

¹Институт микробиологии Академии Наук Республики Узбекистан,
ул. А. Кадыри, 76, Ташкент, 100128, Узбекистан

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, Д03680, Украина

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ РОДА *ANABAENA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РИЗОСФЕРЫ ХЛОПЧАТНИКА

Идентификация нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК цианобактерии *Anabaena variabilis* шт. 21 (Uzb1) показала, что штамм из ризосферы хлопчатника Узбекистана на 99 % гомологичен с известным штаммом *Anabaena variabilis* (EF488831.1). В дополнение к морфологическим признакам (наличие акинет и гетероцист) это указывает на филогенетическое родство выделенного штамма цианобактерий *A. variabilis* Uzb1 с другими описанными представителями рода *Anabaena*.

Ключевые слова: цианобактерии, *Anabaena variabilis*, идентификация, последовательность гена 16S рРНК

Цианобактерии широко распространены в водных и неводных биотопах. Цианобактерии, которые содержат разнообразные цианобактериальные группы, в том числе, гетероцистные цианобактерии, нитевидные негетероцистные и одноклеточные цианобактерии часто демонстрируют высокий уровень фиксации молекулярного азота. Цианобактерии не требуют для своего роста и развития готовых органических веществ, а сами приносят его в почву [6]. Морфология, развитие и биохимические параметры данных организмов могут изменяться в зависимости от факторов окружающей среды или условий культивирования. Они могут быть классифицированы на основе морфологии, клеточной дифференцировки, биохимических, физиологических и генетических критериев [5,13]. Оксигенные фотосинтезирующие прокариоты, цианобактерии и прохлорофиты генетически связаны на основе нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК [14].

Основной целью наших исследований является идентификация на основе нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК цианобактерий рода *Anabaena*, выделенных из ризосферы хлопчатника Узбекистана.

Материалы и методы. Аксенические цианобактерии *Anabaena variabilis* шт. 21, выделенные из ризосферы хлопчатника (коллекция микроводорослей Института микробиологии АН РУз), культивировали на среде BG 11о [10].

Родовую и видовую принадлежность местных штаммов цианобактерий *Anabaena variabilis* шт. №21 по морфологическим признакам определяли в соответствии с руководством «Определитель пресноводных водорослей» [3], а также пособием «Цианобактерии» [1] и «Водоросли» [2]. Микроскопические фотографии цианобактерий получены с помощью микроскопа «Olympus BX41» (digital, Japan), при увеличении 100x12x1,25.

Выделение и подготовка образцов ДНК для электрофореза. Экстракция ДНК была проведена в соответствии со стандартными методами [11]. Экспоненциально растущие клетки из 50 мл среды осаждали путем центрифугирования и ресуспендировали в 0,5 мл лизисного раствора (25 % сахарозы, 50 мМ трис - HCl, 100 мМ ЭДТА). Клетки обрабатывали лизоцимом (5 мг) в течение 30 мин при 37 °С. Добавляли SDS и протеиназу К до конечной концентрации 1 % и 100 мкг/мл, соответственно, и инкубировали образцы при 45° С в течение ночи. ДНК экстрагировали три раза смесью фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (25:24:1) и дважды смесью хлороформ : изоамиловый спирт (24:1). ДНК осаждали, промывали 70 % этанолом, ресуспендировали в 100 мкл Трис – ЭДТА буфере и хранили при температуре -20 °С.

