

УДК 579.[25+64]:575.17:632.9

Изучение генетического разнообразия *Bacillus thuringiensis*, выделенных в различных эколого-географических зонах Украины, при помощи анализа генов 16S рРНК, *gyrB* и методов АР-ПЦР и saAFLP

Н. В. Пунина^{1,2*}, В. С. Зотов¹, А. Л. Пархоменко³, Т. Ю. Пархоменко³, А. Ф. Топунов¹¹Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Россия, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2²Медико-генетический научный центр РАМН, 115478, Россия, Москва, ул. Москворечье, 1³Институт сельского хозяйства Крыма Национальной академии аграрных наук Украины, 95453, Украина, АР Крым, Симферополь, ул. Киевская, 150

*E-mail: hin-enkelte@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.10.2012

РЕФЕРАТ Группа *Bacillus cereus*, включающая в себя близкородственные виды бактерий, представляет большой интерес с биотехнологической, сельскохозяйственной и медицинской точек зрения. Однако дифференциация видов внутри данной группы и изучение их внутривидового разнообразия представляют сложную задачу, требующую комплексного решения. Бактерии вида *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) входят в состав группы *B. cereus*. В представленной работе изучена внутривидовая структура пяти энтомопатогенных штаммов и 20 изолятов *Bt*, выделенных в различных эколого-географических зонах Украины, при помощи различных методов: анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и *gyrB*, АР-ПЦР (ВОХ- и ERIC-ПЦР) и разработанного нами метода saAFLP. Анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и *gyrB* позволил выделить внутри группы *B. cereus* шесть подгрупп: *B. anthracis*, *B. cereus* I и II, *Bt* I, II и III, и подтвердить принадлежность изучаемых штаммов к роду *Bacillus*. Все штаммы были разделены на три группы, 17 из них отнесли к группе *Bt* II коммерческих, промышленных штаммов. Результаты, полученные методами АР-ПЦР (ВОХ и ERIC) и saAFLP, хорошо коррелировали друг с другом и с данными для генов 16S рРНК и *gyrB*. Все штаммы были объединены в пять групп. У штамма *Bt* 0376 р.о., применяющегося в производстве энтомопатогенного препарата «STAR-t», выявлен уникальный saAFLP-паттерн, который позволяет отличать его от других штаммов группы *Bt* II.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА группа *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, 16S рибосомная РНК, *gyrB*, saAFLP, таксономия, филогения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ *Bt* – *Bacillus thuringiensis*; ICP – δ-эндотоксин; MLST (multilocus sequence typing) – мультилокусное типирование последовательностей; MEE (multilocus enzyme electrophoresis) – мультилокусный электрофорез ферментов; saAFLP, AFLP (single adapter amplified fragment length polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов, полученных с применением одного адаптера; RFLP (restriction fragment length polymorphism) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов; АР-ПЦР (arbitrarily primed polymerase chain reaction) – полимеразная цепная реакция со случайными праймерами; реп-ПЦР (repetitive sequence-based PCR) – полимеразная цепная реакция с праймерами на повторяющиеся элементы; ВОХ, ERIC – повторяющиеся элементы ДНК; ME (minimum evolution) – метод минимальной эволюции; NJ (neighbour joining) – метод связывания ближайших соседей.

ВВЕДЕНИЕ

Bacillus thuringiensis (*Bt*) – грамположительные бактерии, обладающие биоинсектицидной активностью, обусловленной их способностью в процессе споруляции продуцировать комплекс кристаллических бел-

ковых токсинов, называемых также δ-эндотоксинами (ICP), или Cry-белками [1]. Эти токсины активны в отношении широкого ряда видов и родов насекомых, в том числе вредителей сельскохозяйственной продукции и паразитов человека [2, 3]. Благодаря

высокой специфичности δ -эндотоксинов энтомопатогенные бактерии вида *Bt* могут заменять собой пестицидные средства и широко применяются при создании биотехнологических препаратов для защиты урожая [4, 5].

На основании фенотипического и генотипического анализа вид *Bt* был отнесен к группе *B. cereus*. Эта группа включает также близкородственные виды *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*. Виды *B. cereus* и *Bt* невозможно различить при помощи морфологических [6], фенотипических [7] и генетических методов [8–11]. Предполагается, что эти виды могут представлять собой один общий вид *B. cereus sensu lato* [12, 13]. Поскольку данная группа близкородственных бактерий представляет большой интерес для сельского хозяйства и медицины, актуальным остается детальное изучение таксономии этих видов, а также создание инструментов и технологий для их дифференциации и выделения.

Традиционно вид *Bt* выделяли и разделяли на подвиды на основании наличия или отсутствия кристаллических ИСР и кодирующих их генов *cry* и *cty* [1, 3]. Однако этот метод имеет свои недостатки: гены ИСР располагаются на плазмиде, и бактерии в процессе конъюгации способны терять их, передавать другим штаммам *Bt* или близкородственным видам [14]. При помощи серологического анализа жгутиковых антигенов (Н-серотипирования) выявлено более 82 сероваров *Bt* [15, 16]. Однако эта классификация не всегда соответствовала истинным филогенетическим взаимоотношениям внутри данного вида [17–19].

Генетическое разнообразие бактерий *Bt* и возможность разделения двух видов *Bt* и *B. cereus* изучали с использованием различных методов: ДНК-ДНК-гибридизации [20], анализа нуклеотидных последовательностей 16S рРНК, 23S рРНК, 16S–23S рРНК [8, 11], MLST [21], МЕЕ [12, 18], AFLP [22–24], RFLP [25], AP-ПЦР [26–29] и др. Однако эти методы также не позволили установить истинные филогенетические взаимоотношения среди *Bt*.

Цель данной работы заключалась в оценке применимости модифицированного нами метода геномного фингерпринтинга (saAFLP) для выявления филогенетических различий изолятов и штаммов *Bacillus* sp., выделенных в различных эколого-географических зонах Украины. Для определения таксономических отношений на уровне род-вид мы анализировали нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК и *gyrB*; для изучения структуры на внутривидовом уровне применяли метод saAFLP наряду с другими информативными методами (гер-ПЦР). Такая комплексная диагностика в совокуп-

ности с данными физиолого-биохимических тестов предоставляет большие возможности для изучения таксономической структуры близкородственных организмов. Однако следует отметить, что выборку штаммов *Bt* в дальнейшем нам будет необходимо расширить.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы

В работе использовали пять энтомопатогенных штаммов и 20 изолятов бактерий *Bt*, обладающих уникальными биохимическими свойствами, из коллекций полезных микроорганизмов различных научных учреждений Украины и России (Института сельского хозяйства Крыма Национальной академии аграрных наук Украины, ИСХК НААН, Симферополь, АР Крым, Украина; Института сельскохозяйственной микробиологии Национальной академии аграрных наук, Чернигов; Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетика», Москва). Пять штаммов из коллекции ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетики» использовали в качестве типовых. Изоляты из коллекции ИСХК НААН были выделены в разных эколого-географических зонах Украины.

