

3
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



Чибилёв А.А.

2018

УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2018

574.586:577.29

*Е.С. Клименко^{1,2}, С.И. Беликов², Л.И. Черногор²,
Р.В. Адельшин³, Н.Л. Белькова²*

ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФОТОТРОФНЫХ СИМБИОНТОВ БАЙКАЛЬСКИХ ЭНДЕМИЧНЫХ ГУБОК

¹ Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

² Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

³ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора, Иркутск, Россия

Цель. Оценка специфичности праймеров для селективной детекции некоторых фотосинтезирующих симбионтов пресноводных губок.

Материалы и методы. Детекцию фрагментов рибосомного оперона производили в природных образцах и клеточной культуре *Lubomirskia baicalensis* методом ПЦР, с последующим клонированием и секвенированием ампликонов.

Результаты. Положительные ампликоны получены только на праймерах, фланкирующих ITS1. Последовательности из клеточной культуры идентифицированы как *Pseudomuriella* sp. и *Choricystis* sp. Фрагмент ITS1 детектируется во всех образцах и имеет разную длину. Последовательности, полученные на праймерах для цианобактерий, идентифицируются как хлоропласт *Choricystis* sp.

Заключение. Для группы Chlorophyta протестированы праймеры и получены последовательности фрагмента ITS1. Цианобактериальные праймеры CYA106L/CYA781R позволяют амплифицировать ген 16S рРНК хлоропласта эукариотических микросимбионтов.

Ключевые слова: губка, симбиоз, зеленые водоросли, цианобактерии, ITS.

E.S. Klimenko^{1,2}, S.I. Belikov², L.I. Chernogor², R.V. Adelshin³, N.L. Belkova²

SEARCH FOR GENETIC MARKERS CHARACTERIZING PHOTOTROPHIC SYMBIANTS OF BAIKALIAN ENDEMIC SPONGES

¹ Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

² Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russia

³ Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russia

Objective. Evaluation of the specificity of PCR primers for selective detection of certain photosynthetic symbionts of freshwater sponges.

Materials and methods. Detection of fragments of the ribosomal operon was performed in environmental samples and cell culture of the *Lubomirskia baicalensis* by PCR, followed by cloning and amplicon sequencing.

Results. Positive amplicons were obtained only on primers specific for ITS1. Sequences derived from the cell culture have been identified as *Pseudomuriella* sp. and *Choricystis* sp. The ITS1 fragment is detected in all samples and has a different length. Sequences obtained on cyanobacterial primers are identified as chloroplast *Choricystis* sp.

Conclusions. Primers were tested for the Chlorophyta group and sequences of the ITS1 fragment were obtained. Cyanobacterial primers CYA106L/CYA781R allow the amplification of the 16S rRNA gene of the chloroplast of eukaryotic microsymbionts.

Keywords: sponge, symbiosis, green algae, cyanobacterium, ITS.

Введение

Губки (тип Porifera) являются многоклеточными примитивными животными-фильтраторами, которые формируют симбиотические отношения с представителями разных групп организмов. Энергетическая потребность губок реализуется за счет симбиотических отношений с фотосинтезирующими организмами, разнообразие которых велико: динофлагелляты, зоохлореллы, красные водоросли, нитчатые зелёные водоросли, а также цианобактерии [1].

Симбиотические зеленые водоросли и цианобактерии помогают губке в процессе питания либо путем внутриклеточного переваривания, либо путем транслокации метаболитов, включая фиксацию азота, нитрификацию и фотосинтез, а также участвуют в химической защитной системе хозяина [2-5].

Для идентификации зеленых водорослей и определения их филогенетических взаимоотношений используют целый ряд молекулярных маркеров, включая ядерные гены рибосомальных РНК, гены большой субъединицы рибулозо-бифосфат карбоксилазы (*rbcL*) и элонгационного фактора *tu* (*tufA*) хлоропластов. Каждый из маркеров имеет свои недостатки: гены 18S и 23S рРНК не обладают достаточной вариабельностью для разделения близкородственных видов, для *rbcL* отсутствуют универсальные праймеры для всех Chlorophyta, а ген *tufA* только недавно был предложен для исследования пресноводных Chlorophyta и поэтому база последовательностей ограничена [6-11].

