

УДК 57.063.8

А.В. МОКЕЕВА^{1,*}, С.Ф. ОРЕШКОВА¹, Г.В. КАЛМЫКОВА², Л.И. БУРЦЕВА², И.С. АНДРЕЕВА¹, В.Е. РЕПИН¹

¹ ФГУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Новосибирская область, Кольцово, 630559

² Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, 630091

e-mail: mokeeva@vector.nsc.ru

Молекулярное типирование штаммов бактерии *Bacillus thuringiensis* с помощью RAPD-анализа

В работе проведена классификация 54 штаммов *Bacillus thuringiensis* с помощью RAPD-анализа. По результатам анализа построено филогенетическое дерево, и штаммы *B. thuringiensis* разделены нами на 28 геномных типа. Как правило, все штаммы *B. thuringiensis* в пределах подвида имели идентичные RAPD-профили, а большинство штаммов, принадлежащих к разным подвидам, не показали сходства картин фингерпринтинга. Установлено, что штаммы внутри каждого из подвидов *kurstaki* и *galleria* генетически близкородственны. Сделано предположение, что для этих подвидов потеря/изменение кристаллообразования не связано с существенными изменениями генома бактерии. В отличие от упомянутых подвидов *israelensis*, *yunnanensis* и *sotto* генетически гетерогенны. Штаммы 157 и 2e1г *B. thuringiensis* ssp. *israelensis*, продуцирующие мелкие кристаллы, характеризуются наличием генов *cry* 7,8. Штаммы *Bt* ssp. *israelensis* B-992, B-993, 12JPS, 749, 164, 2жд8, BTS393, формирующие крупные кристаллы, на дендрограмме разделены на два типа в соответствии с вероятными различиями в строении их геномов, выявленными в RAPD.

Ключевые слова: дендрограмма, *Bacillus thuringiensis*, RAPD-анализ.

Bacillus thuringiensis (*Bt*) — грамположительная бактерия, способная синтезировать кристаллические белки, которые содержатся в клетке в виде параспоральных телец, токсичных для насекомых и других беспозвоночных [1, 2]. Это свойство позволило использовать данные бактерии как альтернативу химическим инсектицидам для борьбы с вредителями сельского и лесного хозяйства. Коммерческий интерес к биологическому контролю над насекомыми усилил поиск новых изолятов *Bt* с различной токсичностью продуцируемых белков [3].

Наиболее широко применяемый способ подвидовой классификации *Bt* основан на Н-серотипировании, иммунологической реакции с бактериальными жгутиковыми антигенами, а также на ре-

зультатах биохимических исследований. На сегодняшний день штаммы *Bt* разделены на 84 подвида [4]. Однако многие штаммы внутри подвида различаются по биохимическим, генетическим свойствам и токсическому действию на разные виды насекомых. Так, если подвид *Bt* ssp. *israelensis* включает штаммы с практически одинаковыми токсическими свойствами (поражает один вид насекомых) [5], то штаммы *Bt* ssp. *morrisoni* токсичны одновременно для комаров [6], жуков [7] и бабочек [8]. С другой стороны, иногда штаммы разных подвидов могут иметь биохимическое, генетическое и токсикологическое сходство. Помимо этого существующая схема внутривидовой идентификации не дает никакой информации о генетическом родстве штаммов внутри подвида и между подвидами.

Список сокращений: ПЦР — полимеразная цепная реакция; среда LB — среда Льюина—Бертани; RAPD — randomly amplified polymorphic DNA.

* Автор для переписки.

Таким образом, необходимо специфическое типирование *Bt* для того, чтобы выявлять распространение штаммов в окружающей среде и идентифицировать новые штаммы.

В последнее время при изучении микроорганизмов используют методы генотипирования, или геномной дактилоскопии, которые основаны на интегральных способах характеристики генома и не требуют определения его полной молекулярной организации. Они позволяют находить различия между близкородственными микроорганизмами, не выявляемые другими методами.

Технология, основанная на полимеразной цепной реакции (ПЦР), а именно, метод амплификации полиморфной ДНК с применением произвольного праймера (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD) [9], — широко используемый современный подход к генотипированию бактерий [10, 11]. В частности, он применялся для типирования патогенных для насекомых штаммов *B. sphaericus* [12], а также для дифференциации штаммов *Bt* [13—17].

