

MELNYCHUK M.D., KOLOMIETS J.V., LIKHANOV A.F., AVETYSJAN J.F.

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

Ukraine, 03401, Kyiv, 15 Geroiv Oborony St., e-mail: julyja@i.ua

SPECIFIC TRANSFORMATIONS OF TISSUE REPRODUCTIVE ORGANS OF TOMATOES (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.) UNDER THE INFLUENCE PATHOGENIC MICROORGANISMS

Aims. The aim of our research was the study of transformation of tissues and cells of reproductive organs of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in conditions of bakteriozsis. **Methods.** For research we have chosen such kinds of tomatoes as “Zarnica”, “Myaghkaya”, “Nasten’ka”, “San’ka”, “Ephemer”, “Novichok”. Structural and functional reorganization in seeds and fruit buds we study using light and fluorescent microscopy methods. Anatomico-histological studies of tissues we made according to standard statements.

Results. We found that bacterial pathogenesis of tomatoes lead to the destruction in chloroplasts, nucleus and in other components. Under the impact of bacterium’s exometabolites in parenchyma of cover tissues of integuments, placenta and mesocarp of fruits form a viscous consistency secret - polysaccharide, which cause significant disturbance of protoplasts, induces the creation of cell walls, leads to chlorotic changes which are followed by necrosis of tissues. **Conclusions.** We suggested the transformations of tissues and cells of reproductive organs of tomatoes in conditions of bakteriozsis divide into 6 main stages.

Key words: *Lycopersicon esculentum* Mill., cells components, bakteriozsis.

ПАРХОМЕНКО А.Л.¹, ПУНИНА Н.В.^{2,3}, ЗОТОВ В.С.², ПАРХОМЕНКО Т.Ю.¹

¹ Институт сельского хозяйства Крыма НААН

Украина, 95453, АР Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150, e-mail: tat.parkhomenko@rambler.ru

² Институт биохимии им. АН. Баха РАН

Россия, 11907, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

³ Медико-генетический научный центр РАМН,

Россия, 115478, Москва, ул. Москворечье, 1

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Одним из экологически безопасных методов защиты растений от фитофагов является использование препаратов на основе энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). В мире разработан широкий ассортимент таких препаратов, так как этот биоагент является одним из немногих, эффективных против большинства фитофагов из семейств *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Diptera*, *Coleoptera* и в то же время безопасных для человека, животных и полезных насекомых [1].

Постепенное расширение ареала фитофагов, связанное с изменением климата, а также появление и развитие резистентных к химическим инсектицидам насекомых требует скри-

нинга новых более эффективных штаммов, изучения их физиолого-биохимических и генетических свойств и оценки эффективности против экономически значимых фитофагов с целью создания на их основе новых микробных препаратов.

Целью нашей работы было провести первичную оценку эффективности новых выделенных из природных популяций фитофагов штаммов *Bt*, определить их физиолого-биохимические и генетические свойства и провести сравнительный анализ с имеющимися штаммами в коллекции с целью их идентификации.

Материалы и методы

В работе были изучены штаммы из коллекции отдела микробиологии Института сельского хозяйства Крыма НААН: *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 0293 (III серотипа) – аналог штамма биоагента препарата Лепидоцид, *B. thuringiensis*

var. *thuringiensis* 994 (I серотипа) - аналог штамма биоагента препарата Битоксибациллин, *B. thuringiensis* var. *morrisoni* 109 (VIII серотипа), *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis* H₁₀ (X серотипа), а также новые штаммы *B. thuringiensis* 0376

р.о. И 408 (или 0408). Для исследований нами также были использованы типовые штаммы: *B. thuringiensis* sbsp. *israelensis* B-5246; *B. thuringiensis* sbsp. *thuringiensis* B-1223; *B. thuringiensis* sbsp. *subtoxicus* B-822; *B. thuringiensis* sbsp. *galeriae* B-197; *B. thuringiensis* sbsp. *finitimus* B-1162.

Нами были использованы микробиологические, биохимические и молекулярно-биологические методы. Сбор и хранение насекомых, выделение штаммов, определение их морфологических признаков, идентификацию проводили общепринятыми методами [2,3,4]. Первичная оценка эффективности новых штаммов была проведена в лабораторных опытах на личинках колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*, *Coleoptera*) младшего возраста. Листья картофеля обрабатывали методом опрыскивания суспензией с титром спор 2×10^8 в 1 мл. Объем использованной суспензии составлял 5 мл на повторность. Эффективность определяли на протяжении 10 суток после обработки путем учета погибших особей.

