Правительство Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования

«Санкт-Петербургский государственный университет»

(СПбГУ)

УДК 579.8; 579.06

Рег № НИОКТР АААА-А20-120012490097-5

Инв.№

УТВЕРЖДАЮ

Начальник Управления

научных исследований СПбГУ

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Е.В. Лебедева

«\_\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2022 г.

ОТЧЁТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Новые цианобактерии, использующие дальний красный свет (выявление, описание и функциональный анализ)

(промежуточный, этап 2)

по гранту РФФИ

№ 20-04-00020

Руководитель НИР,

профессор,

доктор биологических наук  А.В. Пиневич

 *подпись*

Санкт-Петербург

2022

РЕФЕРАТ

Отчет 17 с., 1 кн., 51 источн.

Ключевые слова: цианобактерии, полифазная таксономия, дальний красный свет, хлорофилл d, хлорофилл f, фотоадаптация, FaRLiP, молекулярная филогения

Объектом исследования в данном Проекте являются оксигенные фототрофные прокариоты – цианобактерии. Целью работы является поиск и описание в рамках бактериальной полифазной таксономии новых цианобактерий, использующих дальний красный свет. Поиск и анализ новых объектов осуществляли с использованием набора классических микробиологических и спектрометрических методов, а также с привлечением современных методов молекулярно-филогенетического и биоинформатического анализа. Для семи штаммов цианобактерий р. *Leptolyngbya*, *Phormidium* и *Pseudаnabaena,* впервые показана способность к образованию длинноволновых хлорофиллов при освещении дальним красным светом. Описан и опубликован новый для науки вид *Altericista variichlora*, в геноме которого обнаружен кластер генов, отвечающих за фотоадаптацию к дальнему красному свету**.**

СОДЕРЖАНИЕ

|  |  |
| --- | --- |
| Введение  | 4 |
| Развернутый отчет о НИР  | 5 |
| Заключение | 12 |
| Список использованной литературы | 13 |
| Список публикаций по проекту | 17 |
|  |  |

Введение

Известно, что способностью к фотосинтезу с использованием дальнего красного света (ДКС; 700-800 нм) в первую очередь обладают аноксигенные бактерии − большинство пурпурных, зеленые, хлорацидо- и гелио-, а несколько видов пурпурных бактерий, образующих бактериохлорофилл b, используют инфракрасный свет (800-1200 нм). В отличие от них подавляющее большинство оксигенных бактерий, или цианобактерий, содержит хлорофилл a. У этого пигмента Qy-полоса (Qy-вектор энергетического перехода в длинноволновой области), или красный максимум поглощения света, находится при 700 нм. Однако известно небольшое количество штаммов одноклеточных и нитчатых цианобактерий, которые образуют «длинноволновые» хлорофиллы d и/или f (Qy-полоса при >700 нм; см. Averina et al., 2018), и поэтому они также способны использовать ДКС. В последние годы эти объекты изучают с разных сторон - от таксономического описания (Chen et al., 2012) до углубленного молекулярного анализа их светособирающих антенных комплексов и реакционных центров (Tomo et al., 2014). Выявленное разнообразие обладателей «длинноволновых» хлорофиллов (ДХ) еще невелико, и среди них мало удобных модельных объектов, что тормозит прогресс фундаментальных исследований феномена адаптации к ДКС. Следует также признать, что этими объектами занимается ограниченный круг исследователей, главным образом специалистов в области фотобиологии, тогда как бактериологи уделяют им недостаточно внимания.

Целью Проекта являются поиск и описание в рамках бактериальной полифазной таксономии новых цианобактерий, использующих ДКС. Это актуально для фундаментальной микробиологии, поскольку Проект предусматривает изучение филогении вновь найденных объектов, анализ распространения генов адаптации к ДКС, а также исследование взаимодействия основного светособирающего комплекса с ДХ. Исследование также актуально в свете разработки систем промышленного фотосинтеза с новым источником энергии и новыми объектами биотехнологии (см. Tomo et al., 2014; Akimoto et al., 2015).

Задачами этапа проекта на 2021 были: 1) получение новых штаммов цианобактерий, образующих ДХ и продолжение ретроспективного скрининга штаммов коллекции CALU на предмет выявления данного признака; 2) полифазное исследование материала, выявленного при решении Задачи 1, филогенетический анализ распространения способности адаптироваться к ДКС и оценка таксономического значения данного признака; 3) секвенирование и аннотирование геномов цианобактерий, образующих ДХ и выявление кластера FaRLiP и/или других детерминант адаптации к ДКС.

Развернутый отчет о НИР

При выполнении **задачи 1** для выделения новых штаммов природные образцы собирали, ориентируясь на типичные местообитания цианобактерий, образующих ДХ − ниши со слабым естественным освещением белым светом. Накопительные культуры выращивали при 20−22°C в модифицированной среде BG-11 (Pinevich et al., 2004), при постоянном освещении люминесцетными лампами холодного белого света интенсивностью 20−50 мкЕ фотонов/м2/с. С целью очистки культур использовали метод “истощающего мазка” с клонированием одиночных колоний на чашках Петри, под визуальным и микроскопическим контролем, а также с проверкой на гетеротрофную контаминацию на среде с добавлением глюкозы и ферментативного гидролизата казеина. В результате были получены 53 штамма, тестированные на наличие ДХ.

Штаммы коллекции CALU предварительно выращивали в модифицированной жидкой среде BG-11 или модифицированной среде Кратца-Майерса (Pinevich et al., 2004) при постоянном освещении люминесцентными лампами холодного белого света интенсивностью 20−50 мкЕ фотонов/м2/с. В итоге на наличие ДХ были тестированы 153 штамма, принадлежащие к родам *Anabaena* (12 штаммов), *Calothrix* (18), *Leptolyngbya* (66), *Oscillatoria* (12), *Pseudanabaena* (14) и *Nostoc* (31).