Так же для идентификации зеленых водорослей используются фрагменты межгенных спейсеров ITS1 и ITS2. В основном, практикуется идентификация с помощью ITS2-маркера. Однако, показано, что ITS1 является лучшим маркером, чем ITS2, из-за меньшей доли содержания GC-пар, меньшего количества инделей и меньшей вариабельности длины фрагмента [12, 13].

Целью работы стала проверка специфичности праймеров, позволяющих амплифицировать фрагменты рибосомного оперона различных групп фотосинтезирующих симбионтов байкальских эндемичных губок.

Материалы и методы

В работе тестированы праймеры, позволяющие амплифицировать фрагменты рибосомного оперона фотосинтезирующих симбиотических микроводорослей Chlorophyta и цианобактерий (табл. 1). Схема расположения праймеров представлена на рисунке 1. Генетическое разнообразие фотосинтезирующих микроорганизмов определяли в образцах одного из наиболее широко распространенных представителей спонгиофауны озера Байкал –

ветвистой губки *L. baicalensis*. В работе использованы природные пробы, отобранные в разные сезоны, а также клеточная культура.

Таблица 1. Структуры праймеров, использованных в работе.

Название	Структура 5'–3'	Ссылка
Chlorophyta		
GR_18S_F1	CGTCGCTCCTACCGATTG	Наши данные
GR_5,8_F2	GATGAAGAACGCAGCGAAATG	Наши данные
GR_5,8_R1	CAATATGCGTTCAAAGATTCGATG	Наши данные
GR_28S_R2	TCTCTAGACAACAATTC	Наши данные
Cyanobacteria		
CYA106L	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	Денисова и др., 1999
CYA781R	GACTACWGGGGTATCTAATCCCWTT	

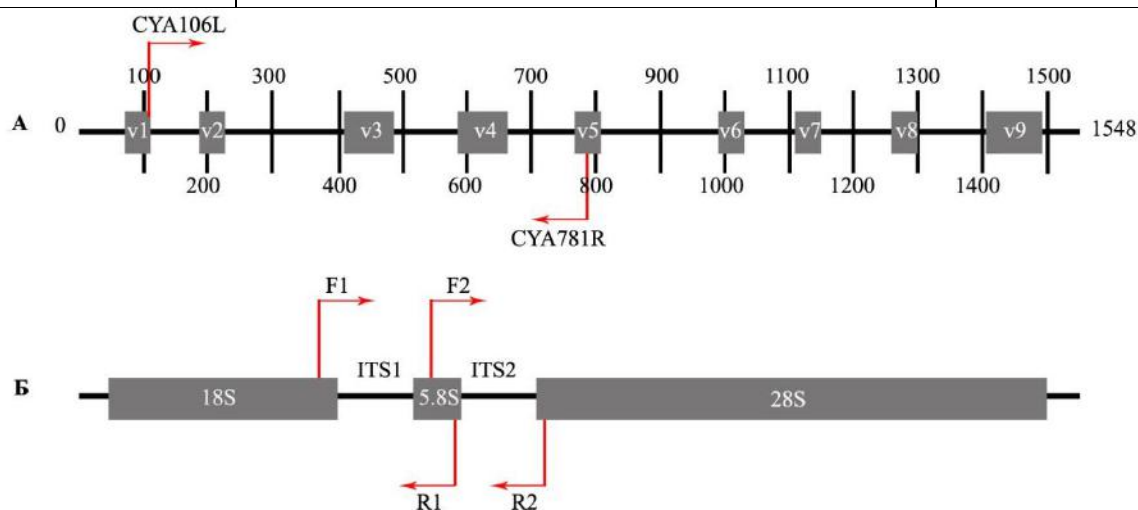


Рис. 1. Фрагменты рибосомного оперона и расположение использованных праймеров. А – малая субъединица рибосомной ДНК (16S рДНК) прокариот с указанными варибельными участками; Б – общая структура рибосомного оперона эукариот.

