

УДК 579.26

Е.В. Мошинец¹, Ж. Бруне², С.Е. Рымарь¹, И.В. Косаковская³,
Г. Поттерс⁴

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. ак. Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680,
тел.: +380979186618; e-mail: moshynets@gmail.com

²Университет Парижа Эст Критейл, Париж, Франция, 61,
проспект Генерала де Голля, 94010, Франция
e-mail: judicaelle.brunet@gmail.com

³Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
ул. Терещенковская, 2, Киев, 01601, Украина,
тел.: +380505039195; e-mail: science@botany.kiev.ua

⁴Университет г. Антверпена, Бельгия, В-2020, Антверпен, вул. Грёненборген, 171,
тел.: +32496410684;
e-mail: geert.potters@ua.ac.be

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ РАСТЕНИЙ БАМБУКА (*PHYLLOSTACHYS* И *FARGESIA*)

Эндофитные бактерии из растений бамбуков (подсемейство Bambusoideae) выделены и идентифицированы путём анализа нуклеотидного состава фрагментов rrs-генов (генов 16S рДНК), амплифицируемых как из тканей растений, так и из выделенных культур эндофитов. Выделено 74 штамма бактерий, из которых 47 отнесены к семействам Bacillaceae, Mycobacteriaceae, Paenibacillaceae, Microbacteriaceae родам Agrobacterium/Rhizobium, Burkholderia, Pseudomonas, Leifsonia, Achromobacter, Acinetobacter.

Ключевые слова: эндофитные бактерии, бамбук, идентификация, 16S рДНК.

Многие представители подсемейства *Bambusoideae* (Бамбуковые) семейства *Poaceae* (Злакоцветные) являются важными аграрными и промышленными культурами. Их древесина используется как строительный и декоративный материал, а растительная биомасса является источником получения возобновляемой энергии [1, 2]. При получении биомассы предпочтение отдаётся культурам, способным расти на загрязнённых почвах [3, 4]. Бамбук является одним из таких растений: некоторые виды бамбука способны расти на закисленных грунтах с



pH 3 (неопубликованные данные), на грунтах, загрязнённых тяжелыми металлами. По способности к поглощению тяжелых металлов бамбук опережает такие популярные в фиторемедиационных мероприятиях культуры как тополь и ива [5, 6]. Поэтому бамбук рассматривают как растение-кандидат для получения биомассы и очистки грунтов от тяжелых металлов в условиях климата севера Европы. В результате продолжительных исследований на полях Ирландии и Фландрии (Бельгия) доказана возможность успешного культивирования растений бамбука *Phyllostachys vivax*, *P. aureosulcata*, *P. praecox*, *P. humilis*, *P. decora*, *P. bissetti*, *P. aurea* в условиях умеренного климата [3].

Вся фитосферная микробиота оказывает существенное влияние на устойчивость растений к неблагоприятным внешним факторам и на развитие их фиторемедиационных свойств [7, 8, 9]. Однако, эндофитная микробиота, находясь в особенно тесных структурно-функциональных взаимоотношениях с растительным организмом, принимает особое участие в адаптации растений к неблагоприятным факторам [10–13]. Эндофиты существенно влияют на устойчивость растений к неблагоприятным воздействиям и способны к некоторой модификации вредных факторов окружающей среды. Показано, что при повышении концентрации загрязнителя происходит активация процесса роста эндофитов [14]. Недавно открытый эндофитный микроорганизм *Methylobacterium populum* sp. nov., штамм VJ001, участвует в разложении ряда органических загрязнителей, а именно 2,4,6-тринитротолуина, гексагидро-1,3,5-тринитро-1,3,5-триазина и гексагидро-1,3,5-гексанитро-1,3,5-триазина [15]. Среди эндофитов тополя обнаружены штаммы, способные нейтрализовать бензол, толуол, этилбензол и ксилол и трихлорэтилен [16].

Поскольку метаболическая активность эндофитов является важным фактором процесса очистки загрязнённых почв, а эндофитные сообщества бамбука, среди которых есть как культивируемые, так и некультивируемые микроорганизмы [17, 18], практически не исследовались, целью нашей работы была идентификация культивируемых и некультивируемых эндофитных бактерий бамбука и получение коллекции чистых культур этих бактерий.

