



УДК 578.816(282.256.341)

Генетическое разнообразие цианофагов семейства *Myoviridae* в озере Байкал

Т. В. Бутина¹, С. А. Потапов¹, О. И. Белых¹, Н. Дамдинсурэн², Б. Чойдаш²

¹Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

²Монгольский государственный университет, Улан-Батор

E-mail: butina@lin.irk.ru

Аннотация. Высокое генетическое разнообразие цианофагов семейства *Myoviridae* в оз. Байкал выявлено на основе анализа генов капсидного белка g20. Наибольшее сходство проанализированных фрагментов установлено с генами вирусов, поражающих цианобактерии *Synechococcus* sp., и с генами некультивированных пресноводных бактериофагов.

Ключевые слова: цианофаги, семейство *Myoviridae*, генетическое разнообразие, ген g20, оз. Байкал.

Введение

В последние десятилетия интерес к изучению вирусных сообществ водных экосистем неуклонно растёт, что обусловлено той глобальной ролью, которую они играют в функционировании водоёмов. Среди бактериофагов водных экосистем определяющее значение имеют цианофаги – вирусы, инфицирующие цианобактерии. Большинство известных цианофагов принадлежит трём семействам бактериофагов с хвостовыми отростками (отряд Caudovirales): *Myoviridae*, *Podoviridae* и *Siphoviridae* [9; 11; 12; 18; 19]. При этом 80 % изолятов морских цианофагов составляют цианофаги семейства *Myoviridae* – цианомиовирусы [9; 11].

Недавние исследования выявили высокую численность и видовое разнообразие вириопланктона в оз. Байкал [1; 3]. Автотрофный пикопланктон играет ключевую роль в продуктивности фитопланктона озера и изучение основных регуляторов численности цианобактерий – цианофагов, как главного компонента пикопланктона, является важным звеном в изучении закономерностей функционирования экосистемы оз. Байкал.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании цианофагов семейства *Myoviridae* в оз. Байкал с применением праймеров к гену капсидного белка g20 [13; 14], разработанных для идентификации вирусов в природных образцах без этапа культивирования [6; 10; 16; 17; 20].

Материалы и методы

Пробы воды отбирали в августе 2010 г. в пелагиали Южного (разрез Листвянка – Танхой), Среднего (разрез м. Ухан – м. Тонкий) и Северного (разрез м. Елохин – Давша) Байкала с глубин 0, 5, 15, 25 и 50 м.

Образцы воды объёмом 50 мл с каждого горизонта последовательно фильтровали через поликарбонатные фильтры (Millipore) с диаметром пор 1,2, 0,45 и 0,22 мкм для удаления зоо-, фито- и бактериопланктона. Далее образцы концентрировали осаждением в 10%-ном растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000), содержащем 0,5M NaCl. Осадок растворяли в 100 мкл отфильтрованной воды. Из полученных образцов выделяли ДНК с помощью набора «ДНК-сорб» (ИнтерЛабСервис, Москва).

ПЦР проводили с использованием двух пар праймеров к гену g20: CPS1 и CPS8; CPS1 и CPS4 [13; 14]. Реакционная смесь для ПЦР (из комплекта реагентов «Амплиценс», ИнтерЛабСервис, Москва) в объёме 10 мкл содержала 1,5 mM MgSO₄, 0,2 mM каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 20 pmol каждого праймера, 1,0 единицу Taq-полимеразы и 1 мкл ДНК.

Ампликоны первоначально визуализировали электрофорезом в 4%-ном акриламидном геле с последующим «серебряным» окрашиванием. Фрагменты геля, содержащие ДНК ожидаемой молекулярной массы (430 п. н.), использовали как источник ДНК в повторной амплификации объёмом 20 мкл. ПЦР-продукты нужной длины после разделения в 0,8 % ага-

рожном геле в 0,5хТАЕ буфере (20 mM Трис-ацетат, 5 mM EDTA, pH 8,0) вырезали из геля, экстрагировали в буфер после двух циклов замораживания и оттаивания. Полученные ампликоны клонировали, используя набор «In-sTAclone» (Fermentas). Скрининг клонов выполняли с помощью ПЦР с универсальными плазмидными праймерами. Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе CEQ 8800 (Beckman Coulter).

Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов гена g20 выравнивали и редактировали с помощью программы BioEdit (v. 7.0.5) [7]. Идентичные последовательности исключали из дальнейшего анализа. Поиск ближайших гомологов по банку данных NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) проводили по нуклеотидным последовательностям с применением программы BLASTn. Филогенетическое древо реконструировали методом Байесовского анализа с помощью программы MrBayes v. 3.1.2 [8]. В анализе создавали 3 млн генераций цепей Маркова (MCMC), отбирая каждое сотое генерированное дерево, первые 7 500 деревьев исключали из анализа. Достоверность ветвлений оценивали постериорными вероятностями.

Результаты и обсуждение

Амплификация гена g20 из ДНК, выделенной из вириопланктонных проб оз. Байкал, оказалась результативной, когда фрагмент гена ограничивали олигонуклеотидами CPS1 и CPS4, пара CPS1-CPS8 не давала положительных откликов. В результате определены последовательности 74 клонированных фрагментов ДНК, попарное сходство нуклеотидных последовательностей между собой варьирует в пределах 58,5–100 %. По данным BLAST-анализа полученные нуклеотидные последовательности имеют 76–97 % гомологии с капсидным геном g20 культивированных и некультивированных цианофагов семейства *Myoviridae*. Максимальное сходство выявлено с генами некультивированных бактериофагов пресных водоёмов и биоценозов рисовых полей, а также с морскими цианофагами, выделенными на культурах одноклеточных бактерий *Synechococcus* sp. Наибольшее количество идентичных позиций (97 %) обнаружено с генами g20 некультивированных бактериофагов из оз. Бурже (Франция) [6]. Идентичные последовательности генов g20 к настоящему моменту в GenBank не зафиксированы, что свидетельствует о том, что в оз. Байкал обнаружены уникальные гены g20 бактериофагов семейства *Myoviridae*.

Таблица

Последовательности гена g20 цианофагов из базы данных GenBank, использованные для филогенетического анализа

Идентификационный номер GenBank	Название цианофага	Место отбора проб / Условное обозначение	Ссылка
Культивированные цианофаги*			
AY027974	27A	Саргассово море / SS	[14]
AY027975	31B	- // -	- // -
AY027976	32A	- // -	- // -
AY027977	44A	- // -	- // -
EU715793	S-SSM7	- // -	[16]
AY027978	S-PWM1	Мексиканский зал. / GM	[14]
AY027979	P6	- // -	- // -
AY027981	P17	Жёлтое море, побережье г. Циндао, Китай / QCC	- // -
AY027982	P77	р. Олтамеха (эстуарий), США, штат Джорджия / ARE	- // -
AY027984	P81	- // -	- // -
AY027983	P79	р. Сатилла (эстуарий), США, штат Джорджия / SRE	- // -
AY259259	S-RIM16	Атлантический океан, побережье штата Род-Айленд, США / RIC	[11]
AY259270	S-RIM27	- // -	- // -
AY259272	S-RIM29	- // -	- // -
AY259274	S-RIM31	- // -	- // -
AF016384	S-PM2	прол. Ла-Манш / EC	[13]

Некультивированные цианофаги			
AY426128-AY426174	–	оз. Бурже, Франция / LB	[6]
DQ318388-DQ318432	–	оз. Эри, США / LGL	[10]
AY027938-AY027973	–	Атлантический океан, Гольфстрим / GS	[14]
AY027985-AY028013	–	р. Саванна (эстуарий), США / SE	- // -
AY028014-AY028078	–	Саргассово мор / SSe	- // -
AY152732-AY152746	–	Чесапикский зал., США / ChB	[21]
AB471563-AB471638	–	Рисовые поля, Япония / JaP	[20]

Примечание: *Получены на культурах цианобактерий *Synechococcus* sp.

