doi: https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.01.093
УДК 577.21:582.259

Я.В. Пірко[1], А.М. Рабоконь[1], А.С. Постовойтова[1], Ю.О. Білоножко[1], Л.О. Калафат[1], О.В. Борисова[2], П.М. Царенко[2], Я.Б. Блюм[1]

[1] ДУ "Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України", Київ
[2] Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ
E-mail: yarvp1@gmail.com

Поліморфізм довжини інтронів генів β-тубуліну у мікроводоростей

Представлено академіком НАН України Я.Б. Блюмом

За допомогою аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β-тубуліну здійснено генетичне профілювання восьми видів (десяти штамів) мікроводоростей з колекції IBASU-A Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Вперше встановлено закономірності відмінностей ДНК-профілів таксономічних одиниць мікроводоростей родового рівня, а саме: Acutodesmus, Desmodesmus, Dunaliella, Tribonema та Euglena. Показано можливість використання методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β-тубуліну для міжвидової та внутрішньовидової диференціації мікроводоростей.

Ключові слова: *мікроводорості, молекулярно-генетичні маркери, гени β-тубуліну, інтрони.*

Представники відділів *Chlorophyta*, *Ochrophyta* та *Euglenophyta* є невід'ємною складовою біорізноманіття різних екосистем. Багато видів водоростей широко застосовуються для вирішення технічних, господарських та наукових задач людства [1—3]. На сьогодні існує проблема ідентифікації різних видів мікроводоростей, в основі якої лежить поліфілетичне походження багатьох з них та наявність видів-двійників. Морфологічні методи не завжди дають змогу розрізнити критичні види водоростей, а інколи є неоднозначними під час ідентифікації окремих родів. Зазвичай їх диференціюють за відмінностями репродуктивної фази або особливостями життєвого циклу. Такі методи потребують довгострокових спостережень за живими клітинами водоростей, глибоких знань їх морфології та порівняння значного об'єму інформації [1, 3]. Усе частіше для з'ясування питань філогенетики та видоідентифікації застосовують різноманітні молекулярно-генетичні маркери [4, 5].

В останні роки для вирішення багатьох питань міжвидової та внутрішньовидової диференціації організмів застосовують аналіз поліморфізму довжини інтронів різних генів [6]. Зокрема, метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β-тубуліну (TBP (tubulin based

© Я.В. Пірко, А.М. Рабоконь, А.С. Постовойтова, Ю.О. Білоножко, Л.О. Калафат, О.В. Борисова, П.М. Царенко, Я.Б. Блюм, 2019

polymorphism)) вважається надійною та стабільно працюючою для різних видів вищих рослин системою молекулярно-генетичних маркерів [7]. Цей метод базується на консервативності послідовностей екзонів генів β-тубуліну в усіх еукаріотичних організмів. Крім того, у рослин майже всі гени β-тубуліну мають подібну організацію [8]. Тож можна припустити, що дослідження довжини інтронів генів β-тубуліну може стати надійним інструментом для генетичного профілювання різних таксонів зелених мікроводоростей.

Матеріали та методи. У дослідженні використано вісім видів (10 штамів) мікроводоростей з колекції IBASU-A Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного, що представляли три філи — зеленої (*Chlorophyta*), жовтої або жовто-зеленої (*Ochrophyta*) та евгленофітової (*Euglenophyta*) лінії еволюції. Вибрані види та штами у філогенетичному відношенні формують добре відокремлені клади і мають різну таксономічну належність на рівні найвищих таксономічних одиниць (відділів). Вони належать до п'яти родів трьох таксономічних відділів: *Acutodesmus acuminatus* (Lagerh.) P. Tsarenko, штам IBASU-A 245, *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) P.Tsarenko, штам IBASU-A 251, *Acutodesmus dimorphus*, штам IBASU-A 344, *Desmodesmus armatus* (Chodat) E.Hegew., штам IBASU-A 338, *Desmodesmus armatus*, штам IBASU-A 263, *Desmodesmus subspicatus* (Chodat) E.Hegew. et A.Schmidt, штам IBASU-A 408, *Dunaliella salina* (Dunal) Teodor., штам IBASU-A 4, *Dunaliella minuta* W.Lerche, штам IBASU-A 40 (*Chlorophyta*), *Tribonema ulotrichoides* Pascher, штам IBASU-A 520 (*Ochrophyta*) та *Euglena* sp., штам IBASU-A 498 (*Euglenophyta*).

