

Успанов А.М., Токарев Ю.С.,
Казарцев И.А., Оразова С.Б.,
Васильева А.А.,
Смагулова Ш.Б.,
Дуйсембеков Б.А.,
Слямова Н.Д.,
Сагитов А.О., Леднев Г.Р.

**Полиморфизм нуклеотидных
последовательностей генов,
детерминирующих
вирулентность
энтомопатогенного гриба
*Beauveria bassiana***

Uspanov A.M., Tokarev Ju.S.,
Kazarcev I.A., Orazova S.B.,
Vasilyeva A.A.,
Smagulova Sh.B.,
Dujsembekov B.A.,
Sljamova N.D.,
Sagitov A.O., Lednev G.R.

**Polymorphism of nucleotide se-
quences of genes that determine
the virulence of entomopatho-
genic fungus *Beauveria bassiana***

Успанов А.М., Токарев Ю.С.,
Казарцев И.А., Оразова С.Б.,
Васильева А.А.,
Смагулова Ш.Б.,
Дуйсембеков Б.А.,
Слямова Н.Д.,
Сагитов А.О., Леднев Г.Р.

**Нуклеотидті полиморфизмнің
ген тізбегінің *Beauveria
bassiana* энтомопатогенді
саңырауқұлақтың
ұйтылығына әсері**

На основе анализа нуклеотидных последовательностей индуцибельных генов гриба *Beauveria bassiana*, участвующих в патогенезе микозов насекомых, были подобраны праймеры, использованные для генотипирования трёх близкородственных штаммов разного происхождения. Большинство последовательностей генов трёх штаммов имели гомологию на уровне 98-100%, однако сиквенс участка гена, кодирующего секретируемую липазу (Slip), оказался значительно более полиморфным (гомология 89-90%). Использование данного локуса в качестве биогеографического молекулярного маркера позволило четко дифференцировать штаммы, различающиеся по происхождению.

Ключевые слова: *Beauveria bassiana*, генетический полиморфизм, молекулярный маркер, секретируемая липаза.

It has been selected primers used for genotyping of three closely related *Beauveria bassiana* strains of different origin based on the analysis of nucleotide sequences of the inducible genes of the fungus that are involved in the pathogenesis of fungal infections of insects. Most of the sequences of genes of the three strains had homology at the level of 98-100%, but the phase sequence of the gene encoding the excreted lipase (Slip), were significantly more polymorphic (homology 89-90%). The use of this locus as a biogeographic molecular marker allowed to clearly differentiate strains of differing origin.

Key words: *Beauveria bassiana*, genetic polymorphism, molecular marker, excreted lipase

Бунақденелілер микозды патогенезіне қатысатын *B. Bassiana* саңырауқұлағының индуцибельді гендарының нуклеотидті жүйелілігін талдау негізінде шығу тегі әр түрлі туыстығы жақын үш штаммды генотиптеу үшін қолданылатын праймерлеріріктелді. Үш штаммның көпшілік гендерінің жүйелілігінің гомологиясы 98-100% деңгейінде болды, алайда, липазаны кодтайтын тең учаскесінің сиквенсі аса полиморфты болып шықты (гомология 89-90%). Бұл локусты биогеографиялық молекулалы маркер ретінде қолдану шығу тектері бойынша ажыратылатын штаммдарды нақты дифференциациялауға (саралауға) мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: *Beauveria bassiana*, генетикалық полиморфизм, молекулалық маркер, бөлініп шығарылатын липаза

¹Успанов А.М., ^{2*}Токарев Ю.С., ²Казарцев И.А.,
¹Оразова С.Б., ²Васильева А.А., ¹Смагулова Ш.Б.,
¹Дуйсембеков Б.А., ¹Слямова Н.Д., ¹Сагитов А.О.,
²Леднев Г.Р.

¹Казахский НИИ защиты и карантина растений,
Республика Казахстан, г. Алматы

²Всероссийский институт защиты растений,
Российская Федерация, г. Санкт-Петербург-Пушкин
*E-mail: jumacro@yahoo.com

**ПОЛИМОРФИЗМ
НУКЛЕОТИДНЫХ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬ-
НОСТЕЙ ГЕНОВ, ДЕ-
ТЕРМИНИРУЮЩИХ
ВИРУЛЕНТНОСТЬ
ЭНТОМОПАТОГЕН-
НОГО ГРИБА *BEAUVE-
RIA BASSIANA***

Введение

Одним из важнейших вопросов в патологии членистоногих является познание основных факторов, определяющих вирулентные свойства патогенов. В полной мере это относится и к энтомопатогенным грибам. С прикладной точки зрения раскрытие основных механизмов патогенеза и генов, за них отвечающих, с одной стороны обеспечивает возможность конструирования штаммов-продуцентов микроинсектицидов, сбалансированных по основным признакам, в конечном итоге определяющим эффективность препаратов [1], с другой стороны, решение этой задачи может обеспечить надежное маркирование перспективных природных штаммов-продуцентов.

