

УДК 581.174.1/2;582.263;577.344

ИНДУКЦИЯ ВТОРИЧНОГО КАРОТИНОГЕНЕЗА У НОВЫХ ГАЛОФИЛЬНЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ИЗ РОДА *Dunaliella* (Chlorophyceae)*

© 2015 А.Е. Соловченко^{1,2**}, Е.А. Селиванова³, К.А. Чеканов^{1,4},
Р.А. Сидоров², Н.В. Немцева³, Е.С. Лобакова¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)939-3807,
электронная почта: solovchenko@mail.bio.msu.ru

² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,
127276 Москва

³ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН,
460000 Оренбург

⁴ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»,
Центр гуманитарных исследований и технологий, 115409 Москва

Поступила в редакцию 06.07.15

После доработки 21.07.15

Исследовали влияние света высокой интенсивности (480 мкмоль квантов/(м²·с)) и солености (160 и 200 г/л NaCl) на рост, состав пигментов и жирных кислот (ЖК), суммарных липидов клеток трех новых штаммов галофильных одноклеточных зеленых водорослей рода *Dunaliella*. По нуклеотидной последовательности кластера рибосомальных генов ITS1–5.8S рРНК–ITS2, а также по наличию способности к накоплению вторичного (не связанного с фотосинтетическим аппаратом) β-каротина штаммы *Dunaliella* sp. BS1 и BS2 идентифицированы как *D. salina*, штамм *Dunaliella* sp. R5 – как *D. viridis*. В оптимальных условиях среди пигментов у изученных организмов преобладали хлорофиллы и первичные каротиноиды (главным образом лютеин), основными ЖК были ненасыщенные С18-ЖК, характерные для структурных липидов мембран тилакоидов. У всех изученных организмов стрессоры вызывали снижение содержания хлорофиллов и рост доли ненасыщенных С16- и С18-ЖК, характерных для запасных липидов. У каротиногенного вида *D. salina* наблюдали 10-кратный рост содержания каротиноидов в клетках при снижении пропорции лютеина и росте доли β-каротина до 75% суммы этих пигментов. У *D. viridis* содержание каротиноидов увеличивалось в 1,5 раза без изменения соотношения доминирующих каротиноидов. Обсуждаются механизмы устойчивости к стрессам у видов *Dunaliella* с различной способностью к каротиногенезу в связи с устойчивостью галофильных микроводорослей к фотоокислительному повреждению, а также перспективы использования новых штаммов *Dunaliella* для биотехнологического получения β-каротина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: галотолерантность, жирные кислоты, каротиноиды, молекулярная идентификация, стресс, хлорофиллы, фотоадаптация.

Галофильные одноклеточные водоросли (микроводоросли) рода *Dunaliella* (Chlorophyta, Chlorophyceae) являются основными представителями фитопланктона и продуцентами органического вещества в континентальных гипергалинных водоемах с нестабильными, часто неблагоприятными условиями среды [1, 2]. Среди галофильных видов особое внимание исследователей привлекает вид *Dunaliella salina*, способный к накоплению при действии стрессоров

значительных (до 10% от сухого веса клеток) количеств вторичного (не связанного структурно либо функционально с фотосинтетическим аппаратом) β-каротина [3–5]. Благодаря этой особенности *D. salina* является важнейшим источником натурального β-каротина, получаемого биотехнологическим путем из микроводорослей [2, 6].

Способность к вторичному каротиногенезу, наряду с прочими факторами, определяет высокую толерантность отдельных представителей рода *Dunaliella* к экстремально высоким уровням солености, интенсивности света и температуры, а также дефициту элементов минерального питания [7–9]. У микроводорослей, включая *Dunaliella*, индуцированный действием стрессоров вторичный каротиногенез связан с редукци-

Принятые сокращения: ЖК – жирные кислоты, Кар – каротиноид(ы), Хл – хлорофилл(ы), ФАР – фотосинтетически активная радиация.

* Приложение к статье опубликовано на сайте «Biochemistry» (Moscow), Vol. 80, issue 11, 2015.

