



УДК: 579.578.262(575.1)

Ситора САМАДИЙ,

НУУЗ преподаватель кафедры микробиологии и биотехнологии биологического факультета

Сохибжон АБДУСАМАТОВ,

НУУЗ старший преподаватель кафедры микробиологии и биотехнологии биологического факультета

Гульсана МАРДОНОВА,

НУУЗ докторант кафедры микробиологии и биотехнологии биологического факультета

Бахора ЖАЛОЛОВА,

НУУЗ докторант кафедры микробиологии и биотехнологии биологического факультета

Маъруфбек ИСОКУЛОВ

НУУЗ магистрант кафедры микробиологии и биотехнологии биологического факультета

E-mail: sitorasamadiy@gmail.com

Tel: +998909570789

АНРУЗ институт Генетики и экспериментальной биологии растений с.н.с. д.б.н. Т.Бозоров

ВЫДЕЛЕНИЕ ЭНДОФИТОВ И ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Аннотация

О разнообразии бактериальных эндофитов сообщалось у разных видов растений, но особый интерес был к тем, которые обладают агрономически важными свойствами. Метод пиросеквенирования гена 16S рРНК был использован для определения состава бактериальных эндофитов в листьях томата, и полученные результаты показали, что листья содержали пять типов бактерий: Proteobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia и Acidobacteria, с Proteobacteria в качестве доминирующего типа, а наименее доминирующим типом были Acidobacteria. Ожидается, что с применением современных технологий секвенирования многие проводимые исследования будут посвящены разнообразию эндофитов, для расширения знаний об экологических ролях, которые эндофиты играют во внутреннем микробиоме растений, с надеждой использовать эту информацию для повышения урожайности.

Ключевые слова: Эндофит, ген, 16S рибосомной РНК, ДНК, секвенирование, ПЦР, NCBI, Филогенетическое древо, ген банк.

ENDOFITLARNI AJRATISH VA ULARNI IDENTIFIKATSIYALASH

Annotatsiya

Bakterial endofitlarning xilma-xilligi turli xil o'simlik turlarida qayd etilgan, ammo agronomik jihatdan muhim xususiyatlarga ega bo'lganlarga alohida qiziqish bor. Pomidor barglaridagi bakterial endofitlarning tarkibini aniqlash uchun 16s rRNA genini pirosekvensiyalash usuli qo'llanilgan va natijalar shuni ko'rsatdiki, barglarda besh turdagi bakteriyalar mavjud: Proteobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia va Acidobacteria, Proteobacteria dominant turi va eng kam dominant turi Acidobacteria. Zamonaviy sekvinslash texnologiyalaridan foydalangan holda, ko'plab tadqiqotlar endofitlarning xilma-xilligiga bag'ishlanishi kutilmoqda, endofitlarning o'simliklarning ichki mikrobiomasida o'ynaydigan ekologik rollari haqidagi bilimlarni kengaytirish uchun ushbu ma'lumotlardan hosildorlikni oshirish uchun foydalanishni maqsad qilib oladi.

Kalit so'zlar: Endofit, gen, 16s ribosomal RNA, DNK, sekvinslash, PCR, NCBI, filogenetik daraxt, gen bank.

ISOLATION OF ENDOPHYTES AND THEIR IDENTIFICATION

Annotation

The diversity of bacterial endophytes was reported in different plant species, but particular interest was in those that have agronomically important properties. The 16S rRNA gene pyrosequencing method was used to determine the composition of bacterial endophytes in tomato leaves, and the results showed that the leaves contained five types of bacteria: Proteobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia and Acidobacteria, with Proteobacteria as the dominant type, and the least dominant type were Acidobacteria. It is expected that with the use of modern sequencing technologies, many ongoing studies will be devoted to the diversity of endophytes, in order to expand knowledge about the ecological roles that endophytes play in the internal microbiome of plants, with the hope of using this information to increase yields.

