

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАК СОСТАВНАЯ ЧАСТЬ СКРИНИНГА КАРОТИНОГЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Э. С. Челебиева¹, К. А. Чеканов², Н. В. Данцюк¹

¹Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, РФ,
elina.chelebieva@gmail.com

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, РФ

Выполнена молекулярно-генетическая верификация таксономического статуса 6 штаммов микроводорослей. На основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 18S рРНК три полевых изолята идентифицированы как *Haematococcus pluvialis*, подтверждён таксономический статус штаммов *Pseudospongiococcum protococcoides* CALU – 221 и *Coelastrella (Scotiellopsis) rubescens* IPPAS H-350. Установлено, что штамм IPPAS D-292 идентичен штамму *Scenedesmus rubescens* CCAP 232/1.

Ключевые слова: зелёные микроводоросли, таксономия, молекулярная филогения, 18S рРНК

В середине 2000-х годов в Институте биологии южных морей (ныне ИМБИ) начались исследования по скринингу каротиногенных микроводорослей для выявления перспективных источников высокоценных каротиноидов группы астаксантина (АСТ). Для выполнения работ путем сбора полевого материала и межколлекционного обмена был создан экспериментальный фонд живых культур - продуцентов АСТ. Таксономический статус депонированных и выделенных самостоятельно штаммов был определен при помощи классических микроскопических методов. В настоящее время развитие молекулярно-генетических методов привело к коренному пересмотру систематики зелёных водорослей и стало обязательным условием для проведения исследований физиолого-биохимических и продукционных характеристик водорослей. Все вышесказанное и определяет необходимость верификации систематического положения штаммов микроводорослей из экспериментального фонда ИМБИ.

Материал и методы. Объектами исследований служили шесть штаммов микроводорослей. Три полевых изолята *Haematococcus pluvialis* Flotow: штаммы «Адлер», «Кавказ» и «Севастополь», выделенные из природной среды в состоянии красной апланоспоры в соответствующих названиям регионах. Штамм *Pseudospongiococcum protococcoides* Gromov & Mamkaeva (CALU-221) передан из коллекции культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института Санкт-Петербургского университета. Два штамма поступили из коллекции Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН: штамм IPPAS D-292 как *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard (мутант) и штамм IPPAS H-350 как *Scotiellopsis rubescens* Vinatzer.

В коллекции ИМБИ штаммы хранились на агаризованных (2 %) средах ОНМ [1] и ВВМ [2] при постоянном освещении люминесцентными лампами «Feron» DL 20W облученностью ФАР (I) $34,4 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и температуре (T) $13-15^\circ \text{C}$.

Морфо-фенотипические характеристики штаммов и особенности их жизненного цикла анализировали при помощи светового микроскопа Leica DM 1000 (Германия), оснащённого цифровой камерой DC 300, в условиях накопительной культуры при облученности $105 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, $T = 23-24^\circ \text{C}$.

Для молекулярно-генетической верификации таксономического статуса штаммов использовали нуклеотидную последовательность фрагмента ядерного гена, кодирующего малую субъединицу рибосомы 18S рРНК. Выделение ДНК из клеток полевых

изолятов *H. pluvialis* и штамма IPPAS H-350 проводили при помощи набора реактивов MagJET Plant Genomic DNA Kit #K2761 (Thermo Scientific, Lithuania) по прилагающемуся протоколу, у других – по протоколу DNA Microprep Isolation from Plants, (<http://www.scienceboard.net>). Амплификацию изучаемых фрагментов осуществляли путём полимеразной цепной реакции (ПЦР) в термоциклере Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, Германия) или Techne TC 412 (Bibby Scientific, США). Объем амплифицируемой смеси – 50 мкл. Температурный профиль реакции для полевых изолятов *H. pluvialis* и штамма IPPAS H-350 был следующим: 95°C – 2 мин (95 °C – 30 сек, 55 °C – 30 сек, 72 °C – 2 мин 20 с) – 25 циклов, 72 °C – 2 мин, для штаммов CALU 221 и IPPAS D-292 - 94°C – 3 мин (94°C – 45 с, 54°C – 1 мин, 72°C – 3 мин) – 30 циклов, 72°C – 5 мин, 4°C – ∞. Ампликоны, полученные в результате ПЦР, визуализировали методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле с бромидом этидия. Секвенирование амплифицированных последовательностей полевых изолятов и штамма IPPAS H-350 проводили с использованием автоматического секвенатора Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer в ЦКП «Геном» (Россия), штаммов CALU 221 и IPPAS D-292 - в лаборатории Macrogen Inc. (Голландия).

