

UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU
INSTYTUT BIOLOGII
ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

Emilia Murawska

STRUKTURA GENOMU
I ENTOMOPATOGENNOŚĆ SZCZEPU
***BACILLUS THURINGIENSIS* IS5056**

Rozprawa doktorska
wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Izabeli Święcickiej

BIAŁYSTOK 2017

STRESZCZENIE

Gram-dodatnie, tlenowe laseczki *Bacillus thuringiensis* należą do *Bacillus cereus sensu lato*, grupy bakterii wytwarzającej przetrwalniki i powszechnie występującej w glebie, skąd są łatwo przenoszone do wody, płodów rolnych, skóry i przewodów pokarmowych zwierząt i ludzi. Grupa *B. cereus sl* jest bardzo homogeniczna pod względem genetycznym. Poszczególne szczepy przypisuje się do gatunku na podstawie cech fenotypowych i biochemicznych, które w dużej mierze kodowane są plazmidowo. Dyskusje i prowadzenie badań na temat tej grupy jest niezwykle istotne z gospodarczego i medycznego punktu widzenia: *Bacillus cereus sensu stricto* są przyczyną zatruc pokarmowych, *Bacillus anthracis*, etiologicznym czynnikiem wąglika, *Bacillus thuringiensis*, produkują białka toksyczne stosowane w zwalczaniu szkodników upraw. Dodatkowo, w obrębie grupy bardzo łatwo dochodzi do horyzontalnego transferu genów.

Wyizolowany z gleby w Biebrzańskim Parku Narodowym (2005) *B. thuringiensis* IS5056 syntetyzuje wyjątkowo duże, sześciennie kryształy zawierające δ -endotoksynę CryI. Opisany został nowy gen *cryIAb1*, który prawdopodobnie jest przyczyną wysokiej toksyczności względem larw szkodnika *Trichoplusia ni*, porównywalnej ze szczepami stosowanymi w produkcji komercyjnych preparatów owadobójczych Bt.

Celem niniejszej pracy było wyjaśnienie podstaw wysokiej toksyczności szczepu *Bacillus thuringiensis* podgat. *turingiensis* IS5056 oraz zbadanie struktur genetycznych i podobieństwa tych sekwencji, które umożliwiłoby określenie powiązań ewolucyjnych z innymi szczepami *B. thuringiensis*.

Wykonano badania mające na celu porównanie genomów szczepu *B. thuringiensis* IS5056 ze szczepami referencyjnymi, analizy sekwencji genomu oraz dokonano badań ekspresji genów białek owadobójczych.

W analizie sekwencji siedmiu genów metabolizmu podstawowego (MLST) *B. thuringiensis* szczep IS5056 określono jako najbardziej podobny do wysoko toksycznego HD1, HD2 o średniej toksyczności oraz T44 001 o nieokreślonej sile bójczej. Natomiast, na podstawie podobieństwa genomowych profili restrykcyjnych *NotI* najbardziej podobne są szczepy HD8 i HD201 (brak danych o toksyczności). W obu metodach szczepy T44 001 i HD201 są bliskie genetycznie szczepu IS5056. Na podstawie podobieństwa genetycznego nie można określić nawet w przybliżeniu prawdopodobnego stopnia toksyczności szczepu.

Szczep IS5056 posiada jeden z większych genomów (6,8 mln pz) wśród zsekwencjonowanych do tej pory szczepów *Bacillus thuringiensis*, co zawdzięcza obecności aż 14 plazmidów wielkości od ~6,9-328,2 tys. pz. Na plazmidach IS5056 znajdują się geny δ -endotoksyn, białek owadobójczych syntetyzowanych niezależnie od sporulacji oraz wiele dodatkowych genów białek ułatwiających kolonizację jelita owada. Wszystkie plazmidy, lub ich fragmenty, mają swoje odpowiedniki wśród homologicznych sekwencji plazmidów innych szczepów *B. thuringiensis*. Homologia ma charakter wyspowy, często zachowana jest kolejność genów w sekwencji.

Nowo opisany gen *cryIAb21* otoczony przez sekwencje ruchome, znajduje się na plazmidzie pIS56-63 o modularnej budowie, na którym kodowane są również białka funkcjonalnego systemu koniugacyjnego T4SS ułatwiającego transfer horyzontalny tegoż plazmidu. Geny *cryIAa3*, *cryIIa14*, *cry2Aa9*, *cry2Ab1* oraz *vip3Aa10* położone na wyspie patogenności plazmidu pIS56-285. Jeszcze jeden gen δ -endotoksyny *cryIBa1* wraz w kompleksem genów o częściowej homologii do wytwarzającego β -egzotoksynę jest obecny na plazmidzie pIS56-107. Na pIS56-328 kodowane są białka Vip1, Vip2 i Sip.

Szczep IS5056 charakteryzuje bardzo wysoka ekspresja genów białek owadobójczych na poziomie mRNA i białek. Jest ona związana w obecnością niepoznanych mechanizmów składania i ochrony kryształów białkowych. Klonowane geny IS5056 w innym szczepie nie ulegają tak wysokiej ekspresji na poziomie białek, pomimo większej ilości mRNA.

Synteza dużych ilości δ -endotoksyn, jak wynika z porównania szczepów o wysokiej, średniej i niskiej toksyczności, nie może być wyznacznikiem toksyczności szczepu. Silne działanie owadobójcze IS5056 jest związane z obecnością wielu plazmidów i kodowanych na nich białek owadobójczych, ich synergistycznego działania w jelicie owada. Z analizy literatury wynika również, iż obecne na plazmidach geny białek ułatwiających kolonizację oraz wspomagających proces sporulacji odgrywają istotną rolę w toksyczności szczepów. Prawdopodobnie genom IS5056, z dużą ilością plazmidów i zawartych na nich genów związanych z owadobójczością i zasiedlaniem, ukształtował się w drodze koewolucji przy częstym kontakcie z larwami owadów, których populacja często była zasiedlana przez ten szczep.