Для проведения молекулярно-биологических исследований данных штаммов использовались и подтверждения их принадлежности к роду *Bacillus* применялись анализ нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК и методы АР-ПЦР: Rep-ПЦР [5,6]; ERIC-ПЦР, BOX-ПЦР, а также новый метод – saAFLP [7].

Выделение ДНК. Для выделения препаратов суммарной клеточной ДНК штаммы культивировали на агаризованной среде ТУ: дрож-

жевой экстракт – 1 г/л; пептон – 10 г/л; CaCl₂ – 0,4 г/л; агар – 20 г/л. ДНК была выделена из свежих культур на 1-2 сутки их роста с помощью метода сорбции на магнитных частицах (набор “Минипреп”, «Силекс», Россия).

ПЦР с использованием праймеров к различным повторяющимся элементам (Rep-ПЦР). Для проведения Rep-ПЦР были использованы описанные ранее праймерные системы и протоколы [5,6].

saAFLP анализ штаммов *Bt* [7,8]. Рестрикционный анализ проводили одновременно с лигированием в 10 мкл смеси, содержащей 80 нг образца ДНК, 1х лигазный буфер (“Fermentas”, США), 10 пкМ одноцепочечного адаптера (Ad.CTAG1: 5`-ctagCTGGAATCGATTCCAG-3`), 5 ед. Т4 ДНК лигазы (“Fermentas”, США) и 1 ед. рестриктазы XmaI (XbaI). Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 2 часов, после чего доводили реакционный объем до 100 мкл. ПЦР проводили на амплификаторе Mastercycler gradient Eppendorf в 25 мкл смеси содержащей: 1х буфер для ПЦР, 2,8 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, в качестве ДНК-матрицы – 2 мкл рестрикционно-лигазной смеси, 0,4 мкМ праймера (Pr.CTAG1: 5`-CTGGAATCGATTCCAGctag-3`), комплементарного адаптеру и 1 ед. ДНК-полимеразы BioTaq (“Диалат ЛТД”, Россия). Для ПЦР амплификации был использован следующий температурно-временной профиль: первоначальная денатурация при 94°C - 2 мин; последующие 30 циклов: 94°C – 30 с, 40°C – 30 с, 72°C – 3 мин; окончательная элонгация – 5 мин при 72°C.

Результаты и обсуждение

Из трупов имаго картофельной моли в период эпизоотии выделен новый штамм *Bt* 0376 р.о. Штамм *Bt* 408 выделен из трупа имаго зерновой моли.

Клетки штамма *Bt* 0376 р.о. – продолговатые палочки, округлые на концах, длиной 4.12 ± 0.07 мкм и шириной 1.28 ± 0.03 мкм. Клетки

штамма *Bt* 408 – продолговатые палочки, округлые на концах, длиной — 4.41 ± 0.07 мкм и шириной 1.25 ± 0.03 мкм.

Первичная оценка эффективности штаммов против фитофагов проводилась на гусеницах колорадского жука младшего возраста (табл.1, 2).

Таблица 1. Эффективность штамма *Bt* 0376 р.о. против личинок *Leptinotarsa decemlineata* (лабораторный опыт L_{1-2})

Вариант опыта	Гибель личинок, сутки, %			
	3	5	7	10
Контроль (вода)	0.0	0.0	2.3±0.1	2.3±0.1
<i>Bt</i> 994	10.7±0.3	69.7±0.1	91.7±0.1	98.3±0.3
<i>Bt</i> 0376 р.о.	20.0±0.3	76.7±0.7	95.0±1.0	100.0±0.00

Таблица 2. Эффективность штамма *Bt* 0408 против личинок *Leptinotarsa decemlineata* (лабораторный опыт L_{1-2})

Вариант опыта	Гибель личинок, сутки, %			
	3	5	7	10
Контроль (вода)	1.3±1.23	4.0±2.25	4.0± 2.25	4.0±2.25
<i>Bt</i> 994	12.0±2.31	24.0±4.00	57.3±4.81	96.0±2.31
<i>Bt</i> 408	17.3±1.33	54.7±9.61	97.3±1.33	100.0±0.00

Так, в результате данных экспериментов была показана высокая энтомопатогенная активность штаммов против личинок *Leptinotarsa decemlineata*, что стало основанием для проведения дальнейшего изучения их биохимических и генетических свойств. Все остальные изучаемые нами штаммы также показали высокую энтомопатогенную активность против соответствующих фитофагов (данные не представлены). Были проведены необходимые биохимические реакции – рост на мясо-пептонном бульоне, протеолитическая, амилитическая, уреазная активность штаммов, продуцирование лецитиназы, ферментация эскулина и усвоение углеводов – сахарозы, маннозы, глюкозы, мальтозы,

арабинозы, дульцита, рафинозы, рамнозы, а также реакция на образование ацетил-метилкарбинола.

