

УДК 595.132:582.796

<https://doi.org/10.31016/978-5-6053355-1-1.2025.26.362-366>

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-СКРИНИНГА ГЕНА *CRY6* ИЗ ГЕНОМА ШТАММОВ БАКТЕРИЙ *BACILLUS THURINGIENSIS* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ НА НЕМАТОДАХ РОДА *MELOIDOGYNE*

Эгамберганова А. Ш.¹,

младший научный сотрудник лаборатории общей паразитологии,
egamberganova1992@mail.ru

Саидова Ш. О.¹,

доктор философии (PhD) по биологическим наукам,
младший научный сотрудник лаборатории общей паразитологии

Акрамова Ф. Д.¹,

доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией общей паразитологии

Халилов И. М.²,

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
заведующий лабораторией молекулярной биологии

Аннотация

В настоящее время удовлетворение растущего спроса на продукцию овощных культур и повышение их урожайности являются важными задачами с одной стороны, а обеспечение продовольственной безопасности — с другой. В связи с негативным воздействием некоторых химических веществ на здоровье человека, окружающую среду и живые организмы, исследователи все больше обращаются к полезным бактериям для контроля вредителей и патогенов растений. Проведенные исследования показывают, что они оказывают эффективное воздействие на биометрические показатели растений и способствуют увеличению их урожайности. Штаммы *Bacillus thuringiensis* в процессе роста вырабатывают различные кристаллические белковые токсины (Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14, Cry21 и Cry55). Эти Cry токсины демонстрируют важную биологическую активность против паразитических нематод и других патогенных вредителей. Нами установлено, что штамм *Bt1-4*, выделенный из ризосферы корней растений, поврежденных паразитическими нематодами,

¹ Институт Зоологии Академии наук Республики Узбекистан (100053, Узбекистан, г. Ташкент, ул. Богишамол, д. 2326)

² Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан (100128, Узбекистан, г. Ташкент, ул. А. Кадыри, д. 76)

образует специфические ДНК-ампликоны для гена *Cry6* при электрофорезе. Это позволяет использовать штамм *Bt1-4* в борьбе с нематодами рода *Meloidogyne*, поскольку для гена *Cry6* в штамме *Bt1-4* зарегистрирован специфический ДНК-ампликон. В наших экспериментах установлено, что *Cry6* белки, вырабатываемые штаммом *Bt1-4*, являются перспективным средством для борьбы с нематодами.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, паразитическая нематода, *Cry6*, немотицидная активность, патоген

PCR SCREENING OF THE CRY6 GENE FROM THE GENOME OF *BACILLUS THURINGIENSIS* BACTERIAL STRAINS AND ITS APPLICATION TO NEMATODES OF THE GENUS *MELOIDOGYNE*

Egamberganova A. S. ¹,

Junior Researcher of the Laboratory of General Parasitology,
egamberganova1992@mail.ru

Saidova S. O. ¹,

PhD in Biological Sciences,
Junior Researcher of the Laboratory of General Parasitology

Akramova F. D. ¹,

Doctor of Biological Sciences, Professor,
Head of the Laboratory of General Parasitology

Khalilov I. M. ²,

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher,
Head of the Laboratory of Molecular Biology

Abstract

Currently, important tasks are to meet the growing demand for vegetable products and to increase their yields, on the one hand, and to ensure food security, on the other. Due to negative impact of some chemical substances on human health, the environment, and living organisms, researchers are increasingly looking to beneficial bacteria to control pests and plant pathogens. The conducted research shows

¹ Institute of Zoology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan (232b, Bogishamol st., Tashkent, 100053, Uzbekistan)

² Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan (7b, A. Qodiriy st., Tashkent, 100128, Uzbekistan)

that they have effective impact on plant biometrics and contribute to increasing their yield. *Bacillus thuringiensis* strains produce various crystalline protein toxins (Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14, Cry21, and Cry55) during growth. These Cry toxins exhibit significant biological activity against parasitic nematodes and other pathogenic pests. We found that the *Bt1-4* strain isolated from the rhizosphere of roots of parasitic nematode-infected plants produced specific DNA amplicons for the Cry6 gene during electrophoresis. This allows the use of the *Bt1-4* strain to control nematodes *Meloidogyne*, as a specific DNA amplicon was registered for the Cry6 gene in the *Bt1-4* strain. Our experiments found that Cry6 proteins produced by the *Bt1-4* strain were a promising means to control nematodes.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, parasitic nematode, Cry6, nematicidal activity, pathogen

Введение. Известно, что большое количество серьезных растительных патогенов как грибы, бактерии, вирусы и паразитические нематоды вызывают серьезные проблемы в растениеводстве многих стран. Это приводит к потерям урожая сельскохозяйственных культур [1]. Существует множество причин, связанных со снижением урожайности культур, включая потери, вызванные паразитическими нематодами. Паразитические нематоды являются серьезными патогенами, наносящими значительный ущерб растениям, и ежегодно приводят к потерям в сельском хозяйстве, что составляет 157 миллиардов долларов США. Потери урожая, связанные с патогенными паразитами, составляют от 20 до 40% [1].

