

«Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», доктор биологических наук, пос. ВНИИСС, Российская Федерация; e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Федорин Дмитрий Николаевич – научный сотрудник отдела генетики и биотехнологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», кандидат биологических наук, пос. ВНИИСС, Российская Федерация; e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Information about authors

Vasilchenko Yelena Nikolayevna – Senior Researcher of the Department of Genetics and Biotechnology, FSBSI «All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar named after A.L. Mazlumov», village VNISS, Russian Federation; e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Fedulova Tatyana Petrovna – Head of the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, FSBSI «All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar named after A.L. Mazlumov», DSc (Biology), village VNISS, Russian Federation; e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Fedorin Dmitry Nikolaevich – Researcher of the Department of Genetics and Biotechnology, FSBSI «All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar named after A.L. Mazlumov», PhD (Biology), village VNISS, Russian Federation; e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

DOI: 10.12737/article_5c1a3206dad755.50307403

УДК 633.63:575:632.52.577.1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM*

кандидат биологических наук **А. А. Налбандян**¹

доктор сельскохозяйственных наук **Н. В. Безлер**¹

¹ – ФГБНУ «Всероссийский НИИ сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова»
пос. ВНИИСС, Российская Федерация

Целью работы являлось апробирование и подбор родо-специфических пар праймеров для достоверной идентификации азотфиксирующих микроорганизмов – грамтрицательных бактерий рода *Azospirillum*. В ходе работы была модифицирована методика экстракции суммарной ДНК изолятов бактерий из их биомассы – чистой культуры. Проводились экспериментальные исследования по подбору родо-специфического молекулярного маркера для надежной идентификации. Были оптимизированы условия проведения полимеразно-цепной реакции (ПЦР). Амплификация суммарной ДНК бактерий с праймером Az16S-A F / Az16S-A R выявила у всех изучаемых номеров наличие ампликона размером в 640 п. н., что подтверждает принадлежность всех трех исследуемых образцов к роду *Azospirillum*. В результате проведенных экспериментов апробирован и отобран родо-специфический праймер Az16S-A F / Az16S-A R, позволивший выделить штаммы рода *Azospirillum* в чистой культуре (3 штамма). Полученные экспериментальные данные по молекулярному маркеру позволяют образцам штаммов, принадлежность которых к данному роду подтверждена ПЦР анализом, служить как положительным, так и отрицательным контролем при дальнейшей работе с бактериями.

Ключевые слова: ДНК, полимеразно-цепная реакция, праймер, бактерии, *Azospirillum*.

MOLECULAR IDENTIFICATION OF AZOTFIXING BACTERIA *AZOSPIRILLUM*

PhD (Biology) **A. A. Nalbandyan**¹

DSc (Agriculture) **N. V. Bezler**¹

¹ – FSBSI «All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar named after A.L. Mazlumov»
village VNISS, Russian Federation

Abstract

The aim of the work was to test and select genus-specific primer pairs for the reliable identification of nitrogen-fixing microorganisms - gram-negative bacteria of *Azospirillum* genus. In the work, the technique for extracting total DNA of bacterial isolates from their biomass (pure culture) has been modified. Experimental studies have been con-

ducted on the selection of a genus-specific molecular marker for reliable identification. The conditions of the polymerase chain reaction (PCR) have been optimized. Amplification of total bacterial DNA with the primer Az16S-A F / Az16S-A R has revealed the presence of an amplicon measuring 640 bp in all studied numbers, which confirms that all three studied samples belong to *Azospirillum* genus. As a result of the experiments, the genus-specific primer Az16S-A F / Az16S-A R has been tested and selected, allowing isolating strains of *Azospirillum* genus in pure culture (3 strains). The obtained experimental data on the molecular marker allow the samples of the strains, whose affiliation to this genus is confirmed by PCR analysis, to serve as both positive and negative controls for further work with bacteria.

Keywords: DNA, polymerase chain reaction, primer, bacteria, *Azospirillum*.

Зерновые культуры – полноценные компоненты зернопаропропашного севооборота, являются одним из основных предшественников сахарной свеклы. Растения зерновых культур в природных условиях существуют в ассоциации с комплексом различных полезных микроорганизмов, оказывающих положительное влияние на рост и развитие растений. Симбиотические и ассоциативные микроорганизмы способствуют эффективному потреблению растениями минеральных веществ, снабжают их витаминами и регуляторами роста и защищают от фитопатогенов и вредителей. В настоящее время бактерии, обладающие совокупностью полезных свойств, являются перспективными объектами для использования в сельскохозяйственной практике. К ним относятся ризобактерии PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), способные повысить урожайность культур в зависимости от видов растений и среды обитания. В этом отношении большое значение имеют бактерии рода *Azospirillum* [1]. Представители *Azospirillum* sp. относятся к аэробным, грамотрицательным α -протеобактериям. Считается, что стимуляция роста растений обусловлена также фиксацией азота штаммами этих бактерий, которые способствуют накоплению азота и для последующих культур севооборота, в частности сахарной свеклы. *Azospirillum* sp. используются в качестве биоудобрений и био-пестицидов, что в последнее время стало крайне актуальным из-за необходимости сокращения химической нагрузки на поля [3, 9].