В целом было проанализировано 15 признаков штаммов *Bt*. Полученные результаты были использованы для кластерного анализа (рис. 1). Показан высокий уровень сходства (S) штаммов *Bt* I серотипа и *Bt* 0376 p.o., а также *Bt* X серотипа и штамма *Bt* 408 между собой ($0,7 < S \leq 1,0$) — 0,88. Штаммы *Bt* III и VIII серотипов образовывали отдельные кластеры, однако выяснить их действительные филогенетические отношения с помощью проведения кластерного анализа только на основании биохимических характеристик не представлялось возможным.

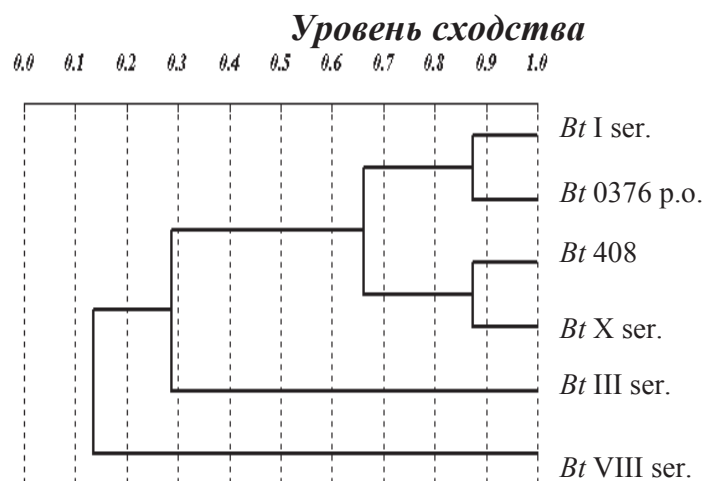


Рис. 1. Дендрограмма уровня сходства исследуемых штаммов *Bt* по физиолого-биохимическим характеристикам

Для уточнения филогенетических взаимоотношений исследуемых штаммов нами были применены генетические методы исследования. С целью подтверждения принадлежности штаммов к роду *Bacillus* был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *16S* рРНК и *gyrB*. На основании данного анализа все исследуемые штаммы были отнесены к роду *Bacillus*, группе *B. cereus*. С помощью сравнительного анализа нуклеотидной и аминокислотной последовательностей было уточнено таксономическое положение изучаемых штаммов и показано, что они относятся к виду *Bt* [8]. Однако не удавалось выявить генетических различий, которые бы позволили разделить исследуемые штаммы, например, *Bt* 0376 p.o и *Bt* 408. Поэтому для выявления различий между близкими штаммами бактерий внутри вида были применены методы геномного фингерпринтинга: ERIC-, BOX-ПЦР и метод saAFLP, модифи-

кислотной последовательностей было уточнено таксономическое положение изучаемых штаммов и показано, что они относятся к виду *Bt* [8]. Однако не удавалось выявить генетических различий, которые бы позволили разделить исследуемые штаммы, например, *Bt* 0376 p.o и *Bt* 408. Поэтому для выявления различий между близкими штаммами бактерий внутри вида были применены методы геномного фингерпринтинга: ERIC-, BOX-ПЦР и метод saAFLP, модифи-

цированный нами ранее [7]. Данные методы достоверно позволили различить штаммы на уровне: вид – группа штаммов — штамм. Ранее был проведен анализ геномного фингерпринтинга (рис. 2, [8]). Показано, что все полученные спектры разделили исследуемую выборку штаммов на 5 кластеров, разделение не соотносилось с данными серотипического анализа, что, возможно, связано с наличием *cry* генов в тех

или иных штаммов. Кластер 1 включал в себя типовые и референтные штаммы *Bt* sbsp. *thuringiensis*, *Bt* 0408, а также штамм *Bt* 0376 p.o., который также имел уникальную полосу, отличающую его от спектров штаммов группы 1. Кластеры 2, 3, 4, 5 были представлены либо малым числом штаммов, либо одним. Все штаммы относились к одному виду *B. thuringiensis*, предположительно к разным подвидам.

