

Sequenciamento do DNA mitocondrial de *Chlamydomonas biconvexa* revela um mitogenoma compacto

Patrícia Verdugo Pascoal¹, Sámed Ibrahim Isa Abdel Hadi², Andrei Stecca Steindorff³, Eduardo Fernandes Formighieri⁴, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil⁵

Resumo

A estirpe de microalga *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 foi isolada das águas residuais de uma indústria sucroalcooleira em Goianésia, GO. Essa estirpe robusta é capaz de atingir altas produtividades de biomassa rica em proteínas e carboidratos quando cultivada em vinhaça, passivo gerado em grandes quantidades na produção de etanol de cana-de-açúcar. Neste estudo, relatamos a sequência do DNA mitocondrial de *C. biconvexa* Embrapa|LBA40. Seu DNA foi sequenciado por meio da plataforma Illumina HiSeq e Miseq e analisado *in silico* quanto ao conteúdo gênico e ao perfil filogenômico. A metodologia seguiu etapas de controle de qualidade, montagem, anotação e reconstrução filogenômica. A estirpe apresentou mitogenoma linear com estimativa de 9,27 kb de tamanho, contendo 21 genes. Entre eles, 9 codificam para proteínas, 10 para tRNAs e 2 para rRNAs, responsáveis pela manutenção da cadeia respiratória e síntese de ATP. A presença do gene *trnQ* no mitogenoma contendo o códon UUG, um padrão semelhante aos códons encontrados em bactérias (AUG, GUG, UUG), corrobora a hipótese de que alfa-proteobactérias sejam as possíveis ancestrais do genoma mitocondrial. Curiosamente, os genes da subunidade *cox2* e *cox3* estão ausentes nesse mitogenoma, dando origem a um genoma mais simples e compacto em comparação com as outras espécies de microalgas. A perda de informação genética durante a evolução deixa para a subunidade *cox1* todo o papel na geração da enzima citocromo oxidase C. A análise filogenética revelou que a cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 possui um dos menores mitogenomas de uma espécie de microalga relatado até agora.

Palavras-chave: microalgas. mitogenoma. genes. filogenômica.

Introdução

Chlamydomonas é um gênero de microalgas bastante estudado e citado quanto às suas aplicações biotecnológicas (SCRANTON et al., 2015). A espécie *Chlamydomonas biconvexa*, tratada no presente estudo, possui potencial aplicação na produção de

¹ Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, mestranda em Biotecnologia, Fundação Universidade Federal do Tocantins, patricia.pascoal@colaborador.embrapa.br.

² Biotecnólogo, doutorando em Bioinformática, Universidade Federal de Minas Gerais, samed.ibrahim@colaborador.embrapa.br

³ Biólogo, doutor em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, andrei.steindorff@colaborador.embrapa.br

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Biologia Funcional e Molecular, pesquisador da Embrapa Agrogenética, eduardo.formighieri@embrapa.br

⁵ Biólogo, doutor em Microbiologia, pesquisador da Embrapa Agroenergia, bruno.brasil@embrapa.br

biomassa com altos teores de proteínas e carboidratos de interesse para a indústria agroalimentar e de biocombustíveis; além da capacidade de ser cultivada em efluentes agroindustriais, contribuindo com a biorremediação desses resíduos líquidos (NASCIMENTO, 2016).

O estudo do mitogenoma dessa espécie contribui com o aumento de informações genéticas, uma vez que são poucos os genomas de organelas já sequenciados em microalgas do gênero e do filo Chlorophyta. Tais informações são necessárias para melhor explorar as características e o potencial biotecnológico do gênero *Chlamydomonas* e contribuir para a geração de bioprodutos de valor agregado para diversas vertentes da Biotecnologia industrial.

