

Sekwencjonowanie genomu psychrotrofowego grzyba *Cladosporium* sp. 01

Mateusz Kutyla¹, Anna Marzec-Grządziel²

¹Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, Akademicka 19, 20-033 Lublin, Polska;
mateusz.kutyla@mail.umcs.pl

²Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Mikrobiologii, Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, Polska

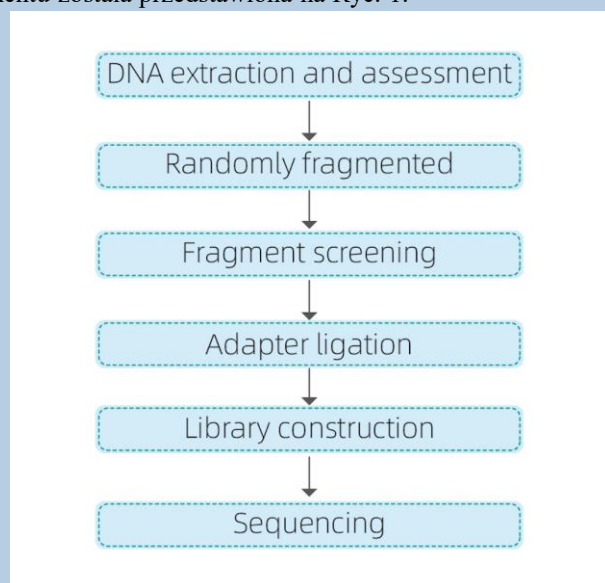
Badania zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu Miniatura 8: 2024/08/X/NZ1/00362

Cladosporium cladosporioides 01 to psychrotroficzny grzyb strzępkowy wyizolowany z gleby pochodzącej z arktycznej tundry (Zachodni Spitspergen). Szczep ten charakteryzuje się wysoką aktywnością oksydacyjną monoterenów (np. α - i β -pinen) do cennych związków smakowo-zapachowych i o zwiększonej aktywności biologicznej. Z kolei, hydrolazy związane z hydrofobowymi strukturami grzybni *C. cladosporioides* 01 charakteryzują się wysoką aktywnością perhydrolityczną w octanie etylu, w obecności kwasu octowego i wysokiego stężenia H_2O_2 w temperaturze $55^\circ C$, co jest wykorzystywane w epoksydacji związków terpenowych. Enzymy te wykazują również wysoką aktywność estryfikacji alkoholi terpenowych i kwasów karboksylowych w rozpuszczalnikach organicznych. Ponadto enzymy te charakteryzują się wysoką stabilnością w niekorzystnych warunkach prowadzenia katalizy (wysoka temperatura, obecność H_2O_2 , kwasów i rozpuszczalników organicznych).

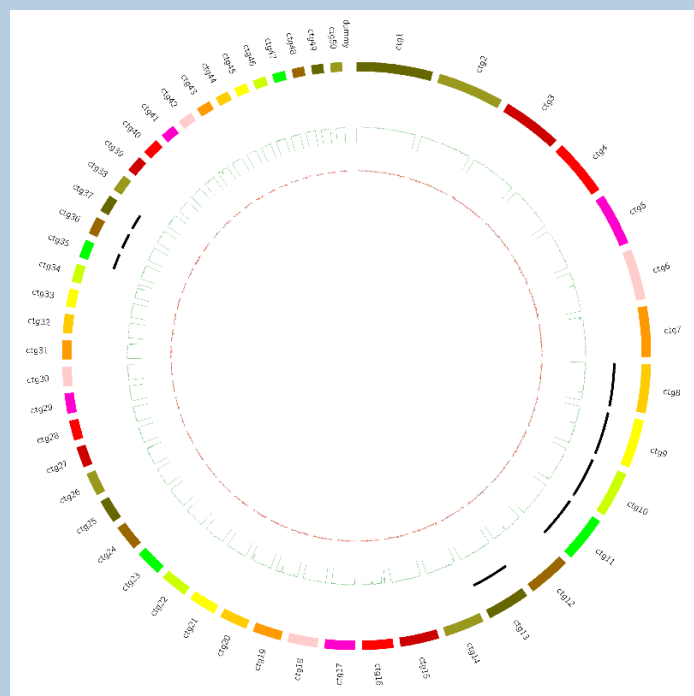
Techniki biologii molekularnej, w szczególności metoda sekwencjonowania Sangera, pozwalają na genetyczną charakterystykę izolatów środowiskowych wykazujących unikatowe cechy. Umożliwiają one wyodrębnienie sekwencji kodujących konkretne białka katalityczne, ich ekspresję heterologiczną, co przekłada się na możliwość badań nad mechanizmem oporności białek na niekorzystne warunki reakcji z zachowaniem wysokiej aktywności katalitycznej.

