

А.В. СКРИПНИК

Національний науковий центр «Інститут експериментальної
і клінічної ветеринарної медицини», Харків
E-mail: artemskrypnyk@yahoo.com

МОЛЕКУЛЯРНА ФІЛОГЕНІЯ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *Mycobacterium* ЗА ДАНИМИ СТРУКТУРНОГО АНАЛІЗУ ГІПЕРВАРІАБЕЛЬНОЇ ДІЛЯНКИ А ГЕНА 16S РИБОСОМАЛЬНОЇ РНК



Проаналізовано філогенетичні взаємозв'язки 17 видів роду *Mycobacterium*. Філогенетичне дерево, побудоване за методом найближчого сусіда, складається з трьох кладів: швидкозростаючих, «термотолерантних» швидкозростаючих та повільнозростаючих мікобактерій, вказуючи на генетичну детермінацію ознак швидкості росту та термотолерантності. Ознака пігментоутворення, що слугує основним критерієм класифікації мікобактерій за Рунуон, не відображає їхні філогенетичні взаємозв'язки.

© А.В. СКРИПНИК, 2010

Вступ. Патогенні представники роду *Mycobacterium* зумовлюють хронічну хворобу людини і тварин – туберкульоз, який є гострою проблемою для медицини і ветеринарії, оскільки збудники туберкульозу передаються від тварин до людини й у зворотному напрямку.

Рід *Mycobacterium*, єдиний у родині *Mycobacteriaceae*, уперше був описаний К.В. Lehmann та R. Neumann у 1896 р. [1]. З часів відкриття 127 років тому Р. Кохом збудника *Mycobacterium tuberculosis* і до сьогодні вчені описують усе нові види мікобактерій [2]. Нині охарактеризовано вже понад 90 їхніх видів [2, 3].

Систематика мікобактерій доволі складна. У вітчизняній науці наразі панує класифікація мікобактерій на патогенні та атипіві. Останні, за класифікацією Рунуон, поділено на чотири групи: до перших трьох належать повільнозростаючі (понад 7 діб), до четвертої – швидкозростаючі (менше 7 діб). Класифікація за Рунуон була розроблена у 60-х роках минулого сторіччя та ґрунтується на основі фенотипових властивостей мікобактерій, а саме на засадах пігментоутворення та швидкості росту.

Для зрахування нового повільнозростаючого виду до роду *Mycobacterium* цей вид має відповідати мінімальним критеріям [4], в той же час чітких критеріїв для систематизації швидкозростаючих видів на сьогодні не сформульовано.

Для визначення окремого таксона всередині роду *Mycobacterium* не існує критерію мінімальної кількості нуклеотидних відмінностей. Розбіжність 5–15 нуклеотидів у гені 16S рибосомальної РНК, що запропонована для диференціації інших мікроорганізмів [5], не придатна для роду *Mycobacterium*, види якого споріднені більше. Міжвидова подібність всередині роду є порівняно високою – від 94,3 до 99,9 %. Близькоспоріднені види можуть відрізнитися тільки декількома нуклеотидами або, за наявності чітких фенотипових відмінностей, не відрізнитись зовсім.

Так, усі патогенні мікобактерії, що належать до *M. tuberculosis complex* (МТС), характеризуються подібністю хромосомної ДНК та ідентичністю послідовностей 16S рДНК 99,9 % [6, 7]. І навпаки, послідовність 16S рДНК декількох чітко визначених видів є гетерогенною, наприклад, у секуварів *M. avium complex* (МАС) вона сягає 7 п.н. [2].

Застосування філогенетичного аналізу нуклеїнових кислот і протеїнових послідовностей

відкриває широкі можливості дослідження таксономії, еволюції мікроорганізмів на молекулярному рівні, походження штамів, змін структурних і функціональних властивостей генів, а також реконструкції історії розвитку родів і видів [8].