© Г.Х.Кадырова, Е.С. Коробкова, 2013

Амплификация и секвенирование гена 16S рРНК. ПЦР-амплификацию проводили на очищенной ДНК *Anabaena variabilis* (Uzb1) в лаборатории Молекулярной биологии и генетики микроорганизмов Института микробиологии АНРУз. Амплификацию генов 16S рРНК проводили методом ПЦР с использованием праймеров: A1 (forward) 5'- GTA TGC TTA CAC ATG CAA GTC GAA CGG -3' и A2 (reverse) 5'- TTA CGG CTA GGA CTA CTG GGG TAT CTA -3'. Смесь ПЦР содержала 10 мкл Taq (10 X) коммерческого буфера, 10 мкл очищенной ДНК (50-100 нг), 150 мкМ каждого dNTP, 500 нг каждого праймера и 2,5 U Taq-полимеразы. Общий объем реакционной смеси составляет 100 мкл после начального цикла, который при температуре 95 °С составлял 3 мин, при 55 °С – 2 мин и 30 сек – при температуре 72 °С. 30 циклов амплификации были начаты 1,5 мин при 95°С, 2,5 мин при 55°С и 3 мин при 72°С. Прекращение цикла – 7 мин при температуре 72 °С. Затем ПЦР-продукт анализировали в 1,5 % агарозном геле, содержащем 0.5 X TBE, сравнивая размер амплифицированного продукта с фрагментами ДНК STEP LADDER 100 bp (маркерными ДНК) и визуализировали путем окрашивания 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Полимеразную цепную реакцию проводили на ERICOMP, Delta cycler I™ system, Easy cycler™ PCR system.

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК были определены с использованием Applied Biosystems PRISM 3100 Genetic analyzer (Университет Бен-Гурион, Израиль).

Филогенетический анализ. Сравнение нуклеотидной последовательности проводилось в соответствии CLUSTAL W Multiple Sequence Alignment Program [12]. Филогенетическое дерево было построено методом neighbor-joining с использованием программного обеспечения MEGA4.

Результаты и их обсуждение. Из ризосферы хлопчатника Узбекистана выделены местные штаммы цианобактерий рода *Anabaena*. Исследуемые цианобактерии рода *Anabaena* альгологически и бактериально очищены и идентифицированы классическими методами до видовой принадлежности как *A. variabilis* шт.21 (рис. 1) [3].

Морфологические признаки цианобактерий у *A. variabilis* шт. 21 следующие: трихомы разнообразно изогнутые, большей частью без влагалищ, 5 мкм ширины, клетки боченкообразные, 4-5 мкм длины. Гетероцисты шаровидные, 6 мкм длины и до 8 мкм длины. Споры боченковидные, 7 мкм ширины и 8-12 мкм длины, с гладкой бесцветной оболочкой, располагаются рядами, вне связи с гетероцистами.



Рис. 1. Микроскопические фотографии трихом цианобактерий *Anabaena variabilis* шт.21: а – гетероцисты, б – трихомы (увеличение 100x12x1,25).

Дальнейшее изучение таксономии местного штамма гетероцистных цианобактерий *A. variabilis* шт. 21, идентифицированного по морфологическим признакам, проводили с помощью молекулярно-генетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Для данных исследований нами были созданы прайме-

ры для цианобактерий рода *Anabaena*: A1 праймер (forward) 5'- GTA TGC TTA CAC ATG CAA GTC GAA CGG -3' и A2 праймер (reverse) 5'- TTA CGG СТА GGA СТА СТГ GGG TAT СТА -3'. Далее на основе данных праймеров была проведена ПЦР-амплификация ДНК цианобактерий *A. variabilis* шт. 21 (рис. 2). В последующем с использованием праймеров A1 и A2 получена частичная нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК цианобактерий *Anabaena variabilis* шт. 21:

GTATGCTTACACATGCAAGTCGAACGGAATCCTTGGGATTTAGTGGCGGAC
GGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCTTCAGGTCTGGGACAACAGTTGGAAA
CGACTGСТААТАССGGATGTGCCGAGAGGTGAAAGGCTTGCTGCCTGAAGAT
GAGCTTGCCTCTGATTAAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGGGACG
ATCAGTAGCTGGTCTCGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CGCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGATTTTTCCGCAATGGGCGAAAG
CCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGТАААССТС
TTTTCTCAGGGAAГААТААААТGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAAC
TCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGATGCAAGCGTTATCCGGAATG
ATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCTATGТАAGTCTGCTGTТАААТАGTCA
TGCTCAACATGATCAAGGCAGTGGAAACTACAAGGCTAGAGTGCCTTCGGGG
CAGAGGGGAATTCCTGGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAAC
ACCGGTGGCGATAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAA
GCTAGGGGAGCGAATGGGATAGATACCCAGTAGTCTAGCCGTAAACG

Следует отметить, что полученный ПЦР-продукт *A. variabilis* шт. 21 после секвенирования состоял из 725 пар нуклеотидов.

