

Аналіз генетичного поліморфізму культури *Chlorella vulgaris* Weyer. за вирощування в присутності селеніту натрію в комбінації з сульфатом цинку та хлоридом хрому

Боднар О.І.¹, Андрєєв І.О.², Прокоп'як М.З.¹, Дробик Н.М.¹, Грубінко В.В.¹

¹Тернопільський національний педагогічний університет імені В. Гнатюка,

вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль 46027, Україна

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

вул. Академіка Заболотного, 150, Київ 03143, Україна

bodnar@chem-bio.com.ua

Надійшла до редакції 05.04.2021. Після доопрацювання 15.05. 2021. Підписана до друку 16.05.2021.

Опублікована 29.06.2021

Реферат. Досліджено генетичний поліморфізм *Chlorella vulgaris* за дії мікроелементів селену, цинку і хрому для оптимізації способу культивування водоростей та отримання корисних сполук. Метали та неметали, потрапляючи у клітину, проявляють високу біохімічну дію, модифікуючи метаболічні реакції, у т. ч. пов'язані з функціонуванням генетичного апарату клітин мікрводоростей. У роботі використані загальноприйняті гідробіологічні методи вирощування водоростей, метод виділення ДНК за Rogers, Bendich (1985); молекулярно-генетичний аналіз з використанням ISSR (inter simple sequence repeats) та IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism) маркерів. Для всіх зразків *C. vulgaris* отримано 109 фрагментів, 42 з яких виявилися поліморфними (38,5%). Генетичні відстані за Жаккардом (D_j) між зразками культури *C. vulgaris*, отриманої за вирощування на середовищах різного складу та контролем (водорості, вирощені за стандартних умов), становили: 0,232 за дії селеніту окремо, 0,206 за спільної дії селеніту і цинку та 0,300 за спільної дії селеніту і хрому. Встановлено, що додаткове внесення мікроелементів у середовище культивування обумовлює певні модифікації генетичного апарату клітин водорості. Водночас виявлені зміни у водоростей, вирощених на середовищах із вмістом різних мікроелементів та їхніх поєднань, знаходяться в межах рівня генетичного поліморфізму одноклітинних зелених водоростей за природних умов росту, що свідчить про відсутність суттєвого генотоксичного впливу мікроелементів і високу метаболічну та генетичну пластичність культури водоростей.

Ключові слова: *Chlorella vulgaris*, мікроелементи, ISSR- та IRAP-маркери, генетичний поліморфізм, генетичні відстані за Жаккардом

© Боднар О.І., Андрєєв І.О., Прокоп'як М.З., Дробик Н.М., Грубінко В.В., 2021

Вступ

Сьогодні інтерес до потенційних комерційних сполук із мікродоростей обумовлений необхідністю з'ясування механізмів підвищення їхньої стресостійкості, збільшення продуктивності, інтенсифікації обміну речовин і спрямування метаболізму для активації тих чи інших біосинтетичних процесів та отримання корисних речовин (Richmond, Hu, 2013). Поряд із біохімічними методами регуляції активно застосовуються генетичні методи трансформації метаболізму, які полягають у вивченні геному водоростей, експресії відповідних генів та утворенні нових генетично модифікованих штамів (Alzahrani, 2013; Shrestha et al., 2013).

Відомо, що водорості містять значну кількість груп активних органічних компонентів різної хімічної будови із різними властивостями. Серед них полісахариди (альгінати, ламінарин, агар), пігменти (хлорофіли, каротиноїди, лютеїн), ліпіди (насичені та поліненасичені жирні кислоти), пептиди і протеїни, а також вітаміни та мінерали. Для багатьох цих сполук характерний широкий спектр потенційного лікувально-профілактичного впливу (антиоксидантний, протираковий, антивірусний, антибактеріальний, антиалергічний, антидіабетичний, протизапальний, тощо) на організм тварин і людини (Liu, Hu, 2013; Richmond, Hu, 2013). Тому актуальним і перспективним способом лікування та профілактики багатьох захворювань може виявитися використання натуральних біологічно активних добавок з водоростей (Skrivan et al., 2010; Liu, Hu, 2013). Завдяки своїм високим адсорбційним властивостям водорості здатні поглинати та акумулювати метали й неметали проти градієнту концентрації та включати їх до складу внутрішньоклітинних органічних молекул (Richmond, Hu, 2013). З огляду на це, інтерес становлять водоростеві комплекси селену (компонент антиоксидантної системи) і біологічно активних металів – цинку (один з найважливіших регулюючих мікроелементів у живих організмах) та хрому (фактор толерантності до глюкози) (Skrivan et al., 2010; Yoshida et al., 2011; Vincent, 2013).