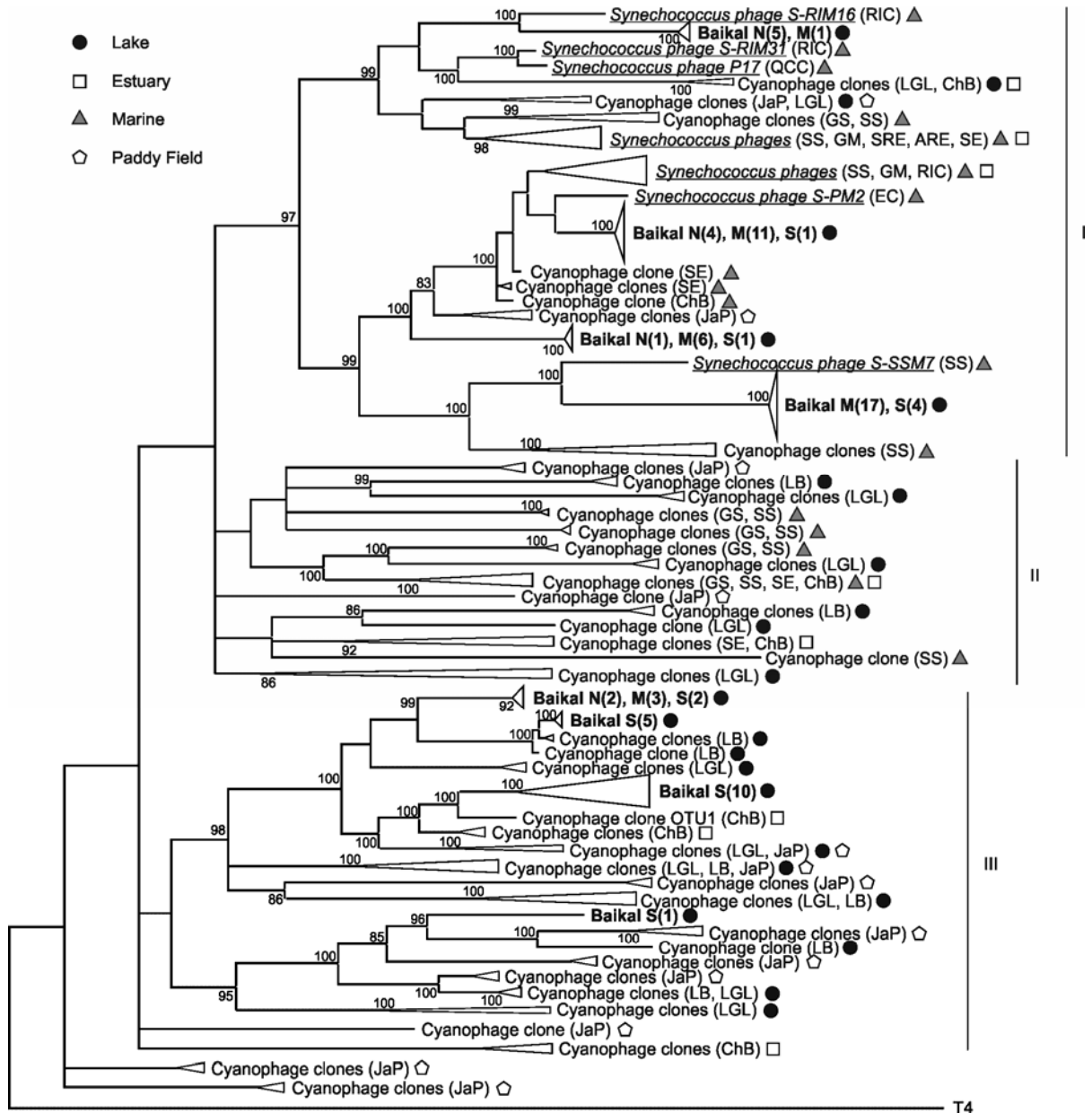


Рис. Схема филогенетических связей цианофагов семейства *Myoviridae* по результатам анализа фрагментов гена *g20* капсидного белка. Байкальские клоны выделены жирным шрифтом, в скобках указано количество проанализированных в нашем исследовании клонов. В качестве аутгруппы использовали последовательность белка *g20* бактериофага T4. Постериорные вероятности выражены в процентах, значения меньше 80 % удалены. Сокращения: N – Северный, M – Средний, S – Южный Байкал

Результат филогенетического анализа новых байкальских последовательностей и генов g20 из GenBank, принадлежащих культивированным цианофагам бактерий рода *Synechococcus* и некультивированным бактериофагам из различных природных биоценозов (морских, пресноводных и почвенных), представлен на рисунке. Байкальские последовательности сформировали шесть собственных монофилетических групп, не включающих ни одной посторонней последовательности. Часть из них сформировали четыре монофилетические группы внутри клады, в состав которой входят гены g20 цианофагов, выделенных на культурах *Synechococcus* sp. (группа I на рис.). При этом три клады байкальских вирусов принадлежат одной линии внутри этой группы, тогда как четвёртая – сестринской. Оставшиеся последовательности из оз. Байкал тремя кладами лежат в группе III, где объединены клонированные последовательности преимущественно пресноводных цианофагов и вирусов из образцов с рисовых полей. Представительная группа II некультивированных вирусных изолятов из разных, включая морские, биоценозов не содержит ни одной байкальской последовательности гена g20.