Key words: Endophyte, gene, 16S ribosomal RNA, DNA, sequencing, PCR, NCBI, phylogenetic tree, gene bank.

Введение. Наиболее часто используемым методом выделения эндофитов является поверхностная стерилизация здоровых органов растения, при которой растения должны быть свободны от микробов, присутствующих на их поверхности. Для выделения эндофитов могут быть использованы различные органы растительных тканей, такие как листья, корни, стебли и плоды [6]. Существуют два требования, которые необходимо учитывать при стерилизации органов растений для выделения эндофитов: (1) все присутствующие на поверхности растений микроорганизмы должны быть уничтожены и (2) процедура стерилизации должна оказывать минимальное негативное воздействие на эндофиты или не иметь его вообще [7].

Метод поверхностной стерилизации обычно проводится в лаборатории в асептических условиях. Перед проведением метода поверхностной стерилизации растительные ткани обычно несколько раз промывают проточной водопроводной водой для удаления частиц почвы с растений. Затем следует поверхностная стерилизация, при которой промытые ткани растений обрабатываются 70 % этанолом в течение 1 минуты, после чего ткани растений погружаются в гипохлорит натрия на 1 - 5 минут, при этом концентрация должна быть заранее определена, и, наконец, ткани растений

промывают стерильной дистиллированной водой несколько раз. Другие исследователи использовали другие стерилизующие агенты, такие как перекись водорода и хлорид ртути с различной концентрацией 0,05-0,2% [1].

Другие исследователи, такие как Gohain и др. (2015) использовали 0,1% Tween 20 для ополаскивания образцов растений перед проведением процесса стерилизации. Coombs и др. (1985) использовали 99% этанол для стерилизации корней, после чего промывали 3,125% гипохлоритом натрия (NaOCl) и 99% этанолом с последующим окончательным ополаскиванием стерильной водой, обработанной обратным осмосом. В другом исследовании образцы растений подвергали поверхностной стерилизации путем погружения в раствор циклогексимида (50 мкг/мл) на 4 ч, затем промывали 3,15% раствором NaOCl в течение 15 мин с последующим хранением в течение ночи в холодильнике при 4 °C. Процедура стерилизации затем проверяется путем посева последней промывной воды на питательную среду, в которой не ожидается роста.

На эффективность выделения может влиять используемая питательная среда; это будет зависеть от интересующих видов и цели исследования. Существуют различные типы сред, которые можно использовать при выделении эндофитов: минимальные, богатые и сложные среды. Минимальная среда содержит определенное количество питательных веществ, а сложная среда содержит неопределенное количество питательных веществ в больших количествах. Тип выбранной питательной среды может влиять на количество и разнообразие эндофитов, выделенных из конкретной растительной ткани, и на культивируемость некоторых эндофитных бактерий [2].

Классический подход, который используется в традиционной микробиологии для выделения и культивирования микроорганизмов из окружающей среды, обычно включает выращивание микроорганизма на разных питательных средах в разных условиях роста для получения чистых колоний, однако это приводит к тому, что другие новые микроорганизмы не изучаются, поскольку их трудно выделить с использованием культурально-зависимых методов [14]. Использование культурально-зависимых методов для выделения бактериальных эндофитов ограничено только способностью эндофитов расти на питательных средах, в то время как облигатные эндофиты не могут расти на искусственных средах и не могут быть выделены из естественной среды [11]. Было подсчитано, что более 99% прокариот, обнаруженных в окружающей среде, не могут быть культивированы, и к настоящему моменту были задокументированы только 5% видов бактерий [9].