** Адресат для корреспонденции.

ей фотосинтетического аппарата и переключением липидного метаболизма на биосинтез запасных нейтральных липидов [10–12]. Исследования координированного биосинтеза вторичных каротиноидов (Кар) и запасных липидов представляют значительный интерес для расшифровки механизмов стресс-устойчивости одноклеточных фототрофных организмов. Следует также отметить, что выраженный каротиногенный ответ на действие стрессоров характерен не для всех представителей рода *Dunaliella*, и способность к каротиногенезу является одним из признаков, отличающих вид *D. salina*.

С учетом сказанного, наше внимание привлек ряд новых штаммов *Dunaliella* с различной способностью к каротиногенезу, выделенных из гипергалинных водоемов на территории России и предварительно идентифицированных как *D. salina* [13]. В настоящей работе был уточнен таксономический статус новых штаммов *Dunaliella*, исследованы индукция каротиногенеза и изменения профиля жирных кислот (ЖК) липидов клеток этих организмов при действии света высокой интенсивности и высоких концентраций NaCl в среде. Полученные данные обсуждаются в связи с устойчивостью галофильных микроводорослей к фотоокислительному повреждению и возможностью использования новых штаммов *Dunaliella* в биотехнологии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты и условия культивирования. В работе использовали альгологически чистые культуры микроводорослей, выделенные из мелких эфемерных водоемов вблизи впадения реки Большая Сморогда в озеро Эльтон (Волгоградская область, Россия) – штаммы *Dunaliella* sp. BS1 и BS2, а также из гипергалинного озера Развал (Оренбургская область, Россия) – *Dunaliella* sp. R5 (предварительно идентифицированный как *D. salina* и депонированный в альгологическую коллекцию Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН с присвоением идентификатора IPPAS D-232 [13]).

Клетки микроводорослей выращивали по ранее описанной методике [14]: в 600 мл среды ОПС_М (основная питательная смесь модифицированная, состав: NaCl – 160 г, MgSO₄ · 7 H₂O – 50 г, KNO₃ – 2,5 г, K₂HPO₄ – 0,2 г, NaHCO₃ – 1,0 г, водопроводная вода – до 1 л) в стеклянных цилиндрах диаметром 6,6 см и емкостью 1,5 л, при постоянном освещении светодиодными лампами белого света (480 мкмоль фотонов/(м² · с) ФАР). Интенсивность освещения измеряли квантометром LiCor 850 («LiCor», США). Куль-

туру непрерывно продували атмосферным воздухом (0,3 л на 1 л культуры в минуту) и поддерживали температуру 27°. В отдельных экспериментах содержание NaCl в среде увеличивали до 200 г/л. Начальная плотность культуры составляла $3 \cdot 10^5$ (штаммы *Dunaliella* sp. BS1, BS2) и $2,3 \cdot 10^6$ клеток/мл (штамм *Dunaliella* sp. R5). Временные препараты клеточных суспензий микроскопировали с использованием фотомикроскопа Nikon Eclipse 90i («Nikon», Япония). Численность клеток микроводорослей определяли под микроскопом с помощью камеры Горяева.

Выделение геномной ДНК, определение и анализ нуклеотидных последовательностей. Для выделения ДНК биомассу (2–5 мг сухого веса) осаждали центрифугированием, подвергали трехкратному замораживанию–оттаиванию и инкубировали в течение 1 ч в 300 мкл цитрат-фосфатного буфера (рН 5,0) с 1 мкМ ЭДТА и 2% Ds-Na при 40°. К образцам добавляли 1 М NaCl и оставляли на ночь для высаливания белков, после чего ДНК экстрагировали стандартным фенол-хлороформным методом [15]. Чистоту препаратов ДНК проверяли путем электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле, содержащем 0,2 мкг/мл бромида этидия.