Для філогенетичного аналізу найчастіше використовують гени рибосомальної РНК, які розглядаються як філогенетично значимі ділянки ДНК, в структурі яких відображається хід еволюції. Розподіл бактерій на класи, родини, роди й види зумовлено поліморфізмом послідовності рРНК, що відображено у вигляді «молекулярних маркерів», які враховують не тільки первинну послідовність, але й характеристику вторинної структури молекул РНК [2, 9].

Для вивчення філогенетичних зв'язків мікроорганізмів найчастіше використовується ген 16S рРНК в силу того, що цей ген представлений у всіх бактерій, функціонально константний та має послідовності, специфічні для мікроорганізмів на видовому рівні [10, 11]. Це послідовність приблизно 1500 п.н., в якій розташовано висококонсервативні домени (тобто послідовності, в значній мірі ідентичні у різноманітних мікроорганізмів), рівно як і помірно варіабельні (родоспецифічні) й високоваріабельні (видоспецифічні), які можуть бути використані для ідентифікації відповідно роду й виду мікроорганізму [12].

У мікобактерій рибосомальні гени зв'язані в оперон у наступному порядку: 5'-rrs(16S rRNA)—rrl(23S rRNA)—rrf(5S rRNA)—3' [13]. Цей оперон представлений однією копією у повільнозростаючих мікобактерій, в той час як швидкозростаючі види мають, як правило, дві копії [14]. 16S рДНК мікобактерій містить два гіперваріабельних локуси, так звані регіони А та Б (позиції 130–210 та 430–500 відносно картування *E. coli*), які широко використовуються для філогенетичного аналізу [9, 15–17].

Метою нашої роботи був аналіз генетичної варіабельності послідовностей гіперваріабельного регіону А 16S рДНК штамів мікобактерій, ізолюваних в Україні, конструювання філогенетичного дерева на основі отриманих даних, встановлення взаємовідносин між досліджуваними штамми, вивчення розподілу

видів мікобактерій в залежності від фенотипових ознак пігментації та швидкості росту, а також відповідності між таким розподілом та класифікацією мікобактерій за Runyon.

Матеріали та методи. *Штами мікобактерій.* В роботі досліджено послідовності гіперваріабельної ділянки А гена 16S рибосомальної РНК 67 штамів мікобактерій, ізолюваних від великої рогатої худоби, сільськогосподарської та зоопаркової птиці, молока, силосу, з навколишнього середовища на територіях Донецької, Запорізької, Кіровоградської, Київської, Луганської, Миколаївської, Одеської, Харківської, Черкаської, Чернігівської областей. До аналізу також було залучено послідовності 16S рДНК *M. tuberculosis* CDC1551 [17] та *M. bovis* AF2122/97 [18], отримані з GenBank.

