

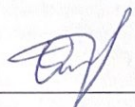
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (специализация, магистерская программа): Микробиология и вирусология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
ФОРМИРОВАНИЕ РИЗОБИОМА РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS*
THALIANA В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ МИКРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Обучающийся 2 курса
группы 01-140-2



Ф.Р. Османова

Научный руководитель
д-р биол. наук, профессор



М.Р. Шарипова

Научный руководитель
канд. биол. наук, старший научный сотрудник



Л.Р. Валеева

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



О.Н. Ильинская

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Микробные сообщества, ассоциированные с растениями	7
1.1.1 Разнообразие таксонов микроорганизмов, ассоциированных с растениями	7
1.1.2 Микрофлора ризосферы растений	9
1.1.3 Формы взаимодействия растений и микроорганизмов	11
1.2 Роль микрофлоры почв и окружающей среды в формировании микрофлоры растений	13
1.2.1 Роль растительных метаболитов в формировании микробиома	14
1.2.2 Резистентность растений к фитопатогенным микроорганизмам: роль нормальной микрофлоры в SAR и ISR	16
1.3 Использование данных микрофлоры почв в прикладных областях	20
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	22
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	22
2.1 Почва и ее подготовка	22
2.2 Растения <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
2.3 Штаммы микроорганизмов и среды культивирования	23
2.4 Инфицирование растений фитопатогеном <i>P. syringae</i> pv. tomato DC300023	23
2.5 Отбор образцов для анализа микробиома	24
2.6 Отбор образцов для получения изолятов бактерий	25
2.7 Выделение ДНК из образцов почв ризосферы	25
2.8 Подготовка библиотек и секвенирование	25
2.9 Метагеномный анализ	26
2.10 Выделение бактериальных изолятов	26
2.11 Выделение ДНК из бактерий	26
2.12 Идентификация бактериальных штаммов	27
2.13 Анализ результатов секвенирования	28
2.14 Определение протеолитической и антагонистической активности	28

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	30
3.1 Анализ микробиома ризосферы инфицированных растений.....	30
3.2 Создание коллекций бактериальных изолятов, выделенных из ризосфер здоровых и инфицированных растений.....	40
3.3 Анализ разнообразия культивируемых бактериальных изолятов.....	44
3.4 Протеолитическая и антагонистическая активность ризосферных изолятов бактерий.....	56
Заключение	64
ВЫВОДЫ.....	65
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	67

ВВЕДЕНИЕ

Ризосфера является одной из важнейших экосистем, процессы в которой оказывают влияние как на рост самих растений, так и на более глобальные процессы, включая формирование почв и круговорот веществ. Ключевым компонентом ризосферы являются различные микроорганизмы, а их взаимодействие с растениями представляет сложнейшую биологическую систему с многообразием функций. Ответная реакция растений на биологический стресс и формирование резистентности к фитопатогенам является одним из процессов, который также напрямую связан с микробиомом ризосферы. Индуцируемая иммунная система растений формируется на основе их взаимодействия с патогенными и мутуалистическими микроорганизмами, в том числе за счет способности растений использовать защитные преимущества ризобиома. Однако все механизмы, лежащие в основе таких взаимодействий остаются мало изученными.

В связи с этим, важнейшим направлением в изучении взаимодействия растений и микроорганизмов и регуляции развития защитных механизмов растений является исследование их микрофлоры, в частности, ризобиома. Анализ корреляции между генотипами растений и их микробиомами в норме и при развитии инфекций позволяет заложить основу для дальнейших молекулярных исследований и понимания функционирования растительных и почвенных экосистем в целом. Кроме того, изучение микробиомов представляет собой актуальное направление в различных прикладных областях, таких как биотехнология и сельское хозяйство. В частности, для развития новых природных средств защиты для растительных культур.

Для изучения формирования и динамики ризобиома растений в условиях развития микробных инфекций наиболее удобным является использование модельного организма *Arabidopsis thaliana*, что связано с

наличием подробной информации о нуклеотидной последовательности о геноме и его малым размером, а также большим разнообразием генотипов.

Цель работы – выявление изменений в микробиоме ризосферы растений *Arabidopsis thaliana* как фактора развития устойчивости к фитопатогенам в условиях развития микробных инфекций.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) Проведение метагеномного анализа микробиома ризосферы инфицированных и здоровых растений *A. thaliana* экотипа Col-0.
- 2) Создание коллекций бактериальных изолятов, выделенных из ризосфер здоровых и инфицированных растений *A. thaliana* экотипов Col-0 и Sf-2.
- 3) Идентификация и анализ видового разнообразия культивируемых бактериальных изолятов.
- 4) Определение протеолитической и антагонистической активности ризосферных изолятов бактерий.

ВЫВОДЫ

1) Анализ микробиомов ризосферы корней растений *A. thaliana* экотипа Col-0 в норме и в условиях инфицирования фитопатогенном *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 показал, что бактериальные сообщества почвенных образцов всех трех экспериментальных групп (DC3000, Control, Soil) преимущественно были представлены филумами *Proteobacteria* (37.7 %, 40.3 %, 39.8 %), *Actinobacteriota* (30.1 %, 30.1 %, 28.4 %) и *Firmicutes* (13.8 %, 9.2 %, 11.3 %). Для всех экспериментальных групп *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacilli* и *Clostridia* были наиболее распространенными классами. Различия в микробиомах растений было обнаружено на уровне порядков *Bryobacterales* (*Acidobacteriae*), *Polyangiales* (*Mycococcota*), *Gemmatales* (*Planctomycetes*), представленность которых была ниже у инфицированных растений.

2) Из полученных образцов почв ризосферы растений *A. thaliana* экотипов Col-0 и Sf-2 в норме и при инфицировании фитопатогеном *P. syringae* DC3000, в общей сложности были отобраны и выделены чистые культуры 122 бактериальных изолятов с уникальной морфологией.

3) Проведена идентификация выделенных изолятов бактерий контрольной и опытных групп исследуемых экотипов растений *A. thaliana* Col-0 и Sf-2. Наиболее распространенными культивируемыми бактериями, ассоциированными с экотипом Col-0 являлись представители родов *Bacillus*, *Actinomyces* и *Streptomyces* в обоих исследуемых группах. Наиболее распространёнными изолятами, выделенными из ризосферы экотипа Sf-2, являлись бактерии родов *Pseudomonas*, *Actinomyces* - в здоровых растениях, *Actinomyces* и *Paenibacillus* - в инфицированных растениях.

4) Внеклеточная протеолитическая активность бактериальных изолятов была обнаружена у представителей родов *Bacillus* и *Actinomyces*. Антагонистической активностью по отношению к фитопатогену *P. syringae*

DC3000 обладали представители рода *Bacillus*: *Bacillus tequilensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*.