

Т4-ПОДОБНЫЕ ЦИАНОФАГИ ОЗ. БАЙКАЛ: ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И БИОГЕОГРАФИЯ

© 2024 г. С. А. Потапов^а, *, И. В. Тихонова^а, Е. Л. Кречетова^б, О. И. Белых^а

^аФГБУН Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033, Россия

^бФГБОУ ВО Педагогический институт “Иркутский государственный университет”, Иркутск, 664011, Россия

*e-mail: poet1988@list.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 02.11.2023 г.

Принята к публикации 02.11.2023 г.

На основе анализа маркерного гена изучено разнообразие и биогеография Т4-подобных цианофагов из мелководного залива Посольский сор оз. Байкал. Выявлено высокое разнообразие нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *g20*, установлена их уникальность. Наибольшее сходство последовательностей вирусов отмечено с таковыми из оз. Байкал, полученными ранее, и пресноводных озер, таких как олиготрофные Грин, Раунд, олигомезотрофное Анси и мезотрофное Бурже. С точки зрения биогеографии, определено, что последовательности фагов из разных экотопов оз. Байкал более сходны между собой, чем с соответствующими последовательностями из других экосистем.

Ключевые слова: цианофаги, генетическое разнообразие, биогеография, ген *g20*, оз. Байкал

DOI: 10.31857/S0026365624020216

Вирусы — самые многочисленные биологические объекты в водных экосистемах. Являясь облигатными внутриклеточными паразитами, они состоят из одноцепочечной или двухцепочечной молекулы РНК или ДНК, заключенной в белковый капсид, некоторые вирусы имеют дополнительную мембранную оболочку (суперкапсид). Бактериофаги (цианофаги) — вирусы, поражающие бактерии (цианобактерии), влияют на генетическое разнообразие и контролируют их численность, в значительной мере определяя биоразнообразие, структуру, продуктивность и функционирование водных экосистем (Suttle, 2007).

Исследование разнообразия вирусов в природных популяциях представляет сложную задачу, поскольку универсальных генетических маркеров для всех таксонов вирусов нет. Фаги содержат кодовые гены, т.е. гены, имеющиеся только у данной группы вирусов, капсидные и некоторые другие структурные гены. Ген *g20* Т4-подобных вирусов кодирует порталный белок, который принимает участие в инициации сборки капсида, последующей упаковке ДНК; он является также маркерным геном и успешно применяется для идентификации цианофагов семейства *Kyanoviridae* (ранее входившие в состав сем. *Myoviridae*) в природных образцах (Fuller et al., 1998; Zhong et al., 2002; Wang et al., 2004; Wilhelm et al., 2006; Zhong, Jacquet, 2013). Разнообразие и оценка с точки зрения биогеографии гена *g20* позволяет выявить пул цианофагов,

приуроченных к определенному местообитанию (эндемизм) или присутствующих в разных экосистемах (космополитность).

В 2012 году в пелагиали оз. Байкал выявлено высокое генетическое разнообразие цианофагов на основе анализа гена *g20*. Полученные результаты свидетельствуют о циркуляции в озере уникальных цианофагов. Также были показаны отличия в составе цианофагов из разных котловин озера (Бутина и соавт., 2012). В 2015 году на основе фрагментов гена *g20* проведен молекулярно-генетический анализ цианофагов в составе ассоциированного сообщества эндемичной байкальской губки *Lubomirskia baicalensis* (Бутина и соавт., 2015).

В настоящее время литоральная зона озера Байкал и ее мелководные заливы с высокой рекреационной нагрузкой испытывают значительное антропогенное воздействие (Shtykova et al., 2019). В этой связи очень важно проводить исследования в период изменения состояния качества вод Байкала, в частности, наблюдать изменения в составе цианофагов.

Цель настоящей работы заключается в выявлении генетического разнообразия Т4-подобных цианофагов по маркерному гену *g20* в мелководном заливе оз. Байкал и анализе полученных данных с точки зрения биогеографии.

Пробы воды отбирали в летнее время (август) в мелководном заливе Посольский сор

в стерильные флаконы (2018 г.; 51.96556° с.ш.; 106.17181° в.д.) на глубине 0.5 м. Для получения цианофагов, ассоциированных с их хозяевами (бактериальная фракция, более 0.2 мкм), образцы воды фильтровали через стерильные поликарбонатные фильтры (“Millipore”, США) с диаметром пор 0.2 мкм. Выделение ДНК проводили фенол-хлороформным методом.

