

Viruses in Baikal mollusks *Benedictia baicalensis*

Butina T.V.^{1*}, Mozhaeva M.A.², Gorev V.A.¹, Bukin Yu.S.¹

¹Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

²Irkutsk State University, Faculty of Biology and Soil Science, Sukhe-Bator Str., 5, Irkutsk, 664011, Russia

ABSTRACT. Study of viral diversity in aquatic ecosystems continues to be relevant, including the threat of the emergence of new infectious diseases of animals and humans. The aim of this work was to study the diversity of viral communities associated with the Baikal endemic mollusks *Benedictia baicalensis* (Caenogastropoda, Benedictiidae) using metagenomic analysis. Our study revealed a high diversity of viruses in mollusk samples, which indicates the important role of gastropods in the bioaccumulation and circulation of bacteria and viruses in the ecosystem of Lake Baikal.

Keywords: viruses, mollusks, metagenomic analysis, Lake Baikal

For citation: Butina T.V., Mozhaeva M.A., Gorev V.A., Bukin Yu.S. Viruses in Baikal mollusks *Benedictia baicalensis* // *Limnology and Freshwater Biology*. 2024. - № 4. - P. 829-833. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-829

1. Introduction

Mollusks are one of the richest groups of invertebrates in terms of the number of species and diversity of forms. They are distributed throughout the Earth, living in various marine and freshwater bodies, as well as on land (Bouchet, 2015). Mollusks are believed to have highly effective innate immunity and resistance to infectious diseases (Green et al., 2015).

Viruses are the most abundant and diverse inhabitants of aquatic ecosystems, where they play an important ecological role and affect the vital function of hydrobionts. Recently, interest in studying viruses in mollusks as well as other invertebrates, has been steadily growing (Shi et al., 2016; Zhang et al., 2022). Mollusks are known to be able to bioaccumulate a variety of viruses from a wide range of organisms in their bodies (Le Guyader et al., 2012). In general, the viruses and viromes of mollusks, especially freshwater ones, remain poorly understood.

About 180 species of mollusks live in the waters of Lake Baikal, most of which are endemic. Gastropods (Gastropoda) make up the largest part in terms of the number of species and dominate in biomass among the inhabitants of the benthos. The Baikal gastropods participate in the self-purification of the lake and play a significant role in the biological processes of the lake.

The aim of this study was to investigate the diversity of viral communities associated with the

mollusks *Benedictia baicalensis* (Caenogastropoda, Benedictiidae), one of the largest, most widespread and abundant endemics of Lake Baikal, using metagenomic analysis (DNA sequencing). Previously, the first data on the diversity of viruses (mainly RNA viruses) in *B. baicalensis* samples were published based on metatranscriptomic analysis (Butina et al., 2023).

2. Materials and methods

Samples of the mollusks *Benedictia baicalensis* were collected at two stations of South Baikal, in the area of the Listvyanka settlement (in June and October 2022) and near the settlement Bolshie Koty (Varnachka pad, June 2022), as well as at the station of North Baikal, in the area of the Ushkany Islands (Butina et al., 2023). Total DNA isolation and purification from samples of *B. baicalensis* were carried out using CTAB buffer (Panova et al., 2016). The concentration and quality of nucleic acids were assessed using electrophoresis and a Qubit 4.0 fluorometer.

DNA libraries were obtained at the Institute of Genome Analysis LLC (Moscow, Russia) and samples were sequenced in paired-end reading mode using a DNBSEQ-400 sequencer (MGI Tech, China).

To analyze the data sets, read quality control and filtering of the primary fastq data were carried out using the FastQC and Trimmomatic programs. Using

*Corresponding author.

E-mail address: tvbutina@mail.ru (T.V. Butina)

Received: July 18, 2024; **Accepted:** August 08, 2024;

Available online: August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



the Kaiju v.1.9.0 program and the NCBI nr database, the obtained reads were analyzed and sequences belonging to viruses were identified.

3. Results and discussion

This work resulted in bioinformatic analysis of metagenomic datasets obtained from *B. baicalensis* mollusk samples. In direct analysis of the reads (using the Kaiju program), 98.2–99.1% of the reads were mollusk genome sequences, with the rest belonging to bacteria, microeukaryotes, archaea, and viruses (0.7–1.7%, 0.1–0.3%, 0.0003–0.0007% and 0.007–0.049%, respectively).

