

Филогенетические взаимосвязи серологических вариантов *Bacillus thuringiensis*

Т. И. Патыка, Н. В. Патыка, В. Ф. Патыка¹

Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии РАСХН
Санкт-Петербург, Пушкин

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 154, Киев, Украина, 03680

vpatyka@mail.ru, patykatatyana@mail.ru

Цель. *B. thuringiensis* (*Bt*) – грамположительные спорообразующие аэробные или факультативно анаэробные бактерии, способные в процессе споруляции образовывать видоспецифические кристаллообразные включения белковой природы, состоящие из особых термолабильных –эндотоксинов. Серологические варианты *Bt* продуцируют разные энтомотоксины, их синтез во многом зависит от условий культивирования культуры. Накоплен богатый фактический материал о происхождении энтомотоксинов, условиях синтеза, строении, составе, токсических свойствах и механизмах действия на насекомых. *Bt* приобрели доминантное положение в микробиоме борьбы с вредителями растений и животных. В настоящее время существуют разновидности *Bt* в более чем 70 вариантах (серотипах), избирательно специфичных к определенному кругу хозяев-насекомых. Однако описание новых разновидностей не всегда выглядит оправданным с точки зрения филогенетической систематики, основанной на фенотипических признаках. **Методы.** На основе клонированных генов 16S рРНК энтомопатогенных бактерий *BtH1*, *BtH10*, *BtH14* проведен сравнительный филогенетический анализ внутривидовых взаимосвязей *Bt*. **Результаты.** Прослежены филогенетически однородные линии (уровень сходства 16S рРНК штаммов 1-го и 10-го серотипов составляет от 90,0 до 94%; отчетливой генетической обособленности среди штаммов 10-го и 14-го серотипов не выявлено). **Выводы.** При сравнении нуклеотидных последовательностей по 16S рРНК установлено существование штаммового полиморфизма внутри группы энтомопатогенов *BtH1*, *BtH10*, *BtH14*, связанного с их энтомоцидной активностью.

Ключевые слова: сероварианты, *Bacillus thuringiensis*, филогенетический анализ.

Введение. Использование генома или отдельных его фрагментов в систематике микроорганизмов имеет особое значение из-за его относительной консервативности по сравнению с любыми другими признаками и, кроме того, генетические различия лучше отражают эволюционно сложившиеся отношения между микроорганизмами, вследствие чего они являются основополагающими в современной классификации бактерий.

Возможности исследователей для построения молекулярной эволюционной систематики, филогении бактерий существенно расширяются в связи с привлечением методов определения генетического подобия (сравнительный анализ ДНК и последовательностей аминокислот в белках). Филогения группы организмов традиционно представляется в форме иерархического «древа», отображающего возможные эволюционные отношения [1, 2]. Использование молекулярно-генетических подходов в микробиологии привело к появлению не-

Список штаммов *Bacillus thuringiensis*, используемых в исследовании

Вариант	Серовариант	Количество штаммов	Сокращенное название (согласно каталогу Института Пастера)	Функциональная группа
<i>thuringiensis</i>	1	5	THU	I
<i>darmstadiensis</i>	10a, 10b	4	DAR	IV
<i>israelensis</i>	14	3	ISR	IV

скольких направлений в систематике бактерий, среди которых формирование филогенетической систематики бактерий; идентификация штаммов с применением филогенетической и фенотипической информации; выявление микроорганизмов в окружающей среде без их культивирования. Это позволяет контролировать чистоту биопрепаратов, основу которых составляют активные, технологичные биоагенты (штаммы), и проводить мониторинг культур в соответствующих условиях. Необходимо создавать базис для дальнейшего изучения генотипа культур, перспективных для использования в биотехнологии, а также осуществлять поиск и выделение генов, предопределяющих высокую биологическую активность.

B. thuringiensis (*Bt*) – грамположительные спорообразующие аэробные или факультативно анаэробные бактерии, способные в процессе споруляции образовывать видоспецифические кристаллообразные включения белковой природы, состоящие из особых термолабильных –эндотоксинов. Серологические варианты *Bt* продуцируют разные энтомотоксины, их синтез во многом зависит от условий культивирования культуры. Накоплен богатый фактический материал о происхождении энтомотоксинов, условиях синтеза, строении, составе, токсических свойствах и механизмах их действия на насекомых.