Хлорела, завдяки швидкому росту і розмноженню та невибагливості до умов вирощування, є класичним об'єктом для різноманітних лабораторних досліджень і сировиною для отримання корисних продуктів в аквакультурі (Afkar et al., 2010; Liu, Hu, 2013; Richmond, Hu, 2013). На відміну від морфологічних, біохімічних та фізіологічних ознак, які значною мірою залежать від віку культури і фізико-хімічних умов культивування та не завжди мають чітку видову специфічність, генетичні ознаки зазвичай більш стабільні.

Сьогодні молекулярно-генетичні методи широко використовуються для ідентифікації організмів та встановлення генетичних зв'язків між ними, зокрема й одноклітинних водоростей (Roshani et al., 2012; Wongsawad et al., 2015).

Раніше нами було встановлено, що використання натрій селеніту окремо та у комбінації з сульфатом цинку чи хлоридом хрому для біотехнологічного культивування *C. vulgaris* з метою отримання корисних сполук, збагачених мікроелементами, є оптимальним з огляду на моделювання метаболічного статусу водоростей та активації ліпідного метаболізму (Lukashiv et al., 2017; Vodnar et al., 2018). Водночас невідомо, як культивування за таких умов впливає на генетичні показники культури водоростей.

У роботі А.М. Alzahrani (2013) показано, що поряд із фізіологічними та біохімічними змінами за адаптації культури *C. vulgaris* до підвищених концентрацій купруму відбуваються зміни генетичних характеристик культури. Відмінності, визначені за допомогою ISSR-ПЛР (метод молекулярно-генетичного аналізу на основі полімеразної ланцюгової реакції ПЛР), між культурою диких водоростей та дібраною за стійкістю до купруму культурою перевищували 60%.

Тому комплексний підхід до вивчення впливу металів і неметалів як ефективних регуляторів метаболізму у водоростей, що полягає у використанні традиційних фізіолого-біохімічних та молекулярно-генетичних методів дослідження, дасть змогу визначити рівень генетичних змін культури за дії використаних мікроелементів, а також встановити їхні оптимальні концентрації. Це дозволить більш ефективно проводити добір стійких до потенційно токсичних хімічних елементів штамів водоростей (Alzahrani, 2013; Kebeish et al., 2014).

Одними з найефективніших інструментів дослідження генетичного поліморфізму, завдяки своїй простоті, високій чутливості та швидкості проведення, є методи молекулярно-генетичного аналізу на основі ПЛР (Malyshev, Kartel, 1997; Mostafa et al., 2011), зокрема з використанням мультилокусних ISSR-маркерів (inter simple sequence repeats) (Mostafa et al., 2011; Alzahrani, 2013) та IRAP-маркерів (inter-retransposon amplified polymorphism) (Malyshev, Kartel, 1997).

Матеріали та методи

Об'єктом лабораторного дослідження була альгологічно чиста культура зеленої водорості *Chlorella vulgaris* HPDP-119 із колекції Інституту гідробіології НАН України, яку вирощували на середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горхема № 11 при температурі 22–25 °С та освітленні лампами денного світла інтенсивністю 2500 лк протягом 16 год (Torachevskiy, 1975).

У культуральне середовище додавали водні розчини Na_2SeO_3 у розрахунку на кількість іонів Se(IV) – 10,0 мг/дм³ окремо та спільно з $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ у розрахунку Zn^{2+} – 5,0 мг/дм³ або з $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ у розрахунку на вміст Cr^{3+} – 5,0 мг/дм³. Контролем слугувала культура, вирощена у

стандартному середовищі без додавання селеніту натрію та солей хрому і цинку. Клітини для виділення ДНК відбирали на 7-у добу культивування.

ДНК виділяли за стандартним протоколом із біомаси водоростей, висушеної при температурі 37 °С (Rogers, Bendich, 1985). У результаті попереднього скринінгу з 8 ISSR- та 4 IRAP-праймерів для роботи було відібрано 7 і 1 відповідно, які забезпечували синтез чітких відтворюваних ампліконів (послідовності праймерів наведено у табл. 1).

