

Геном митохондрий штамма *Chlorella* sp. BAC9706, выделенного из озера Байкал

Краткое сообщение

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGYПанова Ю.А.^{1,2}, Черногор Л.И.^{2*}, Беликов С.И.^{2*}¹ Сибирский федеральный университет, Академгородок, 13а, Красноярск, 660036, Россия² Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. В данной статье мы представляем последовательность митохондриального генома зеленой водоросли озера Байкал, выделенную из полного генома штамма *Chlorella* sp. BAC9706. Секвенированный митохондриальный геном штамма BAC9706 имеет 90,8 тыс. п.н., содержащий в том числе 34 белок-кодирующих гена. Филогенетический анализ с использованием митохондриальных геномов водорослей порядка *Chlorellales* показал, что штамм BAC9706 принадлежит кладе *C. vulgaris* и является байкальским экотипом *C. vulgaris*.

Ключевые слова: *Chlorella vulgaris*, митохондриальный геном, озеро Байкал

Для цитирования: Панова Ю.А., Черногор Л.И., Беликов С.И. Геном митохондрий штамма *Chlorella* sp. BAC9706, выделенного из озера Байкал // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 5. - С. 1267-1275. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-5-1267

1. Введение

Байкал — уникальное древнее олиготрофное пресноводное озеро — самое глубокое, самое древнее и самое большое по объему в мире. Озеро имеет необычную климатическую среду и удивительное разнообразие эндемичной флоры и фауны. Автотрофный пикопланктон играет значительную роль в производстве первичного органического вещества. Летом пикопланктон обеспечивает 60–90% всей первичной продукции в озере Байкал (Votintsev et al., 1975; Bondarenko and Guselnikova, 1989; Nagata et al., 1994). Наибольший вклад в биомассу фитопланктона вносят диатомовые и золотистые водоросли (Bondarenko et al., 2017), тогда как зеленые водоросли *Chlorophyta* редки и представлены несколькими видами, а водоросли рода *Chlorella* отмечены лишь спорадически. Так, авторы сообщали о подледном развитии *Chlorella* sp. в озере Байкал (Kozhova, 1959; 1987, Nagata et al., 1994). Недавно было показано, что в 2020 г. подо льдом доминировали хлореллоподобные зеленые водоросли, а на всех исследованных станциях Иркутского водохранилища, опосредованно прилегающего к озеру Байкал, обнаружена *Chlorella vulgaris* Beijerinck. (Bashenkhaeva et al., 2020; Firsova et al., 2023). Массовая гибель эндемичных губок

Lubomirskia baikalensis началась в Байкале в 2011 г. (Belikov et al., 2019). Ранее нами было показано, что существенные изменения произошли в микробных сообществах губки *L. baikalensis* и культуре клеток примморф. Выявлены существенный сдвиг микробных сообществ и массовая гибель основных симбиотических зеленых водорослей *Choricystis* и их частичная замена другими водорослями в сообществах губок. (Belikov et al., 2019; Chernogor et al., 2020).

Проект последовательности генома штамма *Chlorella* sp. BAC9706 (Petrushin et al., 2020) был подготовлен для расширения наших молекулярно-биологических знаний об этих микроводорослях и для сравнения их с эндосимбиотическим штаммом водоросли в будущем. В этом исследовании мы собрали полный митохондриальный геном штамма микроводоросли BAC9706, морфологически похожего на водоросли типа *Chlorella*.

2. Материалы и методы

2.1. Секвенирование и сборка ДНК

Геномная ДНК была выделена, как описано ранее (Petrushin et al., 2020), и секвенирована с использованием платформы Illumina MiSeq. Проект

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: sergeibelikov47@gmail.com (S.I. Belikov)

Поступила: 30 сентября 2024; Принята: 23 октября 2024;

Опубликована online: 31 октября 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



сборки был создан с использованием SPAdes v. 3.15.4 (Bankevich et al., 2012). Этот проект сборки содержал 5837 контигов со значением N50 44 654 п.н., а самый большой контиг имел длину 317 606 п.н.

Полученные контиги полногеномной сборки были выровнены с референсными геномами, полученными из NCBI, с использованием BLASTn для идентификации митохондриального контига.