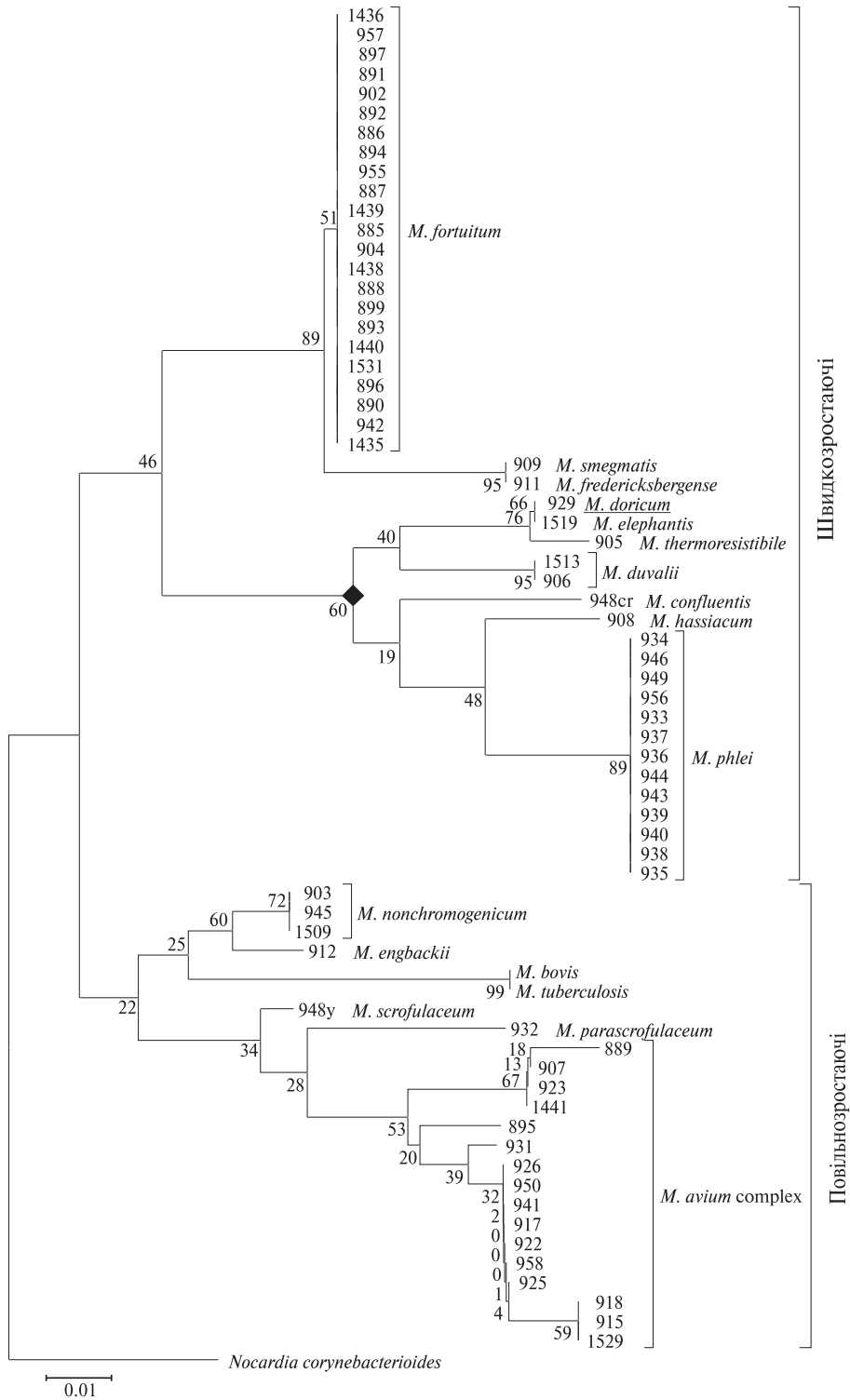
Культивування. Усі досліджувані ізоляти мікобактерій культивували на чотирьох живильних середовищах: рідкому (бульйон 7Н9 Mead-dlebrook), агарвміщуючому (7Н10 Mead-dlebrook) та яєчних (Stonebrink з піруватом та Ogawa з гліцеролом). Пробірки з посівами інкубували за температури 37–38 °С в аеробних умовах.

Секвенування. Ампліфікацію фрагмента гена 16S рибосомальної РНК довжиною 1040 п.н., що містить гіперваріабельні ділянки, здійснювали шляхом ПЛР з використанням праймерів M285 (GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG) та M264 (TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA) за такою програмою: первинна денатурація – 96 °С, 60 с; денатурація – 96 °С, 30 с; відпалювання – 58 °С, 60 с; елонгація – 72 °С, 60 с; фінальна елонгація – 72 °С, 300 с; кількість циклів – 35.

Мастер-мікс на одну пробу містив 5 мкл буфера для ПЛР (10×); 2 мкл суміші дНТФ (концентрація 2 мМ); по 1 мкл розчинів праймерів (концентрація 20 пМ); 0,2 мкл полімерази (5 од/мкл); 39,8 (38,8) мкл води для ПЛР. Зразок ДНК вносили в об'ємі 1–2 мкл.