Для амплификации фрагмента ДНК (~600 п.н.), включающего внутренние транскрибируемые спейсеры, ITS1 и ITS2 (фрагмент), а также ген 5.8S рРНК из кластера ядерных рибосомальных генов (ITS1–5.8S рРНК–ITS2), использовали праймеры 3'-GCCTGCCTATCCAGTTGCG-5' и 5'-GAACCTGCGGAAGGATCATTTG-3' [16]. Амплификацию методом ПЦР осуществляли на амплификаторе Mastercycler Gradient («Eppendorf», Германия) с использованием Taq-полимеразы («Евроген», Россия) по следующей программе: 95°, 3 мин – начальная денатурация; 30 циклов: 95° – 20 с, 55° – 30 с, 72° – 35 с; заключительная элонгация – 72°, 5 мин. Продукт ПЦР очищали с помощью набора Cleanup Standard («Евроген») по протоколу производителя. Последовательность нуклеотидов определяли на автоматическом секвенаторе 3730 DNA Analyzer («Applied Biosystems», США).

Поиск гомологичных последовательностей вели в базе данных NCBI GenBank (база nt/nt) с помощью онлайн-сервиса BLAST [17]; данные анализировали с помощью программы MEGA 6.06 [18]; множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли по алгоритму MUSCLE [19] с параметрами по умолчанию (см. Приложение).

Экстракция и анализ пигментов и жирных кислот суммарных липидов. Фотосинтетические пигменты экстрагировали из клеток микроводорослей смесью хлороформа с метанолом (2 : 1, v/v),

содержание хлорофиллов (Хл) *a* и *b*, а также суммы каротиноидов (Кар) определяли спектрофотометрически в хлороформной фракции экстракта [20], состав ЖК суммарных липидов клеток микроводорослей анализировали методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием [14].

Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Результаты представляли как средние значения \pm s.d.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования вторичного каротиногенеза одноклеточных водорослей важны как для расшифровки механизмов стресс-устойчивости фотоавтотрофных организмов, так и для биотехнологического получения ценных каротиноидных пигментов [8, 10]. В этой связи значительный интерес представляют новые потенциально каротиногенные микроорганизмы, такие как исследованные в настоящей работе новые представители рода *Dunaliella*. По цитоморфологическим критериям все исследованные штаммы микроводорослей были предварительно отнесены к виду *D. salina*, однако обнаруженные в ходе настоящей работы существенные физиолого-биохимические различия (в частности, по способности к каротиногенному ответу, см. ниже) обусловили необходимость уточнения их таксономического статуса. С этой целью были амплифицированы фрагменты геномной ДНК, включающие частичные последовательности ITS1 и ITS2, а также полную последовательность гена 5.8S рНК, и определены их нуклеотидные последовательности (GenBank ID: штамм BS 1 – KT013269; BS 2 – KT013270; R5 (IPPAS D-232) – KT013271). Сопоставление полученных последовательностей ITS1–5.8S рНК–ITS2 с таковыми для микроводорослей с установленным таксономическим статусом выявило высокую (95–99%) гомологию с последовательностями представителей рода *Dunaliella* (Volvocales, Dunaliellaceae). Последовательности штамма *Dunaliella* sp. R5 кластеризовались (рис. S1 Приложения) с последовательностями штаммов, составляющих кладу «*viridis* clade III». С учетом этих обстоятельств штамм *Dunaliella* sp. R5 можно отнести к виду *D. viridis* [21]. Последовательности штаммов *Dunaliella* sp. BS1 и BS2 кластеризовались с таковыми штаммов, принадлежащими к кладе «*salina* clade III» [21], что позволяет отнести их к виду *D. salina*.