Для создания элективных условий синтеза ДХ исследуемые штаммы, выращивали при непрерывном освещении дальним красным светом интенсивностью 10 мкЕ фотонов/м2/с (LED с полосой испускания 730-750 нм) в течение 4-6 недель. Исходным доказательством присутствия ДХ служил максимум (плечо) при длине волны больше 700 нм на спектрах поглощения клеточных суспензий (регистрация на спектрофотометре Unico 2802S UV/VIS Spectrophotometer).1.3.

На этапе 2021 г. мы выявили 7 штаммов, у которых при выращивании под ДКС имелся максимум (плечо) при длине волны более 700 нм: три штамма (*Pseudanabaena* sp*.* 286х, *Phormidium* sp. Leb\_rock и *Leptolyngbya* sp. Neva\_2\_4) вновь выделены, а еще четыре штамма (*Leptolyngbya* sp. CALU 1711, *Leptolyngbya* sp. CALU 1713, *Leptolyngbya* sp. CALU 1715 и *Leptolyngbya* sp. CALU 1750) найдены среди представителей коллекции САLU.

Происхождение штаммов:

*Leptolyngbya* sp. СALU 1711 − из воды Английского пруда, Петергоф, С.-Петербург, Россия (2010 г.).

*Leptolyngbya* sp. CALU 1713 − из воды р. Тихая, пос. Бригадное, Приозерский р-н, Ленинградская обл., Россия (2011 г.).

*Leptolyngbya* sp. СALU 1715 − из воды оз. Онега, Новгородская обл., Россия (2011 г.).

*Leptolyngbya* sp. СALU 1750 − из воды оз. Тарасовское, Выборгский р-н, Ленинградская обл., Россия (2011 г.).

*Leptolyngbya* sp. Neva\_2\_4 − из смеси песка и водорослевой массы, берег р. Нева, С.-Петербург, Россия (2021 г.).

*Phormidium* sp. Leb\_rock − из обрастание гранитного камня, пос. Лебедевка, Выборгский р-н, Ленинградская обл., Россия (2021 г.).

*Pseudanabaena* sp. 286x − из микробного мата, оз. Степпед, оазис Холмы Ларсеманн, Восточная Антарктида (2021 г.).

Таким образом, по завершении второго этапа выполнения Проекта мы имеем коллекцию из 15 штаммов, образующих ДХ, что значительно расширило круг культивируемых модельных объектов для изучения адаптации к ДКС (см. Averina et al., 2018).

Помимо вышеуказанных штаммов, из обрастания на поверхности бетонной плиты, омываемой водами Черного моря (пос. Шепси, Краснодарский край, Россия, 2021 г.), получена смешанная накопительная культура нитчатых цианобактерий. Она обозначена как shepsi\_more, и ее суспензия имела максимум (плечо) при росте на ДКС.

Для решения **задачи 2** полифазное исследование отобранных штаммов мы начинали с **качественного анализа фотосинтетических пигментов**. На спектрах поглощения клеток 7 отобранных штаммов, а также смешанной накопительной культуры shepsi\_more, выращенных при освещении белым светом (БС), были зарегистрированы максимумы, характерные для хлорофилла а (680 нм) и фикоцианина (620-630 нм). В случае штамма *Pseudanabaena* sp. 286x и накопительной культуры shepsi\_more, был зарегистрирован дополнительный максимум, характерный для фикоэритрина (565 нм). На спектрах поглощения клеток, выращенных при освещении ДКС, присутствовало плечо при длине волны более 700 нм, характерное для ДХ. Появление длинноволнового максимума свидетельствовало об адаптивном синтезе ДХ при фотоакклиматизации к ДКС (англ. Far-Red Light Photoacclimation, FaRLiP). Данный процесс связан с перестройкой фотосинтетического аппарата, в частности образованием ДХ d и/или f, а также изменением молекулярного состава и архитектуры основного светособирающего комплекса - фикобилисомы (Gan et al., 2015). Цианобактерии, адаптивно синтезирующие хлорофиллы d и/или f входят в состав биопленок, микробных матов и строматолитов (Chen et al., 2012; Gan et al., 2015; Trampe, Kühl, 2016). Они обнаружены в морских экосистемах (Chen et al., 2012), пресных озерах (Akutsu et al., 2011), горячих источниках (Gan et al., 2014; 2015), заболоченной почве (Airs et al., 2014; Gan et al., 2015) и эпилитных сообществах карстовых пещер (Behrendt et al., 2015). Некоторые из таких местообитаний попали в поле зрения нашего исследования.

**Флуоресцентный анализ фотосинтетических пигментов.** Для 4 штаммов: *Leptolyngbya* sp. Neva\_2\_4 (выделен в 2021 г.), *Phormidium* sp. Leb\_rock (выделен в 2021 г.), *Leptolyngbya* sp. Neva\_2\_6 (выделен в 2020 г.) и *Leptolyngbya* sp. Leb\_dry (выделен в 2020 г.) были зарегистрированы спектры испускания флуоресценции и спектры возбуждения флуоресценции с использованием сканирующего спектрофотометра-флуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies) Образцы 2-4 недельных культур осаждали центрифугированием, промывали 100 мМ буфером HEPES (pH 8,0) и ресуспендировали в 50 мМ буфере HEPES. Спектры испускания флуоресценции регистрировали при возбуждении светом 405, 440 и 550 нм соответственно, а спектры возбуждения флуоресценции – светом 745 нм. Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Cary Eclipse Scan.

