

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA*, ШТАММ IBSS-2

Лантушенко А.О.¹, Мегер Я.В.¹, Шаповалова В.Е.¹, Дегтяр И.В.¹, Синченко А.В.¹,
Боровков А.Б.²

¹ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, РФ; e-mail: lantushenko@mail.ru

² ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, РФ

Поступила в редакцию: 18.08.2021

Аннотация. *Dunaliella* – род микроводорослей, развивающихся в гипергалинных водоемах. Существовать в таких условиях им позволяет высокая концентрация β -каротина и глицерола, выполняющих протекторные функции. Высокое накопление этих биологически активных веществ обуславливает перспективность использования *D. salina* в биотехнологии. Одним из наиболее перспективных с этой точки зрения штаммов коллекции IBSS -2 из ЦКП "Коллекция гидробионтов Мирового океана" ФИЦ ИнБЮМ был изучен с целью уточнения его таксономического статуса. Филогенетический анализ показал высокую степень гомологии с *D. salina* CCAP 19/31, что позволяет отнести исследованный изолят к виду *Dunaliella salina*.

Ключевые слова: гидробионты, молекулярно-генетический анализ, филогения, *Dunaliella salina*.

ВВЕДЕНИЕ

Dunaliella – род водорослей с высоким экономическим потенциалом по причине продукции большого количества биологически активных веществ, таких как β -каротин, глицерол и др [1]. *Dunaliella salina* – вид, обитающий в гиперсоленых озерах, из-за чего обладает уникальными свойствами – выдерживает широкий диапазон различных абиотических факторов, в том числе общей солености, температуры и освещённости [2]. Эта особенность вызывает интерес к данному объекту и как к модельному организму для изучения устойчивости к различным факторам, так и для его использования в промышленности для получения натуральных биологически активных веществ.

Dunaliella не имеет жесткой клеточной стенки и имеет пластичную клеточную мембрану, способную быстро менять форму в ответ на изменяющиеся факторы среды, что обуславливает интересующие исследователей свойства водоросли. При этом размер клеток настолько сильно колеблется от внешних условий, что не позволяет морфометрически определить видопринадлежность с достаточной степенью достоверности, поскольку внутривидовая изменчивость в зависимости от условий на протяжении всего периода культивирования превосходит межвидовую [3].

Генотипирование в настоящее время считается обязательным для классификации видов рода *Dunaliella*, при этом рибосомальные маркеры ITS предпочтительны в большинстве случаев для филогенетического анализа. Подбор подходящих молекулярных маркеров необходим для точной идентификации вида в изоляте и определения более ценных штаммов, которые продуцируют большее количество, например, 9-цис- β -каротина, который является более ценным, чем его изомер транс- β -каротин [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали культуру зелёной микроводоросли *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco, 1905; штамм IBSS-2 из ЦКП "Коллекция гидробионтов Мирового океана" ФИЦ ИнБЮМ.

Предварительная оценка чистоты и целостности культуры осуществлялась микроскопически, использовалось увеличение $\times 1000$ (рис. 1).

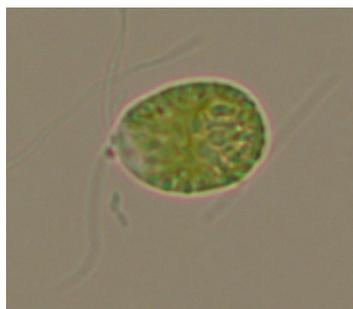


Рисунок 1. Микрофотография исследованной культуры *Dunaliella salina*, увеличение $\times 1000$

Таблица 1. Характеристики праймеров

Название праймера	Целевой участок	Последовательность олигонуклеотида (5'-3')	Размер продукта	Температура отжига	Условия ПЦР реакции	Источник
ITS1	ITS1, 5,8 S рРНК и ITS2	ААТСТАТСААТААССА САССГ	678 п.н.	52 С	В тексте	(Preetha et al., 2012)
ITS4		ТТТСАТТСГССАТТАС ТААГГ				

Для уточнения таксономического статуса используемой в эксперименте культуры был проведен филогенетический анализ с использованием внутреннего транскрибируемого спейсера ITS (ITS1, 5,8 S рРНК и ITS2). Исследования проводились в ЦКП «Молекулярная структура вещества» СевГУ.