Штаммы *Bt* патогенны для личинок колорадского жука, гусениц капустной совки младших возрастов, капустной белянки, капустной моли, крестоцветных блошек, капустной тли на овощных культурах. Отмечена их высокая эффективность против популяций плодовой моли, белянок, американской белой бабочки, листовёрток, шелкопрядов, пядениц, златогузок на плодовых культурах; паутиных клещей на огурцах защищенного грун-

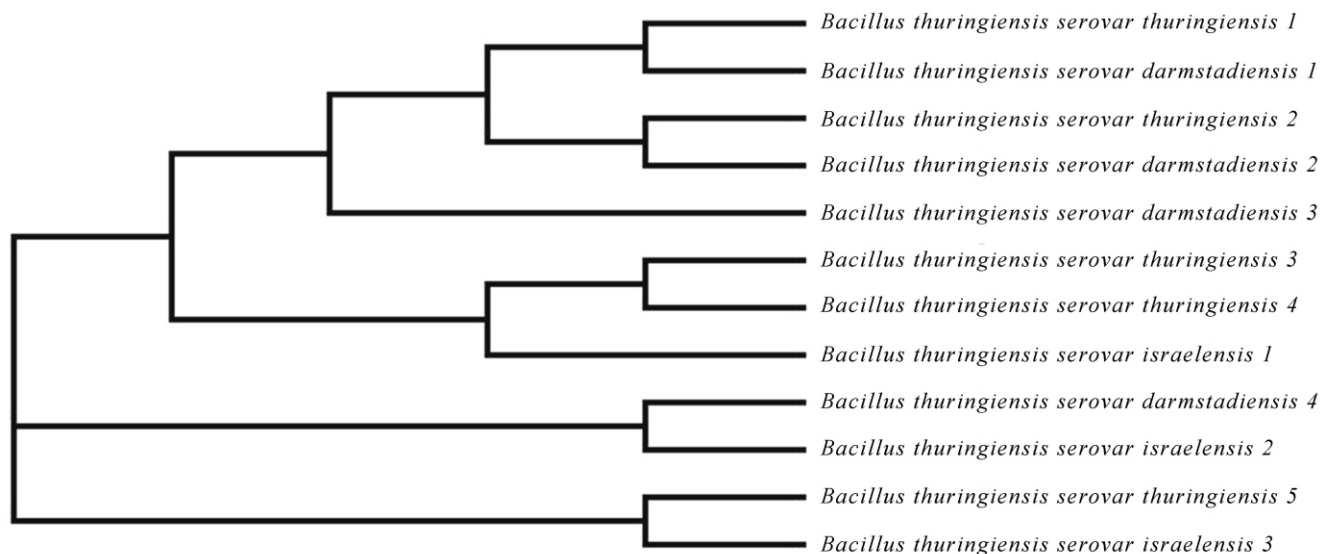
та; гусениц лугового мотылька на свекле, моркови, капусте, подсолнечнике и на многолетних травах; гусениц листовёртки на виноградниках и многих других вредителей [3].

Таким образом, *Bt* приобрели доминантное положение в микробиоме борьбы с вредителями растений и животных. В настоящее время существуют разновидности *Bt* в более чем 70 вариантах (серотипах), избирательно специфичных к определенному кругу хозяев-насекомых. Однако описание новых разновидностей не всегда выглядит оправданным с точки зрения филогенетической систематики, основанной на фенотипических признаках.

Цель работы – филогенетический анализ различных серологических вариантов энтомопатогенных бактерий *Bt*, выделенных из природных популяций насекомых, основанный на изучении полиморфизма нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК.

Материалы и методы. Использовали разновидности штаммов энтомопатогенных бактерий *Bt*, выделенных из природных популяций насекомых: экзотоксиногенные *Bt* var. *thuringiensis* (*BtH₁*), *Bt* var. *darmstadiensis* (*BtH₁₀*), *Bt* var. *israelensis* (*BtH₁₄*) (таблица).

ДНК энтомопатогенных бактерий экстрагировали методом, описанным авторами публикации [4]. После электрофоретического разделения в 1 %-м агарозном геле полученные образцы ДНК визуально детектировали, как в работе [5]. Полимерно-цепную реакцию (ПЦР) для 16S рРНК проводили по стандартным протоколам в амплификаторе BioRad My Cycler с применением олигонуклеотидов SSU-642-F HAATHYGTGCCAGCAGC и SSU-1445-R GTCRTCCYDCCTTCCTC. Продукты амплификации после экстракции из 1 %-го агарозного



Филогенетическая взаимосвязь разновидностей *Bt*, базирующаяся на анализе последовательностей генов 16S рРНК

геля использовали для клонирования в вектор *pAL-TA* [6, 7].