Филогенетическая близость значительной доли генов g20 из оз. Байкал с генами фагов, инфицирующих виды рода *Synechococcus*, согласуется с фактом большого видового разнообразия и массового развития пикоцианобактерий этого рода в озере [4; 5].

Аналогичные результаты получены ранее при изучении генетического разнообразия T4-подобных байкальских бактериофагов. Большая часть последовательностей гена g23, полученных из котловины Северного Байкала, где отмечалось высокое развитие пикоцианобактерий близких родов (*Synechococcus*, *Cyanobium* и *Synechocystis*), принадлежала подгруппе морских цианофагов, инфицирующих представителей родов *Synechococcus* и *Prochlorococcus* [2; 15]. Таким образом, анализ последовательностей g20 и g23 выявил разнообразие цианофагов семейства *Myoviridae*, хозяевами которых являются пикоцианобактерии.

Поскольку группы II и III на филогенетическом древе (см. рис.) включают только гены некультивированных бактериофагов, определить круг хозяев этих вирусов очень сложно. Исходя из того, что в группу III входят последовательности фагов из пресных и опреснённых биоценозов (озёр, рисовых полей и эстуариев), очевидно, что вирусы этой группы по-

ражают пресноводные виды бактерий и филогенетически далеки от морских цианофагов.

Филогенетический анализ показал, что большая часть клонов g20 из Южного Байкала формирует две отдельные «южно-байкальские» клады в составе группы III, не содержащие представителей из других котловин, тогда как остальные клады байкальских генов содержат последовательности, выделенные из разных удаленных участков озера. Выраженные климатические различия трёх котловин, обусловленные значительной протяжённостью озера с юга на север, определяют разный качественный и количественный состав бактериопланктона [4], что, в свою очередь, сказывается на разнообразии и специфичности вириопланктона.