В последнее время достигнут значительный прогресс в изучении молекулярных и биохимических детерминант вирулентности энтомопатогенных грибов [2]. Получены нуклеотидные последовательности геномов и транскриптомов некоторых энтомопатогенных анаморфных аскомицетов. В частности, изучены транскриптомные пулы гриба *Beauveria bassiana*, при развитии на разных тканях некоторых видов насекомых [3]. Сравнительный геномный анализ *B. bassiana* и *Metharidium guberstii* продемонстрировал, что существует относительная гомология между механизмами, обеспечивающими вирулентность этих грибов, но отдельные особенности молекулярных и биохимических процессов, а также клеточные структуры, вовлеченные в процесс заражения, иногда существенно различаются. Благодаря этим исследованиям найдены и описаны ферменты, вовлеченные в деградацию кутикулярного барьера (хитиназы, протеазы, липазы), секретируемые токсические метаболиты (щавелевая кислота, баверицин, ооспорин и др.), механизмы стрессового ответа (в контексте инфицирования), сигнальные и транскрипционные паттерны регуляции патогенеза [4]. Хорошо известно, что процесс заражения насекомых грибами представляет серию скоординированных процессов, включающих поиск и распознавание потенциальных хозяев, обусловленный, прежде всего химическим компонентам эпиму-

тикулы, разрушение прокутикулы, преодоление внешних и внутренних пассивных и активных защитных барьеров, потребление доступных питательных веществ, распространение с поверхности ассимилированного хозяина.

На начальной стадии заражения насекомого инфекционная гифа гриба, прорастающая из попавшей на кутикулу конидии, формирует специализированную инфекционную структуру (аппрессорий), позволяющую растущей гифе проникать через наружные покровы хозяина. Формирование аппрессориев энтомопатогенными грибами может стимулировать кутикулярная сигнальная система насекомых [5].

Значительная часть механизмов разрушения кутикулярных липидов энтомопатогенными грибами до сих пор не изучена, однако, геномные исследования позволяют выявить разнообразие секретируемых липаз и существование путей усвоения углеводов. У *V. bassiana* потребление углеводов происходит через β -окисление, специфический путь катаболизма жирных кислот, в который вовлечена система цитохрома P450, представленная, по крайней мере, восемью генами цитохрома P450 с потенциальной специфичностью к углеводам, а также три липазы и значительное число катализ [6].

Изучение экспрессии генов позволило предположить вовлеченность всех генов, продуцирующих цитохром P450, но в настоящее время удалось подтвердить активность и значение только одного из них – *VbCYP52X1* [7]. Генно-модифицированный штамм с выключенным геном *CYP52X1* обладал пониженной вирулентностью при размещении на кутикуле насекомого-хозяина, но при инъекции в гемоцель, когда кутикулярный барьер был пройден, организм развивался нормально. Этот эксперимент продемонстрировал, что данный фермент необходим для прохождения через покровы насекомого. Единичные мутации в других генах цитохрома не приводили к снижению вирулентности.

Как только инфекционная гифа *V. bassiana* проникает в гемоцель она претерпевает морфологические изменения, позволяющие ей производить одноклеточные бластоспоры. Активации иммунных реакций насекомых, таких как фенолоксидазная система, препятствуют токсические метаболиты гриба. Эта ситуация усугубляется неспособностью защитных систем хозяина распознавать инфекционные клетки [7]. В последнем случае, избегание фагоцитоза при иммунном ответе связано с приобретением энтомопатогенными грибами резистентности к почвенным

амебам. Это указывает на то, что различные природные адаптации в новых условиях могут приобретать новое значение и формировать новые свойства организма, так в рассмотренном примере, первоначально защитные механизмы в последствии переходят в механизмы патогенеза.

Мы предположили, что гены, связанные с вирулентностью энтомопатогенных грибов, обладают повышенной мутационной активностью в связи с лабильностью проявления соответствующих признаков, и могут быть использованы, в том числе, как биогеографические маркеры внутривидового генетического полиморфизма.

