Molecular phylogeny of the brown algal genera *Akkesiphycus* and *Halosiphon* (Laminariales), resulting in the circumscription of the new families Akkesiphycaceae and Halosiphonaceae // Phycologia. Vol. 39. P. 416–428.

Kawai H., Hanyuda T., Lindeberg M., Lindstrom S.C. 2008. Morphology and molecular phylogeny of *Aureophycus aleuticus* gen. et sp. nov. (Laminariales, Phaeophyceae) from the Aleutian Islands // J. Phycol. Vol. 44. P. 1013–1021.

Kawai H., Hanyuda T., Gao X., Terauchi M., Miyata M., Lindstrom S.C., Klochkova N.G., Miller K.A. 2017. Taxonomic revision of the Agaraceae with a description of *Neoagarum* gen. nov. and reinstatement of *Thalassiophyllum* // J. Phycol. Vol. 53. P. 261–270.

Klimova A.V., Klochkova T.A., Klochkova N.G., Kim G.H. 2018. Morphological and molecular identification of *Alaria paradisea* (Phaeophyceae, Laminariales) from the Kurile Islands // Algae. Vol. 33 (1). P. 37–48.

Klochkova N.G., Klochkova T.A. 2010. *Costulariella*, a new substitute name for *Costularia* Ju. Petrov et I. Gussarova (Laminariales, Phaeophyceae) // Algae. Vol. 25 (4). P. 183–185.

Klochkova T.A., Kim G.H., Lee K.M., Choi H.-G., Belij M.N., Klochkova N.G. 2010. Brown algae (Phaeophyceae) from Russian Far Eastern seas: re-evaluation of *Laminaria multiplicata* Petrov et Suchovejeva // Algae. Vol. 25 (2). P. 77–87.

Klochkova T.A., Kim G.H., Belij M.N., Klochkova N.G. 2012. Morphology and phytogeography of *Laminaria appressirhiza* and *L. inclinatorhiza* (Phaeophyceae) from the Sea of Okhotsk // Algae. Vol. 27 (3). P. 139–153.

Klochkova T.A., Klochkova N.G., Yotsukura N., Kim G.H. 2017. Morphological, molecular, and chromosomal identification of dwarf haploid parthenosporophytes of *Tauya basicrassa* (Phaeophyceae, Laminaiales) from the Sea of Okhotsk // Algae. Vol. 32 (1). P. 15–28.

Lane C.E., Saunders G.W. 2005. Molecular investigation reveals epi/endophytic extrageneric kelp (Laminariales, Phaeophyceae) gametophytes colonizing *Lessoniopsis littoralis* thalli // Bot. Mar. Vol. 48. P. 426–436.

Lane C.E., Mayes C., Druehl L.D., Saunders G.W. 2006. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial re-organization // J. Phycol. Vol. 42 (4). P. 493–512.

Lane C.E., Lindstrom S.C., Saunders G.W. 2007. A molecular assessment of northeast Pacific *Alaria* species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding // Mol. Phylog. Evol. Vol. 44. P. 634–648.

Lee Y.-P., Yoon J.T. 1998. Taxonomy and morphology of *Undaria* (Alariaceae, Phaeophyta) in Korea // Algae. Vol. 13 (4). P. 427–446.

Myabe K., Nagai M. 1933. Laminariaceae of the Kurile Islands // Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc. Vol. 13. P. 85–102.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2018. GenBank. Available from: http//www.ncbi.nlm.nih.gov. Accessed November 15, 2018.

Pröschold T., Marin B., Schlosser U.G., Melkonian M. 2001. 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. Vol. 152. P. 265–300.

Saunders G.W., Druehl L.D. 1993. Nucleotide sequences of the internal transcribed spacers and 5.8S rRNA genes from *Alaria marginata* and *Postelsia palmaeformis* (Phaeophyta: Laminariales) // Mar. Biol. Vol. 115. P. 347–352.

Widdowson T.B. 1971. A taxonomic revision of the genus *Alaria* Greville // Syesis. Vol. 4. P. 11–49.

Wynne M.J. 1982. Phaeophyceae // In: Synopsis and classification of living organisms (S.P. Parker, ed.), McGraw-Hill, NY. P. 115–125.24.

Yendo K. 1919. A monograph of the genus *Alaria* // J. Coll. Sci., Tokyo Imperial University. Vol. 43. P. 1–145.

Yotsukura N., Denboh T., Motomura T., Horiguchi T., Coleman A.W., Ichimura T. 1999. Little divergence in ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 and -2 sequences among non-digitate species of *Laminaria* (Phaeophyceae) from Hokkaido, Japan // Phycol. Res. Vol. 47. P. 71–80.