Тотальну геномну ДНК мікроводоростей екстрагували за допомогою ЦТАБ-методу [9]. Якість і кількість ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1,5 %-му агарозному гелі і спектрофотометрично на біофотометрі "Eppendorf" з визначенням концентрації і ступеня забруднення ДНК. Зразки ДНК зберігали при –20 °С.

ТВР- та сТВР(комбінаторний ТВР-метод)-аналізи виконували з використанням універсальних праймерів, узятих з літературних джерел. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснювали на ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 ("Applied Biosystems", США) згідно з Bardini із співавт., 2004 [7, 10]. Кожну реакцію проводили як мінімум у двократній повторності з використанням негативного контролю. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 6 %-му неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1 × ТВЕ-буфері при 350 В, візуалізацію фрагментів проводили шляхом їх фарбування нітратом срібла [11]. Довжину відтворюваних і найбільш чітких фрагментів визначали, використовуючи ДНК-маркер (O'Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; "Fermentas", Литва). Зображення аналізували за допомогою програми GelAnalyzer [12]. Для кластерного аналізу, який здійснювали за допомогою методу UPGMA з використанням програми FreeTree (https://web.natur.cuni.cz/~flegr/programs/freetree.htm), були використані значення подібності Нея та Лі. Для оцінки достовірності побудованих дерев проведено бутстреп-аналіз для 1000 повторностей розподілу зразків. Отримані дендрограми візуалізували за допомогою програми FigTree v1.4.2 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

Результати та їх обговорення. Варто зазначити, що ТВР-маркерна система раніше використовувалася для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β-тубуліну тільки вищих рослин. Результати проведеного електрофоретичного аналізу досліджуваних видів і штамів мікроводоростей з використанням ТВР-маркерів показали, що переважна більшість чітких та поліморфних смуг (ампліконів інтронів генів β-тубуліну) візуалізувалася в діапазоні