Materiais e Métodos

Coleta da amostra, extração do DNA e identificação da cepa

A coleta da amostra foi realizada na vinhaça da indústria sucroalcooleira Jalles Machado (Goianésia, GO). A coleta foi autorizada e registrada conforme os preceitos legais. O cultivo foi realizado em meio BBM (SCHLÖSSER, 1997) a 28 °C, com intensidade luminosa de 50 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 16/8h. A extração do DNA genômico total foi realizada utilizando o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) adaptado de Doyle e Doyle (1990).

Para a identificação, a cepa foi submetida à identificação morfológica, seguida de identificação molecular em que a região ITS1-5.8S-ITS2 foi amplificada por PCR e anotada. As sequências nucleotídicas do gene 5.8S e regiões ITS foram depositadas no GenBank (KT308076.2). A busca por similaridade foi realizada utilizando a ferramenta BLAST. A estrutura secundária da região ITS2 foi predita e comparada com sequências próximas na busca por CBCs e hemi-CBCs (HADI et al., 2016).

Sequenciamento

A cepa nativa do Brasil, Embrapa|LBA40, depositada na Coleção de Microrganismos e Microalgas da Embrapa Agroenergia (Brasília, DF), pertencente à espécie *Chlamydomonas biconvexa*, teve seu genoma fragmentado para a construção de duas bibliotecas: *shotgun library* (2 x 250 pb), sequenciada em plataforma Illumina MiSeq; e *jump library* 3 kb (2 x 125 pb), sequenciada em plataforma Illumina HiSeq 2500. O sequenciamento da biblioteca *paired-end (shotgun)* gerou ~34 milhões de *reads* com tamanho médio de inserto de 280 pb. Já o sequenciamento da biblioteca *jump* gerou ~35 milhões de *reads* com tamanho médio de inserto de 1.8 kb, além de ~30 milhões de *reads* com tamanho médio de inserto de 325 pb. O resultado foi uma cobertura média do genoma total de 40X. Após a obtenção dos *reads* sequenciados, foram iniciadas as análises *in silico* no Laboratório de Bioinformática em Bioenergia (LBB) da Embrapa Agroenergia.

Controle de qualidade de dados

O conjunto de dados do sequenciamento foi verificado quanto à qualidade das sequências pela ferramenta de controle de qualidade FastQC (BABRAHAM BIOINFORMATICS, 2010). Os adaptadores foram trimados por meio do software

Trimmomatic (BOLGER, 2014) com os seguintes parâmetros: ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:3:30:10; SLIDINGWINDOW:4:20 e MINLEN:50.

Montagem do mitogenoma

A montagem do genoma foi realizada com a ferramenta de reconstrução de genoma mitocondrial, MITObim (HAHN et al., 2013), em baixa cobertura, 2X, para retirada da organela. A biblioteca utilizada foi *paired-end* (PE), previamente processada e utilizando-se o mitogenoma da espécie de referência, *Chlamydomonas reinhardtii*.

Anotação de genes mitocondriais

O processo de anotação foi efetuado com o servidor *web* para anotação mitocondrial, MITOS Web Server (BERNT et al., 2013), com a opção: Mold|Protozoan|Coelenterate.

Construção da árvore filogenética

Para a análise filogenômica, a ferramenta RAxML versão 8 (STAMATAKIS, 2014) foi aplicada com valor de bootstrap de 100. O programa FigTree (RAMBAUT, 2006) proporcionou a visualização e edição da árvore filogenômica. Foram incluídos 15 mitogenomas de outras espécies de algas verdes e utilizadas as espécies *Micromonas commoda* como o *outgroup*.

Resultados e discussão

Os 8 genes codantes presentes no genoma mitocondrial são responsáveis pela respiração celular da espécie estudada, especificamente na fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria. A lista de 21 genes inclui os genes *cob*, *cox1*, *nad1*, *nad2*, *nad4*, *nad5-0_b*, *nad5-0_a*, *nad5-1* e *nad6*, além de genes que codificam para tRNAs como: *trnF*, *trnP*, *trnW*, *trnQ*, *trnI*, *trnC*, *trnN*, *trnT*, *trnM* e *trnE*, e por fim, 2 rRNAs: *rrnL* e *rrnS*.

