



УДК 578.816(282.256.341)

Генетическое разнообразие Т4-подобных бактериофагов в озере Байкал

С. А. Потапов, Т. В. Бутина, О. И. Белых, С. И. Беликов

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск
E-mail: poet1988@list.ru

Аннотация. Исследовано генетическое разнообразие Т4-подобных бактериофагов семейства Myoviridae в олиготрофном оз. Байкал на основе анализа гена основного капсидного белка g23. Определены последовательности 58 клонированных фрагментов гена g23. Согласно результатам BLAST-анализа, полученные нуклеотидные и выведенные аминокислотные последовательности g23 не имеют аналогов в базе данных GenBank. Выявлена группа байкальских Т4-цианофагов, поражающих пикопланктонные цианобактерии. Данные, полученные с помощью UniFrac-анализа, показали, что некультивированные Т4-подобные вирусы из эвтрофированного участка оз. Байкал группируются с вирусами экосистем сходного трофического статуса. Этот факт предполагает, что трофические условия влияют на формирование вирусных популяций, в частности Т4-подобных вирусов, пресноводных озёр.

Ключевые слова: Т4-бактериофаги, семейство Myoviridae, генетическое разнообразие, ген g23, озеро Байкал.

Введение

Вирусы – самые многочисленные биологические объекты в водных экосистемах. Большинство вирусов являются бактериофагами, они влияют на генетическое разнообразие и контролируют численность бактерий и цианобактерий, в значительной мере определяя биоразнообразие, структуру, продуктивность и функционирование водных экосистем [10; 24]. В современных условиях при постоянном увеличении антропогенных нагрузок и изменении климата вирусам принадлежит особая роль.

Вирусы семейства Myoviridae, принадлежащие к отряду хвостатых бактериофагов (Caudovirales), имеют широкий круг хозяев и являются одними из самых многочисленных организмов в морских и пресных водоёмах [6; 27]. Известной группой семейства Myoviridae является род Т4-подобных вирусов («Т4-like viruses»). Т4-подобные вирусы (Т4-бактериофаги) обладают высокой литической активностью и вызывают гибель клеток хозяина, обуславливая высокую экологическую значимость для водных биоценозов [7].

Т4-подобные вирусы инфицируют различные виды бактерий. К настоящему времени исследованы и охарактеризованы около 40 геномов этих вирусов [12]. Большинство Т4-фагов выделены от *Escherichia coli* и других видов энтеробактерий родов *Klebsiella*, *Shigella* и *Yersinia*. Кроме того, Т4-бактериофаги поражают бактерии родов *Aeromonas*, *Acinetobacter*,

Pseudomonas, *Vibrio*, а также цианобактерии (филум Cyanobacteria) [2; 11]. Все известные Т4-бактериофаги разделяют на 4 подгруппы на основе анализа генов трёх основных структурных белков (g18, g19, g23): Т-, PseudoТ-, SchizoТ- и EchoТ-evens [23]. В первые три подгруппы вошли изоляты от патогенных и условно-патогенных бактерий. Подгруппа EchoТ-evens включает изоляты вирусов морских пикоцианобактерий *Synechococcus* spp. и *Prochlorococcus* spp. [3; 28].

На основе консервативных участков гена основного капсидного белка g23 Т4-бактериофагов разработан набор ПЦР-праймеров для генетической идентификации вирусов этой группы в природных образцах без этапа культивирования [21]. Исследования g23-генов Т4-бактериофагов водных биоценозов с помощью разработанных праймеров выявили большое разнообразие и широкое распространение этих вирусов *in vivo* [21; 22; 26; 15; 25].

Целью настоящей работы стало исследование разнообразия Т4-бактериофагов в оз. Байкал посредством анализа гена основного капсидного белка g23.

Материалы и методы

Пробы воды отбирали в летнее время в пелагиали Северного (разрез с. Байкальское – м. Турали) и Южного (разрез пос. Листвянка – пос. Танхой) Байкала на глубине 0–50 м в 2008 г. и в проливе Малое море (зал. Мухор) на глубине 0–5 м в 2011 г.

