

УДК 575: 631.46: 633.16

«321»

© 2020

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ДОМІНАНТНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ РОДІВ *BACILLUS* І *PHYLLOBACTERIUM*, ІЗОЛЬОВАНИХ З РИЗОСФЕРИ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО

М.О. Кіроянц¹, Т.І. Патика², М.В. Патика³

² доктор сільськогосподарських наук

³доктор сільськогосподарських наук, член-кореспондент НААН
Національний університет біоресурсів і природокористування України
вул. Героїв Оборони, 13, м. Київ, 03041, Україна

e-mail: ¹midia1993@gmail.com, ²patykatatyana@gmail.com, ³npatyka@gmail.com
ORCID: ¹0000-0003-2890-8304, ²0000-0002-2506-8699, ³0000-0003-1316-0516

Надійшла 22.01.2020

Мета. Визначити таксономічне положення домінантних мікроорганізмів ризосфери ячменю ярого — представників родів *Bacillus* і *Phyllobacterium* — на основі філогенетичного аналізу нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК. **Методи.** Для ідентифікації бактерій використовували аналіз нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК. Бактеріальну ДНК виділяли з суспензії бактеріальних клітин з використанням набору GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific), згідно з протоколами виробника. Ампліфікацію гена 16S рРНК проводили з праймерами 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') і 1492r (5'-CGGTTACCTGTTCGA CTT-3'). **Результати.** Визначено таксономічне положення домінантних мікроорганізмів ризосфери ячменю ярого (штами *Phyllobacterium ifriqiense* 1 та *Bacillus methylotrophicus* 10 робочої колекції кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України) на основі філогенетичного аналізу нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК. Нуклеотидну послідовність фрагменту гена 16S рРНК зазначених вище штамів зареєстровано в міжнародній базі даних GenBank (NCBI) за №: MK947049, MK947055 та MK947050, MK947056 відповідно. Отриманий амплікон розміром ~ 1500 п.н. вирізали з гелю і очищували за допомогою набору GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Концентрацію ДНК визначали на спектрофотометрі DS-11FX+ (DeNovix, США). Очищений ПЛР-продукт секвенували у двох напрямках на приладі «Genetic Analyzer 3130» (Applied Biosystems, США) з використанням набору реактивів «BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit». **Висновки.** За аналізу виділених штамів *Phyllobacterium ifriqiense* 1 та *Bacillus methylotrophicus* 10 за спорідненістю нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК виявлено 99% подібності із сиквенсами типових представників відповідних видів. Перспективні штам *Phyllobacterium ifriqiense* 1 та *Bacillus methylotrophicus* 10 можна успішно інтродукувати у метагеном аборигенних формувань ґрунту як біоагентів мікробних препаратів, а також вони можуть забезпечити метаболічні функції біологічних систем ризосфери ячменю, бути практично цінними агентами біопротекторної дії, індукції системної стійкості рослин щодо фітопатогенів.

Ключові слова: секвенування, 16S рРНК, *Phyllobacterium ifriqiense*, *Bacillus methylophilus*, філогенетична ідентифікація.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202005-06>

Мікробний біом і метагеном біоценозу ґрунту зумовлюють основну функціональну роль у кругообігу речовин та енергії і є ключовими складовими елементами трансформації органічних решток, визначають мінералізацію й іммобілізацію біогенних елементів. Тому дослідження біому ґрунтових мікроорганізмів (особливо домінантних штамів) є науковою основою для розробки заходів, спрямованих на розширене відтворення родючості чорноземів. Нуклеотидний склад ґрунтової ДНК досліджує структурна метагеноміка за допомогою секвенування фрагментів геному або окремих генів, які є філогенетичними маркерами біорізноманіття. Як філогенетичний маркер для прокаріот використовували ген 16S рРНК [1–3] для вивчення таксономічного положення домінантних бактеріальних угруповань ризосфери рослин ячменю ярого.