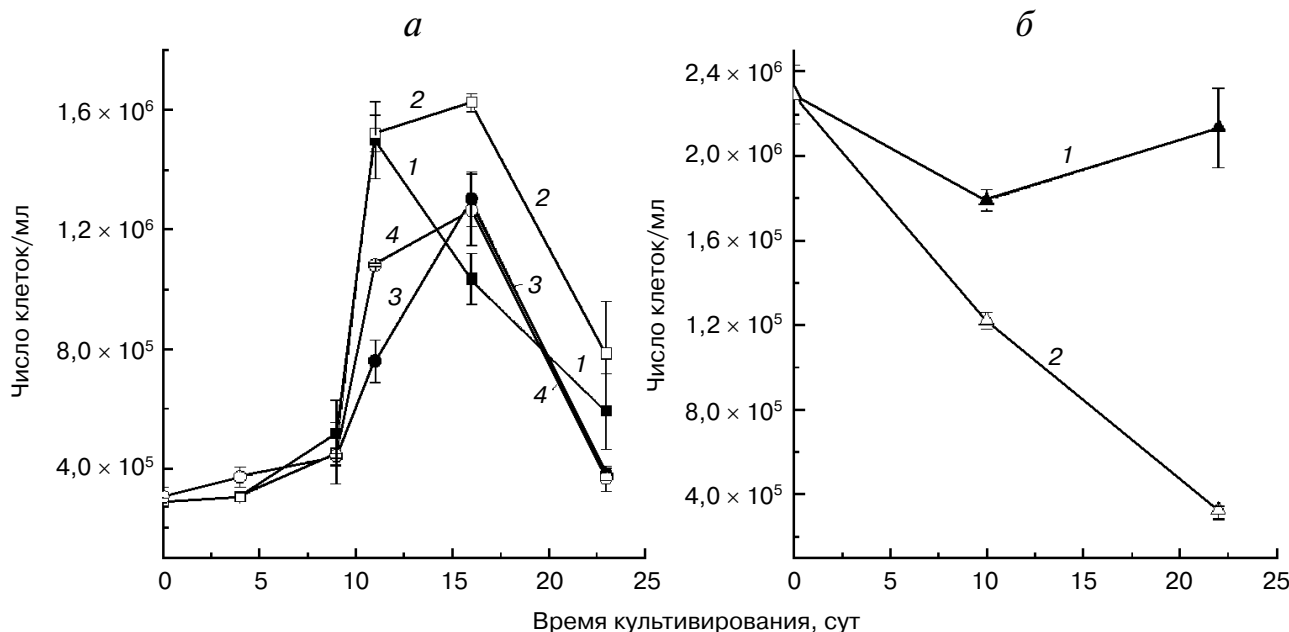
Поскольку особый интерес в контексте настоящего исследования представлял каротиногенный ответ, динамику численности и морфо-

логию клеток отслеживали при действии света высокой интенсивности (480 мкмоль квантов ФАР/(м² · с)) и повышенной концентрации NaCl в среде культивирования (160 и 200 г/л) – факторов, наиболее эффективно индуцирующих накопление вторичных каротиноидов у *Dunaliella* [2–5].

Установлено, что штаммы, отнесенные к разным видам, существенно различались по динамике численности клеток при культивировании (рисунок). Так, для культур *D. salina* BS1 и BS2 (рисунок, *a*) в первые девять суток была характерна низкая скорость роста. После девяти суток культивирования рост культуры резко ускорялся, и численность клеток возрастала в 3–4 раза. На 16-е сутки (в отдельных случаях – на 11-е) рост замедлялся и сменялся резким падением численности клеток. При этом эффект повышения концентрации NaCl в среде культивирования был слабо выраженным. В аналогичных экспериментальных условиях наблюдали гибель клеток культуры *D. viridis* R5, засеянных с начальной плотностью, близкой к таковой культуры *D. salina* (данные не приведены). Повышение начальной плотности культуры *D. viridis* R5 позволило избежать гибели клеток, но и в этом случае не наблюдали роста культуры (при концентрации NaCl 160 г/л; рисунок, *б*, кривая 1), а при повышении солености до 200 г/л численность клеток заметно снижалась (рисунок, *б*, кривая 2).

Культивирование микроводорослей при действии факторов, индуцирующих каротиногенез, сопровождалось морфологическими изменениями клеток микроводорослей, характер которых различался в зависимости от вида. У *D. viridis* R5 происходило изменение окраски клеток с зеленой на желтую, в цитоплазме появлялись бесцветные включения (рис. S2 Приложения). Клетки *D. salina* BS1 и BS2 увеличивались в размерах, округлялись, в клетках обнаруживались крупные включения округлой формы. Клетки этих штаммов приобретали сначала желтоватый оттенок, а затем равномерную коричнево-оранжевую или кирпично-красную окраску (рис. S2 Приложения), типичную для каротиногенных видов *Dunaliella* [1–4].