A teoria da existência de um evento de endossimbiose para fundamentar a origem das mitocôndrias a partir de uma α -proteobacteria foi formulada por Altmann (1894) e, até hoje, vem sendo consolidada pela presença de códons de iniciação provenientes de bactérias. Basicamente, o genoma de endossimbiontes foi reduzido no conteúdo gênico e em seu tamanho, gerando uma dependência direta dos endossimbiontes com a célula hospedeira. O gene *trnQ* no mitogenoma da espécie aqui tratada contém o códon UUG, padrão similar aos códons encontrados em bactérias (AUG, GUG, UUG, AUA); sendo assim, é aceitável afirmar que o mesmo tem herança direta com α -proteobacterias, possível progenitora da mitocôndria (TANIFUJI et al., 2016).

Tabela 1. Anotação e características do mitogenoma de *Chlamydomonas biconvexa*.

Gene	Posição no Genoma		Tamanho (pb)	Proteína produto ou função
	Início	Fim		
Cob	570	1622	1053	Proteína do Apocitocromo b
nad4	1823	2851	1029	Gene da subunidade 4 da NADH desidrogenase
trnF (aaa)	3266	3332	67	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido ácido glutâmico
trnP (cgg)	3464	3531	68	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido arginina
nad5-0_b	3660	4259	600	Gene da subunidade 5 da NADH desidrogenase, gene dividido, parte 0_b
nad5-0_a	4271	4795	525	Gene da subunidade 4 da NADH desidrogenase, gene dividido, parte 0_a
cox1	5054	6538	1485	Gene da subunidade 1 da citocromo oxidase
nad5-1	6679	6840	162	Gene da subunidade 5 da NADH desidrogenase, gene dividido, parte 1
nad2	6923	7786	864	Gene da subunidade 2 da NADH desidrogenase
nad6	7987	8397	411	Gene da subunidade 6 da NADH desidrogenase
trnW (cca)	8475	8549	75	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido prolina
trnQ (ttg)	9251	9322	72	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido leucina
rrnL	9593	9866	274	RNA Ribossomal 23S
nad1	10390	11265	876	Gene da subunidade 1 da NADH desidrogenase
trnI (tat)	11574	11627	54	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido ácido aspártico
trnC (gca)	12134	12193	60	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido treonina
trnN (att)	12510	12580	71	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido isoleucina
trnT (tgt)	12710	12765	56	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido glicina
rrnS	13357	13640	284	RNA Ribossomal 16S
trnM (cat)	13876	13494	74	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido histidina
trnE (ttc)	14580	14633	54	RNA transportador. Códon de iniciação: aminoácido fenilalanina

A Tabela 1 contém informações como: a posição do gene no mitogenoma, onde cada gene inicia e termina, o comprimento de cada gene em pares de bases (pb) e a função ou produto de cada gene.

Pode-se observar que os genes codantes são os maiores no comprimento em pb, como é o caso do gene *cox1* com 1485 bp, seguido pelo *cob*, *nad4*, *nad1*, *nad2*, *nad5-0_b*, *nad5-0_a*, *nad6* e *nad5-1* em ordem decrescente de tamanho. Em seguida, os dois genes de RNAs ribossomais, *rrnS* e *rrnL* tem 284 bp e 274 bp, respectivamente, e, finalmente, os RNAs transportadores apresentaram os menores genes em pb dentro do mitogenoma da espécie *Chlamydomonas biconvexa*.

A Figura 1 ilustra o mitogenoma total com tamanho estimado em 9,27 kb e estrutura linear, como relatado para o gênero das *Chlamydomonas* e pela presença de

telômeros palindrômicos (HAMAJI et al., 2017). A ordem dos genes ocorre da esquerda para a direita na figura 1 e cada gene segue a ordem presente da Tabela 1.