В автоматическом секвенаторе CEQ 8000 Genetic Analysis System («Beckman Coulter», США) нуклеотидные последовательности анализировали и проверяли их идентичность соответствующим последовательностям 16S рРНК различных вариантов *Bt* из базы данных GenBank. Построение дендрограммы и оценку сходства серологических вариантов осуществляли по полученным нуклеотидным последовательностям с помощью компьютерной программы Vector NTI Advance 8,0.

Результаты и обсуждение. Основным инструментом филогенетического анализа является сравнение близких по структуре или функции генов или белков и, прежде всего, сопоставление их первичных последовательностей. Анализ по 16S рРНК оказался более эффективным молекулярно-таксономическим инструментом оценки генетического разнообразия и отношений между бактериальными разновидностями (серотипами) энтомопатогенов *Bt*, чем подходы, базирующиеся на фенотипических данных (к примеру, серотипирование по *H*-антигену). Однако следует заметить, что реконструкции филогенетических отношений между штаммами, проведенные на основании разных молеку-

лярных данных, далеко не всегда согласуются не только с «морфологической» классификацией, но и между собой. Основные причины расхождения морфологических и молекулярных реконструкций заключаются в том, что на морфологическом уровне проявляется только малая часть генетической информации, заключенной в геноме организма. Используя комбинацию данных по изучению 16S рРНК, можно получить визуально наглядные фингерпринты и подтвердить видовую принадлежность штаммов и филогенетические взаимосвязи внутри вида.

Дендрограмма, построенная на основе полученных данных (рисунок), иллюстрирует существующие взаимосвязи между штаммами *Bt* 1, 10 и 14-го серотипов. Почти все разновидности *Bt* можно распределить по группам, они проявляют филогенетическую однородность, однако обозначились и некоторые обособленные варианты. Топология распределения разновидностей бацилл на дендрограмме свидетельствует о наличии трех основных кластеров, соответствующих шести генотипам. Сравнение штаммов *Bt* показало, что в генетическом плане наиболее близкородственными оказались три генотипа первого кластера с уровнем сходства 90,0–93,5 % (*BtH₁* (*thuringiensis*)), проявляю-

щих энтомоцидность в отношении чешуекрылых насекомых (*Lepidoptera*), и *BtH₁₀* (*darmstadiensis*), активных против жуков (*Coleoptera*). Таким образом, генетическая гомология энтомопатогенных штаммов подтверждается также спектром их энтомоцидной активности.

Штаммы *BtH₁₄* (*israelensis*), поражающие личинок кровососущих комаров, мошек и растительноядных комаров (рисового, шампиньонного и др.), оказались во втором и третьем кластерах с наименьшим уровнем сходства по рРНК 16S (гомология ниже 70 %). Следует отметить, что уникальность действия бактерий подвида *israelensis* на личинок двукрылых насекомых, включая ларвицидность, связана исключительно с особенностями их кристаллического эндотоксина.

Штаммы *Bt*, продуцирующие разный набор энтомотоксинов, по биологической активности в отношении восприимчивых насекомых могут значительно варьировать или быть вполне подобными, например, некоторые mosquitoцидные штаммы и др. Известно, что относящиеся к одному виду энтомопатогены часто обладают одинаковым набором факторов патогенности, а также сходными биохимическими и геномными характеристиками. Однако потомкам разных клонов одного вида присуща определенная вариабельность как на генотипическом, так и фенотипическом уровне.

Таким образом, молекулярно-генетический анализ *BtH₁*, *BtH₁₀*, *BtH₁₄*, базирующийся на сравнении нуклеотидных последовательностей по 16S рРНК, выявил существование штаммового полиморфизма внутри группы энтомопатогенов. На основе установленных отличий по морфологическим, физиолого-биохимическим и серологическим характеристикам штаммов *Bt* можно сделать предварительный вывод об их принадлежности по крайней мере к двум филогенетически однородным линиям. Уровень сходства 16S рРНК штаммов 1-го и 10-го серотипов составляет от 90,0 до 94,0 %. Отчетливой филогенетической обособленности между штаммами 10-го и 14-го серотипов не установлено. Надежность филогенетического результата во многом будет зависеть от комбинирования разноплановых данных, что позволит в дальнейшем оказывать влияние на конгруэнтность филогенетичес-

ких деревьев, статистическую поддержку и разрешение их ветвей, исключая систематическую ошибку.

