

Применимость анализа компенсаторных замен во вторичной структуре ITS2 для идентификации видов зеленых микроводорослей

Applicability of ITS2 secondary structure compensatory substitution analysis for identification of green microalgae species

Кулакова Н. В.^{1,2}, Егорова И. Н.¹

Kulakova N. V.^{1,2}, Egorova I. N.¹

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия
E-mails: kulakova@sifibr.irk.ru; egorova@sifibr.irk.ru

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia

² Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия
² Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Реферат. Исследование вторичных структур ITS2 – ключевой инструмент молекулярной систематики, расширяющий возможности анализа первичных нуклеотидных последовательностей. У большинства эукариот ITS2 формирует консервативную модель из четырех хеликсов, I–IV. Точная модель структуры критична для филогенеза и разграничения видов. Анализ компенсаторных замен (CBC) в ITS2 является необходимым элементом алгоритма видовой идентификации. Исследования различных таксономических групп зеленых микроводорослей показали возможные проблемы и ограничения использования CBCs в анализе. Моделирование вторичной структуры ITS, поиск CBC, а также особенности эволюции отдельных таксонов микроводорослей являются важными аспектами для видовой идентификации.

Ключевые слова. Вторичная структура ITS2, видовой идентификация, компенсаторные замены в ITS2, разграничение видов микроводорослей, CBC-концепция вида.

Summary. Studying the secondary structure of ITS2 is a key tool in molecular systematics, expanding the capabilities of primary nucleotide sequence analysis. In most eukaryotes, ITS2 forms a conserved pattern of four helices, I–IV. An accurate model of this structure is critical for phylogeny and species delimitation. Analysis of compensatory substitutions (CBCs) in ITS2 is a necessary element of the species identification algorithm. Studies of various taxonomic groups of green microalgae have revealed potential problems and limitations of using CBCs in analysis. Modeling the secondary structure of ITS, searching for CBCs, and understanding the evolutionary history of specific taxa of microalga are important aspects of species identification.

Key words. Secondary structure of ITS2, species identification, compensatory base changes in ITS2, delineation of microalgae species, CBC species concept.

Идентификация вторичной структуры внутреннего транскрибируемого спейсера 2 (ITS2) является одним из значимых инструментов в молекулярной систематике, поскольку она обеспечивает дополнительную информацию и, следовательно, более надежную основу для идентификации и разграничения видов по сравнению с одними лишь данными первичной последовательности. Нуклеотидные последовательности ITS2 могут быть очень вариабельными, но, как правило, они формируют определенную вторичную структуру.

У большинства эукариот ITS2 формирует консервативную вторичную структуру, где хеликсы I–IV разделены неспаренными областями. В этой шпильечно-петлевой структуре 3'-конец 5.8S рРНК и 5'-конец 28S рРНК взаимодействуют, образуя спаренный участок (stem) у основания ITS2. Несмотря на относительно высокую вариабельность ITS2, вторичная структура остается консервативной, при этом хеликсы II и III выступают в качестве важных структурных и распознающих сигналов для процессинга большой субъединицы рибосомы. Хеликсы I и IV менее консервативны, часто короткие, и могут

отсутствовать в некоторых организмах, что делает их менее значимыми для поддержания вторичной структуры. Хеликсы II и III несут высококонсервативные структурные элементы, которые необходимы для узнавания специфических белков и факторов процессинга. Хеликс II характеризуется стабильной пиримидин-пиримидиновой петлей (U-U), необходимой для поддержания структуры ITS2, а также консервативной вторичной структурой основания (proximal stem). Нуклеотидные пары у основания часто служат каркасом для формирования общей структуры ITS2 (Coleman, 2007). Хеликс III, как правило, является самой длинной, наиболее стабильной и консервативной, выступая в качестве важного компонента для процессинга рРНК. Она играет ключевую направляющую роль для удаления спейсера ITS2, что является критически значимым этапом для формирования рРНК и созревания 60S рибосомной субъединицы. Наиболее важными структурными элементами спирали III являются консервативные последовательности с высоким содержанием пуринов, расположенные около дистального конца (вершины хеликса), обычно характеризующиеся мотивом 5' UGGU или UGG. Наоборот, нуклеотиды у основания хеликса III менее консервативны. Таким образом, хеликс III обеспечивает консервативный сайт распознавания, тогда как хеликс II определяет структурную стабильность, необходимую для успешного процессинга рРНК.

Стабильность структуры ITS2 анализируют с помощью моделирования и расчетов минимальной свободной энергии (ΔG) (с помощью программ Mfold или RNAfold). Полученные модели широко используются в филогенетических исследованиях микроводорослей, для идентификации и разграничения видов. Алгоритм анализа вторичной структуры ITS2 рассмотрен в работе J. Schultz, M. Wolf (2009). Ключевым инструментом для идентификации видов является анализ компенсаторных изменений оснований (Compensatory base changes (CBCs)) с помощью программ 4SALE и CBCAnalyzer. CBCs представляют собой мутации сразу двух нуклеотидов из пары оснований, которые формируют вторичную структуру. Изменения в парных участках структуры могут указывать на дивергенцию, тогда как даже одна CBC служит критерием разграничения биологических видов. Принципиальным является получение точной модели вторичной структуры. Разные программы или ручная правка могут давать разные варианты выравнивания, а ошибка в один нуклеотид в модели может сказаться на результатах анализа.