Исходные культуры *D. viridis* R5, выращенные в оптимальных для роста условиях, обладали сходным пигментным составом, сравнительно высоким содержанием Хл и, по данным жидкостно-хроматографического анализа, сравнительно низкой долей β-каротина в суммарном содержании Кар (табл. 1), типичной для первичных Кар зеленых водорослей и высших растений, выращенных в оптимальных условиях [22]. В клетках *D. salina* BS1 и BS2 исходное содержание β-каротина было на 15–20% выше (табл. 1).



Динамика численности клеток микроводорослей *D. salina* (а) и *D. viridis* (б), культивируемых на свету высокой интенсивности на среде с концентрацией NaCl 160 (1, 3) либо 200 г/л (2, 4)

При культивировании в стрессовых условиях, как правило, наблюдали снижение общего содержания Хл при росте соотношения Хл *a/b*. Повышения абсолютного содержания Кар и соотношения Кар/Хл также являлось общей тенденцией, однако исследованные организмы резко различались по величине этих изменений: если у *D. viridis* R5 эти параметры увеличивались в ~1,5 раза, то у *D. salina* BS1 и BS2 зарегистрирован рост более чем на порядок (табл. 1). При этом профиль Кар у *D. viridis* R5 не изменялся, тогда как у *D. salina* BS1 и BS2 доля β-каротина увеличивалась до 75–88% общих Кар, преимущественно за счет пропорционального снижения доли лютеина (табл. 1). Снижение относительного содержания лютеина, выполняющего, главным образом, функцию светосбора, согласуется с наблюдаемым снижением содержания Хл; эти процессы могут быть проявлением типичного для микроводорослей ответа на действие стрессоров различной природы, включающего редукцию антенных комплексов, снижающего потенциально высокий при стрессе риск фотоокислительного повреждения [23].

Вышеописанные изменения пигментного состава сопровождались характерной динамикой профиля ЖК-состава суммарных липидов клеток (табл. 2). Во всех вариантах опыта основными ЖК были миристиновая (14 : 0, 0,8–12,8%),

пальмитиновая (16 : 0, 22,4–38,3%), пальмитолеиновая (16 : 1, 1,8–11,9%), гексадекатетраеновая (16 : 4, 0,8–13,6%), стеариновая (18 : 0, 0,7–11,4%), а у *D. viridis* – также α-линоленовая (18 : 3, 16,8–36,9%). Помимо этого были обнаружены минорные ЖК: пентадекановая (15 : 0), маргариновая (17 : 0), арахидиновая (20 : 0) и *cis*-вакценовая (18 : 1), массовая доля каждой из которых не превышала 0,3%. В ходе культивирования *D. salina* BS1 в среде с 160 г/л NaCl доля миристиновой кислоты в суммарных липидах клеток снижалась в 2,3 раза, в то время как у других штаммов ее концентрация значительно возрастала к концу культивирования (в 2,6–12,8 раза), при этом у *D. salina* BS1 и *D. viridis* увеличивалось содержание пальмитиновой и стеариновой ЖК, что говорит об активном синтезе ЖК в клетках этих водорослей и о конверсии миристиновой ЖК в пальмитиновую с последующей элонгацией до стеариновой. Эти насыщенные ЖК, как известно, преобладают в запасных липидах – триацилглицеринах [24]. У штамма BS2, а также при культивировании *D. salina* в среде с 200 г/л NaCl были отмечены сходные тенденции изменения ЖК-состава. Следует отметить значительное снижение триненасыщенных ЖК (представленных, главным образом, α-линоленовой кислотой, ассоциированной с гликолипидами мембран тилакоидов [24]) у *D. viridis*.

Таблица 1. Пигментный состав клеток исследованных галофильных водорослей рода *Dunaliella* при засеве (0 сут) и после 23 сут культивирования при 480 мкмоль квантов/(м² · с) и различной концентрации NaCl в среде культивирования

