

Санкт-Петербургский Государственный университет

Биологический факультет

Кафедра микробиологии

Печковская Софья Александровна

**Влияние спектра доступных источников азота на физиологические и морфологические параметры динофлагеллят**

Выпускная квалификационная работа магистра

(магистерская диссертация)

Работа выполнена в лаборатории  
Одноклеточных организмов  
Института Цитологии РАН.  
(зав. лаб. – д.б.н. Скарлато С. О.)

Научный руководитель:  
м.н.с. Матанцева О. В.

Куратор:  
д.б.н., проф. Пиневиц А. В.

Санкт-Петербург

2017

## Содержание

I. Введение.....	4
II. Обзор литературы.....	6
II.1. Влияние антропогенной эвтрофикации на морские экосистемы.....	6
II.2. Краткая характеристика типа Dinoflagellata.....	7
II.3. Влияние условий внешней среды на физиологию и морфологию фитопланктонных организмов .....	9
II.3.1. Размер и форма клеток.....	10
II.3.2. Количество пиментов в клетке .....	11
II.3.3. Скорость поглощения неорганического углерода .....	12
II.3.4. Скорость поглощения азота .....	12
II.3.5. Интенсивность синтеза РНК .....	13
II.4. <i>Prorocentrum minimum</i> : причины успешного распространения.....	13
III. Методы .....	17
III. 1. Объекты исследования.....	17
III.2 Периодическое культивирование клонов <i>P. minimum</i> .....	17
III. 3. Проточное культивирование <i>P. minimum</i> .....	18
III. 4. Световая микроскопия и определение плотности культуры.....	20
III. 6. Измерение синтеза РНК по включению <sup>3</sup> H-уридина .....	20
III. 7. Измерение поглощения азота и углерода.....	20
III. 7. Расчет интенсивности поглощения.....	21
III. 8. Измерение интенсивности флуоресценции .....	22
III. 9. Измерение длины клеток .....	22
III. 10. Измерение концентрации азота и углерода .....	22
III. 14. Молекулярные методы.....	23
III. 14. 1. Выделение ДНК из клеток <i>P. minimum</i> .....	23
III. 14. 2. Конструирование праймеров .....	23

Ш. 14. 3. Условия полимеразной цепной реакции (ПЦР).....	24
Ш. 14. 4. Электрофоретическое разделение ампликонов .....	24
Ш. 14. 5. Выделение амплифицированных фрагментов ДНК из агарозного геля ...	25
Ш. 14. 6. Секвенирование ДНК .....	25
Ш. 15. Статистический анализ данных .....	25
<b>IV. Результаты и обсуждение .....</b>	<b>26</b>
IV. 1. Влияние различных сочетаний источников азота на уровень синтеза РНК и флуоресценцию пигментов в опытах с периодической культурой .....	26
IV. 2. Влияние различных сочетаний источников азота на морфологические и физиологические параметры клеток в опытах с проточной культурой.....	29
IV.2.1. Динамика роста клеток в проточных культурах.....	29
IV.2.2. Измерение физиологических параметров клеток в проточных культурах ...	32
IV.2.3. Анализ морфологических характеристик клеток .....	36
IV.2.4. Измерение скорости поглощения азота и углерода .....	39
IV.3. Результаты анализа и амплификации генов транспортера мочевины и транспортера нитрата .....	40
<b>Выводы.....</b>	<b>46</b>
<b>Список литературы .....</b>	<b>48</b>
<b>Приложение.....</b>	<b>58</b>

## I. Введение

Усиление глобального антропогенного влияния приводит к изменениям состава морской воды, особенно в эстуарных зонах, куда осуществляется массовый экспорт биогенных веществ. Сельскохозяйственная и животноводческая активность, смыв удобрений, промышленные сбросы способствуют эвтрофикации морских экосистем, что, в свою очередь, приводит к интенсивному развитию фитопланктона и учащению формирования обильных цветений микроводорослей.

Фитопланктонные микроорганизмы являются важнейшими первичными продуцентами в мировом океане и играют важную роль в морских экосистемах и глобальных биогеохимических циклах (Falkowski, 2012). В условиях глобальной эвтрофикации возникает необходимость в изучении влияния изменения состава воды на физиологические параметры водорослей. В связи с изменяющимися условиями некоторые группы микроорганизмов привлекают к себе все больший научный интерес, к одной из них относятся протисты типа *Dinoflagellata*.

Несмотря на то что в последние несколько десятилетий тип *Dinoflagellata* активно исследуется в полевых условиях и в лабораториях разных стран мира, информация о некоторых аспектах их жизнедеятельности представлена не в полном объеме. До сих пор не было произведено полное секвенирование генома этих организмов, и многие белки не были выделены и охарактеризованы. Тем не менее, в условиях эвтрофикации изучение азотного метаболизма динофлагеллят представляет интерес, поскольку именно повышенная концентрация азота в морской воде в первую очередь предоставляет им конкурентное преимущество и позволяет образовывать интенсивные цветения, также известные как «красные приливы». Изучение механизмов регуляции азотного метаболизма динофлагеллят позволит расширить понимание экологических процессов и влияния содержания азота в морской воде на динамику популяций фитопланктона.

На данный момент в литературе хорошо освещено влияние концентрации источников азота в среде на физиологические и морфологические параметры динофлагеллят (Ou et al., 2014; Olenina et al., 2016), однако очень малое количество работ посвящено влиянию непосредственно формы азота на клетки. Это немаловажно, поскольку динофлагелляты демонстрируют выраженные предпочтения при поглощении различных источников азота. Предположительно, наличие различных форм азота в среде может по-разному влиять на биосинтетические процессы,

проходящие в клетке, и тем самым обуславливать вариабельность морфологических и физиологических параметров.

Целью работы было изучить влияние различных источников азота и их комбинаций на морфологию и физиологию динофлагеллят.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние различных источников азота и их комбинаций на морфологические и физиологические параметры клеток, растущих в периодической культуре;
2. Изучить влияние различных источников азота на морфологические и физиологические параметры клеток, растущих в проточной культуре;
3. Сконструировать праймеры к генам транспортера мочевины и транспортера нитрата и амплифицировать фрагменты этих генов у лабораторных клонов *Prorocentrum minimum*.

Работа частично поддержана грантами РФФИ, проект 16-14-10116, и РФФИ, проект 15-29-02706.

## II. Обзор литературы

### Изменения условий внешней среды под воздействием антропогенной эвтрофикации и их влияние на динофлагеллят

#### II.1. Влияние антропогенной эвтрофикации на морские экосистемы

Морской цикл азота является одним из самых сложных биогеохимических циклов, поскольку включает в себя огромное разнообразие азотсодержащих соединений и реакций их трансформации (Zehr, Kudela, 2011; Dagenais-Bellefeuille et al., 2013). Большая часть азота в океане находится в форме растворенного газа  $N_2$ . Он переводится в доступную для ассимиляции форму при помощи азотфиксации, осуществляемой прокариотическими организмами. Фиксированный азот представлен, главным образом, нитратом ( $NO_3^-$ ; ~88%), растворенными органическими веществами (~11,7%), а также нитритом ( $NO_2^-$ ), аммонием ( $NH_4^+$ ) и взвешенными частицами органического азота (Gruber, 2008). Распределение и соотношение азотсодержащих веществ изменяется в зависимости от глубины и проходящих в океане биологических процессов.

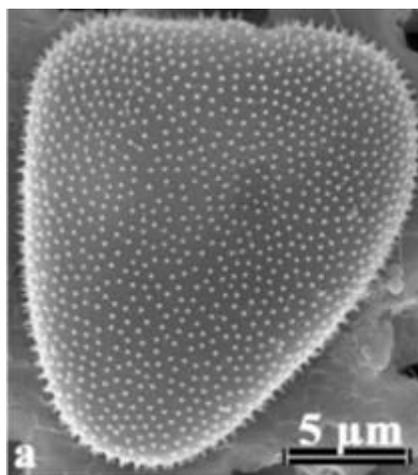
Как правило, концентрация доступного для ассимиляции азота в морской воде очень низка, поэтому он является элементом, лимитирующим рост фотосинтезирующих организмов и, следовательно, первичную продукцию (Falkowski, 1997). Однако в настоящее время прибрежные экосистемы часто получают интенсивный приток азотсодержащих веществ в результате антропогенной эвтрофикации, которая считается одной из крупнейших экологических проблем нашего времени (Howarth et al., 2002). Антропогенная эвтрофикация – это загрязнение прибрежных вод биогенными элементами в результате деятельности человека. Рост населения, развитие сельского хозяйства и промышленности влекут за собой увеличение объема сточных вод и стоков с возделываемых земель, содержащих биогенные элементы в высоких концентрациях (Glibert et al., 2005). За последние несколько десятилетий благодаря активному использованию синтетических удобрений экспорт органических азотсодержащих соединений в прибрежные зоны возрос в несколько раз (Galloway et al., 2004; Glibert et al., 2005); при этом более 50% азота, используемого в удобрениях, представлено в форме мочевины (Glibert et al., 2006). Развитие животноводческого и аквакультурного хозяйств приводит к обильному

экспорту ионов аммония и мочевины в прибрежные воды со сточными водами и посредством атмосферных осадков (Burkholder et al., 2006; Bouwman et al., 2013).

Таким образом, антропогенное загрязнение влечет за собой как повышение общей концентрации доступного для ассимиляции азота в прибрежных водах, так и увеличение разнообразия его форм. Подобные перестройки ведут к изменению качественного (видового) и количественного состава сообществ, когда одни группы организмов начинают вытеснять другие. Так, было отмечено, что в последние десятилетия доминирующей группой эукариотических микроорганизмов в прибрежных экосистемах часто становятся динофлагелляты (Glibert et al., 2004; Neil et al., 2007). По-видимому, в условиях повышенной концентрации растворенных органических веществ, в том числе мочевины, они получают конкурентное преимущество благодаря особенностям их физиологии.

## II.2. Краткая характеристика типа *Dinoflagellata*

Динофлагелляты (*Dinoflagellata* (Bütschli) Fensome, Taylor, Norris, Sarjeant, Eharton et Williams 1993) – тип одноклеточных эукариотных организмов из группы *Alveolata*, широко распространенных в морских и пресноводных экосистемах (Hackett et al., 2004) (рис.1).



**Рис. 1.** Внешний вид динофлагеллят на примере *Prorocentrum minimum* (из: Pertola et al., 2003).

Для динофлагеллят характерен ряд цитологических и биохимических особенностей. Как правило, вегетативная стадия представлена монадной формой с двумя неравными жгутиками. Покровы динофлагеллят – амфиесма – представляют

собой разновидность типичной для всех альвеолят пелликулы, состоящей из плазмалеммы и альвеолярных пузырьков под ней (Pozdnyakov, Skarlato, 2012). Типичное ядро динофлагеллят – динокарион, содержит постоянно конденсированные хромосомы. Деление динокариона – диномитоз, представляет собой особую разновидность закрытого внеядерного плевромитоза, при котором микротрубочки веретена деления располагаются в каналах, пронизывающих делящееся ядро. Для динофлагеллят характерны геномы больших размеров, некоторые виды обладают одними из самых больших геномов среди всех эукариот (около 200 млрд. п.н.). Они синтезируют особые мембранные стеролы – диностеролы. У фотосинтезирующих динофлагеллят выделяют пять типов пластид, каждый из которых имеет свою филогению и строение, которые являются результатом вторичного или третичного эндосимбиоза (Schnepf and Elbrächter, 1999; Yoon et al., 2002). Они синтезируют особый каротиноид, характерный только для динофлагеллят – перидинин.

Динофлагелляты демонстрируют разнообразные стратегии питания, среди них встречаются как фотоавтотрофы, так и гетеротрофы. Некоторые виды способны к миксотрофии, то есть сочетают оба типа питания, что дает им возможность использовать как органические, так и неорганические источники питательных веществ (Stoecker, 1999). Считается, что в роли триггеров может выступать ряд внешних факторов, например таких, как концентрация азота и фосфора в среде, освещение или температура (Stoecker, 1999; Матанцева, Скарлато, 2013). Динофлагелляты способны синтезировать широкий спектр вторичных метаболитов, в том числе разнообразные токсины (Hackett et al., 2004). В определенных условиях эти микроорганизмы способны формировать обширные цветения в прибрежных зонах, зачастую сопряженные с синтезом разнообразных токсинов, известные как «красные приливы» (Hackett et al., 2004).

О молекулярных механизмах азотного метаболизма динофлагеллят до сих пор известно достаточно мало. Белки динофлагеллят, отвечающие за транспорт азотных соединений внутрь клетки и за начальные стадии азотного метаболизма, не были очищены и исследованы. До сих пор не удалось получить полностью секвенированный геном динофлагеллят, а имеющиеся транскриптомные базы данных не аннотированы и не отражают полную информацию о геномах этих организмов.

### II.3. Влияние условий внешней среды на физиологию и морфологию фитопланктонных организмов

На физиологическое и морфологическое состояние клеток могут влиять такие факторы внешней среды, как температура, соленость и концентрация азота. Например, известно, что высокие концентрации азота в среде необходимы для формирования обильных цветений динофлагеллят (Lee, 2006). Кроме того, концентрация питательных веществ в среде влияет на уровень синтеза вторичных метаболитов этих микроорганизмов. Так, в условиях лимитирования по азоту у некоторых видов наблюдается повышенная продукция токсинов (Johansson, Granéli, 1999). Также было отмечено, что высокие концентрации азота стимулировали накопление большого количества белков в клетках на экспоненциальной стадии роста (Fabregas et al., 1989; Fernandez-Reiriz et al., 1989; Fidalgo et al., 1995), при этом наибольшее содержание белка у *P. minimum* было зафиксировано при росте на среде с нитратом в качестве источника азота.

Несмотря на то что способность динофлагеллят ассимилировать различные источники азота активно изучается как в лабораторных, так и в полевых условиях, эффект, оказываемый поглощением различных форм азотсодержащих соединений на клетки, недостаточно изучен (Ou et al., 2014). В литературных источниках широко освещены особенности поглощения и ассимиляции предпочтительных источников азота фитопланктоном и изменения скорости роста клеток в зависимости от различных источников (Fan et al., 2003), также исследовались эффекты ингибирования поглощения одних азотсодержащих субстратов в присутствии других (Lomas, Glibert, 1999; Jauzein et al., 2008; Matantseva et al., 2016). Однако относительно немного работ было посвящено исследованию действия различных форм азота на некоторые аспекты морфологии и физиологического состояния клеток фотосинтезирующих организмов (Utting, 1985; Fidalgo et al., 1995).

К основным параметрам, отражающим общее физиологическое состояние клеток фототрофных организмов, можно отнести их форму и размер, интенсивность автофлуоресценции пигментов в клетке, скорость поглощения бикарбоната и соединений азота, а также интенсивность синтеза РНК.

### II.3.1. Размер и форма клеток

Размер клеток – это ключевое свойство, отражающее физиологические и экологические аспекты, такие как скорость метаболизма, абсорбция света (Raven, 1984; Finkel, 2001), потребность в питательных веществах, их диффузия и поглощение (Aksnes, Egge, 1991), скорость оседания клеток и плотность популяции (Kjørboe, 1993; Waite et al., 1997).

Известно, что на форму и размер клеток планктонных микроорганизмов могут влиять такие внешние факторы, как соленость воды, температура и концентрация питательных веществ (Dale et al., 1999; Laabir et al., 2011; Röder et al., 2012, Sildever et al., 2015). Так, было подсчитано, что повышение температуры на 1°C приводит к уменьшению объема клетки на ~2,5%. Возможно, это объясняется тем, что при повышении температуры изменяется соотношение питательных веществ, и преимущество получают клетки меньших размеров, либо уменьшение размеров связано с быстрым делением клеток (Atkinson et al., 2003). Также известно, что при высокой концентрации CO<sub>2</sub> клетки динофлагеллят с меньшим размером получают преимущество, возможно, за счет более тонкого диффузионного слоя вокруг клетки (Finkel et al., 2007).

Последние исследования на примере модельного объекта *P. minimum* продемонстрировали зависимость клеточных размеров от солености и концентрации питательных веществ: повышение солености приводило к уменьшению размеров клеток (Garcia et al., 2012; Mitra et al., 2012; Olenina et al., 2016), в то время как повышение концентрации питательных веществ способствовало увеличению клеточных размеров (Roder et al., 2012). По сравнению с мелкими клетками крупные росли медленнее, но при этом имели большую плотность популяции (Olenina et al., 2016) и способность к более интенсивному поглощению азота, что связано с их потребностями и большими объемами запасных веществ (Marañón, 2013). Кроме того, есть данные, что переход к миксотрофному питанию ведет к увеличению клеточного размера и объема на 60% (Legrand et al., 1998; Litaker et al., 2002).

Размер клетки выступает в качестве биофизического ограничителя диффузии и определяет потребность фитопланктона в питательных веществах. Именно их концентрация зачастую является главным параметром, определяющим размер клеток и видовое соотношение внутри фитопланктонных сообществ (Chisholm, 1992; Coale et al., 1996). С увеличением размера увеличивается порог концентрации биогенных веществ, ниже которого клетки неспособны поддерживать скорость роста (Chisholm, 1992).

Понимание этих ограничений позволяет предположить, каким образом меньший клеточный размер предоставляет преимущества в условиях недостатка биогенных веществ (Marañón, 2015).