Таблиця 1. Нуклеотидні послідовності ISSR- та IRAP-праймерів

п/п	Тип праймера	Назва праймера	Нуклеотидна послідовність, (5' – 3')
1	ISSR	UBC#03	5' ACA CAC ACA CAC ACA CTT 3'
2		UBC#04	5' ACA CAC ACA CAC ACA CAG 3'
3		UBC#05	5' ACA CAC ACA CAC ACA CTG 3'
4		UBC#23	5' ACA CAC ACA CAC ACA CTA 3'
5		UBC#807	5' AGA GAG AGA GAG AGA GT 3'
6		UBC#836	5' AGA GAG AGA GAG AGA GYA 3'
7		UBC#840	5' GAG AGA GAG AGA GAG AYT 3'
8		UBC#811	5' GAG AGA GAG AGA GAG AC 3'
9	IRAP	642	5' TTTGAAAACCTGGCGGCAACG 3'
10		866	5' ACCAGCCC GGCCGTCGACC 3'
11		1651	5' TGACCAAGGGCGCGTATCGTG 3'
12		1681	5' ATACCTCGGAGGCGCTGCACCTG 3'

Примітка. Напівжирним шрифтом виділені праймери, які забезпечували синтез чітких відтворюваних послідовностей і були використані для генетичного аналізу; Y = C/T.

Ампліфікацію проводили у термоциклері Терцик МС2 (Біотехнологія, Росія). Реакційна суміш містила: 20 нг ДНК (IRAP-аналіз), 30 нг ДНК (ISSR-аналіз), 0,2 мМ dNTP (Fermentas, Литва), 1,25 U Taq-полімерази (Амплісенс, Росія), 0,5 мкМ праймера, 1 × ПЛР-буфер на (NH₄)₂SO₄ з 2,5 мМ MgCl₂ (Fermentas, Литва). Зверху нашаровували 15 мкл мінеральної олії. Як негативний контроль використовували стандартну реакційну суміш без ДНК. Для проведення ПЛР встановлювали наступні режими: ISSR-ПЛР: 94 °С – 2 хв, 35 циклів (94 °С – 30 с, 53 °С – 30 с, 72 °С – 1,5 хв), 72 °С – 2,5 хв; IRAP-ПЛР: 94 °С – 2 хв, 35 циклів (94 °С – 30 с; 58 °С – 30 с; 72 °С – 1,5 хв), 72 °С – 2,5 хв. Продукти ампліфікації розділяли електрофорезом в 1,3%-му агарозному гелі з додаванням

0,5 мкг/мл бромистого етидію в $1 \times$ SB-буфері (5 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, рН 8,5) впродовж 5–6 год за напруженості електричного поля 4–5 В/см. Для визначення довжини фрагментів використовували маркер молекулярної маси (100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb DNA Ladder), який містив фрагменти ДНК наступних розмірів: 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1000; 1500; 3000 п. н. (ООО-СибЭнзим-М, Москва).

Обробку електрофореграм проводили за допомогою програми TotalLab TL120 (Nonlinear Dynamics). Для статистичної оцінки даних ПЛР-аналізу застосовували програми FAMD 1.25 (Schluter, Harris, 2006) і GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2006). Для оцінки рівня генетичних відмінностей використовували такі параметри, як частку поліморфних ампліконів та генетичні відстані за Жаккардом (D_j). Отримані експериментальні дані опрацьовували за допомогою програми Statistica 6.0.

При проведенні експериментальних досліджень застосовували реактиви фірм «Sigma», «Lachema», «Reanal», «Химреактив» (кваліфікація «ч.д.а.»), «Амплісенс», «Fermentas» та «ООО-СибЭнзим-М».

Результати та обговорення

Використані ISSR- та IRAP-праймери забезпечували ампліфікацію фрагментів у межах: 180–2600 і 190–3400 п. н. відповідно. На рисунку представлені електрофореграми, які демонструють поліморфізм профілів ПЛР-продуктів зразків культури *C. vulgaris*, отриманої при вирощуванні на середовищах різного складу.

При визначенні генетичного поліморфізму у *C. vulgaris* за допомогою ISSR-праймерів отримані нами ПЛР-продукти були схожими за розмірами, як у випадку з *C. vulgaris* та *C. pyrenoidosa*, за використання цього ж виду праймерів, та знаходилися в межах 200–2600 п. н. (Shen, 2008).

Загальна кількість фрагментів для всіх зразків, що синтезувалися за використання 1 IRAP- та 7 ISSR-маркерів (табл. 2), становила 109, з яких 42 виявилися поліморфними (38,5%), причому праймер UBC#840 (ISSR) показав найвищий рівень поліморфізму (81%), а UBC#04 (ISSR) – найменший (7,7%). У роботі S. Shen (2008) показано, що частка поліморфних ампліконів у чотирьох клонів *C. vulgaris* за стандартних умов культивування становила 39,6%, що відповідає отриманим нами даним за впливу селену окремо та спільно з цинком чи хромом.