Образцы воды объёмом 50 мл последовательно фильтровали через поликарбонатные фильтры (Millipore) с диаметром пор 1,2; 0,45 и 0,22 мкм для удаления зоо-, фито- и бактериопланктона. Далее материал 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).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием вырожденных праймеров к гену g23, MZIA1bis и MZIA6 [21]. Реакционная смесь для ПЦР (из комплекта реагентов «Амплисенс», 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-матрицы.

Ампликоны первоначально визуализировали электрофорезом в 4%-ном полиакриламидном геле в 1xTBE буфере с последующим «серебряным» окрашиванием. Фрагменты геля, содержащие ДНК ожидаемой молекулярной массы (300–600 п. н.), отбирали пипеткой и использовали как источник ДНК в повторной амплификации объёмом 20 мкл. ПЦР-продукты нужной длины после разделения в 0,8%-ном агарозном геле в 0,5xTAE буфере (20 mM Трис-ацетат, 5 mM EDTA, pH 8,0), вырезали из геля, экстрагировали в буфер после двух циклов замораживания и оттаивания. Полученные ПЦР-продукты клонировали, используя набор «InsTAclone» (Fermentas). Скрининг клонов выполняли с помощью ПЦР с универсальными плазмидными праймерами. Реамплифицированные фрагменты очищали с помощью агарозного электрофореза и определяли нуклеотидные последовательности на автоматическом секвенаторе CEQ 8800 (Beckman Coulter) и с помощью услуг компании «Синтол» (Москва).

Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов гена g23 выравнивали, редактировали и транслировали с помощью программы BioEdit (v7.0.5) [13]. Идентичные последовательности исключали из дальнейшего анализа. Поиск ближайших гомологов по банку данных NCBI проводили по аминокислотным последовательностям с применением программы BLASTp [5].

Филогенетическое древо реконструировали методом Байесовского анализа с помощью программы MrBayes v3.1.2 [16]. В анализе создавали 5 миллионов генераций цепей Маркова

(MCMC), отбирая каждое двухсотое генерированное дерево, первые 12 500 деревьев исключали из анализа. Достоверность ветвлений оценивали постериорными вероятностями. На основе филогении аминокислотных последовательностей g23 проводили статистический UniFrac-анализ с помощью программы Fast UniFrac [14].

Результаты и обсуждение

В результате определены последовательности 58 клонированных фрагментов гена g23 Т4-бактериофагов из Байкала. Согласно результатам BLAST-анализа, полученные нуклеотидные и выведенные аминокислотные последовательности g23 не имели аналогов в базе данных GenBank. Наибольшее сходство (62–97 % гомологии) выявлено с генами g23 пресноводных биоценозов – озёр и рисовых полей [11; 22; 28].

Результаты филогенетического анализа представлены на рис. 1. Для анализа использовали выведенные аминокислотные последовательности фрагмента g23 Т4-бактериофагов из оз. Байкал и фрагменты белка g23 из GenBank, идентифицированные в антарктическом ультраолиготрофном озере (Lake Limnopolar) [15] и эвтрофных озёрах Дунху (Китай) [11] и Котокель (Республика Бурятия) [8]. Озеро Котокель находится в непосредственной близости от Байкала и имеет с ним прямую водную связь через водоток. Из представленного древа видно, что g23-гены Т4-бактериофагов из Байкала формируют множество отдельных достоверных кластеров, демонстрируя высокое генетическое разнообразие. Последовательности g23 из Байкала, как и клоны g23 из других озёр, принадлежат большой кладе, в состав которой входит подгруппа EhoT-evens культивированных морских цианофагов одноклеточных цианобактерий родов *Synechococcus* и *Prochlorococcus* [3; 28].