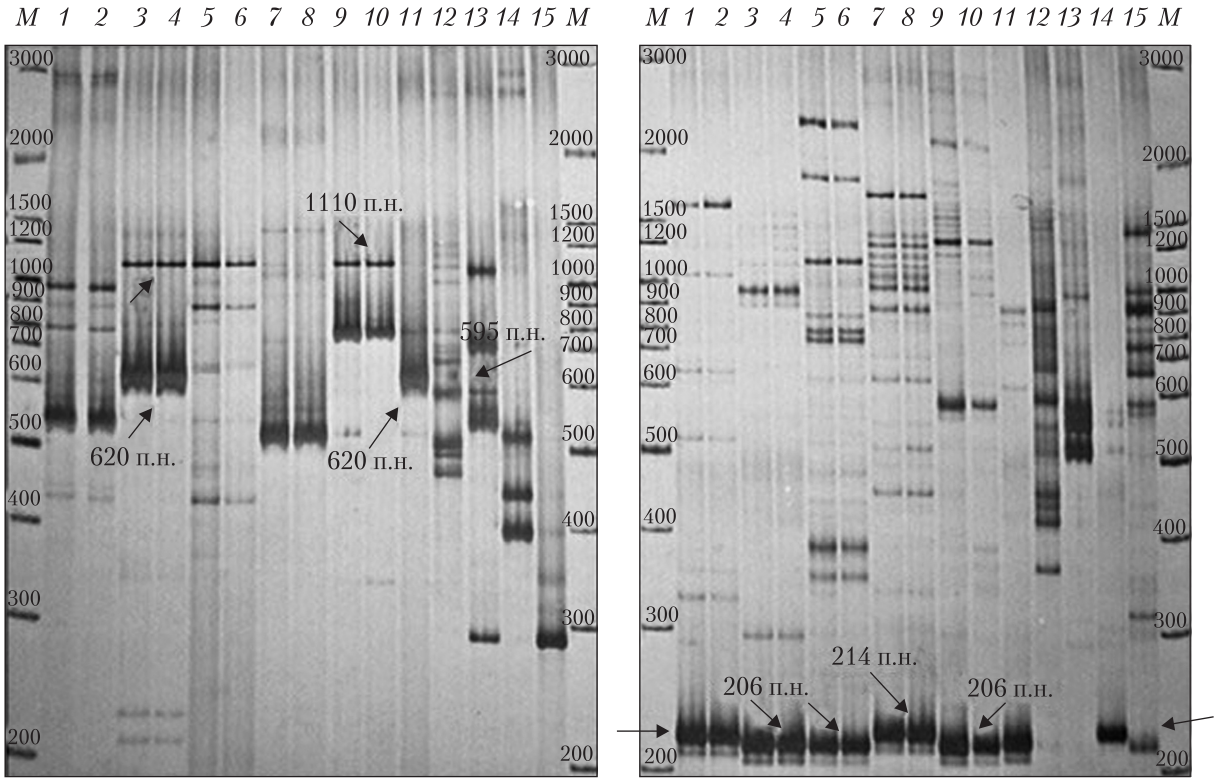

Рис. 1. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів β-тубуліну водоростей (інтервал 200—3300 п. н.), отримана за допомогою ТВР- (*а*) та сТВР-методів (*б*). *Номери зразків: 1, 2 — Acutodesmus dimorphus* (штам IBASU-A 251); *3, 4 — Desmodesmus armatus* (штам IBASU-A 263); *5, 6 — Acutodesmus dimorphus* (штам IBASU-A 344); *7, 8 — Acutodesmus acuminatus* (штам IBASU-A 245); *9, 10 — Desmodesmus armatus* (штам IBASU-A 338); *11 — Desmodesmus subspicatus* (штам IBASU-A 408); *12 — Dunaliella minuta* (штам IBASU-A 40); *13 — Dunaliella salina* (штам IBASU-A 4); *14 — Tribonema ulotrichoides* (штам IBASU-A 520); *15 — Euglena* sp. (штам IBASU-A 498); M — ДНК-маркер O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder ("Fermentas")

290—1200 п. н. (рис. 1, *а*). Крім того, на електрофореграмі спостерігалася поява нечітких смуг, характерних для ПЛР-продуктів неповної ампліфікації ДНК. У подальшому ці амплікони не аналізувалися. Діапазон довжин утворюваних фрагментів інтронів генів β-тубуліну в цілому відповідає очікуваним результатам ампліфікації першого інтрона з невеликими ділянками першого та другого екзонів [7].

Для кожного зразка спостерігалося формування ДНК-профілю зі специфічним набором та розподілом ампліконів інтронів генів β-тубуліну з певними відмінностями. При цьому ТВР-профілі відрізнялися для таксономічних одиниць різного рівня (міжродового, міжвидового та між окремими штамами). Зокрема, утворювалися ДНК-специфічні профілі, що містили фрагменти інтронів генів β-тубуліну, для кожного з п'яти родів мікроводоростей, а саме: *Acutodesmus*, *Desmodesmus*, *Dunaliella* та родів *Tribonema* і *Euglena*. На міжвидовому рівні виявлений поліморфізм інтронів генів β-тубуліну у видів *A. acuminatus* (штам IBASU-A 245) та *A. dimorphus* (штами IBASU-A 251 та IBASU-A 344). Також були проаналізовані різні види роду *Desmodesmus*. Встановлено, що *D. armatus* (штам IBASU-A 263) та *D. subspi-*