Figura 1. Mitogenoma linear anotado com tamanho estimado de 9,27 kb. Genes de proteína codante (setas vermelhas), genes de tRNA (setas azuis) e genes de rRNA (setas verdes).

A ausência de algumas subunidades importantes como genes *cox2* e *cox3* foi verificada no mitogenoma de *Chlamydomonas biconvexa* e também nas demais espécies que compõem a classe Chlorophyceae, parte superior da árvore (Figura 2), resultando em uma classe com genomas mais simples e compactos. A perda de informação genética com o decorrer da evolução pode ser explicada pela necessidade em diminuir a demanda energética durante a síntese de proteínas, levando a subunidade *cox1* a demandar todo o papel na geração da enzima citocromo C oxidase.

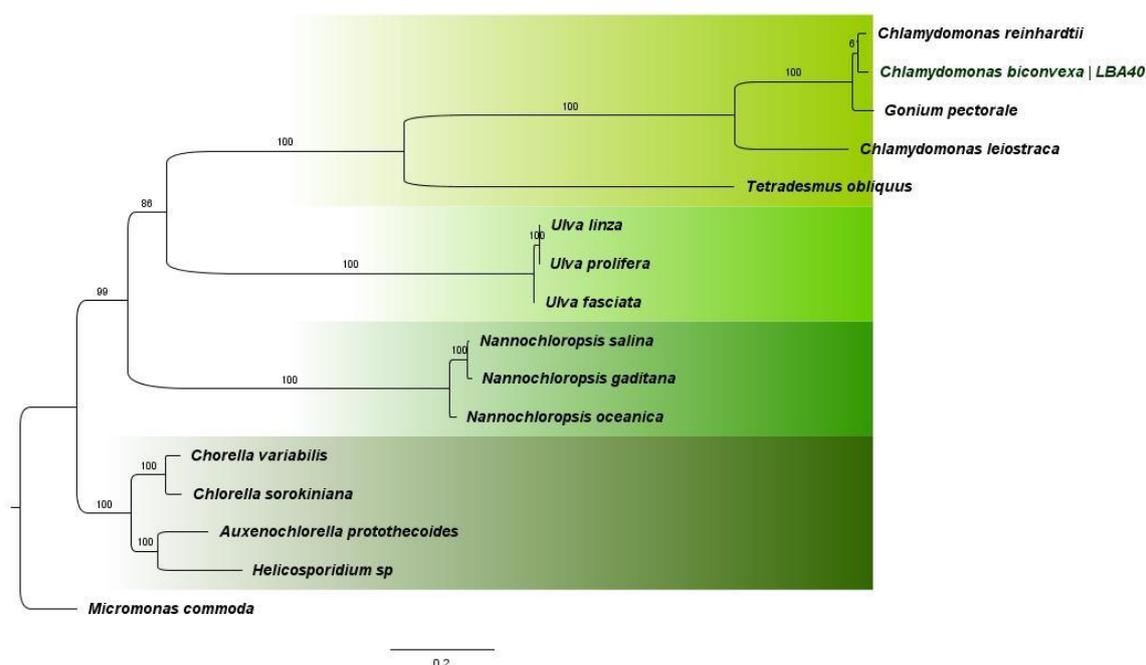


Figura 2. Árvore filogenômica baseada na Máxima Verossimilhança (MV) usando o programa RAxML com valor de bootstrap representado em cada ramo da árvore. A árvore é composta por espécies de algas verdes divididas em quatro classes desse grupo fotosintético.

O mitogenoma da espécie filogeneticamente mais distante, *Micromonas commoda* da classe prasinophyta, é o maior na análise filogenômica, uma vez que possui baixa densidade gênica em relação às outras algas, sendo a mais próxima das plantas terrestres. Um dos motivos para a diminuição da densidade genética nos genomas eucariotos é que esses genomas contêm quantidades consideráveis de DNA repetitivo (VAN BAREN et al., 2016). Na classe das Chlorophyceae, por sua vez, são

relatados mitogenomas menos complexos, mais compactos e de alta densidade gênica, com cerca de 1.980 genes/Mb ou 1,98 gene/kb) (TURMEL et al., 2002).