ДНК природных образцов выделяли с помощью лизирующего буфера из набора ДНК-сорб-В («АмплиСенс», Россия), дальнейшую очистку проводили фенол-хлороформным методом; выделение ДНК из клеточной культуры примморф - набором Quick-DNA Fecal/Soil Kits (Zymo Research, США), по протоколу фирмы-производителя.

Аmplification of DNA fragments was performed with the Encyclo Plus PCR kit («Евроген», Россия). В реакцию брали 2–3 мкл суммарной ДНК концентрацией от 5 до 15 нг/мкл. Реакцию вели в 1× буфере Encyclo, добавляли 2 мМ дНТФ, по 10 пмоль/мкл каждого праймера (табл. 1) и 0.04 ед. акт. поли-

меразы Encyclo («Евроген», Россия). Структуры праймеров, использованных в работе, представлены в таблице 1. Реакцию проводили в автоматическом амплификаторе «Бис» типа A111 («Бис», Россия) в следующем режиме: в первом цикле денатурация при 95°C – 5 мин, 30 циклов: денатурация при 95°C – 30 сек, отжиг праймеров при 58°C – 30 сек, элонгация при 72°C – 60 сек, в последнем цикле время элонгации увеличивали до 10 мин. Ампликоны анализировали в 1,5% агарозном геле (ТА буфер: Трис-ацетат – 40 мМ, N 8,0) при 80V в течение 35 мин. Ампликоны нужной длины вырезали из геля и хранили при –20°C. Целевые ампликоны использовали для лигирования с вектором pJET1/blunt и трансформации по стандартному методу с CaCl₂ [14]. Проводили прямой скрининг колоний. Анализ рекомбинантных клонов на наличие вставки нужной длины проводили амплификацией клеточного лизата с плазмидными праймерами pJet1.2 F и pJet1.2 R, рекомендованными производителем, в следующем режиме: в первом цикле денатурация при 95°C – 5 мин, 30 циклов: денатурация при 95°C – 30 сек, отжиг праймеров при 58°C – 30 сек, элонгация при 72°C – 30 сек, в последнем цикле время элонгации увеличивали до 10 мин. Все положительные ампликоны были отсекуены.

Сиквенсную реакцию вели с набором BigDye® Terminator (Applied Biosystems, США) согласно протоколу фирмы-производителя. В реакцию брали 10–20 нг ампликона и 3–5 пмоль праймера. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом капиллярном секвенаторе ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Оценку ожидаемой длины целевых ампликонов производили на основании ПЦР *in silico* с помощью программы Primer-BLAST. Редактирование нуклеотидных последовательностей производили вручную в соответствии с секвенограммой при помощи программы BioEdit v 7.2.5 [15]. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов рибосомного оперона с международной базой данных NCBI проводили с помощью программы BLASTn.

Результаты и обсуждение

В работе протестировано три пары праймеров на группу фотосинтезирующих микросимбионтов Chlorophyta: праймеры, фланкирующие ITS1 (GR_18S_F1/GR_5,8_R1) и ITS2 (GR_5,8_F2/GR_28S_R2) переменные районы, а также фрагмент, включающий обе переменные области вместе с 5.8S рДНК (GR_18S_F1/GR_28S_R2). Помимо этого, в образцах клеточной куль-

туры был произведен скрининг на цианобактериальных праймерах.

Оценка специфичности праймеров и ожидаемой длины ампликона.

Учитывая, что межгенные спейсеры – очень вариабельные районы, была проведена оценка ожидаемой длины целевых ампликонов (табл. 2).