Заключение

В результате проведённого анализа выявлено большое разнообразие цианомиовирусов в оз. Байкал. Последовательности g20 генов уникальны и не имеют идентичных гомологов в GenBank. Выявленные ранее последовательности гена g23 T4-бактериофагов из оз. Байкал также характеризовались высоким разнообразием и отличались от всех известных [2; 15]. Полученные данные свидетельствуют о циркуляции в озере уникальных вирусных сообществ, включая сообщества цианофагов. Отличия в составе вирусных сообществ в котловинах озера обусловлены, вероятно, климатическими и гидробиологическими особенностями озера.

Работа выполнена при поддержке проектов РФФИ №№ 10-04-01613 и 11-04-92220.

Литература

1. Белых О. И. Выявление и учёт вирусоподобных частиц в байкальской воде с помощью эпифлуоресцентной микроскопии / О. И. Белых, С. И. Беликов // Третья Верещагин. Байкал. конф. : тез. докл. – Иркутск, 2000. – С. 27.
2. Бутина Т. В. Молекулярно-генетическая идентификация T4-бактериофагов в озере Байкал / Т. В. Бутина, О. И. Белых, С. И. Беликов // Докл. Акад. наук. – 2010. – № 433. – С. 406–409.
3. Дрюккер В. В. Бактериофаги как новое трофическое звено в экосистеме глубоководного озера Байкал / В. В. Дрюккер, Н. В. Дутова // Докл. Акад. наук. – 2009. – Т. 427. – С. 277–281.
4. Belykh O. I. Autotrophic picoplankton of Lake Baikal: species composition, abundance and distribution / O. I. Belykh and E. G. Sorokovikova // Aquat. Ecosyst. Health Manag. – 2003. – Vol. 6. – P. 251–262.
5. Characteristics of Lake Baikal summer phytoplankton and autotrophic picoplankton / O. I. Belykh [et al.] // Inter. J. Algae. – 2007. – Vol. 9. – P. 247–263.

6. Dorigo U. Cyanophage diversity, inferred from g20 gene analyses, in the largest natural lake in France, Lake Bourget / U. Dorigo, S. Jacquet and J. F. Humbert // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70. – P. 1017–1022.
7. Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T. A. Hall // *Nucl. Acids Symp. Ser.* – 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.
8. Huelsenbeck J. P. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees / J. P. Huelsenbeck and F. Ronquist // *Bioinformatics.* – 2001. – Vol. 17. – P. 754–755.
9. Mann N. H. Phages of the marine cyanobacterial picoplankton / N. H. Mann // *FEMS Microbiol. Reviews.* – 2003. – Vol. 27. – P. 17–34.
10. Marine and Freshwater Cyanophages in a Laurentian Great Lake: Evidence from Infectivity Assays and Molecular Analyses of g20 Genes / S. W. Wilhelm [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – Vol. 72. – P. 4957–4963.
11. Marston M. F. Genetic diversity and temporal variation in the cyanophage community infecting marine *Synechococcus* species in Rhode Island's coastal waters / M. F. Marston and J. L. Sallee // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 69. – N 8. – P. 4639–4647.
12. Millard A. D. A temporal and spatial investigation of cyanophage abundance in the Gulf of Aqaba, Red Sea / A. D. Millard and N. H. Mann // *J. Mar. Biol. Assoc.* – 2006. – Vol. 86. – P. 507–515.
13. Occurrence of a sequence in marine cyanophages similar to that of T4 g20 and its application to PCR-based detection and quantification techniques / N. J. Fuller [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol. 64. – P. 2051–2060.
14. Phylogenetic diversity of marine cyanophage isolates and natural virus communities as revealed by sequences of viral capsid assembly protein gene g20 / Y. Zhong [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – Vol. 68. – P. 1576–1584.
15. Phylogenetic diversity of T4-like bacteriophages in Lake Baikal, East Siberia / T. V. Butina, O. I. Belykh, S. Y. Maksimenko, S. I. Belikov // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2010. – Vol. 309. – P. 122–129.
16. Portal protein diversity and phage ecology / M. B. Sullivan [et al.] // *Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 10. – P. 2810–2823.
17. Short C. M. Nearly identical bacteriophage structural gene sequences are widely distributed in both marine and freshwater environments / C. M. Short and C. A. Suttle // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71. – P. 480–486.
18. Sullivan M. B. Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus* / M. B. Sullivan, J. B. Waterbury and S. W. Chisholm // *Nature.* – 2003. – Vol. 424. – P. 1047–1051.
19. Suttle C. A. Marine cyanophages infecting oceanic and coastal strains of *Synechococcus* – abundance, morphology, cross-infectivity and growth characteristics / C. A. Suttle and A. M. Chan // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1993. – Vol. 92. – P. 99–109.
20. Unique viral capsid assembly protein gene (g20) of cyanophages in the floodwater of a Japanese paddy field / G. Wang [et al.] // *Biol. Fertil. Soils.* – 2010. – Vol. 46. – P. 93–102.
21. Wang K. Prevalence of highly host-specific cyanophages in the estuarine environment / K. Wang and F. Chen // *Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 10. – № 2. – P. 300–312.

