

УДК 582.26

ОЦЕНКА РАЗНООБРАЗИЯ ВИДОВ РОДА *PSEUDO-NITZSCHIA* H. PERAGALLO, 1900 (BACILLARIOPHYTA) В ПЛАНКТОНЕ ВБЛИЗИ КАРАДАГА МЕТОДАМИ МНОГОМЕРНОГО СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

© 2021 г. Н. А. Давидович¹, *, С. Л. Полякова¹

¹Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН – филиал ФГБУН ФИЦ Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского, Феодосия 298188, Россия

*e-mail: nickolaid@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.09.2020 г.

После доработки 11.04.2021 г.

Принята к публикации 22.04.2021 г.

В составе рода *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo, 1900 известно более 50 видов. Семь из них указаны для Черного моря. Из-за высокого морфологического сходства многих представителей принято считать криптовыми, для их надежной идентификации требуется использование разных и зачастую ресурсозатратных методов. Задача исследования состояла в оценке общего количества видов рода *Pseudo-nitzschia*, встречающихся вблизи Карадага (юго-восточный Крым) в период их массового развития весной. Помимо экспертной оценки использованы методы многомерной статистики, которые позволили по простым биометрическим параметрам определить количество видов в пробах и, опираясь на первоначально полученный массив данных, установить видовую принадлежность объектов во вновь отобранных пробах.

Ключевые слова: диатомовые, *Pseudo-nitzschia*, видовое разнообразие, многомерная статистика, кластерный анализ, дискриминантный анализ

DOI: 10.31857/S0134347521060036

Род *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo, 1900 вызывает особый интерес исследователей ввиду токсичности многих его представителей (Trainer et al., 2012; Bates et al., 2018). К настоящему времени в составе этого планктонного исключительно морского рода известно более 50 видов (Guiry & Guiry, 2020). Из них семь видов, включая *P. calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle, *P. delicatissima* (Cleve) Heiden, *P. fraudulenta* (Cleve) Hasle, *P. inflantula* Hasle, *P. pseudodelicatissima* (Hasle) Hasle, *P. pungens* (Grunov et Cleve) Hasle и *P. seriata* (Cleve) Peragallo, указаны для Черного моря (Сеничева, 2002; Рябушко, 2003; Lundholm et al., 2003). До сих пор актуальна проблема распознавания видов этого рода, в том числе с использованием световой микроскопии (Bates et al., 1993; Amato et al., 2007; Lundholm et al., 2012, и др.). Многих представителей рода принято считать криптовыми из-за их высокого морфологического сходства; за привычными названиями видов скрываются видовые комплексы (Lundholm et al., 2012). Но в гидробиологической практике часто требуется быстро и с приемлемой надежностью ответить на вопрос о том, сколько видов присутствует в пробе.

Задача настоящего исследования состояла в определении количества видов рода *Pseudo-nitzschia* в период массового развития этих водорослей в планктоне вблизи Карадага (юго-восточное побережье Крымского полуострова). Для этого кроме традиционной экспертной оценки мы применили методы многомерной статистики. В качестве параметров использованы простые биометрические данные (длина, ширина, длина перекрытия клеток в цепочке). При этом была проверена возможность идентификации видов по перечисленным параметрам, но для другого периода наблюдений с использованием первоначально полученного массива данных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Планктонные пробы отбирали еженедельно в апреле–мае 2020 и 2021 гг. с причала Карадагской научной станции (44°54'40" N, 35°12'11" E) при помощи малой планктонной сети Джели (ячей 74 мкм). Измеряли длину (апикальный размер) и ширину клеток (трансапикальный размер), а также длину перекрытия (наложения) клеток в цепочке, используя для этого инвертированный световой

Таблица 1. Некоторые биометрические показатели* видов рода *Pseudo-nitzschia* в исследованных пробах

Кластер	Вид	Число клеток**	Длина клеток, мкм	Ширина клеток, мкм	Перекрытие, мкм	Перекрытие, %
1	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	81	124–158 (138)	2.3–5.1 (4.5)	29.3–33.8 (31.6)	19.4–25.5 (22.8)
2	<i>P. calliantha</i>	42	90–146 (108)	3.4–5.1 (3.6)	22.5–25.4 (22.7)	15.4–25.0 (21.4)
3	<i>P. seriata</i>	120	71–112 (96)	5.1 (5.1)	15.2 (15.2)	13.6–21.4 (16.0)
4	<i>P. pseudodelicatissima</i>	576	56–153 (97)	2.3 (2.3)	6.8–18 (11.4)	6.5–21.1 (12.0)

*Указаны диапазоны значений и в скобках средние значения.