Стоит отметить, что при образовании цветений, которые сопряжены с высокими концентрациями питательных веществ в среде, в популяции динофлагеллят доминируют крупные клетки. Некоторые исследователи предполагают, что они получают преимущество благодаря своим крупным размерам: это позволяет гетеротрофным и миксотрофным динофлагеллятам питаться более мелкими видами фитопланктона и избегать других хищников (Kjørboe, 2008; Irigoien et al., 2005; Barton et al., 2013).

### II.3.2. Количество пигментов в клетке

Количество хлорофилла *a* в клетке служит индикатором фотосинтетической активности. Исследования диатомовых водорослей показали, что концентрация пигмента резко уменьшалась, когда клетки оказывались в условиях лимитации по азоту (Li, Goldman, 1981). Самое большое количество хлорофилла *a* наблюдали у клеток, выращенных в среде с добавлением нитрата, в то время, как клетки, выращенные с добавлением мочевины, имели самые низкие показатели. В другом исследовании количество хлорофилла *a* в клетках динофлагеллят, культивируемых с добавлением растворенного органического азота, было сопоставимо с количеством хлорофилла в клетках, выращенных с добавлением аммония, что свидетельствует о высокой эффективности поглощения органических азотсодержащих веществ (Ou et al., 2014).

Ряд исследователей предполагает, что содержание хлорофилла *a* в также зависит от размера клеток (Kirk, 1994; Sathyendranath et al., 1996; Stuart et al., 1998). Это обуславливается тем, что клеточный размер влияет на путь прохождения световой волны: чем крупнее клетка, тем он длиннее. Удлинение пути, необходимое для преодоления объема крупных клеток, приводит к уменьшению абсорбции света на единицу объема (Fujiki, 2002). Абсорбция света хлорофиллом *a* также уменьшается с увеличением размеров клеток из-за эффекта самозатенения пигмента, особенно в условиях низкой освещенности, когда концентрация внутриклеточных пигментов возрастает (Finkel, 2001).

### П.3.3. Скорость поглощения неорганического углерода

Интенсивность поглощения неорганического углерода в форме  $\text{CO}_2$  и  $\text{HCO}_3^-$  отражает фотосинтетическую активность клеток динофлагеллят в зависимости от условий культивирования. Скорость поглощения неорганического углерода клетками динофлагеллят напрямую зависит от условий освещения. Так, клетки, культивируемые при низкой освещенности, увеличивали фотосинтетическую активность и, соответственно, скорость поглощения неорганического углерода (Fan, Glibert, 2005).

Исследование клеток *P. minimum*, выращенных в среде с добавлением таких источников азота как нитрат, аммоний и мочевины показало, что в отличие от концентрации азота и фосфора концентрация внутриклеточного углерода практически не менялась. Количество углерода в клетках, выращенных на нитрате, аммонии и мочеvine, было постоянным на стационарной фазе и составляло от 220–232 пг на клетку, но было значительно ниже, чем в клетках, выращенных в среде с добавлением гуминовых кислот в качестве источника азота ( $262 \pm 4$  пг) (Ou et al., 2014).

### П.3.4. Скорость поглощения азота

Эксперименты с добавлением в среду различных азотсодержащих веществ показали, что динофлагелляты в течение нескольких дней поглощали практически весь доступный азот. Культуры, выращенные с добавлением нитрата, мочевины и аммония в эквимольных концентрациях, имели одинаковые скорости роста и одинаковую плотность клеток (Levasseur et al., 1993; Lourenco, 2002; Ou et al., 2014; Liu et al., 2015). В то же время клетки, культивируемые с добавлением смеси растворенных органических азотсодержащих веществ, росли быстрее. При этом скорость ассимиляции смеси органических азотсодержащих веществ была выше, чем скорость ассимиляции мочевины и аммония как единственных источников азота (Ou et al., 2014), хотя в большинстве случаев в качестве предпочтительного источника азота выступает именно аммоний, поскольку для его ассимиляции требуется меньше всего энергии (Antia et al., 1991). Интересно, что аммоний в среде ингибирует поглощение нитрата (Lomas, Glibert, 1999) и мочевины (Jauzein et al., 2008) клетками динофлагеллят. Несмотря на это, высокие концентрации аммония токсичны для фитопланктона (Källqvist, Svenson, 2003; Glibert et al., 2015).

Многочисленные исследования показали, что динофлагелляты способны ассимилировать мочевины так же эффективно, как и неорганический азот благодаря

высокой активности уреазы (Dyhrman, Anderson, 2003; Solomon, Glibert, 2008). При поступлении в клетку мочевины гидролизуются с образованием двух молекул аммония и одной молекулы бикарбоната (Mobley, Hausinger, 1989). Более того, недавние исследования показали, что мочевины в среде частично ингибирует ассимиляцию нитрата, что, возможно, объясняется снижением эффективности транспортеров нитрата (Matantseva et al., 2016) или репрессией активности нитратредуктазы (Liu et al., 2015).

### **II.3.5. Интенсивность синтеза РНК**

В присутствии смеси источников азота клеткам необходимо синтезировать и встроить в мембрану транспортеры азотсодержащих веществ и усилить синтез ферментов, отвечающих за ассимиляцию различных азотсодержащих соединений. Синтез дополнительных белков, обеспечивающих ответ клетки на изменение внешних факторов и регуляцию метаболизма, сопряжен с увеличением общего уровня синтеза мРНК в клетке. Таким образом, уровень синтеза РНК отражает интенсивность биосинтетических процессов, идущих в клетках динофлагеллят (Pfeiffer, Tolmach, 1968).

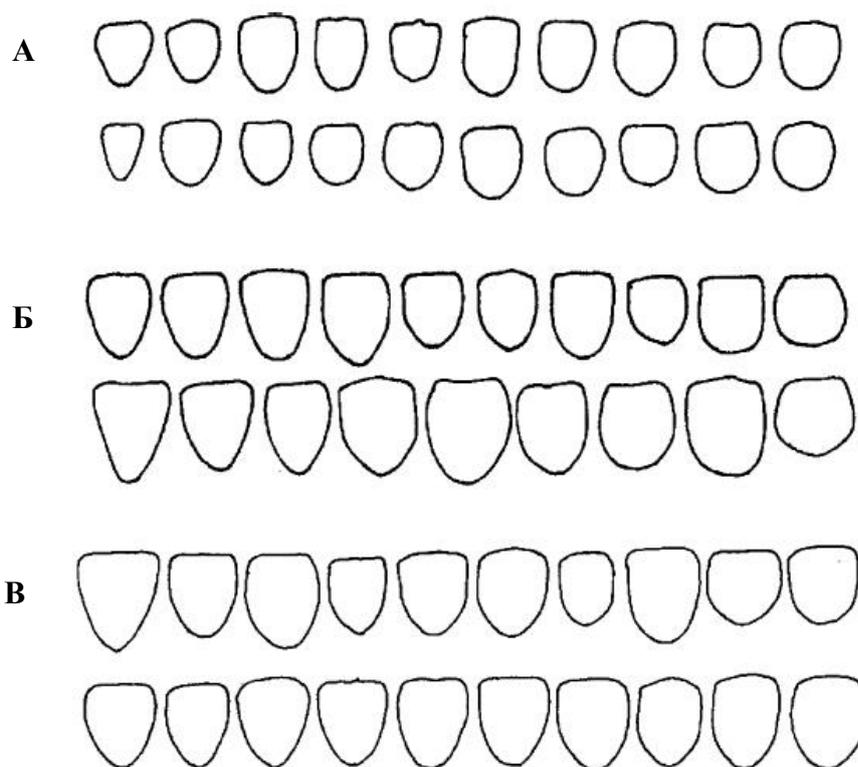
### **II.4. *Prorocentrum minimum*: причины успешного распространения**

Климатические изменения, влекущие за собой уменьшение солености вод, температуры и концентрации питательных веществ, оказывают значительное влияние на состав планктонных экосистем, что приводит к изменению видового состава и, как следствие, к распространению видов-вселенцев и учащению образования цветения водорослей (Wasmund et al., 2008). *P. minimum* является единственным фитопланктонным видом-вселенцем, сумевшим за несколько десятилетий проникнуть в акваторию Балтийского моря и занять свою нишу среди других видов фитопланктона (Kimor et al., 1985; Olenina et al., 2010; Telesh et al., 2016).

*P. minimum* – это эвригалинный и эвритермный (Grzebyk, Berland, 1996) вид динофлагеллят, широко распространенный в прибрежных водах тропических и умеренных широт (Glibert et al., 2012; Neil et al., 2005; Pertola et al., 2003), и один из пяти видов рода *Prorocentrum*, обитающих в Балтийском море (Telesh et al., 2016). Известно, что этот вид способен вызывать цветение воды и синтезировать токсины, которые, накапливаясь в рыбе и моллюсках, могут приводить к отравлениям людей,

однако природа этих соединений до сих пор не установлена (Saba et al., 2011). Интерес к этой группе организмов возрос за последние несколько десятилетий, благодаря повсеместной эвтрофикации и сопряженному с ней распространению цветений.

Размер клеток *P. minimum* колеблется от 14 до 22 мкм в длину и от 10 до 15 мкм в ширину. Форма клеток варьирует от круглой и овальной до треугольной, имеется множество промежуточных форм (рис. 1). В одной популяции могут быть представлены клетки различной формы и размеров. Различия в форме клеток могут объясняться разницей в тургорном давлении, солености, температуре или освещении (Hajdu et al., 2000). Исследования показали, что для Балтийского моря характерны клетки преимущественно овальной формы (около 70%) (Pertola et al., 2005).



**Рис. 2.** Разнообразие форм клеток *P. minimum*. А – пробы клеток из Мекленбургской бухты (соленость 12-20‰), Б – северной части Балтийской акватории (до 7‰), В – Финского залива (из: Hajdu et al., 2005, с изменениями).

По некоторым данным, для балтийских популяций *P. minimum* оптимальна соленость 15–17 ‰, однако они хорошо приспосабливаются и к низкой солености и могут расти даже при значениях ниже 5 PSU (Hajdu et al., 2000). Популяции *P. minimum*

способны формировать цветения при температуре ниже 10 °С (Tyler, Seliger, 1981) и переживать понижение температуры вплоть до 2,7 °С (Hajdu et al., 2005).

Интересен феномен заселения видом *P. minimum* Балтийского моря. Балтийское море – это солоноватый водоем, обильно снабжаемый пресной водой за счет речных стоков и атмосферных осадков. Первая вспышка цветения *P. minimum* была зафиксирована в проливе Скагеррак в 1979 г. (Edler et al., 1982). Начиная с 1981 г. присутствие *P. minimum* регулярно наблюдалось в прибрежных эвтрофицированных водах Балтийского моря. В 1989–1993 гг. появление этого вида было зафиксировано в центральных и северных водах Балтийского моря. К концу 1990-х гг. была зафиксирована следующая вспышка цветения *P. minimum*, а ареал обитания этого вида в Балтийском море уже включал в себя Финский и Рижский заливы (Olenina et al., 2010; Telesh et al., 2016). Предположительно, *P. minimum* проник в Балтийское море в результате естественной миграции (Hajdu et al., 2000), но нельзя исключать, что этот вид был занесен в его воды с балластными водами судов (Telesh et al., 2016).



**Рис. 3.** Распространение вспышек цветения, образованных *P. minimum*, в акватории Балтийского моря. Масштаб 100 км. (по: Olenina et al., 2010)

Воды Балтийского моря подвержены значительному антропогенному влиянию за счет того, что его побережье плотно населено, а прибрежные земли активно

возделываются (Deutsch et al., 2006; Voss et al., 2006). За последние годы экспорт растворенных органических веществ в прибрежную зону Балтийского моря значительно увеличился (Fagerberg et al., 2010), что привело к изменению соотношения органических и неорганических веществ (Voss et al., 2011). Стоки, богатые биогенными элементами, благоприятствуют развитию популяций *P. minimum*: показано, что плотность клеток положительно коррелирует с увеличением концентрации азота и фосфора в морской воде (Pertola, 2006; Ou et al., 2014). Несмотря на то, что вопрос о причинах успешного заселения *P. minimum* большей части Балтийского моря остается открытым из-за недостаточного количества полевых данных, предположительно, *P. minimum* получает преимущество за счет способности эффективно использовать растворенные органические вещества в качестве источника азота (Heil, 2005; Pertola et al., 2005). Известно, что это вид может утилизировать мочевины и другие органические соединения азота наравне с неорганическими нитратом и аммонием. Таким образом, процветание вида *P. minimum* связано с эвтрофикацией вод, особенно в прибрежных зонах, где помимо интенсивного поступления биогенных элементов с суши (зачастую в форме органических веществ) наблюдается понижение солености за счет притока пресных вод (Grzebyk, Berland, 1996). Предположительно, дальнейшее понижение солености вод Балтийского моря, рост температуры, и увеличение экспорта питательных веществ может привести к увеличению частоты и интенсивности вспышек цветения потенциально опасных водорослей (Telesh et al., 2016).

Таким образом, изменения условий окружающей среды, вызванные антропогенной деятельностью, оказывают значительное воздействие на природные экосистемы. Дальнейшее изучение азотного метаболизма динофлагеллят позволит лучше понять влияние эвтрофикации на видовое разнообразие, распространение и динамику фитопланктонных популяций.

### III. Методы

#### III. 1. Объекты исследования

В работе была использована культура динофлагеллят *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller 1933 из коллекции ССАР (Великобритания), штамм ССАР 1136/16, выделенный в 2003 г. из залива Лох-Этив, Аргайл, Шотландия.

#### III.2 Периодическое культивирование клонов *P. minimum*

Культивирование проводили в среде f/2 (Guillard, 1975) без силикатов (Таблица 1), приготовленной на основе искусственной морской воды (Kester et al., 1967) (Таблица 2). Соленость искусственной морской воды составляла 25‰, характерному для региона, из которого были выделены клоны. Культуры поддерживали при температуре 22–25°C и освещенности 50 мкмоль фотонов×м<sup>-2</sup>×с<sup>-1</sup> с циклом освещения 12 ч (день): 12 ч (ночь). Культуры пересевали с периодичностью раз в месяц.

При подготовке проб клетки выращивали в периодической культуре в среде f/2 с добавлением нитрата в качестве единственного источника азота. Клетки размещали в колбы по 50 мл с расчетом не менее 1 млн клеток на колбу, добавляли дополнительный источник азота (нитрат, аммоний, мочевины, глицин или их комбинации) в концентрации 100 или 200 мкМ, после чего инкубировали в течение 24 часов.

Таблица 1. Состав среды f/2 (pH 8,0)

Макроэлементы	
NaNO <sub>3</sub>	75 г/л
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	6,39 г/л
Микроэлементы, г/л	
FeCl <sub>3</sub> ×6H <sub>2</sub> O	31,5
CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	10,0
ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	22,0
CoCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O	10,0
MnCl <sub>2</sub> ×12 H <sub>2</sub> O	14,7
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	6,0

### Продолжение таблицы 1.

Витамины	
Цианокобаламин (В <sub>12</sub> )	500 мкг/л
Тиамин (В <sub>1</sub> )	100 мкг/л
Биотин (Н)	500 мкг/л
Na <sub>2</sub> EDTA	43,6 г/л

**Таблица 2.** Состав искусственной морской воды (г/л)

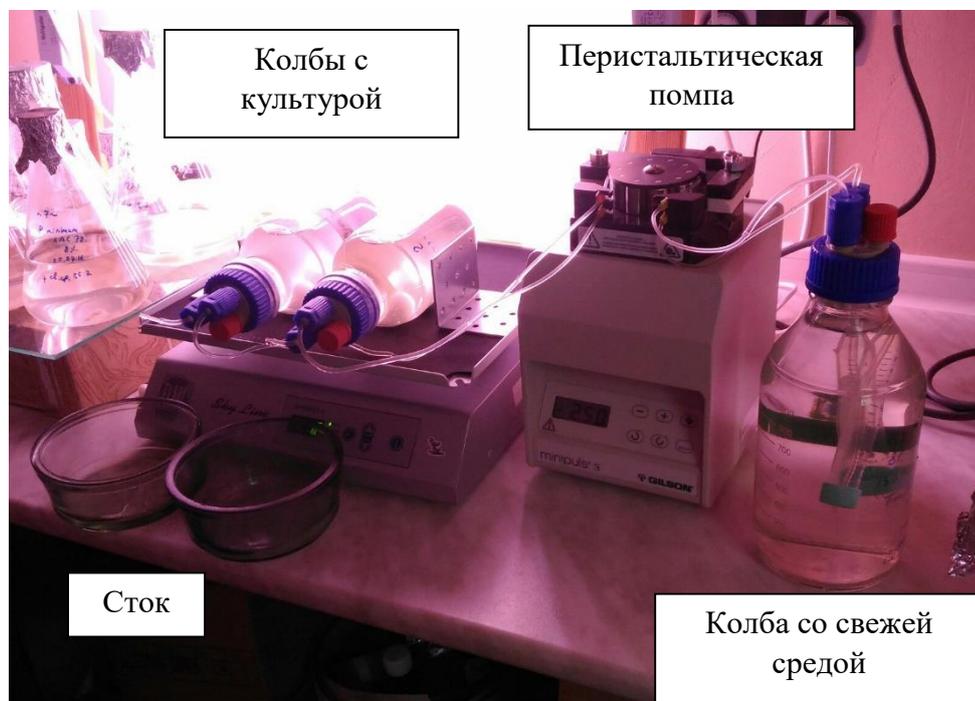
NaCl	23,93
KCl	0,68
MgSO <sub>4</sub>	3,39
NaHCO <sub>3</sub>	0,196
KBr	0,098
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,026
NaF	0,003
MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	10,8
CaCl <sub>2</sub>	1,12
SrSO <sub>4</sub>	0,017

### III. 3. Проточное культивирование *P. minimum*

Непрерывное культивирование проводили в хемостатах в среде, приготовленной на основе морской воды соленостью 25‰. Культуры поддерживали при температуре 21–25°C и освещенности 50 мкмоль фотонов×м–2×с–1 с циклом освещения 12 ч (день): 12 ч (ночь).

