Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

• Փորձարարական և տեսական հոդվածներ •Экспериментальные и теоретические статьи •
• Experimental and theoretical articles •

Биолог. журн. Армении, 3 (71), 2019

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ЗЕЛЕНЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *CHLORELLACEAE*

Н.К. КАЛАНТАРЯН

Лаборатория альтернативных источников энергии
Научно-производственный центр "Армбиотехнология" НАН РА

С помощью молекулярно-генетических методов с использованием анализа генов рДНК исследованы лабораторные культуры *Chlorella vulgaris* Pa-001 и *Ch. pyrenoidosa* Pa-002, отобранные из различных образцов водных экосистем. В соответствии с современной систематикой удалось определить истинную видовую принадлежность зеленых одноклеточных микроводорослей, как *Parachlorella kessleri*, обладающих высоким биотехнологическим потенциалом.

Микроводоросли – коллекционные культуры – молекулярно-генетическая идентификация – таксономический статус – филогения

Մոլեկուլային-գենետիկական մեթոդների օգնությամբ և ռԴՆԹ գեների վերլուծության օգտագործմամբ անալիզի են ենթարկվել *Chlorella vulgaris* Pa-001 և *Ch. pyrenoidosa* Pa-002 լաբորատոր կուլտուրաները, որոնք ընտրվել են տարբեր ջրային էկոհամակարգերի նմուշներից: Համաձայն ժամանակակից դասակարգման՝ հաջողվել է որոշել կանաչ միաբջիջ միկրոջրիմուռների իրական տեսակային պատկանելիությունը՝ որպես *Parachlorella kessleri*, որն օժտված է բարձր կենսատեխնոլոգիական պոտենցիալով:

Միկրոջրիմուռներ – կոլեկցիոն կուլտուրաներ – մոլեկուլային-գենետիկական նույնականացում – տաքսոնոմիական կարգավիճակ – ֆիլոգենիա

The laboratory cultures of *Chlorella vulgaris* Pa-001 and *Ch. pyrenoidosa* Pa-002 selected from various samples of aquatic ecosystems have been analyzed by molecular genetic methods and analysis of rDNA genes. In accordance with modern taxonomy, it was possible to determine the true species identity of green unicellular microalgae as *Parachlorella kessleri* with high biotechnological potential.

Microalgae – collection cultures – molecular genetic identification – taxonomic status – phylogeny

Зеленые микроводоросли – обширная группа одноклеточных микроорганизмов, широко распространенная в различных типах пресных и соленых водоемов. Их отличительной особенностью является способность удваивать биомассу за сравнительно короткий период времени и накапливать значительные количества веществ, имеющих значение в жизнедеятельности человека и животных.

Огромное биологическое разнообразие микроводорослей позволяет проводить целевой отбор активных штаммов-продуцентов с заданными свойствами, а

также осуществлять различные генно-инженерные манипуляции с целью повышения их биотехнологического потенциала [11].

Армения, имея уникальные экологические, климатические и географические условия, вместе с тем располагает значительными водными ресурсами. Хорошо известные горячие, теплые и холодные, пресные и минеральные источники, пресноводное озеро Севан, а также щелочноземельные почвы, богатые представителями различных видов микроводорослей. Видовая диагностика одна из ключевых задач в оценке биоразнообразия и экологического мониторинга микроводорослей, заселяющих водные биотопы республики. Точная идентификация служит основой для создания коллекционного фонда культур и дальнейшего фундаментального и практического исследования.

В основе классификации микроводорослей по таксономическим группам заложен ряд морфологических признаков: пигментный и химический состав, строение клеточных оболочек, наличие двигательного аппарата (жгутики, их количество, строение и расположение), содержание питательных веществ и способ размножения. Вместе с тем, виды из таксономически отдалённых групп микроводорослей могут сочетать общие друг для друга характеристики, а разные представители одного и того же вида могут демонстрировать чрезвычайное разнообразие по форме, размеру, структуре, составу и окраске. Известно также, что один и тот же вид может переходить на разные способы размножения в зависимости от окружающих условий.

Таким образом, отсутствие генетического анализа часто приводит к недостоверной и ошибочной таксономической классификации культур, так как известно, что морфологический критерий одноклеточных зачастую не является надежным и позволяет только предварительно диагностировать максимально возможный таксономический статус.

В настоящее время молекулярно-генетические методы анализа применяют во многих фундаментальных и прикладных исследованиях как один из успешных, быстрых и экономически эффективных инструментов оценки биоразнообразия. Зачастую, они являются единственным возможным инструментом в установлении видовой принадлежности у большинства микроводорослей.