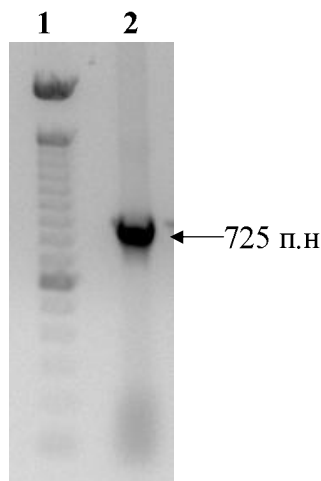


Рис. 2. Электрофоретическое разделение ПЦР-продукта ДНК цианобактерий *Anabaena variabilis* шт. 21 в 1,5 % агарозном геле:

1 – Маркеры DNA ladder 100 bp.

2 – ПЦР- продукт ДНК цианобактерий *Anabaena variabilis* шт.21.

В результате BLAST-анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК местного штамма цианобактерий *A. variabilis* шт. 21 (на филогенетическом древе обозначен нами как *A. variabilis* (Uzb1)) проведен сравнительный анализ с теми представителями гетероцистных цианобактерий, которые имеются в Gene Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Сравнительный BLAST анализ показал, что исследуемая нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК *A. variabilis* Uzb1 был гомологична на 99 % с известным штаммом *Anabaena variabilis* (EF488831.1). При этом, у *A. variabilis* Uzb1 гомология нуклеотидной последовательности с другими видами рода *Anabaena* составляла от 93 % до 98 %. А для других видов цианобактерий, таких как *Trichormus variabilis* – (AJ630456.1), *Nostoc sp 152* (AJ133161.1), *Cylindrospermum sp. A1345* (AJ133163.1) и *Gloeotrichia echinulata* URA3 (AM230705.1) гомология со-

ставляла – 98 %, 94 %, 94 % и 93 %, соответственно. На основе анализа полученных нуклеотидных последовательностей было создано филогенетическое дерево *A. variabilis* Uzb1 (рис. 3).

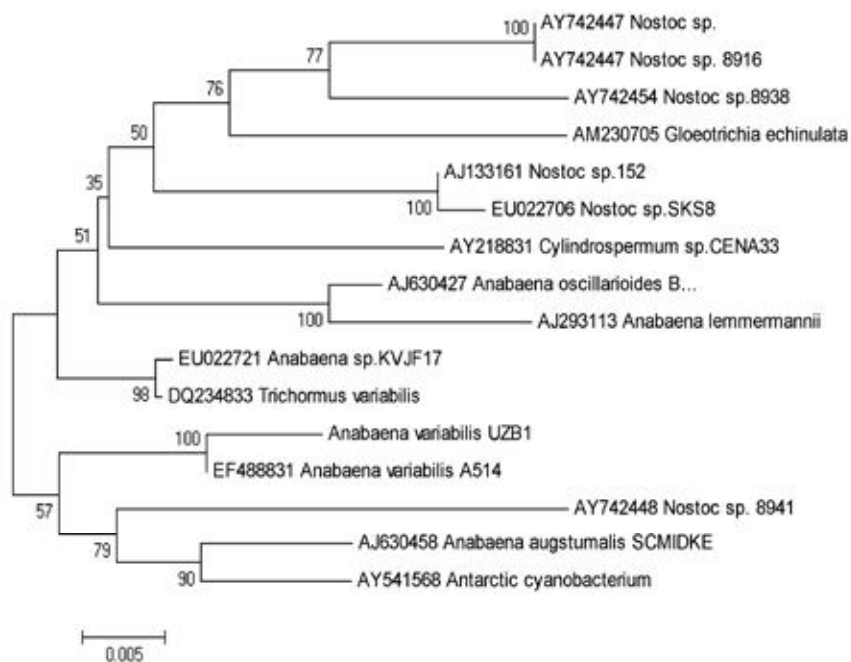


Рис. 3. Филогенетическое дерево *Anabaena variabilis* (Uzb1) и других видов цианобактерий, построенное на основе последовательностей гена 16S рРНК.