Культуры выращивали во флаконах Duran GLS 80 объемом 500 мл. Колбы были помещены на шейкер ELMi S-4 (ELMI Ltd, Латвия) со скоростью 6 качаний в минуту для обеспечения перемешивания посредством перемещения полиоксиметиленового шарика (рис. 4). Подача среды осуществлялась через полипропиленовые трубки при помощи перистальтического насоса Minipuls 3 (Gilson, США) с заданным коэффициентом разбавления  $D = 0,15 \text{ сут}^{-1}$ .

Поступающая в реактор среда содержала источник азота (нитрат, аммоний, мочевины или глицин) в концентрации 20 мкМ. Клетки культивировали в течение 15–20 дней до достижения состояния динамического равновесия. Пробы для подсчета клеток брали каждый день.



**Рис. 4.** Реактор для проточного культивирования.

Перед помещением в реакторы для проточного культивирования клетки выращивали в периодической культуре в среде f/2 с добавлением нитрата в качестве источника азота. На фазе экспоненциального роста их помещали в реактор для с таким расчетом, чтобы численность клеток не превышала  $30\text{--}40 \times 10^3$  кл/мл, после чего в реактор подавалась среда с добавлением источника азота в концентрации 20 мкМ. Полное замещение первоначальной среды в реакторе происходило в течение 7 сут. В соответствии с добавленным источником азота эксперименты обозначались как NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, Мочевина и Глицин.

В течение культивирования ежедневно проводили подсчет концентрации клеток в реакторе не менее чем в 3-х пробах. По окончании культивирования брали пробы для измерения размера клеток, интенсивности флуоресценции пигментов, скорости поглощения азота и углерода, уровня синтеза РНК. В качестве контроля при проведении анализ уровня синтеза РНК брали культуру, находящуюся в экспоненциальной фазе роста.

### **III. 4. Световая микроскопия и определение плотности культуры**

Микроскопическое исследование препаратов *P. minimum* проводили с помощью микроскопа Carl Zeiss и Leica DM2500. Объекты фотографировали с помощью микроскопа Leica, снабженного фотокамерой Leica DFC 420 и соответствующим программным обеспечением.

Подсчет клеток в культуре проводили с помощью камеры Фукса-Розенталя и светового микроскопа Carl Zeiss при увеличении  $\times 10$ . Подсчитывали количество клеток в 8 квадратах, расчет общего количества проводили по формуле  $x = N/3,2 \times 10^3$ , где  $x$  – количество клеток в 1 мл культуры;  $N$  – среднее арифметическое числа клеток в одной камере. В каждой пробе было подсчитано минимум 200 клеток. Ошибка метода составляла 10%.

### **III. 6. Измерение синтеза РНК по включению $^3\text{H}$ -уридина**

В колбы с клетками добавляли раствор  $^3\text{H}$ -уридина ( $2 \times 10^6$  Бк) и инкубировали в течение 2 ч. при  $24^\circ\text{C}$ . После этого клетки центрифугировали в течение 10 мин при 1200 g, ресуспендировали и проводили подсчет в камере Горяева. Затем клетки помещали в пластиковые 96-луночные круглодонные планшеты с таким расчетом, чтобы в каждой ячейке объемом 0,2 мл было не менее  $1 \times 10^5$  клеток. Суспензии из ячеек были перемещены на бумажные фильтры, промыты в 5% растворе трихлоруксусной кислоты и высушены в 96%-ном этаноле. Радиоактивность проб измеряли в сцинтилляционном счетчике LS6500 (Beckman, США) в сцинтилляционной жидкости (толуол/РРО/РОРОР). Для каждой повторности было сделано 6 (при периодическом культивировании) или 12 (при проточном культивировании) измерений.

### **III. 7. Измерение поглощения азота и углерода**

По окончании культивирования брали пробы для измерения интенсивности поглощения азота и углерода. При измерении использовались следующие субстраты, меченные стабильными изотопами: 98%  $^{15}\text{N}$ -мочевинной, 98%  $^{15}\text{N}$ -нитратом, 98%  $^{15}\text{N}$ -глицином, 98%  $^{13}\text{C}$ -бикарбонатом (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, США), при этом конечные концентрации в пробах 2%  $^{13}\text{C}$ -бикарбонат, 10 %  $^{15}\text{N}$ -мочевина,  $^{15}\text{N}$ -нитрат,  $^{15}\text{N}$ -глицин.

Для измерения поглощения азота из культуры брались пробы до добавления изотопных меток ( $t_0$ ) и после добавления изотопных меток ( $t_1$ ), после чего пробы  $t_1$  инкубировали в течение 2 ч. Для каждой пробы брали не менее 1 млн клеток. Пробы были профильтрованы через стеклянные фильтры (GF/C, Whatman, Maidstone, Великобритания), предварительно обожженные при 450°C в течение 4 ч, после чего тщательно промыты изотоничным раствором NaCl (25‰). Фильтры с изотопными пробами были высушены при температуре 50°C в течение ночи. Затем фильтры были завернуты в оловянную фольгу и спрессованы для проведения дальнейшего анализа. Измерение изотопного состава биомассы проводили при помощи масс-спектрометра Delta V (ThermoScientific, Waltham, MA, США) в Институте Исследования Балтийского моря (г. Росток, Германия).

Пробы для измерения концентрации азотсодержащих субстратов и бикарбоната были профильтрованы через стерильные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Millipore, Billerica, MA, США) и помещены на хранение в холодильник при 4°C.

### III. 7. Расчет интенсивности поглощения

Для вычисления параметров поглощения использовали соответствующие уравнения (Dugdale, Wilkerson, 1986).

Для вычисления скорости поглощения  $V_{(t)}$  использовали следующую формулу:

$$V_{(t)} = {}^{15}N_{xs} / ({}^{15}N_{enr} - (F)) \times T,$$

где  ${}^{15}N_{xs}$  - процент содержания изотопов  ${}^{15}N$  в пробе,  ${}^{15}N_{enr}$  – процент стабильных изотопов  ${}^{15}N$  в изначально меченой фракции,  $F$  – естественное содержание  ${}^{15}N$  в пробе,  $T$  – время инкубации с изотопами.

Абсолютное поглощение вещества на объем пробы,  $\rho_{(t)}$ , вычисляли по формуле:

$$\rho_{(t)} = V_{(t)} \times PON_{(t)},$$

где PON – взвешенный органический азот на момент окончания инкубации.

Абсолютное поглощение вещества на клетку вычисляли по формуле:

$$\rho_{(cell)} = \rho_{(t)} / d,$$

где  $d$  – плотность клеток культуры.

Расчет интенсивности поглощения углерода проводили по аналогичным уравнениям.

### **III. 8. Измерение интенсивности флуоресценции**

Измерение интенсивности флуоресценции производили с помощью программы ImageJ (Schneider et al., 2012). В качестве стандартов использовали флуоресцентные шарики Flow-Check flourospheres (Beckman Coulter, США). Клетки на компьютерных изображениях отбирали вручную, после чего измеряли параметры Area (площадь клетки), Integrated Density (интегрированная плотность) и среднюю флуоресценцию фона. Подсчет интенсивности флуоресценции проводили в программе Microsoft Office Excel по формуле:

CTCF (corrected total cell fluorescence) = Integrated Density - (Area of selected cell × Mean fluorescence of background readings).

### **III. 9. Измерение длины клеток**

Длину клеток измеряли с помощью программы ImageJ. Калибровку масштаба проводили по количеству пикселей, помещающихся на изображение 20 мкм измерительной линейки. Для измерения брали минимум 85 клеток. Статистическую обработку данных проводили в программе MaxStat.

### **III. 10. Измерение концентрации азота и углерода**

Измерение концентрации азота и углерода проводили по окончании культивирования.

Концентрацию нитрата измеряли согласно протоколу (Miranda et al., 2001; Doane, Howarth, 2003). В соляной кислоте растворяли хлорид ванадия (III) и добавляли к водному раствору сульфониламида и N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлорида. Реактив смешивали с пробами в соотношении 1000:50 (для измерения высоких концентраций нитрата) или в соотношении 500:500 (для измерения низких концентраций нитрата). Пробы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 6-10 ч. Измерение абсорбции проводили на спектрофотометре при длине волны 540 нм.

Для измерения концентрации аммония 8 мл образца фильтровали через стеклянный фильтр (GF/C, Whatman, Maidstone, Великобритания), после чего добавляли 0,24 мл натрий-цитратного буфера, перемешивали, инкубировали 1 минуту добавляли 0,24 мл фенольного реактива, перемешивали и добавляли 0,24 мл дитиотреитола. Пробы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 6 часов, после чего измеряли на спектрофотометре при длине волны 630 нм.

Измерение концентрации мочевины проводили следующим образом: к 4 мл пробы добавляли 0,281 мл раствора тиосемикарбазида в диацетилмонооксиде и 0,914 мл сернокислого раствора хлорида железа (III) (Mulvenna, Savige, 1992; Goeyens et al., 1998; Revilla et al., 2005).

Определение концентрации бикарбоната в среде проводилось в течение недели после взятия проб. К 5 мл среды добавляли 30 мкл метилового оранжевого, затем титровали 0,0508 М соляной кислотой до изменения окраски раствора из желтой до оранжевой.

### **III. 14. Молекулярные методы**

#### **III. 14. 1. Выделение ДНК из клеток *P. minimum***

Клетки гомогенизировали путем замораживания пробы объемом 100 мкл при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин. После размораживания пробы центрифугировали в течение 5 мин при 10000 g. Выделение ДНК осуществляли с помощью набора для экстракции ДНК BioSilica (Россия) по протоколу фирмы-производителя.

#### **III. 14. 2. Конструирование праймеров**

Подбор праймеров для амплификации генов транспортера нитрата и транспортера мочевины *P. minimum* осуществляли с помощью программы OligoAnalyzer 3.1 на основе последовательностей из базы данных Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (ММЕТПС, Keeling et al., 2014). При конструировании праймеров соблюдали следующие условия:

- 1) длина праймеров должна составлять  $20 (\pm 2)$  нуклеотида;
- 2) размер PCR-продукта 100–200 п.н.;

- 2) содержание пар GC нуклеотидов в праймерах 40–60%;
- 3) температура плавления 55–60°;
- 4) присутствие G/C на 3'-конце;
- 5) отсутствие гомо- и гетеродимеров;
- 6) специфичность по отношению к организму и участку генома.

В качестве праймеров для положительных контролей использовали праймеры к 18S рРНК динофлагеллят (Таблица 1 Приложения).

При подборе праймеров учитывалась экзон-интронная структура гена. Поскольку есть основания полагать, что места вырезания интронов в последовательностях генов динофлагеллят маркируются нуклеотидами AGG (Mendez et al., 2015), праймеры подбирались к участкам транскрипта гена, расположенным между триплетами AGG.

### **III. 14. 3. Условия полимеразной цепной реакции (ПЦР)**

Реакционная смесь для ПЦР объемом 10 мкл содержала:

- буфер MasterMix (ThermoScientific, США);
- 2 мкл дистиллированной воды;
- по 1 мкл праймеров (конечная концентрация 0,5 мкМ);
- 1 мкл матричной ДНК (конечное содержание ДНК 1–10 нг).

Аmplификацию проводили при помощи амплификатора BioRad T100 (США) по следующей программе:

1. Начальный цикл денатурации: 94°С, 3 мин.
2. 39 циклов:
  - 94°С (30 с) – денатурация;
  - 45–60°С (30 с) в зависимости от используемых праймеров – отжиг;
  - 70°С (1 мин) – синтез.
3. Завершающий цикл синтеза: 70°С, 7 мин.

Проводилась дополнительная оптимизация ПЦР путем изменения температуры отжига и добавления диметилсульфоксида для уменьшения образования неспецифических продуктов и увеличения эффективности ПЦР.

В качестве контроля были взяты праймеры к последовательностям генов  $\alpha$ -тубулина и малатдегидрогеназы (Таблица 2 Приложения).

### **III. 14. 4. Электрофоретическое разделение ампликонов**

Разделение амплифицированных участков ДНК проводили в 1,5%-ном агарозном геле при силе тока 100 мА в течение 30–40 мин в камере для горизонтального электрофореза BioRad (США). В качестве буфера использовали 1× TAE (40 мМ Tris; 40 мМ CH<sub>3</sub>COOH; 2 мМ Na<sub>2</sub>EDTA pH 8,0). Для визуализации разделенных фрагментов ДНК в ультрафиолетовом свете использовали интеркалирующий краситель бромистый этидий. Для определения молекулярной массы фрагментов ДНК в геле использовался ДНК-маркер GeneRuler 1kb (ThermoScientific, США). Гель фотографировали в УФ-свете при помощи камеры КТ&С и программы HD Cap.

### **III. 14. 5. Выделение амплифицированных фрагментов ДНК из агарозного геля**

Для последующего секвенирования ампликонов их выделяли из геля с использованием набора для экстракции ДНК BioSilica (Россия) по протоколу фирмы-производителя. Концентрацию ДНК измеряли с помощью прибора NanoDrop (ThermoScientific, США).

### **III. 14. 6. Секвенирование ДНК**

Секвенирование полученных фрагментов ДНК осуществлялось фирмой «Beagle» (Санкт-Петербург) с использованием автоматической капиллярной системы MegaBACE 1000 DNA Analysis System. Для секвенирования применяли праймеры, с которыми проводили амплификацию. По результатам секвенирования полученные последовательности вручную редактировали с помощью программы BioEdit (Hall et al., 1999).

### **III. 15. Статистический анализ данных**

Анализ статистических данных и построение графиков проводили в программах Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, США) и MaxStat (MaxStat Software, Германия). Для сравнения повторностей использовали параметрические критерии, позволяющие анализировать малые выборки.

## IV. Результаты и обсуждение

### IV. 1. Влияние различных сочетаний источников азота на уровень синтеза РНК и флуоресценцию пигментов в опытах с периодической культурой

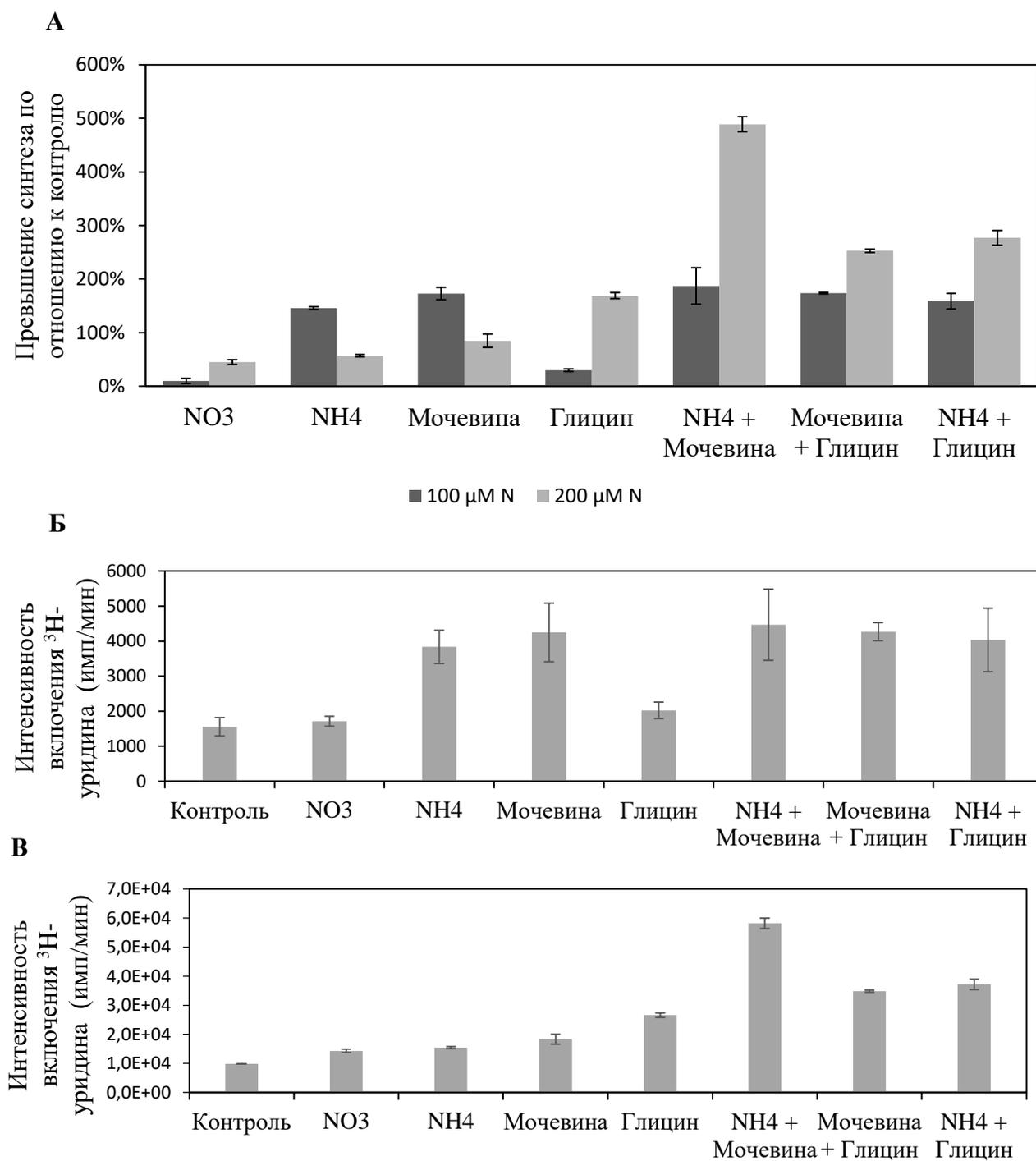
Для оценки влияния различных комбинаций соединений азота на физиологическое состояние клеток *P. minimum* был проведен анализ уровня общего синтеза РНК в клетках, растущих на нитрате, после добавления в среду дополнительных источников азота. Это позволило оценить интенсивность метаболических процессов в ответ на появление в среде дополнительных источников азота.