Материалы и методы

В работе использовались растения бамбука *P. humilis*, *P. atrovaginata*, *P. nigra* и *Fargesia rufa*, полученные методом микроразмножения на базе фирмы Origins Plant NV, г. Рийкеворсел (Rijkevorsel), Бельгия. Для экспериментов использовались как растения, выращенные *in vitro*, так и растения, полученные в результате культивирования *in vitro* в специальном субстрате, разработанном и изготовленном фирмой Bamboo Select[®], Бельгия (<http://eng.bambooselect.com/>). Стерилизацию надземных и подземных поверхностей растений, выращиваемых в нестерильных усло-



виях в субстрате, осуществляли согласно схеме: 3 мин в 70% этаноле, 5 мин в 12% растворе гиперхлорита натрия, 1 мин в 70% этаноле [19].

Для выделения эндофитов из надземных тканей растений, выращиваемых в субстрате, каждый кусочек растения с простерилизованными поверхностями покровных тканей помещали в 5 мл питательной среды: *глюкозный бульон* (5 г пептона С, 2 г гидролизованного пептона № 3, 3 г пептона G, 3 г говяжьего экстракта, 5 г глюкозы и 5 г NaCl на 1 литр водопроводной воды) и *колумбийский бульон* (12 г пептона С, 5 г пептона, 3 г дрожжевого экстракта, 3 г говяжьего экстракта, 1 г крахмала пшеницы и 5 г NaCl на 1 литр водопроводной воды). Инкубацию проводили при 28 °С в течение 48 часов, периодически встряхивая, после чего выращенные в питательных средах микроорганизмы переносили на соответствующие агаризованные питательные среды, содержащие 1,5% агара. Инкубация на агаризованных средах продолжалась 24 часа при 28 °С. Для последующего молекулярно-генетического анализа отобранные отдельные колонии культивировали на глюкозном и колумбийском бульонах.

Для выделения бактерий из подземных органов бамбука, использовали растения, выращенные в субстрате. Подземные части промывали в дистиллированной воде для удаления частиц субстрата и стерилизовали в соответствии с протоколом [19]. Растительную ткань (1 г) измельчали, перетирая в 10 мл натрий-фосфатного буфера (рН 7,4). Полученную суспензию разводили в 10 и 100 раз. По 100 мкл из каждого разведения культивировали на агаризованном LB и глюкозном агаре. Инкубацию продолжали от 24 до 48 ч при температуре 28 °С. Для выделения ДНК бактерии из отдельных колоний выращивали в соответствующих жидких средах.

Для выделения бактерий из тканей растений бамбука, выращенных *in vitro*, 0,5 г биомассы целых растений, выращенных *in vitro*, растирали в 5 мл натрий-фосфатного буфера. Полученную гомогенную суспензию разводили в 10 и 100 раз. Пробы объемом 100 мкл из каждого разведения наносили на агаризованные среды LB и глюкозный агар. Инкубацию проводили от 24 до 72 ч при температуре 28 °С. Для последующего молекулярно-генетического анализа отдельные колонии пересеивали в соответствующие жидкие питательные среды. Выделенные изоляты бактерий сохраняли в виде ночной культуры с добавлением до 20% глицерина при температуре -70 °С.

Экстракцию ДНК из клеток бактерий, полученных из тканей растений, проводили щелочным методом [20].

Для экстракции ДНК из тканей бамбука каждый образец, весом 0,25 г замораживали в жидком азоте. Замороженные ткани гомогенизировали в 1 мл метанола с использованием набора для гомогенизации Magnalyser (Roche, Германия). Выделение ДНК и депротеинизацию проводили в соответствии со стандартной методикой [21]. Концентрацию ДНК определяли с помощью прибора NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific Inc., США).



Ген, кодирующий 16S рДНК, амплифицировали с использованием универсальных прямого праймера 25F (5'-AAC TCA AGA GTT TGA TCC TGG CTC-3'), обратного праймера 1492r (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') [19] и набора для ПЦР (Roche, Германия). ПЦР проводили согласно инструкции производителя набора. Условия реакции были следующими: денатурация в течение 10 мин при 94 °С; 35 циклов в режиме: 45 с при 94 °С, 45 с при 62 °С, 1 мин при 72 °С; 10 мин при 72 °С. Продукт визуализировали с помощью гель-электрофореза в 0,8% агарозном геле согласно стандартной методике [20]. Клонирование продуктов ПЦР проводили, используя рGEM T[®] Easy вектор (Promega, USA) согласно инструкции производителя. Выделение плазмидной ДНК осуществляли с помощью набора для выделения плазмидной ДНК (Roche, Германия) согласно инструкции производителя. Определение нуклеотидной последовательности ПЦР продуктов проводили, используя специфические праймеры T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') и SP6 (5'-GAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3') в секвенаторе Applied Biosystems 3730 (США). Анализ нуклеотидной последовательности 16S рДНК фрагментов проводили используя BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) и базу данных NCBI (США) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) [22].