Нами було визначено показник генетичних дистанцій за Жаккардом (D_j) між зразками культури *C. vulgaris*, отриманої при вирощуванні на середовищах різного складу (з додаванням селену, цинку і хрому), та контролем. Розраховані на основі даних ПЛР-аналізу генетичні дистанції за Жаккардом показали, що найбільші відмінності від контролю (0,300) мав зразок культури *C. vulgaris*, вирощений на середовищі з вмістом селеніту натрію та хлориду хрому, а найменші (0,206) – зразок культури *C. vulgaris*, вирощеної за присутності селеніту натрію та сульфату цинку (табл. 3).

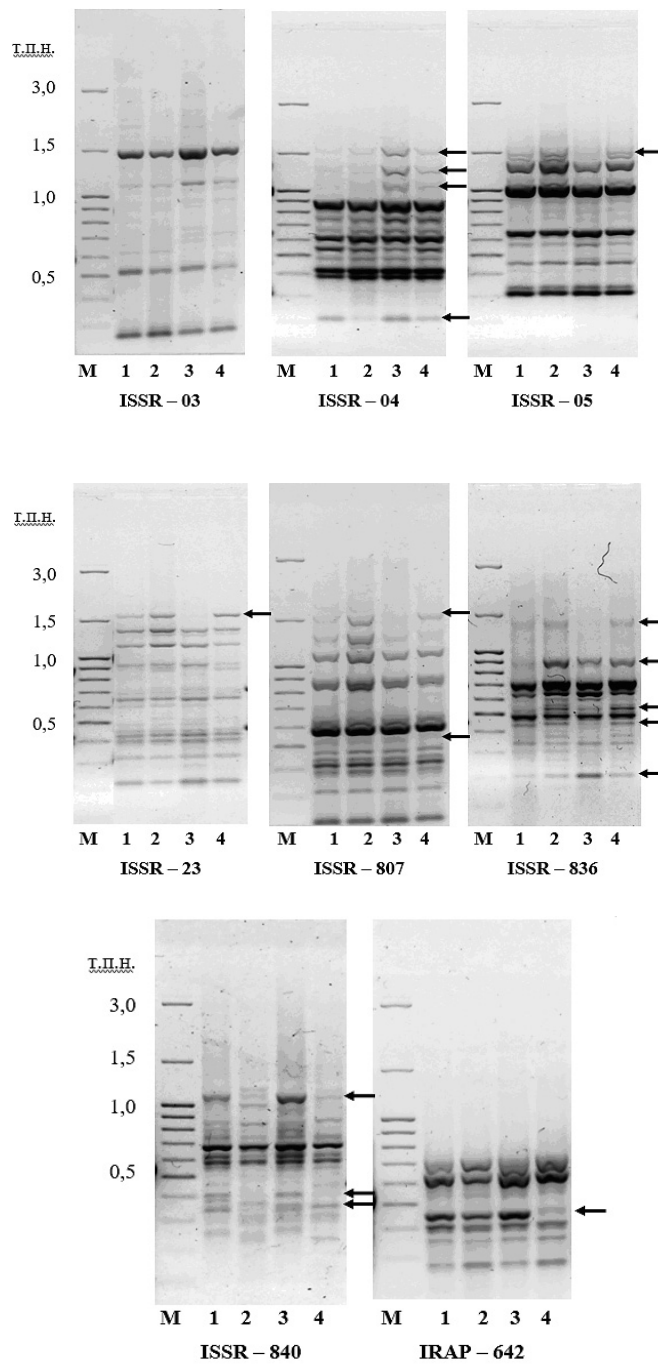


Рисунок. Поліморфізм спектрів ПЛР-продуктів зразків культури *Chlorella vulgaris*, отриманої при вирощуванні на середовищах різного складу: 1 – контроль, 2 – водорості, вирощені з додаванням Se(IV) 10,0 мг/дм³, 3 – Se(IV) 10,0 та Zn(II) 5,0 мг/дм³, 4 – Se(IV) 10,0 та Cr(III) 5,0 мг/дм³. М – маркер молекулярної маси ДНК

Таблиця 2. Характеристика ПЛР-продуктів *Chlorella vulgaris* відповідно з отриманими нами даними ISSR- та IRAP-маркерів