Анализ включения меченного  $^3\text{H}$ -уридина в клетки показал, что добавление аммония, мочевины, глицина и их сочетаний в качестве дополнительных источников азота вызывает различный физиологический ответ. Источники азота добавляли в концентрациях 100 мкМ и 200 мкМ по азоту.

Опыт показал, что на уровне синтеза РНК оказывает влияние увеличение содержания азота в среде (рис. 5, А). Так, интенсивность синтеза РНК положительно коррелировала с концентрацией добавленного нитрата или глицина. При этом при добавлении аммония или мочевины в концентрации 200 мкМ уровень синтеза РНК был меньше, чем при добавлении этих соединений в концентрации 100 мкМ. По-видимому, это связано с тем, что высокие концентрации аммония ингибируют рост динофлагеллят (Iwasaki, 1973). Так как при поступлении в клетки мочевины гидролизуется на бикарбонат и два иона аммония, высокие концентрации мочевины также оказывают ингибирующее воздействие на клетки.

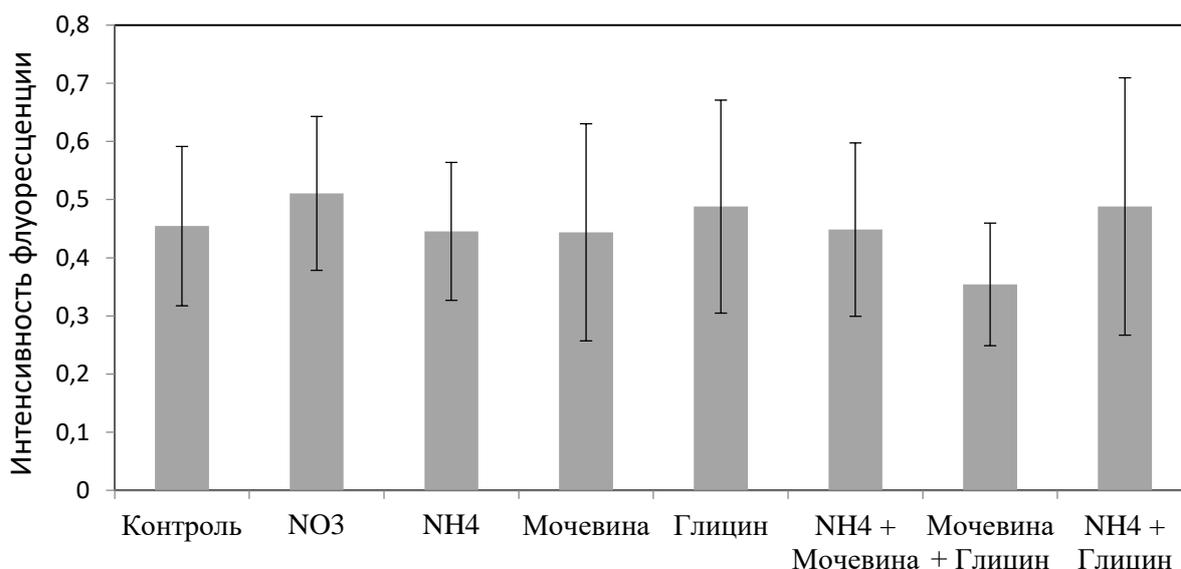
Самые низкие уровни синтеза РНК наблюдали при добавлении нитрата и глицина в концентрации 100 мкМ, в то время как добавление аммония и мочевины в этой же концентрации приводило к увеличению уровней синтеза РНК в несколько раз (рис. 5, Б). Добавление различных сочетаний источников азота в концентрации 100 мкМ также приводило к повышению уровней синтеза РНК, но они не превышали уровней синтеза, наблюдаемых при добавлении аммония или мочевины в качестве единственных источников азота. В то же время добавление сочетаний различных форм азота в концентрации 200 мкМ приводило к значительному увеличению уровней синтеза РНК (рис. 5, В). При этом наиболее высокие уровни синтеза отмечены в эксперименте с добавлением комбинации аммония и мочевины в концентрации 200

мкМ. Это связано с тем, что каждый из источников был добавлен в концентрации 100 мкМ и не оказывал ингибирующего воздействия на клетки.



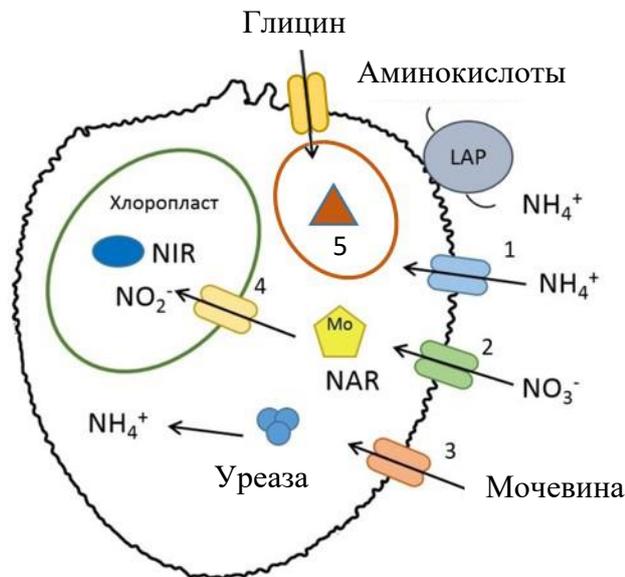
**Рис. 5.** Уровень синтеза РНК в периодических культурах после добавления дополнительных источников азота. А – превышение синтеза по отношению к контролю, Б – интенсивность включения метки при 100 мкМ азота, В - интенсивность включения метки при 200 мкМ азота. 1 - контроль, 2 – нитрат, 3 – аммоний, 4 – мочевина, 5 – глицин, 6 – аммоний + мочевина, 7 – мочевина + глицин, 8 – аммоний + глицин. ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ , n=2) (ANOVA, p>0.05).

Поскольку азот необходим практически для всех биосинтетических процессов, было решено проверить, связано ли увеличение синтеза РНК, наблюдаемое при добавлении дополнительных источников азота, с синтезом пигментов. Анализ флуоресценции не выявил зависимости интенсивности флуоресценции пигментов с уровнем синтеза РНК: средние значения флуоресценции не отличались при добавлении различных форм азота (рис. 6).



**Рис. 6.** Интенсивность флуоресценции в клетках при периодическом культивировании с добавлением 100 мкМ N. ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ , n=2).

Предположительно, увеличение уровня синтеза РНК в клетках в ответ на добавление различных источников азота могло быть связано с синтезом белков, отвечающих за транспорт азотных соединений внутрь клетки и за начальные этапы азотного метаболизма (рис. 7). К транспортным белкам относятся транспортеры аммония семейства AMT, транспортеры нитрата семейства NRT1 и NRT2, транспортеры мочевины семейства DUR3, а также хлоропластный формат/нитритный транспортер. За начальные этапы азотного метаболизма отвечают нитратредуктаза, уреаза и белки комплекса декарбоксилирования глицина. В хлоропластах за ассимиляцию азота отвечает нитритредуктаза.



**Рис. 7.** Схема белков транспорта азотных соединений и начальных этапы азотного метаболизма в клетке динофлагеллят.

1 – транспортер аммония (AMT), 2 – транспортер нитрата (NRT), 3 – транспортер мочевины (DUR3), 4 – формат/нитритный транспортер (FNT), 5 – комплекс декарбоксилирования глицина в митохондриях, NAR – нитратредуктаза, NIR – нитритредуктаза.

## IV. 2. Влияние различных сочетаний источников азота на морфологические и физиологические параметры клеток в опытах с проточной культурой

### IV.2.1. Динамика роста клеток в проточных культурах

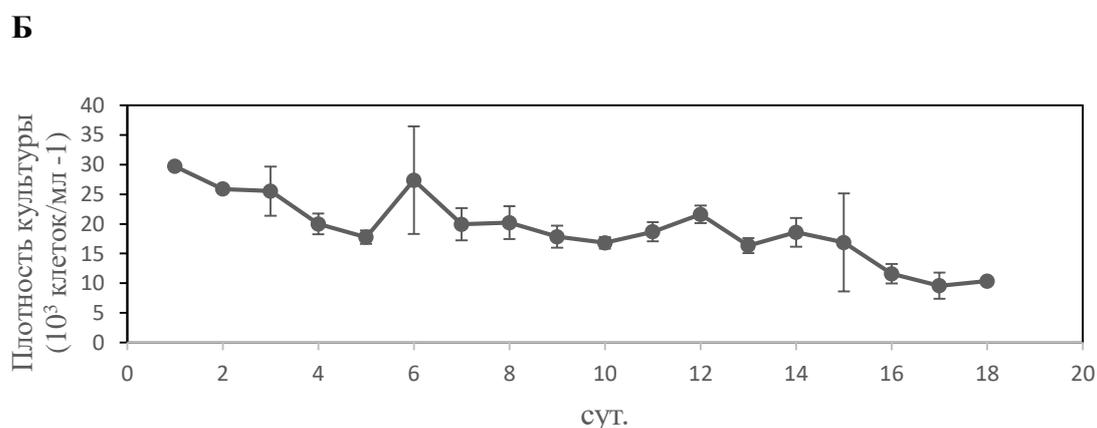
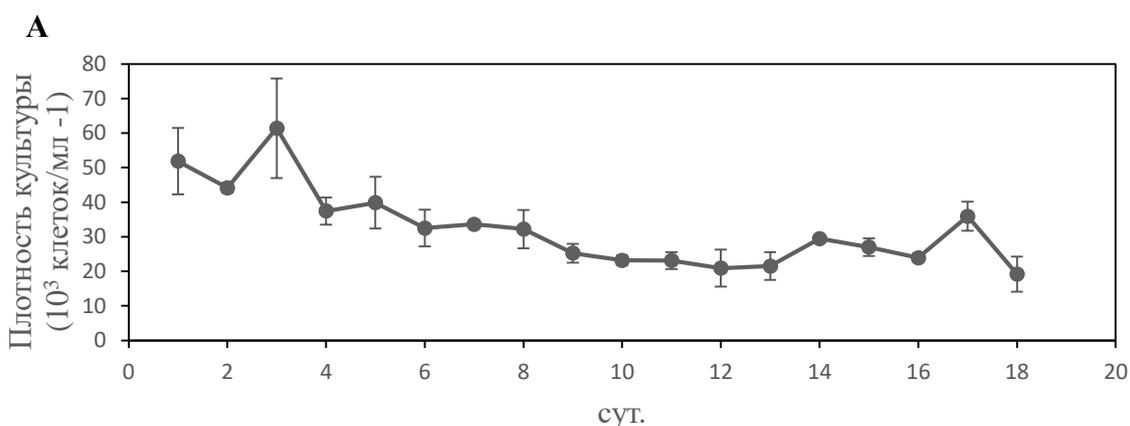
Добавление смесей различных источников азота к периодическим культурам, растущим на нитрате, приводило к изменениям уровня синтеза РНК в клетках динофлагеллят. Мы выдвинули предположение, что разные источники азота и их сочетания при эквимолярной концентрации по-разному влияют на физиологические и морфологические параметры клеток.

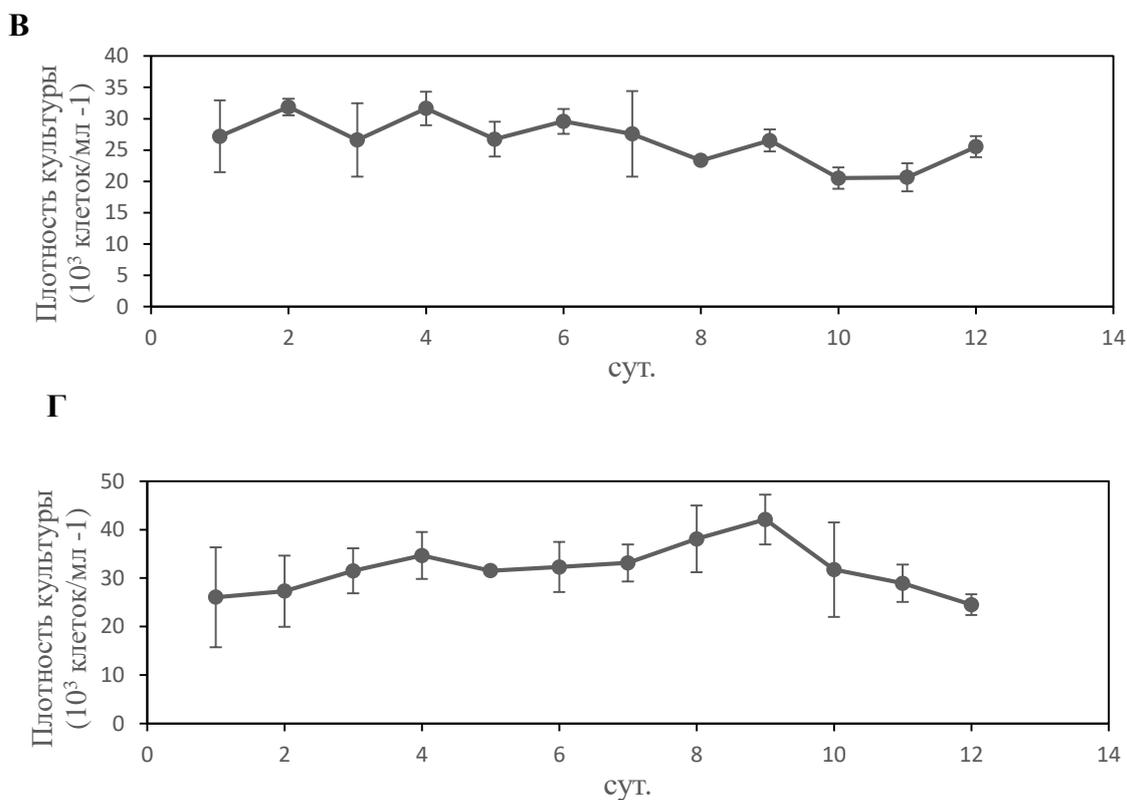
Дальнейшие исследования были направлены на поиски различий в морфологических и физиологических параметрах динофлагеллят, растущих на средах с добавлением различных источников азота. Анализировали интенсивность флуоресценции пигментов в клетках, интенсивность поглощения азота и углерода, форму и размер клеток.

Поскольку содержание азота в морской воде мало, а высокие концентрации встречаются лишь при определенных условиях (в том числе при антропогенном загрязнении), клетки необходимо было культивировать при низких концентрациях азота. Оптимальным методом для такого рода исследования выступил метод проточных культур. Он позволял регулировать поступление питательных субстратов в среду, а также обеспечивал адаптацию клеток для приближения к естественным условиям по количеству азота.

Рост популяции при проточном культивировании контролируется при помощи коэффициента разбавления  $D$ . При инициации культуры с высокой численностью клеток скорость роста  $\mu$  оказывается ниже коэффициента разбавления. В результате популяция уменьшается до тех пор, пока ее рост не будет лимитирован имеющимися в среде ресурсами. Культура достигает состояния динамического равновесия в тот момент, когда скорость роста становится равна коэффициенту разбавления. В этом состоянии концентрация питательных веществ и плотность клеток поддерживаются на постоянном уровне.

На рис. 8 представлены примеры кривых численности клеток, растущих при проточном культивировании с подачей среды с концентрацией азота 20 мкМ N. Скорость роста клеток при динамическом равновесии составила  $0,15 \text{ д}^{-1}$ .





**Рис. 8.** Кривые роста при культивировании с различными источниками азота. А – нитрат, Б – аммоний, В – мочевины, Г – глицин ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ , n=3).

Культуры достигали состояния динамического равновесия на 10-12 день после начала культивирования. Это также подтверждает соотношение количества углерода к азоту в клетках (C/N) (Ou et al., 2014), которое оставалось постоянным в клетках вне зависимости от источника азота, на котором они росли.