Різноманітність мікроорганізмів, асоційованих з кореневою системою рослин, величезна і становить десятки тисяч видів. Однак лише недавно визнано колосальну роль мікробіому в житті рослини і подано ідею про розгляд його як другого геному рослини. Розуміння механізмів формування та функціонального навантаження ризосферного мікробіому дасть змогу розробити ефективні системи підвищення продуктивності рослин, збагатити наші знання в галузі екології рослинно-мікробних взаємодій. Нині одним із найважливіших об'єктів дослідження стає метагеном — сукупний генетичний матеріал екосистеми [4, 5].

Спочатку було вивчено особливості формування мікробного комплексу чорнозему типового в агрофітоценозі ячменю ярого, проведено порівняльну характеристику чисельності основних фізіологічних і таксономічних груп мікроорганізмів, проаналізовано якісний склад, структуру та різноманіття мікробного комплексу, що формується в онтогенезі ячменю ярого за різних систем землеробства. Чисельність мікроорганізмів основних фізіологічних

і таксономічних груп визначали за класичним методом висіву ґрунтових суспензій на відповідні елективні поживні середовища. За допомогою визначення показників біорізноманіття Шеннона та домінування Сімпсона у різні фази онтогенезу ячменю ярого був проведений аналіз формування мікробіоти та виділені домінантні штами мікроорганізмів ризосфери ячменю ярого. Лабораторними методами здійснено ідентифікацію та класифіковано домінантні штами мікроорганізмів, встановлено їхню приналежність до родів *Bacillus* і *Phyllobacterium*.

Сучасні молекулярно-біологічні методи відкривають широку перспективу та нове розуміння щодо філогенетичного і функціонального різноманіття ризосферних мікробних угруповань. Подальший комплексний аналіз дає змогу провести оцінку таксономічної та функціональної структури домінантних штамів мікроорганізмів за допомогою вибору ген-специфічних праймерів і секвенування повнорозмірних геномів [2, 6].

Ізольовані домінантні штами мають високий ступінь асоціативності з рослиною, адаптовані до ґрунтово-кліматичних умов центральної частини України, здатні зв'язувати азот атмосфери, стимулювати ріст і розвиток рослин, що позитивно впливає на показники продуктивності ячменю.

Основним інструментарієм філогенетичних досліджень є порівняння первинних нуклеотидних послідовностей та послідовна візуалізація результатів. Як філогенетичний маркер використовують структуру варіабельних ділянок гена 16S рРНК.

Мета досліджень — визначити таксономічне положення домінантних мікроорганізмів ризосфери ячменю ярого — представників родів *Bacillus* і *Phyllobacterium* — на основі філогенетичного аналізу нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК.

Матеріали та методика досліджень. Бактеріальну ДНК виділяли з суспензії бактеріальних клітин з використанням

набору GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific), згідно з протоколом виробника. Ампліфікацію гена 16S рРНК проводили з праймерами 27f (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3') і 1492r (5'-CGGTTACCTTGTACGA CTT-3') за такого температурного режиму: 95°C, 2 хв; 30 циклів — 95°C, 30 с; 55°C, 45 с; 72°C, 90 с; кінцева елонгація 72°C, 7 хв. ПЛР-суміш об'ємом 25 мкл містила 12,5 мкл 2x DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific), 30 пкмоль кожного праймера та 50 нг ДНК. ПЛР проводили на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 (Eppendorf, Німеччина). Продукти ПЛР розділяли у 1,7%-му агарозному гелі, що містив 0,01% бромистого етидію. Результати візуалізували в УФ-світлі. Отриманий амплікон розміром ~ 1500 п.н. вирізали з гелю і очищували за допомогою набору GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Концентрацію ДНК визначали на спектрофотометрі DS-11FX+(DeNovix, США). Очищений ПЛР-продукт секвенували у двох напрямках на приладі «Genetic Analyzer 3130» (Applied Biosystems, США) з використанням набору реактивів «BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit».