Результаты исследований и их обсуждение

Для выявления и определения эндофитов растений бамбука использовали два подхода. Первый заключался в выделении культивируемых эндофитов из тканей надземных и подземных органов растений, а также из тканей молодых растений, выращенных в условиях *in vitro*. Второй — в выделении тотальной ДНК из образцов тканей растений и её последующий анализ на наличие бактериального гена *rrs*.

В результате культивирования тканей *P. humilis* и *F. rufa* на глюкозном агаре были получены мелкие белые колонии. При культивировании на колумбийском агаре выросли белые и желтые колонии микроорганизмов из *P. humilis*. Выделение ДНК проводили из суточных культур, полученных после пересева колоний, используя ДНК как матрицу для ПЦР, амплифицировали фрагмент 16S рДНК, нуклеотидный состав которого в дальнейшем анализировали с целью определения таксономического положения микроорганизмов. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таким образом, из надземной части бамбуков *P. humilis* и *F. rufa* посредством культивирования на искусственных питательных средах удалось выделить культуры бактерий отнесенные к видам эндофитов, *Bacillus amyloliquefaciens* и *B. subtilis*. Из тканей бамбука *P. humilis* также удалось выделить эндофитную бактерию *B. mojavensis*, относящуюся к тому же семейству. Виды рода *Bacillus* являются довольно распространенными эндофитами и описаны для многих растений [23, 24]. Они выполняют важную фитопротекторную функцию и повышают устойчивость к фитопатогенным грибам [25].



Таблица 1
Культивируемые эндофиты надземной части бамбуков *P. humilis* и *F. ruфа*Table 1
Cultivated endophytes of the aerial parts of bamboo plants *P. humilis* and *F. ruфа*

Вид бамбука	Наиболее близкородственный микроорганизм	Гомология нуклеотидного состава ПЦР фрагментов 16S рДНК, %
<i>F. ruфа</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (XE6676)	100%
	<i>Bacillus subtilis</i> (XB7767)	100%
<i>P. humilis</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (XE6676)	100%
	<i>Bacillus subtilis</i> (XB7767)	100%
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (XE6676)	99%
	<i>Bacillus subtilis</i> (XB7767)	99%
	<i>Bacillus subtilis</i> (XB7767)	100%
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (XE6676)	98%
	<i>Bacillus subtilis</i> (XB7767)	98%
	<i>Bacillus mojavensis</i>	98%

В следующей серии экспериментов было проведено выделение тотальной ДНК из тканей надземной части молодых бамбуков *P. atrovaginata*, *P. nigra* и *P. humilis*, выращенных в субстрате. В препаратах общей ДНК, выделенной из растительных тканей, наряду с ДНК бамбука обнаружена ДНК эндофитных бактерий. Результаты анализа нуклеотидной последовательности фрагментов 16S рДНК, амплифицированных с использованием соответствующих праймеров с ДНК тканей бамбуков *P. atrovaginata*, *P. nigra* и *P. humilis*, представлены в таблице 2.

В результате анализа ПЦР-фрагментов *rrs* генов у бамбуков *P. atrovaginata*, *P. nigra* и *P. humilis* выявлены эндофитные бактерии семейства *Mycobacteriaceae*, отдела *Actinobacteria*. В тканях *P. atrovaginata* обнаружены бактерии *Mycobacterium palustre* и *M. lentiflavum*; в тканях *P. nigra* — бактерии *M. avium* complex и *M. arosiense*; в тканях *P. humilis* — несколько клонов некультивируемых бактерий. Во всех экспериментах выявлены фрагменты митохондриальной и хлоропластной ДНК.

Таким образом, при использовании метода лабораторного культивирования и молекулярно-генетического метода для изучения состава эндофитных бактерий надземной части растений *P. humilis*, выявлены разные виды микроорганизмов. С данным эффектом сталкивались и многие другие исследователи [26–29].