Выделение ДНК

Препараты суммарной клеточной ДНК выделяли из штаммов, которые культивировали на агаризованной среде ТУ (г/л): дрожжевой экстракт – 1.0; пептон – 10.0; CaCl₂ – 0.4; агар – 20.0. ДНК выделяли из свежих культур на 1–2 сут роста с использованием метода сорбции на магнитных частицах (набор Минипреп, «Силекс», Россия).

Фенотипическая характеристика

Морфологические и физиолого-биохимические характеристики чистых культур бактерий определяли, руководствуясь общей стратегией фенотипической дифференциации, описанной в руководствах «Определитель бактерий» [30], «Методы общей бактериологии» [31].

ПЦР-амплификация и секвенирование гена 16S рРНК

ПЦР-анализ и последующее определение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК [32] проводили на генетическом анализаторе с использованием универсальных праймеров 27f (5'-GTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACGGYTACSTTGTTACGACTT-3') [33]. Амплифицированные фрагменты детектировали при помощи электрофореза в 1.5% агарозном геле.

Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3130xl ABI («Applied Biosystems», США).

ПЦР-амплификация и секвенирование гена *gyrB*

Ген *gyrB* амплифицировали и секвенировали с использованием ранее разработанных универсальных праймерных систем UP1 и UP2r [34], разработанных нами специфичных для рода *Bacillus* праймеров *gyrB_F* (5'-CTTGAAGGACTAGARGCAGT-3') + *gyrB_Rf* (5'-CCTTCACGAACATCYTCACC-3') и *gyrB_Fr* (5'-GGTGARGATGTTTCGTGAAGG-3') + *gyrB_R* (5'-TGGATAAAGTTACGACGYGG-3') и протокола. Температурно-временной профиль реакции был следующим: первоначальная денатурация при 94°C – 2 мин; затем 30 циклов: 94°C – 30 с, 62°C – 30 с, 72°C – 1 мин; окончательная элонгация – 5 мин при 72°C. Амплифицированные фрагменты выявляли при помощи электрофореза в 1.5% агарозном геле. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3130xl ABI («Applied Biosystems», США).

ПЦР с использованием праймеров к различным повторяющимся элементам (rep-ПЦР)

Для проведения rep-ПЦР использовали описанные ранее праймерные системы [26, 27]: ERIC1R 5'-ATGTAAGTCTCCTGGGGATTCCAG-3'; ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'; BOXA1R 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'.

Амплификацию проводили в 25 мкл смеси: 1× буфер для полимеразы BioTaq (17 мМ (NH₄)₂SO₄, 6 мМ Трис-НСl, рН 8.8, 2 мМ MgCl₂), 5 нМ dNTP, 50 нг ДНК-матрицы, 12.5 пМ праймера и 1.25 ед. акт. BioTaq-ДНК-полимеразы («Диалат ЛТД», Россия). Температурно-временной профиль: первый цикл – 94°C, 2 мин; последующие 40 циклов – 94°C, 20 с; 40°C, 30 с и 72°C, 90 с; окончательная элонгация – 7 мин при 72°C. Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 1.5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, при напряженности поля 6 В/см и документировали с использованием системы BioDoc Analyze («Biometra», Германия).

saAFLP-анализ [35]

Ранее мы модифицировали метод AFLP, разработанный и запатентованный Забеу и Восом [36], и в данной работе оценили его применимость для анализа близкородственных бактерий *Bt*. Ранее при помощи модифицированного нами метода saAFLP были успешно проанализированы филогенетические отношения близкородственных штаммов разных видов рода *Rhizobium* [35]. Процедура saAFLP состоит

из трех шагов: (i) одновременная обработка в одной пробирке экстрагированной ДНК бактерии с помощью одной из эндонуклеаз рестрикции (XmaJI, XbaI, PstI) и лигирование с одним одноцепочечным адаптером Ad.CTAG1; (ii) ПЦР-амплификация с одним праймером, комплементарным последовательности Ad.CTAG1; (iii) электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов в агарозном геле. Принципиально новое в случае данного saAFLP – проведение рестрикционного анализа и лигазной реакции в одной пробирке, применение эндонуклеазы рестрикции XmaJI (XbaI, PstI) для изучения филогенетических отношений штаммов *Bt*, выделенных в различных эколого-географических зонах Украины, а также применение одного одноцепочечного адаптера Ad.CTAG1.

Рестрикционный анализ проводили одновременно с лигированием в 10 мкл смеси, содержащей 80 нг образца ДНК, лигазный буфер («Fermentas», США), 10 пМ одноцепочечного адаптера Ad.CTAG1 (5'-ctagCTGGAATCGATTCCAG-3'), 5 ед. акт. T4-ДНК-лигазы («Fermentas», США) и 1 ед. акт. рестриктазы XmaJI (XbaI, PstI). Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 2 ч, после чего доводили реакционный объем до 100 мкл. ПЦР проводили на амплификаторе Mastercycler Gradient Eppendorf в 25 мкл смеси, содержащей 1× буфер для ПЦР, 2.8 мМ MgCl₂, 0.2 мМ dNTP, в качестве ДНК-матрицы – 2 мкл рестриктазно-лигазной смеси, 0.4 мкМ праймера Pr.CTAG1 (5'-CTGGAATCGATTCCAGctag-3'), комплементарного адаптеру и 1 ед. акт. ДНК-полимеразы BioTaq («Диалат ЛТД», Россия). ПЦР-амплификацию проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация – 94°C, 2 мин; затем 30 циклов – 94°C, 30 с; 40°C, 30 с; 72°C, 3 мин; окончательная элонгация – 5 мин при 72°C.

Анализ нуклеотидных последовательностей

Первичный сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей, полученных в данной работе и представленных в базе данных GenBank, проведен при помощи программы NCBI Blast [37]. Выравнивание последовательностей проводили с использованием программы CLUSTALW 1.75v. [38], проверку и редактирование – с помощью редактора BioEdit 7.0.5.3 [39] и Mega 3.1 [40]. Филогенетические деревья были построены в программе Mega 3.1 [40] при помощи методов объединения ближайших соседей (NJ) [41] и минимальной эволюции ME [42]. Статистическую значимость порядка ветвления полученных деревьев рассчитывали с использованием бутстрэп-анализа путем построения 1000 альтернативных реплик, или деревьев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК

Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК часто применяется с целью таксономической локализации и идентификации рода/вида бактерий. Мы амплифицировали и секвенировали ПЦР-фрагменты гена 16S рРНК (размер секвенированной области составил 1386 п.н.) пяти типовых штаммов рода *Bacillus* и 20 изолятов из Украины, требующих подтверждения таксономической принадлежности к роду *Bacillus*. Аналогичные нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК *B. cereus*, *Bt*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis* получены из базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США и использованы для сравнения. В качестве удаленных контролей при проведении филогенетического анализа были выбраны нуклеотидные последовательности *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*. По выровненным последовательностям при помощи алгоритма ME построено филогенетическое дерево, отражающее эволюцию анализируемого гена (рис. 1). Парные генетические расстояния рассчитывали с использованием двухпараметрической модели Кимуры.

Топология полученного дерева имела значительное сходство с филогенетической структурой рода, установленной методом ДНК-ДНК-гибридизации [43] и полученной для группы *B. cereus* в результате анализа фрагментов 16S рРНК, 23S рРНК [8, 11] и межгенной области 16S–23S рРНК [44], реп-ПЦР [29] и AFLP [23].

Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК подтвердил принадлежность изучаемых изолятов к роду *Bacillus*. Однако вследствие высокой консервативности последовательности гена 16S рРНК (99.7–100.0% гомологии) этот метод не позволяет достоверно выделить отдельные виды внутри группы *B. cereus*, что неоднократно отмечали и в других работах [8, 29].

Штаммы вида *B. anthracis*, хотя и были сгруппированы в единый кластер, однако с низкой степенью значимости. В этот кластер *B. anthracis* были помещены и штаммы *Bt*. Как и в работе Бавыкина и соавт. [45], мы выделили две группы *B. cereus* (I и II). Такое разделение не подтверждено статистически (статистическая значимость порядка ветвления < 50%). Группа *B. cereus* I включала в себя патогенный штамм *B. cereus* ATCC 14579^T и целый ряд непатогенных сероваров *Bt*. Группа *B. cereus* II состояла из различных сероваров *Bt* и непатогенного штамма *B. cereus* ATCC 10987^T. Большинство штаммов *Bt* с низким уровнем значимости ветвления формировали единый кластер,

объединяющий различные серовары этого вида. В отдельную подгруппу были сгруппированы штаммы видов *B. mycoides* и *B. weihenstephanensis*.

Штаммы, представляющие коммерческую ценность, а также типовой штамм *Bt ser. berliner* ATCC 10792^T, были объединены в группу *Bt* II со значимостью ветвления 56%. К этой группе отнесли 17 изучаемых нами украинских изолятов различных серотипов, выделенных из различных насекомых-хозяев в основном в Луганской и Херсонской областях, а также в Красногвардейском и Симферопольском районах. Штамм *Bt* 0376 р.о. (серотип 1), предложенный для производства экологически безопасного энтомопатогенного препарата «STAR-t» (ООО «Симбиотор»), предназначенного для регуляции численности личинок колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*), картофельной моли (*Phthorimea operculella* Zel.) и нуттового минера (*Liriomiza cicerina* Rd.) во время вегетации и хранения картофеля и нута, был отнесен к данной группе и имел группоспецифические замены А/Г77, Т/С90, Т/А92, С/Т192, С/А1015 в гене 16S рРНК. Все исследованные нами изоляты группы *Bt* II имели полностью идентичные нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК. Штамм *Bt var. thuringiensis* 994 (серотип 1, аналог биоагента препарата Битоксибациллин), применяемый для производства препарата «Акбитур», штамм *Bt* 408 (серотип 3), проявляющий высокую энтомопатогенную активность в отношении *L. decemlineata*, и штамм *Bt var. darmstadiensis* Н10 (Х серотип) также вошли в группу *Bt* II.

Штаммы *Bt* 836 (серотип 4), *Bt var. kurstaki* 0293 (серотип 3, аналог штамма-биоагента препарата Лепидоцид) и *Bt var. morrisoni* 109 (серотип Х) были отнесены к группе *Bt* I. Внутри каждой группы найдены как специфические нуклеотидные замены, характерные для каждой из групп, так и случайные. У *B. anthracis* нашли 16 замен; у *B. cereus* I – 30; у *B. cereus* II – 32; у *Bt* I – 28; у *Bt* II – 21. Однако следует отметить, что большинство нуклеотидных замен носило случайный характер, они были штаммоспецифичными.

Таким образом, ген 16S рРНК не может использоваться для оценки и изучения филогении на уровне ниже рода и вида *Bt*, так как не позволяет выделить нуклеотидные замены, специфичные для отдельных видов данной группы.

Генетическое разнообразие последовательностей гена *gyrB*

В таксономических исследованиях и для идентификации бактерий наряду с геном 16S рРНК применяют нуклеотидную последовательность гена *gyrB* [34]. В настоящее время опубликован ряд работ, в которых

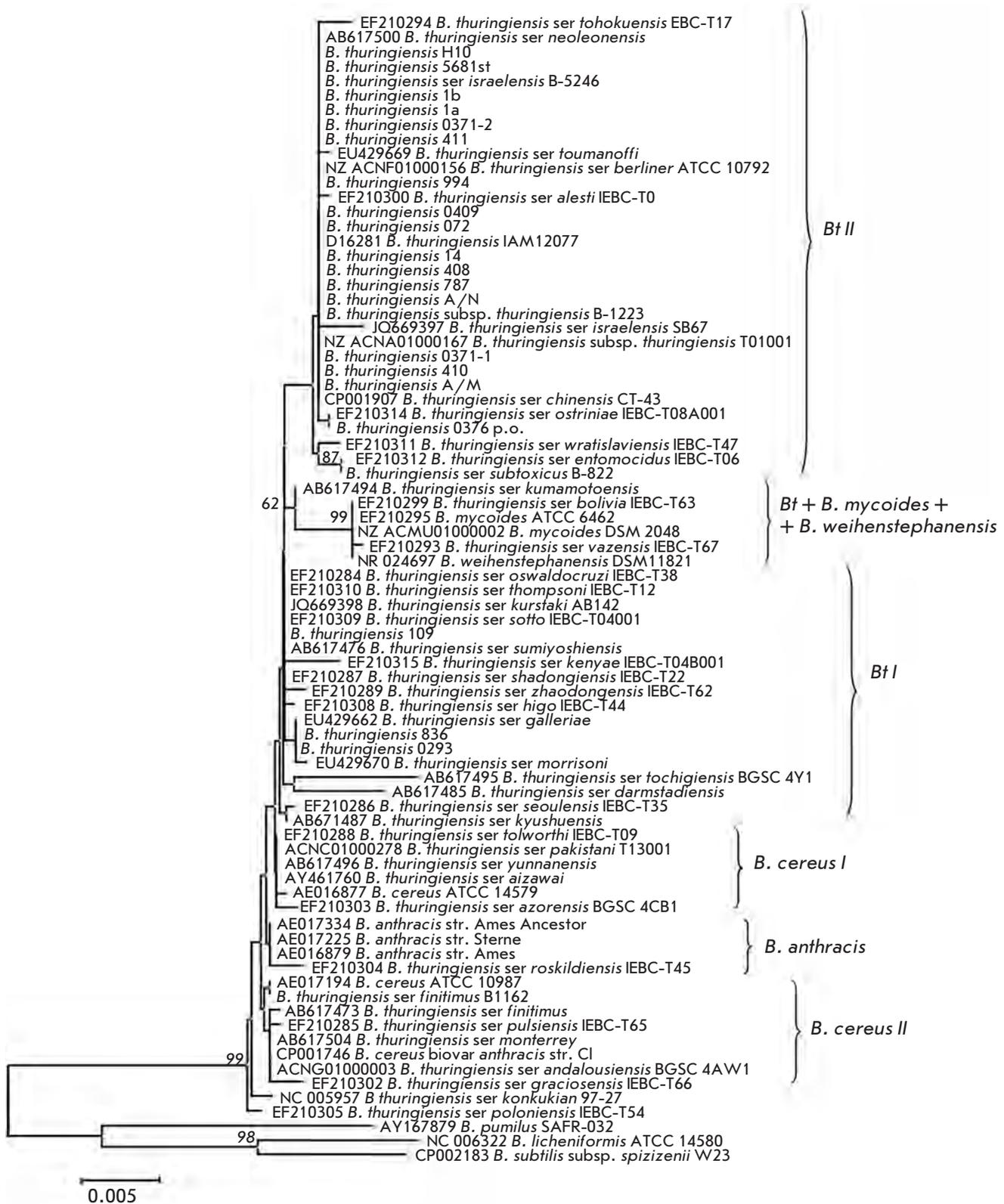


Рис. 1. Филогенетическое дерево бактерий рода *Bacillus*, построенное по результатам сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК с использованием алгоритма ME. Масштаб соответствует 0.5 заменам на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана статистическая значимость порядка ветвления (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев

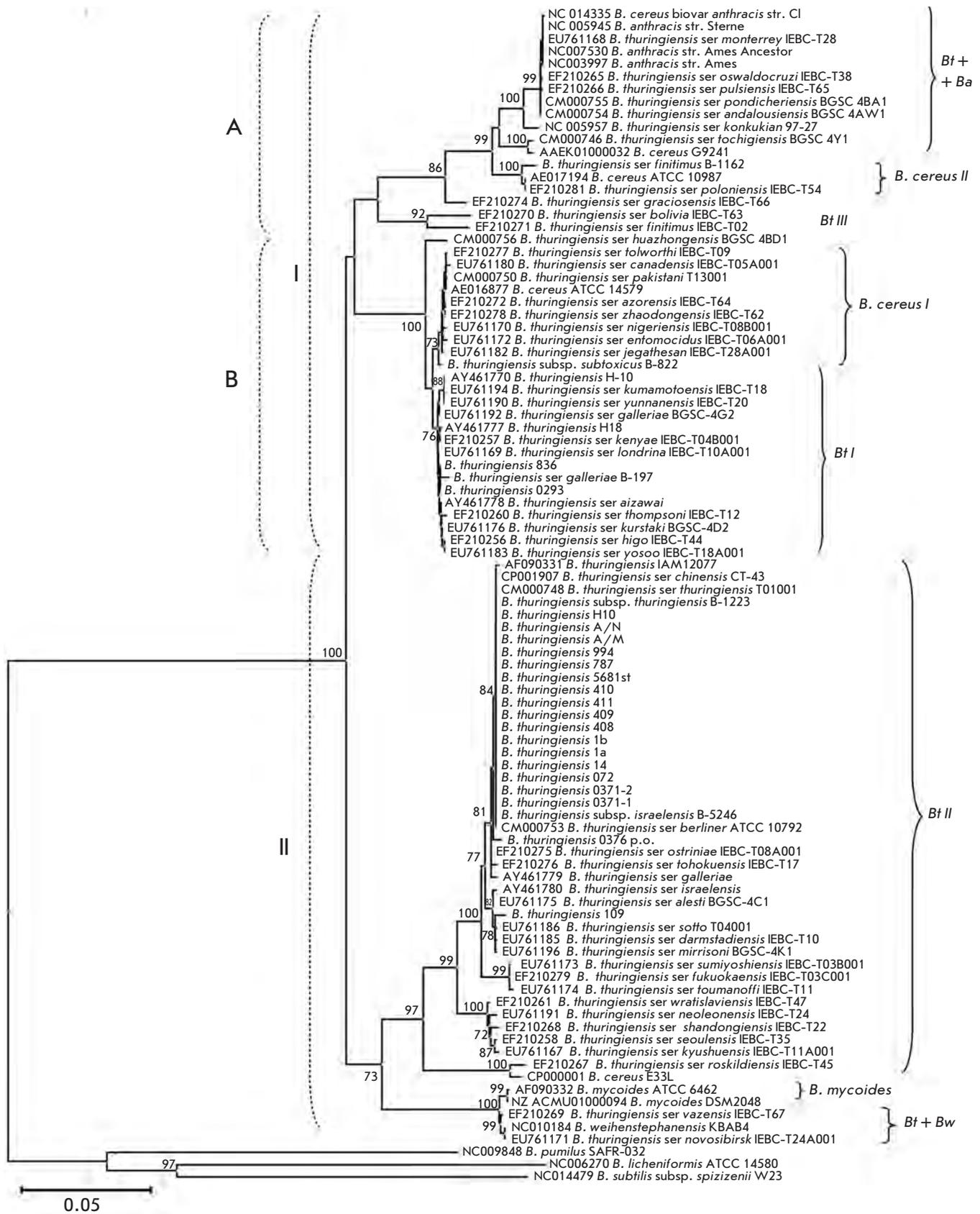


Рис. 2. Филогенетическое дерево бактерий группы *B. cereus*, построенное по результатам сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена *gyrB*, с использованием алгоритма МЕ. Масштаб соответствует 5 заменам на 100 п.н. Цифрами указана статистическая значимость порядка ветвления (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев

изучали изменчивость последовательности данного гена у различных видов бактерий рода *Bacillus* (например, *B. subtilis* [46], группы *B. cereus* [47]). С помощью предложенных ранее универсальных праймеров [34] и созданных нами праймерных систем, специфичных для 3'-конца гена *gyrB* бактерий группы *B. cereus*, амплифицировали и секвенировали ПЦР-фрагменты гена (размер секвенированной области составил 1800 п.н., 81.82% всего гена). Этот фрагмент гена *gyrB* выбран нами на основании распределения уровня полиморфизма (энтропии) нуклеотидной последовательности гена с помощью программного обеспечения DNAsp v. 5 [48]. Уровень полиморфизма был выше среднего на участках 150–700 и 1650–2000 п.н. от начала гена (данные не представлены). Однако вследствие ограниченного количества представленных в GenBank последовательностей гена *gyrB* штаммов группы *B. cereus* данной длины для анализа мы выбрали участок с 385 по 1507 п.н. от начала гена (аннотация дана для штамма *Bt ser. berliner* ATCC 10792^T), что составило 60% общей длины гена. Для 25 изученных нами штаммов, изолятов и референсных последовательностей штаммов рода *Bacillus*, депонированных в GenBank, при помощи алгоритма ME построено филогенетическое дерево, представленное на *рис. 2*. В качестве удаленных контролей при проведении филогенетического анализа использовали нуклеотидные последовательности видов *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*.

Топология построенного дерева имела значительное сходство с филогенетическими деревьями, полученными ранее для гена 16S рРНК и межгенного региона 16S–23S рРНК, и не зависела от применяемых для построения алгоритмов (NJ, ME). Выявлены межвидовые и внутривидовые различия между видом *B. anthracis* и группой *B. cereus* – *Bt*. Результаты проведенных исследований показали, что нуклеотидная последовательность гена *gyrB* обладает большей разрешающей способностью, чем последовательности генов 16S рРНК и межгенного региона 16S–23S рРНК [34, 46], и соответственно более пригодна для таксономического изучения близкородственных видов.