Таблица 2. Оценка ожидаемой длины целевых фрагментов при амплификации на праймерах, специфичных для фотосинтезирующих симбионтов группы Chlorophyta.

Таксон	Ожидаемая длина фрагмента, пн.		
	F1/R1	F2/R2	F1/R2
Chlorophyceae	440-600	300-650	870-950
Ulvophyceae	450-500	460-500	850-1080
Trebouxiophyceae	450-550	470-550	970-1030
Mamiellophyceae	400-500	520-560	850-950
Chlorodendrophyceae	450-600	480-510	850-1300

Сравнение показало, что длина ампликонов в среднем составляет 400-600 пн для F1/R1, 300-650 пн – для F2/R2 и 850-1300 пн – для F1/R2. Так же было показано, что длина ампликона варьирует в пределах 100 пн в зависимости от класса организмов.

Результаты амплификации. Положительные ампликоны были получены только на праймерах F1/R1. Амплифицирующийся фрагмент имел длину около 550 пн (рис. 2).

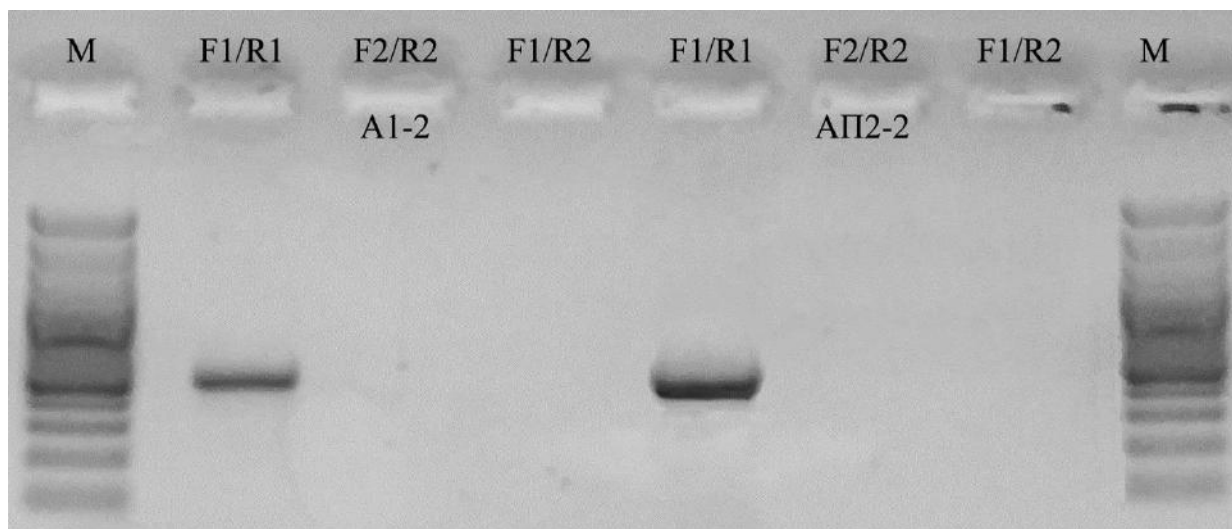


Рис. 2. Результаты гель-электрофореза ампликонов, полученных на парах праймеров, специфичных для группы Chlorophyta: F1/R1 – GR_18S_F1/GR_5,8_R1; F2/R2 – GR_5,8_F2/GR_28S_R2; F1/R2 – GR_18S_F1/GR_28S_R2; M – маркер молекулярного веса.

В дальнейшем эти ампликоны были использованы для подтверждения специфичности праймеров: проводили клонирование и идентификацию целевых фрагментов.