В последнее время для идентификации и характеристики многих эндофитов, используются независимые от культивирования методы. Эти подходы включают секвенирование гена 16S рРНК (для эндофитных бактерий), внутренних транскрибируемых спейсерных областей ITS1 и ITS2 (для эндофитных грибов) или секвенирование всего генома сообществ эндофитов (метагеномика) [14]. Используя этот подход, геномную ДНК выделяют из чистой культуры эндофитной бактерии. Выделение нуклеиновых кислот можно проводить с использованием либо эффективного и хорошо оптимизированного лабораторного протокола, либо наборов для выделения бактериальной ДНК, следуя инструкциям производителя. Специфическая последовательность ДНК в бактериальном геноме, ген 16S рибосомной РНК (рРНК), которая относительно короткая, часто консервативна в пределах вида и, как правило, различается между видами, обычно является мишенью для амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). 16S рибосомная РНК, компонент малой субъединицы 30S всех прокариотических рибосом, стала предпочтительным сегментом, поскольку она высоко консервативна у разных видов бактерий и как таковая обычно используется в филогенетических исследованиях [3]. Кроме того, последовательности гена 16S рРНК содержат гипервариабельные области, которые могут обеспечивать видоспецифичные сигнатурные последовательности, что делает их полезными для идентификации бактерий [12].

Для молекулярной идентификации используются разные стратегии. Бактериальные универсальные праймеры предназначены для нацеливания на область 16S гена рРНК и синтезированы. Пара праймеров используется для ПЦР-амплификации с геномной ДНК эндофитных бактерий в качестве матрицы. ПЦР-амплифицированный фрагмент очищают и секвенируют. Нуклеотидная последовательность сравнивается с согласованными данными о последовательностях из общедоступных баз данных, таких как Национальный центр биотехнологической информации (NCBI) или Европейский архив нуклеотидов (ENA), с использованием процедуры сопоставления последовательностей BLAST N. Лучшее попадание обычно раскрывает личность изолята. Эта процедура молекулярной идентификации настолько эффективна, что ее можно использовать для выявления идентичности бактериального изолята вплоть до подвидового уровня. Вторая стратегия включает разработку пары видоспецифичных праймеров, которые используются для ПЦР-амплификации нуклеиновой кислоты, выделенной из тестируемого эндофитного бактериального изолята. Появление полосы при гель-электрофорезе указывает на то, что изолят представляет собой вид, для которого были разработаны праймеры. Этот метод молекулярной идентификации часто используется для подтверждения целей исследователей.

Идентификация бактерий. Выделение ДНК. Для выделения ДНК использовали метод термообработки [4]. Небольшие части колоний переносили в пробирки Эппендорфа на 2 мл с 1,5 мл стерильной дважды дистиллированной воды и перемешивали на вортексе Biosan B-1 в течение 10 сек. Пробирки инкубировали при 90 °C в течение 20 мин в сухом нагревателе (IKA Works) и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 мин. ДНК-содержащий супернатант отбирали и хранили при -20 °C. Наличие ДНК проверяли горизонтальным электрофорезом в геле (0,8% агарозы) и количественно определяли с помощью NanoDrop™ One (ThermoFisher Scientific).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Экстрагированную ДНК использовали в качестве матрицы для анализа гена 16S рРНК. Гены 16S рРНК амплифицировали с помощью ПЦР с использованием следующих праймеров: 16SF 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) и 16SR 5'-GAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури). Каждые 25 мкл реакционной смеси содержали 1 мкл с 15 - 40 нг ДНК; 5х стандартный реакционный буфер One Taq (BioLabs, Новая Англия) – 5 мкл; 10 mM смесь dNTP (Thermo Scientific) – 0,5 мкл; 10 mM праймер 16SF (Merck) – 0,5 мкл; 10 mM праймер 16SR (Merck) – 0,5 мкл (25 пмоль/мл); 0,1 % бычий сывороточный альбумин (TaKaRa Bio Inc.) – 1 мкл; One Taq-полимеразу (BioLabs, Новая Англия) – 0,125 мкл; MQ воду – 16,375 мкл. ПЦР проводили на термоблокере PTC-200 (BioRad). Программа ПЦР была следующей: стадия первичного нагрева 30 с при 94°C, затем 30 циклов денатурации по 15 с при 94°C, отжиг 30 с при 55°C и элонгация 1,5 мин при 68

°C, затем следовала заключительная стадия в течение 20 мин при 68 °C. Амплифицированные продукты ПЦР исследовали электрофорезом с использованием 0,8% агарозного геля, содержащего краситель GelRed.