Наиболее близкими к морским цианофагам оказались только последовательности из Байкала, причём преимущественно из северной котловины, где во время отбора проб отмечалось высокое обилие близких родов пикопланктонных цианобактерий, включая *Synechococcus* spp [1]. Для остальных водоёмов, использованных в анализе, такое обилие автотрофного пикопланктона нехарактерно [18; 9]. Полученные данные свидетельствуют о принадлежности байкальских последовательностей из подгруппы EhoT-evens к Т4-цианофагам, поражающим пикоцианобактерии. Ни одна из полученных последовательностей из Байкала не вошла в подгруппы T-, PseudoT- или SchizoT-evens Т4-подобных фагов.

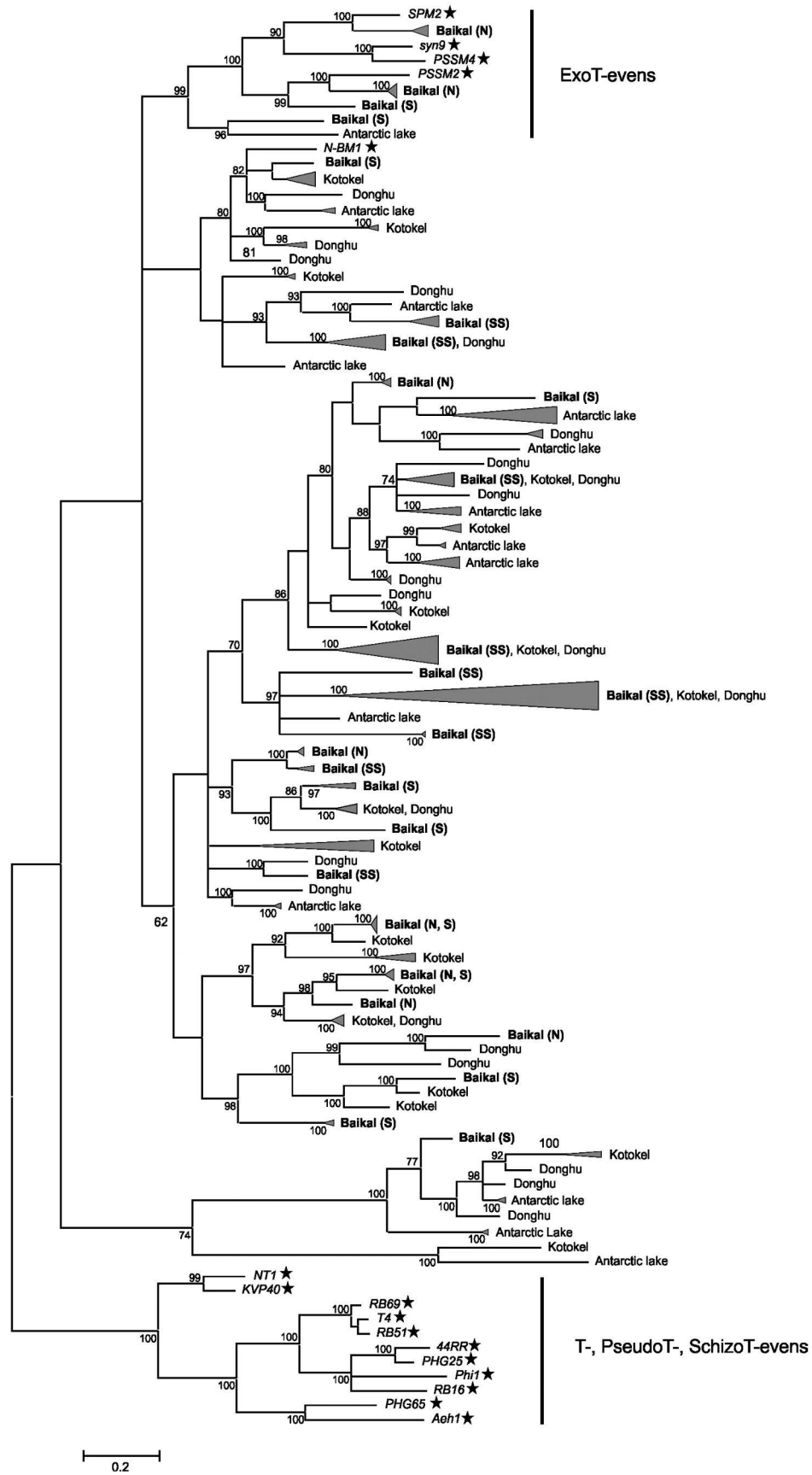


Рис. 1. Результаты филогенетического анализа фрагментов белка g23 Т4-бактериофагов из пресных озёр. Культивированные Т4-бактериофаги и цианофаги выделены курсивом и астериксом. Штамм *N-BM1* изолирован от нитчатых токсичных цианобактерий *Nodularia spumigena* из Балтийского моря [17]. *N* – Северный Байкал, *S* – Южный Байкал, *SS* – Малое Море

В целом филогенетический анализ пресноводных Т4-бактериофагов демонстрирует высокое разнообразие и широкое распространение сходных штаммов вирусов в пресных озёрах. Несмотря на это, g23-клоны из отдельных водоёмов образуют, главным образом, отдельные достоверные кластеры, что демонстрирует зависимость от условий экосистемы радиацию отдельных локально адаптированных вирусов.

На рис. 2 представлены результаты проведённого нами UniFrac-анализа. Этот статистический метод разработан сравнительно недавно [19] и позволяет на основе филогенетического анализа генов оценить различия сообществ микроорганизмов в отдельных биоценозах. Первоначально UniFrac-метод использовали для характеристики бактериальных сообществ на основе обширного количества мировых данных о структуре генов 16S рРНК из различных биоценозов. В результате продемонстрировано

влияние природных условий (солёность, субстрат, рН и др.) на формирование бактериальных сообществ в природной среде [20; 4]. Полученные нами результаты наглядно демонстрируют различие сообществ Т4-бактериофагов из отдельных районов Байкала. Скорее всего, гидрохимические особенности экосистемы отражаются на составе популяций вирусов, в том числе Т4-бактериофагов.

Обращает на себя внимание сходство вирусных сообществ из эвтрофированного участка оз. Байкал – пролива Малое Море и эвтрофных озёр Котокель и Дунху. Полученные данные свидетельствуют о том, что факторы среды, определяющие трофический статус водоёмов, могут иметь большую значимость для распространения и формирования вирусных сообществ, чем, например, географическое положение.