В нашей работе мы продолжили начатое ранее исследование [18] по установлению с помощью метода RAPD-финггерпринта генетического родства штаммов *Bt* как внутри, так и между подвидами.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы. Объектами исследования были типовые штаммы *Bt* 23 подвидов, акристаллоформные варианты *Bt* ssp. *thuringiensis*, *kurstaki*, *galleriae*, *israelensis*, *yunnanensis* и морфологические варианты *Bt* ssp. *kurstaki*, *galleriae*, *israelensis* (таблица). Все исследованные штаммы *Bt* хранятся в лаборатории патологии насекомых Института систематики и экологии животных СО РАН и депонированы в коллекции ФГУН ГНЦ ВБ “Вектор”. Все культуры *Bt* были идентифицированы нами по общепринятой схеме внутривидовой дифференциации [8]. Их идентификацию подтверждали реакцией жгутиковой агглютинации с диагностическими сыворотками. Способность штаммов к кристаллообразованию оценивали с помощью световой микроскопии окрашенных карболовым эозином шестисуточных культур.

Выделение ДНК. Штаммы культивировали в жидкой среде LB в течение ночи. Геномную ДНК *Bt* выделяли по методу, предложенному ранее [19], с некоторыми модификациями. Ночную культуру исследуемых бактерий осаждали центрифугированием, клетки суспендировали в TES-буфере (30 мМ трис-НСl, 5 мМ ЭДТА, 50 мМ

NaCl, pH 8,0) и повторно центрифугировали. К полученному осадку добавляли 0,5 мл лизирующего буфера (25% сахарозы, 25 мМ трис-НСl, pH 8,0, 10 мМ ЭДТА, 4 мг/мл лизоцима), ресуспендировали и помещали в термостат на 1 ч при 37°. После этого добавляли протеиназу К и оставляли смесь на 30 мин при 37°. Дальнейшее выделение и очистку ДНК проводили путем экстракции фенолом, хлороформом и осаждения этанолом, как описано в [20].

ПЦР-анализ. Для RAPD-анализа штаммов *Bt* был использован праймер 5'-CCGAGTCCA [21]. Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 5 нг геномной ДНК в реакционном буфере (50 мМ трис-НСl, pH 8,8, 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgCl₂, 0,05 мМ твин-20), 0,2 мМ дезоксинуклеотидтрифосфаты, 0,5 мкМ праймер и 0,5 Е *Taq*-ДНК-полимеразы.

Амплификацию осуществляли в следующих условиях: предварительная денатурация при 72° в течение 1 с, далее 30 циклов: денатурация — 1 с при 96°, отжиг праймеров — 10 с при 30°, элонгация — 10 с при 72°, время перехода 0,3°С/с. Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 4%-ном полиакриламидном геле.

Для анализа полученных данных был использован пакет программ STATISTICA 5.0®, Microsoft Co. [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Штаммы (см. таблицу) анализировали с использованием праймера 5'-CCGAGTCCA. Ранее этот праймер уже применялся для типирования штаммов *Bt* [13].

При работе с различными подвидами *Bt* с использованием этого праймера был получен наиболее разнообразный спектр RAPD-профилей (рис. 1). Размер анализируемых фрагментов составил от 400 до 3000 п.н. Каждый из подвидов имел свой определенный спектр амплифицированных RAPD-продуктов, отличающийся от других количеством фрагментов, их размером и интенсивностью соответствующих полос (см. рис. 1).

Статистический анализ для количественной оценки полиморфизма и определения уровня дивергенции между исследуемыми штаммами включал составление бинарной матрицы, в которой отмечалось “присутствие” (1) или “отсутствие” (0) фрагментов с определенной молекулярной массой на электрофореграмме. На основании суммарной матрицы RAPD-спектров с помощью программного пакета STATISTICA 5.0® были определены генетические дистанции между исследуемыми штаммами.