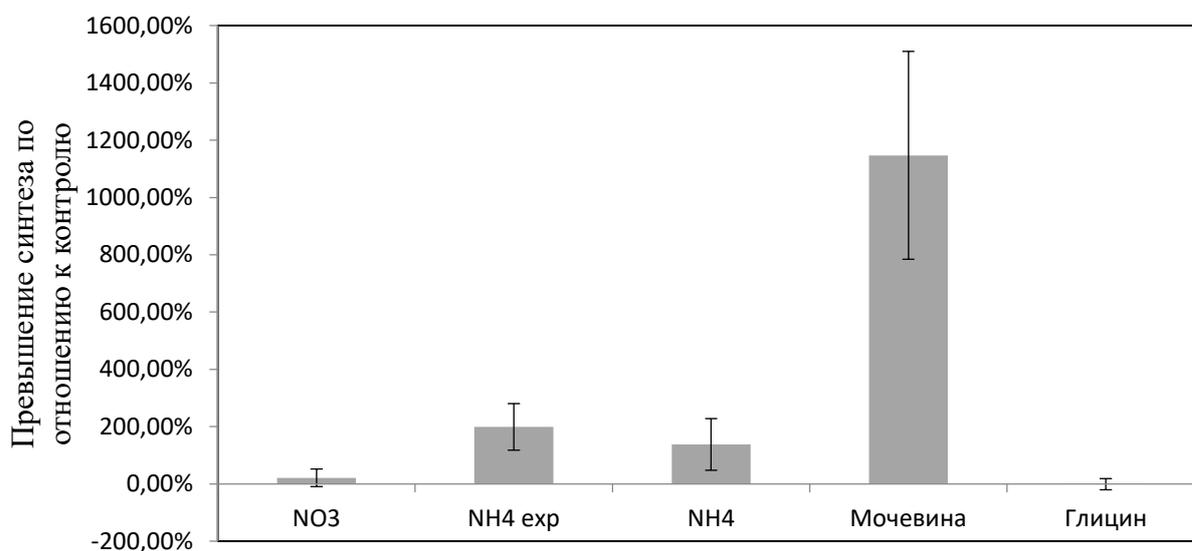
В таблице 3 приведены соотношения C/N для каждой из повторностей. Анализ этого соотношения позволил выявить, что клетки в некоторых опытах (NO<sub>3</sub>-2, NH<sub>4</sub>-1 и NH<sub>4</sub>-2) не достигли динамического равновесия. Несмотря на это, материал из вариантов NH<sub>4</sub>-1 и NH<sub>4</sub>-2 были подвергнуты дальнейшему анализу. Полученный материал сравнивали с материалом из других экспериментов. Далее эти повторности будут обозначаться как NH<sub>4</sub> (exp) (NH<sub>4</sub> exponential).

**Таблица 3.** Соотношение количества углерода к азоту в клетках динофлагеллят и количество клеток в 1 мл культуры в каждом варианте опыта и в каждой повторности.

Вариант опыта	C/N	Кл/мл×10 <sup>3</sup>
NO <sub>3</sub> -1	18,95	25,4
NO <sub>3</sub> -2	10,87	32,1
NO <sub>3</sub> -3	16,98	39,8
NO <sub>3</sub> -4	15,53	47,4
NH <sub>4</sub> -1	10,73	39,9
NH <sub>4</sub> -2	9,69	21,7
Мочевина-1	21,15	41,6
Мочевина-2	18,63	65,8
Глицин-1	18,93	50,9
Глицин -2	21,22	38,9

#### **IV.2.2. Измерение физиологических параметров клеток в проточных культурах**

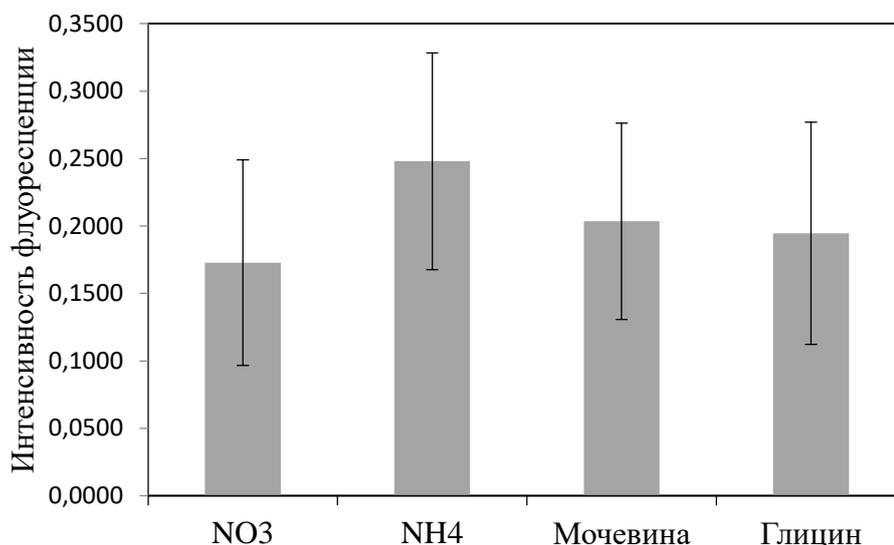
Мы исследовали зависимость уровня синтеза РНК от источника азота в экспериментах с проточными культурами. В качестве контроля использовали клетки из периодической культуры в фазе экспоненциального роста. Из графика, представленного на рис. 9, следует, что наибольший уровень синтеза РНК при проточном культивировании был достигнут в варианте опыта с использованием мочевины в качестве источника азота, что совпадает с результатами опытов с периодическими культурами.



**Рис. 9.** Уровень синтеза РНК проточных культур, растущих на различных источниках азота ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ , n=2).

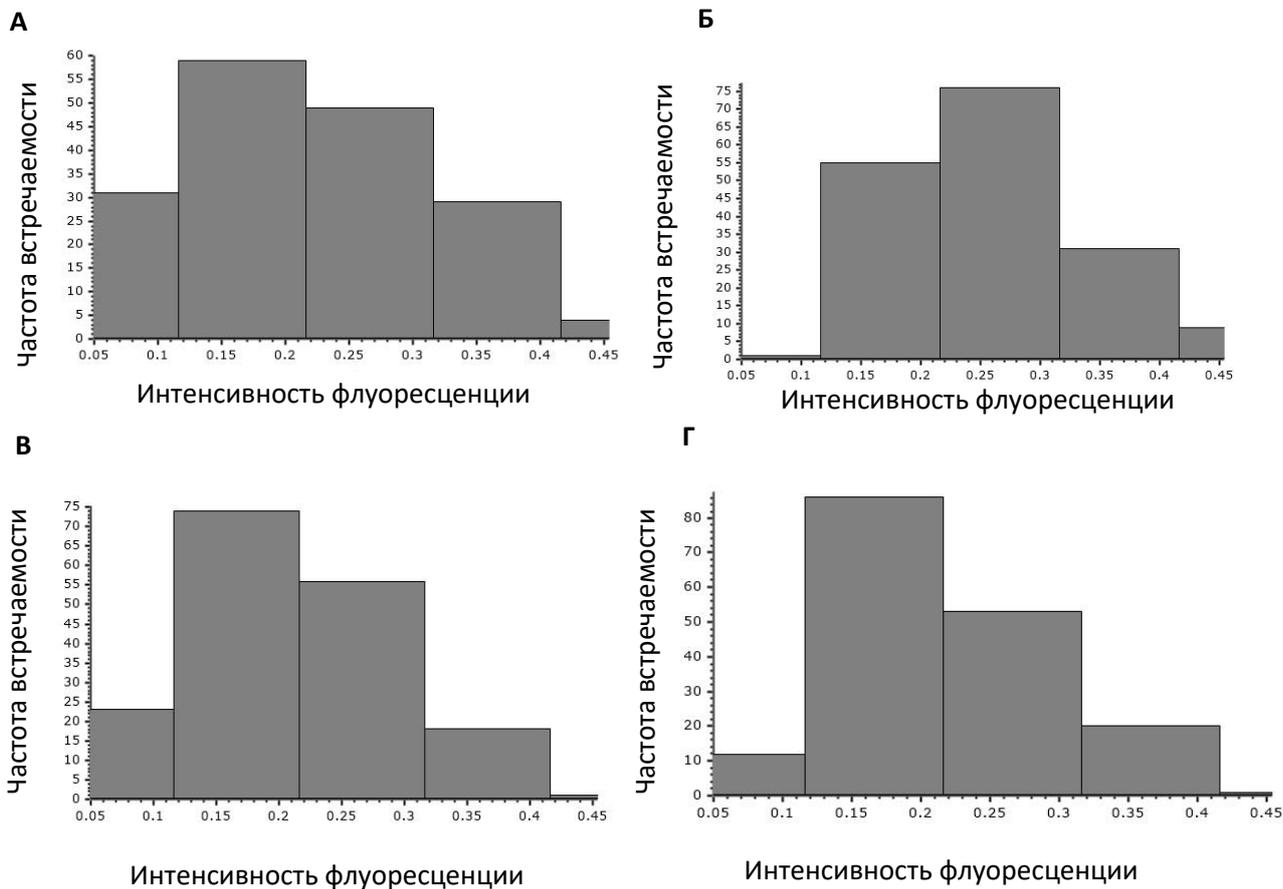
Кроме того, измерения показали, что уровень синтеза РНК не отличался у клеток, растущих на нитрате, аммонии и глицине. Известно, что *P. minimum* характеризуется высокой активностью уреазы при росте на любых источниках азота (Solomon, Glibert, 2008; Liu et al., 2015). Вероятно, высокие уровни синтеза РНК связаны с транскрипцией большого количества транспортеров мочевины, либо с увеличением всего уровня синтеза РНК в клетке.

Анализ флуоресценции клеток, растущих в проточных культурах, не выявил ее зависимости от уровня синтеза РНК (рис. 10). Более того, средние значения флуоресценции пигментов не отличались у клеток, растущих на разных источниках азота (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Таким образом, среднюю интенсивность флуоресценции и, следовательно, количество пигментов в клетках не зависит от типа источников азота.



**Рис. 10.** Интенсивность флуоресценции в клетках при проточном культивировании на среде с 20 мкМ азота ( $\bar{X} \pm S_x$ , n=3).

Несмотря на то, что средние значения не отличались, мы наблюдали разницу в распределении частоты встречаемости клеток с различной интенсивностью аутофлуоресценции при добавлении каждого из источников азота (рис. 11). Помимо средних значений, интерес представляют и распределение индивидуальных значений флуоресценции клеток внутри каждой экспериментальной параллели, отражающее гетерогенность популяции. В последнее время изучению гетерогенности клеток уделяется все больше внимания, поскольку это важно для понимания структуры и механизмов поддержания клеточных популяций. Гетерогенность фитопланктона частично ослабляет внутривидовую конкуренцию за ресурсы и оказывает влияние на динамику популяций и их выживание в изменяющихся условиях среды (Matantseva et al., 2016).



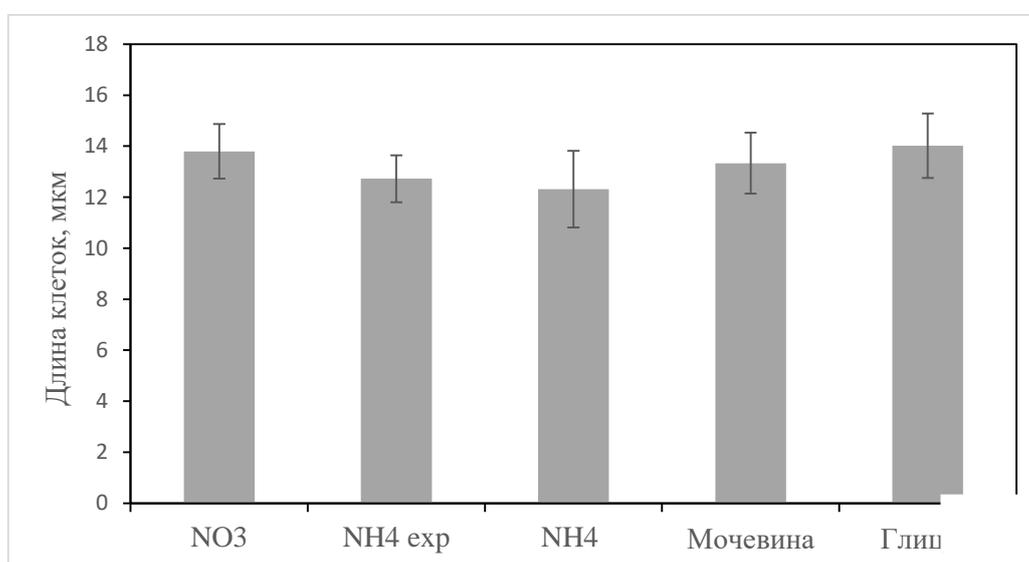
**Рис. 11.** Распределение клеток с различным уровнем флуоресценции внутри каждой экспериментальной параллели в проточных культурах. А – опыты с добавлением нитрата, Б – аммония, В – глицина, Г – мочевины (n=2–3). В каждой повторности проанализировано 85 клеток.

Среди отдельных клеток в разных экспериментальных параллелях выявлена вариабельность по интенсивности автофлуоресценции пигментов. Все повторности демонстрировали похожие распределения клеток по этому параметру, близкие к нормальному: больше всего было клеток со средней интенсивностью флуоресценции. Однако в эксперименте с добавлением аммония практически отсутствовали клетки с низкой интенсивностью флуоресценции (рис. 11, Б). Известно, что низкой интенсивностью флуоресценции обладают метаболически неактивные клетки, и по количеству таких клеток в культуре можно судить о состоянии культуры. На основании полученных данных можно предположить, что наличие аммония в среде в качестве источника азота создает наиболее благоприятные условия для роста культуры.

### IV.2.3. Анализ морфологических характеристик клеток

Морфологические параметры клеток косвенно отражают их состояние, в том числе скорость биосинтетических процессов, время удвоения и т.п., поэтому их исследование имеет важный физиологический смысл. Кроме того, размер клеток важен при оценке биомассы и продуктивности фитопланктона.

Из каждой повторности брали не менее 85 клеток, измерение проводили в программе ImageJ. Сравнение средних значений длин клеток, растущих на разных источниках азота, не выявило видимых различий между экспериментами (рис. 12.) (ANOVA,  $p > 0,05$ ).



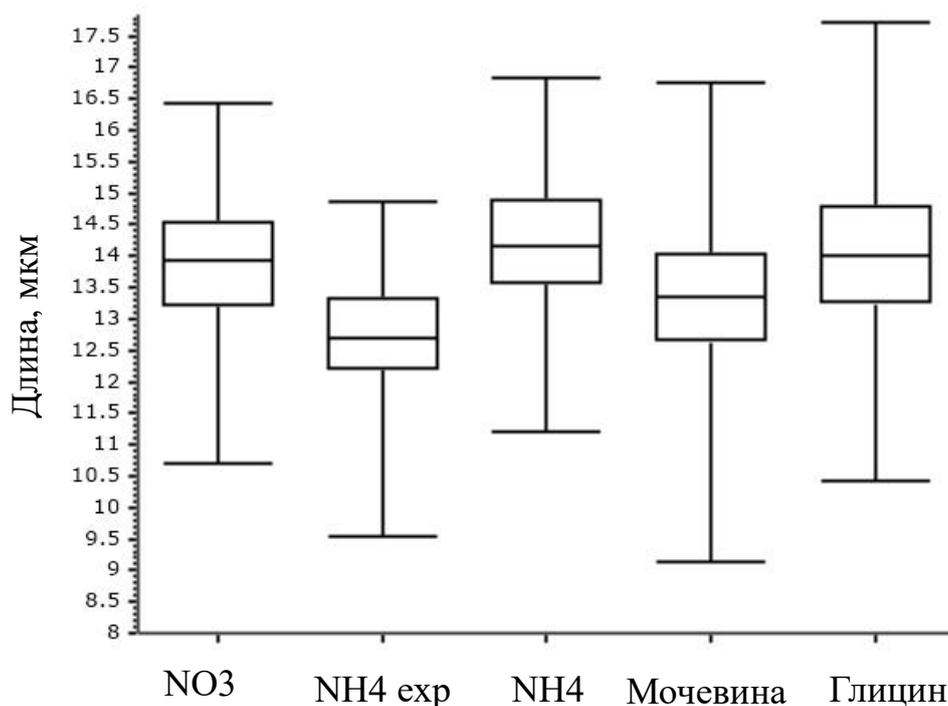
**Рис. 12.** Размер клеток в вариантах опытов с использованием различных источников азота ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ ,  $n=3$ )

В вариантах с добавлением нитрата средняя длина клеток составила 13,9 мкм. Минимальное значение составило 10,7 мкм, максимальное – 16,4 мкм.

Эксперименты с добавлением аммония разделены на две группы. Клетки первой группы NH<sub>4</sub> (exp), не достигшие состояния динамического равновесия, имели среднюю длину 12,7 мкм, минимальная длина составила 9,5 мкм, максимальная – 14,9. Клетки второй группы, достигшие состояния динамического равновесия, имели среднюю длину 14,2 мкм, минимальная длина составила 11,2 мкм, максимальная – 16,8 мкм. Средняя длина клеток, культивируемых с добавлением мочевины, составила 13,3 мкм, минимальная – 9,1 мкм, максимальная – 16,8 мкм.

Самые крупные клетки были в повторностях с добавлением глицина. Средняя длина клеток, культивируемых с добавлением глицина, составила 14,0 мкм, минимальная длина составила 10,4 мкм, максимальная – 17,7.