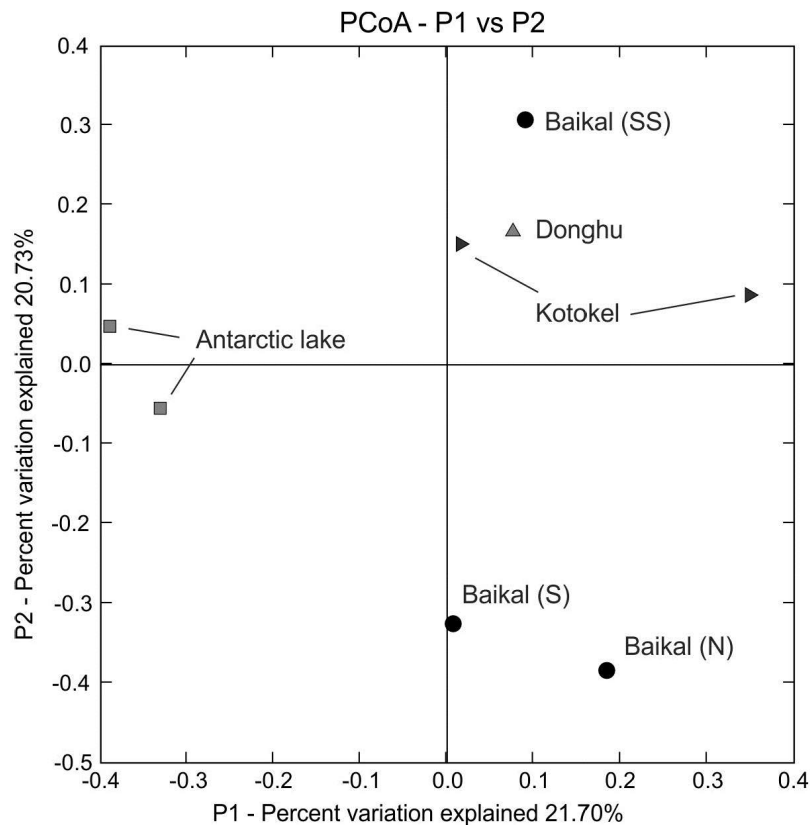


Рис. 2. Результаты PCoA-анализа (principal coordinate analysis) g23-сообществ пресных озёр, выполненный с помощью программы Fast UniFrac [14]

Выводы

1. В результате исследований выявлено высокое разнообразие Т4-бактериофагов, в том числе Т4-цианофагов, в Байкале.

2. Показана генетическая разнородность сообществ Т4-бактериофагов в отдельных районах озера.

3. Впервые показано, что трофические условия влияют на формирование не только бактериальных, но и вирусных популяций.

Работа выполнена при поддержке проектов РФФИ № № 10-04-01613 и 11-04-92220, публикация статьи осуществлена при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 13-04-06068-з.

Литература

- Бутина Т. В. Молекулярно-генетическая идентификация Т4-бактериофагов в озере Байкал / Т. В. Бутина, О. И. Бельх, С. И. Беликов // Докл. акад. наук. – 2010. – № 433. – С. 406–409.
- Ackermann H.-W. 5500 Phages examined in the electron microscope / H.-W. Ackermann // Arch. Virol. – 2007. – Vol. 152. – P. 227–243.
- A conserved genetic module that encodes the major virion components in both the coliphage T4 and the marine cyanophage S-PM2 / E. Hambly [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98. – P. 11411–11416.
- A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria / R. J. Newton [et al.] // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2011. – Vol. 75. – P. 14–49.
- BLAST Assembled RefSeq Genomes [Electronic resource]. – URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Comeau A. M. The capsid of the T4 phage superfamily: the evolution, diversity and structure of some of the most prevalent proteins in the biosphere / A. M. Comeau, H. M. Krisch // Mol. Biol. Evol. – 2008. – Vol. 25. – P. 1321–1332.
- Desplats C. The diversity and evolution of the T4-type bacteriophages / C. Desplats, H. M. Krisch // Res. Microbiol. – 2003. – Vol. 154. – P. 259–267.
- Diversity of the major capsid genes (*g23*) of T4-like bacteriophages in the eutrophic Lake Kotokel in East Siberia, Russia / T. V. Butina [et al.] // Arch. Microbiol. – 2013. – Vol. 195. – P. 513–520.
- Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range / L. Vörös [et al.] // Hydrobiologia. – 1998. – Vol. 369–370. – P. 117–125.
- Fuhrman J. A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects / J. A. Fuhrman // Nature. – 1999. – Vol. 399. – P. 541–548.
- Genetic diversity of T4 viroplankton, inferred from *g23* gene, in Wuhan Donghu Lake / H. Z. Huang [et al.] // China Environ. Sci. – 2011. – Vol. 31. – P. 44–447 (in Chinese with English abstract).
- GGC T4-like Genome website. [Electronic resource]. – URL: <http://phage.ggc.edu>.
- 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.
- Hamady M. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data / M. Hamady, C. Lozupone, R. Knight // ISME J. – 2010. – Vol. 4. – P. 17–27.