Ризобактерии широко используются в качестве биологических средств борьбы с растительными паразитическими нематодами. Многие виды рода *Bacillus* были исследованы в снижении численности вредных насекомых и паразитических нематод [4]. Наиболее успешным патогеном, используемым для контроля растительных паразитических нематод, оказалось штаммы бактерии *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), которая в настоящее время занимает примерно 2% мирового рынка [2].

Материалы и методы. Для ПЦР амплификации гена *Cry6* была получена нуклеотидная последовательность гена с номером DQ257287.1 из базы данных NCBI, и на основе этой последовательности были спроектированы праймеры с помощью онлайн-программы Primer3 следующим образом:

F19(5'-ACGACTTTACCTAGACATTCACCT-3'),

R489(5'-ACCACATCGCGCTTTAAAATC-3');

F469(5'-GATTTTAAAGCGCGATGTGGT-3'),

R890(5'-TCTCTATCCAAATCATGCTGA GC-3').

Кроме того, были получены штаммы *Bacillus thuringiensis* *Bt1*, *Bt7*, *Bt16*, *Bt1x18*, *Bt28*, *Bt57*, *Bt84*, *Bt99*, *Bt100*, *Btmm*, а также впервые из ризосферы корней растений, поврежденных паразитическими нематодами, был выделен штамм *Bt1-4*. Геномная ДНК этих бактерий была выделена модифицированным методом Мармура [3]. Затем на выделенную ДНК была проведена реакция с праймерами F19 и R489. Для геномной ДНК, выделенной из *Bt*, температурой отжига праймеров F469 и R890 была установлена на 55 °С.

Результаты исследований. Результаты наших исследований показали, что при температуре отжига 55 °С на агарозном электрофореграммном геле ПЦР-продуктов не образовывались ампликоны для штаммов *Bt57*, *Bt99*, *Bt100*, *Btmm*. Однако только для штамма *Bt16* был получен один ПЦР-продукт, близкий к 500 п. н., который оказался специфическим.

Для остальных штаммов *Bt1*, *Bt7*, *Bt1x18*, *Bt28*, *Bt84* наблюдалось образование нескольких неспецифических ДНК-ампликонов. Затем, с целью повышения специфичности ПЦР-продукта, праймеры были использованы при температуре отжига 58 °С. При этой температуре отжига ПЦР-продукты не образовывались для штаммов *Bt7*, *Btmm*, *Bt99*, *Bt7* и *Bt1*. Для остальных штаммов были получены неспецифические фрагменты ДНК. Это указывает на то, что использованные праймеры были комплементарны нескольким участкам генома ДНК.

При электрофорезе для штамма *Bt1-4* также были получены специфические ДНК-ампликоны для гена *Сгуб*. Учитывая вышеуказанные исследования, штамм *Bt1-4* можно использовать для борьбы с нематодами рода *Meloidogyne*, так как для гена *Сгуб* в штамме *Bt1-4* был зарегистрирован специфический ДНК-ампликон.

Заключение. При электрофорезе для штамма *Bt1-4* также были получены специфические ДНК-ампликоны гена *Сгуб*. Учитывая вышеуказанные исследования, штамм *Bt1-4* можно использовать для борьбы с нематодами рода *Meloidogyne*, так как для гена *Сгуб* в штамме *Bt1-4* был зарегистрирован специфический ДНК-ампликон. Таким образом, схему действия *Сгу*-токсинов можно описать следующим образом: связывание токсина с рецептором на клеточной мембране; проникновение токсина в клеточную мембрану, образование пор или ионных каналов и уничтожение клеток.

Список источников / References

1. Ab Rahman S. F. S., Singh E., Pieterse C. M. J., Schenk P. M. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*. 2018; 267: 102–111.
2. Bravo A., Likitvivatanavong S., Gill S. S., Soberyn M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2011; 41: 423–431.
3. Xalilov I. M., Sherqulova J. P., Qobilov F. B., Xalilova F. M. Molekulyar mikrobiologiya fanidan o'quv qo'llanma. Toshkent, 2023: 216 p.
4. Yu C., Liu X., Zhang X., Zhang M., Gu Y., Ali Q., Mohamed M., Xu J., Shi J., Gao X. Mycosubtilin Produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633 Inhibits Growth and Mycotoxin Biosynthesis of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*. *Toxins*. 2021; 13: 791.