Таблица 2
Эндофитные бактерии надземной части бамбуков *P. atrovaginata*,
P. nigra и *P. humilis*

Table 2
Endophytic bacteria of the aerial parts of bamboo plants *P. atrovaginata*,
P. nigra and *P. humilis*

Вид бамбука	Наиболее близкородственный микроорганизм	Гомология нуклеотидного состава ПЦР фрагментов 16S рДНК, %
<i>P. atrovaginata</i>	<i>Mycobacterium palustre</i> (E846)	99%
	<i>Mycobacterium lentiflavum</i> (UN-106)	99%
	<i>Mycobacterium lentiflavum</i> (GR-2466)	99%
<i>P. nigra</i>	<i>Mycobacterium avium complex</i> (5356591)	99%
	<i>Mycobacterium arosiense</i> (T1919)	99%
<i>P. humilis</i>	Uncultured bacterium clone nbt35d06	99%
	Uncultured bacterium clone nbt36d12	99%
	Uncultured bacterium clone p8k02ok	99%

Одной из причин этого может быть тот факт, что исходное количество клеток бацилл на фоне других бактерий в растении было достаточно низким, что снизило возможности их идентификации молекулярно-генетическим методом, но количество клеток существенно увеличивалось в селективных условиях — в культуре [30, 31]. Некультивируемые эндофиты *Mycobacterium* spp. были найдены и у других растений порядка Злакоцветные (*Poales*) [29], в то время как среди культивируемой микробиоты микобактерии не обнаруживались [32]. В целом, микобактерии являются сапрофитами, комменсалами или симбионтами животных, человека и простейших. Ряд эндофитных *Mycobacterium* spp. найден в корнях риса [33], пшеницы [27] и торфяного мха [34]. В то же время микобактерии очень редко выступают эндофитами надземных частей. Нами найдено только две работы, в которых описываются эндофитные микобактерии. В обоих случаях, как и в нашей работе, микобактерии выделяли из растений, полученных методом микроразмножения, или из тканевых культур [29, 35].

Кроме идентифицированных некультивируемых эндофитов, нами были обнаружены и неидентифицированные некультивируемые бактерии. Неидентифицированные эндофиты у бамбука были обнаружены впервые, что, впрочем, скорее связано с малой изученностью микроби-

оты бамбуков. Некультивируемые эндофиты обнаружены у злаков [28], картофеля [36] и др.

При анализе эндофитов подземной части бамбука *P. humilis* гомогенаты тканей высевали на питательные среды — глюкозный агар и агаризованную LB. В ходе исследования эндофитов подземной части бамбука *P. humilis* выделено 61 культуру микроорганизмов, отличающихся по окраске колоний и морфологическими особенностями клеток. Результаты анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов 16S рДНК изолированных бактерий представлены в таблице 3.

Таблица 3
Культивируемые эндофиты подземной части бамбука *P. humilis*

Table 3
Cultivated rhizome endophytes of bamboo plant *P. humilis*

Номер культуры	Наиболее близкородственный микроорганизм	Гомология нуклеотидного состава ПЦР фрагментов 16S рДНК, %
2, 5, 12	<i>Microbacterium laevaniformans</i> (EU545414)	99%
24, 25	<i>Paenibacillus chondroitinus</i> (EU290158)	99%
8, 35, 36, 44, 53	<i>Paenibacillus</i> sp.	99%
9, 14, 23	<i>Leifsonia</i> sp.	98%
11, 26	<i>Burkholderia</i> sp. (<i>B. fungorum</i> HM113360)	99%(98%)
10	<i>Burkholderia cepacia</i> complex	99%
27	<i>Agrobacterium/Rhizobium</i>	100%
102	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i> (FJ483524)	100%
107	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (EU159479)	99%

Анализ эндофитных бактерий, культивируемых из подземной части бамбука *P. humilis*, выявил большее, по сравнению с надземной частью, разнообразие микроорганизмов. Были выделены и определены культуры *Microbacterium laevaniformans* и *Leifsonia* sp., принадлежащие семейству *Microbacteriaceae* отдела *Actinobacteria*; *Paenibacillus* sp. и *Paenibacillus chondroitinus*, относящиеся к семейству *Paenibacillaceae* отдела *Firmicutes*; а также несколько изолятов, относящихся к отделу *Proteobacteria*, один изолят *Agrobacterium/Rhizobium*, принадлежащий *Alphaproteobacteria*, два изолята — *Pseudomonas fuscovaginae* и *Pseudomonas fluorescens*, относящихся к *Gamma*proteobacteria, и два



изолята — *Burkholderia cepacia* complex и *Burkholderia* sp., относящихся к *Betaproteobacteria*.