Как и в случае гена 16S рРНК, но с большей степенью значимости, внутри группы *B. cereus* можно выделить пять подгрупп: *B. anthracis*, *B. cereus* I и II, *Bt* I и II. На филогенетической кладограмме со статистической значимостью порядка ветвления 92% выделена еще одна группа – *Bt* III, в которую вошли штаммы *Bt ser. bolivia* IЕВС-Т63 и *Bt ser. finitimus* IЕВС-Т02. Большинство штаммов с высокой степенью значимости формировали группу штаммов *Bt* II, в которой также находились штаммы, применяемые в производстве энтомопатогенных препаратов. Однако, как и предполагалось, исходя из опубликован-

ных данных, различить между собой виды *B. cereus* и *Bt* не представлялось возможным [45]. Так, штаммы *Bt* были сгруппированы вместе со штаммами видов *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. weihenstephanensis* в подгруппы *B. anthracis*, *B. cereus* I и II и *B. weihenstephanensis*. Вследствие большей разрешающей способности и вариабельности нуклеотидной последовательности *gyrB* при сравнении последовательностей данного гена штамма *Bt* 0376 р.о. и других штаммов данной группы удалось выявить две специфические для данного штамма замены: А/Г861 и А/Г1149. В целом в группе *B. cereus* уровень сходства нуклеотидных и аминокислотных последовательностей составил 87.1–95.2% и 95.1–99.2% соответственно.

Стоит отметить кластеризацию штаммов в две группы с высоким уровнем статистической значимости порядка ветвления. Кластер I образован группами А и В. Группа А объединила (достоверно сгруппированные) патогенные штаммы *B. anthracis*, непатогенный штамм *B. cereus* ATCC 10987^T и энтомопатогенные штаммы *Bt ser. finitimus* В-1162 и *Bt ser. poloniensis* IЕВС-Т54 группы *B. cereus* II, энтомопатогенные штаммы группы *Bt* III. Группа В образована патогенным для человека штаммом *B. cereus* ATCC 14579^T, энтомопатогенными штаммами *Bt* группы *B. cereus* I и энтомопатогенными штаммами группы *Bt* I. В кластер II вошли бактерии видов *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* и группа *Bt* II, включающая большинство штаммов, применяющихся в промышленном производстве энтомопатогенных препаратов. Подобная кластеризация бацилл может свидетельствовать в пользу парафилетичной структуры как самой группы *B. cereus* в целом, так и отдельных ее видов.

Полиморфизм *Bt*, выявленный saAFLP и гер-ПЦР-маркерами

Для выявления различий между близкими видами и штаммами бактерий наряду с генами домашнего хозяйства применяют методы геномного фингерпринтинга. Наиболее часто применяется метод гер-ПЦР, основанный на использовании олигонуклеотидных праймеров, гомологичных последовательностям межгенных повторяющихся элементов различного типа. В нашей работе различия между близкородственными штаммами *Bt* выявляли при помощи гер-ПЦР (BOX-, ERIC-ПЦР) и saAFLP. Полученные результаты представлены на *рис. 3, 4*.

Все исследуемые нами штаммы анализировали методом saAFLP с применением трех эндонуклеаз рестрикции – XmaJI, XbaI и PstI. Информативные спектры для всех штаммов *Bt* получены только с использованием XmaJI. Метод saAFLP, модифициро-

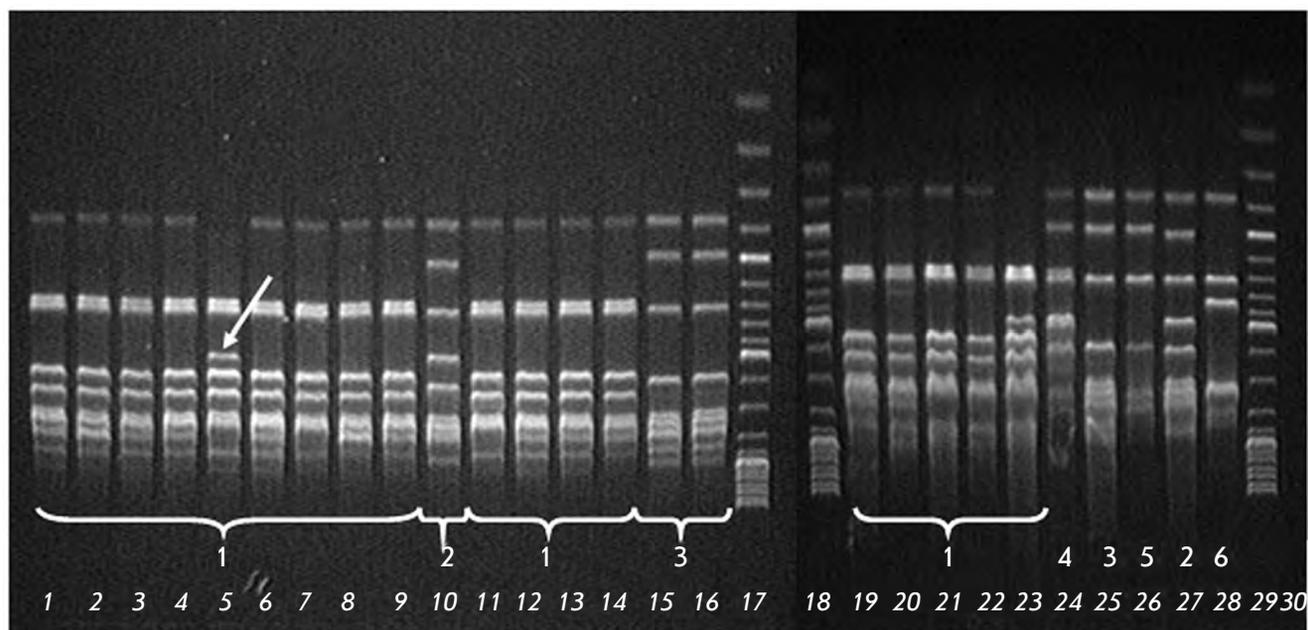


Рис. 3. Результаты электрофоретического анализа продуктов saAFLP на препаратах ДНК *Bt*. Дорожки 17, 18, 29 – маркер GeneRuler™ молекулярной массы ДНК (1 kb ladder, «Fermentas»); 1 – *Bt* H10, R-тип; 2 – *Bt* A/N; 3 – *Bt* 408; 4, 19 – *Bt* 5681st; 5, 23 – *Bt* 0376 р.о.; 6 – *Bt* 787; 7 – *Bt* 411; 8 – *Bt* 072; 9 – *Bt* 0371-1; 10, 27 – *Bt* 109; 11 – *Bt* 14; 12 – *Bt* 994; 13 – *Bt* 1b; 14 – *Bt* A/M; 15 – *Bt* 836; 16, 25 – *Bt* 0293; 20 – *Bt* subsp. *israelensis* B-5246; 21 – *Bt* 0371-2; 22 – *Bt* subsp. *thuringiensis* B-1223; 24 – *Bt* subsp. *subtoxicus* B-822; 26 – *Bt* subsp. *galleriae* B-197; 28 – *Bt* subsp. *finitimus* B-1162; 30 – контрольная ПЦР в отсутствие ДНК-матрицы