Амплікони відділяли електрофорезом в 1%-ному агарозному гелі, смужки вирізували з гелю для подальшого очищення, яке здійснювали за допомогою Qiagen PCR Purification Columns з набору QIAquick Gel Extraction Kit («Qiagen», Німеччина).

Очищений ПЛР-продукт використовували як матрицю для сиквенс-ампліфікації гіперваріабельної ділянки А з праймером M285 та



Філогенетичні взаємозв'язки мікобактерій. Кореневе древо побудоване на підставі аналізу первинної структури гіперваріабельної ділянки А гена 16S рРНК. Масштабна лінійка показує частку нуклеотидних замін. Ромбом відзначено вузол галуження «термотолерантних» швидкозростаючих мікобактерій

Результати культивування досліджуваних штамів мікобактерій

Вид мікобактерій	Первинний ріст колоній, діб	Форма колоній	Наявність пігменту колоній	Група за класифікацією Runyon
<i>M. fortuitum</i>	2–9	S	–	4
<i>M. smegmatis</i>	5	R	–	4
<i>M. fredericksbergense</i>	4	S	Жовтий	4
<i>M. doricum</i>	42	S	Жовтий	2
<i>M. elephantis</i>	5	S	Жовтий	4
<i>M. thermoresistibile</i>	4	S	Жовтий	4
<i>M. duvalii</i>	4	R	Жовтий	4
<i>M. confluentis</i>	6	S	Креманий	4
<i>M. hassiacum</i>	5	S	Темно-жовтий	4
<i>M. phlei</i>	3–4	R	Жовтий	4
<i>M. nonchromogenicum</i>	7–10	R	–	3
<i>M. engbackii</i>	9	S	Оранжевий	3
<i>M. scrofulaceum</i>	14	S	Жовтий	2
<i>M. parascrofulaceum</i>	7	S	Жовтий	4
<i>M. avium</i> complex	7–14	R, S	–	3

із застосуванням мастер-міксу «Terminator Ready Reaction Mix (Big Dye)» з набору для секвенування (ABI PRISM Dye Terminator Cycle-Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems) згідно з інструкцією виробника. Автоматичне секвенування ДНК здійснювали на секвенаторі ABI PRISM 310 Genetic Analyser, США.

Вид досліджуваних мікобактерій визначали за допомогою баз даних GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) [19] та RIDOM (www.ridom-rdna.de) [20].

Множинне вирівнювання секвенованих послідовностей здійснювали за допомогою *CLUSTAL X* v.1.83 [21] відносно повністю секвенованої послідовності ДНК *Mycobacterium bovis* AF2122/97 з використанням наступних параметрів: штраф відкриття гепу – 15; штраф подовження гепу – 6,66; алгоритм вагової матриці ДНК – IUB; вага транзиції – 0,8; рівень ідентичності, необхідний для затримки додавання сиквенсу (затримка вирівнювання для найменш спорідненого сиквенсу) – 50 %. Менеджмент послідовностей проводили за допомогою BioEdit v.7.0.4.1 [22].

Філогенетичний аналіз та конструювання філогенетичних дерев здійснювали з використанням MEGA v.3.1 [23]. Дерева були розраховані за методом neighbour-joining за умови відсутності гепів. Матриця відмінностей була сформована на основі двопараметрової дистантної моделі Кімури. Статистичну вірогідність галуження визначали за допомогою бутстреп-аналізу, значення якого обчислювали у 500 повторях.

Як поляризатор (outgroup) використовували послідовність гена 16S рРНК виду *Nocardia corynebacterioides* DSM 20151 (GenBank AF430066), близькоспорідненого до роду *Mycobacterium* [24].