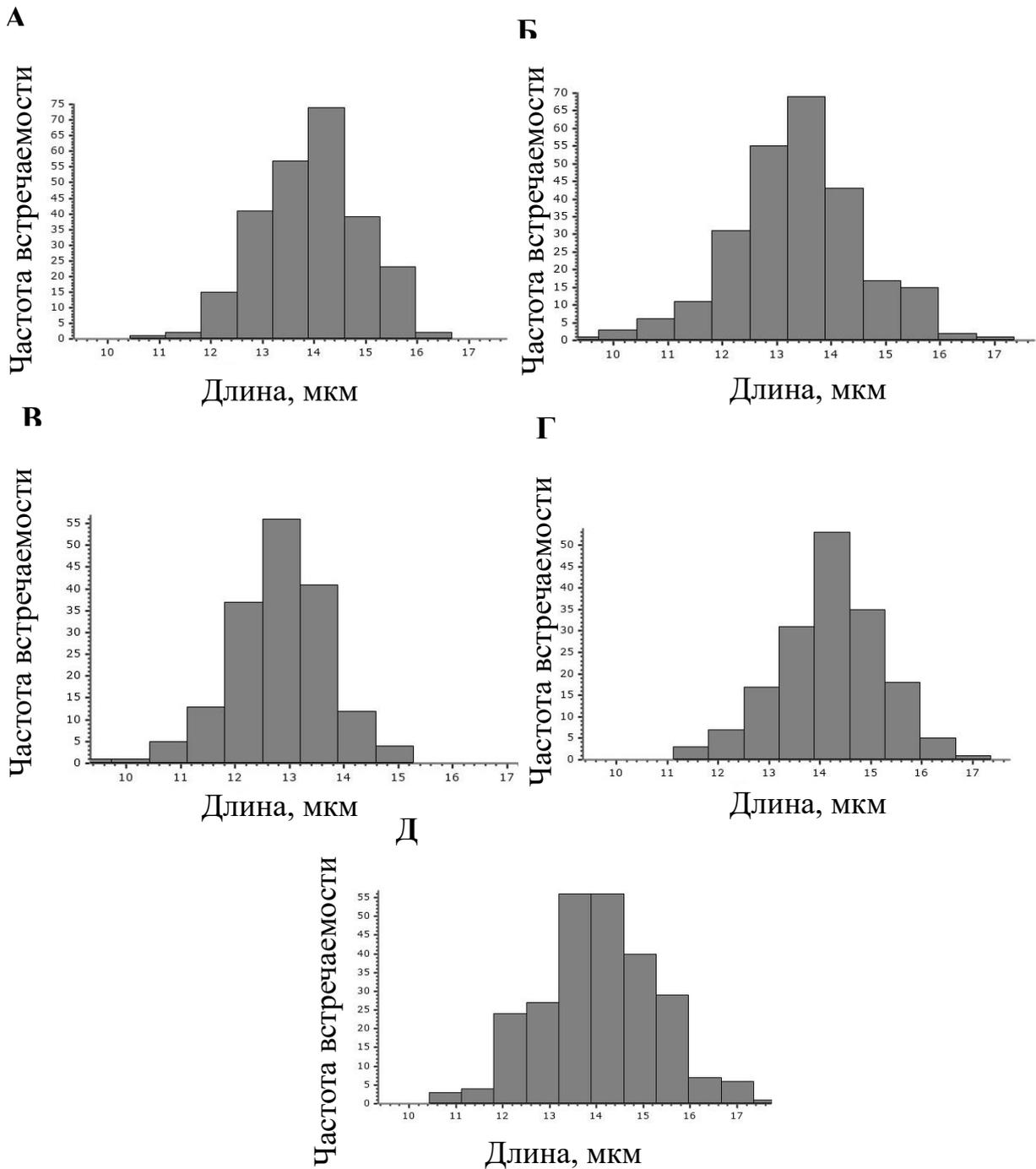
Примечательно, что, несмотря на то, что средние значения не отличались, сравнение значений медиан клеток, выращенных с добавлением различных источников азота, продемонстрировали некоторые различия между вариантами опыта (рис. 13).



**Рис. 13.** Длина клеток *P. minimum* в вариантах опытов с различными источниками азота. На графике отмечены медианы значений, перцентили (25%-75%), минимальные и максимальные значения.

Клетки из группы NH<sub>4</sub> (exp) были меньше, чем клетки из группы NH<sub>4</sub>, достигшей состояния динамического равновесия. Гистограммы распределения клеток по размеру подтверждают это различие. Разница в размерах, видимо, обусловлена тем, что клетки находились на разных фазах роста. Клетки первой группы не достигли состояния динамического равновесия и росли быстрее. Представленные на диаграмме медианы повторностей с добавлением NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> и глицина близки по значениям (13,9, 14,1 и 14,0 мкм соответственно), а медианы вариантов NH<sub>4</sub> (exp) и опыта с добавлением мочевины демонстрируют меньшие значения (12,7 и 13,3 мкм).

На рис. 14 представлены распределения клеток внутри каждой популяции.

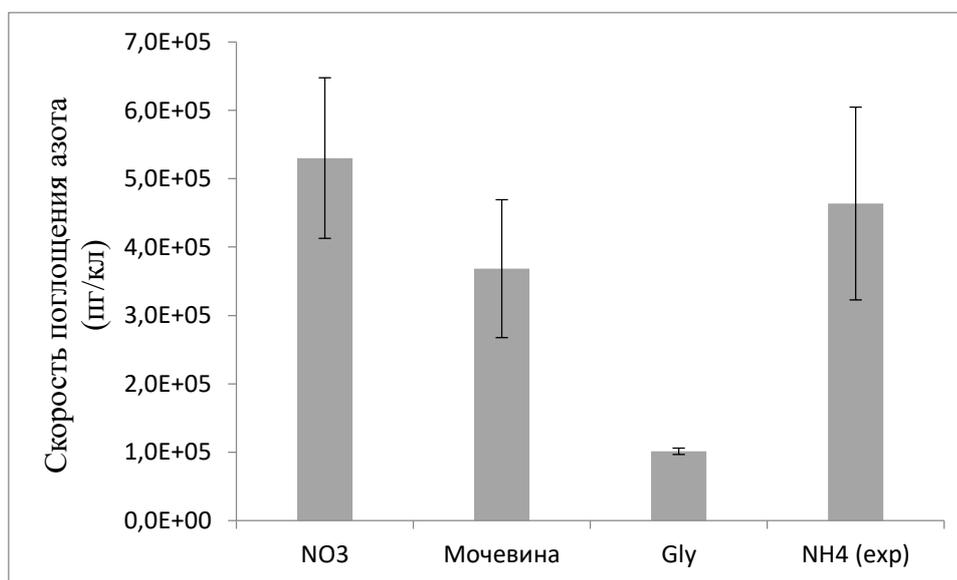


**Рис. 14.** Распределение клеток по длине в вариантах опытов с добавлением различных источников азота. А – нитрат, Б – мочевины, В – аммоний, экспоненциальная фаза, Б – аммоний, Д - глицин.

Все экспериментальные параллели демонстрировали похожие распределения, близкие к нормальному, больше всего было представлено клеток средней длины. Однако между параллелями средние значения длин клеток незначительно отличались.

#### IV.2.4. Измерение скорости поглощения азота и углерода

Измерение интенсивности поглощения азота основано на определении количества стабильных изотопов, поглощенных клетками за время инкубации. Результаты измерений представлены на рис. 15.



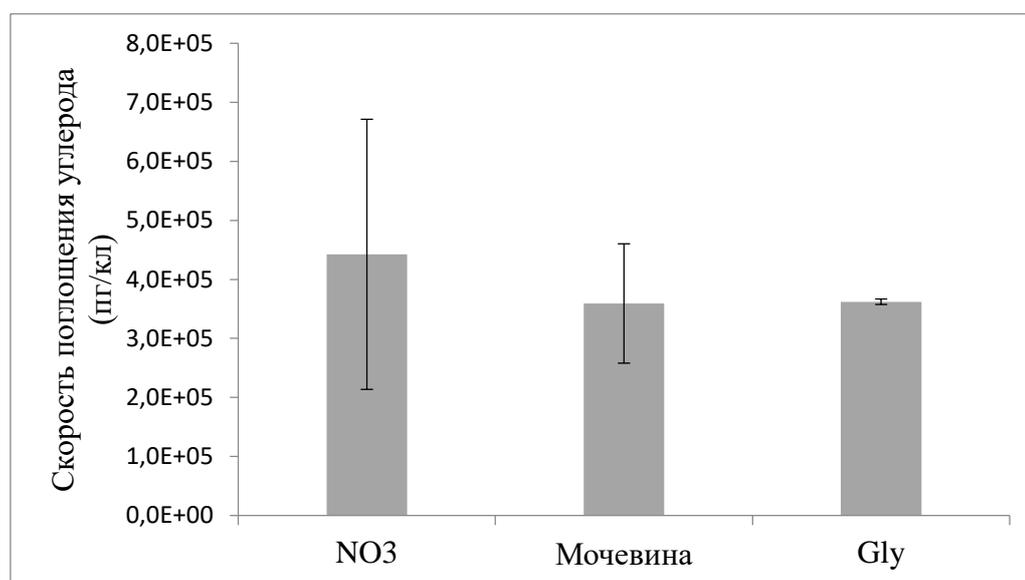
**Рис. 15.** Скорость поглощения азота в зависимости от различных источников в фазе динамического равновесия ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ , n=2).

По окончании культивирования концентрация азота во всех параллелях соответствовала или была меньше предела детекции (0,5 мкМ). По литературным данным, фаза динамического равновесия при проточном культивировании характеризуется очень низким содержанием лимитирующего вещества в среде – в данном случае азота, концентрация которого может быть значительно меньше 1 мкМ (Johansson, Granéli, 1999). В наших экспериментах для расчета скорости поглощения азота было использовано значение 100 нМ. Контрольные расчеты показали, что изменение концентрации азота в диапазоне 100–500 нМ приводило лишь к незначительным изменениям в получаемых значениях скорости поглощения субстратов, которые не превышали стандартных отклонений для каждой параллели.

Известно, что в отличие от других систематических групп, динофлагелляты характеризуются высокой активностью уреазы, что дает им конкурентное преимущество в условиях глобальной эвтрофикации (Solomon, Glibert, 2008). Однако самые высокие скорости поглощения азота во время фазы динамического равновесия продемонстрировали клетки, растущие на нитрате и на аммонии в фазе

экспоненциального роста. Возможно, это объясняется тем, что при низких концентрациях азота в среде клетки имеют высокое сродство к нитрату.

Результаты измерения скорости поглощения углерода приведены на рис. 16. Клетки в вариантах опыта, находившихся в фазе динамического равновесия, продемонстрировали сходные скорости поглощения азота. Это подтверждается и литературными данными (Ou et al., 2014). Клетки культуры, растущей на аммонии в экспоненциальной фазе роста, показали очень высокую скорость поглощения углерода ( $30,5 \times 10^5$  пг/кл). Это объясняется тем, что во время активного роста и деления необходимо большее количество углерода.



**Рис. 16.** Скорость поглощения углерода в зависимости от различных источников в фазе динамического равновесия ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ , n=2).

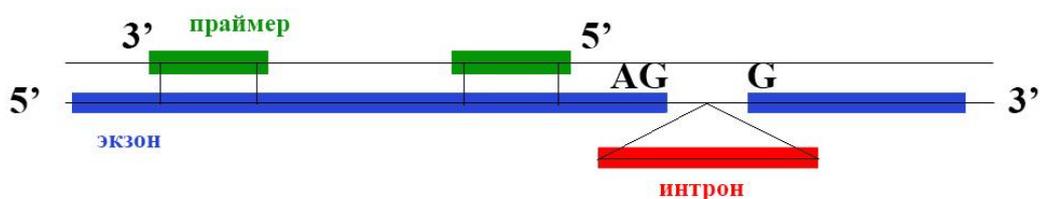
#### **IV.3. Результаты анализа и амплификации генов транспортера мочевины и транспортера нитрата**

Увеличение уровней синтеза РНК, возможно, объясняется экспрессией генов, вовлеченных в азотный метаболизм. Поскольку культуры, растущие на мочевины и нитрате, представляли наибольший интерес, было решено идентифицировать и исследовать гены транспортера мочевины и транспортера нитрата у *P. minimum*. Нами было предпринято несколько попыток сконструировать праймеры на основе последовательностей, найденных в транскриптомной базе MNETPS, но они не

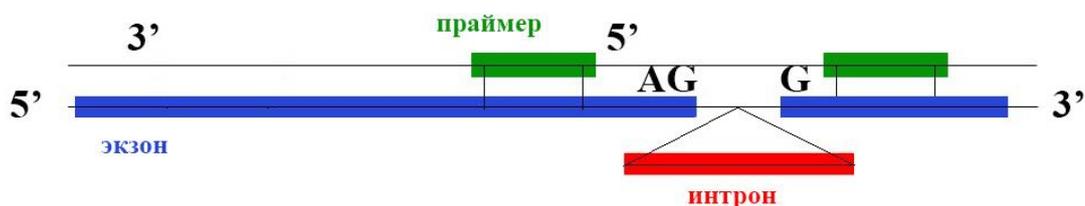
принесли положительных результатов. Литературные данные (Mendez et al., 2015) проливают свет на экзонно-интронную структуру генов динофлагеллят на примере *Cryptocodinium cohnii*, они были взяты за основу при конструировании праймеров для искомым генов.

Из вышеуказанной статьи следовало, что сайты сплайсинга экзонов в геноме динофлагеллят в большинстве случаев маркируются короткой последовательностью AGG. Это оказалось удобным для составления праймеров к последовательности гена, взятой из транскриптомной базы. В таком случае было возможно два варианта расположения праймеров на исследуемом фрагменте гена: либо на коротком участке экзона между двумя последовательностями AGG (рис. 17, А), либо на участке, включающем последовательность AGG. Второй вариант расположения праймеров позволяет проверить возможность наличия интрона в исследуемом участке (рис. 17, Б).

А



Б

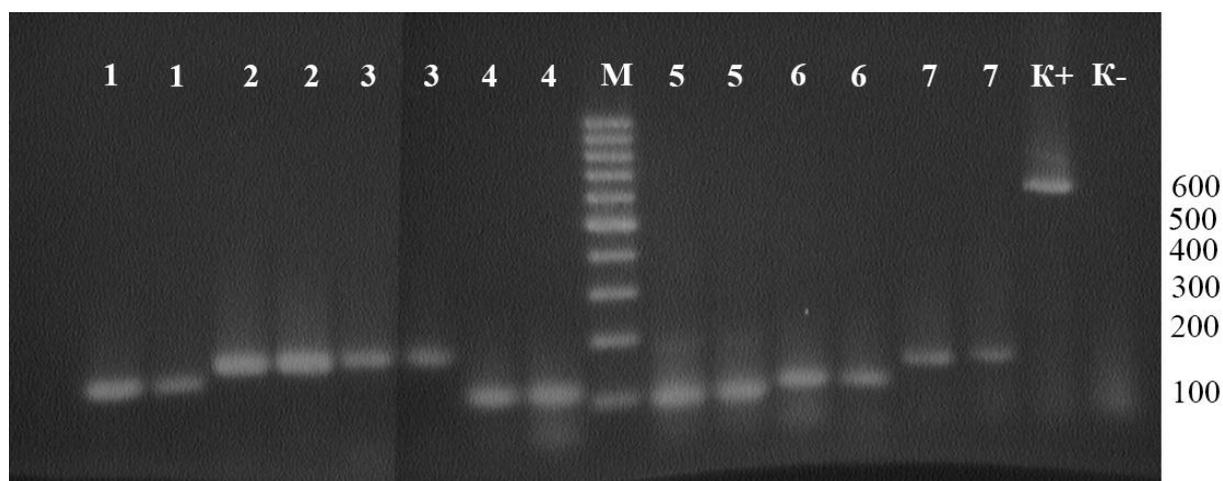


**Рис. 17.** Варианты расположения праймеров, сконструированных на основе транскрибированной ДНК, на участок геномной ДНК относительно экзонов и интронов.

На основе последовательности гена транспортера мочевины, найденной в транскриптоме *P. minimum* из базы MMETPS при помощи программы OligoAnalyzer 3.1 были подобраны 6 пар праймеров. Праймеры DUR3F1/R1, DU3F2/R2, Dur3F3/R3 были сконструированы для присоединения к участку экзона непосредственно перед триплетом AGG. Праймеры DUR3F4/R4, DUR3F5/R5, DUR3F6/R6 были сконструированы для присоединения к участкам экзонов по обе стороны от участка AGG (Таблица 3 Приложения). При подборе оптимальных условий для амплификации

проводилась ПЦР с градиентом температуры 55–60. Полученные фрагменты имели длину 100–200 пн, что соответствовало ожидаемому размеру.

При амплификации пары праймеров DUR3F1/R1, DUR3F2/R2, DUR3F3/R3, DUR3F4/R4 и DUR3F5/R5 дали положительные результаты (рис. 18). Амплификация с использованием пары праймеров Dur3F6/R6 дала отрицательный результат, что, скорее всего, связано с тем, что амплифицированный участок включал в себя интрон большого размера, в результате чего фрагмент мог оказаться слишком длинным для амплификации с используемой полимеразой. В таблице 4 указаны праймеры для гена транспортера мочевины DUR3, давшие положительный результат при амплификации.