Исследование молодых тканей бамбуков, выращенных в условиях *in vitro*, показало, что культуры, полученные из гомогената тканей *P. atrovaginata*, соответствуют *Acinetobacter calcoaceticus*, в то время как культуры, полученные из гомогената тканей *P. humilis* гомологичны *Achromobacter* sp. Обе выделенные бактерии относятся к отделу *Proteobacteria*. *A. calcoaceticus* принадлежит к *Gammaproteobacteria*, а изолят *Achromobacter* sp. — к *Betaproteobacteria*. Такое снижение разнообразия эндофитной микробиоты у *in vitro* растений по сравнению с растениями, растущими в субстрате, по-видимому, является следствием того, что опытный растительный материал многократно клонировался и находился при этом в стерильных условиях [36].

Таким образом, был проанализирован состав популяции эндофитных микроорганизмов нескольких представителей подсемейства *Bambusoideae* (Табл. 4).

Среди эндофитов надземной части растений идентифицированы исключительно грамположительные бактерии, относящиеся к семействам *Bacillaceae* и *Mycobacteriaceae*, тогда как в подземной части и в тканях, выращенных *in vitro*, обнаружены как грамположительные, принадлежащие к семействам *Microbacteriaceae* и *Paenibacillaceae*, так и грамотрицательные бактерии, принадлежащие к группам *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria* филума *Proteobacteria*. Установлено, что грамотрицательные эндофиты преобладали в подземной части растений.

Полученные результаты совпадают с данными исследований других авторов. Так, эндофиты подземной части *Phyllostachys edulis* и *Zea mays* L. более разнообразны по сравнению с эндофитами надземной части [19, 23], а эндофиты растений, выращенных в субстрате, многообразнее эндофитов *in vitro* растений [29, 36]. Представители родов *Burkholderia* и *Agrobacterium* обнаружены среди эндофитов подземной части *P. edulis*, *Z. mays* L. и изученного нами бамбука *P. humilis* [19, 23]. Аналогичные результаты получены при изучении эндофитов надземной части растений. Так, среди эндофлоры надземной части бамбуков *P. humilis* и *F. rufa*, как и среди эндофитов многих растений, в том числе и злака — кукурузы, выявлены представители семейств *Bacillaceae* [37]. Среди эндофитов надземной части бамбуков найдены бактерии семейства *Mycobacteriaceae*. *Mycobacterium* spp. были обнаружены среди эндофитов надземной части растений и у других злаков [29]. Эндофит *Acinetobacter calcoaceticus* нами обнаружен в тканях *P. atrovaginata*, выращенных *in vitro*, в то время как в кукурузе *Acinetobacter* sp. локализован в стеблях [19].

Таблица 4

Эндофитные бактерии представителей подсемейства *Bambusoideae*

Table 4

Endophytic bacteria of *Bambusoideae* subfamily

Растительные ткани	Филогенетическая группа	Род	Вид	Вид бамбука
Стебель	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>P. humilis</i>
			<i>B. subtilis</i>	<i>F. rufo</i>
			<i>B. mojavensis</i>	<i>P. humilis</i>
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>M. palustre</i>	<i>P. atrovaginata</i>
			<i>M. lentiflavum</i>	
			<i>M. avium complex</i>	<i>P. nigra</i>
			<i>M. arosiense</i>	
Uncultured bacterium clones				<i>P. humilis</i>
Корень, ризомы	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Agrobacterium/Rhizobium</i>	<i>Agrobacterium/Rhizobium sp.</i>	<i>P. humilis</i>
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia sp.</i>	
			<i>B. cepacia complex</i>	
	<i>Gammaaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. fuscovaginae</i>	
			<i>P. fluorescens</i>	
	<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus sp.</i>	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>M. laevaniformans</i>		
	<i>Leifsonia</i>	<i>Leifsonia sp.</i>		
In vitro	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter sp.</i>	<i>P. humilis</i>
	<i>Gammaaproteobacteria</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>P. atrovaginata</i>