В рамках данного исследования нами была предпринята попытка поиска полиморфных молекулярных маркеров для генотипирования штаммов гриба *V. bassiana*, основанных на анализе геномных данных.

Материалы и методы

С целью поиска полиморфных молекулярных маркеров были использованы полученные ранее и находящиеся в публичном доступе библиотеки нуклеотидных последовательностей генов (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> (ADAN000000000), в том числе дифференциально экспрессирующихся на искусственных субстратах, моделирующих взаимодействие паразита с кутикулой и с гемоцелью насекомого-хозяина (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE32699>). Из этой библиотеки были выбраны генетические системы, идентифицированные на основании биоинформационного анализа как потенциальные факторы вирулентности, накопление мутационных изменений в которых наиболее вероятно при формировании гаплотипов, ассоциированных с разным уровнем вирулентности у близкородственных штаммов одной филогенетической линии. Последовательности выравнивали с помощью алгоритма ClustalW, это обеспечивало нахождение консервативных и полиморфных участков подходящих для конструирования праймеров с различным уровнем специфичности. Получаемые праймеры должны соответствовать определенным требованиям:

- 1) Длина праймера должна начинаться от 18 п.н и выше во избежание амплификации неспецифических фрагментов;
- 2) Температура плавления праймера не должна превышать температуру оптимума элонгации используемой полимеразы. Для оптимизации лабораторных работ принято решение конструиро-

вать праймеры с одинаковой температурой плавления – 60°C;

3) Нуклеотидная последовательность праймера должна обеспечивать невозможность образования его димеров как с самим собой, так и с обратным праймером;

4) Содержание G/C- оснований должно быть в интервале 40-60%;

5) Для обеспечения наилучшего отжига пять последних нуклеотидов на 3' – конце праймера должны содержать не менее 2 и не более 3 G или C.

Дополнительным требованием служило наличие интронов во фланкируемых праймерами участках нуклеотидных последовательностей для более тщательного контроля экстрактов РНК на наличие контаминации ДНК: после амплификации копии, образовавшиеся на ДНК матрице, будут длиннее из-за наличия интронов, которые во фрагментах, копирующих мРНК (кДНК) будут отсутствовать, в результате их удаления в процессе посттранскрипционной модификации РНК (сплайсинга мРНК).

Конструирование праймеров с заданными характеристиками осуществлялось с помощью программы Primer3. Для уточнения диапазона специфичности, а также оценки корректности полученных олигонуклеотидных последовательностей выполнена их проверка методом PCR *in silico* в программе PrimerBlast.

Для ПЦР с сконструированными праймерами использовали следующую программу амплификации: начальная денатурация – 95 °С 180 сек, денатурация – 95 °С 30 сек, отжиг – 54 °С 30 сек, элонгация – 72 °С 60 сек. (последние три этапа повторялись 30 раз), финальная элонгация – 72 °С 300 сек, далее терминация охлаждением до 12 °С. При выборе длительности элонгации руководствовались длиной амплифицируемого фрагмента из расчета 2000 н.о. за 60 сек.

Полученные продукты ПЦР подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле при 100 V в течение 40 мин, в качестве буфера использовали 0,5×TBE. Для окрашивания геля использовали бромистый этидий (0.5 мкг/мл). В качестве шаблона для измерения длины фрагмента использовали маркер Generuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). Визуализацию и документирование результатов электрофореза проводили с помощью ChemiDoc™ MP System (Bio-RAD), участки геля, содержащие специфические продукты, вырезали скальпелем и замораживали для последующей очистки.

Для очистки ампликонов использовали протокол, предполагающий расплавление агароз-

ного геля при 55°C в 300 мкл раствора, содержащего 3 M гуанидин изотиоцианата, 20 mM ЭДТА, 10 mM Трис-Cl, 40мг/мл Triton X-100. Дальнейшие процедуры включали инкубацию расплавленного геля с аликвотой (20-40 мкл) оксида кремния (40 мг/мл Silica (Sigma S5631) при комнатной температуре в течение 5 мин; центрифугирование 1 мин при 1000 g для осаждения оксида кремния, на котором сорбирована целевая ДНК, и последовательную промывку осадка раствором New wash (25% этанола, 25% изопропанола, 100 mM хлорида натрия, 10мM Трис-Cl, рН=8,0) и/или этанолом. Количество отмывок варьировало от 1 до 5. На заключительном этапе проводили элюцию, для чего добавляли к слегка подсушенному осадку оксида кремния 13-15 мкл сверхочищенной воды на 5 мин, центрифугировали смесь и надосадочную жидкость, содержащую целевую ДНК, переносили в новую пробирку. Один микролитр полученного раствора ДНК использовали для определения концентрации методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле с маркером молекулярного веса Massruler (Thermo Scientific).