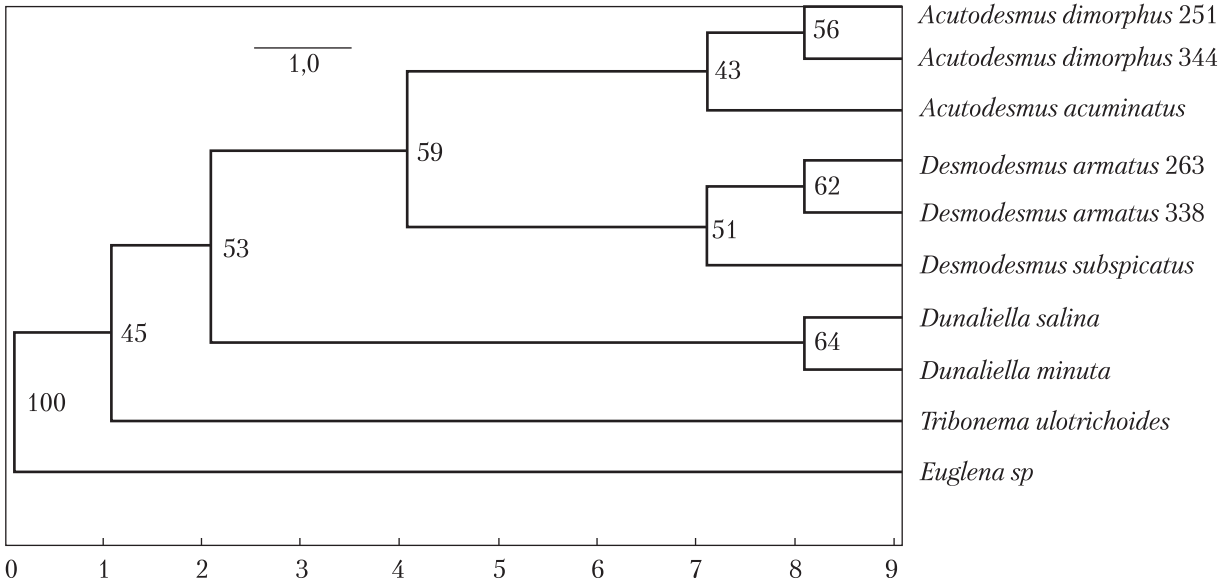

Рис. 2. UPGMA-дендрограма, побудована на підставі результатів аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β-тубуліну у досліджених зразків мікроводоростей

catus (штам IBASU-A 408) мали однаковий фрагмент ДНК завдовжки близько 620 п. н., хоча у *D. armatus* (штам IBASU-A 338) цей фрагмент був відсутній. Для *Dunaliella salina* (штам IBASU-A 4) та *D. minuta* (штам IBASU-A 40) показано утворення відмінних ТВР-профілів лише з одним однаковим фрагментом завдовжки близько 595 п. н.

З метою генетичного профілювання та диференціації мікроводоростей на рівні окремих штамів у межах одного виду було проаналізовано по два штами *A. dimorphus* (штам IBASU-A 251 і штам IBASU-A 344) та *D. armatus* (штам IBASU-A 338 і штам IBASU-A 263). За результатами ТВР-аналізу виявлено значні відмінності в ДНК-профілях досліджених штамів. Два штами *A. dimorphus* містили унікальні амплікони інтронів генів β-тубуліну, а в штамів *D. armatus* виявлено лише один спільний фрагмент у діапазоні від 1000 до 1200 п. н.

Дані фінгерпринтингу за першим інтроном гена β-тубуліну були використані для кластерного аналізу за допомогою методу UPGMA. З отриманої дендрограми (рис. 2) видно, що, з одного боку, всі зразки, хоч і не з високою бутстреп-підтримкою, диференціюються один від одного, а з іншого — розподіляються на три кластери згідно з існуючою таксономічною класифікацією, при цьому в межах кожного кластера зберігається генотипова унікальність.