С применением молекулярно-генетических инструментов и разработкой эффективных генетических маркеров в идентификации микроводорослей разграничение видов во многих случаях облегчилось. Вместе с тем, оно усложнилось для тех случаев, когда молекулярно-генетические данные несопоставимы с морфологическими признаками. Для микроорганизмов проблема усложнена вследствие их микроскопических размеров. Однако таксономический пересмотр на основе комплексного анализа и с применением генов ядерной рДНК успешно разрешает данную проблему [9].

Основными востребованными генами, использующимися в молекулярной идентификации микроводорослей в зависимости от степени установления таксономического уровня, являются ядерные гены, кодирующие рибосомную РНК (рДНК) (18S рДНК) [3]. Ген 18S рДНК считается самым надёжным молекулярно-генетическим маркёром в дифференциации на родовом уровне. У некоторых видов микроводорослей он позволяет проводить диагностику на видовом и штаммовом уровне. Малая субъединица 18S рДНК интенсивно используется для филогенетического анализа и определения разнообразия фитопланктона не только в коллекциях культур, но и образцах экологических проб [8]. Гены 18S рДНК оказались весьма востребованными в анализе некультивируемых или трудно культивируемых микроводорослей благодаря относительно простому способу выделения их из отдельных клеток, а также широко применяются в метагеномном анализе планктона при оценке экологического состояния окружающей среды.

Несмотря на некоторые недостатки, индивидуальные для определённых таксономических групп микроводорослей, гены рибосомного кластера имеют преимущества по сравнению с другими ядерными, митохондриальными и хлоропластными генами и являются наиболее успешными и востребованными в установлении таксономической принадлежности, количественной оценке видового разнообразия и выявлении эволюционных связей [1, 14].

Лаборатория альтернативных источников энергии НПЦ "Армбиотехнолгия" НАН РА на протяжении длительного времени занимается вопросами всестороннего исследования микроводорослей. В результате этих работ была создана Коллекция культур микроводорослей, отнесенных, согласно морфологическим признакам, к видам *Chlorella, Chlamidomonas, Chlrococcum, Dunaliella, Haematococcus, Scenedesmus, Neochloris, Pandorina, Porphyridium* и др., всего более 30 штаммов.

Вместе с тем, отсутствие уверенности в правильной идентификации указанных видов только на основании морфологических признаков послужило поводом для проведения молекулярно-генетических исследований некоторых штаммов микроводорослей, поддерживаемых в коллекции культур лаборатории.

Материал и методика. В работе использовались идентифицированные на основе морфологических признаков альгологически чистые коллекционные штаммы зеленых одноклеточных микроводорослей *Chlorella vulgaris* штамм Ра-001 и *Ch. pyrenoidosa* штамм Ра-002, представляющие порядок Chlorophyceae, выделенные из различных источников водных экосистем Армении. Культуры микроводорослей выращивали в колбах объемом 250 $см^3$ на жидкой питательной среде Тамия, содержащей макроэлементы (г/л): KNO_3 – 2.0, KH_2PO_4 – 0.3, $MgSO_4$ x $7H_2O$ – 0.3 и микроэлементы (мг/л): $FeSO_4$ x $7H_2O$ – 5.0, $Co(NO_3)_2$ x $6H_2O$ – 0.02, $CuSO_4$ x $5H_2O$ – 0.01, $ZnSO_4$ x $7H_2O$ – 0.04, $MnSO_4$ x $5H_2O$ – 1.0, H_3BO_3 – 0.6, $(NH_4)Mo_7O_{24}$ – 1, ЭДТА – 10.0. pH-7.5, температура культивирования – 24-26^{0}C.

Таксономическое положение культур микроводорослей определяли при помощи молекулярно-генетических методов исследований. Выделение геномной ДНК из клеток микроводорослей проводили в соответствии с протоколом выделения ДНК из растений, грибов и бактерий бензилхлоридным методом, предложенным Zhu *et al*. [16].

Амплификацию последовательностей малой субъединицы проводили при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием пары универсальных эукариотических праймеров для 18S рДНК: прямого F1 (5'-AGCTCGTAGTTGGATTTCTG-3') и обратного R1 (5'-AGTCAAATTAAGCCGCAGGC-3'), синтезированных в "HVD Biotech Vertriebs" Ges.m.b.H (Vienna, Austria). Объем амплифицируемой смеси составлял 50 μл. Амплификацию проводили в термоциклере „DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler" (BIO-RAD) со следующим температурным профилем реакции (табл. 1).