Celem pracy było sekwencjonowanie genomu *C. cladosporioides* 01.

Sekwencjonowanie przeprowadzono w firmie zewnętrznej weSEQ.it, której dostarczono płytki maltozowe porośnięte grzybnią. Sekwencjonowanie prowadzono w technologii Illumina NovaSeq 6000, PE 150. Procedura eksperymentu została przedstawiona na Ryc. 1.

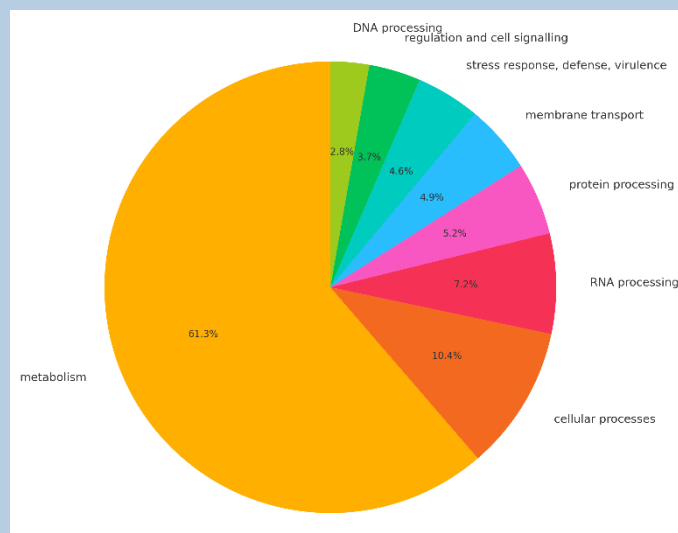


Ryc. 1. Procedura sekwencjonowania



Ryc. 2. Wykres typu *circos* obrazujący liczbę oraz długość analizowanych kontigów, CDS, zawartość GC, stosunek G/C (w kolejności od zewnątrz do środka). Na wykresie pokazano 50 największych kontigów.

Wykazano obecność genów kodujących 13295 białek, z których 11385 miało przypisaną funkcję. Sklasyfikowane białka biorą udział w przebiegu 797 unikalnych identyfikatorów szlaków KEGG ścieżek metabolicznych. Najwięcej genów brało udział w szlakach metabolicznych, najmniej w procesach obróbki DNA (Ryc. 3).



Ryc. 3. Liczba genów zaangażowanych w analizowane procesy metaboliczne

Analiza bioinformatyczna wskazała obecność 533 hydrolaz, z czego 18 to lipazy. Dalsze badania będą skupiały się na charakterystyce biochemicznej lipaz *C. cladosporioides* 01.

ANALIZA BIOINFORMATYCZNA

LINUX:

- Trim Galore – usunięcie sekwencji adapterów
- Assembly Unicycler – uzyskanie k-mer(ów) oraz kontigów
- GlimmerHMM, Quast – wygenerowanie listy potencjalnych genów
- BlastN, MetaQuast – przyrównanie do genomu referencyjnego
- Augustus – przypisanie genów do ścieżek metabolicznych

Łącznie przygotowano biblioteki przy użyciu genomowego DNA o długości wstawki 350 pb, sekwencjonowania na platformie Illumina NovaSeq i filtrowania w celu uzyskania 6,50 Gb wysokiej jakości danych. Całkowita głębokość sekwencjonowania wynosi około 177x, udział Q20 w danych sekwencjonowania wynosi ponad 98,38%, udział Q30 w danych sekwencjonowania wynosi ponad 93,98%.

Analiza bioinformatyczna uzyskanego genomu pozwoliła na określenie następujących statystyk:

uzyskano 755 kontigów,

N50: 684735,

Długość całkowita: 34101673,

najdłuższy kontig: 1719253 (Ryc. 2).

Sekwencja genu ITS pozwoliła na przypisanie analizowanego genomu do rodzaju *Cladosporium*.