ПЦР выполняли с использованием праймеров к гену *g20*: CPS1 и CPS4 (Fuller et al., 1998; Zhong et al., 2002). Ампликоны очищали на магнитных шариках CleanMag DNA (“Евроген”, Россия) по методике, описанной в протоколе. Подготовка библиотеки и секвенирование на Illumina MiSeq (2*300) выполнены в ЦКП “Геномика” (Новосибирск, Россия).

Контроль качества полученных прочтений осуществляли с помощью программы FastQC v. 1.11.4 (Andrews, 2010), затем данные были отсортированы по качеству с помощью Trimmomatic v. 0.36 (Bolger et al., 2014). В программе USEARCH v. 11.0.667 (Edgar, 2010) объединяли левые и правые риды, удаляли праймеры. Идентичные последовательности исключали из последующего анализа путем кластеризации на 100% (алгоритм Unoise3), на этом же этапе удаляли химеры.

Полученные нуклеотидные последовательности транслировали в белки с помощью программы BioEdit v. 7.2.6.1 (Hall, 1999). Ближайших родственников определяли с помощью BLASTr анализа (параметр $e\text{-value } 10^{-3}$), используя базы данных NCBI. Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили в программе MEGA7 (Kumar et al., 2016), алгоритм Clustal W. Деревья строили в программе Mr. Bayes v. 3.2.7 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). Для визуализации дерева использовали программу FigTree v. 1.4.4 (Rambaut, 2010).

Для оценки α - и β -разнообразия использовали нуклеотидные последовательности, доступные в NCBI. Оценку α -разнообразия осуществляли с помощью программы DNASP v. 6.12 (Rozas et al., 2017). Для оценки β -разнообразия на основе аминокислотных последовательностей гена *g20* из различных водоемов получали матрицу дистанций метрикой UniFrac, с последующим использованием иерархического кластерного анализа Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA). Дендрограммы получали на основе сравнения байкальских фрагментов гена *g20* с 17 пулами фрагментов из различных источников (озера, рисовые поля, моря), доступные в базе данных NCBI.

Обработанные нуклеотидные последовательности данного исследования депонированы в международную базу данных GenBank (NCBI) под номерами ON089135—ON089292.

В результате обработки первичных данных секвенирования фрагмента гена *g20* получено 158 последовательностей Zotu (zero-radius OTU). Анализ

BLASTr (база данных NCBI NR) показал, что наибольшее количество последовательностей (32.3%) сходно с последовательностями из оз. Байкал, полученных в предыдущих исследованиях. Следует отметить, что только 1.9% последовательностей из планктона Посольского сора близкородственно с вирусами из байкальской губки (*Lubomirskia baicalensis*), вероятно, из-за уникального как микробного, так и вирусного сообщества губки. Среди других экосистем большее количество сходных последовательностей было с субальпийскими озерами Анси и Бурже (Франция) — 15.8%, возможно, из-за значительного сходства гидрофизических и гидрохимических параметров (общий фосфор, общий азот, нитраты, pH), а также сходного состава бактериопланктона.

BLASTr анализ фрагмента гена с последовательностями, принадлежащими культивированным фагам, показал наибольшее сходство с цианофагами из Саргассова моря *Synechococcus* phage S-SSM7 (сходство 88.5%), хозяином которого является *Synechococcus* sp. WH8109 и *Prochlorococcus* phage Syn33 (сходство 72.7%), изолированного из Атлантического океана, хозяин *Synechococcus* sp. WH7803. Среди культивированных ближайших родственников не было последовательностей со 100% идентичностью.

Для оценки α -разнообразия проведен сравнительный анализ последовательностей на основе нуклеотидов (π). Последовательности из Посольского сора имели значение нуклеотидного разнообразия 0.30. Среди байкальских последовательностей из Посольского сора отличаются наибольшим нуклеотидным разнообразием по гену *g20*. Такое же значение характерно для последовательностей, полученных из Чесапикского залива и оз. Бурже.

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей *g20* с последовательностями культивированных и некультивированных фагов из различных природных источников показал высокое генетическое разнообразие вирусов в оз. Байкал. Последовательности из залива Посольский сор распределились по всему дереву, формируя как отдельные ветви, так и несколько монофилетических групп, что говорит об уникальности этих генотипов.