Морфология кристаллов, наличие *cry*-генов и серотипирование штаммов *B. thuringiensis*, использованных в работе

Серотип	Подвид	Штамм	Морфология кристаллов	Гены <i>cry</i>
1	2	3	4	5
H1	<i>thuringiensis</i>	221 213	Вытянутые крупные бипирамиды Кристаллы отсутствуют	1 1, 9
H2	<i>finitimus</i>	218 106	Мелкие бипирамиды, сцепленные со спорой Мелкие бипирамиды	H/o* H/o
H3abc	<i>kurstaki</i>	273 1BX3 B-994 B-995	Правильные ромбовидные Кристаллы отсутствуют Правильные ромбы со вкладышами Правильные ромбы со вкладышами	1 1, 2, 9 1, 2 1, 2
H3ad	<i>sumiyoshiensis</i>	84-F-51-46	Мелкие и средние бесформенные	9
H3ade	<i>fukuokaensis</i>	84-I-1-13	Мелкие бесформенные	H/o
H4ab	<i>sotto</i>	56 616/д 57a	Ромбовидные разных размеров Очень мелкие бипирамиды Очень мелкие бипирамиды	1, 9 7, 8 7, 8
H5ab	<i>galleriae</i>	69-6 B-996 B-997 P2 P1 B1 B-1006 280	Кристалл-“луковка” Правильные ромбы То-же —”— Полиморфные кристаллы разных форм Ромбовидные кристаллы Мелкие бесформенные Кристаллы отсутствуют	1, 9 1, 9 1, 2, 9 1, 2, 9 1, 2, 9 1, 9 1, 2, 9 1, 9
H6	<i>entomocidus</i>	201 206	Мелкие и средние ромбовидные Ромбовидные величиной со спору	1, 2, 9 1, 2, 9
H7	<i>aizawai</i>	212	Ромбовидные средние и много мелких	1, 2, 7, 8, 9
H8ab	<i>morrisoni</i>	209 PG-14	Крупные бипирамидальные Мелкие и средние бесформенные	1, 2, 9 1, 4, 7, 8, 9, 11
H9	<i>tolworthi</i>	211	Крупные ромбовидные	1, 2
H10	<i>darmstadiensis</i>	73-E-10-2 73-E-10-16	Мелкие бесформенные Мелкие бесформенные	1, 2, 4, 9 1, 2, 4, 9
H13	<i>pakistani</i>	1124	Мелкие полиморфные	H/o
H14	<i>israelensis</i>	1125 157 2e1г B-992 B-993 12JPS 749 164 2жд8 BTS393	Бесформенные (в небольшом количестве) Мелкие ромбы Мелкие ромбы Крупные бесформенные То же —”— —”— —”— —”— —”—	H/o 7, 8 7, 8 4, 11 4, 11 4, 11 4, 11 4, 11 4, 11 4, 11

Окончание таблицы

1	2	3	4	5
H15	<i>dakota</i>	1199 944	Мелкие ромбы То же	7, 8 7, 8
H17	<i>tohokuensis</i>	945	—”—	H/o
H18	<i>kumamotoensis</i>	1202 946	—”— —”—	7, 8 7, 8
H20ab	<i>yunnanensis</i>	1204 107	Кристаллы отсутствуют Огромные ромбовидные	1, 2 1
H24ac	<i>novosibirsk</i>	19-97	Квадраты-рамки	9
H26	<i>silo</i>	9413	Мелкие ромбовидные, сцепленные со спорой	H/o
H29	<i>amagiensis</i>	9416 84-F-58-35	Крупные ромбовидные-рамки Крупные ромбовидные-рамки	H/o H/o
H31	<i>toguchini</i>	B-973 9417	Ромбовидные величиной со спору и овальные Ромбовидные величиной со спору и овальные	H/o H/o
H33	<i>leesis</i>	9419	Средние и мелкие бесформенные	H/o

* Гены *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry7*, 8, *cry9* и *cry11a* не обнаружены.

двумя образцами. Для построения дендрограммы, демонстрирующей филогенетические отношения между изученными штаммами по результатам RAPD-анализа, применили метод невзвешен-

ного парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA), используя программу STATISTICA 5.0®.