A large number of reads identified as viral were similar to unclassified viruses (17.4–21.6%). The most abundant DNA viruses (virotypes) in metagenomic data sets were representatives of the realms *Duplodnaviria* (1.3–13.9%), *Varidnaviria* (1.0–7.5%) and the family *Polydnaviridae* (modern name: *Polydnaviriformidae*) (0.6–2.5%). The dominant DNA bacteriophages (*Duplodnaviria*) in the list of virotypes were “unclassified *Siphoviridae* sp.” (taxon ID: 2170413) and “uncultured *Caudovirales* phage” (taxon ID: 2100421), each averaged more than 2% of reads per sample. The analysis also revealed an abundance of viruses close to insect viruses *Cotesia vestalis bracovirus* (*Polydnaviridae*; on average, more than 1.5% of reads) and *Bloomfield virus* (unclassified virus; more than 17%) (Chen et al., 2011; Webster et al., 2015). A large number of viral reads were assigned to RNA viruses (realm *Riboviria*; 56.7–75.3% of reads). Among all RNA virotypes, a virus close to *Drosophila C virus* of the *Dicistroviridae* family predominated (on average, more than 25% of reads per sample) (Huszar and Imler, 2008). In general, the diversity of viruses in *B. baicalensis* samples, according to the Chao1 and ACE indices, varied from 67 to 124 and from 61 to 114 species, respectively. The list of identified virotypes included a wide variety of viruses from a wide range of hosts.

As noted previously (Butina et al., 2023), the involvement of viruses in horizontal gene transfer leads to the presence of fragments in the host genomes that are similar to viral sequences, and when analyzing short reads, these fragments can be identified as viruses. Therefore, for a more accurate analysis, assembly of primary reads and subsequent analysis of the identified viral scaffolds/contigs are required.

4. Conclusions

Metagenomic analysis of *B. baicalensis* samples allowed us to supplement previously obtained data (Butina et al., 2023) on the composition of viral communities associated with Baikal gastropods. Mollusks *B. baicalensis* are known to be omnivorous, living on different substrates (stones, pebbles, and sand) in a wide range of depths (from 1.5 to 100 m) (Roepstorf et al.,

2003; Sitnikova and Roepstorf, 2004). Therefore, our data indicate the important role of gastropods in the bioaccumulation and circulation of viruses in the ecosystem of Lake Baikal.