Выделение ДНК осуществляли с помощью набора реактивов ДНК-Экстран 2 (Синтол, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Количественное определение полученной геномной ДНК и оценку ее чистоты проводили на нанофотометре InPlex (Германия) и с помощью гель-электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

Внутренняя транскрибированная область спейсера (ITS) (700 bp), включающая ITS1, 5,8 S рРНК и ITS2, была амплифицирована с использованием праймеров ITS1, ITS4 [4]. Последовательность праймеров приведены в таблице 1. Условия ПЦР следующие: Предварительная денатурация при 94 С в течение 3 минут. Далее 34 цикла из денатурации при 94 С в течение 30 секунд, отжига праймеров при 60 С в течении 30 секунд и элонгации при 72 С в течении 60 секунд. После окончания – финальная элонгация при 72 С в течении 10 минут.

Реакция секвенирования проводилась в объеме 10 мкл с использованием набора реактивов BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Очистка продуктов секвенирования производилась с помощью EDTA и этилового спирта. Капиллярный электрофорез производился на устройстве секвенирования НАНОФОР-05 с использованием полимера ПДМА-6 в режиме секвенирования с рекомендуемыми производителем параметрами. Бэйсколинг производился с помощью программ встроенного бэйсколлера «ДНК Анализ» (Синтол).

Полученную нуклеотидную последовательность использовали для филогенетического анализа. Поиск ближайших гомологов проводили при помощи программы BLAST в базе данных GenBank NCBI. Множественное выравнивание осуществляли с использованием алгоритма Muscle, филогенетический анализ проводили по эволюционной модели замещения GTR с гамма-распределенным изменением скорости между участками и долей неизменных участков моделированием цепи Маркова методом Монте-Карло на основании 200 тысяч генераций в интерфейсе MrBayes [5]. В качестве внешней группы использовали последовательности *Yamagishiella unicosca* strain UTEX2431 (код Genbank AF375785.1) и *Chlamydomonas reinhardtii* (AB511842.1). Конечная визуализация производилась инструментами Figtree.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате реакции ПЦР были получены амплифицированные продукты, длина которых составила порядка 700 п.н. После очистки продуктов ПЦР электрофорез в агарозном геле показал однородность продуктов без следов неспецифического связывания (рис. 2).

Концентрация продуктов ПЦР была вычислена спектрофотометрически, спектры поглощения показаны на рисунке 3.

В результате секвенирования и бэйсколинга были получены нуклеотидные фрагменты длиной 678 п.н. с высокой степенью достоверности. Фрагмент электрофореграммы представлен на рисунке 4. Таксономический статус штамма IBSS-2 проверяли путем реконструкции филогенетических связей с использованием метода Байеса. Для анализа использовали нуклеотидную последовательность ITS1, 5,8 S рРНК и ITS2, полученное филогенетическое дерево представлено на рисунке 5.

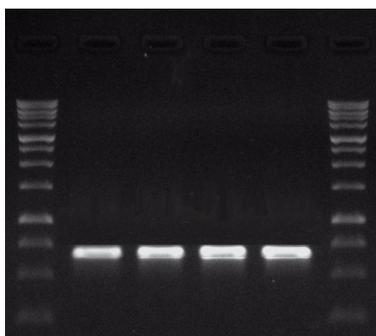


Рисунок 2. Визуализация электрофореза очищенных продуктов ПЦР *Dunaliella salina* IBSS-2 участка ITS в четырех технических повторностях