Идентификация бактерий только на основании морфологических, культуральных, физиолого-биохимических признаков в настоящее время считается недостаточной, поскольку под воздействием различных факторов многие виды обладают высоким уровнем фенотипической изменчивости. Молекулярно-генетические методы идентификации зарекомендовали

себя как надежные и независимые от внешних факторов. Недавние достижения в области секвенирования ДНК облегчили обнаружение и идентификацию целевых микробов [2, 7, 10]. Для разработки родоспецифичных праймеров к *Azospirillum* sp. был применен RAPD-анализ полиморфной ДНК бактерий и секвенирование участка универсального для всех прокариот гена 16S рРНК (рДНК). На основании проведенных исследований иностранными авторами были сконструированы 3 пары родоспецифичных праймеров для быстрой и надежной идентификации изолятов *Azospirillum* sp. методом ПЦР. Данный метод позволяет обнаружить даже малые количества искомой бактерии [8].

Целью данной работы являлось апробирование родоспецифичных праймеров и отбор молекулярно-генетического маркера, позволяющего идентифицировать микроорганизмы – штаммы бактерий *Azospirillum* sp. в чистой культуре. Предложенный метод послужит полезным инструментом для выделения множества аборигенных изолятов бактерий рода *Azospirillum* из ризопланы и ризосферы зерновых культур.

В качестве материалов для проведения молекулярно-генетического анализа были использованы чистые культуры бактерий, выделенные из ризосферы и ризопланы зерновых культур (ячмень, озимая пшеница) на родоспецифической для *Azospirillum* sp. агаризованной среде. Для осуществления экспериментов экстрагировалась ДНК бактерий: 2 мл суточной культуры ресуспендировали в ТЕ-буфере на водяной бане около 10 мин, с дальнейшим применением 20 % SDS и 8M ацетата аммония. Полученный осадок бактериальной ДНК растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера. Концентрацию нуклеиновой кислоты определяли в 1 % агарозном геле [4, 5, 6].

Для проведения ПЦР-амплификации были подобраны следующие параметры:

1. Предварительная денатурация: 95 °С в тече-

ние 5 минут;

2. 40 циклов: 94 °С – 60 с; температура отжига – 60 с; 72 °С – 120 с;

3. Финальный этап элонгации цепи: 72 °С – 10 мин.

Качественный и количественный анализ ПЦР-продуктов (ампликонов) проводился при помощи электрофореза в 1,8 % агарозном геле, в присутствии TBE буфера и бромистого этидия. Визуализация результатов происходила под УФ-лучами и фиксировалась гель-документирующей системой.

Изоляты бактерий были протестированы с помощью следующих трех пар родоспецифичных праймеров [8]:

1. Az16S B/F - 5'-GCGGTAATACGAAGGGGGCK-3'
Az16S B/R - 5'-GTAGCACGTGTGTAGCCCAAC-3'
2. Az16S A/F - 5'-GCGGTAATACGAAGGGGGCK-3'
Az16S A/R - 5'-CTTGTACCCGGCAGTTCCACCAG-3'
3. Az16S C/F - 5'-GCGGTAATACGAAGGGGGCK-3'
Az16S C/R - 5'-CATCCCCGCCTTCCCTCCGGC-3'

Для проведения молекулярно-генетических исследований была экстрагирована ДНК из бактериальной суспензии. Визуально качество выделенной ДНК оценивалось на электрофореграмме (рис. 1).

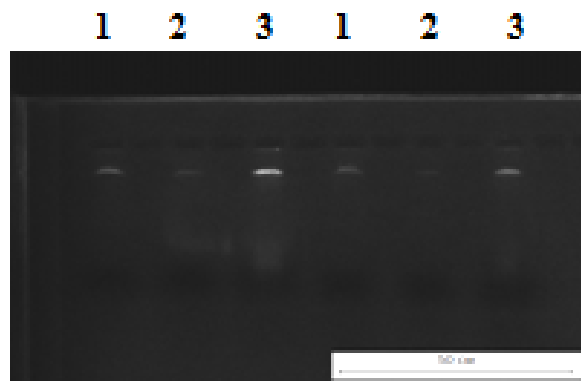


Рис. 1. Электрофореграмма образцов ДНК бактерий. Дорожки (образцы сахарной свеклы): 1 – 3 – ДНК по 5 мкл; 1 – 3 – ДНК по 3 мкл

Полученная относительно чистая, не деградированная ДНК была использована в дальнейшей работе.

В ходе работы проводилась амплификация ДНК-образцов 3 изолятов бактерий, предположительно относящихся к *Azospirillum* sp. Использовались 3 пары молекулярно-генетических маркеров (Az16S-A F/R, Az16S-B F/R, Az16S-C F/R).