Отриману нуклеотидну послідовність порівнювали з даними бази GenBank за допомогою програми NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Філогенетичний аналіз, вирівнювання нуклеотидних послідовностей 16S рРНК представників різних видів родів *Bacillus* і *Phyllobacterium* здійснювали за допомогою програми MEGA 10 [7, 8]. Дендрограму філогенетичних зв'язків будували за допомогою методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining)

з використанням 2-параметричної моделі Кімури по 1000 реплікам бутстреп-аналізу. Послідовності гена 16S рРНК референтних культур бактерій родів *Bacillus* і *Phyllobacterium* використано з бази даних GenBank.

Результати досліджень. У результаті проведених досліджень отримано нуклеотидну послідовність фрагмента гена 16S рРНК штаму *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 загальною довжиною 991 нуклеотид та штаму *Bacillus methylotrophicus* 10 — 1126 нуклеотидів. Первинний порівняльний аналіз сиквенсів досліджуваних штамів з послідовностями гена 16S рРНК, задепонованими у бази даних GenBank, виявив 99% подібності штамів до сиквенсів типових представників відповідних видів. Нуклеотидні послідовності штаму *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 зареєстровано у базі GenBank під № МК947049 і МК947055, а *Bacillus methylotrophicus* 10 — МК947050 і МК947056 відповідно.

Філогенетичні зв'язки досліджуваних штамів з референтними штамми бактерій родів *Phyllobacterium* і *Bacillus* отримано порівнянням послідовностей гена 16S рРНК. Цифрами вказана частота групування штамів у відповідні кластери (100 реплік вихідного набору послідовностей ДНК, випадково змінених методом bootstrap) (рисунки 1 і 2).

Відомо, що домінантні ризосферні мікроорганізми мають високий ступінь асоціативності з рослинами, адаптованими до ґрунтово-кліматичних умов [9, 10]. Вони здатні зв'язувати азот атмосфери, стимулювати ріст і розвиток рослин, що забезпечує підвищення продуктивності зернових

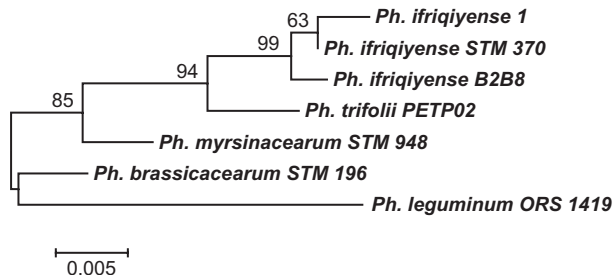


Рис. 1. Філогенетичні зв'язки штаму *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 і референтних штамів роду *Phyllobacterium*

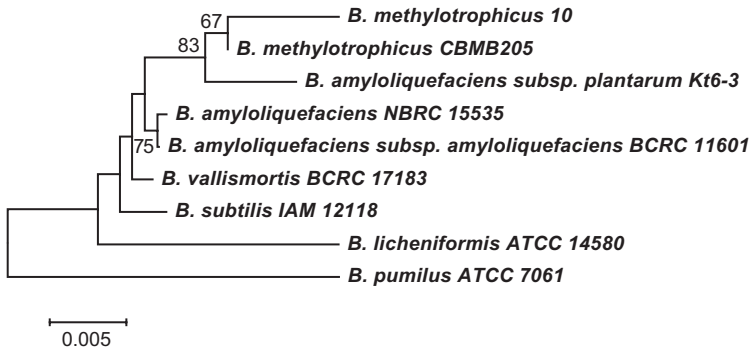


Рис. 2. Дендрограма філогенетичних зв'язків штамів роду *Bacillus* за нуклеотидним складом (щодо штаму *Bacillus methylotrophicus* 10)

культур. Виділений з апікальної частини коренів ячменю штам асоціативних бактерій *Phyllobacterium ifriqiense* 1 виявився активним азотофіксатором з властивостями стимуляції росту і розвитку рослин ячменю ярого. Виділений штам *Bacillus methylotrophicus* 10, пов'язаний з формуванням кореневої системи рослин, позитивно впливає на морфометричні показники ячменю ярого [2, 11, 12].