Таблица 1. Температурный профиль

Температура, ^{0}C	**Время**	**Ген**
94	5 мин	18S рДНК
94	30 сек	
55	30 сек	35 циклов
72	90 сек	
72	10 мин	
4	∞	

Полученные в результате ПЦР ампликоны (рис. 1) визуализировали методом горизонтального электрофореза в 1 %-ном агарозном геле в TBE буфере [4].

Секвенирование (секвенатор: ABI PRISM 3730XL Analyzer, 96 capillary type) амплифицированных последовательностей осуществляли с прямыми и обратными праймерами (табл. 2) в лаборатории "Macrogen" Inc. (Южная Корея).

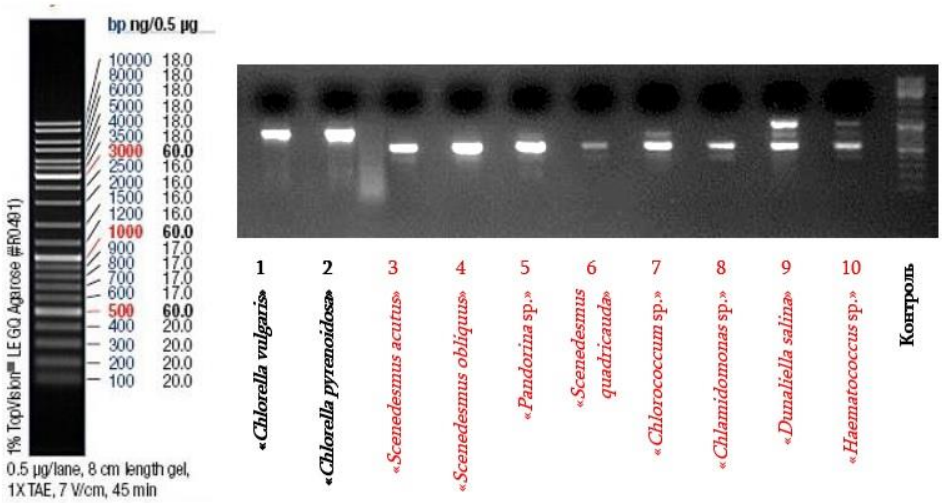

Рис.1. Визуализация ампликонов методом горизонтального электрофореза

Таблица 2. Праймеры, использованные для амплификации и секвенирования ДНК микроводорослей

Название праймера	Сиквенс (5' -> 3')
18F1	AGCTCGTAGTTGGATTTCTG
18R1	AGTCAAATTAAGCCGCAGGC
18SU467F	ATCCAAGGAAGGCAGCAGGC
18SU1310R	CTCCACCAACTAAGAACGGC
P45 (F)	ACCTGGTTGATCCTGCCAGT
P47 (R)	TCTCAGGCTCCCTCTCCGGA
MA1 (F)	CGGGATCCGTAGTCATATGCTTGTCTC
MA2 (R)	CGGAATTCCTTCTGCAGGTTCACC
SS5 (F)	GGTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTG
SS3 (R)	GATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAACC

Хроматограммы, полученные в результате секвенирования, во избежание ошибок и конфликтов визуально оценивали в программах Chromas (v.2.26) и DNA Baser Sequence Assembler (v.4.10). Последовательности, полученные через клонирование, также проверяли на наличие химерных вставок и на положение праймеров. Последовательности полученных фрагментов сопоставлялись с депонированными в GenBank NCBI при помощи алгоритма Blastn [2], позволяющего уточнять видовую принадлежность штаммов, ошибочно идентифицированных морфологически.

Попарное и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей для каждой идентифицируемой культуры проводили согласно алгоритму Clustal W (v.2.26), встроенного в программу MEGA X [10]. Скорректированные p-дистанции рассчитывали согласно выбранным моделям нуклеотидных замен в программе MEGA X. Оптимальные модели нуклеотидных замен выбирали согласно информационному критерию Акаике (AIC) [5, 12].

Филогенетические деревья строили дистанционными методами кластеризации ближайших соседей (Neighbor-Joining, NJ) [13, 15]. Значимость филогенетических реконструкций оценивали параметрическим бутстрэп-анализом (bootstrap analysis) для NJ и ML в 500 реплик [6]. Для укоренения филогенетических деревьев использованы последовательности внешней группы *Chlamydomonas nivalis* GB1.