Штамм	<i>D. viridis</i> R5			<i>D. salina</i> BS1			<i>D. salina</i> BS2		
Время культивирования, сут	0	23	23	0	23	23	0	23	23
NaCl, г/л	160	160	200	160	160	200	160	160	200
Содержание, нмоль/млн клеток									
Хл <i>a</i>	2,04	1,67	1,40	2,23	2,29	1,90	2,47	2,90	2,23
Хл <i>b</i>	0,83	0,41	0,28	1,28	0,78	0,71	1,32	1,11	1,01
Сумма Кар	1,50	2,14	1,94	1,93	18,65	19,5	2,28	24,8	27,8
Соотношение, моль/моль									
Хл <i>a</i> /Хл <i>b</i>	2,46	3,30	5,0	1,75	1,87	2,67	2,92	2,6	2,21
Кар/(Хл <i>a</i> + <i>b</i>)	0,52	0,99	1,16	0,55	6,06	7,47	0,60	6,18	8,58
Доля в сумме Кар, %									
Лютеин	74	74	75	49	15	9	52	9	11
β-каротин	18	19,7	17	49	82	78	37	82	89
Прочие Кар	8	6,3	8	2	3	13	11	9	—*

* Следы.

При культивировании в присутствии 160 г/л NaCl в среде этот процесс сопровождался ростом доли диненасыщенных ЖК, а при более интенсивном действии данного стрессора (200 г/л NaCl) — ростом моносенасыщенных ЖК. По всей видимости, подобные изменения состава ЖК отражают функционирование двух механизмов приспособления к действию стрессоров: редукции мембран тилакоидов и индукции синтеза запасных липидов, обеспечивающих сток избыточных фотоассимилятов при замедлении деления клеток [25]. Эти особенности объясняют тот факт, что у каротиногенных видов *Dunaliella* накопление β-каротина сильнее коррелирует с ростом доли пальмитиновой и олеиновой кислот, чем с общим содержанием ЖК в клетке [10]. Эта особенность также согласуется с представлениями о ведущей роли биосинтеза ЖК в развитии каротиногенного ответа как источника «строительных блоков» для сборки триацилглицеринов — доминирующих компонентов пластоглобул, в которых накапливается вторичный β-каротин [8, 12].

Суммируя накопленные в литературе и полученные в настоящей работе данные, можно за-

ключить, что способность к вторичному каротиногенезу является определяющей для стратегии приспособления *Dunaliella* к неблагоприятным условиям среды. Так, виды, неспособные к накоплению высоких количеств вторичных каротиноидов (такие как *D. viridis*), отвечают на действие света высокой интенсивности и высокой солености главным образом снижением содержания Хл и редукцией гранально-ламеллярной системы тилакоидов [26, 27], а также накоплением осмопротекторов, таких как глицерин [2]. Каротиногенные виды *Dunaliella*, такие как *D. salina*, наряду со снижением содержания Хл накапливают β-каротин, обеспечивающий дополнительную защиту клеток микроводоросли благодаря оптическому экранированию [28] и, возможно, локальному антиоксидантному эффекту [29]. Кроме того, биосинтез ЖК и нейтральных липидов, согласованный с накоплением вторичных Кар, по-видимому, обеспечивает дополнительный сток избыточных фотоассимилятов, снижая риск фотоокислительного повреждения, особенно высокий при действии комбинированного стрессора (свет высокой интенсивности и высокая соленость) [26].

Таблица 2. Изменения ЖК-состава суммарных липидов клеток исследованных штаммов *Dunaliella* после девяти суток культивирования на среде с 160 г/л NaCl при 480 мкмоль квантов/(м² · с)

Жирные кислоты	<i>D. viridis</i> R5		<i>D. salina</i> BS1		<i>D. salina</i> BS2	
	0 сут	9 сут	0 сут	9 сут	0 сут	9 сут
14 : 0	0,8	2,1	12,3*	5,4	—	12,8
16 : 0	22,4	38,3	25,0	36,7	28,6	24,9
16 : 1**	2,8	3,3	11,9	11,8	2,0	1,8
16 : 2	0,9	2,2	—***	—	0,5	1,6
16 : 3	4,3	1,7	0,5	—	—	1,7
16 : 4	13,6	4,5	1,2	0,8	2,7	2,9
18 : 0	0,7	2,4	5,9	11,4	—	2,9
18 : 1	9,3	10,3	30,5	23,8	41,7	29,6
18 : 2	8,2	16,7	12,4	10,1	24,1	21,5
18 : 3	36,9	16,8	—	—	—	—

* Процент суммарного содержания ЖК.