У всех штаммов, выращенных при освещении БС, при возбуждении хлорофиллов светом длиной волны 405 нм были 2-3 главных пика испускания флуоресценции при 640-725 нм. У всех штаммов, выращенных при освещении ДКС, зарегистрирована интенсивная флуоресценция при 730-740 нм. У штамма *Phormidium* sp. Leb\_rock дополнительно зарегистрированы максимумы испускания флуоресценции 466-482 нм. Аналогичный результат получен при возбуждении хлорофилла светом длиной волны 440 нм.

Полученные результаты совпадают с литературными данными, в частности с результатами сравнения спектров флуоресценции *Halomicronema hongdechloris*, выращенной при освещении БС или ДКС (Chen et al., 2012). При возбуждении хлорофилла светом 405 нм на спектрах испускания флуоресценции клеток, выращенных при освещении БС, были зарегистрированы сравнимые по интенсивности максимумы при 640, 658, 682 и 730 нм. В свою очередь, у клеток, выращенных при освещении ДКС, главный максимум испускания флуоресценции находился при 748 нм, а меньшие по высоте максимумы - при 682 и 720 нм. В капитальном исследовании феномена FaRLiP (Gan et al., 2015) сравнили спектры испускания флуоресценции у штаммов *Calothrix* sp. PCC 7507, *Chlorogloeopsis* sp. PCC 9212, *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203, *Fischerella thermalis* PCC 7521 и *Synechococcus* sp. PCC 7335. Для возбуждения флуоресценции использовался свет 440 нм. В случае клеток, выращенных при освещении БС, были зарегистрированы максимумы испускания флуоресценции при 683-684, 693-695 и 718-727 нм, тогда как у выращенных при освещении ДКС клеток, в зависимости от штамма, были зарегистрированы 2-5 максимума при длине волны более 710 нм (Gan et al., 2015). Таким образом, в случае клеток, выращенных при освещении ДКС, в спектре испускания флуоресценции (при возбуждении хлорофилла светом длиной волны 405−440 нм) присутствовали дополнительные максимумы флуоресценции при длине волны свыше 730 нм (Akimoto et al., 2015; Chen et al., 2012; Gan et al., 2015).

Для возбуждения флуоресценции фикобилипротеинов использовали свет 550 нм. На спектрах испускания флуоресценции клеток, выращенных при освещении БС, главный максимум находился 640-655 нм, а в некоторых случаях появлялось плечо при 690-715 нм. В случае клеток, выращенных при освещении ДКС, помимо максимума при 645-660 нм присутствовал дополнительный максимум при 715-735 нм. У *Leptolyngbya* sp. Neva\_2\_4 имелось лишь небольшое плечо при 675-710 нм.

Эти результаты также согласуются с литературными данными. При анализе клеток культуры *Synechococcus* sp. PCC 7335, выращенной при освещении КС или ДКС (Ho et al., 2016), в ответ на возбуждение фикобилипротеинов светом длиной волны 590 нм наблюдали характерные спектры эмиссии флуоресценции. В первом случае это были максимумы при 643, 658 и 679 нм; во втором случае помимо них дополнительные максимумы при 717 и 737 нм. Появление дополнительных пиков флуоресценции у клеток, выращенных при освещении ДКС, было объяснено перестройкой фикобилисом из-за активации генного кластера, отвечающего за FaRLiP (FaRLiP gene cluster).

Спектры возбуждения флуоресценции регистрировали, измеряя эмиссию флуоресценции при 745 нм. У клеток, выращенных при освещении БС, главный максимум находился при 620-650 нм. У штамма *Leptolyngbya* sp. Neva\_2\_4 был зарегистрирован максимум при 712 нм. У всех штаммов, выращенных при освещении ДКС, за исключением *Leptolyngbya* sp. Neva\_2\_4, присутствовали два главных максимума: узкий, более интенсивный при 715-720 нм и широкий при 650-670 нм. У штамма *Leptolyngbya* sp. Neva\_2\_4 наблюдались максимумы убывающей интенсивности при 632, 667 и 712 нм.

Согласно литературным данным, на спектрах возбуждения флуоресценции клеток *H. hongdechloris*, выращенных при освещении ДКС, в ходе регистрации эмиссии флуоресценции при 745 нм были обнаружены дополнительные пики при 710-720 нм (Chen et al., 2012). В случае клеток, выращенных при освещении БС, наблюдались главные максимумы при 630 и 672 нм и минорный максимум при 706 нм. В случае клеток, выращенных при освещении ДКС, также были зарегистрированы максимумы при 630, 672 и 712 нм, причем первый из них был значительно ниже, а третий выше максимума при 706 нм, чем у клеток, выращенных при освещении БС.

В целом полученные нами результаты подтверждают факт присутствия длинноволновых хлорофиллов у штаммов, выращенных при освещении ДКС. Более детальная расшифровка спектров флуоресценции при возможности проведения анализа в криогенном режиме, позволит в дальнейшем охарактеризовать взаимодействие пигментов фотосинтетического аппарата в состоянии FaRLiP.

**Морфологический анализ**. Изученные за отчетный период цианобактерии имеют нитчатый (трихомный) морфотип и, согласно руководству Берги, относятся к Субсекции III филы Cyanobacteria (Castenholz, 2001). Большинство из них диагностируется как *Leptolyngbya* sp.: клетки цилиндрические, диаметром 2-3 мкм, с чехлом, трихом не дает истинного ветвления, дифференцированные клетки – гетероцисты и акинеты – отсутствуют. Штамм 286х мы предварительно отнесли к роду *Pseudanabaen*a – диаметр 2-3 мкм, трихом без выраженного чехла, имеется характерное сужение в области контакта соседних клеток. Штамм Leb\_rock попадает под описание рода *Phormidium* (Komárek et al., 2014) – клетки цилиндрические или изодиаметрические диаметром примерно 5 мкм, имеют тонкий чехол, сужение отсутствует.