У подальшому для всіх досліджуваних видів та штамів була застосована варіація ТВР-аналізу, яка передбачає оцінку поліморфізму довжини другого інтрона генів β-тубуліну — сТВР метод [13]. Раніше такий підхід використовувався лише для генотипування вищих рослин. Тож у цьому дослідженні вперше показані результати сТВР-аналізу мікроводоростей. У кожному з проаналізованих із використанням сТВР-маркерів зразків утворювалися чіткі і відтворювані фрагменти ДНК, що містили другий інтрон генів β-тубуліну, які варіювали в діапазоні від 200 до 3000 п. н. (див. рис. 1, *б*).

На міжродовому рівні для кожного з п'яти досліджуваних родів мікроводоростей показано утворення ДНК-профілів, які значно відрізнялися один від одного. Варто зазначити,

що смуга поліморфних ампліконів, розташованих вище 200 п. н., є характерною для представників усіх проаналізованих родів. Винятком є штами роду *Dunaliella*: *D. salina* (штам IBASU-A 4) та *D. minuta* (штам IBASU-A 40), у яких ці фрагменти відсутні.

На міжвидовому рівні виявлений поліморфізм ампліконів інтронів генів β-тубуліну у видів *A. acuminatus* (штам IBASU-A 245) та *A. dimorphus* (штами IBASU-A 251 і IBASU-A 344). До того ж ДНК-профілі цих видів не містили однакових фрагментів інших інтронів генів β-тубуліну, крім фрагментів завдовжки близько 214 п. н. у зразків *A. dimorphus* (штам IBASU-A 251) та *A. acuminatus* (штам IBASU-A 245). Результати cTBP-аналізу різних видів роду *Desmodesmus* — *D. armatus* (штами IBASU-A 338 і IBASU-A 263) та *D. subspicatus* (штам IBASU-A 408) — свідчать про те, що їхні ДНК-профілі містять лише один однаковий фрагмент ДНК завдовжки близько 206 п. н. Для видів *Dunaliella salina* (штам IBASU-A 4) та *D. minuta* (штам IBASU-A 40) показано утворення відмінних cTBP-профілів і відсутність спільних ампліконів другого інтрона генів β-тубуліну.

На підставі результатів порівняння, отриманих із застосуванням двох споріднених підходів — оцінки TBP та cTBP, доходимо висновку, що обидві маркерні системи придатні для генотипування різних зразків мікроводоростей. Кожна з цих ДНК-маркерних систем дає змогу отримати низку чітких та відтворюваних фрагментів, що містять перший (для TBP) та другий (для cTBP) інтрони генів β-тубуліну. Специфічні TBP- та cTBP-профілі значно відрізняються між собою за кількістю та розташуванням цільових ампліконів інтронів, однак дають можливість чітко диференціювати генотипи мікроводоростей різних таксономічних рівнів. Загалом отримані результати свідчать про доцільність подальшого використання даних ДНК-маркерів для генотипування та аналізу різних таксонів водоростей.