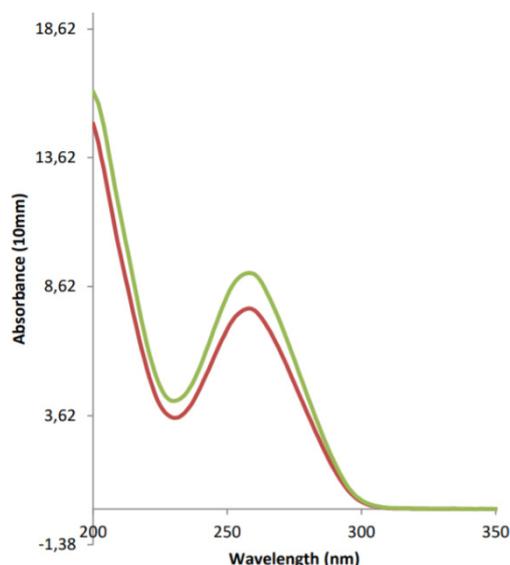


Рисунок 3. Спектр поглощения очищенных продуктов ПЦР *D. salina* IBSS-2

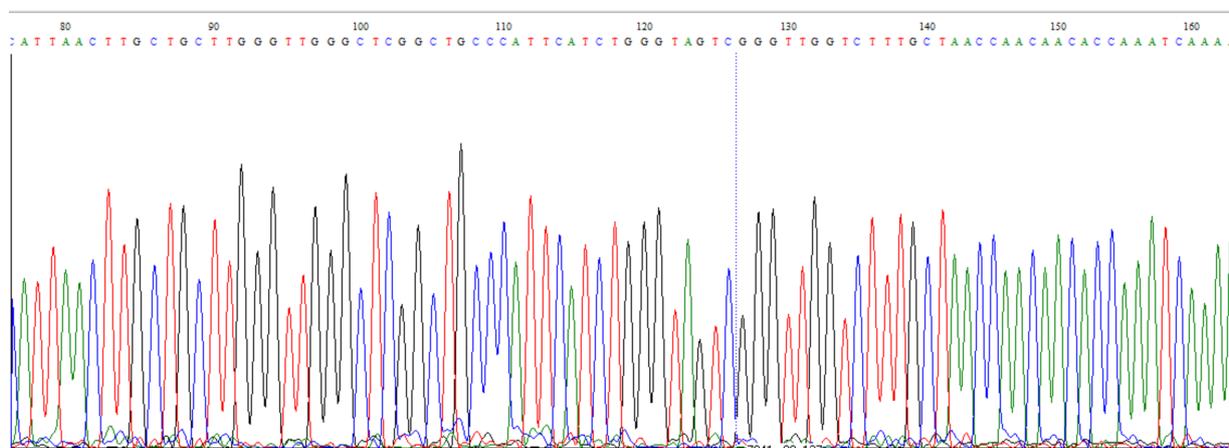


Рисунок 4. Фрагмент электрофореграммы секвенированного участка последовательности ITS1, 5,8 S рРНК и ITS2 штамма *Dunaliella Salina* IBSS-2

Исследованный в данной работе штамм IBSS-2 образует кладу с группой, в которой находятся несколько разных видов *Dunaliella*, но вместе с тем имеющих идентичные ITS последовательности. Важно отметить, что в этой же клade находится *D. salina* CСAP 19/31 [6].

ОБСУЖДЕНИЕ

С точки зрения систематики в роде *Dunaliella* различают четыре секции: секция *Tertiolectae*, которые не накапливают каротины и растут при оптимальной солености <6% NaCl; секция *Dunaliella*, которые способны накапливать каротины; секция *Virides* – всегда зеленые и радиально симметричные; и *Peirceinae*, также всегда зеленые, но клетки двусторонне симметричны. В настоящее время в пределах секции *Dunaliella* различают виды: *D. salina*, *D. parva* и *D. pseudosalina*, а также *D. bardawil*. Было обнаружено, что *Dunaliella salina* способна переносить соленость примерно 5,5 М NaCl [7]. Важно отметить, что морфологическая идентификация вида может быть неоднозначна, поскольку форма клеток может значительно варьировать в зависимости от различных условий среды. Для идентификации этих видов водорослей был предложен ряд молекулярных маркеров: LSU rDNA, ITS, *gbcL* и *tufA* [3,4,8], однако большинство исследователей сходятся во мнении, что наиболее подходящим является внутренний транскрибируемый спейсер ITS. Поэтому для филогенетического анализа в данной работе использовалась последовательность ITS1, 5,8 S рРНК и ITS2.

Исследованный штамм IBSS-2 вместе с *D. salina* CСAP 19/31 образует кладу с группой, в которую входят также и другие виды *Dunaliella*, однако имеющие идентичные ITS последовательности. Результаты филогенетического анализа, таким образом, не достаточно однозначны, но, данная ситуация является до сих пор не решенной научной проблемой в описании рода *Dunaliella*, на которую указывают многие исследователи [3,4,8]. Как отмечают авторы недавно вышедшего обзора [9], систематика видов в пределах рода *Dunaliella* все еще находится в движении, и вопрос о разграничении новых видов или даже подвидов до сих пор не решен. Один