**Рис 18.** Электрофореграмма продуктов амплификации с помощью праймеров для гена транспортера мочевины Dur3.

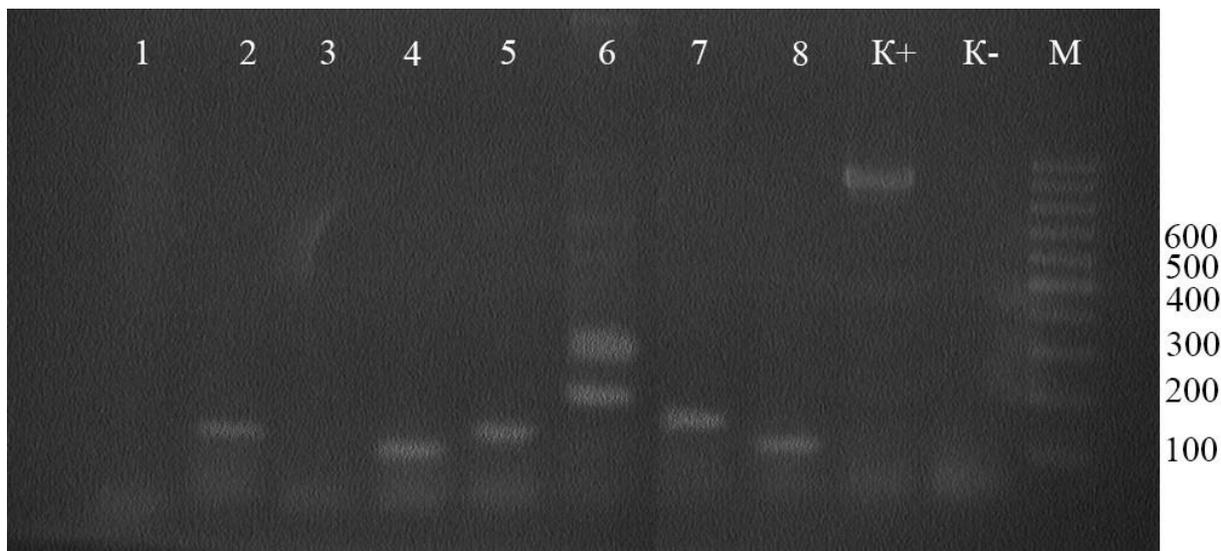
1 – праймер Dur3F1/Dur3R1; 2 – Dur3F2/Dur3R2; 3 – Dur3F3/Dur3R3; 4 – Dur3F4/Dur3R4; 5 – Dur3F5/Dur3R5; 6 – TUA; 7 – MDH; K+ - положительный контроль; K- - отрицательный контроль; M – маркер молекулярной массы (п.н.).

**Таблица 4.** Праймеры DUR3, показавшие положительный результат при амплификации.

DUR3F1	5' - CCTTCATCTTCTTCTGCCTGC - 3'
DUR3R1	5' - ACAGGATCACGCCCCAC - 3'
DUR3F2	5' - GCAACTGGCGATCAGATTCTC - 3'
DUR3R2	5' - GTTCCACAGGGGCACCAC - 3'
DUR3F3	5' - TCGGCGAGATCACGGTG - 3'
DUR3R3	5' - CAGACTGGTCGTTCTCCATC - 3'
DUR3F4	5' - GTGTACTTGGACAAGACCGC - 3'
DUR3R4	5' - CACTGCGACACAATGACCGAC - 3'
DUR3F5	5' - CACCGTGTTCGTGGACCAGTC - 3'
DUR3R5	5' - GAACCACACCAAGCCGCC - 3'

При конструировании праймеров для амплификации последовательности гена транспортера нитрата использовался тот же принцип, что и при конструировании праймеров для транспортера мочевины. Для амплификации последовательности гена транспортера нитрата было подобрано 6 пар праймеров на основе последовательности транспортера нитрата, найденной в транскриптоме *P. minimum* из базы MMETPS.

Для получения последовательностей генов лабораторных клонов *P. minimum* на основе последовательностей генов из транскриптомной базы данных MMETPS при помощи программы OligoAnalyzer 3.1, были подобраны праймеры к генам транспортера мочевины Dur3 и транспортеров нитрата NRT 1.1 (Таблица 4 Приложения) и NRT 2.1. (Таблица 5 Приложения) (рис. 19). При составлении праймеров учитывалась экзон-интронная структура гена, праймеры подбирали к участкам, предположительно являющимися экзонами. Длина фрагментов составила 100–250 п.н. В таблице 5 указаны праймеры для гена транспортера нитрата NRT2.1, давшие положительный результат при амплификации



**Рис. 19.** Электрофореграмма продуктов амплификации с помощью праймеров для гена транспортера нитрата NRT.

1 – праймер NRT1.1 F1/R1, 2 – NRT1.1 F2/R2, 3 – NRT1.1 F6/R6, 4 – NRT2.1 F1/R1, 5 – NRT2.1 F5/R5, 6 – NRT2.1F6/R6, 7 – MDH F/R, 8 – TUA F/R, K+ - положительный контроль; K- - отрицательный контроль; M – маркер молекулярной массы (п.н.).

**Таблица 5.** Праймеры NRT, показавшие положительный результат при амплификации.

NRT1.1F1	5' - CCTGGGATACTCCGTGTCTG - 3'
NRT1.1R1	5' - CAAAGCCGCCACCGTG - 3'
NRT2.1F1	5' - CGAAGTCCTCCCTAAGTGCG - 3'
NRT2.1R1	5' - GCACAAAGATCGTGATGCCGAC - 3'
NRT2.1F5	5' - CATTGGGCGGCATCTTCAGC - 3'
NRT2.1R5	5' - CATGGCTGCGAGTTCTCCAC - 3'

Сконструированные праймеры также подходят для детекции генов посредством ПЦР в режиме реального времени. Дополнительно была проведена амплификация с использованием контрольных праймеров для генов тубулина  $\alpha$  (TUAF/R) и малатдегидрогеназы (MDHF/R), подобранные непосредственно для *P. minimum* (Guo, Ki, 2012). Эти гены продемонстрировали наиболее стабильную экспрессию при изменении факторов внешней среды. К сожалению, методика выделения РНК и проведение ПЦР в режиме реального времени из клеток динофлагеллят не отработана в лаборатории одноклеточных организмов ИИЦ РАН, из-за чего работа с данным методом в установленные сроки не представлялась возможным. Тем не менее, в

будущем планируется исследовать экспрессию генов транспортера мочевины и транспортера нитрата в клетках, выращенных с добавлением различных источников азота, методом РТ-ПЦР.

Секвенирование всех амплифицированных фрагментов гена транспортера мочевины DUR3 показало очень высокое сходство последовательностей *P. minimum* с последовательностью, представленной в транскриптом.

Пары праймеров NRT1.1 F1/R1, NRT2.1 F1/R1 и NRT2.1 F5/R5 были успешно выделены и секвенированы. Фрагмент NRT2.1F1/R1 продемонстрировал высокое сходство к последовательности гена транспортера нитрата, фрагмент NRT2.1 F5/R5 частично совпал с последовательностью из транскриптома, возможно, амплифицированный участок содержал интрон. Сходство последовательности NRT1.1 F1/R1 обнаружено не было, что может объясняться тем, что произошла неспецифическая амплификация.

## Выводы

1. Уровень синтеза РНК и скорость ассимиляции азота в периодических и проточных культурах *P. minimum* зависят от типа и концентрации экзогенного источника азота.
2. Размер клеток *P. minimum*, автофлуоресценция пигментов и скорость поглощения углерода не зависят от типа источника азота.
3. Амплификация тотальной ДНК *P. minimum* с использованием специально сконструированных праймеров свидетельствует о наличии генов транспортера нитрата NRT2.1 и транспортера мочевины DUR3.

Исполнитель: Печковская С.А.

Научный руководитель: м.н.с. Матанцева О. В.

Куратор: д.б.н., проф. Пиневиц А. В.

## **Благодарности**

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю м.н.с. Ольге Валерьевне Матанцевой за постоянную помощь в написании дипломной работы, к.б.н. с.н.с. Наталье Алексеевне Филатовой за помощь в измерении уровня синтеза РНК, д.б.н. профессору Александру Васильевичу Пиневичу за советы и полезные замечания, профессора Марен Фосс за организацию масс-спектрометрических исследований.

## Список литературы

1. Aksnes D. L., Egge J. K. A theoretical model for nutrient uptake in phytoplankton // *Mar Ecol Prog Ser* 1991. V. 70. P. 65-72.
2. Antia N. J., Harrison P. J., Oliveira L. The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology // *Phycologia*. 1991. V. 30. P. 1-89.
3. Atkinson D., Ciotti B. J., Montagnes D. J. S. Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5% C<sup>-1</sup> // *Proc R Soc of London B: Biological Sciences*. 2003. V. 270. P. 2605-2611.
4. Barton A. D. et al. The biogeography of marine plankton traits // *Ecology letters*. – 2013. V. 16. P. 522-534.
5. Bouwman L., Goldewijk K. K., Van Der Hoek K. W., Beusen A. H., Van Vuuren D. P., Willems J., Rufino M. C., Stehfest E. Exploring global changes in nitrogen and phosphorus cycles in agriculture induced by livestock production over the 1900–2050 period // *PNAS*. 2013. V. 110. P. 20882-20887.
6. Burkholder J.M., Dickey D.A., Kinder C., Reed R.E., Mallin M.A., Melia G., McIver M.R., Cahoon L.B., Brownie C., Deamer N., Springer J., Glasgow Jr. H., Toms D., Smith J., 2006. Comprehensive trend analysis of nutrients and related variables in a large eutrophic estuary: a decadal study of anthropogenic and climatic influences // *Limnol. Oceanogr*. 2006. V. 51. P. 463–487
7. Chisholm S. W. Phytoplankton size // *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*. 1992. V. 43. P. 213-237.
8. Coale K. H. et al. A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in the equatorial Pacific Ocean // *Nature*. 1996. V. 383.
9. Dagenais-Bellefeuille S., Morse D. Putting the N in dinoflagellates // *Frontiers in microbiology*. 2013. V. 4. P. 1-14.
10. Dale T., Rey F., Heimdal B. R. Seasonal development of phytoplankton at a high latitude oceanic site // *Sarsia*. 1999. V. 84. P. 419-435.
11. Dale, B., Thorsen, T.A., Fjellså, A. Dinoflagellate cysts as indicators of cultural eutrophication in the Oslofjord, Norway // *Estuar. Coast. Shelf Sci*. 1999. V. 48. P. 371–382.
12. Deutsch, B., Mewes, M., Liskow, I., Voss, M. Quantification of diffuse nitrate inputs into a small river system using stable isotopes of oxygen and nitrogen in nitrate // *Organic Geochemistry*. 2006. V. 37. P. 1333-1342.

13. Doane T. A., Horwath W. R. Spectrophotometric determination of nitrate with a single reagent // *Anal.Lett.* 2003. V. 36. P. 2713–2722.
14. Dugdale C. R. and Wilkerson F. The use of <sup>15</sup>N to measure nitrogen uptake in eutrophic oceans; experimental considerations // *Limnol Oceanogr.* 1986. V. 1. P. 673-689.
15. Dyhrman S. T., Anderson D. M. Urease activity in cultures and field populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium* // *Limnol Oceanogr.* 2003. V. 48. P. 647-655.
16. Edler, L., Ærtebjerg, G., Granéli, E., 1982. Exceptional plankton blooms in the entrance to the Baltic Sea—the Kattegat and Belt Sea area // International Council for the Exploration of the sea. ICES C.M. L 20. P. 1–6.
17. Fabregas J., Abalde J., Herrero C. Biochemical composition and growth of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate // *Aquaculture.* 1989. V. 83. P. 289-304.
18. Fagerberg, T., Jephson, T., Carlsson, P. Molecular size of riverine dissolved organic matter influences coastal phytoplankton communities // *Mar. Ecol. Prog.* 2010. V. 409. P. 17–25.
19. Falkowski P.G. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO<sub>2</sub> in the ocean // *Nature.* 1997. V. 387. P. 272-275.
20. Falkowski P.G. The power of plankton // *Nature.* 2012. V. 483. P. 17-20.
21. Fan C., Glibert P. M. Effects of light on nitrogen and carbon uptake during a *Prorocentrum minimum* bloom // *Harmful Algae.* 2005. V. 4. P. 629-641.
22. Fan C., Glibert P. M., Alexander J., Lomas M. W. Characterization of urease activity in three marine phytoplankton species, *Aureococcus anophagefferens*, *Prorocentrum minimum*, and *Thalassiosira weissflogii* // *Marine Biology.* 2003. V. 142. P. 949-958.
23. Fernandez-Reiriz M. J., Perez-Camacho A., Ferreiro M. J., B Lanco J., Planas M., Campos M.J., Labarta U. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipid and fatty acids) of seven marine microalgae // *Aquaculture.* 1989. V. 83. P. 17-37.
24. Fidalgo J.P, Cid A., Abalde J., Herrero C. Culture of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* with different nitrogen sources: growth, nutrient conversion and biochemical composition // *Cahiers de Biologie Marine.* 1995. V. 36. P. 165- 173.

25. Finkel Z. V. et al. A universal driver of macroevolutionary change in the size of marine phytoplankton over the Cenozoic // *Proc Natl Acad Sci.* 2007. V. 104. P. 20416-20420.
26. Finkel Z. V. Light absorption and size-scaling of light-limited metabolism in marine diatoms // *Limnol Oceanogr.* 2001. V. 46. P. 86-94.
27. Fujiki T., Taguchi S. Variability in chlorophyll a specific absorption coefficient in marine phytoplankton as a function of cell size and irradiance // *J Plankton Res.* 2002. V. 24. P. 859-874.
28. Galloway J. N., Dentener F. J., Capone D. G., Boyer E. W., Howarth R. W., Seitzinger S. P., Asner G. P., Cleveland C. C., Green P. A., Holland E. A., Karl D. M., Michaels A. F., Porter J. H., Townsend A. R., Vöosmarty C. J. Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future // *Biogeochemistry.* 2004. V. 70. P. 153–226.
29. García N., López-Elías J.A., Miranda A., Martínez-Porchas M., Huerta N., García A. Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom *Thalassiosira weissflogii* at three culture phases // *Lat Am J Aquat Res.* 2012. V. 40. P. 435–440.
30. Glibert P. M. et al. Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions // *Limnol Oceanogr.* 2016. T. 61. P. 165-197.
31. Glibert P. M., Burkholder J. A. M., Kana T. M. Recent insights about relationships between nutrient availability, forms, and stoichiometry, and the distribution, ecophysiology, and food web effects of pelagic and benthic *Prorocentrum* species // *Harmful Algae.* 2012. V. 14. P. 231-259.
32. Glibert P. M., Seitzinger S., Heil C. A., Burkholder J.M., Parrow M.W., Codispoti L.A., Kelly V. The role of eutrophication in the global proliferation of harmful algal blooms // *Oceanography.* 2005. V. 18. P.198-209.
33. Glibert P. M., Heil C. A, Hollander D. J., Revilla M., Hoare A., Alexander J., Murasko S. Evidence for Dissolved Organic Nitrogen and Phosphorus Uptake During a Cyanobacterial Bloom in Florida Bay // *Mar Ecol Prog Ser* 2004. V. 280. P. 73-83.
34. Glibert P.M., Burkholder J.M. The complex relationships between increases in fertilization of the earth, coastal eutrophication and proliferation of harmful algal blooms // *Ecology of Harmful Algae.* 2006. V. 189. P. 341-354.

35. Glibert, P.M., Mayorga, E., Seitzinger, S. *Prorocentrum minimum* tracks anthropogenic nitrogen and phosphorus inputs on a global basis: application of spatially explicit nutrient export models // *Harmful Algae*. 2008. V. 8. P. 33–38.
36. Goeyens L. et al. A room temperature procedure for the manual determination of urea in seawater // *Estuar Coast Shelf S*. 1998. V. 47. P. 415-418.
37. Gou R., Ki J. S. Evaluation and validation of internal control genes for studying gene expression in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* using real-time PCR // *Eur J Protistol*. 2012. V. 48. P. 199–206.
38. Gruber N. The marine nitrogen cycle: overview and challenges // *Nitrogen in the Marine Environment*. 2008. V. 2. P. 1-50.
39. Grzebyk, D., Berland, B. Influences of temperature, salinity and irradiance on growth of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea // *J. Plankton Res*. 1996. V. 18. P. 1837–1849.
40. Hackett J. D., Anderson M. D., Erdner D. L., Bhattacharya D. Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment // *Am J Bot* 2004. V. 91. P. 1523-1534.
41. Hajdu S., Edler L., Olenina I., Witek B. (2000) Spreading and Establishment of the Potentially Toxic Dinoflagellate *Prorocentrum minimum* in the Baltic Sea // *J Int Rev Hydrobiol*. 2000. V. 85. P. 557–571.
42. Hajdu S., Pertola S., Kuosa H. *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) in the Baltic Sea: morphology, occurrence — a review// *Harmful Algae*. 2005. V. 4. P. 471-480.
43. Han M., Lee H., Anderson D. M., Kim B. Paralytic shellfish toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium pacificum* (Chinhae Bay, Korea) in axenic, nutrient-limited chemostat cultures and nutrient-enriched batch cultures // *Mar Pollut Bull*. 2016. V.104. P. 34–43.
44. Heil C. A., Glibert P. M., Fan C. *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller. A review of a harmful algal bloom species of growing worldwide importance // *Harmful Algae*. 2005. V. 4. P. 449-470.
45. Howarth R. W., Sharpley A., Walker D. Sources of nutrient pollution to coastal waters in the United States: implications for achieving coastal water quality goals // *Estuaries*. 2002. V. 25. P. 656-676.
46. Howarth R. W., Swaney D. P., Butler T. J., Marino R. Rapid communication: climatic control on eutrophication of the Hudson river estuary // *Ecosystems*. 2000. V. 3. P. 210-215.

