ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ВОДОРОСЛЕЙ МОЛДОВЫ

Инна БИВОЛ [1], Анна БЫРСАН [2], Виктор ШАЛАРУ [2]
[1] Институт генетики, физиологии и защиты растений,
Академия наук, ул. Пэдурий 20,
Кишинэу, МД-2002, Молдова, Телефон: (37322) 556119,
e-mail: bivolinga@yahoo.com
[2] Молдавский государственный университет,
ул. Алексей Матеевич 60, Кишинэу, MD-
2009, Республика Молдова, Телефон: (37322) 577527, 577526,
e-mail:birsanana@mail.ru, e-mail:salaruvictor@yahoo.com

Abstract. Genetic variation between five different blue-green algae species from the collection of Moldova State University was evaluated by means of inter simple sequence repeats (ISSR) markers.

The molecular genotyping has given the possibility to reveal and describe the genetic heterogeneity, specificity and some homology of DNA-fragments. The average level of intra– and interspecific polymorphism was 45.45%. Also it was observed the presence of 6 unique amplicons found in the different species of algae which can be used as molecular markers in the genotyping and analysis of taxonomic relationships between different species of algae growing on the territory of Moldova.

The results of the present study can be seen as a starting point for future researches on the questions of characteristics different taxa of algae, their classification and passportization.

Ключевые слова: сине-зеленые водоросли, молекулярные маркеры, нуклеотидные последовательности, полиморфизм ДНК фрагментов, ISSR– анализ.

Введение

Водоросли – важный компонент водных и наземных экосистем. Они участвуют в образовании органического вещества, круговороте соединений биогенных элементов, изменяют свойства окружающей среды путём выделения продуктов жизнедеятельности, взаимодействуют с другими организмами стимулируя или подавляя их развитие, являются первичным звеном пищевых цепей, обеспечивают самоочищение водоемов и почв от загрязнений различного рода возникших в результате антропогенного фактора. Помимо важной биологической роли, водоросли являются индикаторами состояния водных и наземных экосистем и могут использоваться в процессе мониторинговых наблюдений. Учитывая огромную роль данной группы низших растений исследования связанные с выявлением генетического разнообразия водорослей с целью более точного определе-

ния их родства и систематической принадлежности весьма актуальны и своевременны.

Более широкую возможность по сравнению с классическими методами анализа предоставляют современные методы молекулярной биологии, которые являются более эффективными в решении ряда вопросов таксономического характера, генетического полиморфизма, отслеживания филогенетических отношений, составления хромосомных карт, молекулярной паспортизации, проверки генетической чистоты культуры исследуемых организмов и т.д. На сегодняшний день существует большое множество методов, предназначенных для изучения генома живых организмов, среди которых RAPD, SCAR, AFLP, SSAP, SSR, ISSR, RFLP, CAPS, STS, DArT и SNP являются наиболее часто используемыми. Каждый из этих методов имеет как определенные преимущества, так и недостатки [8, 10, 13]. Адекватный выбор типа молекулярного маркера при проведении исследования зависит в первую очередь от поставленных целей и решаемых задач, а также от разнообразия и количества необходимых маркеров, легкой их выявляемости, воспроизводимости, дешевизны, временных затрат, необходимости тестирования кодоминантных признаков, равномерного распределения по геному и наличия требуемого оборудования для анализа [13].

Для характеристики генетического разнообразия, как в пределах, так и между разными таксономическими классами широко используются ISSR–маркеры (*InterSimpleSequenceRepeats*) [1, 3, 6, 7]. Эти маркеры обладают рядом положительных свойств, делающих их очень удобными для исследований: они рассеяны по всему геному; локализованы в некодирующих регионах генома; для них характерна быстрая эволюция, обусловленная дрейфом и мутациями; свойственен менделевский доминантный тип наследования; консервативны у близких видов, что позволяет использовать одни и те же праймеры и сходные протоколы анализов для проведения исследований. Праймеры ISSR состоят из коротких тандемных повторов от 1 до 6 пар оснований длиной 15-24 нуклеотида и одного селективного нуклеотида на 3'– конце. В результате обнаружения высокого ISSR -полиморфизма в геномах растений и животных метод используется даже в выявлении генетического разнообразия в пределах близкородственных таксонов с низкой гетерогенностью [3-5, 12].

Благодаря существующим преимуществам, применение молекулярных маркеров стало неотъемлемой частью исследовательского процесса во многих областях науки.