Результаты и обсуждение. С учетом морфологических, физиологических и культуральных особенностей штаммы микроводорослей из коллекции культур лаборатории предположительно рода *Chlorella* на видовом уровне были идентифицированы как *Ch. vulgaris* и *Ch. pyrenoidosa* (рис. 2).

Согласно собственным микроскопическим наблюдениям, молодые клетки культур слегка эллипсоидной формы, размерами около 2-3 мкм. Взрослые клетки шаровидные, в диаметре от 8 до 10 мкм. Диаметр клеток с формированными автоспорами в материнской оболочке колеблется в пределах 8-12 мкм. Молодые клетки наделены тонкой, бесцветной, прозрачной клеточной оболочкой, которая в процессе роста утолщается. Размножение происходит автоспорами. Споры одинакового размера, число которых, как правило, равно четырём. Деление клеток – асинхронное.

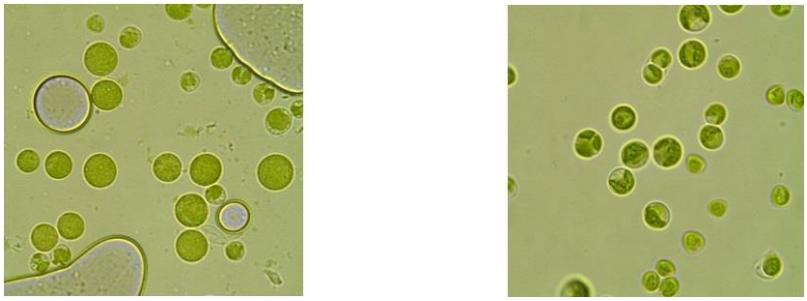

Рис.2. Морфологические признаки культур микроводорослей Chlorella vulgaris и Chlorella pyrenoidosa (микроскопия, “Leica”, 1000x)

Несмотря на подробное изучение таксономии рода *Chlorella* и видовых комплексов *Ch. vulgaris* и *Ch. pyrenoidosa*, в частности, невозможно было выявить специфические и одновременно надёжные морфологические признаки культур. Штаммы одного и того же риботипа демонстрировали значительную морфологическую изменчивость. Необходимость верификации таксономических статусов *Ch. vulgaris* и *Ch. pyrenoidosa* также заключалась в необычной для продуцентов “эксклюзивности” видов, хранящихся в коллекции лаборатории.

В результате проведённого молекулярно-генетического анализа культур *C. vulgaris* Pa-001 и *C. pyrenoidosa* Pa-002 были секвенированы последовательности 18S рДНК общей длиной по 371 п.н., соответственно, из-за небольшого количества доступных для исследуемого рода последовательностей. Полученные нуклеотидные последовательности двух культур оказались однородными по каждому из анализируемых генов.

Филогенетические положения штаммов *Ch. vulgaris* Pa-001 и *Ch. pyrenoidosa* Pa-002, по данным анализа гена 18S рДНК, представлены на рис. 3 (contig_1) и рис. 4 (contig_2) на основе NJ и ML методов. Доля нуклеотидных различий внутри видов составила 0.010, при этом последовательности анализируемых культур не имели различий, полиморфизм не наблюдался.

Анализ результатов определения нуклеотидной последовательности 18S рДНК штаммов, проведенный с использованием поискового алгоритма megablast, показал, что сиквенс *Ch. vulgaris* и *Ch. pyrenoidosa* не совпадает на 100 % ни с одним из секвенированных видов зеленых микроводорослей, зарегистрированных в базе GenBank, NCBI, однако на 99 % сходен с 9 штаммами различных Chlorophyceae, представляющих различные молекулярные клады семейства Chlorellaceae, рода *Parachlorella kessleri*.