Результати досліджень та їх обговорення. За результатами секвенування послідовності гіперваріабельної ділянки А гена 16S рРНК 67 штамів було віднесено до 15 видів роду *Mycobacterium*.

Ми спостерігали відносно низьку порівняно з іншими ділянками геномної ДНК мікобактерій ідентичність послідовностей – 91,07 %, відсоток їхньої дивергенції становив відповідно $8,93 \pm 1,3$. Вміст G+C гіперваріабельної ділянки А секвенованих штамів дорівнював 59,2 моль%, в той час як вміст G+C геному представників цього роду – 59–66 моль%.

Топографія розрахованого філогенетичного дерева не є дуже усталеною. Розраховане дерево (рисунок) має тільки 12 вузлів зі значеннями бутстрепа, вищими за 50 %, з них тільки 5 (26,32 %) вузлів, які до того ж є віддаленими, мають вірогідність, підтверджену значеннями бутстрепа, вищими за 80 %.

Попри це загальна структура дерева, отриманого в результаті нашого аналізу, узгоджується зі структурою, що була одержана іншими авторами [2, 3, 9].

Розраховане філогенетичне дерево досліджуваних штамів мікобактерій складається з трьох окремих кладів. Перший клад утворюють швидкозростаючі мікобактерії, другий – «термотолерантні» швидкозростаючі мікобактерії (за класифікацією Tortoli [2]), до третього кладу увійшли повільнозростаючі мікобактерії.

Аналіз результатів культивування досліджуваних штамів мікобактерій (таблиця) показує, що такі фенотипові ознаки, як вірулентність та

пігментація, не відповідають розташуванню штамів на дереві, отриманому в результаті філогенетичного аналізу. Однак, як і очікувалось, результати аналізу генетичної спорідненості досліджуваних мікобактерій дозволили чітко поділити їх на дві великі групи: швидкозростаючі та повільнозростаючі, що відповідає традиційному розподілу мікобактерій.

Лише один штам було невільно розташовано на філогенетичному дереві. Незважаючи на дуже повільний ріст (42 доби), *M. doricum* було віднесено до групи швидкозростаючих «термотолерантних» мікобактерій. Цей факт можна пояснити подовженням петлі 10 вторинної структури 16S рДНК завдяки одонуклеотидній інсерції, що споріднює «термотолерантні» мікобактерії [2], які утворюють єдиний клад (помічено ромбом).

Штами *M. fortuitum* складають велику групу в кладі швидкозростаючих мікобактерій. Розташування 23 штамів на єдиній гілці засвідчує дуже високий ступінь гомології послідовностей гіперваріабельної ділянки А гена 16S рДНК всередині цього виду, який становив 99,5 % й не дозволив здійснити типування штамів *M. fortuitum* до підвидів. Нуклеотидні заміни у цій ділянці, виявлені під час множинного вирівнювання, можна розцінювати як синонімічні, які не впливають на таксономічне становище штамів *M. fortuitum* і, відповідно, не мають істотного значення з точки зору еволюції.

Великою та гетерогенною групою, розташованою на гілках різної довжини, представлені штамми комплексу *M. avium*. Така топографія підтверджує гетерогенність послідовностей гіперваріабельної ділянки А гена 16S рДНК цього виду, що становить 2,3 %. На підставі результатів множинного вирівнювання було диференційовано шість різних секуварів *M. avium*, хоча віднайдені нами окремі секувари не мають корелятивного зв'язку з підвидами комплексу *M. avium*, визначеними за допомогою ампліфікації специфічних їм інсерційних сиквенсів (дані не наведено).

Висновки. Використання молекулярних методів, зокрема аналіз гена 16S рРНК прокариотів, докорінно змінює таксономічні підходи традиційної систематики, що ґрунтуються на фенотипових ознаках.