Таким чином, вперше за допомогою TBP- та cTBP-аналізу досліджено поліморфізм довжини інтронів генів β-тубуліну у мікроводоростей на міжродовому і міжвидовому рівнях. Результати генотипування і диференціації штамів показали значні відмінності між представниками різних таксономічних одиниць. TPB та cTBP-маркери виявилися простими, швидкими і надійними молекулярно-генетичними інструментами, які можуть бути застосовані для генотипування та диференціації мікроводоростей.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Темралеева А.Д., Минчева Е.В., Щербаков Д.Ю., Пинский Д.Л. ДНК-штрихкодирование зеленых водорослей: обзор. *Альгология*. 2013. **23**, № 4. С. 396—418.
2. Царенко П., Борисова О., Блюм Я. Мікроводорості як об'єкт біоенергетики: види колекції IBASU-A — перспективні продуценти біомаси як джерела сировини для біопалива. *Вісн. НАН України*. 2011. № 5. С. 49—54.
3. Chikkaswamy B.K., Paramanik R.Ch. Molecular distinction of algae using molecular marker. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2016. **5**, № 9. P. 489—495. doi: https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.509.054
4. Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И., Демкович А.Е., Лутова Л.А. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений. *Экол. генетика*. 2011. **9**, № 1. С. 32—43.
5. Wongsawad Ph., Peerapornpisal Yu. Molecular identification and phylogenetic relationship of green algae, *Spirogyra ellipsospora* (Chlorophyta) using ISSR and rbcL markers. *Saudi J. Biol. Sci*. 2014. **21**. P. 505—510. doi: https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.01.003 1319-562X
6. Xia X., Luan L.L., Qin G., Yu L.F., Wang Zh.W., Dong W.C., Song Y., Qiao Y., Zhang X.S., Sang Y.L., Yang L. Genome-wide analysis of SSR and ILP markers in trees: diversity profiling, alternate distribution, and applications in duplication. *Sci. Rep*. 2017. **7**, № 1. 17902. doi: https://doi.org/10.1038/s41598-017-17203-6

7. Bardini M., Lee D., Donini P., Mariani A., Giani S., Toschi M., Lowe C., Breviario D. Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome*. 2004. **47**. P. 281—291.
8. Rabokon A.N., Pirko Ya.V., Demkovych A.Ye., Blume Ya.B. Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β-tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. *Cytol. Genetics*. 2018. **52**, № 1. P. 1—10.
9. Molecular cloning: a laboratory manual: Sambrook J., Russell D.W. (eds.). Vol. 2. Cold Spring Harbor: Cold Spring Laboratory Press, 2001. 2100 p.
10. Breviario D., Baird W.V., Sangoi S., Hilu K., Blumetti P., Gianì S. High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined beta-tubulin introns. *Mol. Breed*. 2007. **20**. P. 249—259.
11. Benbouza H., Jean-Marie J., Jean-Pierre B. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 2006. **10**, № 2. P. 77—81.
12. Lazar I. GelAnalyzer.com, 2010. URL: http://www.gelanalyzer.com/
13. Braglia L., Manca A., Mastromauro F., Breviario D. cTBP: A successful intron length polymorphism (ILP)-based genotyping method targeted to well defined experimental needs. *Diversity*. 2010. **2**, № 4. P. 572—585.

Надійшло до редакції 07.12.2018

REFERENCES

1. Temraleeva, A.D., Mincheva, E.V., Sherbakov, D.Yu. & Pinsky, D.L. (2013). DNA-barcoding of green algae: a review. Algologia, 23, No. 4, pp. 396-418 (in Ukrainian).
2. Tsarenko, P., Borysova, O. & Blyume, Ya. (2011). Microalgas as bioenergetics object IBASU-A collection species — perspective producers of biomass as the source of raw stuff for biofuel. Visn. Nac. Acad. Nauk Ukr., No. 5, pp. 49-54 (in Ukrainian).
3. Chikkaswamy, B.K. & Paramanik, R.Ch. (2016). Molecular distinction of algae using molecular marker. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 5, No. 9, pp. 489-495 doi: https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.509.054
4. Matveeva, T.V., Pavlova, O.A., Bogomaz, D.I., Lutova, L.A. & Demkovich, A.E. (2011). Molecular markers for plant species identification and phylogenetics. Ecol. Genetics, 9, No. 1, pp. 32-43 (in Russian).
5. Wongsawad, Ph. & Peerapornpisal, Yu. (2014). Molecular identification and phylogenetic relationship of green algae, *Spirogyra ellipsospora* (Chlorophyta) using ISSR and rbcL markers. Saudi J. Biol. Sci., 21, pp. 505-510. doi: https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.01.003 1319-562X
6. Xia, X., Luan, L. L., Qin, G., Yu, L.F., Wang, Zh.W., Dong, W.Ch., Song, Y., Qiao, Y., Zhang, X.S., Sang, Y.L. & Yang, L. (2017). Genome-wide analysis of SSR and ILP markers in trees: diversity profiling, alternate distribution, and applications in duplication. Sci. Rep., 7, No. 1, 17902. doi: https://doi.org/10.1038/s41598-017-17203-6
7. Bardini, M., Lee, D., Donini, P., Mariani, A., Giani, S., Toschi, M., Lowe, C. & Breviario, D. (2004). Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. Genome, 47, pp. 281-291.
8. Rabokon, A.N., Pirko, Ya.V., Demkovych, A.Ye. & Blume, Ya.B. (2018). Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β-tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. Cytol. Genetics, 52, No. 1, pp. 1-10.
9. Sambrook, J. & Russell, D.W. (Eds.). (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. (Vol. 2). Cold Spring Harbor: Cold Spring Laboratory Press.
10. Breviario, D., Baird, W.V., Sangoi, S., Hilu, K., Blumetti, P. & Gianì, S. (2007). High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined beta-tubulin introns. Mol. Breed., 20, pp. 249-259.
11. Benbouza, H., Jean-Marie, J. & Jean-Pierre, B. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 10, No. 2. pp. 77-81.
12. Lazar, I. (2010). GelAnalyzer.com. Retrieved from http://www.gelanalyzer.com/
13. Braglia, L., Manca, A., Mastromauro, F. & Breviario, D. (2010). cTBP: A successful intron length polymorphism (ILP)-based genotyping method targeted to well defined experimental needs. Diversity, 2, No. 4, pp. 572-585.