Типирование подвидов *B. thuringiensis* с помощью RAPD-ПЦР-анализа

Данные по филогенетическому анализу исследованных штаммов представлены в виде дендрограммы (рис. 2). Все исследованные нами штаммы *Bt* были распределены на 28 RAPD-типов на основании дендрограммы при 90%-ном подобии.

Результаты, полученные нами при анализе дендрограммы (см. рис. 2), согласуются с литературными данными [13]. Для других штаммов *Bt* была построена дендрограмма и взаиморасположение некоторых подвидов соответствует их положению на филогенетическом дереве и согласуется с нашими данными.

В нашей работе широко представлены *Bt ssp. galleria*, и *ssp. kurstaki* (см. таблицу). По результатам RAPD-анализа генетически гомогенными были подвиды *Bt ssp. galleria*, *Bt ssp. kurstaki* (рис. 3), т.е. все штаммы внутри подвидов показывали одинаковые или близкие RAPD-профили, несмотря на различия штаммов по наличию *cry* генов.

Ранее [18] нами было показано, что штаммы *Bt ssp. galleria* 69-6, B-996, B1, 280 имеют гены

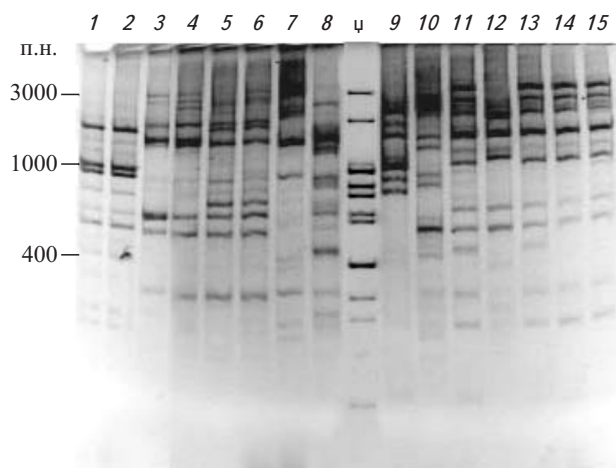


Рис. 1. RAPD-профили различных штаммов *B. thuringiensis*: М — маркер молекулярной массы (100 п.н.+2 т.п.н.+ + 3 т.п.н., “СибЭнзим”, Новосибирск); 1 — *Bt ssp. finitimus* 218; 2 — *Bt ssp. finitimus* 106; 3 — *Bt ssp. tohokuensis* 945; 4 — *Bt ssp. silo* 9413; 5 — *Bt ssp. thuringiensis* 221; 6 — *Bt ssp. thuringiensis* 213; 7 — *Bt ssp. sotto* 56; 8 — *Bt ssp. novosibirsk* 19-97; 9 — *Bt ssp. toguchini* B-973; 10 — *Bt ssp. amagiensis* 84-F-58-35; 11 — *Bt ssp. yunnanensis* 1204; 12 — *Bt ssp. yunnanensis* 107; 13 — *Bt ssp. kurstaki* B-995; 14 — *Bt ssp. kurstaki* 1BX3; 15 — *Bt ssp. kurstaki* 273