2.2. Аннотация митогенома

Для аннотации генома мы использовали инструмент GeSeq (Tillich et al., 2017) с параметрами по умолчанию для генов, кодирующих белок, тРНК и рРНК с NC_045362 последовательности штамма *Chlorella vulgaris* NJ-7 в качестве референса для митохондриального генома. Гены, кодирующие белок, были проверены вручную с помощью выравнивания гомологичных митогеномов из других штаммов *Chlorella vulgaris* с использованием поиска BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Белки, кодируемые в интронах (orf), были идентифицированы путем перевода нуклеотидной последовательности в последовательность белка с использованием инструмента перевода со стандартными генетическими кодами (<https://web.expasy.org/translate/>). Полная последовательность митохондриальной ДНК была загружена в базу данных GenBank (номер доступа PQ043348). Для визуализации геномных карт использовался OGDRAW (Greiner et al., 2019), для подготовки файлов для отправки в Genbank мы использовали GB2sequin (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/GenBank2Sequin.html>) (Lehwark and Greiner, 2019).

2.3. Филогенетический анализ

Для определения филогенетической связи рода *Chlorella* было построено дерево максимального правдоподобия с использованием MEGA11 (Tamura et al., 2021). Все доступные в настоящее время последовательности полных хорошо аннотированных митохондриальных геномов, принадлежащих к порядку Chlorellales, были выбраны из

NCBI. Из них мы извлекли все кодирующие белок последовательности, выполнили выравнивания и объединили их. Для улучшения выравниваний были удалены последовательности из удаленных таксонов. Окончательное филогенетическое дерево основано на последовательностях митохондриальных белков, представляющих 31 конкатенированный кодирующий белок митохондриальный ген (3 из 34 аннотированных генов, кодируемых интронами, были исключены из анализа).

3. Результаты и обсуждение

3.1. Нуклеотидный состав и структура генома

Полный митохондриальный геном *Chlorella* sp. BAC9706 был идентифицирован как кольцевая двухцепочечная молекула длиной 90770 п.н. и расположен между родственными штаммами UTEX259 (98062 п.н.) и NJ-7 (87477 п.н.). Нуклеотидный состав штамма *Chlorella* sp. BAC9706 составляет 35,2 % А, 35,0 % Т, 15,1 % G и 14,6 % С, с более высоким смещением АТ (70,2 %). Содержание АТ в митогеноме штамма BAC9706 было немного выше, чем у двух родственных штаммов, и составило 70,0 % (Таблица 1).

Митохондриальный геном штамма BAC9706 содержит 34 гена, кодирующих белки (PCG), 27 генов тРНК и 3 гена рРНК. Из них в общей сложности 19 PCG кодируются на тяжелой (H) цепи, а 15 генов расположены на легкой (L) цепи (Рис. 1). Общая длина генов, кодирующих белки, составляет 26969 п.н., что составляет 29,7% от всего митохондриального генома. Порядок генов в митохондриальном геноме идентичен порядку генов двух родственных штаммов хлореллы.

Гены, кодирующие белки, включают 13 для рибосомальных белков (rpl5-6, 16, rps2-4, 7, 10-14, 19), 9 для НАД(Ф)Н-хинон оксидоредуктаз (nad1-7, 9 и nad4L), 5 для АТФ-синтаз (atp1, atp4, atp6, atp8 и atp9), 3 для coxs (cox1-3), 1 для cob и 3 orf для предполагаемых белков. Были идентифицированы гены транспортной РНК для всех 20 аминокислот, в которых тРНК-Met, тРНК-Leu триплицированы, а тРНК-Ser, тРНК-Arg и тРНК-Gly дублированы. Все

Таблица 1. Распределения нуклеотидов в штаммах.