**Филогенетический анализ.** Для штаммов *Leptolyngbya* sp. СALU 1711, CALU 1713, СALU 1715 и СALU 1750 ранее была определена последовательность гена 16S рРНК, депонированная в GenBank под номерами ID KX263931, KX263933, KX263935 и KX263945 (Velichko et al., 2018). Степень их попарного сходства составляет 94-99%; по данным GenBank ближайшая культивируемая форма – *Leptolyngbya cf. limnetica* BACA0071 (95-98% сходства) выделена из воды озера Lagoa Negra на Азорских островах (Cordeiro et al., 2020).

За отчетный период проанализированы последовательности генов 16S рРНК двух штаммов, выделенных в 2020 г. (*Leptolyngbya* sp. Leb\_dry и *Leptolyngbya* sp. Neva\_2\_6), а также полученных в 2021 г. штаммов (*Leptolyngbya* sp. Neva\_2\_F4 и *Phormidium* sp. Leb\_rock). ДНК выделяли методом CTAB (Murray, Thompson, 1980). Фрагмент гена 16S рРНК амплифицировали с использованием группоспецифичных CYA106F/CYA781R (Nübel et al., 1997) и универсальных бактериальных праймеров 27F/1492R (Lane, 1991; Turner et al., 1999) по специально разработанным нами протоколам. Секвенированные последовательности сравнивали с последовательностями GenBank с помощью программы BLAST (Altschul et al., 1990), ориентируясь на близкородственных культивируемых представителей.

Последовательности 16S рРНК *Leptolyngbya* sp.\_ Leb\_dry и *Phormidium* sp. Leb\_rock имели наибольший уровень сходства (99% и более) с последовательностями 16S рРНК *Phormidium murrayi*. Вид *P. murrayi* был подвергнут ревизии как новый вид *W. murrayi* нового рода *Wilmottia* на основе результатов анализа гена 16S рРНК у нескольких десятков штаммов, выделенных из низкотемпературных ниш, таких как морское побережье, бентос, озерный перифитон, прибрежная часть водных артерий и грунтовые воды. В таких местообитаниях способность использовать ДКС может принести экофизиологические преимущества (Strunecký et al., 2011).

Согласно полученным данным 16S-риботипирования, штамм *Leptolyngbya* sp. Neva\_2\_4 близок штаммам *Leptolyngbya* sp. СALU 1711 (99%), CALU 1713 (98%), СALU 1715 (96%) и СALU 1750 (94%). Сходные последовательности, обнаруженные в GenBank, принадлежат как некультивируемым (Uncultured bacterium clone Y1-2, 95%-ное сходство), так и культивируемым *(Leptolyngbya* sp. CENA156, 92%-ное сходство) цианобактериям.

Штамм *Leptolyngbya* sp. Neva\_2\_6 обладал максимальным сходством гена 16S рРНК (95-96%) с культивируемыми представителями родов *Leptolyngbya*, *Plectolyngbya* и *Plectonema*, как и наш штамм, выделенными из почвы или обрастаний на поверхности камней. Тем не менее, в противовес диагностическому признаку родов *Plectolyngbya* и *Plectonema*, способности к ложному ветвлению, наш штамм не проявил.

**Таксономическое значение признака “способность адаптироваться к дальнему красному свету”.** Как следует из вышеизложенного, полученные в ходе выполнения Проекта ДКС-адаптирующиеся штаммы – в основном представители Субсекции III. Эти нитчатые, не ветвящиеся, не образующие дифференцированных клеток цианобактерии идентифицированы нами как *Leptolyngbya* sp., *Phormidium* sp. и *Pseudanabaena* sp.

Следует отметить, что способность адаптироваться к ДКС до этого была обнаружена только у четырех представителей Субсекции III – *Leptolyngbya* sp. JSC1, Oscillatoriales cyanobacterium JSC12, *Halomicronema hongdechloris* C2206 и *Halomicronema* sp. Clifton (Averina et al., 2018; Antonaru et al., 2020). Примечательно, что наличие ДХ f было использовано в качестве диагностического признака при описании нового вида H. hongdechloris (hongde по-китайски “красный”; Chen et al., 2012).

В то же время способность адаптироваться к ДКС была ранее обнаружена только у шести одноклеточных штаммов, относящихся к Cубсекциям I и II, причем это были представители уже известных таксонов (см. Averina et al., 2018). Принадлежащий к Субсекции I одноклеточный штамм CALU 1173 был описан нами с применением комплексного (полифазного) анализа на предыдущем этапе выполнения Проекта. В 2021 г. этот штамм опубликован как типовой для нового вида *Altericista variichlora* в составе нового рода *Altericista* (лат. *variichlora* – образующий разные хлорофиллы, в данном случае хлорофиллы a, d и f; Averina et al., 2021). Таким образом, как и в случае *H. hongdechloris*, способность адаптироваться к ДКС была нами использована в качестве диагностического признака при описании нового таксона и отражена в видовом эпитете.

В рамках решения **задачи 3** мы секвенировали геном штамма CALU 1173 − типового для нового вида *A. variichlora*. Геномную ДНК выделяли методом CTAB (Murray, Thompson, 1980) и фрагментировали ультразвуком на приборе Covaris S2 (США). Библиотеки (исходное количество ДНК 500 нг) получали с помощью набора KAPA HyperPrep Kit (Roche, Швейцария) согласно протоколу производителя и секвенировали на приборе HiSeq 4000 (Illumina, США) в режиме парно-концевого прочтения. При сборке генома объединяли данные двух секвенирований.