- High diversity of the viral community from an Antarctic Lake / A. López-Bueno [et al.] // Science. – 2009. – Vol. 326. – P. 858–861.
- Huelsenbeck J. P. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees / J. P. Huelsenbeck, F. Ronquist // Bioinformatics. – 2001. – Vol. 17. – P. 754–755.
- Jenkins C. A. Diversity of cyanophages infecting the heterocystous filamentous cyanobacterium *Nodularia* isolated from the brackish Baltic Sea / C. A. Jenkins, P. K. Hayes // J. Mar. Biol. Ass. UK. – 2006. – Vol. 86. – P. 529–536.
- Limnological characteristics of the freshwater ecosystems of Byers Peninsula, Livingston Island, in maritime Antarctica / M. Toro [et al.] // Polar Biol. – 2007. – Vol. 30. – P. 635–649.
- Lozupone C. A. Unifrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities / C. A. Lozupone, R. Knight // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71. – P. 8228–35.
- Lozupone C. A. Global patterns in bacterial diversity / C. A. Lozupone, R. Knight // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104. – P. 11436–11440.
- Marine T4 type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere / J. Filée [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102. – P. 12471–12476.
- Novel capsid genes (*g23*) of T4-type bacteriophages in a Japanese paddy field / T. Fujii [et al.] // Soil Biol. Biochem. – 2008. – Vol. 40. – P. 1049–1059.
- Phylogeny of the major head and tail genes of the wide-ranging T4-type bacteriophages / F. Tétart [et al.] // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183. – P. 358–366.
- Schwalbach M. S. Viral effects on bacterial community composition in marine plankton microcosms / M. S. Schwalbach, I. Hewson, J. A. Fuhrman // Aquat. Microb. Ecol. – 2004. – Vol. 34. – P. 117–127.
- Specific assemblages of major capsid genes (*g23*) of T4-type bacteriophages isolated from upland black soils in Northeast China / J. Liu [et al.] // Soil Biol. Biochem. – 2011. – Vol. 43. – P. 1980–1984.
- Survey of major capsid genes (*g23*) of T4-type bacteriophages in rice fields in Northeast China / G. Wang [et al.] // Soil Biol. Biochem. – 2009. – Vol. 41. – P. 423–427.
- The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: metagenomic characterization of viruses within aquatic microbial samples [Electronic resource] / S. J. Williamson [et al.] // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3. – e1456. – URL: <http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.0050016>.
- Three Prochlorococcus cyanophage genomes: signature features and ecological interpretations [Electronic resource] / M. B. Sullivan [et al.] // PLoS Biol. – 2005. – Vol. 3(5) – e144. – URL: <http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.0030144>.