Acknowledgements

This research was carried out within the State Assignment of the Ministry of Education and Science No. 0279-2021-0005 with the support of the Russian Science Foundation, the project number 22-24-01120.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bouchet P. 2015. The magnitude of marine biodiversity. In: Duarte C.M. (Ed.), The exploration of marine biodiversity scientific and technological. Fundación BBVA, pp. 31-62.
- Butina T.V., Zemskaya T.I., Bondaryuk A.N. et al. 2023. Viral diversity in samples of freshwater gastropods *Benedictia baicalensis* (Caenogastropoda: Benedictiidae) revealed by total RNA-sequencing. *International Journal of Molecular Sciences* 24(23): 17022. DOI: [10.17537/2023.18.418](https://doi.org/10.17537/2023.18.418)
- Chen Y.F., Gao F., Ye X.Q. et al. 2011. Deep sequencing of *Cotesia vestalis bracovirus* reveals the complexity of a polydnavirus genome. *Virology* 414(1): 42-50. DOI: [10.1016/J.VIROL.2011.03.009](https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2011.03.009)
- Green T.J., Raftos D., Speck P. et al. 2015. Antiviral immunity in marine molluscs. *Journal of General Virology* 96(9): 2471-2482. DOI: [10.1099/jgv.0.000244](https://doi.org/10.1099/jgv.0.000244)
- Huszar T., Imler J.L. 2008. *Drosophila* viruses and the study of antiviral host-defense. *Advances in virus research* 72: 227-265. DOI: [10.1016/S0065-3527\(08\)00406-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00406-5)
- Le Guyader F.S., Atmar R.L., Le Pendu J. 2012. Transmission of viruses through shellfish: When specific ligands come into play. *Current Opinion in Virology* 2(1): 103-110. DOI: [10.1016/j.coviro.2011.10.029](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.029)
- Panova M., Aronsson H., Cameron R.A. et al. 2016. DNA extraction protocols for whole-genome sequencing in marine organisms. In: Bourlat S. (Ed.), *Marine Genomics. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, pp. 13-44. DOI: [10.1007/978-1-4939-3774-5_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3774-5_2)
- Roepstorf P., Sitnikova T.Ya., Timoshkin O.A. 2003. Observation on stomach contents, food uptake and feeding strategies of endemic Baikalian Gastropods. *Berliner Palaobiologische Abhandlungen* 4: 151-156.
- Shi M., Lin X.D., Tian J.H. et al. 2016. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature* 540(7634): 539-543. DOI: [10.1038/nature20167](https://doi.org/10.1038/nature20167)
- Sitnikova T.Y., Roepstorf P. 2004. Mollusks that live exclusively in Lake Baikal. *First Hand* 2(1): 84-99.
- Webster C.L., Waldron F.M., Robertson S. et al. 2015. The discovery, distribution, and evolution of viruses associated with *drosophila melanogaster*. *PLoS Biology* 13(7): 1-33. DOI: [10.1371/journal.pbio.1002210](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002210)
- Zhang Y.Y., Chen Y., Wei X. et al. 2022. Viromes in marine ecosystems reveal remarkable invertebrate RNA virus diversity. *Science China Life Sciences* 65(2): 426-437. DOI: [10.1007/s11427-020-1936-2](https://doi.org/10.1007/s11427-020-1936-2)

Вирусы в байкальских моллюсках *Benedictia baicalensis*

Краткое сообщение

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGYБутина Т.В.^{1*}, Можаяева М.А.², Горев В.А.¹, Букин Ю.С.¹¹Лимнологический институт СО РАН, 664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3²Иркутский Государственный Университет, Биолого-почвенный факультет, 664011, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5

АННОТАЦИЯ. Исследования разнообразия вирусов в водных экосистемах не теряют своей актуальности, в том числе в связи с угрозой возникновения новых инфекционных заболеваний животных и человека. Целью данной работы стало исследование разнообразия вирусных сообществ, ассоциированных с байкальскими эндемичными моллюсками *Benedictia baicalensis* (Caenogastropoda, Benedictiidae), с помощью метагеномного анализа. В результате исследования выявлено высокое разнообразие вирусов в образцах моллюсков, что свидетельствует о важной роли брюхоногих моллюсков в биоаккумуляции и циркуляции вирусов в экосистеме оз. Байкал.

Ключевые слова: вирусы, моллюски, метагеномный анализ, оз. Байкал

Для цитирования: Бутина Т.В., Можаяева М.А., Горев В.А., Букин Ю.С. Вирусы в байкальских моллюсках *Benedictia baicalensis* // *Limnology and Freshwater Biology*. 2024. - № 4. - С. 829-833. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-829

1. Введение

Моллюски – одна из наиболее богатых по числу видов и разнообразию форм группа беспозвоночных; они распространены по всему земному шару, обитают в различных морских и пресноводных водоемах, а также на суше (Bouchet, 2015). Считается, что моллюски обладают высокоэффективным врожденным иммунитетом и устойчивостью к инфекционным заболеваниям (Green et al., 2015).

Вирусы являются наиболее многочисленными и разнообразными обитателями водных экосистем, где они выполняют важную экологическую роль и влияют на жизнедеятельность гидробионтов. В последнее время интерес к изучению вирусов в моллюсках, как и других беспозвоночных, неуклонно растет (Shi et al., 2016; Zhang et al., 2022). Известно, что моллюски способны биоаккумулировать в своем организме разнообразные вирусы широкого круга организмов (Le Guyader et al., 2012). В целом вирусы и виромы моллюсков (особенно пресноводных) остаются малоизученными.

В водах озера Байкал обитает около 180 видов моллюсков, большинство из которых эндемичны. Брюхоногие моллюски (Gastropoda) составляют наибольшую часть по числу видов и доминируют по биомассе среди обитателей бентоса. Байкальские

брюхоногие участвуют в самоочищении озера и играют значительную роль в биологических процессах озера.