Гіперваріабельна ділянка А гена 16S рРНК дозволяє видову диференціацію всередині роду *Mycobacterium* та здійснення філогенетичного аналізу на основі її сиквенсу, хоча ця послідовність має обмежений рівень поліморфізму, що викликає необхідність залучення до філогенетичного аналізу мікобактерій додаткових високоваріабельних ділянок 16S рДНК або інших генів. Крім того, множинне вирівнювання послідовностей 16S рДНК *M. tuberculosis* та *M. bovis* показало їх ідентичність, а також неможливість типування *M. fortuitum* та *M. avium* complex до підвидів.

У результаті аналізу топографії побудованого філогенетичного дерева 17 видів мікобактерій виявлено наявність трьох кладів: швидкозростаючих мікобактерій (3 види), «термотолерантних» швидкозростаючих (7 видів) і повільнозростаючих мікобактерій (7 видів).

Результати філогенетичного аналізу не підтверджують класифікацію мікобактерій за Runyon. Філогенетичні дослідження, здійснені на основі секвенування гіперваріабельної ділянки А гена 16S рДНК мікобактерій, засвідчили, що такі диференційовані ознаки, як швидкість росту та термотолерантність, генетично детерміновані. Ці ознаки дозволили поділити мікобактерії на три кладу. Разом з тим ознака пігментоутворення, покладена в основу класифікації за Runyon, не відіграла ролі в утворенні кладів та визначенні спорідненості мікобактерій.

Встановлення філогенетичних зв'язків між мікобактеріями дає можливість краще зрозуміти комплексність еволюції всередині груп мікобактерій та визначити спорідненість між ними, що має практичне значення під час застосування традиційних та молекулярних методів діагностики, а також уможливорює характеристику новоописаних видів, зокрема *M. frederiksborgense*, *M. parascrofulaceum*, *M. engbackii*, *M. doricum*, *M. hassiacum*, *M. confluentis*, *M. elephantis*.

Висловлюємо щире подяку всім співробітникам Friedrich-Loeffler-Institut, м. Йена (Jena), Німеччина, зокрема Dr. K. Sachse, Dr. I. Moser, Dr. H. Hotzel, а також Німецькій службі академічних обмінів (DAAD) за фінансову підтримку.

A. Skrypnyk
 MOLECULAR PHYLOGENY
 OF REPRESENTATIVES OF MYCOBACTERIUM
 SPECIES BASED ON STRUCTURAL ANALYSIS
 OF HYPERVARIABLE LOCUS A
 OF 16S RIBOSOMAL RNA GENE

Phylogeny of 17 *Mycobacterium* species is analyzed. A phylogenetic tree constructed using the neighbour-joining method consists of three clades: fast growing, «thermotolerant» fast growing, and slow growing mycobacteria that reveal the genetic determination of the characteristics of growth speed and thermotolerance. On the contrary, the pigment formation which serves as the main criterion of mycobacteria classification according to Runyon does not reflect any phylogenetic interrelationships of mycobacteria.

А.В. Скрыпник
 МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ
 ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *MYCOBACTERIUM*
 ПО ДАННЫМ СТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА
 ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНОГО УЧАСТКА А ГЕНА 16S
 РИБОСОМАЛЬНОЙ РНК