На основании морфологических признаков и расположения на филогенетическом дереве показывает близкое эволюционное родство между выделенным штаммом цианобактерий Uzb1 и *Anabaena variabilis* (EF488831.1).

Ранее Ezhilarasi и. Anand идентифицировали представителей рода *Anabaena* на основе морфологических признаков, таких как наличие акинет (спор) и гетероцист [4]. Данные признаки являются очень полезными, когда выделяются различные виды цианобактерий рода *Anabaena* из многочисленных собранных образцов, но вполне вероятно, что в ответ на наличие питательных веществ в среде обитания, в культивируемых штаммах могут не образоваться гетероцисты и споры. Кроме того, биометрические характеристики – такие, как гетероцисты и акинеты клеток выделенных нами представителей сине-зеленых водорослей могут отличаться от таковых из природных образцов.

В настоящее время филогенетический анализ на основе общности 16S рРНК нуклеотидной последовательности широко используется как инструмент для бактериальной таксономии в целом, и преимущества данного метода были подтверждены многочисленными исследованиями [7,8]. Согласно данным литературы, по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК *Nodularia* сходны с *Nostoc*, *Aphanizomenon* и *Anabaena*. Здесь необходимо отметить, что новый род *Spirirestis rafaensis* имеет общие морфологические признаки, как с *Scytonemaceae*, так и *Microchaetaceae*, но на молекулярном уровне данный род оказался тесно связано с *Microchaetaceae* [9].

Таким образом, установлена высокая идентичность между нуклеотидной последовательностью 16S рибосомальной РНК *A. variabilis* шт.21 (Uzb1) и другими видами цианобактерий рода *Anabaena*. Это указывает на то, что выделенный нами штамм цианобактерий по таким морфологическим признакам, как наличие акинет (спор) и гетероцист, и данным молекулярно-генетического анализа идентичен от 93 % до 99 % другим известным представителям рода *Anabaena*.

К экологическому значению выделенных и идентифицированных нами цианобактерий можно отнести их участие в генезисе и сохранении плодородия почв, аэрации и агрегации частиц, которые они образуют, азотфиксации. Кроме того, они продуцируют биологически активные вещества, которые ускоряют процессы разложения в почве и увеличивают активность гетеротрофных микроорганизмов [1,10,13]. В конечном счете, выделенные местные азотфиксирующие штаммы цианобактерий дополняют коллекцию производственно-ценных микроводорослей Узбекистана и могут послужить материалом для фундаментальных и прикладных исследований в области сельскохозяйственной биотехнологии.

Г.Х. Кадирова¹, К.С. Коробкова²

¹*Институт микробиологии Академии Наук Республики Узбекистан,
Ташкент*

²*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,
Київ*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ РОДУ ANABAENA, ВИДЛЕННЫХ ИЗ РИЗОСФЕРЫ БАВОВНИКА

Резюме

Идентификация нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК цианобактерий *Anabaena variabilis* шт.21 (Uzb1) показала, что штамм из ризосферы бавовника Узбекистана на 99% гомологичный известному штамму *Anabaena variabilis* (EF488831.1). У дополнения до морфологических признаков (наличие акинет (спор) и гетероцист) это подтверждает филогенетическую спородненность выделенного штамма цианобактерий *A. variabilis* Uzb1 другим описанным представителям рода *Anabaena*.