Идентификация – подтверждение специфичности праймеров. В результате клонирования получили пять последовательностей. Все последовательности были идентифицированы как Chlorophyta

Сравнительный анализ последовательностей клонов АП2-2 показал максимальную гомологию с родом *Pseudomuriella*; ближайшим гомологом является *Pseudomuriella engadinensis* SAG 221-4. Сравнительный анализ последовательностей клонов А1-2 показал максимальную гомологию с родом *Choricystis*; ближайшим гомологом является *Choricystis minor* SAG 251-1.

Скрининг природных образцов. Скрининг на праймерах, фланкирующих ITS1, показал, что искомый фрагмент детектируется во всех пробах и отличается по длине в разных образцах: например, у образца f из серии №3 длина фрагмента составляет приблизительно 700 пн, а у образца клеточной культуры А1-2 600 пн (рис. 3).

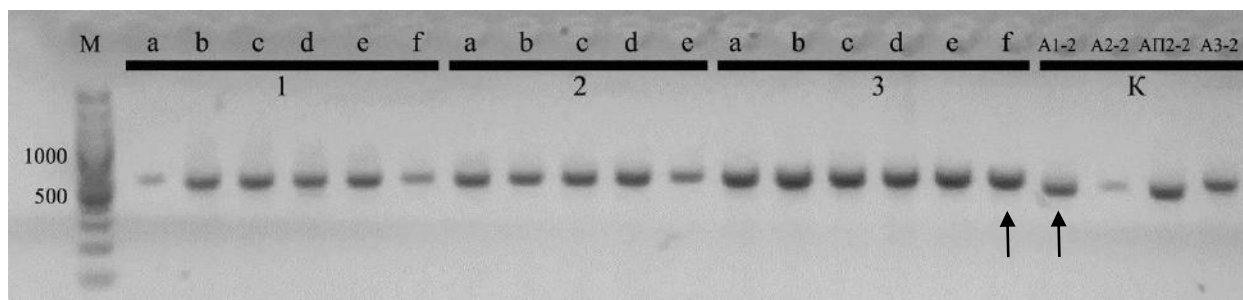


Рис. 3. Результаты электрофоретического анализа в агарозном геле ампликонов, полученных на праймерах GR_18S_F1/GR_5,8_R1. Стрелками указаны ампликоны, отличающиеся по длине. 1, 2, 3 – серии природных образцов, отобранных в разные сезоны; К – культура примморф.

Цианобактериальные праймеры. Сравнительный анализ последовательностей, полученных на цианобактериальных праймерах, позволил выделить две группы среди ближайших гомологов. В первую группу вошли последовательности хлоропластной 16S рДНК зеленых симбионтов-фотосинтетиков, полученных из изолятов губок и относящихся к родам *Lubomirskia* и *Baikalospongia* (Chlorophyta symbiont cluster 1,2). Вторая группа включала последовательности клонированной 16S рДНК морских неидентифицированных цианобактерий (Балтийское море). Для филогенетического анализа кроме вышеперечисленных последовательностей использовали ре-

ференсные последовательности гена 16S рРНК, полученные для хлоропласта *Choricystis parasitica*, а также изолированных и охарактеризованных культур цианобактерий, относящихся к таким родам, как *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Calotrix*, *Halospirulina*, *Leptolyngbia*, *Lyngbia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Pseudoanabaena*, *Rivularia*, *Schizothrix* и *Synechococcus* (Cyanobacterium cluster).

Последовательности, полученные в настоящей работе, объединяются в единый кластер с неидентифицированными последовательностями морских цианобактерий (рис. 4).