Нуклеотиды	BAC9706		UTEX259		NJ-7	
	Число, п.н.	%	Число, п.н.	%	Число, п.н.	%
Аденин (A)	31978	35.2	34356	35.0	30602	35.0
Цитозин (C)	13285	14.6	14462	14.7	12883	14.7
Гуанин (G)	13728	15.1	14965	15.3	13348	15.3
Тимин(Т)	31779	35.0	34279	35.0	30644	35.0
Пурины (A + G)	45706	50.4	49321	50.3	43950	50.2
Пиримидины(C + T)	45064	49.6	48741	49.7	43527	49.8
С + G	27013	29.8	29427	30.0	26231	30.0
А + Т	63757	70.2	68635	70.0	61246	70.0
Общая длина	90770		98062		87477	

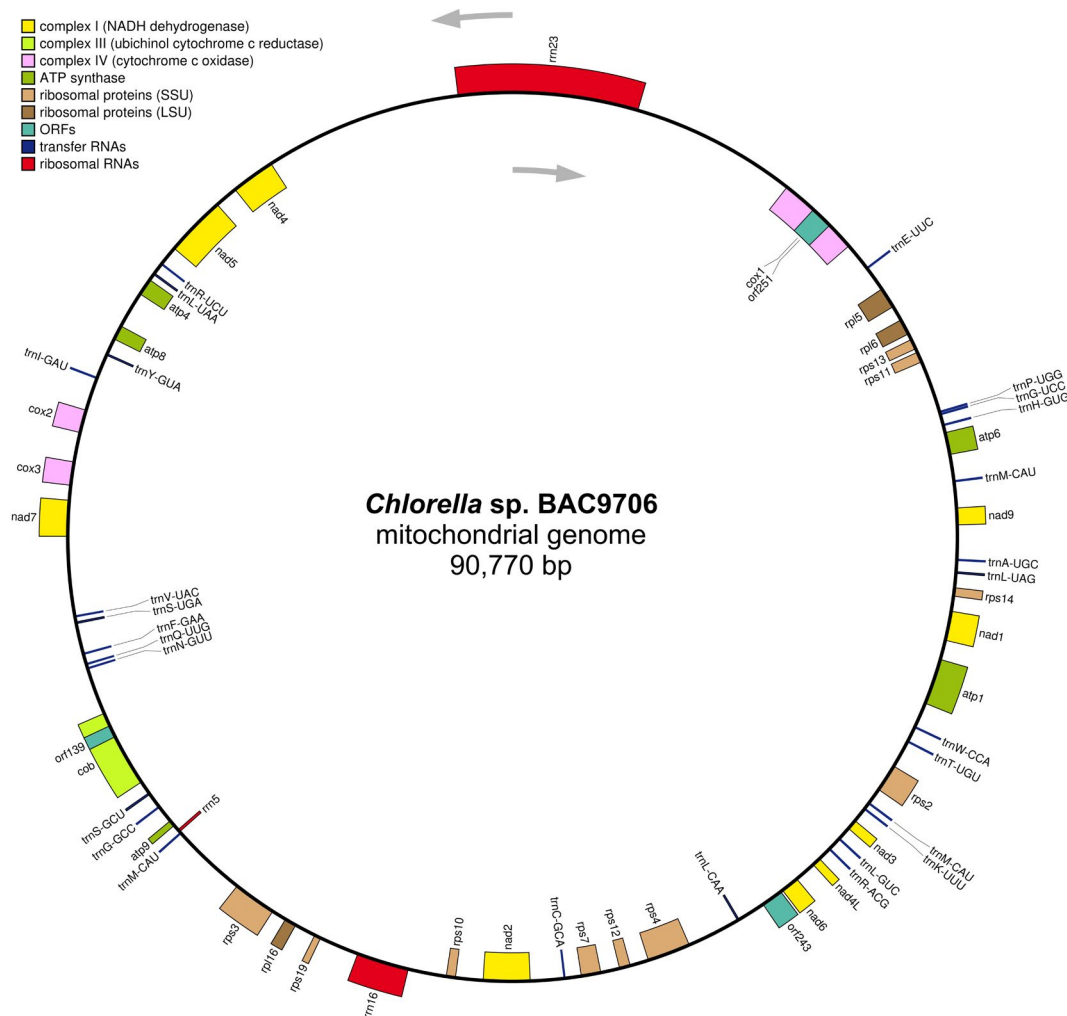


Рис.1. Карта митохондриального генома штамма *Chlorella* sp. BAC9706.