Качество сборки контролировали утилитой FastQC (Andrews et al., 2010) с оболочкой MultiQC (Ewels et al., 2016). Учитывали распределение длин прочтений, качество распределения нуклеотидов вдоль прочтения, а также наличие избыточно представленных последовательностей (в частности, не удаленных адаптеров). Результаты этапа контроля качества учитывали при тримминге, который производили утилитой BBDuk (Bushnell, 2014) с учетом результатов, полученных на этапе контроля качества. Производили рутинную подрезку прочтений до уровня quality =10, удаление адаптеров (при их наличии) и удаление коротких прочтений. Дальнейшую сборку осуществляли по программе metaSPAdes (Nurk et al., 2017). Помимо целевого цианобактериального генома продукт секвенирования дополнительно содержал геномы 3−5 симбионтов, что объясняется контаминацией культуры. Анализ графа сборки выявил заметный уровень разнообразия сопутствующих штаммов, что в свою очередь привело к фрагментации сборки. Поскольку сопутствующие компоненты представляли собой т.н. "мини-метагеномы" с достаточно большим отличием GC-состава от целевого цианобактериального генома, не потребовалось использовать инструменты для кластеризации контигов; взамен этого графы сборки были отфильтрованы по покрытию внутри сборщика. Это позволило эффективно удалить преобладающую часть геномов бактерий-симбионтов и, в свою очередь, устранить часть межвидовых повторов при использовании алгоритма разрешения повторов exSPAnder (Prjibelski et al., 2014).

**Частичное аннотирование генома *Altericista variichlora* CALU 1173.** Скрининг кластера FaRLiP проводили путем наложения скрытых марковых моделей семейств соответствующих генов на граф сборки при помощи инструмента PathRacer (Shlemov, Korobeynikov, 2019). Скрытые марковы модели для семейств генов, входящих в кластер FarLiP, извлекали из набора TIGRFAM (Li et al., 2021). После определения границ кластера все не аннотированные открытые рамки считывания (ORF) дополнительно курировали вручную путем поисков в базе RefSeq. В итоге анализа в геноме *A. variichlora* CALU 1173 мы обнаружили кластер FaRLiP (см. Gan et al., 2014; Gan, Bryant, 2015; Gan et al., 2015). Согласно анализу геномов, находящихся в свободном доступе, этот кластер имеют два десятка штаммов цианобактерий (Gan et al., 2014; 2015; Antonaru et al., 2020). В его состав входит 21 ген, в том числе паралоги, кодирующие субъединицы ФСI (*psa*A2, *psa*B2, *psa*L2, *psa*I2, *psa*F2 и *psa*J2) и ФСII (*psb*A3, *psb*A4, *psb*B2, *psb*C2 и *psb*D2). Предполагается, что продукты этих генов служат адаптивными апопротеинами хлорофилла aи ДХ, обеспечивая эффективную миграцию энергии в антеннах реакционных центов и/или транспорт электронов в реакционных центрах (Gan, Bryant, 2015). Анализ аминокислотных последовательностей апопротеинов PsbA3 и PsbA4 показывает, что PsbA3 имеет классический набор консервативных аминокислотных остатков, лигандирующих Mn-кластер и другие компоненты электрон-транспортной цепи оксигенного фотосинтеза. Апопротеин PsbA4 (т.н. "super rogue" PsbA) имеет сильно измененную последовательность, в которой отсутствует ряд консервативных аминокислотных остатков, в частности нужных для лигандирования Mn-кластера (Murray, 2012; Cardona et al., 2015; Gan et al., 2015). В то же время белок PsbA4 участвует в биосинтезе хлорофилла f в качестве хлорофилл f-синтазы (Ho et al., 2016; Shen et al., 2019).

По нашим данным, в состав кластера FaRLiP также входят паралоги генов аллофикоцианина *apc*A2, *apc*B2, *apc*D2, *apc*D3 и *apc*E2, которые кодируют субъединицы кора фикобилисомы и экспрессируются на ДКС (см. Gan et al. 2014; Zhao et al. 2015). Модифицированные фикобилисомы лишены “коротковолновой” периферии стержней, что способствует оптимальной фотоакклиматизации (Gan et al., 2015; Soiler et al., 2020). В отличие от апопротеинов, которые образуются при освещении культуры БС, продукты генов *apc*A2, *apc*D2 и *apc*D3 содержат дополнительные высоко консервативные остатки Cys, которые специфичны для ДКС-адаптирующихся цианобактерий (Gan et al., 2015; Herrera-Salgado et al., 2018). Согласно реконструкции третичной структуры (αβ)-тримеров аллофикоцианина, дополнительные остатки Cys не образуют ковалентной связи с билиновыми хромофорами (Bryant et al., 2020). Показано также, что у делеционных мутантов *Synechococcus* sp. PCC 7335 по генам *apc* кластера FaRLiP содержание хлорофилла d значительно снижалось в случае роста при освещении ДКС по сравнению со штаммом дикого типа. Отсюда следует (Bryant et al., 2020), что дополнительные остатки Cys участвуют в биосинтезе этого пигмента, хотя соответствующий фермент точно не идентифицирован. Согласно результатам 3D-реконструкции (Bryant et al., 2020), каталитические остатки Cys должны быть на периферии его молекулы, и при синтезе хлорофилла d его предшественник − хлорофилл и/или хлорофиллид а − беспрепятственно взаимодействует с этими остатками.

Еще один выявленный нами продукт экспрессии генов кластера FaRLiP − это белок АрсЕ2, который кодируется паралогом гена *aрс*Е1. В его аминокислотной последовательности произошло много замен, в частности в положении-183 отсутствует консервативный остаток Cys, который связывает фикоцианобилин в случае других вариантов α-субъединицы (Gan et al., 2015, Miao et al., 2019). У белка АрсЕ1 остаток Cys находится в положении-230, в то время как у белка АрсЕ2 его место занимает остаток Val. Кроме того АрсЕ2 отличается от ApcЕ1 консервативным мотивом VIPEDV. Поскольку в аминокислотной последовательности белка АрсЕ2 сохраняется т.н. “chromophore binding pocket”, билиновый хромофор не связан ковалентно, в результате чего максимум поглощения пигмента сдвигается в длинноволновую часть спектра (Gan et al., 2015; Ho et al., 2017b; Miao et al., 2019).