Секвенирующую ПЦР для получения одноцепочечных фрагментов ДНК проводили по классическому методу обрыва цепи с готовой реакционной смесью BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и праймером M13(-46)f или M13(-46)r. Очистку продуктов осуществляли с помощью BigDye Xterminator purification kit (Applied Biosystems). Определение последовательности нуклеотидов проводили на генетическом анализаторе ABI PRIZM 3500 в соответствии с указаниями производителя (Applied Biosystems). Первичную оценку качества (валидацию) и редактирование полученных последовательностей проводили в программах Sequencing Analysis Software v5.3 и Vector NTI Advance v11.5. Полученные сиквенсы сравнивали с референсными последовательностями, представленными в GenBank на сервере NCBI. Чтение и коррекцию нуклеотидных последовательностей осуществляли в бесплатном приложении BioEdit. Сайты отжига специфичных праймеров выбирали вручную, пользуясь файлами элайнмента в редакторе BioEdit.

Результаты и обсуждение

К участкам генов, кодирующих токсичные полипептидные метаболиты (зета-токсин, дельта-токсин), гидролитические (хитиназы, фосфолипазы и липазы), протеолитические (трипсин- и суб-

тилизин-подобные протеазы, сериновые протеазы, ромбоид-протеазы), регуляторные (протеин-киназа) и окислительные (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, цитохром P450 монооксигеназа), были подобраны праймеры для амплификации продуктов размером от 200 до 700 н.о. (таблица 1).

Большая часть праймеров дала реакцию с геномной ДНК штаммов *B. bassiana* ВВК-1, ВВКГ-06, ВВЛ-03, а также К84, хотя с данным штаммом среагировали не все праймеры. Праймеры к генам зета-токсина и ромбоид-протеазы не дали реакцию ни с одним из указанных штаммов.

Таблица 1 – Праймеры, подобранные к участкам, фланкирующим участки генов индуцибельных белков, участвующих в паразито-хозяйственных отношениях *Beauveria* и насекомых

Ген, праймер	Последовательность (5'→3')	Длина	Tm	GC%	Размер продукта
Delta endotoxin central region subgroup 1					
Dtox-f2	GYCGMAAGCAGGTCAAGCC	19	59.13	57.89	590
Dtox-r2	GTAMATGCTRGTTCAAAGCGTA	21	58.66	47.62	
Zeta toxin					
ZT-f154	GACACGTACAAGACGTACCAC	21	58.69	52.38	605
ZT-r764	ACCTGCTCCAGCTGCTCC	18	61.72	66.67	
ZT-f155	GACACGTACAAGACGTACCACC	22	60.92	54.55	272
ZT-r428	AGGATGCCGAGACGCGAC	18	62.15	66.67	
Rhomboid family protein by locus tags BBA_01434 and CCM_05958					
Rho-f	TGGCCATGTTACGACCAT	19	57.03	47.37	905
Rho-r	GCGGTGCTCCCAAAGTA	18	57.61	55.56	
Chitosanase					
Chi_bb-f	ACTGCGACGGCATCCAGC	18	63.13	66.67	233
Chi_bb-r	GACGGCCATGACGGACAGC	19	63.63	68.42	
calmodulin-dependent protein kinase type I					
Cd_bb_425-f	CATGGTGCAGAAACGAGATTGCG	22	63.20	54.55	553
Cd_bb_977-r	CTCGACGGGCGCAAAGGC	18	64.41	72.22	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase					
GPD-bb-f	CCGTCGAGCACAACGACA	18	60.35	61.11	556
GPD-bb-r	ATGATGTTCTGAGCAGCACCA	21	60.00	47.62	
Chymotrypsin-like proteinase_5A_precursor					
CTryP5A_bb-f	TACGGCTGGGGMTACACC	18	61.08	66.67	301
CTryP5A_bb-r	GGWACGAGCTGACCTTGGTG	20	60.95	60.00	
Trypsin-like protease					
TryP_bb-f	TGCGGAGGCAGTCTGCTA	18	60.68	61.11	419-548
TryP_bb-r	AAAAGAGGACCACCGCTATC	20	57.31	50.00	
Beauveria bassiana secretory lipase by locus tags BBA_07934 and BBA_01783					
Slip-f	GTGGAAGCTCGCCGAGAG	18	60.20	66.67	450
Slip-r	GCAGATGSACCTCGTTGC	18	58.51	61.11	
Patatin-like phospholipase by locus tags BBA_01365 and CCM_04741					
PIP28-f	ACTCTGGCGGGCAGTCTC	18	61.39	66.67	343-385
PIP1-r	CTGGCTCCTGCGTTGAG	18	58.43	61.11	
Beauveria bassiana cytochrome P450 monooxygenase CYP52X1 gene					

