

МОЛЕКУЛЯРНО-ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИМБИОТИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ НЕМАТОД РОДА STEINERNEMA И БАКТЕРИЙ РОДА XENORHABDUS

Н. С. Шепелева

Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова, Ленинский пр., 33, Москва, 119071, Россия, zayac_20@mail.ru

Обитающие в почве личинки нематод рода *Steinernema* заносят в полость тела различных насекомых симбиотических бактерий рода *Xenorhabdus*. Последние, развиваясь, быстро убивают насекомое-хозяина, тело которого становится очагом размножения нематод. Молекулярно-филогенетические методы позволили исследовать взаимоотношения нематод и переносимых ими бактерий: выяснить состав родов *Xenorhabdus* и *Photorhabdus*, а также оценить в общих чертах привязку бактериальных видов к видам нематод (Tailliez *et al.*, 2006). В основном для этого использовали последовательности 16S-домен бактериальной ДНК, однако, в последнее время стали использовать и другие последовательности (*gyrB* и *serC*) (Tailliez *et al.*, 2006, Lee, Stock, 2010).

Нами были выделены симбиотические бактерии из двух лабораторных культур нематод *Steinernema carpocapsae*, трех культур вида *Steinernema feltiae*, а также двух неописанных видов штейнернем – *Steinernema* sp. «Bush-Augusta» (выделена в штате Миссури, США в 2000 году) и *Steinernema* sp. из Камеруна.

Материал и методы

Для получения чистой культуры бактерий около 200 инвазионных личинок нематод помещали в 0.1 % раствор мертиолята натрия на 2 часа, после чего отмывали, переносили и растирали в микроступках. Гомогенат наносили на поверхность NBTA-агара и инкубировали при 22–24°C в течение 48–72 часов. Бактерий из образовавшихся колоний синего цвета доращивали в LB-бульоне в течение 48 часов. Для выделения ДНК 2 мл бульона центрифугировали при 2000 об/мин. в течение 5 мин. и после удаления супернатанта, ресуспендировали осадок в лизисном буфере и инкубировали в течение 30 мин при 95 °C. Последовательность 16S-участка бактериальной ДНК амплифицировали с праймерами BabF (GAAGAGTTTGATCATGGCTC) и BabR (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA). Очистку ДНК проводили с помощью электрофореза в 0.8 % агарозном геле. ДНК из блоков геля выделяли с помощью набора фирмы Promega (Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System). После этого проводили преципитацию ДНК этанолом в присутствии ацетата аммония. Для секвенирования пробы отправляли в ЦКП «Геном».

Результаты

Положение исследованных нами штаммов бактерий *Xenorhabdus* на филогенетическом древе, отражающем взаимоотношения между известными бактериальными видами этого рода, представлено на рис. 1. Как и ожидалось, симбиотические бактерии нематод вида *Steinernema carpocapsae* принадлежат к бактериальному виду *Xenorhabdus nematophila*. Бактерии этого вида выделяются исключительно от нематод *S. carpocapsae*. Симбионты *Steinernema feltiae* относятся к виду *X. bovienii*, облигатно ассоциированным с данным видом.