Известно (Zhao et al., 2015) что кластер FaRLiP регулируется 2-х компонентной фосфорелейной системой (сенсор-киназа и регулятор ответа). Она состоит из продуктов генов *rfp*A, *rfp*B и *rfp*C (которые также входят в кластер FaRLiP) и реагирует на изменение условий освещения. Имеющий гистидинкиназный домен сенсор RfpA входит в семейство knotless-фитохромов. Регулятор ответа RfpC представляет собой CheY-подобный белок. Второй регулятор ответа RfpB служит активатором транскрипции кластера FaRLiP; он имеет два CheY-подобных домена для проведения сигнала, которые фланкируют ДНК-связывающий домен (Zhao et al., 2015; Ho et al., 2017a). При действии этой регуляторной системы активируется гистидинкиназа RfpA, которая в свою очередь активирует ключевой регулятор ответа RfpB и активатор транскрипции. Компонент RfpC действует как переносчик фосфатной группы между RfpA и RfpB. Роль этой регуляторной системы подтверждается мутационным анализом: мутанты по генам *rfp*A, *rfp*B и *rfp*C, полученные для *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203, *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212 и *Synechococcus* sp. PCC 7335, не экспрессируют гены кластера FaRLiP при освещении ДКС. В частности они не могут адаптивно синтезировать хлорофилл f, хотя образуют хлорофилл d даже в случае роста при освещении БC (Zhao et al., 2015).

Мы установили, что локализация генов регуляторной системы в кластере FaRLiP *A. variichlora* необычна. А именно, у других ДКС-адаптирующихся штаммов (Gan et al., 2015) три гена этой системы колокализованы в порядке *rfp*B−*rfp*A*−rfp*C. В то же время у нашего штамма ген *rfp*B расположен в положении upstream отдельно от двух других. Причина и следствие данной транспозиции послужат предметом отдельного анализа.

Таким образом, мы обнаружили и проанализировали кластер генов, отвечающих за адаптацию к ДКС у нового вида цианобактерий.

Заключение

В ходе реализации этапа Проекта были выполнены все поставленные задачи. Для семи штаммов цианобактерий р. *Leptolyngbya*, *Phormidium* и *Pseudаnabaena*, вновь выделенных или отобранных после скрининга 153 штаммов из коллекции микроорганизмов (CALU) С.-Петербургского Государственного Университета, показана способность к образованию длинноволновых хлорофиллов (ДХ) при освещении дальним красным светом (ДКС). Аутентичность ДХ подтверждена методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии. Согласно полученным данным риботипирования и результатам филогенетического анализа исследованные штаммы принадлежат к разным филотипам, что косвенно указывает на возможность горизонтального переноса генов, отвечающих за адаптацию к ДКС. Сформированная коллекция цианобактерий, способных образовывать длинноволновые хлорофиллы, служит источником новых модельных объектов для исследования механизмов фотоадаптации к ДКС.

С использованием полифазного подхода описан и опубликован новый род *Altericista*; один из его трех видов, *A. variichlora* (типовой штамм - CALU 1173), образует ДХ d и f при освещении ДКС. Секвенирован геном *A. variichlora*, содержащий генный кластер фотоакклиматизации к ДКС (FaRLiP). В отличие от двухкомпонентной сигнальной системы этого кластера, описанной другими авторами, ген регулятора ответа *rfp*B расположен на хромосоме отдельно от двух других генов - гена сенсора *rfp*A и гена проводника сигнала *rfp*C.

Полученные результаты использовались при подготовке публикаций в изданиях, включенных Web of Science, и докладов на проходивших в текущем году тематических научных конференциях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Airs R.L., Temperton B., Sambles C., Farnham G., Skill S.C. & C. A. Llewellyn C.A. Chlorophyll *f* and chlorophyll *d* are produced in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* when cultured under natural light and near-infrared radiation // FEBS Lett. 2014, 588: 3770–3777.

2. Akimoto S.T., Shinoda M., Chen S., Allakhverdiev I. & Tomo T. Energy transfer in the chlorophyll *f*-containing cyanobacterium, *Halomicronema hongdechloris*, analyzed by time-resolved fluorescence spectroscopies // Photosynth. Res. 2015, 125: 115–122.

3. Akutsu S., Fujinuma D., Furukawa H., Watanabe T., Ohnishi-Kameyama M., Ono H., Ohkubo S., Miyashita H. Kobayashi M. Pigment analysis of a chlorophyll *f*-containing cyanobacterium strain KC1 isolated from Lake Biwa // Photomed. Photobiol. 2011, 33: 35–40.

4. Altschul S.F., Gish W., Miller W. & Myers E.W. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. 1990, 215: 403−410.

5. Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data // Babraham Bioinform. 2010, https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

6. Antonaru L.A., Cardona T., Larkum A.W.D. & Nürnberg D.J. Global distribution of a chlorophyll *f* cyanobacterial markers // ISME J. 2020, 14: 2275–2287.

7. Averina S., Velichko N., Senatskaya E., Pinevich A. Far-red light photoadaptations in aquatic cyanobacteria // Hydrobiologia. 2018, 813: 1−17.

8. Behrendt L., Brejnrod A., Schliep M., Sørensen S.J., Larkum A.W., Kühl M. Chlorophyll *f*-driven photosynthesis in a cavernous cyanobacterium // ISME J. 2015, 9: 2108−2111.