Цель настоящей работы заключалась в оценке полиморфизма и выявлении микросателлитных маркеров, характеризующих генетическую изменчивость различных видов сине-зеленых водорослей с помощью ISSR– анализа.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 6 штаммов 5 видов сине-зеленных водорослей (*Cylindrospermum licheniforme (Bory) Kutz., Nostoc gelatinosum Schousb., Cylindrospermum licheniforme f. Alatosporum Kondrat., Anabaenopsis sp., Anabaena propinqua Setchell. et. Gardn., Calothrix elenkinii Kossinsk.*) из коллекции лаборатории „Альгологии" Молдавского Государственного Университета (Таблица 1).

Таблица 1.

Представители сине-зеленых ворослей, использованные в работе

№ п/п	Таксономическая группа				Место
	Порядок	Семейство	Род	Вид	
1.	Nostocales	Anabaenaceae Elenk.	Cylindrospermum Kutz.	Cylindrospermum licheniforme (Bory) Kutz.	Молдова
2.	Nostocales	Nostocaceae	Nostoc	Nostoc gelatinosum Schousb.	Молдова
3.	Nostocales	Anabaenaceae Elenk.	Cylindrospermum Kutz.	Cylindrospermum licheniforme f. alatosporum Kondrat.	Молдова
4.	Nostocales	Anabaenaceae Elenk.	Anabaenopsis	Anabaenopsis sp.	Молдова
5.	Nostocales	Anabaenaceae	Anabaena	Anabaena propinqua Setchell. et. Gardn.	Молдова
6.	Nostocales	Rivulariaceae (Menegh.) Elenk.	Calothrix (Ag.) V.Poljansk	Calothrix elenkinii Kossinsk.	Молдова

Общую геномную ДНК выделяли из зеленой массы водорослей по общепринятой методике[11]с незначительными модификациями: пробы ДНК очищали от рибосомальной РНК и полисахаридов, которые препятствуют нормальному протеканию реакции амплификации с помощью 12 М раствора хлорида лития с доведением его конечной концентрации в растворе до 4 М.

Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе Genset 9700 "AppliedBiosystem" по принятой методике [9]. Для ISSR-анализа использовали праймер BC808 (5'-AGA GAG AGA GAG AGA GC 3'). Амплификатор программировали на 45 циклов, которые выполнялись по следующей программе:

1. предварительная денатурация при 94ºС 4 мин – 1 цикл;
2. денатурация при 94ºС 1 мин,
   отжиг при 55ºС 1 мин,
   элонгация при 72ºС 2 мин, – 45 циклов;
3. конечная элонгация при 72ºС 7 мин – 1 цикл.

Температура отжига (Tm) подбиралась для праймера согласно формуле и оптимизировалась эмпирически **[**2]**:**

$$Tm = 4x(G+C)+2x(A+T).$$

Выделенную геномную ДНК анализировали в 1% агарозном геле, на основе 1х ТАЕ буферного раствора (40 мМ Tris-acetat, pH 8.0; 1мМ EDTA), в течение 2-3 часов при напряженности электрического поля в 2.5 В/см [9]. Качество и количество ДНК определяли на трансилюминаторе при ультрафиолетовом облучении (длина волны λ=305 нм). Продукты реакции амплификации (10-15 мкл) разделяли электрофорезом в 1.6% агарозном геле. Результаты молекулярного анализа были сфотографированы через оранжевый фильтр на цифровой фотоаппарат Canon Power Shot A640.

Математическая обработка экспериментальных данных была проведена с помощью программы MicrosoftOfficeExcel 2007. Процент полиморфизма амплифицированных фрагментов ДНК вычисляли по следующей формуле [14]:

$$П = \frac{количество\ полиморфных\ локусов}{общее\ \ число\ локусов} \times 100\%.$$

Результаты и обсуждения

Изучение генетического разнообразия различных видов сине-зеленых водорослей проводилось с помощью ISSR– анализа. Как видно из Рисунка 1, основная зона разделения фрагментов с помощью праймера BC808 располагалась в диапазоне от 332 до 707 пн. Всего было получено 11 ISSR-локусов (Рисунок 1, Таблица 2). В результате ПЦР– амплификации установлена как генетическая неоднородность, так и некоторая гомология на молекулярном уровне, что свидетельствует о совершенно различном характере представленности микросателлитных повторов у представителей различных видов водорослей.