Genetic diversity of the family *Myoviridae* cyanophages in Lake Baikal

T. V. Butina¹, S. A. Potapov¹, O. I. Belykh¹, N. Damdinsuren², B. Chojdash²

¹Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

²National University of Mongolia, Ulan Bator

Abstract. High diversity of the family *Myoviridae* cyanophages in Lake Baikal was recorded analyzing capsid assembly protein genes g20. The highest similarity of the analyzed gene fragments was established with cyanophages infected bacteria *Synechococcus* sp., and with genes of uncultured freshwater bacteriophages.

Keywords: cyanophages, family *Myoviridae*, genetic diversity, gene g20, Lake Baikal

Бутина Татьяна Владимировна
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
кандидат биологических наук
научный сотрудник
тел. (3952) 51–18–74
E-mail: butina@lin.irk.ru

Butina Tatyana Vladimirovna
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
Ph. D in Biology, research scientist
phone: (3952) 51–18–74
E-mail: butina@lin.irk.ru

Потапов Сергей Анатольевич
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
аспирант
тел. (3952) 42-54-15
E-mail: poet1988@list.ru

Белых Ольга Ивановна
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
кандидат биологических наук, доцент
ведущий научный сотрудник
тел. (3952) 42-54-15
E-mail: belykh@lin.irk.ru

Дамдинсүрэн Нарантуя
Монгольский государственный университет
Отдел микробиологии
Школа биологии и биотехнологии
г. Улан-Батор, пл. Сүхэ-Батора
научный сотрудник
тел. 976-323970
E-mail: narantuya@num.edu.mn

Чойдаш Батцэцэг
Монгольский государственный университет
Отдел микробиологии
Школа биологии и биотехнологии
г. Улан-Батор, пл. Сүхэ-Батора
кандидат биологических наук
тел. 976-323970
E-mail: battsetseg@num.edu.mn

Potapov Sergey Anatolyevich
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
doctoral student
phone: (3952) 42-54-15
E-mail: poet1988@list.ru

Belykh Olga Ivanovna
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
Ph.D in Biology, ass. prof.
leading research scientist
phone: (3952) 42-54-15
E-mail: belykh@lin.irk.ru

Damdinsuren Narantuya
National University of Mongolia,
Microbiology department, School of Biology
and Biotechnology
Building – 2, Ikhsurguuliin Gudamj-1, BagaToiruu 47,
Sukhbaatar District
Research scientist
phone: 976-323970
E-mail: narantuya@num.edu.mn

Choidash Battsetseg
National University of Mongolia,
Microbiology departmen
School of Biology and Biotechnology
Building – 2, Ikhsurguuliin Gudamj-1, BagaToiruu 47,
Sukhbaatar District
Ph. D in Biology
phone: 976-323970
E-mail: battsetseg@num.edu.mn