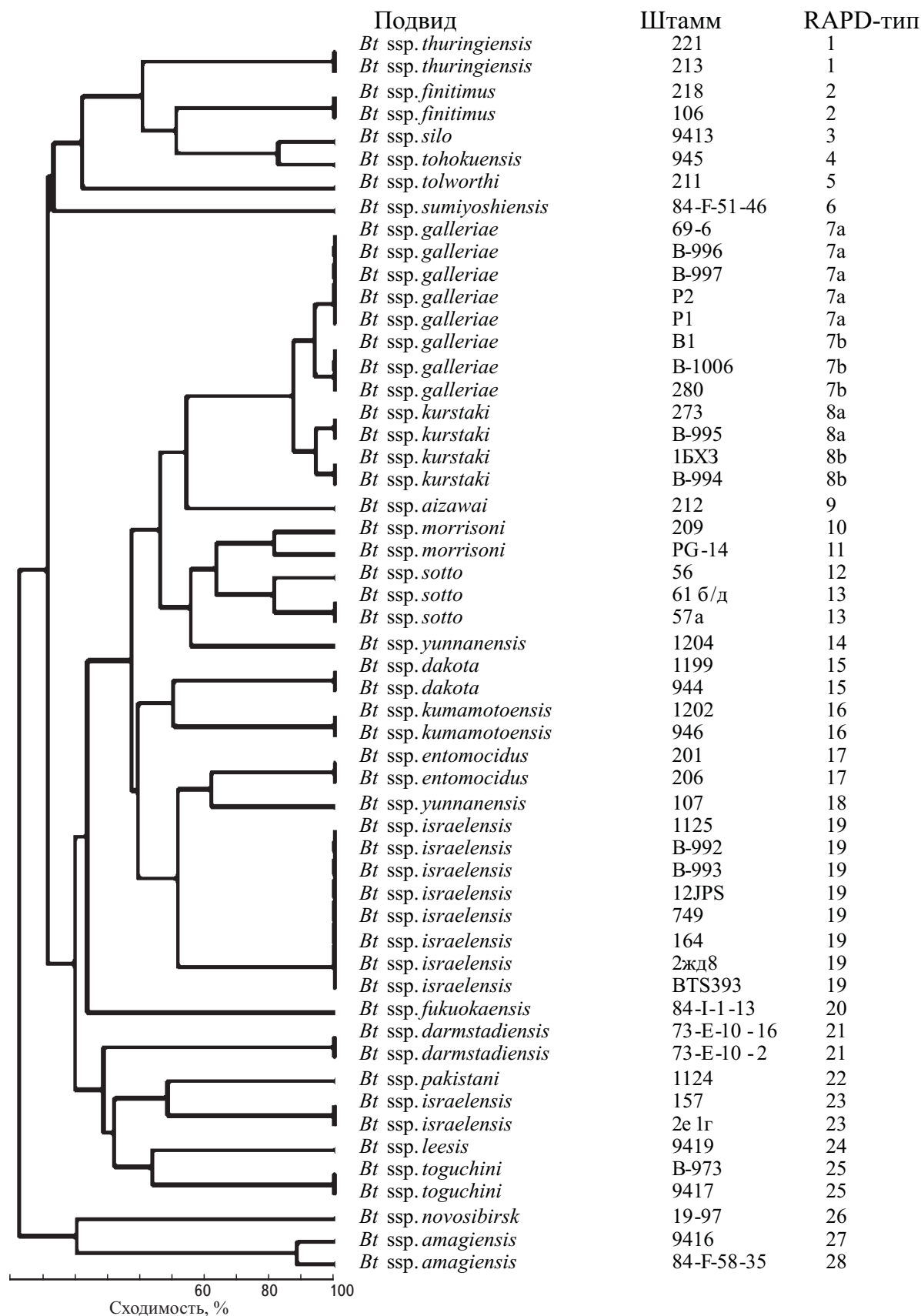


Рис. 2. Дендрограмма штаммов *B. thuringiensis* по результатам RAPD-ПЦР-анализа

cry 1 и *cry 9*. У остальных штаммов из этого подвида В-997, P1, P2, В-1006 обнаружен еще и ген *cry 2*. Штаммы первой и второй групп различались и по продукции кристаллов токсина (см. таблицу). Однако при генотипировании с произвольным праймером штаммы с крупными кристаллами (В-996, В-997, P2) и с мелкими кристаллами (В-1006), а также акристаллический вариант 280 имели сходные RAPD-профили.

Аналогичные результаты были получены и для штаммов внутри подвида *kurstaki*. Несмотря на различия в кристаллообразовании и в распределении генов у штаммов *Bt ssp. kurstaki*, они имели сходные фингерпринты (см. рис. 3). Вследствие этого можно предположить, что для *Bt ssp. galleria* и *ssp. kurstaki* потеря/изменение признака кристаллообразования не является следствием существенных изменений генома бактерии.