Методом UPGMA продемонстрировано, что распределение вирусов связано со средой обитания. Морские и пресноводные вирусы обычно не являются генетически близкими и группируются в обособленные филогенетические кластеры, как и следует из выполненного нами анализа. Последовательности из планктона залива Посольский сор сформировали общий кластер вместе с последовательностями, ранее полученными из различных экотопов оз. Байкал, включая эндемичные губки. Последовательности из оз. Байкал вошли в совместный кластер с таковыми из оз. Грин (США),

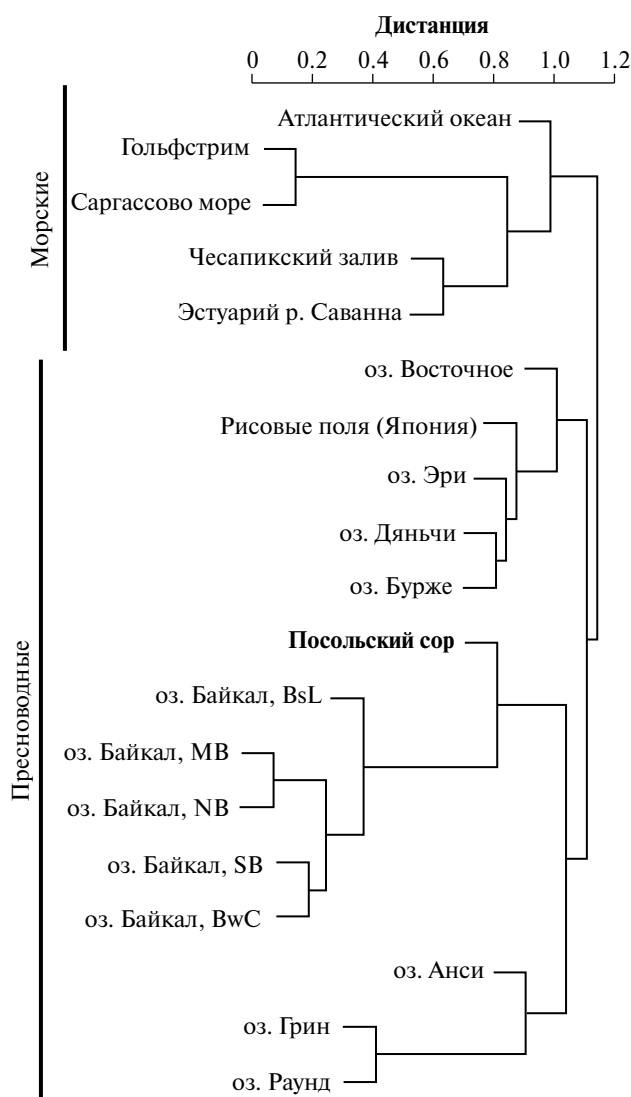


Рис. 1. Дендрограмма UPGMA, построенная с использованием последовательности гена *g20* (аминокислотный уровень). BsL — *Lubomirskia baicalensis*; WwC — вода, южная котловина; SB — вода, южная котловина; MB — вода, средняя котловина; NB — вода, северная котловина. Образец из этого исследования выделен жирным шрифтом.

Раунд (США) и Анси (Франция). Последовательности из озер Восточное (Китай), Дяньчи (Китай), Бурже (Франция) и Эри (США), вместе с последовательностями из рисовых полей (Япония), образовали отдельный кластер. Также, показано, что все байкальские последовательности группируются в общий кластер (рис. 1).

Таким образом, анализ последовательностей *g20* выявил высокое разнообразие и уникальность цианофагов оз. Байкал. Наибольшее количество идентичных последовательностей наблюдается с генами *g20* некультивируемых цианофагов из оз. Байкал и озер Бурже и Анси. Филогенетическая близость значительной доли генов *g20* из оз. Байкал с генами

фагов, инфицирующих виды рода *Synechococcus*, согласуется с фактом большого видового разнообразия и массового развития пикоцианобактерий этого рода в озере (Belykh et al., 2006). Поскольку последовательности, полученные из Посольского сора, на филогенетическом древе кластеризуются с последовательностями некультивируемых фагов из пресноводных водоемов, определить круг хозяев этих вирусов очень сложно; вероятно, что они поражают пресноводные виды цианобактерий и филогенетически далеки от морских цианофагов. Анализ с точки зрения биогеографии показал, что последовательности из залива Посольский сор формируют группу с байкальскими последовательностями, несмотря на отдаленные точки отбора, сезон, различный трофический статус пелагиали и литорали оз. Байкал, глубину и фракцию отбора. Такую же картину мы наблюдали при анализе *g23* гена бактериофагов из фракции более 0.2 мкм (Potapov et al., 2022).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках темы госзадания ЛИН СО РАН № 0279-2021-0015 “Исследования вирусных и бактериальных сообществ как основы стабильного функционирования пресноводных экосистем и эффективного ответа в условиях антропогенного воздействия”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бутина Т.В., Потанов С.А., Бельх О.И., Дамдинсүрэн Н., Чойдаш Б. Генетическое разнообразие цианофагов семейства *Myoviridae* в озере Байкал // Известия ИГУ. Сер. Биология. Экология. 2012. Т. 5. № 3. С. 17–22.
- Бутина Т.В., Потанов С.А., Бельх О.И., Беликов С.И. Генетическое разнообразие цианофагов семейства *Myoviridae* в составе сообщества байкальской губки *Lubomirskia baicalensis* // Генетика. 2015. Т. 51. С. 384–388.
- Butina T.V., Potapov S.A., Belykh O.I., Belikov S.I. Genetic diversity of the family *Myoviridae* cyanophages in the community of the Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis* // Genetics. 2015. V. 51. P. 313–317.
- Andrews S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data // 2010. [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Belykh O.I., Sorokovikova E.G., Saphonova A., Tikhonova I.V. Autotrophic picoplankton of Lake Baikal: composition,