Genetic diversity of T4-like bacteriophages in Lake Baikal

S. A. Potapov, T. V. Butina, O. I. Belykh, S. I. Belikov

Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

Abstract. Genetic diversity of T4-like bacteriophages of the family Myoviridae from oligotrophic Lake Baikal was analyzed using major capsid protein gene g23. Sequences of 58 cloned fragments of gene g23 were determined. The obtained nucleotide and deduced amino acid g23 sequences according to results BLAST-analysis had no analogs in the database GenBank. The group of Lake Baikal T4-cyanophages affecting picoplankton cyanobacteria was revealed. UniFrac analysis showed that uncultured T4-like viruses from eutrophic region of Lake Baikal tended to cluster with those from the distant lake of the same trophic status. This fact suggested that the trophic conditions affected the formation of viral populations, particularly of T4-like viruses, in freshwater environments.

Keywords: T4-bacteriophages, family Myoviridae, genetic diversity, gene g23, Lake Baikal.

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

Potapov Sergey Anatolyevich
Doctoral Student
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-54-15
E-mail: poet1988@list.ru

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

Butina Tatyana Vladimirovna
Ph. D. in Biology, Research Scientist
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 51-18-74
E-mail: butina@lin.irk.ru

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

Belykh Olga Ivanovna
Ph. D. in Biology, Ass. Prof., Leading Research
scientist
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42-54-15
E-mail: belykh@lin.irk.ru

Беликов Сергей Иванович
доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел. (3952) 51-18-74
E-mail: sergeibelikov47@gmail.com

Belikov Sergey Ivanovich
Dr. Sci. of Biology, Prof., Head of Laboratory
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 51-18-74
E-mail: sergeibelikov47@gmail.com