



УДК 575.174.015.3:582.263

© 2011

В. І. Корховий, Я. В. Пірко, П. М. Царенко,
академік НАН України **Я. Б. Блюм**

Генетична диференціація штамів *Botryococcus braunii* Kütz. — продуцентів ліпідів — за допомогою RAPD фінгерпринтингу

Досліджено чотири штами Botryococcus braunii колекції Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України за допомогою аналізу RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA — довільно ампліфікована поліморфна ДНК). Найбільшу кількість ампліконів серед трьох використаних для реакції довільних праймерів — OPP-12, OPP-15, OPP-17 — отримано для праймера OPP-17. Виділені фінгерпринти свідчать про можливість використання RAPD аналізу для генетичної диференціації штамів та дають змогу встановити генетичні дистанції між ними.

Мікродорості вважаються одним з перспективних джерел біопалива [1]. Тому серед першочергових завдань біотехнології особливого значення набуває пошук та визначення найпродуктивніших видів мікродоростей та формування їх штамів, які характеризувалися б високими показниками вмісту ліпідів і високою швидкістю росту за умов штучного культивування. Одним з найважливіших та потенційно перспективних видів для отримання ліпідів є представник зелених водоростей — *Botryococcus braunii* Kütz. [2]. Типова морфологія колоній *Botryococcus braunii* Kütz. характеризується кокоїдною організацією клітин, з'єднаних разом слизовим променезаломлюючим матриксом, та наявністю в них значної кількості ліпідів. Разом з цим спостерігається значна мінливість морфологічних ознак у природних та лабораторних умовах, зокрема в структурі колоній, характері розміщення клітин та їх поєднанні в слизу, розмірах і формі клітин тощо. Така морфологічна строкатість обумовлює складність класичної ідентифікації мікродоростей і свідчить про значну їх гетерогенність та можливість розрізнення на підставі морфологічної диференціації декількох видів роду *Botryococcus* Kütz. [3]. Проте ще й до теперішнього часу залишається відкритим питання щодо чіткого розмежування окремих видів цього роду та встановлення їх таксономічної самостійності, а також внутрішньовидових різновидів найвідомішого представника — *B. braunii*.

Нині проводяться інтенсивні дослідження цього виду із залученням молекулярно-біологічних методів і запропоновано різні підходи для систематизації та штамової ідентифікації *B. braunii* [4–7]. Серед застосованих молекулярних методів найчастіше використовуються

аналіз ISSR [4] та аналіз послідовностей генів 18S рРНК [5, 6] і 16S рРНК [7]. У зв'язку з тим, що в Україні розпочата робота з отримання нових штамів ботріокока — продуцентів біодизелю, виникла нагальна потреба систематизації наявних його штамів. Тому наша мета полягала у визначенні можливості ідентифікації різних штамів *B. braunii* і отриманні індивідуальних, високоспецифічних фінгерпринтів для кожного досліджуваного штаму за допомогою методу RAPD-ПЛР.

Об'єктами дослідження були чотири штами водоростей з роду *Botryococcus*, які, за даними літератури, здатні до накопичення значної кількості ліпідів [8, 9], а саме штами *B. braunii*: ССАР 807–1, ССАР 807–2, ССАЛА 777, ССАЛА 778 з колекції культур водоростей та протистів Великої Британії (ССАР) і колекції культур автотрофних організмів Інституту ботаніки АН Чеської республіки (м. Тржебон), які зберігаються в колекції IBASU-A Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

Досліджувані лінії вирощували за єдиною стандартною схемою протягом трьох тижнів. Культивування здійснювали в колбах з 50 мл рідкого живильного середовища на люміностації при освітленості 3000–4000 лк і температурі 26–28 °С. Приріст біомаси оцінювали шляхом прямого підрахунку кількості клітин у камері Горяєва на 7-му, 14-ту та 21-шу добу і вагових характеристик сухої речовини методом прямого зважування. Водорості вирощували на різних мінеральних живильних середовищах (Тамія, Болда, Бурреллі, Чу-13). Засів на використовуваних середовищах проводили з однаковою кількістю клітин (близько 40–50 тис. кл./мл). Для виділення ДНК брали 50 мл 21-добової суспензії різних штамів водоростей, відстоювали протягом 4 год, після чого 1 мл осаду мікроводоростей переносили в центрифужну мініпробірку типу Eppendorf та центрифугували при 14,5 тис. обертів протягом 5 хв. Супернатант зливали і отриманий осад за допомогою піпетки переносили в ступку, охолоджену рідким азотом. Швидкозаморожену культуру розтирали в ступці та виділяли ДНК за допомогою набору реактивів “GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit” (“Sigma”, США). Якість отриманої ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1%-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію. Концентрацію виділеної ДНК вимірювали за допомогою приладу “BioPhotometer” (“Eppendorf”, Німеччина).