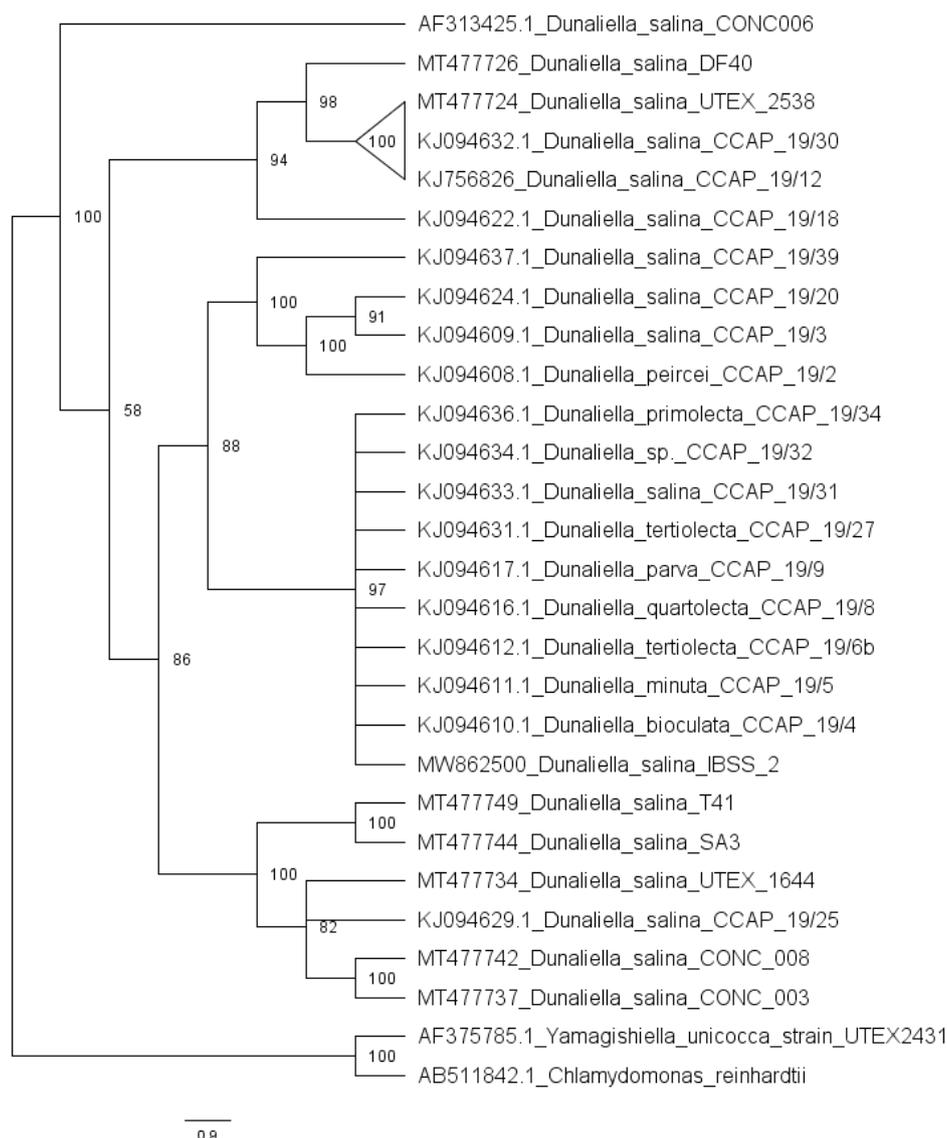


Рисунок 5. Филогенетическое дерево по эволюционной модели замещения GTR с гамма-распределенным изменением скорости между участками и долей неизменных участков моделированием цепи Маркова методом Монте-Карло на основании 200 тысяч генераций. Визуализация данных в FigTree v 1.4.4

из вариантов решения проблемы, используемый многими авторами [3,9] – комплексный подход, основанный на морфологическом, физиологическом и таксономическом анализе, который и был использован в данной работе. На протяжении последних десятилетий сотрудниками ИнБИОМ проводились многочисленные исследования морфологических и физиологических характеристик этого вида при культивировании в лабораторных фотобиореакторах и полупромышленных бассейнах в различных условиях среды [10,11]. Результаты по реакции на стрессовые воздействия, полученные в проведенных ранее исследованиях, в частности накопление каротиноидов до 8% ОВ, а также наличие в кладе исследованного штамма вида *D. salina* CCAP 19/31 (рис. 5) позволяют отнести исследованный штамм к виду *Dunaliella salina*.