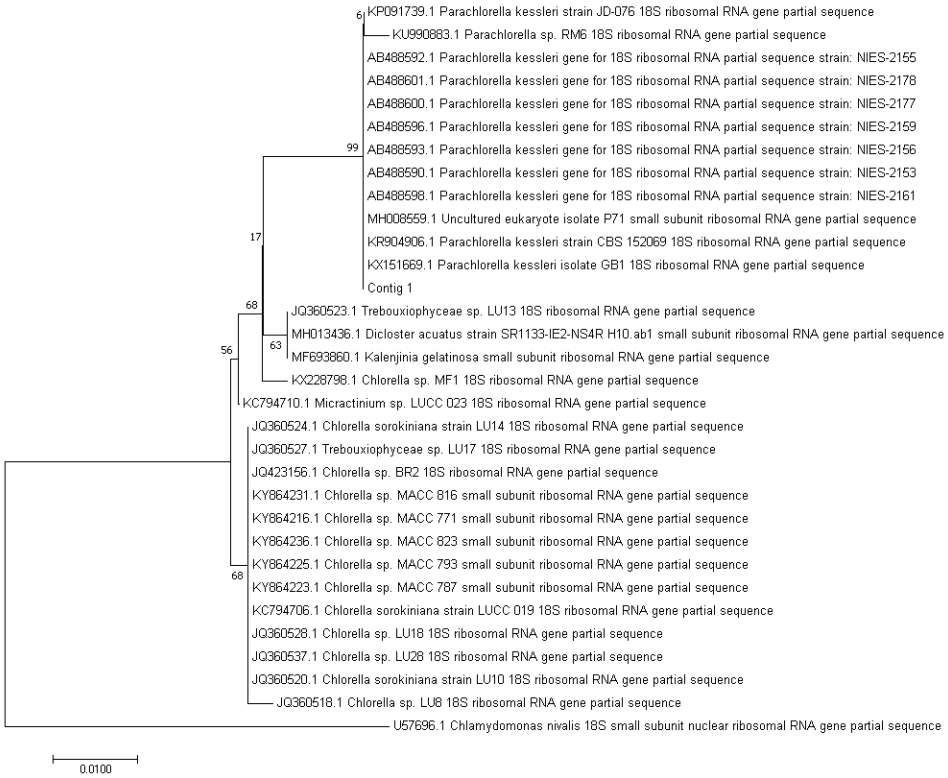

Рис.3. Консенсусное ML-дерево на основе 18S рДНК культуры *Ch. vulgaris* Pa-001 (contig_1), достоверность ветвления указана в виде поддержек ветвей: байесовские апостериорные вероятности, бутстреп-индексы максимального правдоподобия (ML) и ближайшего связывания (NJ). Дерево укоренено последовательностью *Clamydomonas nivalis* U57696.1 в качестве внешней группы.

Были построены филогенетические деревья с использованием методов максимальной правдоподобности (Maximal Likelihood, ML) и ближайших соседей (Neighborhood - Joining, NJ) в филогенетической программе MEGA X для матрицы, состоящей из 30 последовательностей, внешней группы и сиквенса штамма *Clamydomonas nivalis*. На основе Байесова и ML анализов показано, что исследуемые клоны *Ch. vulgaris* Pa-001 и *Ch. pyrenoidosa* Pa-002 с высокой статистической поддержкой сформировали общую кладу с GB1 *Parachlorella kessleri* [7] (код доступа KX151669.1).

Таким образом, анализ нуклеотидных последовательностей 18S рРНК микроводорослей, ранее идентифицированных как *Ch. vulgaris* и *Ch. pyrenoidosa*, показал их видовую принадлежность к штамму *Parachlorella kessleri* внутри того же семейства Chlorellaceae.

В результате проведенной работы с помощью молекулярно-генетических методов с использованием анализа генов рДНК были проанализированы лабораторные культуры, отобранные из различных образцов водных экосистем. В соответствии с современной систематикой удалось определить видовой статус зеленых одноклеточных микроводорослей, обладающих высоким биотехнологическим потенциалом.