Yotsukura N., Kawai T., Kawashima S., Ebata H., Ichimura T. 2006. Nucleotide sequence diversity of the 5S rDNA spacer in the simple blade kelp genera *Laminaria*, *Cymathaere* and *Kjellmaniella* (Laminariales, Phaeophyceae) from Northern Japan // Phycol. Res. Vol. 54 (4). P. 269–279.

Yotsukura N., Kawashima S., Kawai T., Abe T., Dreuhl L.D. 2008. A systematic re-examination of four *Laminaria species*: *L. japonica*, *L. religiosa*, *L. ochotensis* and *L. diabolica* // J. Jap. Bot. Vol. 83. P. 165–176.

Yotsukura N., Druehl L.D. 2009. A new name for *Laminaria sachalinensis* (Laminariales, Phaeophyceae) // J. Jap. Bot. Vol. 84 (2). P. 113.

Yotsukura N., Nagai N., Kawai T. 2016. A taxonomic re-examination of *Saccharina longipedalis* (Laminariales, Phaeophyceae), an endemic kelp species around Lake Akkeshi in Eastern Hokkaido, Japan // Bot. Mar. Vol. 59 (2–3). P. 205–210.

Yoon H.S., Boo S.M. 1999. Phylogeny of Alariaceae (Phaeophyta) with special reference to Undaria based on sequences of the RuBisCo spacer region // Hydrobiologia. Vol. 398/399. P. 47–55.

Yoon H.S., Lee J.Y., Boo S.M., Bhattacharya D. 2001. Phylogeny of Alariaceae, Laminariaceae, and Lessoniaceae (Phaeophyceae) based on plastid-encoded Rubisco spacer and nuclear-encoded ITS sequence comparisons // Mol. Phylog. Evol. Vol. 21. P. 231–243.

REFERENCES

Klochkova N.G., Berezovskaya V.A. *Makrofitobentos Avachinskoy guby i ego antropogennaya destruktsiya* [Macrophytobenthos of the Avacha Bay and its anthropogenic destruction]. Vladivostok: Dalnauka, 2001, 208 p.

Klochkova T.A., Klochkova N.G. Problems of genesystematics and change of the generic name and authority in the kelp species *Saccharina bongardiana* and *Saccharina gurjanovae*. *Bulletin of Kamchatka State Technical University*, 2018, vol. 43, pp. 87–95. (In Russian with English abstract)

Klimova A.V., Klochkova T.A., Klochkova N.G. Finding type specimens of species from the genus *Alaria*

Greville distributed in the marine flora of Kamchatka. *Bulletin of Kamchatka State Technical University*, 2016, vol. 38, pp. 51–62. (In Russian with English abstract)

Ocheretyana S.O., Klochkova N.G., Klochkova T.A. 2015. Seasonal species composition of "green tide"-forming algae from Avacha Bay and effect of anthropogenic pollution on physiology and growth of some green algae. *Bulletin of Kamchatka State Technical University*, 2015, vol. 33, pp. 30–36. (In Russian with English abstract)

Sukhoveeva M.V., Podkorytova A.V. *Promyslovyye vodorosli i travy morey Dal'nego Vostoka: Biologiya, rasprostraneniye, zapasy, tekhnologiya pererabotki* [Commercial algae and grasses of the Far Eastern seas: Biology, distribution, reserves, processing technology]. Vladivostok: TINRO-Center, 2006, 243 p.

Ushakov P.V. Fauna Okhotskogo morya i usloviya eye sushchestvovaniya [Fauna of the Sea of Okhotsk and conditions for its existence]. Moscow: Publishing House of the Academy of Sciences of the USSR, 1953, 461 p.

Ar Gall E. (Le Gall Y.), Asensi A., Marie D., Kloareg B. 1996. Parthenogenesis and apospory in the Laminariales: a flow cytometry analysis. *Eur. J. Phycol.,* vol. 31 (4), pp. 369–380.

Boo G.H., Lindstrom S.C., Klochkova N.G., Yotsukura N., Yang E.C., Kim H.G., Waaland J.R., Cho G.Y., Miller K.A., Boo S.M. Taxonomy and biogeography of *Agarum* and *Thalassiophyllum* (Laminariales, Phaeophyceae) based on sequences of nuclear, mitochondrial, and plastid markers. *Taxon*, 2011, vol. 60, pp. 831–840.

Charrier B., Abreu M.H., Araujo R., Bruhn A., Coates J.C., De Clerck O., Katsaros C., Robaina R.R., Wichard T. Furthering knowledge of seaweed growth and development to facilitate sustainable aquaculture. *New Phytol.*, 2017, vol. 216 (4), pp. 967–975.