9. Bryant D.A., Shen G., Turner G.M., Soulier N., Laremore T.N. & Ho M.-Y. Far-red light allophycocyanin subunits play a role in chlorophyll *d* accumulation in far-red light // Photosynth. Res. 2020, 143: 81–95.

10. Bushnell B. BBMap: a fast, accurate, splice-aware aligner // Joint Genome Instritute, department of energy. 2014. https://www.osti.gov/biblio/1241166-bbmap-fast-acc.

11. Cardona T., Murray J.W. & Rutherford A.W. Origin and evolution of water oxidation before the last common ancestor of cyanobacteria // Mol. Biol. Evol. 2015, 32: 1310−1328.

12. Castenholz R.W. Phylum BX. Cyanobacteria. In: Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (Boone D.R., Castenholz R.W. & Garrity G.M., Eds.). 2001. Springer-Verlag, New York, P. 473−487.

13. Chen M., Li Y., Birch D. & Willows R.D. A cyanobacterium that contains chlorophyll *f* − a red-absorbing photopigment // FEBS Lett. 2012, 586: 3249−3254.

14. Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T.J., Higgins D.G. & Thompson J.D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs // Nucleic Acids Res. 2003, 31: 3497−3500.

15. Cordeiro R., Luz R., Vasconcelos V., Gonçalves V. & Fonseca A. Cyanobacteria phylogenetic studies reveal evidence for polyphyletic genera from thermal and freshwater habitats // Diversity. 2020, 12: 298.

16. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R. & Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // Nature Meth. 2012, 9: 772.

17. Ewels P., Magnusson M., Lundin S. & Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report // Bioinformatics. 2016, 32: 3047–3048.

18. Gan F. & Bryant D.A. Adaptive and acclimative responses of cyanobacteria to far-red light // Environ. Microbiol. 2015, 17: 3450–3465.

19. Gan F., Shen G. & Bryant D.A. Occurrence of far-red light photoacclimation (FaRLiP) in diverse cyanobacteria // Life. 2015, 5: 4–24.

20. Gan F., Zhang S., Rockwell N.C., Martin S.S., Lagarias J.C. & Bryant D.A. Extensive remodeling of a cyanobacterial photosynthetic apparatus in far-red light // Science. 2014, 345: 1312–1317.

21. Gómez-Lojero C., Leyva-Castillo L.E., Herrera-Salgado P., Barrero-Rojas J., Rios-Castro E & Gutiérrez-Cirlos E.B. *Leptolyngbya* CCM 4, a cyanobacterium with far-red photoacclimation from Cuatro Ciénegas Basin, México // Photosynthetica. 2018, 56: 342−353.

22. Herrera-Salgado P., Leyva-Castillo L.E., Ríos-Castro E. & Gómez-Lojero C. Complementary chromatic and far-red photoacclimations in *Synechococcus* ATCC 29403 (PCC 7335). I: The phycobilisomes, a proteomic approach // Photosynth. Res. 2018. 13: 39–56.

23. Ho M., Gan F., Shen G. & Bryant D.A. Far-red light photoacclimation (FaRLiP) in *Synechococcus* sp. PCC 7335. II. Characterization of phycobiliproteins produced during acclimation to far-red light // Photosynth. Res. 2017b, 131:187–202.

24. Ho M.-Y., Gan F., Shen G., Zhao C. & Bryant D.A. Far-red light photoacclimation (FaRLiP) in *Synechococcus* sp. PCC 7335: I. Regulation of FaRLiP gene expression // Photosynth. Res. 2017a, 131: 173–186.

25. Ho M.-Y., Shen G., Canniffe D.P., Zhao C. & Bryant D.A. Light-dependent chlorophyll *f* synthase is a highly divergent paralog of PsbA of photosystem II // Science. 2016, 353: aaf9178.

26. Komárek J., Kaštovský J., Mareš J. & Johansen J.R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach // Preslia. 2014, 86: 295–335.

27. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics (Stackebrandt E. & Goodfellow M., Eds.). 1991. J. Wiley and Sons. Chichester, P. 115-175.

28. Li W., O’Neill K.R., Haft D.H. & 18 more authors. RefSeq: expanding the prokaryotic genome annotation pipeline reach with protein family model curation // Nucleic Acids Res. 2021, 49: D1020–D1028.

29. Marquardt J.D. & Palińska K.A. Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (*Oscillatoriales*) from different habitats and geographical sites // Arch. Microbiol. 2006, 187: 397−413.

30. Miao D., Ding W., Zhao B., Lu L., Xu Q., Scheer H. & Zhao K.-H. Adapting photosynthesis to the near-infrared: non-covalent binding of phycocyanobilin provides an extreme spectral red-shift to phycobilisome core-membrane linker from *Synechococcus* sp. PCC7335 // Biochim Biophys. Acta. 2016, 1857: 688–694.

31. Murray J.W. Sequence variation at the oxygen-evolving centre of photosystem II: A new class of 'rogue' cyanobacterial D1 proteins // Photosynth. Res. 2012, 110: 177–184.

32. Murray M.G. & Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Res. 1980, 8: 4321−4325.

33. Nowack S., Olsen M.T., Schaible G.A., Becraft E.D., Shen G., Klapper I., Bryant D.A. & Ward D.M. The molecular dimension of microbial species: 2. *Synechococcus* strains representative of putative ecotypes inhabiting different depths in the Mushroom Spring microbial mat exhibit different adaptive and acclimative responses to light // Front. Microbiol. 2015, 6: 626.

34. Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria // Appl. Environ. Microbiol. 1997, 63: 3327−3332.

35. Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A. & Pevzner P.A. MetaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler // Genome Res. 2017, 27: 824−834.