Полученные результаты продемонстрировали, что ткани исследованных видов бамбука, произрастающие *in vitro* и в субстратах для выращивания растений, представляют собой фитонишу, колонизируемую эндофитными бактериями. Определено 18 видов бактерий, колонизирующих эндосферу бамбуков, что пополнило список идентифицированных ранее эндофитов бамбуков [19]. Впервые определены как эндофиты бамбуков бактерии *Agrobacterium/Rhizobium sp.*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *M. palustre*, *M. lentiflavum*, *M. avium complex*, *M. arosiense*, *P. fuscovaginae*, *P. fluorescens*, *P. chondroitinus*, *M. laevaniformans*, *Achromobacter sp.* и *A. calcoaceticus*. Эндофиты надземной части представлены исключительно грамположительными бактериями, тогда как среди микробиоты подземной части только 44,4% эндофитов принадлежали к грамположительным, а 55,6% — к грамотрицательным



бактериям. Эндифиты, выявленные в растениях *in vitro*, представлены грамотрицательными бактериями.

Показано, что эндифитная микробиота подземной части растений многообразнее микробиоты надземных частей, а микробиота растений, растущих в субстрате многообразнее микробиоты растений, растущих в условиях *in vitro*. Кроме культивируемых эндифитов, в растениях бамбука найдены и некультивируемые бактерии. Анализ полученных экспериментальных данных и данных литературы показал, что ткани бамбуков, выращенных в разных климатических условиях, а именно в условиях естественного местообитания в Китае и в природных условиях Бельгии, колонизируются теми же представителями бактерий: *Paenibacillaceae* sp., *Bacillaceae* sp., *Pseudomonas* sp., *Microbacteriaceae* sp., *Acinetobacter* sp. и *B. ceracia* complex.

Дальнейшее изучение свойств выделенных эндифитных бактерий бамбука может способствовать решению ряда фундаментальных и прикладных проблем в области экологии, цитологии и биотехнологии растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Scurlock J., Dayton D., Hames B.* Bamboo: an overlooked biomass resource? // *Biomass and Bioenergy*. – 2000. – 19. – P. 229–244.
2. *Potters G., Schoeters G., Tytgat T., Horvath G., Ludeche C., Cool P., Lenaerts S., Appels L., Dewil R.* Pyrolysis kinetics of bamboo material // *Renewables from Biomass and Waste*. – 2010. – P. 391–396.
3. *Potters G., Brems A., Valcke R., Dewil R., D'Haese L., Samson R., Gielis J.* Energy crops in Western Europe: is bamboo an acceptable alternative? // *VIII World Bamboo Congress Proceedings*. – 2009 – 3. – P. 22–34.
4. *Aslibekian O., Moles R.* Environmental risk assessment of metals contaminated soils at silvermines abandoned mine site, Co Tipperary, Ireland // *Environmental Geochemistry and Health*. – 2003. – 25, № 2. – P. 247–266.
5. *Leigh M. B., Fletcher J. S., Fu X., Schmitz F. J.* Root turnover: an important source of microbial substrates in rhizosphere remediation of recalcitrant contaminants // *Environ. Sci. Technol.* – 2002. – 36. – P. 1579–1583.
6. *White J. C., Wang X., Gent M. P., Iannucci-Berger W., Eitzer B. D., Schultes N. P., Arienzo M., Mattina M. I.* Subspecies-level variation in the phytoextraction of weathered p,p'-DDE by *Cucumbita pepo* // *Environ. Sci. Technol.* – 2003. – 37. – P. 4368–4373.
7. *Newman L. A., Reynolds C. M.* Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants // *Trends in Biotechnology*. – 2005. – 23, № 1. – P. 6–9.



8. Козировська Н. О. Взаємодія ендофітних бактерій з рослиною на клітинному та молекулярному рівнях // *Biopolymers and Cell*. — 1998. — 14, № 6. — С. 488–499.

9. Thomas P., Kumari S., Swarna G. K., Prakash D. P., Dinesh M. R. Ubiquitous presence of fastidious endophytic bacteria in field shoots and index-negative apparently clean shoot-tip cultures of papaya // *Cell Biology and Morphogenesis*. — 2007. — 26. — P. 1491–1499.

10. Pirttilä A. M., Podolich O., Koskimäki J. J., Hohtola E., Hohtola A. Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. — 2008. — 95, № 1. — P. 47–55.

11. Compant S., Clement C., Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization // *Soil Biology & Biochemistry* — 2010. — 42. — P. 669–678.