PCG имеют типичный иницирующий кодон ATG и стоп-кодон TAA, за исключением *rps13*, *rps14*, *atp8*, *atp9*, *cox2*, *nad3*, которые используют стоп-кодон TAG. Среди генов, кодирующих белок, *nad5* является самым длинным геном с длиной 2019 п.н., в то время как самым коротким является ген *atp9* с длиной 225 п.н. Количество оснований в 13 PCG следует схеме A (35,2%) > T (35,00%) > G (15,1%) > C (14,6%), что позволяет предположить, что AT более предпочтителен в PCG.

3.2. Филогенетический анализ

Филогенетический анализ с использованием митохондриальных геномов видов *Chlorellales* показал, что штамм BAC9706 тесно связан с другими штаммами *C. vulgaris* - UTEX259, NJ-7, ITBBA3-12, KNUA007, и они сгруппированы в линию *Chlorella* со 100% поддержкой бутстрепа (Рис. 2).

3.3. Выравнивание всего митогенома

Анализ выравнивания всего генома для трех штаммов *C. vulgaris* - UTEX259, NJ-7 и *Chlorella* sp. BAC9706 (Рис. 3) показывает следующие основные различия в митохондриальных геномах: в штамме UTEX259 интрон гена *cox1* содержит *orf441*, который отсутствует в двух других геномах; существен-

ные различия находятся в гене, кодирующем 23S рРНК, и в прилегающей области, аналогично, низкая консервативность наблюдается рядом с геном, кодирующим 16S рРНК.

Таким образом, основные различия между тремя близкородственными штаммами связаны с межгенными областями, близкими к генам рРНК.

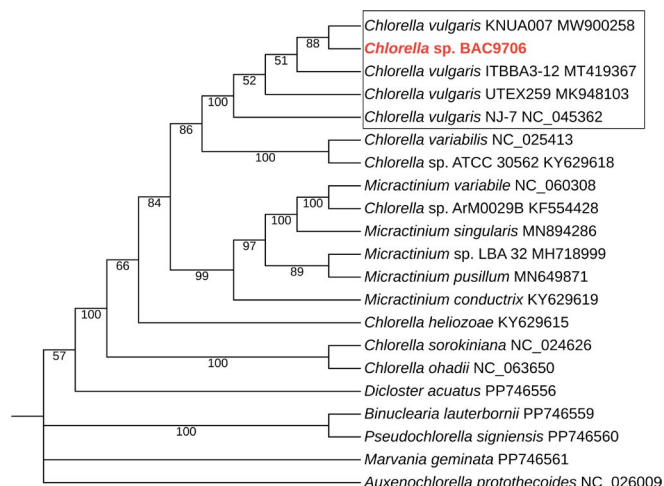


Рис.2. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия штамма *Chlorella* sp. BAC9706 на основе митохондриальных конкатенированных генов, кодирующих белок, из таксонов Chlorellales.



Рис.3. Выравнивание целых геномов для трех штаммов *Chlorella* - UTEX259 (MK948103), NJ7 (NC_045362) и *Chlorella* sp. BAC9706 (PQ043348). CDS показаны желтым цветом, рРНК - розовым, а тРНК - синим. Светло-зеленый линейный график показывает сохранение соответствующей области выравнивания.

4. Выводы

В этом исследовании мы успешно собрали и проанализировали полный митохондриальный геном зеленых водорослей Chlorophyta озера Байкал. Полногеномное секвенирование следующего поколения зеленых водорослей *Chlorella*-like и биоинформатический анализ выявили кольцевую двухцепочечную молекулу с типичным набором митохондриальных генов.

Построенное филогенетическое дерево однозначно указывает на то, что штамм *Chlorella*-like BAC9706 является одним из представителей вида водорослей *Chlorella vulgaris*, байкальского экотипа *C. vulgaris*.

Благодарности

Выражаем благодарность Д. Кузьмину, В. Шарову, К. Крутовскому и С. Феранчуку за помощь в администрировании и проведении вычислений на вычислительном кластере. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания № 0279-2021-0011.