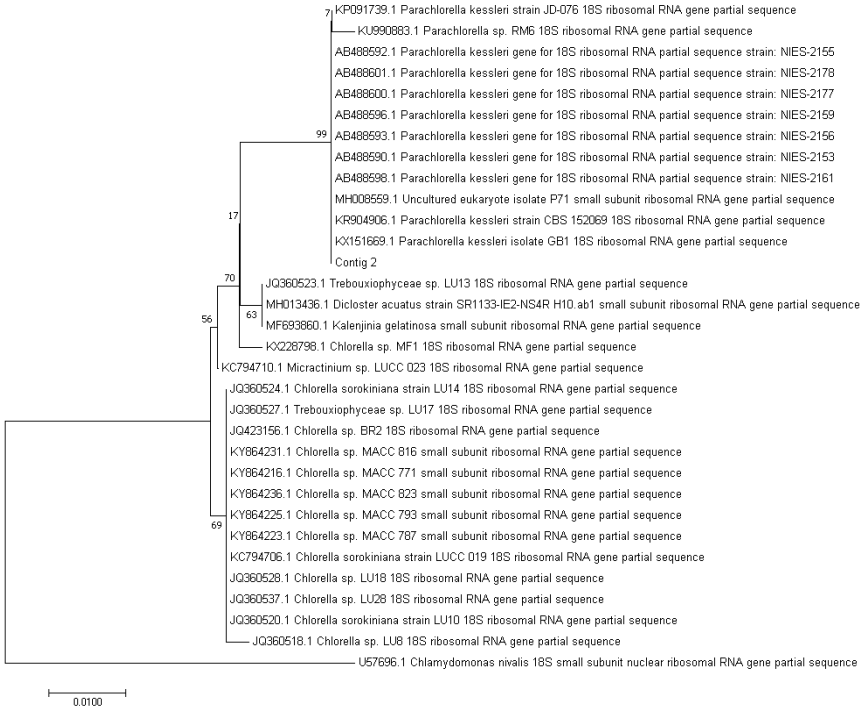

Рис.4. Консенсусное ML-дерево на основе 18S рДНК культуры *Ch. pyrenoidosa* Pa-002 (contig_2), достоверность ветвления указана в виде поддержек ветвей: байесовские апостериорные вероятности, бутстреп-индексы максимального правдоподобия (ML) и ближайшего связывания (NJ). Дерево укоренено последовательностью *Clamydomonas nivalis* U57696.1 в качестве внешней группы.

Некоторые последовательности генов рДНК, впервые полученные для того или иного изученного вида, смогут помочь в выполнении таксономического упорядочения и изучении родственных связей, а также в прослеживании эволюции данных генов.

Показано, что исследуемые рибосомальные гены рДНК имеют большую разрешающую способность, в отличие от классических методов. Тем не менее, данные гены не могут быть использованы в качестве филогеографических маркеров для изучения внутривидовых различий у микроводорослей по ряду причин, в частности, при выраженном отсутствии внутривидовых различий, а также вследствие внутригеномной гипервариабельности.

Исследование выполнено при поддержке ГКН МОН РА в рамках армяно-белорусского совместного научного проекта № 13РБ-043 в 2014-16 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Adachi M., Sako Y., Ishida Y.* Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese Alexandrium species (Dinophyceae). Journal of Phycology, *30*, p. 857-865, 1994.

2. *Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.J.* Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, *215*, p. 403-410, 1990.
3. *Bhattacharya D., Medlin L.* The phylogeny of plastids: a review based on comparison of small-subunit ribosomal RNA coding regions, J. Phycol., *31*, p. 489-498, 1995.
4. *Brody J.R.* History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. Anal. Biochem, *333*, iss. 1, p. 1-13, 2004.
5. *Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D.* ModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods, *9*, p. 772, 2012.
6. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution. *39*, p. 783-791, 1985.
7. *Fott B., Nováková M.* A monograph of the genus Chlorella. The fresh water species. Studies in Phycology. Praha: Academia, p. 10-74, 1969.
8. *Hong D.D., Hien H.T., Thu N.H., Anh H.L., Luyen Q.H.* Phylogenetic analyses of Prorocentrum spp. fnd Alexandrium spp. isolated from northern coast of Vietnam based on 18s rDNA sequences. Journal of Environmental Biology, *29*, 4, p. 535-542, 2008.
9. *John U., Litaker R.W., Montresor M., Murray S., Brosnahan M.L., Anderson D.M.* Formal revision of the Alexandrium tamarense species complex (Dinophyceae) taxonomy: the introduction of five species with emphasis on molecular-based (rDNA) classification. Protist., *165*, 6. p. 779-804, 2014.
10. *Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution. *35*, p. 1547-1549, 2018.
11. *Metting F.B.* Biodiversity and application of microalgae. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, *17*, 5-6, p. 477-489, 1996.
12. *Posada D., Crandall K.A.* Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics. *14*, p. 817-818, 1998.
13. *Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. *4*, p. 406-425, 1987.
14. *Scholin C.A., Herzog M., Sogin M., Anderson D.M.* Identification of group-and strain-specific genetic markers for globally distributed Alexandrium (Dinophyceae). II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene1. Journal of Phycology, *30*, 6, pp. 999-1011, 1994.
15. *Tamura K., Nei M., Kumar S.* Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101, p. 11030-11035, 2004.
16. *Zhu Heng, Qu Feng, Zhu Li-Huang.* Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. Oxford University Press, Nucleic Acids Research, *21*, 22, pp. 5279-5280, 1993.

Поступила 20.06.2019