Проанализированы филогенетические взаимосвязи 17 видов рода *Mycobacterium*. Филогенетическое дерево, построенное методом ближайшего соседа, состоит из трех кладов: быстрорастущих, «термотолерантных» быстрорастущих и медленно растущих микобактерий, что указывает на генетическую детерминацию признаков скорости роста и термотолерантности. Признак пигментообразования, служащий основным критерием классификации микобактерий по Runyon, не отражает их филогенетические взаимосвязи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lehmann K.B., Neumann R. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. – München : 1.Auflage, Verlag J.F. Lehmann, 1896.
2. Tortoli E. Impact of genotypic studies on *Mycobacterial* taxonomy: the new *Mycobacteria* of the 1990s // Clin. Microbiol. Rev. – 2003. – 16. – P. 319–354.
3. Dostal S., Richter E., Harmsen D. Concise guide to mycobacteria and their molecular differentiation. – Würzburg : Ridom Press, 2003. – P. 206.
4. Levy-Frebault V., Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1992. – 42. – P. 315–323.
5. Fox G.E., Wisotzkey J.D., Jurtshuk P.Jr. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1992. – 42. – P. 166–170.
6. Gordon S.V., Eiglmeier K., Garnier T., Brosch R., Parkhill J., Barel B., Cole S.T., Hewinson R.G. Genomics of *Mycobacterium bovis* // Tuberculosis. – 2001. – 81 (1/2). – P. 157–163.
7. Niemann S., Richter E., Rusch-Gerdes S. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* (Aranaz et al. 1999) to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (Approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. // Int. J. Syst. and Evol. Microbiol. – 2002. – 52. – P. 433–436.
8. Retief J.D. Phylogenetic analysis using PHYLIP / Bioinformatics. Methods in molecular biology / Eds S. Misener, S.A. Krawetz. – Totowa : Humana Press, 2000. – 132. – P. 243–258.
9. Kirschner P., Boettger E.C. Species identification of Mycobacteria using rDNA sequencing / Mycobacteria protocols. Methods in molecular biology / Eds T. Parish, N.G. Stoker. – Totowa : Humana Press, 1998. – 101. – P. 349–361.
10. Boettger E.C. Approaches for identification of microorganisms // ASM News. – 1996. – 62. – P. 247–250.
11. Woese C.R. Bacterial evolution // Microbiol. Rev. – 2003. – 51. – P. 221–271.
12. Boeddinghaus B., Rogall T., Flohr T., Bloecker H., Boettger E.C. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA // J. Clin. Microbiol. – 1990. – 28. – P. 1751–1759.
13. Rastogi N., Legrand E., Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis // Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. – 2001. – 20 (1). – P. 21–54.
14. Bercovier H., Kafri O., Sella S. Mycobacteria possess surprisingly small numbers of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1986. – 136. – P. 1136–1144.
15. Rogall T., Wolters J., Flohr T., Bottger E. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium* // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1990. – 40, № 4. – P. 323–330.
16. Springer B., Stockman L., Teschner K., Roberts G.D., Boettger E.C. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods // J. Clin. Microbiol. – 1996. – 34. – P. 296–303.
17. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry III C.E., Tekaiia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.-A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S., Barel B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence // Nature. – 1998. – 393. – P. 537–544.

18. Garnier T., Eiglmeier K., Camus J.-C., Medina N., Mansoor H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris H., Atkin R., Doggett J., Mayes R., Keating L., Wheeler P.R., Parkhill J., Barrell B.G., Cole S.T., Gordon S.T., Hewinson R.G. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2003. – **100**, № 13. – P. 7877–7882.
19. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Wheeler D.L. GenBank // Nucl. Acids Res. – 2005. – **1** (33)(Database issue). – P. 34–38.
20. Harmsen D., Dostal S., Roth A., Niemann S., Rothgänger J., Sammeth M., Albert J., Frosch M., Richter E. RIDOM: comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium* species // BMC Infect. Dis. – 2003. – **3**. – P. 26.
21. Aiyar A. The use of CLUSTAL W and CLUSTAL X for multiple sequence alignment / Bioinformatics. Methods in Molecular Biology / Eds S. Misener, S.A. Krawetz. – Totowa : Humana Press, 2000. – P. 221–241.
22. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids. Symp. Ser. – 1999. – **41**. – P. 95–98.
23. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Brief. Bioinform. – 2004. – **5**. – P. 150–163.
24. Bradley S.G. Relationships among *Mycobacteria* and *Nocardiae* based upon deoxyribonucleic acid reassociation // J. Bacteriol. – 1973. – **113**. – P. 645–651.

Поступила 18.03.09