Праймер	Кількість ампліконів	Кількість поліморфних ампліконів
ISSR-03	15	7
ISSR-04	13	1
ISSR-05	10	1
ISSR-23	17	7
ISSR-807	13	1
ISSR-836	11	7
ISSR-840	21	17
IRAP-642	8	1
Загалом	109	42

Таблиця 3. Генетичні дистанції за Жаккардом, розраховані на основі даних ISSR- та IRAP-ПЛР

Умови	1	2	3	4
Контроль	–			
Se(IV)	0,232	–		
Se(IV) + Zn(II)	0,206	0,216	–	
Se(IV) + Cr(III)	0,300	0,148	0,298	–

1 – контроль; 2 – водорості, вирощені з Se(IV) 10,0 мг/дм³; 3 – з Se(IV) 10,0 та Zn(II) 5,0; 4 – із Se(IV) 10,0 та Cr(III) 5,0 мг/дм³.

При культивуванні *C. vulgaris* на середовищі з селенітом натрію D₃ становила 0,232 по відношенню до контролю. При додаванні окрім селеніту натрію ще й сульфату цинку цей показник знижувався на 12% (табл. 3). Отже, можна припустити, що цинк модулює та контролює накопичення генетичних змін у культурі *C. vulgaris*, оскільки їхня кількість нижча, ніж у зразка, культивованого лише з селенітом натрію.

Таким чином, встановлено, що культивування *C. vulgaris* у присутності селену, цинку або хрому супроводжується змінами генетичних характеристик культури водоростей. Ці зміни можна пояснити мутагенним впливом згаданих елементів у використаних концентраціях. Однак, враховуючи коротку тривалість періоду культивування, впродовж якого

могло відбутися лише близько трьох клітинних поділів, та існуючі літературні дані, це припущення здається малоімовірним.

У роботі (Sun et al., 2014) показано, що нижчі із досліджуваних концентрації Se (≤ 75 мг/дм³) позитивно впливають на ріст культури *C. vulgaris* та проявляють яскраву антиоксидантну дію, інгібуючи перекисне окислення ліпідів та утворення активних форм кисню при вирощуванні впродовж 144 год (6 діб). За цих умов також спостерігали суттєве пришвидшення росту клітин і збільшення вмісту органічного Se у водоростях. Пригнічення росту водорості спостерігали лише при підвищенні концентрації Se у середовищі понад 100 мг/дм³ (Sun et al., 2014).

Біологічна активність сполук селену у клітинах прямо чи опосередковано пов'язана з протеїнами: селенцистеїном, селенметіоніном, глутатіонпероксидазою, тіоредоксинредуктазою, тощо (Yoshida et al., 2011). Належна кількість селену у складі цих сполук забезпечує нормальний перебіг процесів захисту ДНК та хромосом від пошкоджень, розривів, делецій та утворення аддуктів. Сполуки селену можуть також здійснювати модуляції метилювання ДНК або гальмування деацетилювання гістонових протеїнів (Ferguson et al., 2012). Відмічено також додаткову протекторну функцію селену щодо генетичного апарату клітин через селенметіонін-індуковану реакцію репарації ДНК і зростання активності репаративних ензимів – ДНК-глікозилаз (передусім p53, BRCA1 та Gadd45), які відновлюють пошкоджені ділянки ДНК (Fischer et al., 2006; Bera et al., 2013).

Водночас оптимальні кількості цього мікроелементу для життєдіяльності кожного організму залежать найперше від його генотипу та біологічних особливостей (Ferguson et al., 2012). Детальніші дослідження механізмів впливу селену на процеси відновлення ДНК допоможуть пояснити наявні у літературі суперечливі дані стосовно мінімальних його кількостей для максимального захисту і стабільності геному у всіх організмів (Bera et al., 2013).

У роботі S. Maeda et al. (1990) показано, що концентрація цинку в середовищі до 20 мг/дм³ практично не впливала на функціонування культури *C. vulgaris*, тоді як концентрація 10 мг/дм³ обумовила кращий і швидший ріст у порівнянні з контролем. В іншому дослідженні процеси росту культури *C. pyrenoidosa* за концентрацій Zn^{2+} 5–10 мг/дм³ не змінювалися у порівнянні з контрольною культурою (Zhou et al., 2012).

Цинк необхідний для функціонування багатьох протеїнів, що містять так звані «цинкові пальці»: ділянки протеїну, які стабілізовані одним або двома іонами цинку і мають характерну просторову структуру. Такі ділянки входять до складу протеїнових доменів, відповідальних за зв'язування ДНК, РНК, інших протеїнів та невеликих молекул.