ванный нами, позволил различать штаммы на уровне вид-группа штаммов. Из результатов анализа видно, что полученные спектры разделили выборку штаммов *Bt* на шесть групп (рис. 3). Все штаммы относились к виду *Bt*, однако, предположительно, к разным подвидам. Группа 1 включала типовые штаммы *Bt* subsp. *thuringiensis*, а также *Bt* 0376 р.о. Этот штамм содержал уникальный saAFLP-фрагмент длиной 1000 п.н., отличающий его от других штаммов группы 1 (отмечен белой стрелкой на рис. 3). Группы 2, 3, 4, 5 представлены либо малым числом штаммов, либо одним штаммом. Следует отметить, что такое группирование соответствовало данным, полученным ранее с использованием генов 16S рРНК и *gyrB*. Важно, что каждая группа имела свой специфический спектр и saAFLP-фрагменты, отличающие ее от штаммов других групп. Удалось выявить маркеры, уникальные для отдельных штаммов, например, коммерческого штамма *Bt* 0376 р.о., отличающие его от всех штаммов группы 1. Таким образом, предлагаемый нами метод более специфичен и может использоваться для быстрого поиска специфических маркеров и изучения полиморфизма популяции.

В своей работе мы также использовали методы ERIC-ПЦР (рис. 4А) и BOX-ПЦР (рис. 4Б) для срав-

нения результатов, получаемых при помощи «стандартных» праймеров и при помощи разработанного нами saAFLP-анализа. На основании анализа полученных ERIC- и BOX-спектров все исследуемые штаммы *Bt* были разделены на шесть групп. Однако различий между ERIC- и BOX-спектрами штаммов внутри каждой группы не выявлено. Видно, что число специфических ПЦР-маркеров, а также общее количество фрагментов, получаемых методом saAFLP, больше, чем при использовании ERIC- и BOX-праймеров. Это свидетельствует в пользу более высокой чувствительности, специфичности и информативности метода saAFLP. Характер полученных результатов можно объяснить тем, что методы, в которых используются ERIC- и BOX-праймеры, позволяют анализировать отдельные участки генома, которые являются весьма консервативными (промоторные регионы (ERIC1R-ERIC2, BOX, REP2-I-REP1R-I), или область функциональных генов (например, тРНК), поэтому спектры, получаемые на основе таких праймеров, содержат общую, а не штаммоспецифичную информацию, и подходят, скорее, для паспортизации штаммов. Спектры, получаемые методом saAFLP, не привязанного к какому-либо определенному участку генома, отражают инди-

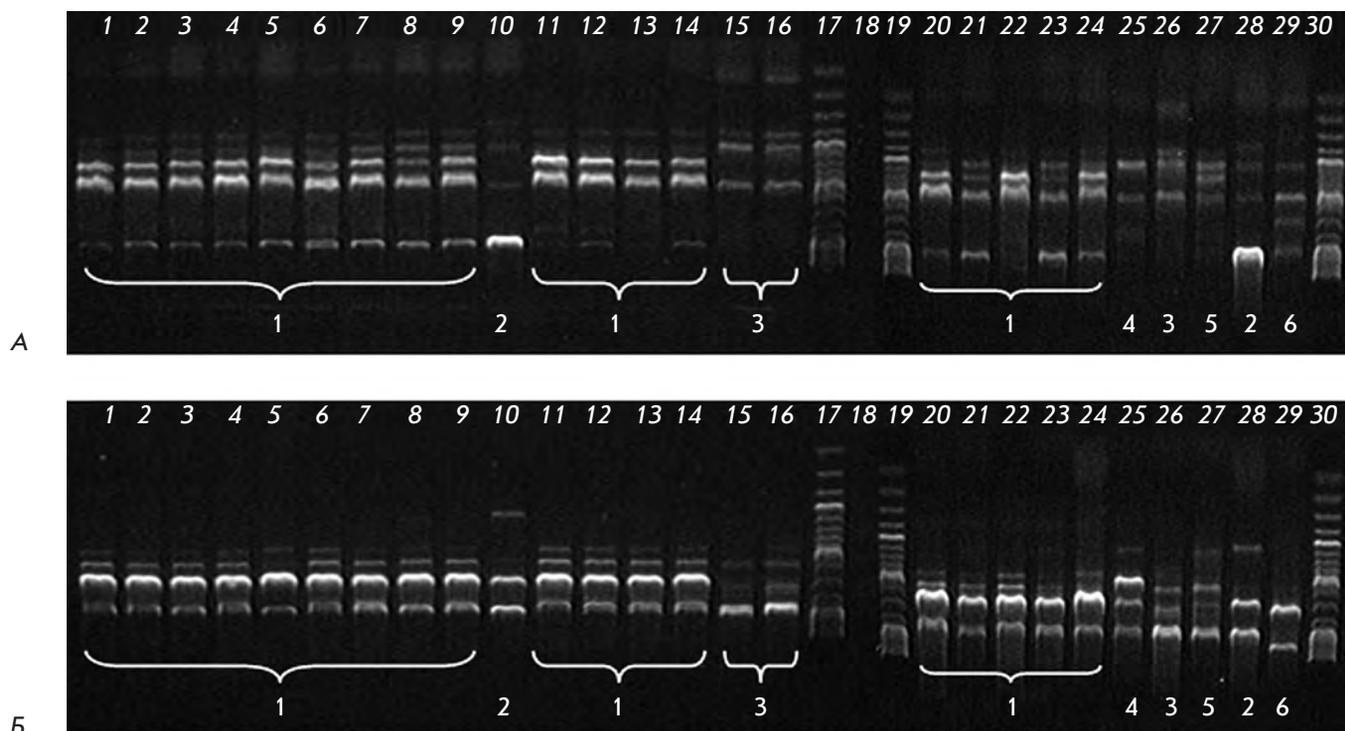


Рис. 4. Результаты электрофоретического анализа продуктов ПЦР на препаратах ДНК *Bt* с применением праймеров к мобильным элементам ERIC (А) и BOX (Б). Дорожки 17, 19, 30 – маркер GeneRuler™ молекулярной массы ДНК (1 kb ladder, «Fermentas»); 1 – *Bt* H10, R-тип; 2 – *Bt* A/N; 3 – *Bt* 408; 4, 19 – *Bt* 5681st; 5, 23 – *Bt* 0376 p.o.; 6, 20 – *Bt* 787; 7 – *Bt* 411; 8 – *Bt* 072; 9, 24 – *Bt* 0371-1; 10, 28 – *Bt* 109; 11 – *Bt* 14; 12 – *Bt* 994; 13 – *Bt* 1b; 14 – *Bt* A/M; 15 – *Bt* 836; 16, 26 – *Bt* 0293; 18 – контрольная ПЦР в отсутствие ДНК-матрицы; 21 – *Bt* subsp. *israelensis* B-5246; 22 – *Bt* subsp. *thuringiensis* B-1223; 25 – *Bt* subsp. *subtoxicus* B-822; 27 – *Bt* subsp. *galleriae* B-197; 29 – *Bt* subsp. *finitimus* B-1162

видуальность каждого конкретного микроорганизма. Фингерпринты на основе этого метода выявляют различия между всеми проанализированными штаммами [34]. Специфичность спектров дает возможность делать предварительные заключения о характере родства, не прибегая к данным других праймеров или методов, за исключением определения родовой принадлежности микроорганизма, например, с помощью генов 16S рРНК или *gyrB*.