Поиск ближайших гомологов в базе данных GenBank NCBI проводили при помощи программы BLAST. Для построения множественного выравнивания использовали алгоритмы Muscle и CLUSTAL W v 1.75. Филогенетический анализ проводили в программах MEGA 6.06 и BioEdit. Для реконструкции филогенетического дерева применяли метод максимального правдоподобия. Достоверность установленной топологии проверяли при помощи bootstrap-анализа (1 000 итераций).

Результаты и обсуждение. При длительном хранении агаризованные культуры всех штаммов приобретали оранжево-красный оттенок, что могло свидетельствовать о накоплении ими вторичных каротиноидов. Это служило рекомендацией для включения водорослей в список объектов скрининга перспективных продуцентов каротиноидов группы АСТ. Верификацию таксономического статуса штаммов проводили при помощи традиционных (микроскопических) и молекулярно-генетических методов.

Путем микроскопического анализа на разных стадиях развития периодических культур было установлено, что морфологические и фенотипические характеристики полевых изолятов *H. pluvialis*, *P. protococcoides* и *S. rubescens* соответствовали литературным данным [3]. Поводом для сомнений в правильности идентификации *P. protococcoides* стало отсутствие штамма в других альгологических коллекциях. *S. rubescens* по морфологическим признакам был чрезвычайно сходен с *Coelastrella* spp., вследствие чего подтвердить таксономический статус штамма при помощи традиционных методов невозможно. При культивировании на различных питательных средах штамма IPPAS D-292, поступившего в ИМБИ как мутант *C. reinhardtii* Dangeard, его культуры состояли только из неподвижных коккоидных клеток сферической и эллипсоидной формы, что нехарактерно для представителей хламидомонад [6].

Для подтверждения систематического положения штаммов для каждого из них были получены нуклеотидные последовательности фрагмента гена 18S рРНК. Данные секвенсы, а также гомологи, выявленные при помощи BLAST, составили выборку для множественного выравнивания и дальнейшего филогенетического анализа.

Поиск ближайших гомологов для полевых изолятов, осуществленный при помощи BLAST-алгоритма в базе данных NCBI (GenBank), показал, что наибольший процент гомологии (99-100%) наблюдался с последовательностями фрагментов гена 18S зеленых водорослей вида *Haematococcus pluvialis*. При построении филогенетического

дерева исследуемые полевые штаммы образовывали кластеры с представителями *Haematococcus* со 100% достоверностью.

Штамм *S. rubescens* IPPAS H-350 описан в 1975 г. G. Vinatzer как типовой и единственный вид рода *Scotiellopsis* на основании единственного отличия от представителей рода *Coelastrella* Chodat - полярных утолщений на полюсах клеток. Чешские исследователи на основании молекулярно-генетического анализа заявили об изменении таксономического статуса аутентичного штамма V 195 (= CCALA 475 = IPPAS H-350) на *Coelastrella rubescens* [7] и упразднении рода *Scotiellopsis*. Анализ нуклеотидной последовательности 18S рРНК штамма IPPAS H-350 подтвердил данные результаты: во всех вариантах филогенетических деревьев, построенных методами «ближайших соседей», максимального согласия и максимального правдоподобия штамм попадал в кладу «*Coelastrella*» семейства Scenedesmaceae.

При анализе последовательности 18S рРНК штамма IPPAS D-292 установлено 100% соответствие секвенированному штамму CCAP 232/1 *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler, Schafer, Hummer, Kloboucek & Huss [8], а также 99-99,9% сходство с 25 последовательностями зелёных водорослей, представляющих различные молекулярные клады семейства Scenedesmaceae [9, 10].

Ранее нами было показано, что сиквенс 18S рРНК штамма CALU-221 на 100% не совпадает ни с одним из секвенированных видов зелёных водорослей, представленных в NCBI [9, 10]. На всех вариантах филогенетических деревьев штамм CALU-221 попадал в кладу «*Coelastrella*» семейства Scenedesmaceae, объединившую такие таксоны как *Graesiella emersonii*, *G. vacuolata*, *Scenedesmus vacuolatus* и *Asterarcys quadricellulare*. Нуклеотидная последовательность 18S рРНК была депонирована в NCBI как фрагмент гена *P. protococcoides*. В 2016 г. повторный анализ поиск показал 100% совпадение со штаммом SAG 2471 *Coelastrella* sp. и подтвердил 99% сходство с вышеуказанными штаммами.

Последовательности 18S рРНК исследованных штаммов были депонированы в GenBank. Коды доступа представлены в табл. 1.