Цинковмісні протеїни дуже поширені у клітинах еукаріот і виконують різноманітні функції: розпізнавання ДНК, пакування РНК, активація транскрипції, регуляція апоптозу, формування просторової структури протеїну та зв'язування ліпідів (Laity et al., 2001). При дослідженні транскрипційних факторів у мікродоростей представників *Haptophyta*, *Bacillariophyta*, *Heterokontophyta*, *Chlorophyta* та *Rhodophyta* (Thiriet-Rupert et al., 2016), встановлено, що в середньому до 10% з них належить до класу протеїнів з «цинковими пальцями». Також показана активна участь цієї групи протеїнів у реакціях-відповідях клітин на біотичні та абіотичні стресові чинники (Deng et al., 2012; Peng et al., 2012).

Питання біологічної активності хрому досі залишається суперечливим і передусім залежить від видової приналежності та генотипу організму. З'ясовано, що для багатьох видів нижчих рослин, включаючи водорості, хром є токсичним (Cervantes et al., 2001; Fang et al., 2014). У підвищених концентраціях цей метал проявляє канцерогенну дію з суттєвим порушенням метаболізму та складним механізмом мутагенезу. Доведено, що Cr(III) є менш небезпечним, ніж Cr(VI) (Fang et al., 2014).

Таким чином, концентрації селену і цинку, використані в нашій роботі, істотно не впливають на приріст біомаси водорості, а отже, не проявляють значний генотоксичний вплив. Лише хром за таких концентрацій здатний частково пригнічувати ріст *C. vulgaris* (Meisch, Schmitt-Beckmann, 1979; Qian et al., 2013), потенційно міг би мати мутагенний вплив, але за умови більш тривалого культивування.

Отже, повинні бути інші причини виявлених нами змін у генетичних характеристиках культури *C. vulgaris*. Найбільш імовірною причиною може бути початкова генетична гетерогенність використаної культури. S. Shen (2008) за допомогою ISSR-ПЛП порівняв окремі клони двох видів водоростей і показав, що за природних умов їх росту генетичні відстані за Жаккардом між чотирма клонами *C. vulgaris* варіюють в межах 0,218–0,321, а між трьома штамми *C. pyrenoidosa* – від 0,190 до 0,275 (Shen, 2008).

Отже, можна припустити, що виявлені нами генетичні зміни є наслідком селективного добору певної частини генетично-гетерогенної популяції клітин *C. vulgaris*, найбільш пристосованої до змінених умов культивування (Hovde et al., 2018). Наслідком цього стали зміни генетичної структури клітинної популяції, які й відобразилися у появі виявлених нами генетичних відмінностей між варіантами культури, отриманими на різних середовищах. Однак для перевірки цього припущення, як і для визначення генотоксичного впливу використаних у роботі елементів, необхідно провести додаткові експерименти на культурах водоростей, отриманих шляхом попереднього клонування.

Висновки

За культивування *Chlorella vulgaris* у присутності селеніту натрій окремо та спільно із сульфатом цинку та хлоридом хрому відбуваються зміни генетичних характеристик культури, згідно до результатів ISSR- та IRAP-ПІР. Генетичні відстані (D_j) між отриманими варіантами культури (мікропопуляціями) хлорели варіюють у межах 0,206–0,300. Додаткове внесення солей селену, цинку і хрому у середовище культивування *C. vulgaris* у досліджуваних концентраціях засвідчило відсутність їхньої суттєвої генотоксичності на водорості. Тому припускаємо, що зазначені сполуки можна використовувати в біотехнологічному процесі для отримання альгобіомаси, збагаченої мікроелементами.

IRAP-праймери (розроблені для різних видів рослин) для роботи люб'язно надав д-р Р.М. Календар (MTT/BI Plant Genomics, Institute of Biotechnology, University of Helsinki).