Cho G.Y., Klochkova N.G., Krupnova T.N., Boo S.M. The reclassification of *Lessonia laminarioides* (Laminariaceae, Phaeophyta): *Pseudolessonia* gen. nov. *J. Phycol.*, 2006, vol. 42 (6), pp. 1286–1299.

Clarke J.D. Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harb Protoc.*, 2009. doi:10.1101/pdb.prot5177.

Druehl L.D. Taxonomy and distribution of northeast Pacific species of *Laminaria* / *Can. J. Bot.*, 1968, vol. 46, pp. 539–547.

Druehl L.D. The pattern of Laminariales distribution in the Northeast Pacific. *Phycologia*, 1970, vol. 9, pp. 237–247.

Druehl L.D. Note: On the taxonomy of California *Laminaria* (Phaeophyta). *J. Phycol.*, 1979, vol. 15, pp. 337–338.

Evans L.V. Cytological studies in the Laminariales. *Ann. Bot.*, 1965, vol. 29, pp. 541–562.

Fang Z.X., Dai J.X. Use of haploid phases in the genetic study of *Laminaria japonica. Acta Genet. Sin.*, 1980, vol. 7, pp. 19–25.

Jackson C., Salomaki E.D., Lane C.E., Saunders G.W. Kelp transcriptomes provide robust support for interfamilial relationships and revision of the little known Arthrothamnaceae (Laminariales) (Letter). *J. Phycol.*, 2017, vol. 53 (1), pp. 1–6.

Gerard V.A., Mann K.H. Growth and production of *Laminaria longicruris* (Phaeophyta) populations exposed to different intensities of water movement. *J. Phycol.*, 1979, vol. 15, pp. 33–41.

Guiry M.D., Guiry G. MAlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. 2018. URL: http://www.algaebase.org.

Hasegawa Y. Problems relating to Hokkaido *Laminaria*. *Fisheries*, 1963, vol. 1963, pp. 113–126.

Kain J.M. The biology of *Laminaria hyperborea*. Comparison with early stages of competitors. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 1969, vol. 49, pp. 455–473.

Kanda T. On the gametophytes of some Japanese species of Laminariales. *Sci. Pap. Inst. Algol. Res. Fac. Sci.*, Hokkaido Imperial University, 1936, vol. 1, pp. 221–260.

Kanda T. On the gametophytes of some Japanese species of Laminariales II. *Sci. Pap. Inst. Algol. Res. Fac. Sci.*, Hokkaido Imperial University, 1938, vol. 2, pp. 87–111.

Kawai H., Sasaki H. Molecular phylogeny of the brown algal genera *Akkesiphycus* and *Halosiphon* (Laminariales), resulting in the circumscription of the new families Akkesiphycaceae and Halosiphonaceae. *Phycologia*, 2000, vol. 39, pp. 416–428.

Kawai H., Hanyuda T., Lindeberg M., Lindstrom S.C. Morphology and molecular phylogeny of *Aureophycus aleuticus* gen. et sp. nov. (Laminariales, Phaeophyceae) from the Aleutian Islands. *J. Phycol.*, 2008, vol. 44, pp. 1013–1021.

Kawai H., Hanyuda T., Gao X., Terauchi M., Miyata M., Lindstrom S.C., Klochkova N.G., Miller K.A. Taxonomic revision of the Agaraceae with a description of *Neoagarum* gen. nov. and reinstatement of *Thalassiophyllum*. *J. Phycol.*, 2017, vol. 53, pp. 261–270.

Klimova A.V., Klochkova T.A., Klochkova N.G., Kim G.H. Morphological and molecular identification