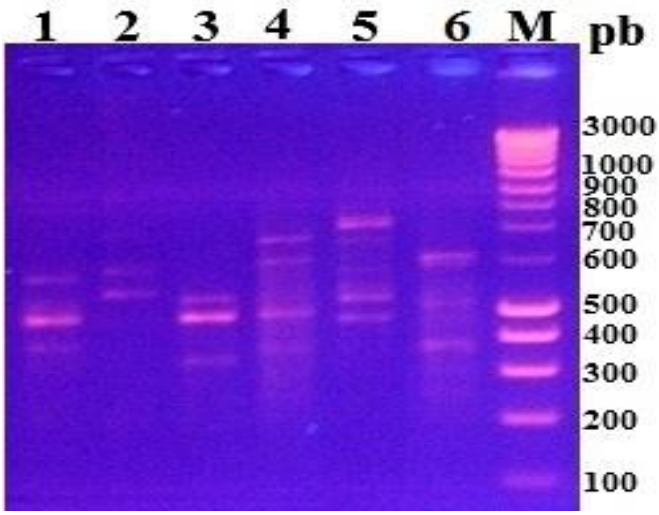


Рисунок. 1. **Электрофоретический анализ амплифицированных фрагментов ДНК различных видов водорослей в 1.6% агарозном геле. В качестве праймера использовали BC808: M – маркер marcher Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder; 1 –Cylindrospermum licheniforme (Bory) Kutz.; 2 –Nostoc gelatinosum Schousb.; 3 –Cylindrospermum licheniforme f. alatosporum Kondrat.; 4 –Anabaenopsis sp.; 5 –Anabaena propinqua Setchell. et. Gardn.; 6 – Calothrix elenkinii Kossinsk.**

ISSR-анализ не выявил общих фрагментов между исследуемыми образцами, что свидетельствует о генетической неоднородности экспериментального материала. Однако, были обнаружены 5 полиморфных локуса размером в 358, 464, 512, 520 и 600 пн, присутствующие в спектрах двух и более исследуемых генотипов (Рисунок 1, Таблица 2). Уровень полиморфизма между всеми исследованными представителями сине-зеленых водорослей составил в среднем 45.45% (Таблица 2).

Таблица 2.

Полиморфизм ДНК различных видов водорослей, выявленный ISSR **-анализом с праймером BC808.**

	Число локусов				**Процент полиморфизма**
	всего	**общих**	**полиморфных**	**специфичных**	
Рисунок 1	11	–	5	6	45.45

Кроме того, ISSR-анализ помог обнаружить имеющееся сходство ДНК между отдельными видами сине-зеленых водорослей по одному-двум амплифицированным фрагментам. Вид 1-*Cylindrospermum licheniforme (Bory)*

Kutz. в результате ПЦР-реакции образовал всего 3 амплифицированных фрагмента, 2 из которых (358 и 464 пн) встречались также у всех остальных 4 видов, кроме вида 2-*Nostoc gelatinosum Schousb*., что свидетельствует о высокой внутри– и межвидовой однородности данного образца с анализируемыми видами водорослей (Таблица 3). У вида 3-*Cylindrospermum licheniforme f. alatosporum Kondrat*. кромевнутривидовой гомологии (фрагмент в 464 пн) с видом 1-*Cylindrospermum licheniforme (Bory) Kutz),* также было отмечено межвидовое сходство с представителями видов 5-*Anabaena propinqua Setchell. et. Gardn.* по этому же фрагменту и с 6 – *Calothrix elenkinii Kossinsk*. по фрагменту в 512 пн (Таблица 3). Вид 4 – *Anabaenopsis sp.*обнаружил сходство с представителями видов1-*Cylindrospermum licheniforme (Bory) Kutz.* (358 пн) и 6-*Calothrix elenkinii Kossinsk.* (358 и 600 пн) (Таблица 3). Межвидовое сходство было отмечено у вида водоросли 5-*Anabaena propinqua Setchell. et. Gardn*. с видом 1-*Cylindrospermum licheniforme (Bory) Kutz.* (464 пн), а также с видом 2-*Nostoc gelatinosum Schousb*. (520 пн) и с видом 3-*Cylindrospermum licheniforme f. alatosporum* (464 пн) (Таблица 3). Выяснено, что у вида 6-*Calothrix elenkinii Kossinsk.* имеется межвидовая гомология по общему фрагменту в 358 пн и 512 пн, соответственно, с представителями видов 1-*Cylindrospermum licheniforme (Bory) Kutz*. и 3-*Cylindrospermum licheniforme f. Alatosporum Kondrat*., а также были выявлены 2 общих фрагмента размером в 358 и 600 пн с видом 4-*Anabaenopsissp.*(Таблица 3).Самый низкий уровень гомологии наблюдался у вида 2-*NostocgelatinosumSchousb.*, который имел общий фрагмент в 520 пн только с видом 5-*Anabaena propinqua Setchell. et. Gardn.* (Таблица 3).

Таблица 3.