Молекулярно-генетичний аналіз виконували, використовуючи RAPD-ПЛР метод (Random Amplified Polymorphic DNA), перевагою якого є технічна простота та швидкість проведення експерименту. Метод не потребує будь-якої інформації щодо послідовностей ДНК, яка для аналізу необхідна в невеликій кількості. Для ампліфікації ДНК використовували три праймера компанії “Operon” (США): OPP-12 (AAGGGCGAGT), OPP-15 (GGAAGCCAAC), OPP-17 (TGACCCGCCT). Реакційна суміш для проведення полімеразної ланцюгової реакції об'ємом 25 мкл містила: 50 нг геномної ДНК; по 0,2 мкМ кожного праймера; 200 мкМ кожного: dATP, dCTP, dGTP та dTTP; 2,5 мМ MgCl₂; 2,5 одиниці Taq-полімерази (“Реплікон”, Росія). Ампліфікацію здійснювали на ампліфікаторі АВ-2720 (“Applied Biosystems”, США) за такою програмою: початкова денатурація при 95 °С, 5 хв; ампліфікація — 45 циклів (95 °С — 1 хв, 35 °С — 1 хв, 72 °С — 2 хв); кінцеве подовження — 72 °С протягом 7 хв. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 2%-му агарозному гелі в 1X TBE-буфері в присутності етидію броміду. Візуалізацію фрагментів проводили в ультрафіолетовому світлі. Для визначення довжини фрагментів використовували ДНК-маркер (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use) фірми “Fermentas” (Литва).

Для кількісної оцінки генетичного поліморфізму досліджуваних видів отримані дані були представлені у вигляді матриці бінарних ознак, у якій наявність чи відсутність однакових фрагментів ДНК розглядалася відповідно як стан 1 чи 0, при цьому враховувалися

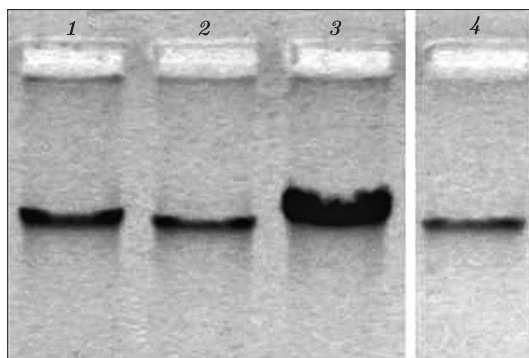


Рис. 1. Електрофореграма ДНК, яка була виділена з різних штамів *B. braunii*, доріжки 1–4: 1 — штам SSAP 807-1; 2 — штам SSAP 807-2; 3 — штам SSALA 777; 4 — штам SSALA 778

тільки відтворювані в повторних експериментах фрагменти. Кожний RAPD-фрагмент розглядався як окремий генетичний локус [10].

Генетичні дистанції Нея–Лі [11] розраховано за допомогою програми TREES [12]. У подальшому вони використані для кластеризації досліджуваних штамів (UPGMA метод).

Серед протестованих середовищ щодо ростових характеристик *B. braunii* та процесу приросту біомаси за оптимальне визначено середовище Чу-13. Виділена за допомогою “GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit” ДНК була цілісною і її кількість становила від 20 мкг/мл (штам SSALA 778, 4 на електрофореграмі) до 38 мкг/мл (штам SSALA 777, 3 на електрофореграмі), що достатньо для проведення подальшого RAPD-ПЛР аналізу (рис. 1). При визначенні концентрації ДНК також встановлено, що отриманий препарат ДНК містить невелику кількість полісахаридів, білків, інших домішок, які незначною мірою можуть вплинути на перебіг RAPD-ПЛР. Інші дослідники повідомляють про не менш успішне виділення ДНК з багатьох інших мікрободоростей з використанням різних методів [13, 14]. Однак такі методи потребують більшої кількості матеріалу для виділення та часу (від 8 год до 1 доби), хоч і дешевші порівняно з використаним нами набором реактивів.

У подальшому проводили ампліфікацію виділеної тотальної ДНК з використанням трьох декамерних праймерів, а саме: OPP-12, OPP-15, OPP-17. Більшість фрагментів була в межах 200–2000 п. о. У результаті проведеного аналізу досліджуваних штамів ідентифіковано 36 поліморфних локусів, з них на OPP-12 припадало 6 локусів, на OPP-15 — 11, а на OPP-17 — 19 (рис. 2, для OPP-12 дані не наведено). Разом з цим не виявлено жодного мономорфного локусу. Кожен з досліджуваних штамів *B. braunii* мав свій чітко визначений спектр ампліфікованих RAPD-продуктів. Штами відрізнялись за кількістю фрагментів (табл. 1). Більшість виявлених ампліконів були штам-специфічними.