** Приводятся суммы изомеров соответствующих ЖК.

*** Не обнаружено.

Судя по динамике численности клеток, каротиногенный вид *D. salina* более успешно адаптировался к действию стрессоров, смоделированных в наших экспериментальных условиях, по сравнению с некаротиногенным видом *D. viridis*. При этом негативное влияние повышения солености на *D. salina* было существенно менее выражено, чем у *D. viridis* (рисунок). Таким образом, ввиду существенно более высокой стрессоустойчивости и способности накапливать β-каротин новые штаммы *D. salina* BS1 и BS2 обла-

дают значительным потенциалом для биотехнологического получения этого ценного пигмента.

Авторы выражают благодарность к.м.н. А.О. Плотникову за сотрудничество при получении чистых культур микроводорослей и к.б.н. Т.А. Федоренко за помощь при выделении ДНК из микроводорослей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Borowitzka, M., and Siva, C. (2007) The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species, *J. Appl. Phycol.*, **19**, 567–590.
- Borowitzka, M. (2013) *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology* (Richmond, A., and Hu, Q., eds), 2nd ed., Blackwell, N.Y., pp. 359–368.
- Ben-Amotz, A., and Shaish, A. (1992) *Dunaliella: physiology, biochemistry, and biotechnology* (Avron, M., and Ben-Amotz, A., eds), CRC, Boca Raton, pp. 205–216.
- Ben-Amotz, A., Katz, A., and Avron, M. (1982) Accumulation of β-carotene in halotolerant alga: purification and characterization of β-carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae), *J. Phycol.*, **18**, 529–537.
- Oren, A. (2005) *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya* (Gunde-Cimerman, N., Oren A., and Plemenitas, A., eds), Springer, N.Y., pp. 493–502.
- Ben-Amotz, A. (2004) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* (Richmond, A., ed.), Blackwell, N.Y., pp. 273–280.
- Семенов В., Абдуллаев А. (1980) Параметрическое управление биосинтезом β-каротина в клетках *Dunaliella salina* в условиях интенсивной культуры, *Физиол. раст.*, **27**, 31–41.
- Lamers, P., Janssen, M., de Vos, R., Bino, R., and Wijffels, R. (2012) Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga, *J. Biotechnol.*, **162**, 21–37.
- Ye Z.-W., Jiang J.-G., and Wu, G.-H. (2009) Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects, *Biotechnol. Adv.*, **26**, 352–360.
- Lamers P., van de Laak, C., Kaasenbrood, P., Lorier, J., Janssen M., de Vos R., Bino, R., and Wijffels R. (2010) Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*, *Biotechnol. Bioeng.*, **106**, 638–648.
- Соловченко А.Е. (2013) Физиология и адаптивное значение вторичного каротиногенеза у зеленых микроводорослей, *Физиол. раст.*, **60**, 3–16.
- Rabbani, S., Beyer, P., Lintig, J., Huguency, P., and Kleinig, H. (1998) Induced β-carotene synthesis driven by

- triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*, *Plant Physiol.*, **116**, 1239–1248.
13. Немцева Н., Селиванова Е., Игнатенко М., Шарапова Н. (2013) Характеристика нового штамма *Dunaliella salina* (Chlorophyta) и оценка параметров его культивирования, *Физиол. раст.*, **60**, 561–568.
 14. Gorelova, O., Baulina, O., Solovchenko, A., Chekanov, K., Chivkunova, O., Fedorenko, T., and Lobakova, E. (2015) Similarity and diversity of the *Desmodesmus* spp. microalgae isolated from associations with white sea invertebrates, *Protoplasma*, **252**, 489–503.
 15. Sambrook, J., and Russell, D.W. (2006) Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform, *Cold Spring Harbor Protoc.*, doi: 10.1101/pdb.prot4455.
 16. Zedek, F., Smerda, J., Smarda, P., and Bures, P. (2010) Correlated evolution of Ltr retrotransposons and genome size in the genus *Eleocharis*, *BMC Plant Biol.*, **10**, 265.
 17. Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., and Lipman, D. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403–410.
 18. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., and Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.*, **30**, 2725–2729.
 19. Edgar, R.C. (2004) Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1792–1797.
 20. Wellburn, A. (1994) The spectral determination of chlorophyll *a* and chlorophyll *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution, *J. Plant Physiol.*, **144**, 307–313.
 21. Assuncao, P., Jaen-Molina, R., Caujape-Castells, J., Wolf, M., Buchheim, M.A., Jara, A., Freijanes, K., Carmona, L., and Mendoza, H. (2013) Phylogenetic analysis of ITS2 sequences suggests the taxonomic re-structuring of *Dunaliella viridis* (Chlorophyceae, Dunaliellales), *Phycol. Res.*, **61**, 81–88.
 22. Lichtenthaler, H. (1987) Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods Enzymol.*, **148**, 331–382.
 23. Erickson, E., Wakao, S., and Niyogi, K.K. (2015) Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant J.*, **82**, 449–465.
 24. Guschina, I.A., and Harwood, J.L. (2013) *Algae for biofuels and energy* (Borowitzka, M., and Moheimani, N., eds), Springer, Dordrecht, pp. 17–36.
 25. Соловченко А. (2012) Физиологическая роль накопления нейтральных липидов эукариотическими микроводорослями при стрессах, *Физиол. раст.*, **59**, 192–202.
 26. Dubinsky, Z., and Stambler, N. (2009) Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications, *Aquatic Microb. Ecol.*, **56**, 163–176.
 27. Berner, T., Dubinsky, Z., Wyman, K., and Falkowski, P. (1989) Photoadaptation and the «package» effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae), *J. Phycol.*, **25**, 70–78.
 28. Ben-Amotz, A., Shaish, A., and Avron, M. (1989) Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation, *Plant Physiol.*, **86**, 1286–1291.
 29. Shaish, A., Avron, M., Pick, U., and Ben-Amotz, A. (1993) Are active oxygen species involved in induction of β -carotene in *Dunaliella bardawil*? *Planta*, **190**, 363–368.

INDUCTION OF SECONDARY CAROTENOGENESIS IN NEW HALOPHILE MICROALGAE FROM THE GENUS *Dunaliella* (Chlorophyceae)

A. E. Solovchenko^{1,2*}, E. A. Selivanova³, K. A. Chekanov^{1,4},
R. A. Sidorov², N. V. Nemtseva³, E. S. Lobakova¹

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty,
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-3807, E-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

² K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow 127276, Russia

³ Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis,
Russian Academy of Sciences, Urals Branch, Orenburg 460000, Russia

⁴ National Research Nuclear University «MEPhI», Center for Humanitarian Studies
and Technologies, Moscow 115409

Received July 6, 2015

Revision received July 21, 2015

We report on the effects of high light (480 μM quanta/($\text{m}^2 \cdot \text{s}$)) irradiance and salinity (160 and 200 g/liter NaCl) on the culture growth as well as on the cell lipid pigment and fatty acid (FA) composition in three novel strains of halophile microalga from the genus *Dunaliella*. Based on the ITS1–5.8S rRNA–ITS2 sequence and on the capability of accumulation of secondary (non-related to the photosynthetic apparatus) β -carotene, the strains *Dunaliella* sp. BS1 and BS2 were identified as *D. salina* and *Dunaliella* sp. R5 as *D. viridis*. Under conditions optimal for growth, chlorophylls and primary carotenoids (mainly lutein) dominated the pigment profile of all strains studied. The main FAs were unsaturated C18-FA typical of thylakoid membrane structural lipids. In all organisms studied, applied stressors caused a decline in chlorophylls and an increase in unsaturated C16- and C18-FA associated with reserve lipids. The carotenogenic species *D. salina* demonstrated 10-fold increase in carotenoids accompanied by a decline in lutein and a drastic increase in β -carotene (up to 75% of total carotenoids). In *D. viridis*, only 1.5-fold increase in carotenoid content took place, and the ratio of major carotenoids remained essentially unchanged. The role of carotenogenic response in mechanisms of photooxidative damage is discussed in view of halophile microalgae stress tolerance and application of new *Dunaliella* strains for biotechnological production of β -carotene.

Key words: halotolerance, fatty acids, carotenoids, molecular identification, stress, chlorophyll, photoadaptation