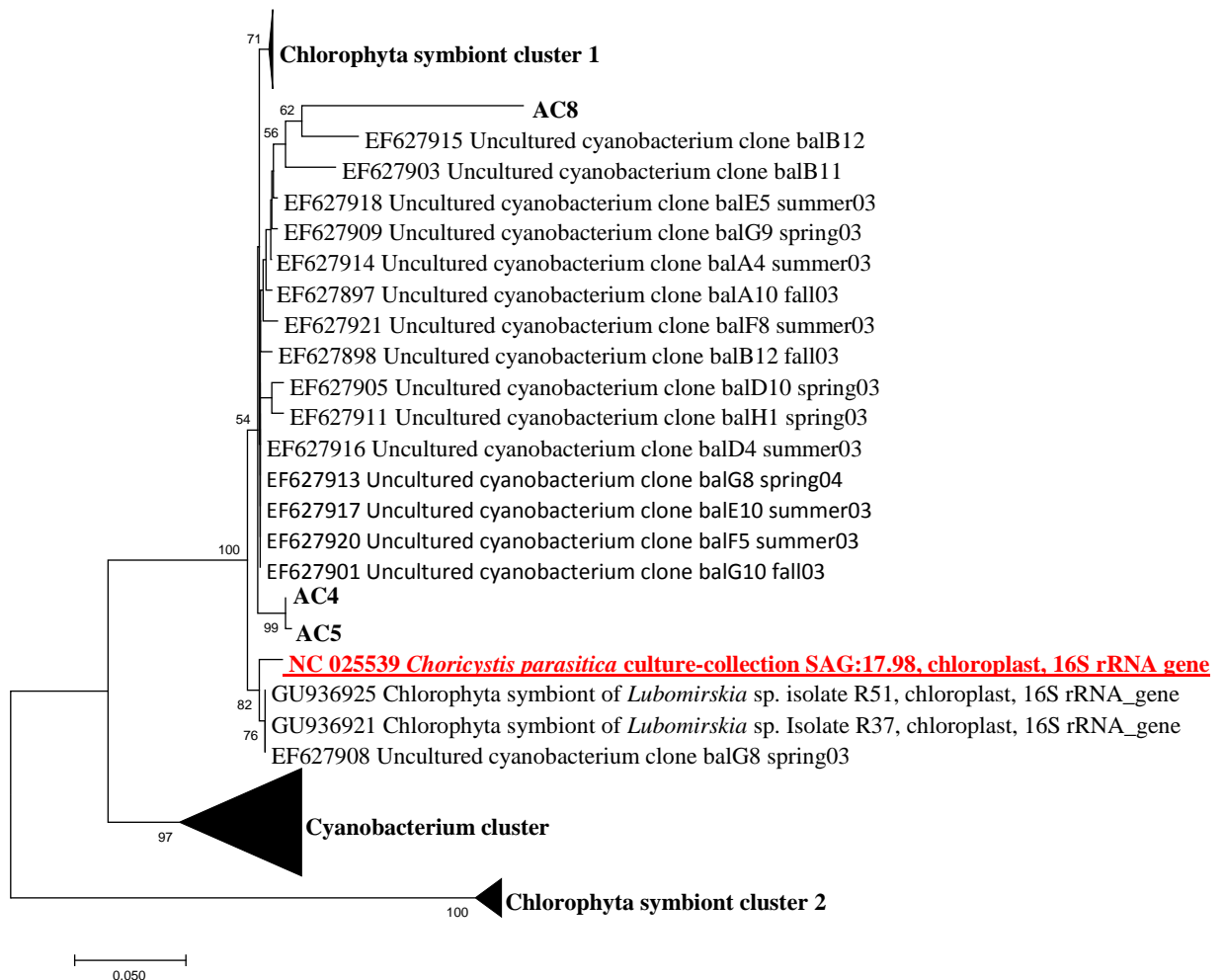


Рис 4. Филогенетическое дерево, построенное методом объединения ближайших соседей для фрагментов гена малой субъединицы рРНК. Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Красным цветом выделена референсная последовательность гена 16S рРНК хлоропласта *C. parasitica* SAG 17.98. Масштаб соответствует 2 заменам на каждые 100 п. н.

Первый кластер симбионтов-фотосинтетиков содержит 32 последовательности и примыкает к кластеру с последовательностями, полученными в

данной работе, и клонами морских цианобактерий, причем значение будстреп-анализа указывает на то, что различий между этими группами не слишком много.