Амплификация с парой праймеров Az16S-B F/R не обнаружила одиночных ампликонов ожидаемой длины ни у одного образца. Пара праймеров Az16S-C F/R выявила искомым ПЦР-продукт только у одного образца. Молекулярный маркер Az16S-A F/R позволил обнаружить ампликон длиной в 640 п. н. у всех трех ДНК-образцов (рис. 2). Это подтверждает принадлежность изучаемых бактерий к роду *Azospirillum*.

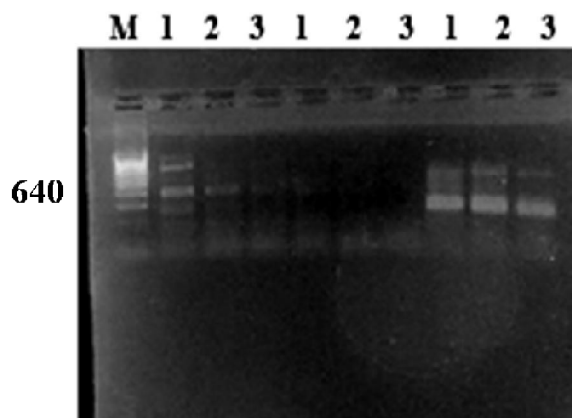


Рис. 2. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов, полученных с помощью праймеров Az16S-C F/R, Az16S-B F/R, Az16S-A F/R. 1 – 3: ДНК бактерий, М – маркер молекулярных масс (Сибэнзим) 100-1500 п. н.

В результате проведенных молекулярно-генетических экспериментов модифицирован способ выделения ДНК бактерий из чистой культуры. Применяли протокол выделения нуклеиновой кислоты, включающий ресуспензию бактериальной массы в TE-буфере на водяной бане.

Апробированы три пары праймеров для идентификации аборигенных штаммов *Azospirillum* sp. В чистой культуре. Выбран молекулярный маркер Az16S-A F/R, проявляющий наиболее высокую комплементарность к нуклеотидной последовательности консервативного участка гена 16S рРНК, характерного для представителей данного рода. Указанный праймер рекомендуется для идентификации бактерий рода *Azospirillum*, что имеет важное теоретическое и практическое значение для микробиологических исследований.

References

1. Bashan Y., Holguin G., De-Bashan L. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances Can J Microbiol, 2004, Vol. 50, pp. 521-577.
2. Braun-Kiewnick A. [et al.] Development of species-, strain- and antibiotic biosynthesis-specific quantitative PCR assays for *Pantoea agglomerans* as tools for biocontrol monitoring. Journal of Microbiological Methods, 2012, Vol. 90, pp. 315-320.
3. Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. AMB Express, 2018, Vol. 8, pp. 73-85.
4. Hussein A., Nalbandyan A., Fedulova T., Bogacheva N. Efficient and nontoxic DNA isolation method for PCR analysis. Russian Agricultural Sciences, May 2014, Vol. 40, Issue 3, pp. 177-178.
5. Mahuku G. S. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA Plant Mol. Biol. Rep, 2004, Vol. 22, pp. 71-81.
6. Rogers S., Bendich A. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Molecular Biologi, 1985, Vol. 5, pp. 67-69.
7. Scarpellini M., Franzetti L., Galli A. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. FEMS Microbiology Letters, 2004, Vol. 236, pp. 257-260.
8. Shime-Hattori A., Kobayashi S., Ikeda S., Asano R. A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria. Journal of Applied Microbiology, 2011, Vol. 111, pp. 915-924.
9. Spilker T., Coenye T., Vandamme P., Puma J. Li PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other *Pseudomonas Species* Recovered from Cystic Fibrosis Patients. Journal of Clinical Microbiology, 2004, Vol. 42, no 5, pp. 2074-2079.
10. Suaad S. Microbiological and molecular identification of bacterial species isolated from nasal and oropharyngeal mucosa of fuel workers in Riyadh, Saudi Arabia. Saudi J of Biological Sciences, 2017, Vol. 24, no 6, pp. 1281-1287.

Сведения об авторах

Налбандян Арпине Артаваздовна – старший научный сотрудник ФГБНУ «Всероссийский НИИ сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», кандидат биологических наук, п. ВНИИСС, Воронежская область, Российская Федерация; e-mail: arpnal@rambler.ru.

Безлер Надежда Викторовна – заведующая лабораторией микробиологических исследований почвы ФГБНУ «Всероссийский НИИ сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», доктор сельскохозяйственных наук, профессор, п. ВНИИСС, Российская Федерация; e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Information about authors

Nalbandyan Arpine Artavazdovna – Senior researcher, FSBSI «All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar named after A.L. Mazlumova», PhD (Biology), village VNISS, Russian Federation; e-mail: arpnal@rambler.ru.

Bezler Nadezhda Viktorovna – Head of soil ecological-microbiological studies laboratory, FSBSI «All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar named after A.L. Mazlumova», DSc (Agriculture), Professor, village VNISS, Russian Federation; e-mail: biotechnologiya@mail.ru.