**Разделение выполнено по результатам кластерного анализа.

микроскоп Nib-100 (Китай) с длиннофокусными объективами увеличением $\times 20$, $\times 40$ и $\times 50$, а также откалиброванной окулярной линейкой с ценой деления соответственно 5.07, 2.53 и 2.25 мкм. Одиночные клетки игнорировали. Полученную матрицу данных обрабатывали с помощью программы Past 4.02 (Hammer et al., 2001; <http://folk.uio.no/ohammer/past/>). В случае иерархического кластерного анализа уровень объединения кластеров выбирали субъективно, руководствуясь наибольшей дистанцией между кластерами, при которой определялось разумное количество видов. Использован алгоритм невзвешенного парно-группового среднего. В качестве индекса сходства применяли евклидово расстояние. Для анализа главных компонент и дискриминантного анализа использованы значения переменных, нормированные по максимальному значению. Объекты с сильно отклоняющимися значениями переменных были исключены из анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего в 2020 и 2021 гг. было измерено соответственно 823 и 482 клетки, относящиеся к роду *Pseudo-nitzschia*. Использование световой микроскопии позволило выделить четыре морфотипа, больше всего различавшихся по ширине и перекрытию клеток (табл. 1). В результате кластеризации для избранных характеристик построена дендрограмма (рис. 1). Распределение объектов на диаграмме рассеяния, полученной в результате анализа главных компонент (рис. 2), совпадает с разбиением, которое дает кластерный анализ по нормированным значениям этих же признаков. Руководствуясь принадлежностью измеренных нами клеток к четырем кластерам, соотносящимся с четырьмя видами (табл. 1), выполнен дискриминантный анализ для весенних проб 2020 г. (рис. 3а). Показана высокая степень дискриминации объектов. На основании полученной матрицы значений дискриминантный анализ позволил

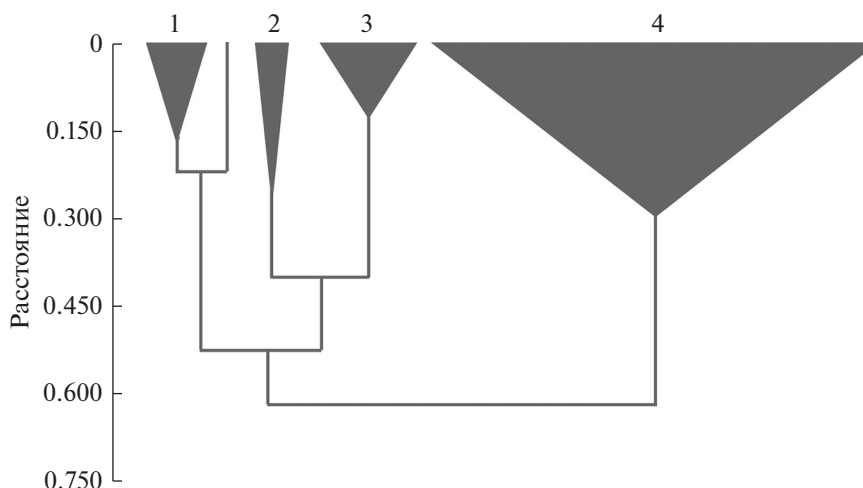


Рис. 1. Дендрограмма иерархической кластеризации клеток *Pseudo-nitzschia* по нормированным значениям длины, величины перекрытия и ширины клеток. Кластеры с малыми расстояниями агрегированы. Под номерами кластеры: 1 – широкие клетки с большим перекрытием (на рис. 2 и 3 – треугольники), 2 – клетки с промежуточным значением признаков (на рис. 2 и 3 – незаштрихованные окружности), 3 – широкие клетки со сравнительно небольшим перекрытием (на рис. 2 и 3 – косые крестики), 4 – клетки с наименьшим перекрытием (на рис. 2 и 3 – заштрихованные окружности).

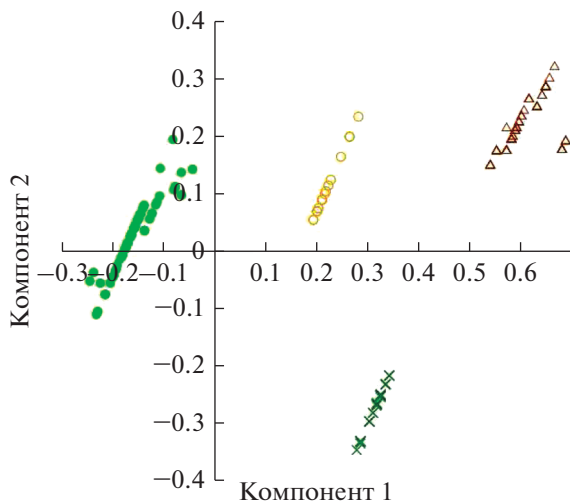


Рис. 2. Диаграмма рассеяния, полученная в результате анализа главных компонент по нормированным значениям трех параметров. Первая главная компонента объясняет 75%, вторая – 18% общей дисперсии.