Широкое использование анализа CBCs и полуконсервативных замен hemi-CBC (hCBC) (изменяется только один из пары нуклеотидов) началось с работы A. W. Coleman (2000), в которой было экспериментально доказано, что наличие хотя бы одной CBC в консервативных участках (хеликсы II и III) вторичной структуры ITS2 коррелирует с репродуктивной изоляцией у представителей Volvocaceae. В исследовании T. Müller с соавт. (2007) был проанализирован обширный набор данных из более 4 тысяч последовательностей ITS2 (из них только часть принадлежала зеленым водорослям Chlorophyceae, Trebouxiophyceae и Ulvophyceae, остальные – другим растениям и животным) и предложена концепция видовых различий, основанная на CBC (CBC species concept). Исходя из этой концепции, если между двумя организмами в консервативных хеликсах (II или III) ITS2 есть хотя бы одна CBC, то существует ~93 % вероятность того, что это два разных биологических вида. В то же время, отсутствие CBC указывает на ~76 % вероятность того, что это один и тот же вид. Таким образом, CBC может быть достаточным, но не необходимым критерием для разграничения отдельных видов (Müller et al., 2007). Часто возникает проблема в неясных результатах анализа, так как отсутствие CBC не исключает наличия двух разных видов. Кроме того, многие виды не удается различить на основании CBC. Например, род *Desmodesmus* содержит множество криптических видов, которые крайне сложно разграничить с помощью CBC из-за высокой гомологии последовательностей (Demura et al., 2021). Часто близкие виды имеют идентичные ITS2 или содержат только одиночные замены (hCBC) (например, некоторые виды родов *Coelastrella*, *Chodatodesmus*) (Novakovskaya et al., 2021; Egorova et al., 2025). В исследовании 115 валидных видов Ulvales показано, что CBCs не являлись для них видовым критерием. Кроме того, отсутствие CBC между видами отмечено в различных порядках зеленых водорослей, включая Chaetophorales, Chaetopeltidales, Oedogoniales и Sphaeropleales, где CBCs в ITS2 часто связаны с таксономическими уровнями более высокого порядка (роды, семейства) (Caisová et al., 2013). Причиной таких явлений может быть недавнее видообразование, когда в ITS2 не успели произойти компенсаторные замены. Кроме того, консервативность вторичной структуры ITS2 не способствует фиксации CBCs на уровне близкородственных видов, даже если они уже разошлись по морфологии и экологии.

Еще одно ограничение применения CBC-концепции – это вариации в структуре хеликсов или наличие дополнительных уникальных хеликсов, как, например, у *Kornmannia* (Ulvophyceae) (Caisova et

al., 2011), осложняющих моделирование и сравнение вторичных структур ITS2. Весомым аргументом для разграничения видов является наличие СВС в консервативных участках хеликсов II и III, однако вариабельность в хеликсах I и IV и HCBCs также часто учитывается. До сих пор нет консенсуса, считать ли такие замены достаточным признаком вида или это лишь внутривидовая вариация. Скорость эволюции также не учитывается СВС-концепцией вида, тем не менее, она может существенно различаться в разных таксономических группах. Кроме того, для многих микроводорослей характерно отсутствие полового процесса, что делает классический критерий биологического вида (репродуктивная изоляция) и связанный с ним СВС-критерий размытыми. Таким образом, анализ вторичной структуры ITS2, являясь важным критерием для видовой идентификации и разграничения видов, требует учитывать различные аспекты его применения, а также сочетать СВС-подход с другими методами анализа.

Благодарности. Работа выполнена по темам гос. заданий 0277-2025-0003, 0277-2025-0004.

ЛИТЕРАТУРА

- Caisová L., Marin B., Melkonian M.** A close-up view on ITS2 evolution and speciation – a case study in the Ulvophyceae (Chlorophyta, Viridiplantae) // BMC Evol. Biol., 2011. – Vol. 11. – P. 262. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-262>
- Caisová L., Marin B., Melkonian M.** Consensus Secondary Structure of ITS2 in the Chlorophyta Identified by Phylogenetic Reconstruction // Protist, 2013. – Vol. 164(4). – P. 482–496. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.04.005>
- Coleman A. W.** The Significance of a Coincidence between Evolutionary Landmarks Found in Mating Affinity and a DNA Sequence // Protist, 2000. – Vol. 151(1). – P. 1–9. <https://doi.org/10.1078/1434-4610-00002>
- Coleman A. W.** Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure // Nucl. Acids Res., 2007. – Vol. 35. – P. 3322–3329.
- Demura M., Noma S., Hayashi N.** Species and Fatty Acid Diversity of *Desmodesmus* (Chlorophyta) in a Local Japanese Area and Identification of New Docosahexaenoic Acid-Producing Species // Biomass, 2021. – Vol. 1. – P. 105–118. <https://doi.org/10.3390/biomass1020008>
- Egorova I. N.; Kulakova N. V., Bedoshvili Y. D.** Diversity of the scenedesmacean genus *Chodatodesmus* (Chlorophyta) and new cryptic species in the algae flora of Lake Baikal revealed by an integrative approach // Org. Divers. Evol., 2025. <https://doi.org/10.1007/s13127-025-00674-1>
- Müller T., Philippi N., Dandekar T., Schultz J., Wolf M.** Distinguishing species // RNA, 2007. – Vol. 13(9). – P. 1469–1472. <https://doi.org/10.1261/rna.617107>
- Novakovskaya I. V., Egorova I. N., Kulakova N. V., Patova E. N., Shadrin D. M., Anissimova O. V.** Morphological and phylogenetic relations of members of the genus *Coelastrella* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) from the Ural and Khentii Mountains (Russia, Mongolia) // Phytotaxa, 2021. – Vol. 527 (1). – P. 1–21. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.527.1.1>
- Schultz J., Wolf M.** ITS2 sequence–structure analysis in phylogenetics: A how-to manual for molecular systematics // Mol. Phyl. Evol., 2009. – Vol. 52, 2. – P. 520–523. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.01.008>