12. Siciliano S. D., Fortin N., Mihoc A., Wisse G., Labelle S., Beaumier D., Ouellette D., Roy R., Whyte L. G., Banks M. K., Schwab P., Lee K., Greer C. W. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2001. — 67. — P. 2469–2475.

13. Van Aken B., Yoon J. M., Schnoor J. L. Biodegradation of Nitro-Substituted Explosives 2,4,6-Trinitrotoluene, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine, and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5-Tetrazocine by a Phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. Associated with Poplar Tissues (*Populus deltoides/nigra* DN34) // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2004. — 70. — P. 508–517.

14. Moore P. F., Barac T., Borremans B., Oeyen L., Vangronsveld J., van der Lelie D., Campbell C. D., Moore E. R. B. Endophytic bacterial diversity in Poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation // *Sys. App. Microbiol.* — 2006. — 29. — P. 539–556.

15. Vervaeke P., Luysaert S., Mertens J., Meers E., Teck F. M. G., Kust N. Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial // *Environ. Poll.* — 2003. — 126. — P. 275–282.

16. Laureysens I., Temmerman L. De, Hastir T., Van Gysel M., Ceulemans R. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a polar coppice culture. II. Vertical distribution and phytoextraction potential // *Environ. Poll.* — 2005. — 133. — P. 541–551.

17. Thomas P. A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissues cultures // *Current Science*. — 2004. — 87, № 1. — P. 67–72.

18. Thomas P., Swarna G. K., Patil P., Rawl R. D. Ubiquitous presence of normally non-culturable endophytic bacteria in field shoot-tips of banana and their gradual activation to quiescent cultivable form in tissue cultures // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. — 2008. — 93, № 1. — P. 39–54.



19. Han J., Xia D., Li L., Sun L., Yang K., Zhang L. Diversity of culturable bacteria isolated from root domains of Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) // *Microbial Ecology*. — 2009. — 58. — P. 363–373.

20. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning — a laboratory manual*. Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

21. Khanuja S. P. S., Shasany A. K., Darokar M. P., Kumar S. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils // *Plant Molecular Biology Reporter*. — 1999. — 17. — P. 1–7.

22. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool // *Journal of Molecular Biology*. — 1990. — 215. — P. 403–410.

23. Melnick R. L., Zidack N. K., Bailey B. A., Maximova S. N., Guiltinan M., Backmann P. A. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. From annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao // *Biological Control*. — 2008. — 46. — P. 46–56.

24. Bai Y., D'Aoust F., Smith D. L., Driscoll B. T. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean foot nodules // *Can. J. Microbiol.* — 2002. — 48. — P. 230–238.

25. Wilhelm E., Arthofer W., Schafleitner R., Krebs B. *Bacillus subtilis* as endophyte of chestnut (*Castanea sativa*) as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) // *Plant Cell, Tissues and Organ Culture*. — 1998. — 52. — P. 105–108.

26. Sessitsch A., Reite B., Pfeifer U., Wilhem E. Cultivation independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 2002. — 39. — P. 23–32.

27. Conn V. M., Franco C. M. M. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2004. — 70. — P. 1787–1794.

28. Tejesvi M. V., Ruotsalainen A. L., Markkola A. M., Pirtilla A. M. *Phialocephala fortinii* is an abundant root associate of dwarf shrubs and the graminoid *Deschampsia flexuosa* along a primary succession gradient on a midboreal island: a phylogenetic analysis // *Fungal Diver.* — 2010. — 41. — P. 125–134.

29. Koskimaki J. J., Hankala E., Suorsa M., Sannakajsa N., Pirtilla A. M. Mycobacteria are hidden endophytes in the shoots of rock plant [*Pogonatherum paniceum* (Lat.) Hack.] (Poaceae) // *Environ. Microbiol. Reports*. — 2010. — 2(4). — P. 619–624.

30. Ward D. M., Bateson M. M., Weller R., Rulif-Roberts A. L. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature // *Adv. Microb. Ecol.* — 1992. — 12. — P. 219–289.

31. Waner M., Amann R., Lemmer H., Schleifer K. H. Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of

culture-dependent methods for describing microbial community structure // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1993. — 59. — P. 1520–1525.

32. *White J. F.* Widespread distribution of endophytes in the Poaceae // *Plant Disease.* — 1987. — 71. — P. 340–342.