К л ю ч о в ы е с л о в а: цианобактерии, *Anabaena variabilis*, идентификация, последовательность гена 16S рРНК

G.Kh. Kadirova¹, K.S. Korobkova²

¹*Institute of Microbiology of Uzbekistan Academy of Sciences,
Tashkent*

²*D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Science of Ukraine, Kyiv*

IDENTIFICATION OF CYANOBACTERIA FROM GENUS ANABAENA ISOLATED FROM THE RHIZOSPHERE OF COTTON-PLANT

S u m m a r y

Identification of nucleotide sequence of the gene 16S rRNA of cyanobacteria *Anabaena variabilis* str.21 (Uzb1) exhibits that the strain from root sphere of cotton plants is 99% homologous to a known strain of *Anabaena variabilis* (EF488831.1). This data confirms the phylogenetic relationship of the strain of cyanobacteria *A. variabilis* Uzb1 to other described representatives of genus *Anabaena* as addition to morphological characteristics (presence of akinets (spores) and heterocysts).

The paper is presented in Russian.

К e y w o r d s: cyanobacteria, *Anabaena variabilis*, identification, sequence of the 16S rRNA gene.

The authors address: Kadirova G.Kh., Institute of Microbiology of Uzbekistan Academy of Sciences, A.Kadyri St., Tashkent, 100128, Uzbekistan.

1. Андреев Е.У., Коптева Ж.Ю., Занина В.В. Цианобактерии. – К.: Наук. думка, 1990 г. – 199с.
2. Вассер С.П., Кондратьева Н.В., Масюк Н.П. и др. Водоросли. Справочник. – Киев: Наук. думка, 1989. – 604с.
3. Голлербах М.М., Коссинская Е.К., Полянский В.И. Определитель пресноводных водорослей СССР. – «Синезеленые водоросли». – М.: Советская Наука, 1953. – С.219–221.
4. Anbalagan Ezhilarasi and Narayanaswamy Anand. Phylogenetic analysis of *Anabaena* spp. (Cyanobacteria) using sequences of 16SrRNA gene // Australian J. of Basic and Applied Sciences. – 2009. – 3(4). – P.4026–4031.
5. Holt, J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Stanley J.T., Williams S.T. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology: Group 11, Oxygenic Phototrophic Bacteria. – 1994. – P. 377–475.
6. Kadirova G.Kh. Some properties of salt tolerant nitrogen-fixing strains of Cyanobacteria // Int. Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Turkish Microbiological society of Microbiology. – Istanbul, 2008. – P.178.
7. Katano T., Fukui M., Watanabe Y., Identification of cultured and uncultured picocyanobacteria from a mesotrophic freshwater lake based on the partial sequences of 16S rDNA // The Japanese Society of Limnology, Limnology. – 2001. – 2. – P. 213–218.
8. Lee W. J., Kyung S. B., The Phylogenetic Relationship of Several Oscillatorian Cyanobacteria, Forming Blooms at Daecheong Reservoirs, Based on Partial 16S rRNA Gene Sequences // J. Microbiology and Biotechnology. – 2001. – 11(3). – P.504–507.
9. Lehtimäki, J., Lyra, C., Suomalainen S., Sundman P., Rouhiainen L., Paulin L., Salkinoja-Salonen M., Sivonen K. Characterization of *Nodularia* Strains, cyanobacteria from Brackish Waters, by Genotypic and Phenotypic Methods // Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2000. – 50. – P.1043– 1053.
10. Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B, Herdman M., Stanier R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // J. General Microbiology. – 1979. – 111. – P.1–61
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning laboratory manual 2nd ed. / Cold Spring: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 811 p.
12. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Research. – 1994. – 22. – P.4673–4680.
13. Whitton B.A. Diversity, Ecology and Taxonomy of the Cyanobacteria : Photosynthetic prokaryotes / Eds N.H. Mann, N.G. Carrs. – Plenum, 1992. – P.1–51
14. Woese C.R. Bacterial evolution // Microbiological Reviews. – 1987. – 51. – P.221–271.

Отримано 14.10.2012