Табл. 1 Коды доступа нуклеотидных последовательностей в базе данных Генбанк

Штамм	GenBank ID
<i>Haematococcus pluvialis</i> «Адлер»	KU193764
<i>Haematococcus pluvialis</i> «Кавказ»	KU193763
<i>Haematococcus pluvialis</i> «Севастополь»	KU193762
<i>Pseudosporangiococcum protococcoides</i> Gromov & Mamkaeva (CALU-221)	KU057947
<i>Coelastrella</i> (<i>Scotiellopsis</i>) <i>rubescens</i> Vinatzer (IPPAS H-350)	KT962984
<i>Scenedesmus rubescens</i> (Dangeard) Kessler, Schafer, Hummer, Kloboucek & Huss (IPPAS D-292)	KU057946

Полученные результаты свидетельствуют, что молекулярно-генетическая верификация объектов исследований - необходимое условие проведения их физиолого-биохимических исследований в качестве потенциальных источников АСТ. Установление таксономического статуса зеленых микроводорослей при их описании и паспортизации является одной из наиболее сложных задач. Это связано с отсутствием общепринятой и устоявшейся во времени систематики внутри класса Chlorophyceae. Поэтому между системами, принятыми различными авторами, а также «традиционной» и молекулярно-генетической систематикой возникает конфликт. Для одного только штамма IPPAS H-350 используется сразу три родовых названия (*Scenedesmus*, *Coelastrella*,

Scotiellopsis). Таким образом, систематика одноклеточных зелёных водорослей в настоящее время нуждается в тщательной ревизии. Для создания общепризнанной классификации принципиально важно в совокупности учитывать данные экологии, морфологии, ультраструктуры, физиологии, биохимии и молекулярно-биологических методов. При этом перспективным является поиск и исследование новых таксономических маркеров, таких как внутренние межгенные спейсеры ядерного рибосомального кластера (ITS), ген большой субъединицы RuBisCO и т.д., а также анализ не только первичной, но и вторичной структуры исследуемых фрагментов.

1. Fábregas J., Domínguez A., Regueiro M. [et al.] Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2000. Vol. 53, iss. 5. P. 530-535.
2. Watanabe M. M. Freshwater culture media // Algal culturing techniques / Ed. R. A. Andersen. London, 2005. P. 13-21.
3. Elliot F.M. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis* / Archiv für Protistenkunde. Jena : G. Fischer Verlag. 1934. P. 250-273.
4. Gromov B. M., Mamkaeva K. A. Morphology and ultrastructure of some chlorococcae algae from the collection of algae strain in Leningrad University // Arch. Hydrobiol. Suppl. 46. Algol. stud. 1974. Vol. 10. P. 1-9.
5. Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зелёные водоросли. - СПб: Наука, 1998. 351 с.
6. Ettl H. Beitrag zur Kenntnis der Morphologie der Gattung *Chlamydomonas* Ehrenberg // Archiv für Protistenkunde. 1965. Vol. 108. P. 271-420.
7. Kaufnerová V., Eliáš M. The demise of the genus *Scotiellopsis* Vinatzer (Chlorophyta) // Nova Hedwigia. 2013. V. 97. P. 415-428.
8. Kessler E., Schafer M., Hummer C. [et al.] Physiological, biochemical, and molecular characters for the taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta) // Botanica Acta. 1997. Vol. 110. P. 244-250.
9. Челебієва Е.С., Скребовська С.В. Морфологічні та молекулярно-філогенетичні дослідження *Scenedesmus rubescens* (Chlorophyta) // Вчені записки ТНУ. Серія «Біологія, хімія». 2013. Том 26 (65). № 2. С. 189-196. – а.
10. Челебієва Е.С., Скребовська С.В. Місце в системі Chlorophyta одноклітинної автоспороутворюючої водорості *Pseudospongiococcum protococcoides* // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2013. Вип. 62. С. 75-81. – б.

MOLECULAR GENETIC RESEARCH AS PART OF SCREENING CAROTENOGENIC MICROALGAE

E. S. Chelebieva¹, K. A. Chekanov², N. V. Dantsyuk¹

¹Kovalevsky Institute of Marine Biological Research, RAS, Sevastopol, RF, elina.chelebieva@gmail.com

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, RF

Molecular genetic verification of the taxonomic status of 6 microalgae strains was performed. On the basis of gene 18S rDNA nucleic sequence analysis three field isolates identified as *Haematococcus pluvialis*; the taxonomic status of the strains *Pseudospongiococcum protococcoides* CALU - 221 and *Coelastrella (Scotiellopsis) rubescens* IPPAS H-350 was confirmed. It was found that the strain IPPAS D-292 is identical to the strain *Scenedesmus rubescens* CCAP 232/1.

Key words: green microalgae, taxonomy, molecular phylogeny, 18S rDNA