Секвенирование и филогенетический анализ. Перед секвенированием продукты ПЦР очищали с помощью набора USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup Kit (Affymetrix, USB® Products, США) в соответствии с протоколом производителя.

Секвенирование проводили с помощью набора ABI PRISM BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) по протоколу производителя. Полученные данные были проанализированы и скорректированы с помощью программы Chromas (v. 2.6.5). Исправленные последовательности объединяли вручную с помощью EMBOSS Explorer (<http://emboss.bioinformatics.nl/>). Последовательности были идентифицированы с использованием онлайн программы BLAST и сравнения с банком данных нуклеотидов GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Эволюционная история была выведена с использованием метода присоединения соседей (Neighbor-Joining) [8]. На рисунке 19 показано оптимальное филогенетическое дерево. Над ветвями показан процент повторяющихся деревьев, в которых ассоциированные таксоны сгруппированы вместе в бутстреп-тесте (500 повторений) [5]. Дерево построено в масштабе с длинами ветвей в тех же единицах, что и эволюционные расстояния, используемые для вывода филогенетического дерева.

Построение филогенетического дерева

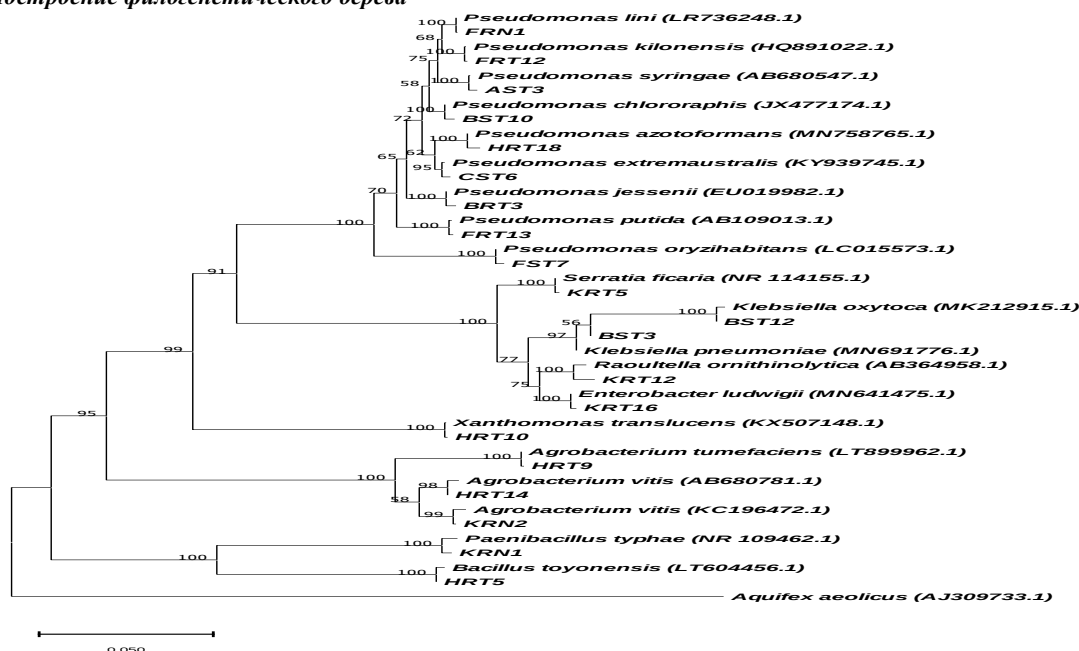


Рис. 1. Филогенетическое дерево, отражающее эволюционное родство выделенных изолятов эндофитных бактерий и ближайших родственных штаммов бактерий, зарегистрированных в GenBank.

Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода максимального составного правдоподобия (Maximum Composite Likelihood) [13] и выражены в единицах количества замен оснований на сайт. В этом анализе участвовала 41 нуклеотидная последовательность. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления). Всего в окончательном наборе данных было 1652 позиции. Эволюционный анализ проводился в программе MEGA X.

Идентифицированные нуклеотидные последовательности гена 16S рНК штаммов бактерий были допонированы и зарегистрированы в базе данных GenBank (NCBI) под номерами OP520933-OP520952.

Выводы: В результате идентификации методом изучения гена 16S рНК и выявления потенциально опасных штаммов, из 20 штаммов осталось 10: *Pseudomonas jessenii* BRT-3, *Pseudomonas chlororaphis* BST-10, *Pseudomonas extremaustralis* CST-6, *Pseudomonas lini* FRN-1, *Pseudomonas kilonensis* FRT-12, *Pseudomonas putida* FRT-13, *Pseudomonas oryzae* FST-7, *Pseudomonas azotoformans* HRT-18, *Bacillus toyonensis* HRT-5, *Paenibacillus typhae* KR-1.

Выявлено, что штаммы *Pseudomonas chlororaphis* BST-10, *Pseudomonas putida* FRT-13 и *Pseudomonas azotoformans* HRT-18 обладали ростостимулирующими свойствами, в частности фиксировали молекулярный азот воздуха, *Pseudomonas chlororaphis* BST-10 и *Pseudomonas putida* FRT-13 растворяли нерастворимые фосфаты, продуцировали АЦК-деаминазу, кроме того *Pseudomonas chlororaphis* BST-10 и *Pseudomonas putida* FRT-13 обладали рядом антифунгальных свойств: продуцировали липазу, протеазу, хитиназу, сидерофоры и цианистый водород.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmed N, Shahab S Phosphate solubilization: their mechanism genetics and application. Int J Microbiol – 2011. P. 4408 - 4412
2. Anjum N, Chandra R Endophytic bacteria: optimization of isolation procedures from various medicinal plants and their preliminary characterization. Asian J Pharm Clin Res -2015. 4: P. 233 - 238.
3. Cole JR, Chai B, Marsh TL, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, Chandra S. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. Nucleic Acids Research 31(1):. -2003. P. 442 - 443.

4. Dashti A. A, Jadaon M.M, Abdulsamad A.M, Dashti H.M. Heat Treatment of Bacteria: A simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Med J.* -2009. 41:. P. 117 - 122.
5. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* -1985. 39:. P. 783 - 791.
6. Jackson C.R, Randolph C.K, Osborn LS, Tyler H.L. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. *BMC Microbiol.* -2013. 13:. P. 274.
7. Mercado-Blanco J, Lugtenberg B. Biotechnological Applications of Bacterial Endophytes. *Curr Biotechnol.* -2014. P. 60 - 75.
8. Saitou N. and Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution.* -1987. 4:. P. 406 - 425.
9. Schloss P.D, Handelsman, Jo. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: Cutting the Gordian knot. *Genome Biol.* -2005. P. 229.
10. Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Rahalkar M. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Molecular Plant Microbe Interactions.* - 2012. P. 28 - 36.
11. Shen SY. Bacterial Endophytes: Exploration of Methods and Analysis of Community Variation. *Ecology and Evolutionary Biology.* -2013. P. 154 - 161.
12. Smit S, Widmann J, Knight R. Evolutionary rates vary among rRNA structural elements. *Nucleic Acids Research.* -2007. P. 3339 - 3354.
13. Tamura K., Nei M., and Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* -2004. P. 11030 - 11035.
14. Turner TR, James EK, Poole PS. The plant microbiome. *Genome Biology.* -2013. P. 209 - 213.