47. Irigoien X., Flynn K. J., Harris R. P. Phytoplankton blooms: a 'loophole' in microzooplankton grazing impact? // *J Plankton Res.* 2005. V. 27. P. 313-321.
48. Iwasaki H. The physiological characteristics of neritic red tide flagellate // *Bull Plankton Soc Jpn.* 1973. V. 19. P. 104-114.
49. Jauzein C., Loureiro S., Garces E., Collos Y. Interactions between ammonium and urea uptake by five strains of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in culture // *Aquat Microb Ecol.* 2008. V. 53. P. 271-280.
50. Johansson N., Granéli E. Influence of different nutrient conditions on cell density, chemical composition and toxicity of *Prymnesium parvum* (Haptophyta) in semi-continuous cultures // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 1999. V. 239. P. 243–258.
51. Källqvist T., Svenson A. Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *Nephroselmis pyriformis*, Chlorophyta // *Water research.* 2003. V. 37. P. 477-484.
52. Keeling P. J., Burki F., Wilcox H., Allam B., Allen E. E., Amaral-Zettler L. A., Armbrust E. V., Archibald J.M., Bharti A. K., Bell C. J., Beszteri B., Bidle K. D., Cameron C. T., Campbell L., Caron D. A., Cattolico R. A., Collier J. L., Coyne K., Davy S. K., Deschamps P., Dyrman S. T., Edvardsen B., Gates R. D., Gobler C. J., Greenwood S. J., Guida S. M., Jacobi J. L., Jakobsen K. S., James E.R., Jenkins B., John U., Johnson M.D., Juhl A. R., Kamp A., Katz L. A., Kiene R., Kudryavtsev A., Leander B. S., Lin S., Lovejoy C., Lynn D., Marchetti A., McManus G., Nedelcu A. M., Menden-Deuer S., Miceli C., Mock T., Montresor M., AnnMoran M., Murray S., Nadathur G., , Nagai S., Ngam P. B., Palenik B., Pawlowski J., Petroni G., Piganeau G., Posewitz M. C., Rengefors K., Romano G., Rumpho M. E., Rynearson T., , Schilling K. B., Schroeder D. C., Simpson A.G.B., Slamovits C. H.m, Smith D. R., Smith G.J., Smith S. R., Sosik H.M., Stief P., Theriot E., Twary S.N., , Umale P. E., Vaultot D., Wawrik B., Wheeler G.L., Wilson W. H., Xu Y., Zingone A., Worden A. Z. The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP): Illuminating the Functional Diversity of Eukaryotic Life in the Oceans through Transcriptome Sequencing // *PLoS Biol* V.12. P. e1001889.
53. Kimor B., Moigis A.G., Dohms V., Stienen C. (1985) A case of mass occurrence of *Prorocentrum minimum* in the Kiel Fjord // *Mar Ecol Prog Ser.* 1985. V. 27. P. 209–215.

54. Kiørboe T. Optimal swimming strategies in mate-searching pelagic copepods // *Oecologia*. 2008. V. 155. P. 179-192.
55. Kiørboe T. Turbulence, phytoplankton cell size, and the structure of pelagic food webs // *Ad Mar Biol*. 1993. V. 29. P. 1-72.
56. Kirk J. T. O. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge. 1994. 509 p.
57. Laabir M., Jauzein C., Genovesi B., Masseret E., Grzebyk D., Cecchi P., Vaquer A., Perrin Y., Collos Y. Influence of temperature salinity & irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters // *J Plankton Res*. 2011. V. 33. P. 1550-1563.
58. Lee Y.S. Factors affecting outbreaks of high-density *Cochlodinium polykrikoides* red tides in the coastal seawaters around Yeosu and Tongyeong, Korea // *Mar Pollut Bull*. 2006. V. 52. P. 1249–1259.
59. Legrand C., Granéli E., Carlsson P. Induced phagotrophy in the photosynthetic dinoflagellate *Heterocapsa triquetra* // *Aquat. Microb. Ecol*. 1998. V. 15. P. 65–75.
60. Levasseur M., Thompson P. A., Harrison P.J. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources // *J Phycol*. 1993. V. 29. P. 587-595.
61. Li W. K. W., Goldman J. C. Problems in estimating growth rates of marine phytoplankton from short-term <sup>14</sup>C assays // *Microb Ecol*. 1981 V. 7. P. 113-121.
62. Lin S., Zhang H., Hou Y., Miranda L., Bhattacharya D. Development of a Dinoflagellate-Oriented PCR Primer Set Leads to Detection of Picoplanktonic Dinoflagellates from Long Island Sound // *Appl Environ Microbiol* 2006. P. 5626-5630.
63. Litaker R.W., Tester P.A., Duke C.S., Kenney B.E., Pinkney J.L., Ramus J. Seasonal niche strategy of the bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa triquetra* // *Mar Ecol Prog* 2002. V. 232. P. 45–62.
64. Liu Y. et al. Effects of nitrogenous nutrition on growth and nitrogen assimilation enzymes of dinoflagellate *Akashiwo sanguinea* // *Harmful Algae*. 2015. V. 50. P. 99-106.
65. Lomas M. W., Glibert P. M. Interactions between NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake and assimilation: comparison of diatoms and dinoflagellates at several growth temperatures // *Marine Biology*. 1999. V. 133. P. 541-551.
66. Lourenco S. O., Barbarino E., Mancini-Filho J., Schinke K.P., Aidar E. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine

- microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture // *Phycologia*. 2002. V. 41. P. 158-168.
67. Marañón E. Cell size as a key determinant of phytoplankton metabolism and community structure // *Ann Rev Mar Sci*. 2015. V. 7. P. 241-264.
68. Marañón E. et al. Unimodal size scaling of phytoplankton growth and the size dependence of nutrient uptake and use // *Ecology letters*. 2013. V. 16. P. 371-379.
69. Matantseva O., Skarlato S., Vogts A., Pozdnyakov I., Liskow I., Schubert H., Voss M. Superposition of individual activities: urea-mediated suppression of nitrate uptake in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* revealed at the population and single-cell levels // *Front Microbiol*. V. 7. P. 1-14.
70. Mendez G. S., Delwiche C. F., Apt K. B., Lippmeier J. C. Dinoflagellate Gene Structure and Intron Splice Sites in a Genomic Tandem Array // *J of Euk Microbiology*. 2015. V. 62. P. 679–687.
71. Miranda K. M., Espey M. G., Wink D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite // *Nitric oxide*. 2001. V. 5. P. 62-71.
72. Mitra A., Zaman S., Ray S.K., Sinha S., Banerjee K. (2012) Inter-relationship between phytoplankton cell volume and aquatic salinity in Indian sundarbans // *Nat Acad Sci Lett*. 2012. V. 35. P. 485–491.
73. Mobley H. L., Hausinger R. P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization // *Microbiol Rev*. 1989. V. 53. P. 85-108.
74. Mulvenna P. F., Savidge G. A modified manual method for the determination of urea in seawater using diacetylmonoxime reagent // *Estuar Coast Shelf S*. 1992. V. 34. P. 429-438.
75. Olenina I., Vaičiukynas E., Šulčius S., Paškauskas R., Verikas A., Gelžinis A., Bačauskienė M., Bertašiūtė V., Olenin S. The dinoflagellate *Prorocentrum cordatum* at the edge of the salinity tolerance: the growth is slower but cells are larger // *Estuar Coast Shelf S*. 2016. V. 168. P. 71-79.
76. Olenina I., Wasmund N., Hajdu S., Jurgensone I., Gromisz S., Kownacka J., Toming K., Vaiciute D., Olenin S. (2010) Assessing impacts of invasive phytoplankton: The Baltic Sea case // *Mar Pollut Bull*. 2010. V. 60. P. 1691–1700.
77. Ou L., Lundgren V., Lu S., Granéli E. The effect of riverine dissolved organic matter and other nitrogen forms on the growth and physiology of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller // *J Sea Res*. 2014. V. 85. P. 499–507.

78. Pertola S., Faust M. A., Kuosa H. Survey on germination and species composition of dinoflagellates from ballast tanks and recent sediments in ports on the South Coast of Finland, North-Eastern Baltic Sea // *Mar Pollut Bull.* 2006. V. 52. P. 900-911.
79. Pertola S., Faust M.A., Kuosa H., Hällfors G. Morphology of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) in the Baltic Sea and in Chesapeake Bay: comparison of cell shapes and thecal ornamentation // *Bot Mar.* 2003. V. 46. P. 477–486.
80. Pertola S., Kuosa H., Olsonen R. Is the invasion of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) related to the nitrogen enrichment of the Baltic Sea? // *Harmful Algae.* 2005. V. 4. P. 481–492.
81. Pfeiffer S. E., Tolmach L. J. RNA synthesis in synchronously growing populations of HeLa S3 cells. I. Rate of total RNA synthesis and its relationship to DNA synthesis // *J Cell Physio.* 1968. V. 71. P. 77-93.
82. Pozdnyakov I., Skarlato S. Dinoflagellate amphiesma at different stages of the life cycle // *Protistology.* 2012. V. 7. P. 108-115.
83. Raven J. A. A cost-benefit analysis of photon absorption by photosynthetic unicells // *New Phytol.* 1984. V. 98. P. 593-625.
84. Revilla M., Alexander J., Glibert P. M. Urea analysis in coastal waters: comparison of enzymatic and direct methods // *Limnol Oceanogr: Methods.* 2005. V. 3. P. 290-299.
85. Röder K., Hantzsche F.M., Gebühr C., Miene C., Helbig T., Krock B., Hoppenrath M., Luckas B., Gerdts G. Effects of salinity, temperature and nutrients on growth, cellular characteristics and yessotoxin production of *Protoceratium reticulatum* // *Harmful Algae.* 2012. V. 15. P. 59-70.
86. Saba G.K., Steinberg D.K., Bronk D.A., Place A.R. The effects of harmful algal species and food concentration on zooplankton grazer production of dissolved organic matter and inorganic nutrients // *Harmful Algae.* V. 10. P. 291–303.
87. Sathyendranath, S., Platt, T., Stuart, V., Irwin, B. D., Veldhuis, M. J.W., Kraay, G.W. and Harrison, W. G. Some bio-optical characteristics of phytoplankton in the NW Indian Ocean // *Mar Ecol Prog.* 1996. V. 132. P. 299–311.
88. Schneider C. A.; Rasband W. S., Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nature methods.* 2012. V. 9. P. 671-675.
89. Schnepf E., Elbrächter M. Dinophyte chloroplasts and phylogeny - A review // *Grana.* 1999. V. 38. P. 81-97.

90. Sildever S., Andersen T. J., Ribeiro S., Ellegaard M. Influence of surface salinity gradient on dinoflagellate cyst community structure, abundance and morphology in the Baltic Sea, Kattegat and Skagerrak // *Estuar Coast Shelf S.* 2015. V. 155. P. 1–7.
91. Solomon C. M., Glibert P. M. Urease activity in five phytoplankton species // *Aquat Microb Ecol.* 2008. V. 52. P. 149-157.
92. Stoecker D.K. Mixotrophy among Dinoflagellates // *J Eukaryot Microbiol.* 1999. V. 46. P. 397-401.
93. Stuart, V., Sathyendranath, S., Platt, T., Maass, H. and Irwin, B. D. Pigments and species composition of natural phytoplankton populations: effect on the absorption spectra // *J Plankton Res.* 1998. V. 20. P. 187–217.
94. Telesh I. V., Schubert H., Skarlato S. O. Ecological niche partitioning of the invasive dinoflagellate *Prorocentrum minimum* and its native congeners in the Baltic Sea // *Harmful Algae.* 2016. V. 59. P. 100-111.
95. Tyler M. A., Seliger H. H. Selection for a red tide organism: physiological responses to the physical environment // *Limnol Oceanogr.* 1981. V. 26. P. 310-324.
96. Utting S. D. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance // *Aquaculture Engineering.* 1985. V. 4. P. 175-190.
97. Voss M., Deutsch, B. Elmgren R., Humborg C., Kuuppo P., Pastuszak M., Rolff C., Schulte U., 2006. Source identification of nitrate by means of isotopic tracers in the Baltic Sea catchments // *Biogeosciences Discuss.* 2006. V. 3. P. 475-511.
98. Voss M., Dippner J.W., Humborg C., Hürdler J., Korth F., Neumann T., Schernewski G., Venohr M. History and scenarios of future development of Baltic Sea eutrophication // *Estuar Coast Shelf S.* 2011. V. 92. P. 307–322.
99. Waal D. B., Eberlein T., Bublitz Y., John U., Rost B. Shake it easy: a gently mixed continuous culture system for dinoflagellates // *J Plankton Res.* 2014. V. 36. P. 889–894.
100. Waite A. et al. Sinking rate versus cell volume relationships illuminate sinking rate control mechanisms in marine diatoms // *Mar Ecol Prog Ser* 1997. V. 157. P. 97-108.
101. Wasmund N., Göbel J., Bodungen B. V. 100-years-changes in the phytoplankton community of Kiel Bight (Baltic Sea) // *J Marine Syst.* 2008. V. 73. P. 300–322.

102. Witek B., Plinski M. The first recorded bloom of *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller in the coastal zone of the Gulf of Gdansk // *Oceanologia*. 2000. V. 42. P. 29–36.
103. Yoon H. S., Hackett J. D., Bhattacharya D. A single origin of the peridinin- and fucoxanthin-containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis // *PNAS*. 2002. V. 99. P. 11724-11729.
104. Zehr J. P., Kudela R. M. Nitrogen Cycle of the Open Ocean: From Genes to Ecosystems // *Ann Rev Mar Sci*. 2011. V. 3. P. 197-225.
105. Матанцева О.В., Скарлато С. О. Миксотрофия у микроорганизмов: экологические и цитофизиологические аспекты // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2013. Т. 49. С. 245-254.

## Приложение

**Таблица 1.** Праймеры к 18S РНК динофлагеллят (Lin et al., 2006)

Dino18SR1	5' - GAGCCAGATRCDCACCCA - 3'
Dino18SR2	5' - TGCTTTCGCAGTAGTYGTCTTTAAC - 3'
18ScomF1	5' - GCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGC - 3'

**Таблица 2.** Праймеры к  $\alpha$ -тубулину и малатдегидрогеназе (Gou and Ki, 2012)

TUA F	5' - GCGTGCTGCATGATGTATCGTG - 3'
TUA R	5' - ATCCGGTAGGGCACCAATCAAC - 3'
MDH F	5' - CGGAGTTGCCATATCTTGCGTC - 3'
MDH R	5' - TTCAAGCCAGCGTCGATCTC - 3'

**Таблица 3.** Праймеры к транспортеру мочевины DUR3

DUR3F1	5' - CCTTCATCTTCTTCTGCCTGC - 3'
DUR3R1	5' - ACAGGATCACGCCCCAC - 3'
DUR3F2	5' - GCAACTGGCGATCAGATTCTC - 3'
DUR3R2	5' - GTCCACAGGGGCACCAC - 3'
DUR3F3	5' - TCGGCGAGATCACGGTG - 3'
DUR3R3	5' - CAGACTGGTCGTTCTCCATC - 3'
DUR3F4	5' - GTGTA CTGGACAAGACCGC - 3'
DUR3R4	5' - CACTGCGACACAATGACCGAC - 3'
DUR3F5	5' - CACCGTGTTCTGTGGACCAGTC - 3'
DUR3R5	5' - GAACCACACCAAGCCGCC - 3'
DUR3F6	5' - CAGCAAAACGCCTCGTCCATAC - 3'
DUR3R6	5' - CCGTCCCCAGGAGGAGTAG - 3'

**Таблица 4.** Праймеры к транспортеру нитрата NRT1.1

NRT1.1F1	5' - CCTGGGATACTCCGTGTCTG - 3'
NRT1.1R1	5' - CAAAGCCGCCACCGTG - 3'
NRT1.1F2	5' - CGTCTCTCTCCTGGTTCTACCTCG - 3'
NRT1.1R2	5' - GTGGGATGCGTGCGGTAGTG - 3'
NRT1.1F6	5' - CTCCA ACTTCGGAGCGGAC - 3'
NRT1.1R6	5' - GAT GCG TGC GGT AGT GC - 3'

**Таблица 5.** Праймеры к транспортеру нитрата NRT2.1

NRT2.1F1	5' - CGAAGTCCTCCCTAAGTGCG - 3'
NRT2.1R1	5' - GCACAAAGATCGTGATGCCGAC - 3'
NRT2.1F5	5' - CATTGGGCGGCATCTTCAGC - 3'
NRT2.1R5	5' - CATGGCTGCGAGTTCTCCAC - 3'
NRT2.1F6	5' - CGTTTGGGACGAGAGTTGTG - 3'
NRT2.1R6	5' - GATCGTGATGCCGACCGAC - 3'