Конфликт интересов

Авторы настоящим заявляют, что данная исследовательская работа и написание рукописи соответствовали этическим стандартам, и ни у кого из авторов нет потенциального конфликта интересов. Мы также заявляем, что данное исследование

не финансировалось никаким агентством, кроме RSF.

Список литературы

- Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. 2012. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19(5): 455-477. DOI: [10.1089/cmb.2012.0021](https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021)
- Bashenkhaeva M.V., Galachyants Y.P., Khanaev I.V. et al. 2020. Comparative analysis of free-living and particle-associated bacterial communities of Lake Baikal during the ice-covered period. *Journal of Great Lakes Research* 46(3): 508-518. DOI: [10.1016/j.jglr.2020.03.015](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2020.03.015)
- Belikov S., Belkova N., Butina T. et al. 2019. Diversity and shifts of the bacterial community associated with Baikal sponge mass mortalities. *PLoS ONE* 14(3): e0213926. DOI: [10.1371/journal.pone.0213926](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213926)
- Bondarenko N., Sheveleva N., Rozhkova N. et al. 2017. Remote mountain lakes of Eastern Siberia: a pattern of ecologically pure non-industrialized water-bodies. *Environmental Earth Sciences* 76(10): 1-10. DOI: [10.1007/s12665-017-6708-4](https://doi.org/10.1007/s12665-017-6708-4)
- Bondarenko N.A., Guselnikova N.E. 1989. Production of phytoplankton of Southern Baikal. *Bulletin of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences*. Issue 1. p. 77-80.
- Chernogor L., Klimenko E., Khanaev I. et al. 2020. Microbiome analysis of healthy and diseased sponges *Lubomirskia baicalensis* by using cell cultures of primmorphs. *PeerJ* 8(e9080): 1-24. DOI: [10.7717/peerj.9080](https://doi.org/10.7717/peerj.9080)
- Firsova A., Galachyants Yu., Bessudova A. et al. 2023. Summer phytoplankton species composition and abundance in the southern basin of Lake Baikal and Irkutsk Reservoir. *Limnology and Freshwater Biology* 6: 204-228. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-6-204](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-6-204)

Greiner S., Lehwark P., Bock R. 2019. Organellar genome DRAW (OGDRAW) version 1.3.1: Expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Research* 47(W1): W59-W64. DOI: [10.1093/nar/gkz238](https://doi.org/10.1093/nar/gkz238)

Kozhova O.M. 1959. About the subglacial “bloom” of phytoplankton in Lake Baikal. *Bot. Zh.* 44 (7). p. 1001.

Kozhova O.M. 1987. Phytoplankton of Lake Baikal: structural and functional characteristics. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 25. p. 19.

Lehwark P., Greiner S. 2019. GB2sequin - A file converter preparing custom GenBank files for database submission. *Genomics* 111(4): 759-761. DOI: [10.1016/j.ygeno.2018.05.003](https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.05.003)

Nagata T., Takai K., Kawanobe K. et al. 1994. Autotrophic picoplankton in southern Lake Baikal: abundance, growth and grazing mortality during summer. *J. Plankton Research* 16(8): 945-959.

Petrushin I.S., Belikov S.I., Belykh O.I. et al. 2020. Draft genome sequence of the green microalga *Chlorella* sp. strain BAC9706, isolated from Lake Baikal, Russia. *Microbiology Resource Announcements* 9(43). DOI: [10.1128/mra.00966-20](https://doi.org/10.1128/mra.00966-20)

Tamura K., Stecher G., Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022-3027. DOI: [10.1093/molbev/msab120](https://doi.org/10.1093/molbev/msab120)

Tillich M., Lehwark P., Pellizzer T. et al. 2017. GeSeq - versatile and accurate annotation of organelle genomes. *Nucleic Acids Research* 45(W1): W6-W11. DOI: [10.1093/nar/gkx391](https://doi.org/10.1093/nar/gkx391)

Votintsev K.K., Meshcheryakova A.I., Popovskaya G.I. 1975. Organic matter cycle in Lake Baikal. *USSR Academy of Sciences. SO Limnol.in-t. Novosibirsk: Nauka.* 189 p.