

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Направление: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

**ВЛИЯНИЕ ФИТОПАТОГЕНОВ НА ИЗМЕНЕНИЕ ДЛИНЫ
ТЕЛОМЕР *ARABIDOPSIS THALIANA***

Работа завершена:

"31" мая 2018 г. Санникова (А.В. Санникова)

Работа допущена к защите:

Научные руководители

д.б.н., профессор,

"31" мая 2018 г. М.Р. Шарипова (М.Р. Шарипова)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор,

"31" мая 2018 г. О.И. Ильинская (О.И. Ильинская)

Казань–2018

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Теломеры и старение	7
1.2 Факторы, влияющие на длину теломер	8
1.3 Длина теломер и возрастные заболевания	11
1.4 Влияние инфекций на изменение длины	13
1.5 Заключение по обзору литературы	24
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	26
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	27
2.1 Условия выращивания растений <i>A. thaliana</i>	27
2.2 Генотипирование мутантов растений	27
2.2.1 Выделение геномной ДНК растений	27
2.2.2 ПЦР	28
2.2.3 Электрофорез в агарозном геле	29
2.3 Анализ длины теломер методом TRF (Terminal Restriction Fragment analysis) или Southern blotting	29
2.4 Заражение растений <i>A. thaliana</i> бактериями <i>P. syringae</i> DC3000	30
2.4.1 Штамм <i>P. syringae</i> DC3000	30
2.4.2 Инфицирование растений бактериями <i>P. syringae</i> DC3000	30
2.4.3 Анализ инфицирования тканей растений	31
2.5 Анализ длины теломер с помощью амплификации теломерных повторов ПЦР-методом PETRA	32
2.6 Биоинформационический метод обработки данных	33
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	34
3.1 Результаты генотипирования	34
3.2 Тестирование геномной ДНК	35

3.3 Анализ длины теломер в растениях-нокаутах по исследуемому гену	36
3.4 Заражение растений <i>A. thaliana</i> бактериями <i>P. syringae</i> DC3000	37
3.5 Проверка качества геномной ДНК после бактериального заражения	44
3. 6. Анализ длины теломер <i>por2c-2</i> с помощью PETRA-анализа	44
3.7. PETRA – анализ длины теломер <i>por2c-2</i> в зараженных <i>P. syringae</i> DC3000 растениях	45
ВЫВОДЫ	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	49

РЕФЕРАТ

Теломеры – нуклеопротеиновые комплексы на концах хромосом эукариот, участвующие в защите хромосомной ДНК от деградации и повреждений, и определяющие продолжительность жизни клетки. Неблагоприятные факторы окружающей среды, образ жизни, возрастные и инфекционные заболевания способны влиять на длину теломер в клетках млекопитающих. Для растений характерны сложные механизмы взаимодействия с фитопатогенными микроорганизмами, включающие различные регуляторные молекулы и фитогормоны, в совокупности составляющие иммунный ответ растений. Однако остается открытым вопрос о влиянии биотических факторов на регуляцию длины теломер у растений. Фитопатогенные бактерии *Pseudomonas syringae* являются одними из широко распространенных возбудителей заболеваний растений, наносящих значительный урон в сельском хозяйстве. *Arabidopsis thaliana* являются наиболее предпочтительными модельными растительными организмами как для изучения биологии теломер, так и для исследований в области взаимодействий растение-фитопатоген.

В данном исследовании использовали метод PETRA, чтобы увидеть, как изменяется длина теломер в контрольных растениях и в мутантах *por2c-2* без бактериального заражения и подвергшихся бактериальному заражению. *A. thaliana* является идеальным модельным организмом для таких исследований, так как большинство его хромосомных концов содержат уникальные субтеломерные последовательности.

Согласно полученным данным все растения *por2c-2* первого, второго и третьего поколения являются гомозиготами по Т-ДНК вставке. TRF-анализ показал, что нокаут мутация в данном гене не влияет на длину теломер. При инфицировании растений *A. thaliana* бактериями *P. syringae* DC3000 на 6 день после инфицирования наблюдали первые признаки хлороза на листьях. На 14 день после инфицирования наблюдали полное проявление инфекции и гибель растений. С помощью PETRA анализа мы оценили 4R теломеры в интактном мутантных растениях *por2c-2*, а также в инфицированных растениях *por2c-2* второго (G2*) и третьего поколения (G3*). Показано, что длина теломер в третьем поколении мутантов снижается при инфицировании растений фитопатогенными бактериями *P. syringae* DC3000.

ВВЕДЕНИЕ

Длина теломер является показателем репликативного возраста клетки и существует связь между длиной теломер и продолжительностью жизни. Теломеры представляют собой совокупность повторов ДНК и комплекса специфических белков на концевых участках эукариотических хромосом. Они необходимы для сохранения целостности генома, предотвращения слипания концевых участков хромосом и в защите от нуклеаз. Однако с каждым делением клетки теломеры укорачиваются, что приводит к клеточному старению.

В природе существует множество факторов, которые могут влиять на изменение длины теломер. Ранее показано, что засуха не влияет на

изменение длины теломер в растениях *Arabidopsis thaliana*. Остался открытым вопрос, могут ли влиять на длину теломер биотические факторы окружающей среды. Чтобы провести такие исследования мы использовали два модельных объекта: микроорганизмы рода *Pseudomonas* и растение *A. thaliana*. Выбор *Pseudomonas syringae* обоснован тем, что эти бактерии являются распространенными микроорганизмами способными заражать сельскохозяйственные культуры. Биология теломер модельного растительного организма *A. thaliana* хорошо изучена, что делает его наиболее перспективным объектом для проведения исследований по изменению длины теломер под воздействием различных факторов.

Целью работы было определение влияния фитопатогенных бактерий *P. syringae* DC3000 на изменение длины теломер в растениях *A. thaliana* с нокаутом по гену *NOP2C-2*.

В связи с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

- 1) Получить гомозиготные линии мутантных растений.
- 2) Определить изменение длины теломер в исследуемой мутантной линии в нескольких поколениях с помощью рестрикционного анализа (TRF-анализ).
- 3) Определить изменение длины теломер в зараженных растениях с помощью анализа длины теломер методом ПЦР (PETRA-анализ).

ВЫВОДЫ

1) При выделении ДНК из мутантных растений *Arabidopsis thaliana* с нокаутом гена *NOP2C-2* установлена гомозиготность образцов по Т-ДНК вставке.

2) Показано, что длина теломер у мутантов по гену *NOP2C* не отличается от длины теломер экотипа Col-0, на основе которого получен

мутант. Сделано заключение, что нокаут по гену *NOP2C-2* не влияет на длину теломер в трех поколениях.

3) Инфицирование фитопатогенными бактериями *P. syringae* DC3000 растений *A. thaliana* вызывает хлороз листьев. У мутантов третьего поколения по гену *NOP2C* установлено уменьшение длины теломер при инфицировании фитопатогенными бактериями *P. syringae* DC3000.