36. Olsen M.T., Nowack S., Wood J.M. & 9 more authors. The molecular dimension of microbial species: 3. Comparative genomics of *Synechococcus* strains with different light responses and in situ diel transcription patterns of associated putative ecotypes in the Mushroom Spring microbial mat // Front. Microbiol. 2015, 6: 604.

37. Pinevich A.V., Andronov E.E., Pershina E.V., Pinevich A.A. & Dmitrieva H.Y. Testing culture purity in prokaryotes: criteria and challenges // Ant. van Leeuwehoek. 2018, 111: 1509−1521.

38. Pinevich A.V, Mamkaeva K.A., Titova N.N., Gavrilova O.V., Ermilova E.V., Kvitko K.V., Pljusch A.V., Voloshko L.N. & and Averina S.G. St. Petersburg culture collection (CALU): four decades of storage and research with microscopic algae, cyanobacteria and other microorganisms // Nova Hedwigia. 2004, 79: 115−126.

39. Prjibelski A.D., Vasilinetc I., Bankevich A. & 8 other uthors. ExSPAnder: a universal repeat resolver for DNA fragment assembly // Bioinformatics. 2014, 30: i293–i301.

40. Rippka R., Coursin T., Hess W. & 7 more authors. *Prochlorococcus marinus* Chisholm *et al*. 1992 subsp. *pastoris* subsp. nov. strain PCC 9511, the first axenic chlorophyll a2/b2-containing cyanobacterium (*Oxyphotobacteria*) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000, 50: 1833−1847.

41. Saitou N. & Nei M. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987, 4: 406−425.

42. Shen G., Canniffe D.P., Ho M.Y., Kurashov V., van der Erst A., Golbeck J.H. & Bryant D.A. Characterization of chlorophyll *f* synthase heterologously produced in *Synechococcus* sp. PCC 7002 // Photosynth. Res. 2019, 140: 77–92.

43. Shlemov A. & Korobeynikov A. PathRacer: Racing Profile HMM Paths on Assembly Graph // In: Algorithms for Computational Biology. AlCoB Lecture Notes in Computer Science (Holmes I., Martín-Vide C. & Vega-Rodríguez M., Eds.). 2019. Springer, Cham., 1488: 80−94.

44. Soulier N., Laremore T.N. & Bryant D.A. Characterization of cyanobacterial allophycocyanins absorbing far-red light // Photosynth. Res. 2020, 145: 189–207.

45. Strunecký O., Elster J. & Komárek J. Taxonomic revision of the freshwater cyanobacterium „*Phormidium*“ *murrayi* = *Wilmottia murrayi* // Fottea. 2011, 11: 57–71.

46. Tomo T., Shinoda T.Y, Chen M., Allakhverdiev S.I. & Akimoto S. Energy transfer processes in chlorophyll f-containing cyanobacteria using time-resolved fluorescence spectroscopy on intact cells // Biochim. Biophys. Acta. 2014, 1837: 1484-1489.

47. Trampe E. & Kühl M. Chlorophyll *f* distribution and dynamics in cyanobacterial beachrock biofilms // J. Phycol. 2016, 52: 990−996.

48. Turner S., Pryer K.M., Miao V.P.W. & Palmer J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis // J. Eukaryotic Microbiol. 1999, 46: 327−338.

49. Velichko N.V., Emelijanova M.S., Averina S.G., PInevich A.A. & Pinevich A.V. Taxonomic attribution of “*Oscillatoriales*” strains within the bacteriological system of Cyanobacteria: identification algorithm for operational genera // Microbiology. 2018, 87: 393−406.

50. Zhang Z.C., Li Z.K., Yin Y.C., Li Y., Jia Y., Chen M. & Qiu B.-S. Widespread occurrence and unexpected diversity of red-shifted chlorophyll producing cyanobacteria in humid subtropical forest ecosystems // Environ. Microbiol. 2019, 21: 1497−1510.

51. Zhao C., Gan F., Shen G. & Bryant D.A. RfpA, RfpB and RfpC are the master control elements of far-red light photoacclimation (FaRLiP) // Front. Microbiol. 2015, 6: 1303.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ПРОЕКТУ

1. Averina S., Polyakova E., Senatskaya E., Pinevich A. A new cyanobacterial genus *Altericista* and three species, *A. lacusladogae* sp. nov., *A. violacea* sp. nov., and *A. variichlora* sp. nov., described using a polyphasic approach // J. Phycol. 2021. V.57 (5). P.1517-1529. First published: 09 June 2021. doi: 10.1111/jpy.13188.

2. Velichko N., Smirnova S., Averina S., Pinevich A. A survey of Antarctic cyanobacteria // Hydrobiologia. 2021. V.848. P. 2627–2652. Published: 27 April 2021. doi:10.1007/s10750-021-04588-9.

3. Аверина С.Г., Пиневич А.В. Система цианобактерий: логика и новые горизонты разнообразия // Сборник материалов 3-его Российского микробиологического конгресса. Электронное сетевое издание. Псков: Псковский государственный университет, 2021. – 296 с. ISBN 978-5-00200-015-9, с. 45-46.

Мероприятие - 3-ий Российский микробиологический конгресс, 26 сен. – 1 окт. 2021 г. г. Псков, Сайт мероприятия https://www.microbiology-congress.ru.

4. Сенатская Е., Аверина C., Полякова Е., Величко Н., Пиневич А. Цианобактерии, образующие длинноволновые пигменты: результаты расширенных поисков // IX Съезд Российского Фотобиологического общества. Материалы съезда. Пущино, Россия, 2021 -182 с. ISBN 978-5-9905822-4-8, c. 167.

Мероприятие - IX Съезд Российского Фотобиологического общества. Всероссийская конференция “Современные проблемы фотобиологии”. 12-19 сентября 2021, пос. Шепси, Краснодарский край. Сайт мероприятия http://www.photobiology.ru/web9/9rsp\_index.htm.