Список літератури

- Afkar E., Ababna H., Fathi A.A. 2010. Toxicological response of the green alga *Chlorella vulgaris* to some heavy metals. *Am. J. Environ. Sci.* 6(3): 230–237.
- Alzahranі A.M. 2013. ISSR-PCR-based genetic diversity analysis on copper-tolerant versus wild type strains of the unicellular alga *Chlorella vulgaris*. *Sci. J. King Faisal Univ. Basic and Appl. Sci.* 14(2): 63–78.
- Bera S., De Rosa V., Rachidi W., Diamond A. 2013. Does a role for selenium in DNA damage repair explain apparent controversies in its use in chemoprevention? *Mutagenesis.* 28(2): 127–134.
- Bodnar O.I., Kovalska H.B., Grubinko V.V. 2018. Regulation of biosynthesis of lipids in *Chlorella vulgaris* by compounds of Zinc, Chromium and Selenium. *Regul. Mech. Biosyst.* 9(2): 267–274.
- Cervantes C., Campos-Garc J., Devars S., Gutierrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzman J.C. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25(3): 335–347.
- Deng H., Liu H., Li X., Xiao J., Wang S.A. 2012. CCCH-type zinc finger nucleic acid binding protein quantitatively confers resistance against rice bacterial blight disease. *Plant Physiol.* 158(2): 876–889.
- Fang Z., Zhao M., Zhen H., Chen L., Shi P., Huang Z. 2014. Genotoxicity of tri- and hexavalent chromium compounds in vivo and their modes of action on DNA damage in vitro. *PLOS ONE.* 9(8): 103–194.
- Ferguson L.R., Karunasinghe N., Zhu S., Wang A.H. 2012. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability. *Mutat. Res.* 733(1–2): 100–110.
- Fischer J.L., Lancia J.K., Mathur A., Smith M.L. 2006. Selenium protection from DNA damage involves a Ref1/p53/Brcal protein complex. *Anticancer Res.* 26(2A): 899–904.

- Hovde B.T., Hanschen E.R., Tyler C.R., Lo C.C., Kunde Y., Davenport K., Daligault H., Msanne J., Canny S., Eyun S.I., Riethoven J.J. 2018. Genomic characterization reveals significant divergence within *Chlorella sorokiniana* (*Chlorellales*, *Trebouxiophyceae*). *Algal Res.* 35: 449–461.
- Kebeish R., El-Ayouty Y., Husain A. 2014. Effect of copper on growth, bioactive metabolites, antioxidant enzymes and photosynthesis-related gene transcription in *Chlorella vulgaris*. *World Res. J. Biol. & Biol. Sci.* 2(2): 34–43.
- Laity J.H., Lee B.M., Wright P.E. 2001. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11(1): 39–46.
- Liu J., Hu Q. 2013. In: *Handbook of Microalgal Culture. Applied Phycology and Biotechnology*. Oxford: Wiley, Ltd. Pp. 339–349.
- Lukashiv O.Y., Bodnar O.I., Grubinko V.V. 2017. Accumulation of Chromium and Selenium inside cells and in lipids of *Chlorella vulgaris* Beijer. during the incubation from chromium by sodium chloride and selenium. *Int. J. Algae.* 19(4): 357–366. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v19.i4.60>
- Maeda S., Mizoguchi M., Ohki A., Takeshita T. 1990. Bioaccumulation of zinc and cadmium in freshwater alga, *Chlorella vulgaris*. Pt I. Toxicity and accumulation. *Chemosphere.* 21(8): 953–963.
- Malyshev S.V., Kartel N.A. 1997. *Mol. Biol.* 31(2): 197–208. [Мальшев С.В., Картель Н.А. Молекулярные маркеры в генетическом картировании растений. *Мол. биол.* 31(2): 197–208].
- Meisch H.U., Schmitt-Beckmann I. 1979. Influence of tri- and hexavalent chromium on two *Chlorella* strains. *Z. Pflanzenphysiol.* 94(3): 231–239.
- Mostafa N., Omar H., Tan S.G., Napis S. 2011. Studies on the genetic variation of the green unicellular alga *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*) obtained from different geographical locations using ISSR and RAPD molecular marker. *Molecules.* 16(3): 2598–2608.
- Peakall R., Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Not.* 6(1): 288–295.
- Peng X., Zhao Y., Cao J., Zhang W., Jiang H., Li X. 2012. CCCH-type zinc finger family in maize: genome-wide identification, classification and expression profiling under abscisic acid and drought treatments. *PLOS ONE.* 7(7): e40120.
- Qian H., Sun Z., Sun L., Jiang Y., Wei Y., Xie J., Fu Z. 2013. Phosphorus availability changes chromium toxicity in the freshwater alga *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere.* 93(6): 885–891.
- Richmond A., Hu Q. 2013. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd. 736 p.
- Rogers S.O., Bendich A.J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5: 69–76.
- Roshani O., Mohd Syahril M.Z., Mohd Hafiz R. 2012. Genetic Polymorphisms of unicellular green algae strains using random amplified polymorphic DNA. In: *Proceedings of the International Conference on Science, Technology and Social Sciences (ICSTSS)*. Kuantan (Singapore): Springer. Pp. 635–640.