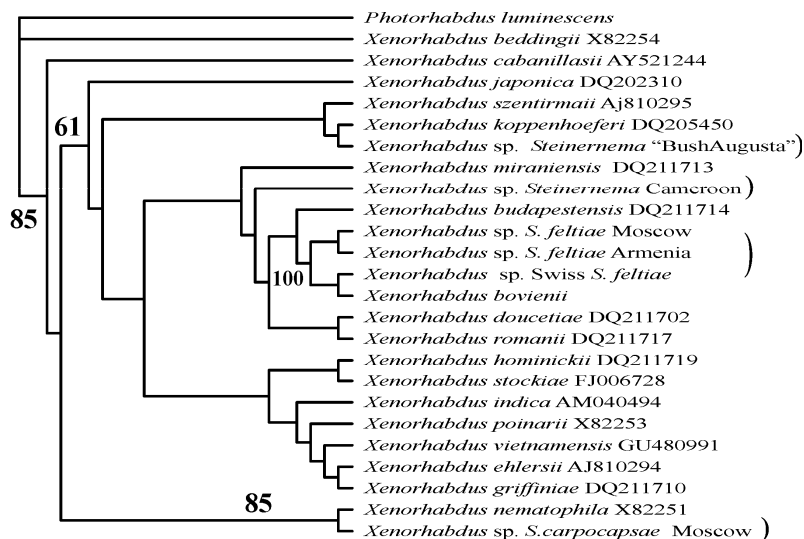


Рис. 1. Филогенетическое положение исследованных бактерий. Изученные нами штаммы отмечены знаком). Анализ последовательностей проведен методом максимальной парсимонии. Указаны значения бутстреп-поддержки при 1000 псевдореплик.

Штаммы *Xenorhabdus* полученные от неописанных видов штейнернематид также показали значительный уровень своеобразия. Бактерии, полученные от изолята *Steinernema* sp. «Bush-Augusta» из штата Миссури (США), оказались близки к бактериальным видам *X. szentirmai* и *X. koppenhoeferi*. Ксенорабдусы, выделенные от *Steinernema* sp. из Камеруна, занимают менее определенное место в филогенетическом древе, попадая в единую линию с видами *X. budapestensis* и *X. miraniensis*.

Обсуждение

Анализ выравнивания и матрицы нуклеотидных различий между исследованными штаммами *Xenorhabdus* и описанными бактериальными видами этого рода показывают, что последовательность исследованной нами культуры бактерий, выделенной от нематод *Steinernema carpocapsae*, демонстрирует значительное сходство с последовательностями, депонированными в Генбанке NCBI для вида *Xenorhabdus nematophila*. Полученная последовательность для *Xenorhabdus* от *S. carpocapsae* из Московской области отличается от типовой на 3 нуклеотида. Выделенный новый штамм *Xenorhabdus* несомненно относится к этому бактериальному виду. Был проведен анализ взаимоотношений между выделенной в Московской области культурой бактерий вида *Xenorhabdus nematophila* и другими штаммами этого вида. Последовательность штамма из Московской области образовывала единую группу со штаммами из США, Польши, Португалии, Иордании и Перу. Однако статистическая поддержка для этой группы была низкой. Средний уровень поддержки (88 %) был отмечен для группы, состоящей из перечисленных штаммов, а также культур *Xenorhabdus nematophila* из Иордании и Перу.

Полученные нами последовательности 16S-участка *Xenorhabdus bovienii* – симбионтов всех трех изолятов нематод *S. feltiae* оказались совершенно идентичными, несмотря на значительное географическое удаление мест их выделения в природе (Армения, Московская область, Швейцария).

Последовательность бактерий выделенных от нематод изолята *Steinernema* sp. «Bush-Augusta» (штат Миссури, США) в построенных нами кладограммах попадала в единую группу с бактериальными видами *X. szentirmai*, *X. koppenhoeferi* и (в некоторых кладограммах) с *X. japonica*. Наименьший уровень нуклеотидных различий был отмечен между этими бактериями и *X. szentirmai*. Молекулярно-таксономические особенности бактерий, полученных от нематод изолята *Steinernema* sp. из Камеруна, указывали на их родство с видом *X. miraniensis*.

Литература

Lee Ming-Min, Stock S. P. A multigene approach for assessing evolutionary relationships of *Xenorhabdus* spp. (γ -Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic *Steinernema* nematodes. Journal of Invertebrate Pathology, 2010, vol. 104, p. 67–74

Tailliez, P., Pagès, S., Ginibre N., Boemare N. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species Intern. J. Syst. Evol. Microbiol., 2006, vol. 56, p. 2805–2818.

Tailliez P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pagès, S., Boemare, N. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis*. Intern. J. Syst. Evol. Microbiol., 2010, vol. 60, p. 1921-1937.