Ген, праймер	Последовательность (5'→3')	Длина	Tm	GC%	Размер продукта
P52X1SF	GAAGAATGTGCCCAACTGGATG	22	59.83	50.00	290
P52X1SR	CTTGGCTGCGAACAAACTGC	20	60.94	55.00	
Subtilisin-like serine protease					
Sulp1524-f	GTGGGAGCTCTTTGTCAAGC	20	59.12	55.00	405
Sulp3r	ACTGACTCCTTGCCCGTG	18	59.26	61.11	

Секвенирование полученных ампликонов показало, что некоторые праймеры (например, к гену дельта-токсина) амплифицировали «гетерозиготную» матрицу ДНК, в результате чего распознавание пиков не представлялось возможным. Другие гены содержали гомополимерные участки большой протяженности, что приводило к сбою реакции полимеризации и возникновению «гетерозиготных» пиков во второй половине сиквенса (Рисунок 1). Эта проблема была решена путём постановки реакции секвенирования с обратным праймером. Объединение данных о нуклеотидных последовательностях из хроматограмм, прочитанных с обеих сторон гомополимерного участка, позволило получить искомые сиквенсы для сравнения. Секвенирование с остальными праймерами не было проблематичным и позволило сразу получить всю искомую информацию.

Сиквенсы большей части генов, полученных для трёх близкородственных штаммов различного происхождения (ВВК-1, ВВКJ-06 и ВВЛ-03), продемонстрировали сходство на уровне 98-100%, и только один ген, кодирующий сек-

ретируемую липазу, показал более высокий уровень дивергенции (сходство на 89-90%). Нуклеотидные последовательности данного гена содержали значительное количество одиночных нуклеотидных замен (SNP), предварительный анализ распределения которых на примере трёх штаммов позволил предположить, что данный локус весьма перспективен с точки зрения подбора сайтов отжига специфичных праймеров. На основании этих данных была сформирована подвыборка штаммов, принадлежащих разным гаплотипам *B. bassiana* различающимся по межгенному локусу *Bloc*, включающая штаммы одинакового происхождения (из одного локального эпизоотического очага). Последовательности гена *Slip* были уникальны для всех штаммов разного происхождения, и только для двух групп штаммов из имаго жуков-долгоносиков, собранных в урочище реки Чапайки Заилийского Алатау (BCu2-07, BCu14-07, BCu21-07) и из гусениц кукурузного мотылька, собранных на одном кукурузном поле в Краснодарском крае (Bos-14-13, Bos-16-13) гаплотипы *Slip* были идентичны внутри каждой группы (Рисунок 2).

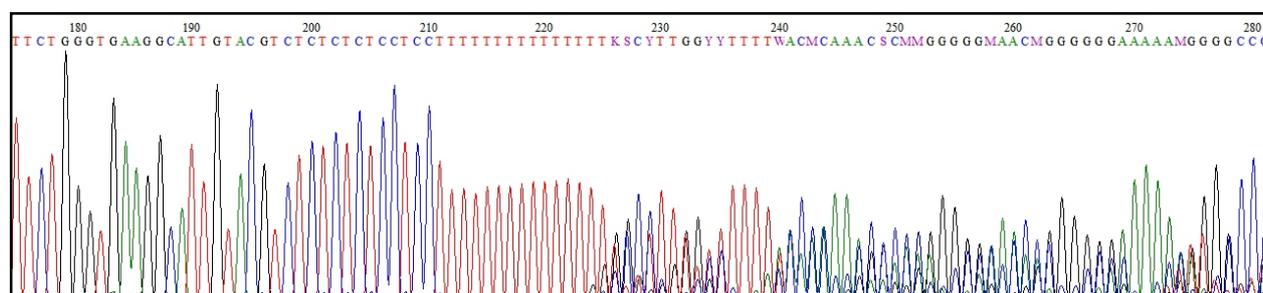


Рисунок 1 – Хроматограмма секвенирования по Сэнгеру ампликона, полученного с праймерами CTryP5A_bb-f:CTryP5A_bb-r.