of *Alaria paradisea* (Phaeophyceae, Laminariales) from the Kurile Islands. *Algae*, 2018, vol. 33 (1), pp. 37–48.
Klochkova N.G., Klochkova T.A. *Costulariella*, a new substitute name for *Costularia* Ju. Petrov et I. Gusarova (Laminariales, Phaeophyceae). *Algae*, 2010, vol. 25 (4), pp. 183–185.
Klochkova T.A., Kim G.H., Lee K.M., Choi H.-G., Belij M.N., Klochkova N.G. Brown algae (Phaeophyceae) from Russian Far Eastern seas: re-evaluation of *Laminaria multiplicata* Petrov et Suchovejeva. *Algae*, 2010, vol. 25 (2), pp. 77–87.
Klochkova T.A., Kim G.H., Belij M.N., Klochkova N.G. Morphology and phytogeography of *Laminaria appressirhiza* and *L. inclinatorhiza* (Phaeophyceae) from the Sea of Okhotsk. *Algae*, 2012, vol. 27 (3), pp. 139–153.
Klochkova T.A., Klochkova N.G., Yotsukura N., Kim G.H. Morphological, molecular, and chromosomal identification of dwarf haploid parthenosporophytes of *Tauya basicrassa* (Phaeophyceae, Laminaiales) from the Sea of Okhotsk. *Algae*, 2017, vol. 32 (1), pp. 15–28.
Lane C.E., Saunders G.W. Molecular investigation reveals epi/endophytic extrageneric kelp (Laminariales, Phaeophyceae) gametophytes colonizing *Lessoniopsis littoralis* thalli. *Bot. Mar*., 2005, vol. 48, pp. 426–436.
Lane C.E., Mayes C., Druehl L.D., Saunders G.W. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial re-organization. *J. Phycol*., 2006, vol. 42 (4), pp. 493–512.
Lane C.E., Lindstrom S.C., Saunders G.W. A molecular assessment of northeast Pacific *Alaria* species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding. *Mol. Phylog. Evol*., 2007, vol. 4, pp. 634–648.
Lee Y.-P., Yoon J.T. Taxonomy and morphology of *Undaria* (Alariaceae, Phaeophyta) in Korea. *Algae*, 1998, vol. 13 (4), pp. 427–446.
Myabe K., Nagai M. Laminariaceae of the Kurile Islands. *Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc.,* 1933, vol. 13, pp. 85–102.
National Center for Biotechnology Information (NCBI). GenBank. 2018. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov. Accessed November 15, 2018.
Pröschold T., Marin B., Schlosser 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, vol. 152, pp. 265–300.
Saunders G.W., Druehl L.D. Nucleotide sequences of the internal transcribed spacers and 5.8S rRNA genes from *Alaria marginata* and *Postelsia palmaeformis* (Phaeophyta: Laminariales). *Mar. Biol.*, 1993, vol. 115, pp. 347–352.
Widdowson T.B. A taxonomic revision of the genus *Alaria* Greville. *Syesis*, 1971, vol. 4, pp. 11–49.
Wynne M.J. Phaeophyceae. In: *Synopsis and classification of living organisms* (S.P. Parker, ed.), McGraw-Hill, NY, 1982, pp. 115–125.24.
Yendo K. A monograph of the genus *Alaria*. *J. Coll. Sci.*, Tokyo Imperial University, 1919, vol. 43, pp. 1–145.
Yotsukura N., Denboh T., Motomura T., Horiguchi T., Coleman A.W., Ichimura T. Little divergence in ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 and -2 sequences among non-digitate species of *Laminaria* (Phaeophyceae) from Hokkaido, Japan. *Phycol. Res*., 1999, vol. 47, pp. 71–80.
Yotsukura N., Kawai T., Kawashima S., Ebata H., Ichimura T. 2006. Nucleotide sequence diversity of the 5S rDNA spacer in the simple blade kelp genera *Laminaria*, *Cymathaere* and *Kjellmaniella* (Laminariales, Phaeophyceae) from Northern Japan // Phycol. Res. Vol. 54 (4). P. 269–279.
Yotsukura N., Kawashima S., Kawai T., Abe T., Dreuhl L.D. A systematic re-examination of four *Laminaria species*: *L. japonica*, *L. religiosa*, *L. ochotensis* and *L. Diabolica*. *J. Jap. Bot.*, 2008, vol. 83, pp. 165–176.
Yotsukura N., Druehl L.D. A new name for *Laminaria sachalinensis* (Laminariales, Phaeophyceae). *J. Jap. Bot*., 2009, vol. 84 (2), 113 p.
Yotsukura N., Nagai N., Kawai T. A taxonomic re-examination of *Saccharina longipedalis* (Laminariales, Phaeophyceae), an endemic kelp species around Lake Akkeshi in Eastern Hokkaido, Japan. *Bot. Mar*., 2016, vol. 59 (2–3), pp. 205–210.
Yoon H.S., Boo S.M. Phylogeny of Alariaceae (Phaeophyta) with special reference to Undaria based on sequences of the RuBisCo spacer region. *Hydrobiologia*, 1999, vol. 398/399, pp. 47–55.
Yoon H.S., Lee J.Y., Boo S.M., Bhattacharya *D*. Phylogeny of Alariaceae, Laminariaceae, and Lessoniaceae (Phaeophyceae) based on plastid-encoded Rubisco spacer and nuclear-encoded ITS sequence comparisons. *Mol. Phylog. Evol*., 2001, vol. 21, pp. 231–243.

Статья поступила в редакцию 22.11.2018
Статья принята после рецензии 30.11.2018