Рослинна ризосфера є унікальним ґрунтовим середовищем, особливість якого полягає в постійному надходженні низькомолекулярних сполук у вигляді кореневих ексудатів. У ризосфері підтримується велика кількість метаболічно активної

мікрофлори, біомаса і поліморфізм якої можуть бути вищими на кілька порядків, ніж загалом в орному шарі ґрунту [13–15]. Взаємодія між рослинами і мікроорганізмами і між ними самими значною мірою не розкрита, а проведені дослідження свідчать про виняткову складність цієї взаємодії і чинників, які на неї впливають. Саме ці чинники роблять цю систему перспективним середовищем для пошуку нових універсальних агентів біопрепаратів (штамів), що ляжуть в основу розробки біотехнологій формування рослинно-мікробних взаємодій у фітоагроценозах зернових культур.

Висновки

Стратегічним напрямом сучасного землеробства є розкриття його адаптаційного потенціалу через призму використання інноваційних біологічних засобів відтворення родючості ґрунту та отримання екологічно безпечної продукції рослинництва. Серед таких засобів, що застосовуються в аграрних технологіях вирощування зернових культур, важливу роль відіграють мікробні агенти поліфункціональної дії для забезпечення трофічної структури метаболізму біологічних систем у ризосфері рослин, біопротекторної дії, індукції системної стійкості рослин проти патогенів і фітофагів. Недостатня ефективність наявних

мікробних препаратів при вирощуванні ячменю ярого пояснюється тим, що в посівах сучасних сортів застосовують інтенсивні технології (багаторазові підгодівлі азотними добривами, обробку хімічними засобами захисту рослин від фітопатогенів, фітофагів і бур'янів). Такі умови формують мікробоценоз, що не сприяє інтродукції та адаптації штамів-біоагентів і, відповідно, функціонуванню асоціативної системи бактерій з рослинами. Тому виділені нами перспективні штами *Phyllobacterium ifriqiense* 1 та *Bacillus methylotrophicus* 10 можна успішно інтродуктувати у метагенном або ризогенних формувань ґрунту як біоагентів

мікробних препаратів, а також вони можуть забезпечити метаболічні функції біологічних систем ризосфери ячменю,

бути практично цінними агентами біопротекторної дії, індукції системної стійкості рослин проти патогенів.

Kiroiants M.¹, Palyka T.², Palyka M.³

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 13 Heroiv Oborony Str., Kyiv 03041, Ukraine; e-mail: ¹midia1993@gmail.com, ²patykatatyana@gmail.com, ³npalyka@gmail.com; ORCID: ¹0000-0003-2890-8304, ²0000-0002-2506-8699, ³0000-0003-1316-0516

Phylogenetic analysis of dominant microorganisms of the genera *Bacillus* and *Phyllobacterium*, isolated from the rhizosphere of spring barley

Goal. To determine the taxonomic position of dominant microorganisms in the rhizosphere of spring barley — the representatives of the genera *Bacillus* and *Phyllobacterium* — based on phylogenetic analysis of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene. **Methods.** To identify the bacteria they used the analysis of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene. Bacterial DNA was extracted from the suspension of bacterial cells using GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) according to the protocols of the manufacturer. Amplification of the 16S rRNA gene was performed with primers 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492r (5'-CGGTTACCTTGTTCAGACTT-3'). **Results.** The taxonomic position is determined by dominant microorganisms in the rhizosphere of spring barley (strains of *Phyllobacterium ifriqiense* 1 and *Bacillus methylotrophicus* 10 from working collection of the Department of ecobiotechnology and biodiversity, NULES of Ukraine) based on phylogenetic analysis