Целью настоящей работы стало исследование разнообразия вирусных сообществ, ассоциированных с моллюсками *Benedictia baicalensis* (Caenogastropoda, Benedictiidae) – одних из самых крупных, распространенных и многочисленных эндемиков оз. Байкал – с помощью метагеномного анализа (ДНК-секвенирования). Ранее были опубликованы первые сведения о разнообразии вирусов (главным образом РНК-вирусов) в образцах *B. baicalensis*, полученные на основе метатранскриптомного анализа (Butina et al., 2023).

2. Материалы и методы

Пробы моллюсков *Benedictia baicalensis* были отобраны на двух станциях Южного Байкала – в районе пос. Листвянка (в июне и октябре 2022 г.) и недалеко от пос. Большие Коты (падь Варначка, июнь 2022 г.), а также на станции Северного Байкала – в районе Ушканьих островов (Butina et al., 2023). Выделение и очистку суммарной ДНК из образцов моллюсков *B. baicalensis* проводили с помощью СТАВ буфера (Panova et al., 2016). Концентрацию и качество нуклеиновых кислот оценивали с помощью электрофореза и флуориметра Qubit 4.0

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: tvbutina@mail.ru (Т.В. Бутина)

Поступила: 18 июля 2024; Принята: 08 августа 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

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



В ООО «Институт Геномного Анализа» (г. Москва) были получены ДНК-библиотеки и проведено секвенирование образцов в режиме парноконцевого чтения с использованием прибора DNBSEQ-400 (MGI Tech, China).

Для анализа наборов данных проводился контроль качества прочтений и фильтрация первичных fastq данных с помощью программ FastQC и Trimmomatic. С помощью программы Kaiju v.1.9.0 и базы данных NCBI nr был проведен анализ полученных прочтений и выявлены последовательности, принадлежащие вирусам.

3. Результаты и обсуждение

В результате работы проведен биоинформатический анализ метагеномных наборов данных, полученных из образцов моллюсков *B. baicalensis*. При прямом анализе прочтений (с помощью программы Kaiju) 98,2–99,1% ридов представляли собой последовательности генома моллюсков, остальные принадлежали бактериям, микроэукариотам, археям и вирусам (0.7-1.7%, 0.1-0.3%, 0.0003-0.0007% и 0.007-0.049%, соответственно).

Большое количество прочтений, идентифицированных как вирусные, было сходно с неклассифицированными вирусами (17,4-21,6%). Наиболее многочисленными ДНК-вирусами (виротипами) в метагеномных наборах данных оказались представители реалмов *Duplodnaviria* (1,3-13,9%), *Varidnaviria* (1,0-7,5%) и семейства *Polydnaviridae* (современное название: *Polydnaviriformidae*) (0,6-2,5%). Доминирующими ДНК-бактериофагами (*Duplodnaviria*) в списке виротипов были: “unclassified *Siphoviridae* sp.” (taxon ID: 2170413) и “uncultured *Caudovirales* phage” (taxon ID: 2100421), каждый в среднем составлял более 2% прочтений на образец. При анализе также выявлено обилие вирусов, близких вирусам насекомых: *Cotesia vestalis bracovirus* (*Polydnaviridae*; в среднем более 1,5% прочтений) и *Bloomfield virus* (неклассифицированный вирус; более 17%) (Chen et al., 2011; Webster et al., 2015). Большое количество вирусных прочтений было отнесено к РНК-вирусам (реалм *Riboviria*; 56,7-75,3% прочтений). Среди всех РНК-виротипов преобладал вирус, близкий *Drosophila C virus* семейства *Dicistroviridae* (в среднем более 25% прочтений на образец) (Huszar and Imler, 2008). В целом, видовое разнообразие вирусов в пробах *B. baicalensis*, согласно индексам Chao1 и ACE, варьировало от 67 до 124 и от 61 до 114 видов, соответственно. Список выявленных виротипов включал большое разнообразие вирусов широкого спектра хозяев.