33. *Mano H., Tanaka F., Nakamura C., Kaga H., Morisaki H.* Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field // *Microbes Environ.* — 22. — P. 175–185.

34. *Katila M. L., Iivanainen E., Torkko P., Kauppinen J., Martikainen P., Vaananen P.* Isolation of potentially pathogenic mycobacteria in the Finnish environment // *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* — 1995. — 98. — P. 9–11.

35. *Laukkanen H., Soini H., Kontunen-Soppela S., Hohtola A., Viljanen M.* A mycobacterium isolated from tissues cultures of mature *Pinus sylvestris* interferes with growth of Scots pine seedlings // *Tree Physiol.* — 2000. — 20. — P. 915–920.

36. *Подоліч О. В., Арданов П. Є., Вознюк Т. М., Ковальчук М. В., Данильченко О. В., Лащевський В. В., Ляшенко С. А., Козировська Н. О.* Ендофітні бактерії картоплі in vitro, активовані екзогенними непатогенними бактеріями // *Biolumens and Cell.* — 2007. — 23, № 1. — С. 21–27.

37. *McInroy J. A., Klopper J. W.* Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn // *Plant and Soil.* — 1995. — 173, № 2. — P. 337–342.

**O.V. Moshynets¹, J. Brunet², S.U. Rymar¹, I.V. Kosakivska³,
G. Potters⁴**

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, NASU, 150, Zabolotny Str., Kyiv, Ukraine, 03680, tel.: +38 097 918 66 18; e-mail: moshynets@gmail.com

²Paris University, 61, General de Gaulle str., 94010, Créteil Cedex, France, e-mail: judicaelle.brunet@gmail.com

³Institute of Botany after M.G. Kholodny, NASU, 2, Tereshchenkivska str., Kyiv, 01601, Ukraine, tel.: +380505039195; e-mail: science@botany.kiev.ua

⁴University of Antwerp, 171, Groenenborgerlan, B-2020, Antwerp, Belgium, tel.: +32 49 641 06 84; e-mail: geert.potters@ua.ac.be

EXTRACTION AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA FROM BAMBOO PLANTS (*PHYLLOSTACHYS* AND *FARGESIA*)

Summary

Endophytic bacteria from rhizomes and culms of bamboo plants (*Bambusoideae*) have been identified by the way of DNA extraction from both plant tissues and isolated bacterial cultures and subsequent determination



of the *rrs* (16S rDNA) sequences. 74 endophytic strains have been isolated thus far, leading to the identification of 47 unique species, belonging to the families *Bacillaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Paenibacillaceae* and *Microbacteriaceae* and the genera *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Leifsonia*, *Achromobacter* and *Acinetobacter*.

К е у w o r d s : endophytes, bamboo, identification, 16S nRNK.

О.В. Мошинець¹, Ж. Бруне², С.Ю. Римар¹, І.В. Косаківська³, Г. Потерс⁴

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. ак. Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна,
тел.: +380979186618; e-mail: moshynets@gmail.com

²Університет Парижу Ест Критейл, Париж, Франція, 61,
проспект Генерала де Голля, 94010, Критейл, Франція
e-mail: judicaelle.brunet@gmail.com

³Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,
ул. Терещенківська, 2, Київ, Україна, 01601,
тел.: +380505039195; e-mail: science@botany.kiev.ua

⁴Університет Антверпену, Бельгія, В-2020, Антверпен, вул. Гроненборген, 171,
тел.: +32496410684; e-mail: geert.potters@ua.ac.be

ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЕНДОФІТНИХ БАКТЕРІЙ ІЗ РОСЛИН БАМБУКА (*PHYLLOSTACHYS* І *FARGESIA*)

Реферат

Ендофітні бактерії, які колонізують тканини рослин бамбуків підродини *Vamusoideae* (Бамбукові) ізольовано та ідентифіковано шляхом аналізу нуклеотидного складу фрагментів *rrs*-генів (генів 16S рДНК), що ампліфікували як з тканин рослин, так і з виділених колоній культур ендофітів. Виділено 74 штами мікроорганізмів, із яких 47 віднесено до родин *Bacillaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Paenibacillaceae* і *Microbacteriaceae* та родів *Agrobacterium/Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Leifsonia*, *Achromobacter* і *Acinetobacter*.

К л ю ч о в і с л о в а : ендофітні бактерії, бамбук, ідентифікація, 16S рДНК.