- abundance, and structure // *Hydrobiologia*. 2006. V. 568S. P. 9–17.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B.* Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. P. 2114–2120.
- Edgar R.C.* Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Fuller N.J., Wilson W.H., Joint I.R., Mann N.H.* Occurrence of a sequence in marine cyanophages similar to that of T4 *g20* and its application to PCR-based detection and quantification techniques // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. P. 2051–2060.
- Hall T.* BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1999. V. 41. P. 95–98.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F.* MRBAYES: bayesian inference of phylogenetic trees // *Bioinformatics*. 2001. V. 17. P. 754–755.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K.* MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Potapov S.A., Tikhonova I.V., Krasnopeev A.Y., Suslova M.Y., Zhuchenko N.A., Drucker V.V., Belykh O.I.* Communities of T4-like bacteriophages associated with bacteria in Lake Baikal: diversity and biogeography // *Peer J*. 2022. V. 10. Art. e12748.
- Rambaut A.* 2010. FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (дата обращения 15.01.2023).
- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S.E., Sánchez-Gracia A.* DnaSP 6: dNA sequence polymorphism analysis of large data sets // *Mol. Biol. Evol.* 2017. V. 34. P. 3299–3302.
- Shtykova Yu.R., Suslova M. Yu., Drucker V.V., Belykh O.I.* Modern approach to the assessment of the sanitary-bacteriological condition of Lake Baikal // *Limnol. Freshwater Biol.* 2019. V. 2. P. 210–217.
- Suttle C.A.* Marine viruses — major players in the global ecosystem // *Nature Revs. Microbiol.* 2007. V. 5. P. 801–812.
- Wang K., Chen F.* Genetic diversity and population dynamics of cyanophage communities in the Chesapeake Bay // *Aquat. Microb. Ecol.* 2004. V. 34. P. 105–116.
- Wilhelm S.W., Carberry M.J., Eldridge M.L., Poorvin L., Saxton M.A., Doblin M.A.* Marine and freshwater cyanophages in a Laurentian Great Lake: evidence from infectivity assays and molecular analyses of *g20* genes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 4957–4963.
- Zhong Y., Chen F., Wilhelm S.W., Poorvin L., Hodson R.E.* Phylogenetic diversity of marine cyanophage isolates and natural virus communities as revealed by sequences of viral capsid assembly protein gene *g20* // *Society*. 2002. V. 68. P. 1576–1584.
- Zhong X., Jacquet S.* Prevalence of viral photosynthetic and capsid protein genes from cyanophages in two large and deep perialpine lakes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. P. 7169–7178.

SHORT COMMUNICATIONS

T4-Like Cyanophages of Lake Baikal: Genetic Diversity and Biogeography

S. A. Potapov^{1, *}, I. V. Tikhonova¹, E. L. Krechetova², and O. I. Belykh¹

¹*Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

²*Irkutsk State University Pedagogical Institute, Irkutsk, 664011 Russia*

*e-mail: poet1988@list.ru

Received October 13, 2023; revised November 2, 2023; accepted November 2, 2023

Abstract—The work deals with investigation of genetic diversity and biogeography of T4-like cyanophages from the shallow bay of the Posolsk Sor (Lake Baikal), based on analysis of the *g20* marker gene. High diversity of *g20* gene fragments and their uniqueness were revealed. The greatest similarity was noted with the previously obtained sequences from Lake Baikal and with those from freshwater ecosystems: oligotrophic Lake Green, Lake Round, oligomesotrophic Lake Ancy, and mesotrophic Lake Bourget. From the point of view of biogeography, it was determined that the phage sequences were similar to the previously obtained ones from different Lake Baikal ecotopes than to those from other ecosystems.

Keywords: cyanophages, genetic diversity, biogeography, gene *g20*, Lake Baikal