Начиная с 220 нуклеотида наблюдается высокий уровень гетерозиготности, не позволяющий однозначно распознать большинство пиков.

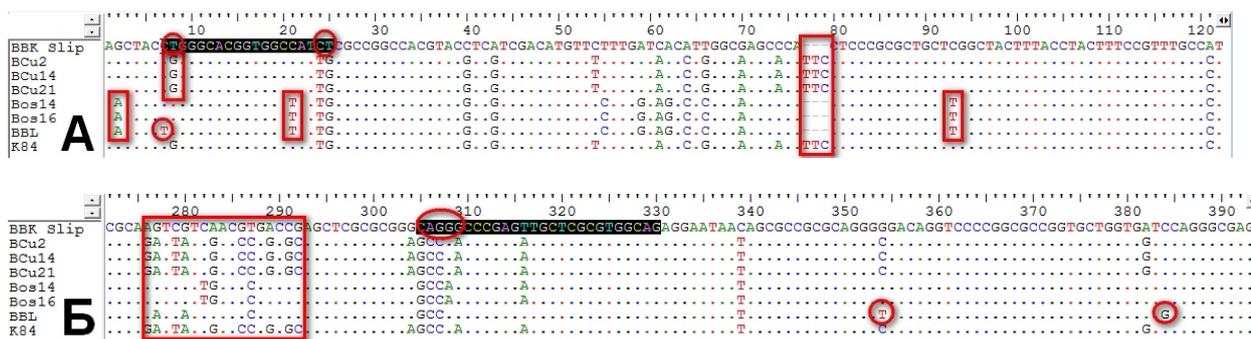


Рисунок 2 – Участки элайнмента сиквенса фрагмента гена секретируемой липазы Slip, полученных для штаммов *B. bassiana*.

Прямоугольное выделение – позиции, позволяющие дифференцировать группы штаммов, овальное – индивидуальные штаммы. Одинаковые литеры в названиях штаммов указывают на их происхождение из одного очага эпизоотии. Черным фоном выделены сайты отжига для праймеров BVK_slip-1F (А) и BVK_Slip-1R (Б), специфических для штамма BVK-1.

Таким образом, нами достигнуто максимально возможная на данном методологическом уровне степень разрешения внутривидового генетического полиморфизма гриба *B. bassiana*. Для наиболее перспективного и широко используемого в практике защиты растений штамма BVK-1 подобраны праймеры BVK_Slip-1F и BVK_Slip-1R (Рисунок 2). Именно locus Slip

можно рекомендовать в качестве диагностического маркера с наибольшей разрешающей способностью, позволяющего идентифицировать штаммы по происхождению вплоть до отдельных локальных точек.

Исследования поддержаны грантами МОН РК №055 и РФФИ № 15-34-20567-мол_а_вед.

Литература

- 1 Fan Y., Zhang S., Kruer N., Keyhani N.O. (2011) High-throughput insertion mutagenesis and functional screening in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol* 106:274–279
- 2 Gibson D.M., Donzelli B.G., Krasnoff S.B., Keyhani N.O. (2014) Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. *Nat Prod Rep* 31:1287–1305
- 3 Ortiz-Urquiza A., Keyhani N.O. (2013) Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4:357–374
- 4 Ortiz-Urquiza A., Luo Zh., Keyhani N. O. (2015) Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(3):1057-68
- 5 Pedrini N., Ortiz-Urquiza A., Huarte-Bonnet C., Zhang S., Keyhani N.O. (2013) Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Front Microbiol* 4:24
- 6 Xiao G., Ying SH., Zheng P., Wang Z.L., Zhang S., Xie X.Q., Shang Y., St. Leger R.J., Zhao G.P., Wang C., Feng M.G. (2012) Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Sci Rep* 2:483
- 7 Zhang S., Widemann E., Bernard G., Lesot A., Pinot F., Pedrini N., Keyhani N.O. (2012) CYP52X1, representing new cytochrome P450 subfamily, displays fatty acid hydroxylase activity and contributes to virulence and growth on insect cuticular substrates in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J Biol Chem* 287:13477–13486.