Bt ssp. israelensis был представлен 10 штаммами, которые различались по морфологии синтезируемых кристаллов. Штаммы *Bt ssp. israelensis* 157, 2e1г продуцировали кристаллы в форме мелких ромбов, а штамм 1125 являлся спорным акристаллическим вариантом. Остальные штаммы *Bt ssp. israelensis* характеризовались кристаллами в форме крупных глыбок, классическими для данного подвида (см. таблицу). При определении генов эндотоксинов ранее нами было показано [18], что практически все штаммы в этом подвиде содержат москитоцидные гены *cry 4* и *cry 11* за исключением штаммов *Bt ssp. israelensis* 157, 2e1г, которые характеризуются наличием генов *cry 7*, 8, и штамма *Bt ssp. israelensis* 1125, у которого исследуемые гены не обнаружены (см. таблицу).

Согласно RAPD-анализу (рис. 4) и результатам, представленным в дендрограмме (см. рис. 2), видно, что штаммы *Bt ssp. israelensis* разделились на две группы (2 RAPD-типа). Одну группу составляли штаммы *Bt ssp. israelensis* 157, 2e1г с мелкими ромбическими кристаллами, другую — штаммы с крупными бесформенными округлыми параспоральными включениями и акристаллофорный штамм *Bt ssp. israelensis* 1125. Совершенно очевидно, что в данном случае присутствуют существенные различия в геноме, возможно, связанные с приобретением штаммами *Bt ssp. israelensis* 157, 2e1г генов *cry 7*, 8.

Остальные подвиды (кроме *galleria*, *kurstaki* и *israelensis*) *Bt* были представлены только двумя—тремя штаммами каждый.

Различия RAPD-профилей отмечали внутри подвидов *Bt ssp. yunnanensis*, *morrisoni* и *atagiensis*, однако только у штаммов подвида *Bt*

ssp. yunnanensis эти различия были настолько велики, что эти штаммы попали в разные RAPD-типы на филогенетическом дереве. Два штамма *Bt ssp. yunnanensis* сильно различались по свойствам: штамм 1204 является акристаллическим вариантом, а штамм 107 продуцирует необычно крупные ромбовидные кристаллы.

Было показано [18], что профили штаммов *Bt ssp. sotto* 616/д и 57а оказались идентичными. Штамм 56 *Bt ssp. sotto* этого же подвида отличался

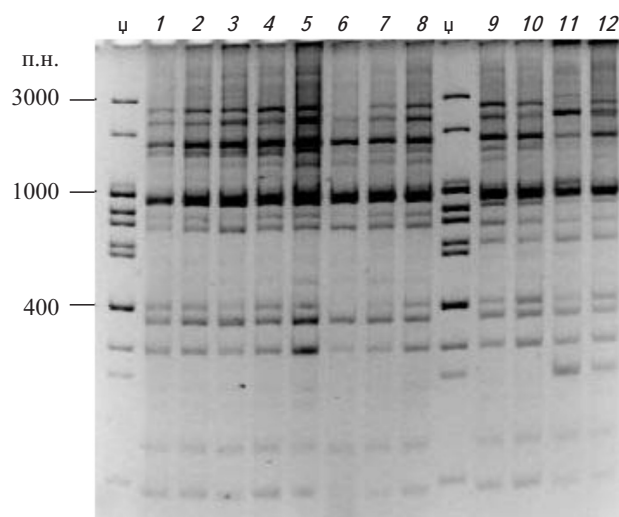


Рис. 3. RAPD-профили штаммов *B. thuringiensis* подвида *galleria* и *kurstaki*: М — маркер молекулярной массы (100 п.н.+2 т.п.н.+3 т.п.н., "СибЭнзим"); 1 — *Bt ssp. galleria* 69-6; 2 — *Bt ssp. galleria* В-996; 3 — *Bt ssp. galleria* В-997; 4 — *Bt ssp. galleria* P2; 5 — *Bt ssp. galleria* P1; 6 — *Bt ssp. galleria* B1; 7 — *Bt ssp. galleria* В-1006; 8 — *Bt ssp. galleria* 280; 9 — *Bt ssp. kurstaki* 273; 10 — *Bt ssp. kurstaki* 1БХ3; 11 — *Bt ssp. kurstaki* В-994; 12 — *Bt ssp. kurstaki* В-995