Второй кластер включает в себя 15 последовательностей и формирует глубокую отдельную ветвь, показывая их существенное отличие от остальных последовательностей. Идентифицированные цианобактерии образуют собственную кладу, причем значение будстреп-анализа в узле ветвления позволяет считать, что данное расхождение достоверно. Последовательность 16S рДНК хлоропласта *C. parasitica* кластеризуется с двумя последовательностями 16S рДНК хлоропласта хлорофита симбионтов *Lubomirskia* sp., а также с представителем морских цианобактерий.

Заключение

Фрагмент, амплифицирующийся на праймерах GR_18S_F1/GR_5,8_R1, не слишком длинный и достигает 500-700 пн, что удобно для клонирования и метагеномного секвенирования.

У некоторых родов Chlorophyta разница в длине ампликонов составляет 50-100 пн и визуально детектируется на геле-электрофорезе, что позволяет при ПЦР-скрининге различать их уже на этой стадии.

В пределах амплифицирующегося фрагмента к консервативным областям 18S рРНК и 5,8S рРНК можно подобрать внутренние праймеры, специфичные для конкретного класса, семейства или рода, и использовать этот набор праймеров для multiplexPCR.

Полученные результаты по цианобактериальным праймерам можно объяснить тем, что ген 16S рРНК хлоропластов очень похож на 16S рРНК цианобактерий, так как последние не являются истинными симбионтами губок, а потому в клеточных культурах не присутствуют, либо присутствуют в следовых количествах; при большем количестве хлоропластной ДНК в пробах амплифицироваться будет именно 16S рРНК хлоропластов.

Для группы Chlorophyta протестированы праймеры и получены последовательности фрагмента ITS1. Цианобактериальные праймеры CYA106L/CYA781R позволяют амплифицировать ген 16S рРНК хлоропласта эукариотических микросимбионтов.

(Работа выполнена в рамках государственного задания № 0345-2018-0002, а также при финансовой поддержке грантов РФФИ № 16-04-00065; № 18-04-00224)

ЛИТЕРАТУРА

1. Webster N.S., Negri A.P., Munro M.M. Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges. *Environ. Microbiol.* 2004. 6 (3): 288-300.
2. Rumpho M.E., Pelletreau K.N., Moustafa A. et al. The making of a photosynthetic animal. *J. Exp. Biol.* 2011. 214: 303-311.
3. Freeman C.J., Thacker R.W., Baker D.M. et al. Quality or quantity: is nutrient transfer driven more by symbiont identity and productivity than by symbiont abundance? *ISME J.* 2013. 7 (6):1116-25.
4. Freeman C.J., Thacker R.W. Complex interactions between marine sponges and their symbiotic microbial communities. *Limnol. Oceanogr.* 2011. 56: 1577-1586.
5. Pita L., Rix L., Slaby B.M. et al. The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. *Microbiome.* 2018. 6 (1): 46.
6. Темралеева А.Д., Минчева Е.В., Щербаков Д.Ю. и др. ДНК-штрихкодирование зеленых водорослей: Обзор. *Альгология.* 2013. 23 (4): 396-418.
7. Hall J.D., Fučíková K., Lo C. et al. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. *Cryptogamie Algol.* 2010. 31 (4): 529-555.
8. Sherwood A.R., Vis M.L., Entwisle T.J. et al. Contrasting intra versus interspecies DNA sequence variation for representatives of the Batrachospermales (Rhodophyta): Insights from a DNA barcoding approach. *Phycol. Res.* 2008. 56 (4): 269-279.
9. Clarkston B.E., Saunders G.W. A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, Florideophyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. *Botany.* 2010. 88 (2): 119-131.
10. Buchheim M., Buchheim J., Carlson T. et al. Phylogeny of the Hydrodictyaceae (Chlorophyceae): inferences from rDNA data. *J. Phycology.* 2005. 41 (5): 1039-1054.
11. Vieira H.H., Bagatini I.L., Guinart C.M. et al. tufA gene as molecular marker for freshwater Chlorophyceae. *Algae.* 2016. 31: 155-165.
12. Темралеева А.Д., Минчева Е.В., Букин Ю.С. и др. Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (Chlorophyta). Кострома: Костромской печатный дом, 2014. 215 с.
13. Wang X.C., Liu C., Huang L. et al. ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Molecular Ecology Resources.* 2015. 15: 573-586.
14. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory Manual.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. V. 1, 2, 3.
15. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999. 41: 95-98.