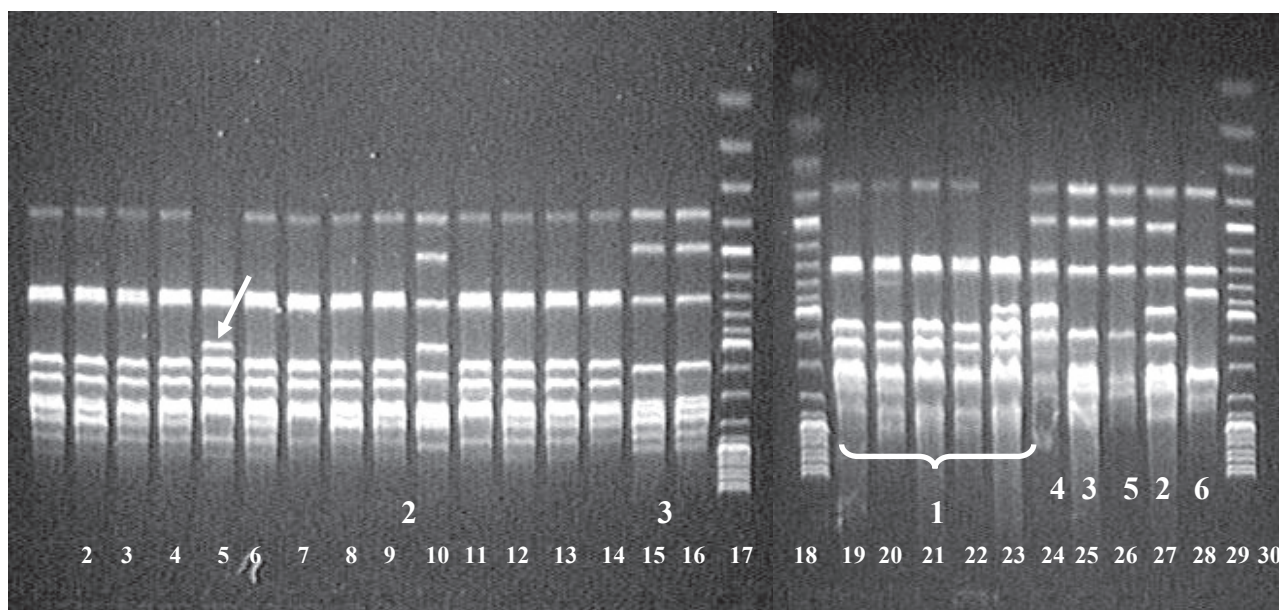


Рис. 2. Результаты электрофоретического анализа продуктов saAFLP на препаратах ДНК *Bt*. Номера дорожек: 17, 18, 29 – маркер GeneRuler™ молекулярной массы ДНК 1 kb (Fermentas); 1 – *Bt* H10, R-тип; 2 – *Bt* A/N; 3 – *Bt* 0408; 4, 19 – *Bt* 5681st; 5, 23 – *Bt* 0376 p.o.; 6 – 9, 10, 27, 11–15, 21 – другие исследованные штаммы; 16, 25 – *Bt* 0293; 20 – *Bt* sbsp. *israelensis* B-5246; 22 – *Bt* sbsp. *thuringiensis* B-1223; 24 – *Bt* sbsp. *subtoxicus* B-822; 26 – *Bt* sbsp. *galerae* B-197; 28 – *Bt* sbsp. *finitimus* B-1162; 30 – контроль в отсутствии ДНК-матрицы

При помощи методов ERIC-, BOX-ПЦР и saAFLP было выявлено 36 полиморфных признаков, на их основе была построена дендрограмма. Все исследуемые штаммы были достоверно разделены на 5 кластеров. К первому относились штаммы *Bt* H10 R-типа, типовой штамм *Bt* sbsp. *thuringiensis* B-1223, штаммы *Bt* 0408, *B. israelensis* B-5246 и другие штаммы коллекции. Однако следует отметить, что штамм *Bt* 0376 p.o. хотя и был сгруппирован в данный кластер, был удален от других штаммов группы,

вследствие наличия уникальных полиморфных признаков. Данные признаки в дальнейшем планируется изучить, определить нуклеотидную последовательность и, возможно, использовать в качестве маркера для диагностики или идентификации. Кластер 2 образован двумя подвидами — *Bt* sbsp. *galerae* и sbsp. *subtoxicus* (с низким уровнем достоверности). Кластер 3 объединяет штаммы *Bt* 0293 и 836. Кластер 4 представлен штаммом *Bt* 109. Подвид *Bt* sbsp. *finitimus* выделен в кластер 5.

Выводы

Оценена эффективность штаммов *Bt* 0376 p.o. и *Bt* 408 против личинок колорадского жука, которая составляет на 10 сутки 100%. Проведена идентификация перспективных штаммов *Bt* 0376 p.o. и *Bt* 408 с помощью физиолого-биохимических и молекулярно-биологических методов. Выявлено, что оба штамма принадле-

жат к I серотипу, и штамм *Bt* 0376 p.o. имеет уникальный saAFLP-фрагмент. Показано, что для выявления различий между близкими видами и штаммами бактерий целесообразно применять метод saAFLP совместно с биохимическим анализом.