Received 07.12.2018

Я.В. Пирко[1], *А.Н. Рабоконь*[1], *А.С. Постовойтова*[1], *Ю.А. Белоножко*[1],
Л.А. Калафат[1], *О.В. Борисова*[2], *П.М. Царенко*[2], *Я.Б. Блюм*[1]

[1]ГУ "Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины", Киев
[2]Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев
E-mail: yarvp1@gmail.com

ПОЛИМОРФИЗМ ДЛИНЫ ИНТРОНОВ ГЕНОВ
β-ТУБУЛИНА У МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

С помощью анализа полиморфизма длины интронов генов β-тубулина осуществлено генетическое профилирование восьми видов (десяти штаммов) микроводорослей из коллекции IBASU-A Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины. Впервые установлены закономерности различий ДНК-профилей таксономических единиц микроводорослей родового уровня, а именно: *Acutodesmus*, *Desmodesmus*, *Dunaliella*, *Tribonema* и *Euglena*. Продемонстрирована возможность применения метода оценки полиморфизма длины интронов генов β-тубулина для межвидовой и внутривидовой дифференциации микроводорослей.

Ключевые слова: *микроводоросли, молекулярно-генетические маркеры, гены* β*-тубулина, интроны.*

Ya.V. Pirko[1], *A.M. Rabokon*[1], *A.S. Postovoitova*[1], *Yu.O. Bilonozhko*[1],
L.O. Kalafat[1], *O.V. Borisova*[2], *P.M. Tsarenko*[2], *Ya.B. Blume*[1]

[1]Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine, Kiev
[2]M.G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine, Kiev
E-mail: yarvp1@gmail.com

INTRON LENGTH POLYMORPHISM
OF β-TUBULIN GENES IN MICROALGAE

The genetic profiling of 8 microalgae species (10 strains) from the collection IBASU-A of Institute of Botany M.G. Kholodny of the NAS of Ukraine was performed using the intron length polymorphism analysis of β-tubulin genes. For the first time, the regularities of the differences between the DNA profiles of the microalgae taxonomic units on the generic level, namely *Acutodesmus*, *Desmodesmus*, *Dunaliella*, *Tribonema,* and *Euglena* were established. The possibility of using the method for estimating the intron length polymorphism of β-tubulin genes for the interspecies and intraspecific differentiations of microalgae in the polymorphism was demonstrated.

Keywords: *microalgae, molecular genetic markers* β*-tubulin genes, introns.*