Схема электрофоретического профиля амплифицированных фрагментов ДНК различных видов водорослей

Праймер ВС808						
1-Cylindrospermum licheniforme (Bory) Kutz.	**2-Nostoc gelatinosum Schousb.**	**3-Cylindrospermum licheniforme f. alatosporum Kondrat.**	**4-Anabaenopsis sp.**	**5-Anabaena propinqua Setchell. et. Gardn.**	**6-Calothrix elenkinii Kossinsk.**	**Пн**
						358
						464
						512
						520
						600

Наряду с этим, ISSR-анализ выявил фрагменты, которые могут рассматриваться как специфические маркеры. Было найдено всего 6 специфичных ампликона (Таблица 2). Диапазон расположения специфичных фрагментов охватывал зону от 332 до 707 пн (Рисунок 1). Следует отметить, что специфичные фрагменты были обнаружены во всех исследуемых видах, кроме вида CalothrixelenkiniiKossinsk. что свидетельствует о наличии высокой вариабельности в исходном экспериментальном материале. Обнаруженные 6 единичных ампликонов, могут рассматриваться как видо– и подвидоспецифические маркеры.

Выводы

Анализ информативностиISSR-маркеров, полученных на коллекции сине-зеленых водорослей, показал, что данный тип маркеров применим при исследовании как внутривидового, так и межвидового генетического полиморфизма.

В ходе молекулярно-генетического анализа изучено генетическое разнообразие некоторых видов водорослей, произрастающих на территории Молдовы. В результате сравнительного анализа по ДНК маркерам (ISSR) выявлена и описана генетическая гетерогенность, специфичность и некоторая гомология ДНК-фрагментов для исходных генотипов, что свидетельствует о совершенно различном характере представленности микросателлитных повторов у представителей различных видов водорослей.

Дальнейшее проведение молекулярного анализа, возможно, более четко прояснит ситуацию в вопросах характеристики разных таксонов, их классификации и паспортизации. Кроме того, найденные специфические фрагменты ДНК могут служить молекулярными маркерами в генотипировании и анализе таксономических взаимоотношений различных видов сине-зеленых водорослей, произрастающих на территории Молдовы.

Библиография

1. Blair M.W., Panaud O. & McCouch S.R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (Oryza sativa L.). Theor. Appl.Genet., 1999,98, p. 780–792.
2. Gavrilă L. Genomica. Bucureşti: Editura enciclopedică, 2003, p. 39.
3. Godwin I.D., Aitken E. and Smith L.W. Application of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers to plant genetics. Electrophoresis, 1997, vol. 18, № 9, p.1524-1528.
4. Goulao L.L., MONTE-CORVO L. and OLIVEIRAC. M. Phenetic characterization of plum cultivars by high multiplex ratio markers: Amplified Fragment Length Polymorphisms and Inter-simple Sequence Repeats. J.Amer.Soc.Hort. Sci., 2001, 126, №1,p. 72-77.

5. Hale A.L., Miller J.C., Renganayaki K., Fritz A.K., Coombs J.J., Frank L.M., and Douches D.S. Suitability of AFLP and microsatellite marker analysis for discriminating intraclonal variants of the potato cultivar Russet Norkotah. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 2005, 130, p. 624–630.
6. Liu C.M., Xie J.H., and Ma W.H. Analysis of genetic relationships among mango germplasm using ISSR markers. Acta Hort., 2007, 763, p.185–190.
7. Pharmawati M., Y. Guijun and M.F. Patrick. Molecular variation and fingerprinting of Leucadendron cultivars (Proteaceae) by ISSR markers. Ann. Bot. (Lond.), 2005, 95, p.1163–1170.
8. Ribaut Jean-Marcel, Ragot Michel. Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. Journal of Experimental Botany, 2007, Vol. 58, № 2, p. 351–360.
9. Sambrook J., Russel D. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001, 18.125 p.
10. Semagn K., Bjornstad A., Ndjiondjop M.N. An Overview of Molecular Marker Methods for Plants. AJB, 2006, Vol. 5, № 25, p. 2540-2568.
11. Vallejos C. E., Sakiyama N. S. and Chase C. D. A Molecular Marker-Based Linkage Map of *Phaseolus vulgaris* L. Genetics, 1992, vol. 131, p. 733-740.
12. Zietkiewicz E.A., ***Rafalski*** A., ***Labuda*** D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 1994, 20, p. 176-183.
13. Омашева М.Е., Аубакирова К.П., Рябушкина Н.А. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования.Биотехнология. Теория и практика, 2013, №4, DOI: http://dx.doi.org/10.11134/btp.4.2013.3
14. Сиволап Ю. М., Солоденко А. Е., Бурлов В. В. RAPD-анализ молекулярно-генетического полиморфизма подсолнечника (Helianthus annuus). Генетика, 1998, том 34, № 2, с. 266–271.