установить принадлежность объектов во вновь отобранных пробах весной 2021 г. (рис. 3б).

Процедура кластерного анализа к настоящему времени достаточно хорошо разработана с точки

зрения математики и реализована во многих программных пакетах обработки данных (Hammer et al., 2001; Шитиков, Мاستицкий, 2017). Одна из основных проблем кластеризации – интерпретация полученных результатов, а именно определение того порогового уровня объединения, который бы позволил установить, какое количество групп на самом деле присутствует в изучаемой выборке. Несмотря на наличие формальных подходов, облегчающих определение предпочтительного числа кластеров (Milligan, Cooper, 1985), общепринятого окончательного решения пока не найдено.

В нашем случае в зависимости от набора используемых при анализе признаков в пробах определяется присутствие трех или четырех основных групп. Следует обратить внимание на то, что из-за доступной точности измерений получено только четыре значения для ширины клеток, поэтому, учитывая такую ступенчатую градацию, большее доверие вызывают параметры длины клеток и длины перекрытия клеток. Последняя характеристика служит важным таксономическим признаком при идентификации представителей рода *Pseudo-nitzschia* (см.: Skov et al., 1999). Анализ главных компонент по нормированным значениям длины клеток, длины перекрытия и

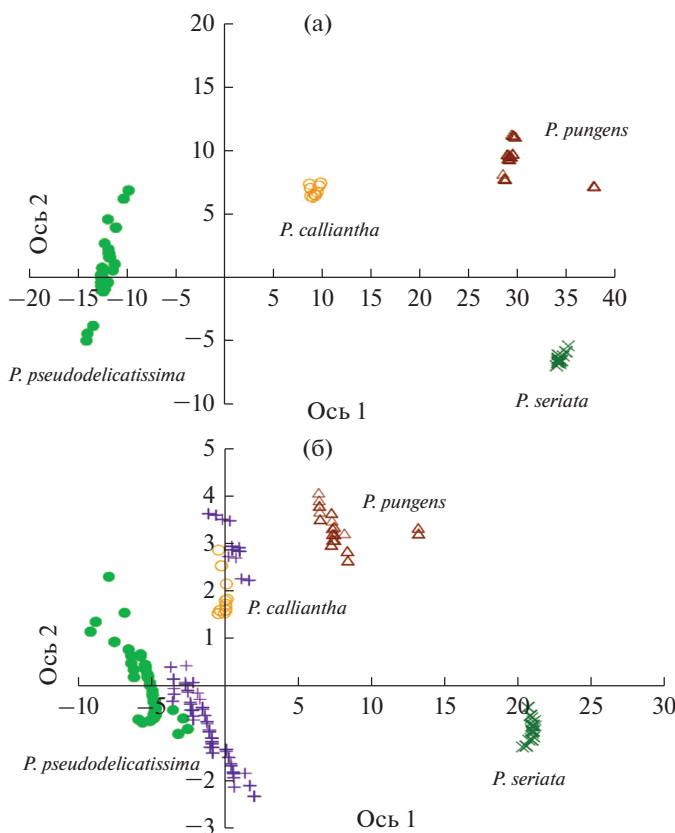


Рис. 3. Результат дискриминантного анализа по трем параметрам: а – весна 2020 г., б – весна 2021 г.; “+” – вновь выявленные объекты.

ширины клеток достаточно непротиворечиво разделяет объекты по четырем группам (морфотипам) (табл. 1). По результатам выполненных ранее исследований известно, что в планктоне в районе Карадага обычно присутствуют *P. calliantha* и *P. pungens* (Полякова, Давидович, 2019). Самые тонкие клетки (шириной менее 3 мкм) с коротким перекрытием мы идентифицировали как *P. pseudodelicatissima*. На основании морфологических и биометрических критериев можно предположить, что последний кластер, вероятнее всего, представлен видом *P. seriata*.