Получена 06.09.2018

(Контактная информация: Клименко Елизавета Станиславовна – магистрант 2 курса БПФ ИГУ, вед. инженер лаборатории аналитической биоорганической химии Лимнологического института СО РАН; адрес: 664033 г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3. тел. (3952) 51-18-74; e-mail: klimenko.elizabet@gmail.com)

LITERATURA

1. Webster N.S., Negri A.P., Munro M.M. Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges. *Environ. Microbiol.* 2004. 6 (3): 288-300.
2. Rumpho M.E., Pelletreau K.N., Moustafa A. et al. The making of a photosynthetic animal. *J. Exp. Biol.* 2011. 214: 303-311.
3. Freeman C.J., Thacker R.W., Baker D.M. et al. Quality or quantity: is nutrient transfer driven more by symbiont identity and productivity than by symbiont abundance? *ISME J.* 2013. 7 (6):1116-25.

4. Freeman C.J., Thacker R.W. Complex interactions between marine sponges and their symbiotic microbial communities. *Limnol. Oceanogr.* 2011. 56: 1577-1586.
5. Pita L., Rix L., Slaby B.M. et al. The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. *Microbiome.* 2018. 6 (1): 46.
6. Temraleeva A.D., Mincheva E.V., Shcherbakov D.Yu. i dr. DNK-shtrihkodirowanie zelenyh vodoroslej: Obzor. *Al'gologiya.* 2013. 23 (4): 396-418.
7. Hall J.D., Fučíková K., Lo C. et al. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. *Cryptogamie Algol.* 2010. 31 (4): 529-555.
8. Sherwood A.R., Vis M.L., Entwisle T.J. et al. Contrasting intra versus interspecies DNA sequence variation for representatives of the Batrachospermales (Rhodophyta): Insights from a DNA barcoding approach. *Phycol. Res.* 2008. 56 (4): 269-279.
9. Clarkston B.E., Saunders G.W. A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, Florideophyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. *Botany.* 2010. 88 (2): 119-131.
10. Buchheim M., Buchheim J., Carlson T. et al. Phylogeny of the Hydrodictyaceae (Chlorophyceae): inferences from rDNA data. *J. Phycology.* 2005. 41 (5): 1039-1054.
11. Vieira H.H., Bagatini I.L., Guinart C.M. et al. tufA gene as molecular marker for freshwater Chlorophyceae. *Algae.* 2016. 31: 155-165.
12. Temraleeva A.D., Mincheva E.V., Bukin Yu.S. i dr. Sovremennyye metody vydeleniya, kul'tivirovaniya i identifikacii zelenyh vodoroslej (Chlorophyta). Kostroma: Kostromskoj pechatnyj dom, 2014. 215 s.
13. Wang X.C., Liu C., Huang L. et al. ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Molecular Ecology Resources.* 2015. 15: 573-586.
14. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory Manual.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. V. 1, 2, 3.
15. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999. 41: 95-98.

Образец ссылки на статью:

Клименко Е.С., Беликов С.И., Черногор Л.И., Адельшин Р.В., Белькова Н.Л. Поиск генетических маркеров для характеристики фототрофных симбионтов байкальских эндемичных губок. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.* 2018. 3: 10 с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-3/Articles/KES-2018-3.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2018-13002.