- Schluter P.M., Harris S.A. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Not.* 6(2): 569–572.
- Shen S. 2008. Genetic diversity analysis with ISSR PCR on green algae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 26(4): 380–384.
- Shrestha R.P., Haerizadeh F., Hildebrand M. 2013. In: *Handbook of Microalgal Culture. Applied Phycology and Biotechnology*. Oxford: Wiley, Ltd. Pp. 146–167.
- Skrivan M., Skrivanova V., Dlouha G., Branyikova I., Zachleder V., Vitova M. 2010. The use of selenium-enriched alga *Scenedesmus quadricauda* in chicken diet. *Czech J. Anim. Sci.* 55(12): 565–571.
- Sun X., Zhong Y., Huang Z., Yang Y. 2014. Selenium accumulation in unicellular green algae *Chlorella vulgaris* and its effects on antioxidant enzymes and content of photosynthetic pigments. *PLOS ONE*. 9(11): e112270.
- Thiriet-Rupert S., Carrier G., Chenais B., Trottier C., Bougaran G., Cadoret J-P. 2016. Transcription factors in microalgae: genome-wide prediction and comparative analysis. *BMC Genom.* 17: 282–298.
- Topachevskiy A.V. 1975. *Methods of physiological and biochemical studies of algae in hydrobiological practice*. Kyiv: Naukova Dumka. 248 p. [Топачевский А.В. 1975. *Методы физиолого-биологического исследования водорослей в гидробиологической практике*. Киев: Наук. думка. 248 с.].
- Vincent J.B. 2013. Chromium: is it essential, pharmacologically relevant, or toxic? *Met. Ions Life Sci.* 13: 171–198.
- Wongsawad P., Peerapornpisal Y., Wongsawad C. 2015. Molecular characterization of *Spirogyra* from Northern Thailand using inter simple sequence repeat (ISSR). *J. Adv. Biol. Biotechnol.* 3(2): 144–153.
- Yoshida S., Haratake M., Fuchigami T., Nakayama M. 2011. Selenium in Seafood Materials. *J. Health Sci.* 57(3): 215–224.
- Zhou G.J., Peng F.Q., Zhang L.J., Ying G.G. 2012. Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19(7): 2918–2929.

Підписала до друку О.К. Золотарьова

Bodnar O.I.¹, Andreev I.O.², Prokopiak M.Z.¹, Drobyk N.M.¹, Grubinko V.V.¹ 2021. **The analysis of the genetic polymorphism of *Chlorella vulgaris* Beyer. culture growing in the presence of sodium selenite, zinc sulfate and chromium chloride.** *Algologia*. 31(2): 113–125

¹Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University,
2 M. Kryvonosa Str., Ternopil 46027, Ukraine

²The Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU,
150 Zabolotnogo Str., Kyiv 03143, Ukraine

The use of microalgae for the economic needs and the commercial goals determines the areas of the scientific researches that will make it possible to increase their productivity. It is also important to direct the metabolism of the algae to the activating of certain synthetic processes in order to obtain the desired compounds. The metals and non-metals, entering into the cell, have a high biochemical activity. These elements modify the metabolic reactions in general and the metabolic reactions related to the functioning of the genome of microalgae cells. **Aim.** The aim was to study the genetic polymorphism of *Chlorella vulgaris* under the action of such trace elements as selenium, zinc and chromium in order to optimize the methods of algae cultivation and the obtaining of the beneficial compounds. **Methods.** The hydrobiological methods of algae cultivation, DNA isolation method by Rogers S. and Bendich A. (1985), PCR-analysis with ISSR (inter simple sequence repeats)- and IRAP-markers (inter-retransposon amplified polymorphism) have been used. **Results.** For all samples of *C. vulgaris* 109 DNA-fragments were obtained and 42 of them were polymorphic (38.5%). Jacquard distances (D_J) between the samples of *C. vulgaris* culture (cultures are grown on the media with different elements compositions and control (standard conditions) were 0.232 (only selenite), 0.206 (selenite and zinc) and 0.300 (selenite and chromium). **Conclusions.** Probably the genetic modifications of *C. vulgaris* cells are caused by the additional introduction of the microelements into the culture medium. The genetic polymorphism of the algae grown on media with various trace elements and their combinations was like the genetic polymorphism of the unicellular green algae grown in the natural conditions. It indicates the absence of significant genotoxic effects of the trace elements and high metabolic and genetic plasticity of algal culture.

Key words: *Chlorella vulgaris*, microelements, ISSR- and IRAP-PCR, genetic polymorphism, Jacquard distance