Литература

1. Кандыбин Н.В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми: теория и практика – М.: Агропромиздат, 1989. – 172 с.
2. Лескова А.Я., Рыбина Л.М., Строева И.А. Идентификация культур *Bacillus thuringiensis* и оценка их патогенных свойств. (Методические указания). – Л.: изд. Всесоюз. НИИ защиты растений, 1984. – 21 с.
3. Определитель бактерий Бержи в 2-х т. / [Под ред. Дж.Хоулта, Н. Крига и др.]. – М.: Мир, 1997. – Т.1. – 432 с.
4. Определитель бактерий Бержи в 2-х т. / [Под ред. Дж.Хоулта, Н. Крига и др.]. – М.: Мир, 1997. – Т.2. – 368 с.
5. 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 G. Basel: Birkhauser. – 1991. – P. 50–69.
6. Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C., de Bruijn F.J. // Appl. environ. Microbiol. – 1994. – Т. 60. – С. 2286–2295.
7. Zotov V.S., Punina N.V., Khapchaeva S.A., Didovich S.V., Melnichuk T.N., Topunov A.F. New taxonomic marker – *hin*-region // Ekologicheskaya genetika. – 2012. – Т. 2. – С. 49–62.
8. Пунина Н.В., Зотов В.С., Пархоменко А.Л., Пархоменко Т.Ю., Топунов А.Ф. Изучение генетического разнообразия *Bacillus thuringiensis*, выделенных в различных эколого-географических зонах Украины, при помощи анализа генов *16S* рPHK, *gyrB* и методов AP-ПЦР и saAFLP // Acta Naturae. – 2013. – Т. 5, №1. – С. 93-103.

PARKHOMENKO A.L.¹, PUNINA N.V.^{2,3}, ZOTOV V.S.², PARKHOMENKO T. YU.¹

¹*Institute of agricultural of Crimea of NAAS*

Ukraine, 95453, AR Crimea, Simferopol, Kievskaya, 150, e-mail: tat.parkhomenko@rambler.ru

²*A.N. Bach Institute of Biochemistry RAS*

Russia, 11907, Moscow, Leninsky prospect, 33, build. 2

³*Research Center for Medical Genetics RAMS*

Russia, 115478, Moscow, Moskvorechje, 1

PHYSIOLOGY -BIOCHEMICAL AND GENETICALLY CHARACTERISTICS OF PERSPECTIVE INSECT PATHOGEN STRAINS *BACILLUS THURINGIENSIS*

Aims. The estimate of efficiency of new natural strains of *B. thuringiensis*, definite its physiology-biochemical characteristics and identification of new strains. **Methods.** In our work we using the collection, typical and new strains of *B. thuringiensis*. We using microbiological and molecular-biological methods (Rep-PCR: ERIC-PCR, BOX-PCR and new methods – saAFLP. **Results.** The strains of *Bt* 0376p.o. and 0408 have the high insecticide activity to larvae of colorado beetle. The death of larvae on 10 day of carrying out of experiments was 100%. In accordance with physiology-biochemical reactions the strain of *Bt* 0376p.o. was grouped to I serotype, the strain of *Bt* 0408 – to X serotype. But by saAFLP and other methods (Rep-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR the both one were grouped with the type strains *Bt* subsp. *thuringiensis* B-1223. **Conclusions.** It was estimate of strains efficiency of *B. thuringiensis* 0376p.o. and 0408 against to larvae of potato beetle – 100 %. It was shown that the both investigated strains belong to I serotype by saAFLP method.

Key words: *B. thuringiensis*, efficiency, single adaptor AFLP.

РОНИН Е.И., МИНКОВА Д.М., МЕСТЕР Д.И., КОРОЛЬ А.Б.

University of Haifa, Institute of Evolution

Mount Carmel, Haifa 31905 Israel, e-mail: efim@research.haifa.ac.il

МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КАРТИРОВАНИЯ НА ОСНОВЕ SNP-МАРКЕРОВ

Новые технические возможности, позволяющие тысячи маркеров на хромосому, требуют модернизации программных средств построения генетических карт, способных переработать не больше сотен маркеров в хромосоме.

Желание иметь гигантское число маркеров при относительно низком объеме популяции (затраты проекта пропорциональны количеству особей в популяции) оправдывается стремлением «залатать дыры в генетической карте». Тут же возник