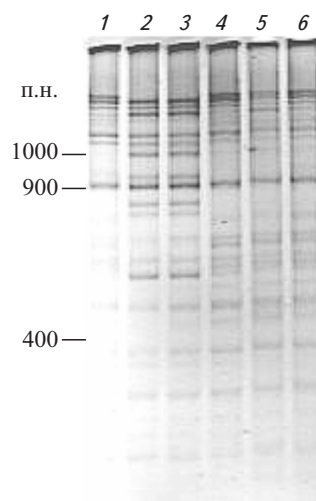


Рис. 4. RAPD-профили штаммов *B. thuringiensis* подвида *israelensis*: 1 — *Bt ssp. israelensis* 1125; 2 — *Bt ssp. israelensis* 157; 3 — *Bt ssp. israelensis* 2e1г; 4 — *Bt ssp. israelensis* 749; 5 — *Bt ssp. israelensis* 164; 6 — *Bt ssp. israelensis* В-992

от остальных членов подвида по картине RAPD-анализа. Штаммы различаются и по спектру *cry* генов, так, у *Bt* ssp. *sotto* 616/д и 57а были обнаружены гены *cry* 7, 8, у *Bt* ssp. *sotto* 56 этих генов нет, но присутствуют гены *cry* 1, 9 [18].

По два штамма, относящихся к подвиду *Bt* ssp. *dakota*, *darmstadiensis*, *entomocidus*, *finitimus*, *thuringiensis*, *toguchini*, *kumamotoensis*, были проанализированы для выявления филогенетического родства. Эти штаммы внутри подвида показали высокую гомогенность в RAPD-анализе.

Необходимо отметить, что штаммы некоторых подвидов *Bt* были идентичны по RAPD-профилям или близкородственны штаммам, принадлежащим к другим подвидам. Например, штаммы *Bt* ssp. *silo* 9413 и *Bt* ssp. *tohokuensis* 945 имели сходные RAPD-профили, как показано на рис. 1. *Bt* ssp. *galleria* и *Bt* ssp. *kurstaki* отличались друг от друга по положению только одной полосы. Можно предположить, что в обоих случаях указанные штаммы близкородственны друг другу. Однако следует учитывать, что полосы в сходных позициях могут представлять различные амплифицированные последовательности, и это сходство, возможно, не отражает филогенетические взаимоотношения данных подвидов (вероятно, в этом случае требуются дополнительные исследования с другими праймерами).

Таким образом, в результате типирования 54 штаммов *Bt*, представляющих 23 подвида, методом RAPD-фингерпринта штаммы *Bt* были распределены нами по 28 RAPD-типам.

По результатам филогенетического анализа наиболее гомогенными являются подвиды *Bt galleria* и *kurstaki*. Сделано предположение, что для этих подвидов потеря/изменение кристаллообразования не связано с существенной модификацией генома бактерии.

В то же время, штаммы подвида *israelensis* 157, 2e1г, характеризующиеся наличием генов *cry* 7, 8, и мелких кристаллов, и штаммы того же подвида с крупными кристаллами оказались на дендрограмме разделены на два RAPD-типа, что, вероятно, отражает существенные различия в строении их геномов.

Результаты проведенных исследований подтвердили, что данная методология позволяет проводить идентификацию *Bt* не только на уровне подвидов, но и внутри них. Как правило, все штаммы *Bt* в пределах подвида имели идентичные RAPD-профили, и большинство штаммов, принадлежащих к разным подвидам, не показали идентичных картин фингерпринта. Полученные RAPD-

профили могут быть основой для создания геномных паспортов исследованных штаммов *Bt*.