T. I. Patyka, N. V. Patyka, V. F. Patyka

Phylogenetic interrelations between serological variants of *Bacillus thuringiensis*

Summary

Aim. *B. thuringiensis* (*Bt*) are gram-positive spore-forming aerobic or facultative anaerobic bacteria able to form during sporulation species specific crystal-like inclusions of protein nature, consisting of particular thermostable -endotoxins. Serological *Bt* variants produce different entomotoxins; their synthesis in many respects depends on the conditions of cultivation. There was accumulated a vast information on the entomotoxins, their origin, synthesis, structure, toxic properties and mechanisms of action on insects. These bacteria are dominating in the microbiomethods of pest control in plants and animals. There are more than 70 serovariants of *Bt* selectively specific to the definite groups of host insects. However, the description of new variants not always looks justified considering the phylogenetic systematization based on phenotype signs. **Methods.** A comparative phylogenetic analysis of the *Bt* intraspecific interrelations was performed on the basis of the cloned 16S rRNA genes of entomopathogenic bacteria *BtH₁*, *BtH₁₀*, *BtH₁₄*. **Results.** The phylogenetically homogeneous lines were investigated – a homology of 16S rRNA of the strains 1 and 10 ranged from 90,0 to 94,0 %; no distinct genetic isolation among the strains of 14th and 10th serovars was revealed. **Conclusions.** The comparison of nucleotide sequences of 16S rRNA has shown the existence of strains polymorphism within the group of entomopathogens *BtH₁*, *BtH₁₀*, *BtH₁₄*, connected with their entomocidal activity.

Keywords: serovars, *Bacillus thuringiensis*, phylogenetic analysis.

T. I. Патика, М. В. Патика, В. П. Патика

Філогенетичні взаємозв'язки серологічних варіантів *Bacillus thuringiensis*

Резюме

Мета. *B. thuringiensis* (*Bt*) – грамозитивні спороутворюючі аеробні або факультативно анаеробні бактерії, здатні в процесі споруляції формувати видоспецифічні кристалоподібні включення білкової природи, які складаються з особливих термолабільних -ендотоксинів. Серологічні варіанти *Bt* продукують різні ентомотоксини, синтез їх багато в чому залежить від умов культивування культури. Накоплено багатий фактичний матеріал щодо походження ентомотоксинів, умов синтезу, будови, складу, токсичних властивостей і механізмів дії на комах. *Bt* набули домінуючого положення у мікробіометоді боротьби із шкідниками рослин і тварин. На сьогодні існують різновиди *Bt* у більш ніж 70 варіантах (серотипах), вибірково специфічних до певного кола хазяїв-комах. Однак опис нових різновидів не завжди є виправданим з точки зору філогенетичної систематики, основаної на фенотипових ознаках. **Методи.** На базі клонуваних генів 16S рРНК ентомопатогенних бактерій *BtH₁*, *BtH₁₀*, *BtH₁₄* здійснено порівняльний

філогенетичний аналіз внутрішньовидових взаємозв'язків *Bt*.
Результати. Прослідковано філогенетично однорідні лінії (рівень схожості 16S рРНК штамів 1-го і 10-го серотипів становить від 90,0 до 94 %; чіткого генетичного виокремлення штамів 10-го і 14-го серотипів не визначено). **Висновки.** При порівнянні нуклеотидних послідовностей за 16S рРНК встановлено існування штамового поліморфізму всередині групи ентомопатогенів *BtH1*, *BtH10*, *BtH14*, пов'язаного з їхньою ентомоцидною активністю.

Ключові слова: сероваріанти, *Bacillus thuringiensis*, філогенетичний аналіз.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Blokhina I. N., Livanova G. F., Antonov A. S. Sistematika bakteriy (s osnovami genosistematiki).—N. Novgorod, 1992.—170 s.
2. Spink G., Kondrosi A., Hooykaas P. The *Rhizobiaceae*: Molecular biology of model plant-associated bacteria.—Dordrecht: Kluwer Acad. publ.—566 p.
3. Kandybin N. V. Bakterial'nye sredstva bor'by s gryzunami i vrednymi nasekomymi: teoriya i praktika.—M.: Agropromizdat, 1989.—172 s.
4. Doyle J. J., Doyle J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus.—1987.—12.—P. 13–15.
5. Moreira D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations // Nucl. Acids Res.—1998.—26, N 13.—P. 3309–3310.
6. Joung K.-B., Cote J.-C. Phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars based on 16S rRNA gene restriction fragments length polymorphizm // Appl. Microbiol.—2001.—90.—P. 115–122.
7. Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E. F. Molecular cloning: A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. publ., 1982.—545 p.

УДК 632.937

Надійшла до редакції 26.05.08