Таблиця 1. Кількість смуг (ампліконів), які детектуються в досліджуваних штамів *B. braunii* за умов проведення аналізу з RAPD праймерами OPP-12, OPP-15, OPP-17

Штами <i>B. braunii</i>	Кількість смуг			
	OPP-12	OPP-15	OPP-17	У цілому
SSAP 807-1	1	6	4	11
SSAP 807-2	0	2	8	10
SSALA 777	3	3	7	13
SSALA 778	2	4	7	13
Для усіх досліджених штамів	6	11	19	36

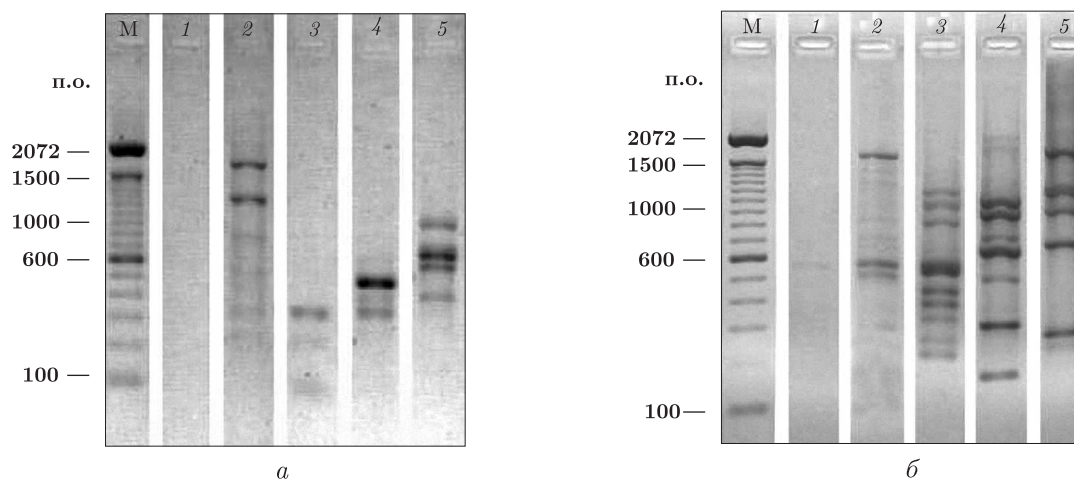


Рис. 2. Результати ампліфікації ДНК з різних штамів *B. braunii* з праймерами OPP-15 (а) та OPP-17 (б). М — маркер молекулярної довжини (п. о. — пар основ); доріжки 1–5: 1 — вода; 2 — штамів SSAP 807-1; 3 — штамів SSAP 807-2; 4 — штамів SSALA 777; 5 — штамів SSALA 778

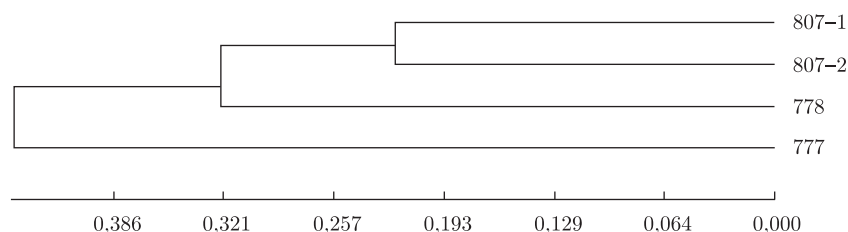


Рис. 3. Дендрограма, побудована за значеннями генетичної дистанції Нея–Лі [11], яка відображає диференціацію досліджуваних штамів

На підставі даних RAPD аналізу за допомогою програми TREES розраховані генетичні дистанції Нея–Лі [9] (табл. 2), які в подальшому використані для проведення кластеризації (UPGMA метод) досліджуваних штамів (рис. 3). Виявилося, що генетичні дистанції між досліджуваними штамами доволі чітко відрізняються, що свідчить про непогані диференціюючі властивості RAPD аналізу і даної підбірки праймерів. Отримані дані підтверджують можливість використання RAPD аналізу як ефективного експрес-методу виявлення генетичного поліморфізму, що особливо важливо для маловивчених таксономічних груп, таких як рід ботріокок. Згідно з результатами кластеризації штамів, найменші генетичні відмінності існують між штамами *B. braunii* SSAP 807-1 та SSAP 807-2, а найбільш диференційованим виявився штамів SSALA 777 (див. рис. 3).