Однако для подтверждения достоверности подобных результатов и получения полной картины генетических взаимоотношений между близкородственными бактериями необходим анализ суммарных данных, полученных и методом saAFLP, и с помощью ERIC- и BOX-ПЦР.

В нашей работе при помощи трех методов – ERIC-, BOX-ПЦР и saAFLP – выявлены 36 полиморфных признаков (уникальных фрагментов) среди исследуемых штаммов и по полученным данным построена их дендрограмма (рис. 5). Генетические расстояния между парами штаммов определяли по алгоритмам

Пирсона (Pearson's correlation), простого различия (Simple difference) и расстояния Козине (Cosine) (данные не представлены). Полученные матрицы расстояний использовали при проведении кластерного анализа с помощью метода NJ. По результатам этого анализа все изучаемые нами штаммы были разделены на пять кластеров. Статистическая значимость порядка ветвления составила от 58 до 99%. Кластеры выделяли на основании сходства $\geq 80\%$ и/или величины значимости ветвления $\geq 50\%$. Кластер 1 включал в себя штаммы *Bt* H10 R-типа, *Bt* A/N, *Bt* 408, *Bt* 409, *Bt* 410, *Bt* 5681st, *Bt* 787, *Bt* 411, *Bt* 072, *Bt* 0371-1, *Bt* 14, *Bt* 994, *Bt* 1a, *Bt* 1b, *Bt* A/M, *Bt* subsp. *israelensis* B-5246, *Bt* 0371-2 и типовой штамм *Bt* subsp. *thuringiensis* B-1223. Внутри данного кластера с высокой статистической значимостью порядка ветвления выделен штамм *Bt* 0376 p.o. Кластер 2 был образован двумя подвидами – *Bt* subsp. *galleriae* и *Bt* subsp. *subtoxicus*. Значимость ветвления $< 50\%$ показывает, что, возможно, данные штаммы принадлежат разным подвидам и при увеличении выборки будут фор-

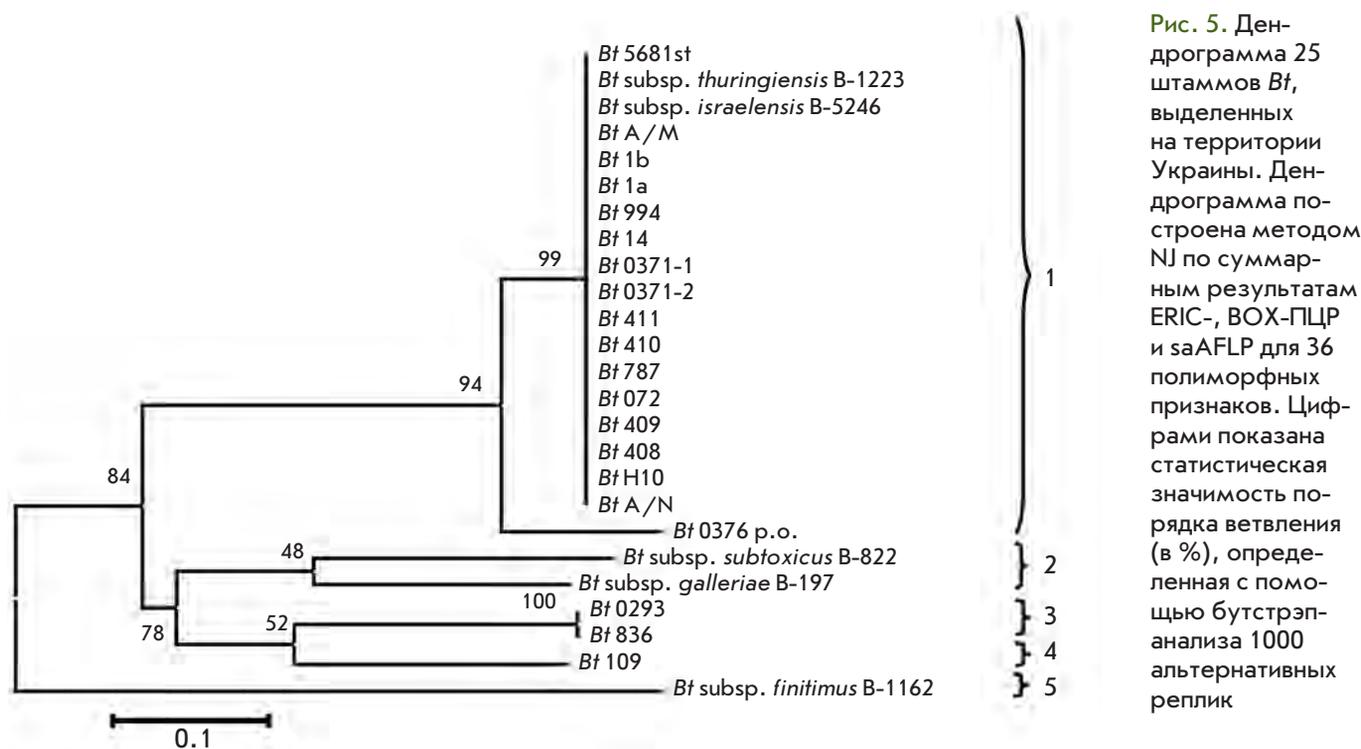


Рис. 5. Дендрограмма 25 штаммов *Bt*, выделенных на территории Украины. Дендрограмма построена методом NJ по суммарным результатам ERIC-, BOX-ПЦР и saAFLP для 36 полиморфных признаков. Цифрами показана статистическая значимость порядка ветвления (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных реплик

мировать отдельные кластеры. Для подтверждения или опровержения данной гипотезы следует в дальнейшем расширить выборку штаммов. В кластер 3 вошли штаммы *Bt* 0293 и *Bt* 836, кластер 4 был представлен штаммом *Bt* 109, а кластер 5 – штаммом *Bt* subsp. *finitimus* B-1162.