Работа выполнена в рамках внутреннего гранта СевГУ на 2021 г. «Изучение молекулярно-генетических механизмов увеличения продуктивности промышленно значимых культур», идентификатор 30/06-31 и темы № 121030300149-0 ФИЦ ИнБИОМ «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса».

Список литературы / References:

1. Масюк Н.П. *Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода Dunaliella Teod.* К.: Наукова думка, 1973, 244 с. [Masyuk N.P. *Morphology, taxonomy, ecology, geographical distribution of the genus Dunaliella Teod.* K.: Naukova Dumka, 1973, 244 p. (In Russ.)]
2. Боровков А.Б. Зеленая микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. (обзор). *Экология моря*, 2005, т. 67, с. 5-17. [Borovkov A.B. Green microalgae *Dunaliella salina* Teod. (overview). *Ecology of the sea*, 2005, vol. 67, pp. 5-17. (In Russ.)]

3. Highfield A., Ward A., Pipe R., Schroeder D. Molecular and phylogenetic analysis reveals new diversity of *Dunaliella salina* from hypersaline environments. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2021, vol. 101, no. 1, pp. 27-37. doi: 10.1017/S0025315420001319
4. Preetha K., John L., Subin C.S., Vijayan K.K. Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (Chlorophyta) from Indian salinas and their diversity. *Aquat. Biosyst.*, 2012, vol. 8, no. 27. doi: 10.1186/2046-9063-8-27
5. Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 2001, vol. 17, pp. 754-755.
6. Emami K., Hack E., Nelson A., Brain C.M., Lyne F.M., Mesbahi E., Day J.G., Caldwell G.S. Proteomic-based biotyping reveals hidden diversity within a microalgae culture collection: *An example using Dunaliella*, 2015. doi: 10.1038/srep10036
7. Ben-Amotz A. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta). *J. Plant. Physiol.*, 1987, vol. 131, pp. 479-487.
8. Assuncao P., Jaen-Molina R., Caujape-Castells J., de la Jara A., Carmona L., Freijanes K., Mendoza H. Molecular taxonomy of *Dunaliella* (Chlorophyceae), with a special focus on *D. salina*: ITS2 sequences revisited with an extensive geographical sampling. *Aquat. Biosyst.*, 2012, vol. 8, no. 2. doi: 10.1186/2046-9063-8-2
9. Polle J.E.W., Jin E.S., Ben-Amotz A. The alga *Dunaliella* revisited: Looking back and moving forward with model and production organisms. *Algal Res.*, 2020. doi: 10.1016/j.algal.2020.101948
10. Гудвилевич И.Н., Боровков А.Б. Аprobация двухстадийного культивирования *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) в Севастопольском регионе. *Юг России: экология, развитие*, 2019, т. 14, № 2, с. 211-220. [Goodvilovich I.N., Borovkov A.B. Approbation of two-stage cultivation of *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) in the Sevastopol region. *South of Russia: ecology, development*, 2019, vol. 14, no. 2, pp. 211-220. (In Russ.)] doi: 10.18470/1992-1098-2019-2-211-220
11. Borovkov A.B., Gudvilovich I.N., Avsiyan A.L. Scale-up of *Dunaliella salina* cultivation: from strain selection to open ponds. *Journal of Applied Phycology*, 2020, vol. 32, iss. 3, pp. 1545-1558.

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF DUNALIELLA SALINA, STRAIN IBSS-2

Lantushenko A.O.¹, Meger Ya.V.¹, Shapovalova V.E.¹, Degtyar I.V.¹, Sinchenko A.V.¹, Borovkov A.B.²

¹ Sevastopol State University

Sevastopol, Russia; e-mail: lantushenko@mail.ru

² Federal Research Center "Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the Russian Academy of Sciences"
Sevastopol, Russia

Abstract. *Dunaliella* is a genus of microalgae that grows in hypersaline ponds. A high concentration of β -carotene and glycerol, which perform protective functions, allows them to exist in such conditions. The high accumulation of these biologically active substances determines the prospects of using *D. salina* in biotechnology. One of the most promising IBSS-2 strain from the common use center "World Ocean hydrobionts collection", was studied in order to clarify its taxonomic status. Phylogenetic analysis showed a high degree of homology with *D. salina* CCAP 19/31, which allows us to attribute the studied isolate to the species *Dunaliella salina*.

Key words: hydrobionts, molecular genetic analysis, phylogeny, *Dunaliella salina*.