Получено 25.03.08

ЛИТЕРАТУРА

1. Aronson, A.I., Shai, Y. // FEMS Microbiol. Lett. — 2001. — V. 195. — P. 1—8.
2. Schnepf, E., Crickmore, N., van Rie, J., et al. // Microbiol. Molec. Biol. Rev. — 1998. — V. 62. — P. 775—806.
3. Feitelson, J.S., Payne, J., Kim, L. // Biotechnology. — 1992. — V. 10. — P. 271—275.
4. Reyes-Ramirez, A., Ibarra, J.E. // Analysis Appl. Environ. Microbiol. — 2005. — V. 71. — N. 3. — P. 1346—1355.
5. Ankarloo, J., Caugant, D., Hansen, B.M., et al. // Curr. Microbiol. — 2000. — V. 40. — P. 51—56.
6. Padua, L.E., Ohba, M., Aizawa, K. // J. Invertebr. Pathol. — 1984. — V. 44. — P. 12—17.
7. Hofte, H., Seurink, J., Van Houtven, A., et al. // Nucleic Acids Res. — 1987. — V. 15. — P. 7183.
8. De Barjac, H., Frachon, E. // Entomophaga. — 1990. — V. 35. — P. 233—240.
9. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, J., et al. // Nucleic Acids Res. — 1990. — V. 18. — P. 6531—6535.
10. Gurtler, V., Mayall, B.C. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2001. — V. 51. — N. 1. — P. 3—16.
11. Ronimus, R.S., Parker, L.E., Morgen, H.W., et al. // FEMS Microbiol. Lett. — 1997. — V. 147. — P. 75—79.
12. Woodburn, M.A., Yousten, A.A., Hilu, K.H. // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1995. — V. 45. — P. 212—217.
13. Rivera, A.M., Priest, F.G. // System. Appl. Microbiol. — 2003. — V. 26. — P. 254—261.
14. Hansen, B.M., Damgaard, P.H., Eilenberg, J., et al. // J. Invertebr. Pathol. — 1998. — V. 71. — N. 2. — P. 106—114.
15. Konecka, E., Kaznowski, A., Ziemnicka, J., et al. // J. Invertebr. Pathol. — 2007. — V. 94. — P. 56—63.
16. Monnerat, R., Martins, E., Queiroz, P., et al. // Appl. Environ. Microbiol. — 2006. — V. 72. — N. 11. — P. 7029—7035.
17. Hendriksen, N.B., Hansen, B.M. // FEMS Microbiol. Lett. — 2006. — V. 257. — P. 106—111.
18. Мокеева А.В., Калмыкова Г.В., Бурцева Л.И. и др. // Биотехнология. — 2006. — № 3. — С. 47—55.
19. Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., et al. // Appl. Environ. Microbiol. — 1997. — V. 63. — P. 4883—4890.
20. Мануатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 479 с.
21. Brousseau, R., Saint-Onge, A., Prefontaine, G., et al. // Appl. Environ. Microbiol. — 1993. — V. 59. — N. 1. — P. 114—119.
22. www.statsoft.ru/statportal/tabID_76/DesktopDefault.aspx

A.V. MOKEEVA^{1,*}, S.F. ORESHKOVA¹, G.V. KALMYKOVA², L.I. BURTSEVA², I.S. ANDREEVA¹, and V.E. REPIN¹

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology *Vector*, 630559, Kol'tsovo, Novosibirskaya oblast Russia

² Institute of Animals Systematics and Ecology, Siberian Branch, Russ. Acad. Sci., 630091, Novosibirsk Russia

e-mail: mokeeva@vector.nsc.ru

Molecular Typing of *Bacillus thuringiensis* Strains by RAPD Analysis

Classification of 54 *Bacillus thuringiensis* strains by means of RAPD analysis has been carried out. The results were used as a basis to design a phylogenetic tree, and all *B. thuringiensis*

strains were divided into 28 genomic types. As a rule, all *B. thuringiensis* isolates within the subspecies showed identical RAPD profiles, and the majority of isolates that belong to different subspecies, had different pictures upon fingerprinting. It was established that each of the *kurstaki* and *galleria* serovars consisted of genetically identical or close strains. The assumption that for these subspecies a loss (or modification) of crystal formation does not reflect essential changes of the bacterial genome was made. Unlike the above subspecies, the *israelensis*, *yunnanensis* and *sotto* serovars were genetically heterogeneous. Indeed, *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* strains 157 and 2e1r with small endotoxin crystals contained *cry* 7, 8 genes, whereas the strains with large crystals fell into two types on the dendrogram according to putative modifications in their genomic structures that were detected by RAPD-analysis.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, dendrogram, RAPD analysis.

* Author for correspondence.