На основании опубликованных и полученных нами данных можно сделать вывод о том, что для изучения и идентификации вида *Bt* группы *B. cereus* необходим комплексный подход, объединяющий анализ и биохимических свойств штамма, и молекулярно-биологические методы. Вид *Bt* можно успешно изучать с использованием нуклеотидной последовательности гена *gyrB*, на внутривидовом уровне – методом

saAFLP вместе с другими методами AP-ПЦР (реп-ПЦР). При помощи данных методов изученную нами выборку штаммов разделили на пять групп, что также соответствовало их уникальным биохимическим свойствам, определенным ранее в работах наших коллег [49]. Разработанный нами метод saAFLP позволил выявить фрагмент ДНК, уникальный для штамма *Bt* 0376 p.o., впервые выделенного нашими коллегами из ИСХК НААН и применяемого в производстве энтомопатогенного препарата «STAR-t». В дальнейшем планируется расширить выборку штаммов, изучить состав генов *cry*, определить нуклеотидные последовательности уникальных ДНК-фрагментов, выявленных в отдельных saAFLP-группах и штаммах. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hofte H., Whiteley H.R. // Microbiol. Rev. 1989. V. 53. P. 242–255.
- Feitelson J.S. // Advanced engineered pesticides / Ed. Kim L. N.Y.: Marcel Dekker, 1993. P. 63–72.
- Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., Vanrie J., Lereclus D., Baum J., Dean D.H. // Microbiol. Rev. 1998. V. 62. P. 807–813.
- Aronson A.I., Beckman W., Dunn P. // Microbiol. Rev. 1986. V. 50. P. 1–24.
- Rowe G.E., Margaritis A. // Crit. Rev. Biotechnol. 1987. V. 6. P. 87–127.
- Baumann L., Okamoto K., Unterman B.M., Lynch M.J., Baumann P. // J. Invertebr. Pathol. 1984. V. 44. P. 329–341.
- Aronson A.I. // *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics / Eds Sonenshein A.B., Hoch J.A., Losick R. Washington, D.C.: Amer. Soc. Microbiol., 1993. P. 953–963.
- Ash C., Farrow J.A.E., Dorsch M., Stackebrandt E., Collins M.D. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1991. V. 41. P. 343–346.
- Carlson C.R., Caugant D.A., Kolsto A.-B. // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. P. 1719–1725.
- Wunschel D., Fox K.F., Black G.E., Fox A. // Syst. Appl. Microbiol. 1994. V. 17. P. 625–635.
- Bourque S.N., Valero J.R., Lavoie M.C., Levesque R.C. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 1623–1626.
- Helgason E., Okstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolsto A.-B. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 2627–2630.
- Chen M.L., Tsen H.Y. // J. Appl. Microbiol. 2002. V. 92. P. 912–919.

14. Thorne C.B. // *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria / Ed. Soneshein A.L. Washington, D.C.: Amer. Soc. Microbiol., 1993. P. 113–124.
15. de Barjac H., Franchan E. // *Entomophaga*. 1990. V. 35. P. 233–240.
16. Lecadet M.-M., Frachon E., Cosmao Dumanoir V., Ripouteau H., Hamon S., Laurent P., Thiery I. // *J. Appl. Microbiol.* 1999. V. 86. P. 660–672.
17. Hansen B.M., Damgaard P.H., Eilenberg J., Pedersen J.C. // *J. Invertebr. Pathol.* 1998. V. 71. P. 106–114.
18. Helgason E., Caugant D.A., Lecadet M.-M., Chen Y., Mahillon J., Hegna I., Kvaloy K., Kolsto A.-B. // *Curr. Microbiol.* 1998. V. 37. P. 80–87.
19. Priest F.G., Barker M., Baillie L.W.J., Holmes E.C., Maiden M.C.J. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 23. P. 7959–7970.
20. Somerville H.J., Jones M.L. // *J. Gen. Microbiol.* 1982. V. 73. P. 257–265.
21. Ko K.S., Kim J.M., Kim J.W., Jung B.Y., Kim W., Kim I.J., Kook Y.H. // *J. Clin. Microbiol.* 2003. V. 41. P. 2908–2914.
22. Kiem P., Kalif A., Schupp J., Hill K., Travis S.E., Richmond K., Adair D.M., Hugh-Jones M., Kuske C.R., Jackson P. // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. P. 818–824.
23. Hill K., Ticknor L., Okinaka R., Asay M., Blair H., Bliss K., Laker M., Pardington P., Richardson A., Tonks M., et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 1068.
24. Ticknor L.O., Kolsto A.-B., Hill K.K., Keim P., Laker M.T., Tonks M., Jackson P.J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 4863–4873.
25. Joung K.-B., Cote J.-C. // *J. Appl. Microbiol.* 2001. V. 90. P. 115–122.
26. Epplen J.T., Ammer H., Epplen C. / Oligonucleotide Fingerprinting Using Simple Repeat Motifs: A Convenient, Ubiquitously Applicable Method To Detect Hypervariability for Multiple Purposes // Eds Burke G., Dolf G., Jeffreys A.J., Wolff R. Basel: Birkhauser, 1991. P. 50–69.
27. Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., de Bruijn F.J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. V. 60. P. 2286–2295.
28. Chaley M.B., Korotkov E.V., Skryabin K.G. // *DNA Res.* 1999. V. 6. P. 153–163.
29. Boulygina E.S., Ignatov A.N., Tsygankova S.V., Korotkov E.V., Kuznetsov B.B. // *Microbiology.* 2009. V. 78. № 6. P. 703–710.
30. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed. // Eds Logan N.A., De Vos P. N.Y.: Springer, 2009. № 3. P. 21–128.
31. *Manual of Methods for General Bacteriology* // Eds Gerhardt P., Murray R.G., Costilow R.N., Nester E.W., Wood M.W., Krieg N.R., Phillips G.B. Washington, DC.: Am. Soc. Microbiol., 1981. P. 232–234.
32. Sanger F., Air G.M., Barrell B.G. // *Nature*. 1977. V. 265. P. 687–695.
33. Lane D.J. / 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* // Eds Stackebrandt E., Goodfellow M. N.Y.: Wiley, 1991. P. 115–175.
34. Yamamoto S., Harayama S. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V. 61. P. 1104–1109.
35. Zotov V.S., Punina N.V., Khapchaeva S.A., Didovich S.V., Melnichuk T.N., Topunov A.F. // *Ekologicheskaya genetika*. 2012. V. 2. P. 49–62.
36. Zabeau M., Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting // European Patent Office. Munich. Germany. 1993. Publication 0534858A1.
37. Altschul S.F., Gish W., Miller W. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. P. 403–410.
38. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 4673–4680.
39. Hall T.A. // *Nucl. Acids Symp. Ser.* 1999. V. 41. P. 95–98.
40. Kumar S., Tamura K., Nei M. // *Briefings in Bioinformatics*. 2004. V. 5. P. 150–163.
41. Nei M., Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2000. P. 336.
42. Rzetsky A., Nei M. // *Mol. Biol. Evol.* 1992. V. 9. P. 945–967.
43. Priest F.G. / DNA homology in the genus *Bacillus*. In *The Aerobic Endospore-Forming Bacteria* // Eds Berkeley R.C.W., Goodfellow M. London: Acad. Press, 1981. P. 33–57.
44. Daffonchio D., Cherif A., Borin S. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 5460–5468.
45. Bavykin S.G., Lysov Y.P., Zakhariyev V., Kelly J.J., Jackman J., Stahl D.A., Cherni A. // *J. Clin. Microbiol.* 2004. V. 42. № 8. P. 3711–3730.
46. Wang L.T., Lee F.L., Tai C.J., Kasai H. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. V. 57. P. 1846–1850.
47. La Duc M.T., Satomi M., Agata N., Venkateswaran K. // *J. Microbiol. Meth.* 2004. V. 56. P. 383–394.
48. Librado P., Rozas J. // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. P. 1451–1452.
49. Parkhomenko A.L., Parkhomenko T.U., Lesovoy N.M. // *Scientific notes of Taurida V. Vernadsky National University. Series: Biology, Chemistry*. 2009. V. 22. № 3. P. 96–100.