Важным преимуществом проведенного анализа является возможность статистической оценки, благодаря которой можно выявить объекты с отклоняющимися характеристиками и оценить степень этих отклонений. Кроме того, дискриминантный анализ позволяет обоснованно отнести новые объекты к одной из уже выявленных групп. Так, установлено, что во вновь отобранных весной 2021 г. пробах присутствовали два вида, которые по биометрическим характеристикам были ближе всего к *P. calliantha* и *P. pseudodelicatissima* (рис. 3б).

Полученный массив значений биометрических параметров, “привязанный” к конкретным надежно идентифицированным объектам, в дальнейшем будет служить основой для мониторинга видового разнообразия и видового состава рода *Pseudo-nitzschia*.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках госзадания КНС–ПЗ РАН филиала ФГБУН ФИЦ ИнБЮМ “Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов”, номер гос. регистрации 121032300019-0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Полякова С.Л., Давидович Н.А. Динамика численности и размерное распределение клеток токсикогенных видов из рода *Pseudo-nitzschia* у берегов Карадага (район Биостанции) // *Вопр. соврем. альгологии*. 2019. № 2(20). С. 64–68.

Рябушко Л.И. Атлас токсичных микроводорослей Черного и Азовского морей. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2003. 140 с.

Сеничева М.И. Новые и редкие для Черного моря виды диатомовых и динофитовых водорослей // *Экол. моря*. 2002. Вып. 62. С. 25–29.

Шутиков В.К., Маслицкий С.Э. Классификация, регрессия, алгоритмы Data Mining с использованием R. 2017. [Электронный ресурс] <https://github.com/ranalytics/data-mining>. Дата обращения 05 августа 2020.

Amato A., Kooistra W.H.C.F., Levaldi Ghiron J.H. et al. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms // *Protist*. 2007. V. 158. № 2. P. 193–207.

Bates S.S., Hubbard K.A., Lundholm N. et al. *Pseudo-nitzschia*, *Nitzschia*, and domoic acid: New research since 2011 // *Harmful Algae*. 2018. V. 79. P. 3–43.

Bates S.S., Léger C., Keafer B.A., Anderson D.M. Discrimination between domoic-acid-producing and nontoxic forms of the diatom *Pseudo-nitzschia pungens* using immunofluorescence // *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* 1993. V. 100. P. 185–195.

Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication. National University of Ireland. Galway. <http://www.algaebase.org>. Searched August 5, 2020.

Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // *Palaeontol. Electron.* 2001. V. 4, issue 1. Art. 4. 9 p. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm. Searched August 5, 2020.

Lundholm N., Bates S.S., Baugh K.A. et al. Cryptic and pseudo-cryptic diversity in diatoms – with descriptions of *Pseudo-nitzschia hasleana* sp. nov. and *P. fryxelliana* sp. nov. // *J. Phycol.* 2012. V. 48. № 2. P. 436–454.

Lundholm N., Moestrup Ø., Hasle G.R., Hoef-Emden K. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/cuspidata* complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*? // *J. Phycol.* 2003. V. 39. № 4. P. 797–813.

Milligan G.W., Cooper M.C. An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set // *Psychometrika*. 1985. V. 50. № 2. P. 159–179.

Skov J., Lundholm N., Moestrup Ø., Larsen J. Potentially toxic phytoplankton. 4. The diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Diatomophyceae/Bacillariophyceae) // *ICES Identification Leaflets for Plankton*. 1999. № 185. P. 1–23.

Trainer V.L., Bates S.S., Lundholm N. et al. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health // *Harmful Algae*. 2012. V. 14. P. 271–300.

**Assessment of the Species Diversity of the Genus *Pseudo-nitzschia*
H. Peragallo, 1900 (Bacillariophyta) in Plankton near Karadag
Using Multidimensional Statistical Analysis**

N. A. Davidovich^a and S. L. Polyakova^a

^a*T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve, Russian Academy of Sciences, Branch of A.O. Kovalevsky
Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Feodosia 298188, Russia*

More than 50 species are known in the genus *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo, 1900. Seven of them were recorded in the Black Sea. Due to the high morphological similarity, many representatives of the genus are considered to be cryptic; their reliable identification requires the use of different, often very resource-consuming methods. The aim of this study was to estimate the total number of *Pseudo-nitzschia* species occurring near Karadag (southeastern Crimea) during the period of their mass development in spring. In addition to expert assessment, we used multivariate statistics methods, which allowed an estimation of the number of species in samples based on simple biometric parameters. Using the initially obtained array of data, it was possible to determine the species identity of objects in newly collected samples.

Keywords: diatoms, *Pseudo-nitzschia*, species diversity, multivariate statistics, cluster analysis, discriminant analysis