of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene. The nucleotide sequence of a fragment of the gene 16S pPHK of the mentioned above strains was registered in the international database GenBank (NCBI) with numbers: MK947049, MK947055, and MK947050, MK947056 respectively. Obtained amplicon in size of ~1500 BP was cut out from the gel and purified using GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific). The DNA concentration was determined on spectrophotometer DS11FX+ (DeNovix, USA). The purified PCR-product was sequenced in two directions on the device 3130 «Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, USA) using a set of reagents «BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit». **Conclusions.** Analysis of the isolated strains of *Phyllobacterium ifriqiense* 1 and *Bacillus methylotrophicus* 10 for the similarity of the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene revealed 99% similarity with sequences of typical representatives of the species concerned. Promising strain *Phyllobacterium ifriqiense* 1 and *Bacillus methylotrophicus* 10 can be successfully introduced in the metagenome of aboriginal groups of the soil as biological agents of microbial preparations. They can provide metabolic functions of biological systems of the rhizosphere of barley, and be practically valuable agents of bioprotector action, induction of systemic resistance of plants against phytopathogens.

Key words: sequencing, 16S rRNA, *Phyllobacterium ifriqiense*, *Bacillus methylotrophicus*, phylogenetic identification.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202005-06>

Бібліографія

1. Андронов Е.Е., Пинаев А.Г., Першина Е.В., Чижевская Е.П. Научно-методические рекомендации по выделению высокоочищенных препаратов ДНК из объектов окружающей среды. СПб., 2011. 23 с.
2. Gadzalo Y.M., Palyka M.V., Zarishnyak A.S. Agrobiology of the Rhizosphere of Plants. Kyiv: Agrarian Science, 2015. 368 p.
3. Palyka N.V., Kolodyazhnyi A.Y., Ibatullin I.I. The Evaluation of Metagenome and Detection of Functionally Significant Polymorphisms of Prokaryotes of Soil by Method of Pyrosequencing. *Mikrobiol. Z.* 2016. 78(2). P. 43–51.
4. Белимов А.А., Иванчиков А.Ю., Юдкин Л.В. и др. Характеристика и интродукция новых штам-

мов ассоциативных ростстимулирующих бактерий, доминирующих в ризоплане проростков ячменя. *Микробиология.* 1999. 68, № 3. С. 392–397.

5. Palyka T.I., Palyka N.V., Palyka V.F. Phylogenetic Interrelations Between Serological Variants of *Bacillus thuringiensis*. *Biopolym. Cell.* 2009. 25(3). P. 240–244.

6. Гиляров М.С., Кривоулицкий Д.А. Жизнь в почве; отв. ред. А.Г. Воронов. Ростов на Дону: Изд-во Ростов. ун-та, 2003. 240 с.

7. Hodkinson B. P., Grice E. A. Next-generation sequencing: a review of technologies and tools for wound microbiome research. *Advances in wound care.* 2015. T. 4. № 1. С. 50–58.

8. DeSantis T. Z., Hugenholtz P., Larsen N. et al.

Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology*. 2006. Т. 72. № 7. С. 5069–5072. doi:10.1128/AEM.03006-05

9. Bowles T.M., Raab P.A., Jackson L.E. Root expression of nitrogen metabolism genes reflects soil nitrogen cycling in an organic agroecosystem. *Plant and Soil*. 2015. V. 392(1–2). P.175–189.

10. Pérez-Jaramillo J.E., Mendes R., Raaijmakers J.M. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant molecular biology*. 2016. V. 90 (6). P. 635–644.

11. Dodds P. N., Rathjen J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen

interactions. *Nature Reviews Genetics*. 2010. Т. 11. № 8. P. 539–548. doi:10.1038/nrg2812

12. Hardoim P. R., van Overbeek L. S., van Elsas J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*. 2008. Т. 16. № 10. P. 463–471.

13. Forney L.J., Zhou X., Brown C.J. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology*. 2004. № 7. P. 210–220.

14. Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology*. 1998. Т. 5. № 10. P. R245–R249.