Таким чином, отримані фінгерпринти засвідчують існування відмінностей між досліджуваними штамами *B. braunii* і можливість використання RAPD аналізу для генетичного

Таблиця 2. Генетичні дистанції Нея–Лі [11] між досліджуваними штамами *B. braunii*

Штами <i>B. braunii</i>	SSAP 807-1	SSAP 807-2	SSALA 777	SSALA 778
SSAP 807-1	***	0,228	0,335	0,335
SSAP 807-2	0,228	***	0,470	0,326
SSALA 777	0,335	0,470	***	0,497
SSALA 778	0,335	0,326	0,497	***

маркування високопродуктивних штамів цього виду мікроводоростей. Відповідно, завдяки розширенню наших уявлень про будову геному *B. braunii* [7] можливим буде у найближчій перспективі застосування й інших молекулярних маркерів: отриманих прямим секвенуванням ДНК, мікросателітів, поліморфних маркерів з однонуклеотидними замінами (SNP) та ПЛР-маркерів на основі поліморфізму довжин продуктів ампліфікації (AFLP). Це, у свою чергу, забезпечить умови для скорочення часу та спрощення засобів, необхідних для аналізу колекційних зразків ботріокока з метою їх упорядкування та подальшого використання в селекційному процесі.

Робота виконана за проектами № 50 та № 51 цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України “Біомаса як паливна сировина” (“Біопалива”).

1. Service R. F. ExxonMobil fuels Venter's efforts to run vehicles on algae-based oil // Science. – 2009. – **325**. – P. 379.
2. Metzger P., Largeau C. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – **66**, No 5. – P. 486–496.
3. Komarek J., Marvan P. Morphological differences innatural populations of the genus *Botryococcus* (Chlorophyceae) // Arch. Protistenk. – 1992. – **141**. – P. 65–100.
4. Dayananda C., Sarada R., Kumar V., Ravishankar G. A. Isolation and characterization of hydrocarbon producing green alga *Botryococcus braunii* from Indian freshwater bodies // Electron. J. Biotechnol. – 2007. – **10**, No 1. – P. 78–91.
5. Senousy H. H., Beakes G. W., Hack E. Phylogenetic placement of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophaceae) and *Botryococcus sudeticus* isolate UTEX 2629 (Chlorophyceae) // J. Phycology. – 2004. – **40**. – P. 412–423.
6. Weiss T. L., Johnston J. S., Fujisawa K. et al. Phylogenetic placement, genome size, and GC content of the liquid-hydrocarbon-producing green microalga *Botryococcus braunii* strain Berkeley (Showa) (Chlorophyta) // Ibid. – 2010. – **46**, No 3. – P. 534–540.
7. Sawayama S., Inoue S., Yokoyana S. Phylogenetic position of *Botryococcus braunii* (Clorophyceae) based on small subunit ribosomal RNA sequence data // Ibid. – 1995. – **31**. – P. 419–420.
8. Metting F. B. Biodiversity and application of microalgae // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 1996. – **17**, No 5–6. – P. 477–489.
9. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. Commercial applications of microalgae // J. Biosci. Bioeng. – 2006. – **101**, No 2. – P. 87–96.
10. Бронникова С. В., Кокаева З. Г., Гостимский С. А. и др. Анализ ДНК-полиморфизма реликтового вида Урала наперстянки крупноцветковой (*Digitalis grandiflora* Mill.) с помощью RAPD- и ISSR-маркеров // Генетика. – 2007. – **43**, № 5. – С. 653–659.
11. Nei M., Li W. H. Mathematical model for studing genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1979. – **76**. – P. 5269–5273.
12. Календарь Р. Н. Компьютерная программа для построения эволюционных деревьев на основе электрофореграмм ДНК и белков // Материалы конф. “Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений”. – Киев, 1994. – С. 25–26.
13. Wu X., Zarka A., Boussiba S. A Simplified protocol for preparing DNA from filamentous Cyanobacteria // Plant Mol. Biol. Report. – 2000. – **18**. – P. 385–392.
14. Fawley M. W., Fawley K. P. A simple and rapid technique for the isolation of DNA from microalgae // J. Phytology. – 2004. – **40**. – P. 223–225.

*Інститут харчової біотехнології та геноміки
НАН України, Київ
Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 19.05.2010

V. I. Korkhovyy, Ya. V. Pirko, P. M. Tsarenko,
Academician of the NAS of Ukraine **Ya. B. Blume**

**Genetic differentiation of strains *Botryococcus braunii* Kütz.,
a producer of lipids, by RAPD fingerprinting**

Four strains of Botryococcus braunii, which are on the storage in a collection of M. G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine, are studied by the method of RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA). Among three random primers (OPP-12, OPP-15, OPP-17) used for the reaction, the most of amplicons are obtained with primer OPP-17. Our data indicate that the RAPD analysis can be used for the genetic differentiation and for the estimation of relationships between strains.