Как отмечалось ранее (Butina et al., 2023), участие вирусов в горизонтальном переносе генов приводит к наличию в геномах хозяина фрагментов, сходных с вирусными последовательностями и при анализе коротких прочтений эти фрагменты могут быть идентифицированы как вирусные. Поэтому для более точного анализа требуется сборка коротких прочтений и последующий анализ выявленных вирусных скаффолдов/контигов.

4. Выводы

Метагеномный анализ образцов моллюсков *B. baicalensis* позволил нам дополнить полученные ранее данные (Butina et al., 2023) о составе вирусных сообществ, ассоциированных с байкальскими гастроподами. Как известно, *B. baicalensis* всеядны, обитают на разных субстратах (камнях, гальке и песке) в широком диапазоне глубин (от 1,5 до 100 м) (Roepstorf et al., 2003; Sitnikova and Roepstorf, 2004). Поэтому наши результаты свидетельствуют о важной роли брюхоногих моллюсков в биоаккумуляции и циркуляции вирусов в экосистеме оз. Байкал.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках госзадания №0279-2021-0005 Минобрнауки России при поддержке Российского научного фонда, проект №22-24-01120.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Bouchet P. 2015. The magnitude of marine biodiversity. In: Duarte C.M. (Ed.), The exploration of marine biodiversity scientific and technological. Fundación BBVA, pp. 31-62.
- Butina T.V., Zemskaya T.I., Bondaryuk A.N. et al. 2023. Viral diversity in samples of freshwater gastropods *Benedictia baicalensis* (Caenogastropoda: Benedictiidae) revealed by total RNA-sequencing. *International Journal of Molecular Sciences* 24(23): 17022. DOI: [10.17537/2023.18.418](https://doi.org/10.17537/2023.18.418)
- Chen Y.F., Gao F., Ye X.Q. et al. 2011. Deep sequencing of *Cotesia vestalis* bracovirus reveals the complexity of a polydnavirus genome. *Virology* 414(1): 42-50. DOI: [10.1016/J.VIROL.2011.03.009](https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2011.03.009)
- Green T.J., Raftos D., Speck P. et al. 2015. Antiviral immunity in marine molluscs. *Journal of General Virology* 96(9): 2471-2482. DOI: [10.1099/jgv.0.000244](https://doi.org/10.1099/jgv.0.000244)
- Huszar T., Imler J.L. 2008. *Drosophila* viruses and the study of antiviral host-defense. *Advances in virus research* 72: 227-265. DOI: [10.1016/S0065-3527\(08\)00406-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00406-5)
- Le Guyader F.S., Atmar R.L., Le Pendu J. 2012. Transmission of viruses through shellfish: When specific ligands come into play. *Current Opinion in Virology* 2(1): 103-110. DOI: [10.1016/j.coviro.2011.10.029](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.029)
- Panova M., Aronsson H., Cameron R.A. et al. 2016. DNA extraction protocols for whole-genome sequencing in marine organisms. In: Bourlat S. (Ed.), *Marine Genomics. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, pp. 13-44. DOI: [10.1007/978-1-4939-3774-5_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3774-5_2)
- Roepstorf P., Sitnikova T.Ya., Timoshkin O.A. 2003. Observation on stomach contents, food uptake and feeding strategies of endemic Baikalian Gastropods. *Berliner Palaobiologische Abhandlungen* 4: 151-156.
- Shi M., Lin X.D., Tian J.H. et al. 2016. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature* 540(7634): 539-543. DOI: [10.1038/nature20167](https://doi.org/10.1038/nature20167)
- Sitnikova T.Y., Roepstorf P. 2004. Mollusks that live exclusively in Lake Baikal. *First Hand* 2(1): 84-99.

Webster C.L., Waldron F.M., Robertson S. et al. 2015. The discovery, distribution, and evolution of viruses associated with *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology* 13(7): 1-33. DOI: [10.1371/journal.pbio.1002210](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002210)

Zhang Y.Y., Chen Y., Wei X. et al. 2022. Viromes in marine ecosystems reveal remarkable invertebrate RNA virus diversity. *Science China Life Sciences* 65(2): 426-437. DOI: [10.1007/s11427-020-1936-2](https://doi.org/10.1007/s11427-020-1936-2)