Considerações Finais

A sequência nucleotídica do mitogenoma da LBA40 será em breve depositada nos bancos de dados públicos. A obtenção dos dados moleculares e análises realizadas neste estudo enriquecerá o conhecimento sobre questões evolutivas das microalgas, além subsidiar futuros estudos de melhoramento genético, por exemplo.

Embora uma tendência geral de redução de tamanho em espécies de Chlamydomonadales tenha sido relatada anteriormente, a análise filogenética revela que a cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 possui um dos menores mitogenomas de uma espécie de microalga relatada até agora.

Referências

- ALTMANN, R. **Die elementar organismen und ihre beziehungen zu den zellen**. Leipzig: Verlag, 1894.
- BABRAHAM BIOINFORMATICS. **FastQC**: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>. Acesso em: 10 de Junho de 2017.
- BERNT, M.; DONATH, A.; JÜHLING, F.; EXTERNBRINK, F.; FLORENTZ, C.; FRITZSCH, G.; PÜTZ, J.; MIDDENDORF, M.; STADLER, P. F. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 2, p. 313-319, 2013.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADE, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30 n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- HADI, S. I. I. A.; SANTANA, H.; BRUNALE, P. P. M.; GOMES, T. G.; OLIVEIRA, M. D.; MATTHIENSEN, A.; OLIVEIRA, M. E. C.; SILVA, F. C. P.; BRASIL, B. S. A. F. DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. **PloS One**, v. 11, n. 2, 2016.
- HAHN, C.; BACHMANN, L.; CHEVREUX, B. Reconstructing mitochondrial genomes directly from genomic next-generation sequencing reads: a baiting and iterative mapping approach. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 13, artigo e129, 2013.
- HAMAJI, T.; KAWAI-TOYOOKA, H.; TOYODA, A. Multiple Independent Changes in Mitochondrial Genome Conformation in Chlamydomonadalean Algae. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 993-999, 2017.
- NASCIMENTO, R. C. do. **Cultivo de microalgas em fotobiorreatores de placas planas para a produção de biomassa e biorremediação de efluente da agroindústria de óleo de palma**. 2016. 55 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO. Orientador: Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil.
- SCHLÖSSER, U. C. Additions to the culture collection of algae since 1994. **Botanica Acta**, v. 110, n. 5, p. 424–429, 1997.
- SCRANTON, M. A.; OSTRAND, J. T.; FIELDS, F. J.; MAYFIELD, S. P. Chlamydomonas as a model for biofuels and bio-products production. **Plant Journal**, v. 82, n. 3, p. 523–531, 2015.
- STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.

TANIFUJI, G.; ARCHIBALD J. M.; HASHIMOTO T. Comparative genomics of mitochondria in chlorarachniophyte algae: endosymbiotic gene transfer and organellar genome dynamics. **Scientific Reports**, v. 6, artigo 21016, 2016.

TURMEL, M.; OTIS, C.; LEMIEUX, C. The complete mitochondrial DNA sequence of *Mesostigma viride* identifies this green alga as the earliest green plant divergence and predicts a highly compact mitochondrial genome in the ancestor of all green plants. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 4, p. 585, 2002.

VAN BAREN, M. J.; BACHY, C.; REISTETTER, E. N.; PURVINE, S. O.; GRIMWOOD, J.; SUDEK, S.; YU, H.; POIRIER, C.; DEERINCK, T. J.; KUO, A.; GRIGORIEV, I. V.; WONG, C-H.; SMITH, R. D.; CALLISTER, S. J.; WEI, C-L.; SCHMUTZ, J.; WORDEN, A. Z. Evidence-based green algal genomics reveals marine diversity and ancestral characteristics of land plants. **BMC Genomics**, v. 17, artigo 267, 2016.