

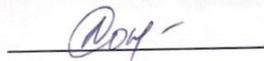
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (магистерская программа): Микробиология и вирусология

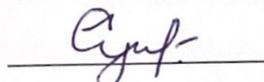
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *PANTOEA*
BRENNERI С ИНАКТИВИРОВАННЫМ ГЕНОМ ИНДОЛ-3-
ПИРУВАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ

Обучающийся 2 курса
группы 01-240-2



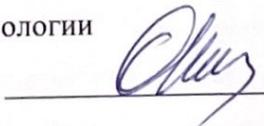
Сокольникова Л.В.

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент



Сулейманова А.Д.

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

Казань – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Индуцированная системная резистентность (ISR), вызванная PGPR	8
1.1.1 Типы системной резистентности	8
1.1.2 Распознавание полезных микроорганизмов растениями.....	9
1.1.3 Процессы, происходящие при ISR.....	10
1.1.3.1 Выработка активных форм кислорода.....	10
1.1.3.2 Отложение каллозы.....	10
1.1.3.3 Активация генов, связанных с защитой	11
1.1.3.4 Выработка вторичных метаболитов.....	11
1.1.3.5 Закрытие устьиц.....	12
1.2 Продукция индол-3-уксусной кислоты (ИУК).....	12
1.2.1 Свойства ИУК и ее физиологические эффекты по отношению к растениям.....	12
1.2.2 Синтез ИУК микроорганизмами	14
1.2.2.1 Триптофан-зависимый синтез ИУК.....	14
1.2.2.1.1 Индол-3-ацетамидный путь (IAM)	15
1.2.2.1.2 Путь индол-3-пировиноградной кислоты (IPA)	15
1.2.2.1.3 Триптаминовый путь (TAM).....	16
1.2.2.1.4 Индол-3-ацетонитрильный путь (IAN).....	16
1.2.2.1.5 Оксидазный путь боковой цепи триптофана (TSO)	17
1.2.2.2 Триптофан-независимый синтез ИУК.....	17
1.2.2.3 Регуляция синтеза ИУК.....	18
1.2.3 Функции ИУК для микроорганизмов.....	20
1.3 Бактерии рода <i>Pantoea</i>	20
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	23
2.1 Объекты исследования	23

2.2 Питательные среды и условия культивирования	23
2.3 Используемые векторы.....	24
2.4 Выделение плазмидной и геномной ДНК.....	24
2.5 Полимеразная цепная реакция	24
2.6 Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	25
2.7 Инактивация гена индол-3-пируватдекарбоксилазы <i>ipdC</i> в штамме <i>P. brenneri</i> 3.2.....	25
2.8 Изучение биохимических способностей нативного и мутантного штаммов <i>P. brenneri</i> 3.2	29
2.9 Оценка динамики роста нативного и мутантного штаммов <i>P. brenneri</i> 3.2	29
2.10 Оценка способности нативного и мутантного штаммов <i>P. brenneri</i> 3.2 синтезировать ИУК	29
2.11 Оценка солубилизации трикальцийфосфата нативным и мутантным штаммами <i>P. brenneri</i> 3.2	30
2.12 Оценка способности секретировать сидерофоры нативным и мутантным штаммами <i>P. brenneri</i> 3.2	30
2.13 Оценка способности образовывать биопленки нативным и мутантным штаммами <i>P. brenneri</i> 3.2	31
2.14 Оценка способности к продукции биосурфактантов нативным и мутантным штаммами <i>P. brenneri</i> 3.2	31
2.15 Оценка подвижности нативного и мутантного штаммов <i>P. brenneri</i> 3.2	31
2.16 Стерилизация семян	31
2.17 Изучение влияния нативного и мутантного штаммов <i>P. brenneri</i> 3.2 на рост и развитие пшеницы	31
2.18 Математическая обработка результатов	32
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	33
3.1 Получение штамма <i>P. brenneri</i> 3.2 $\Delta ipdC$	33
3.2 Характеристика штамма <i>P. brenneri</i> 3.2 $\Delta ipdC$	36
3.2.1 Биохимические способности нативного и мутантного штаммов <i>P. brenneri</i> 3.2.....	36
3.2.2 Динамика роста нативного и мутантного штаммов <i>P. brenneri</i> 3.2.....	38

3.2.3 Динамика биосинтеза ИУК нативным и мутантным штаммами <i>P. brenneri</i> 3.2.....	39
3.2.4 Солюбилизация трикальцифосфата	41
3.2.5 Секреция сидерофоров.....	42
3.2.6 Образование биопленок	42
3.2.7 Продукция биосурфактантов.....	43
3.2.8 Подвижность штаммов	44
3.2.9 Влияние нативного и мутантного штаммов <i>P. brenneri</i> 3.2 на рост и развитие пшеницы	45
ВЫВОДЫ.....	50
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	51

ВВЕДЕНИЕ

С быстрым ростом мирового населения спрос людей на сельскохозяйственную продукцию возрастает. Стремление повысить продуктивность сельскохозяйственных культур привело к избыточному применению удобрений и пестицидов, что негативно отражается на состоянии окружающей среды [Yu *et al.*, 2022]. В последние годы внимание исследователей все более сосредоточено на использовании полезных микроорганизмов в качестве агентов биоконтроля для рационального и устойчивого ведения сельского хозяйства [Riseh, Vazvani, 2024].

Бактерии, обитающие в области ризосферы и имеющие симбиотические отношения с растением, известны как ризобактерии, стимулирующие рост растений (PGPR – plant growth promotion rhizobacteria) [Egamberdieva *et al.*, 2023]. PGPR влияют на улучшение роста растений путем синтеза фитогормонов, аминокислот, ферментов (АЦК-дезаминазы), солюбилизации фосфора и калия [Borah *et al.*, 2023], фиксации атмосферного азота, образования сидерофоров, продукции антибиотиков, цианистого водорода, гидролитических ферментов, а также индукции системной резистентности [Abdelaziz *et al.*, 2023]. Индуцированная системная резистентность (ISR – induced system resistance) – это механизм, с помощью которого полезные для растений бактерии и грибы вырабатывают иммунитет, который может стимулировать рост сельскохозяйственных культур и их устойчивость к различным фитопатогенам, насекомым и паразитам [Rabari *et al.*, 2023]. Растения, активированные полезными микробами, находятся в особом состоянии, которое называется ISR-праймингом. При этом они могут быстрее реагировать на воздействия патогенов и активировать свои защитные реакции [Yu *et al.*, 2022]. Исследования молекулярных основ ISR-прайминга проводятся достаточно давно, однако подробные механизмы, с помощью которых PGPR его вызывают, еще не полностью изучены. Оценка роли в данном процессе

определенных генетических локусов, ответственных за различные PGP-свойства, исследуется путем их инактивации с последующим анализом взаимодействия нативных и модифицированных штаммов ризобактерий с растениями. Известно, что фитогормоны являются важной составляющей сигнального пути ISR. При этом основными считаются жасмоновая кислота, этилен и салициловая кислота, в то время как роль ауксинов и других фитогормонов в активации ISR-прайминга неизвестна [Zehra *et al.*, 2021].

Целью работы явилось получение и характеристика ризосферного штамма *Pantoea brenneri* 3.2 с инактивированным геном индол-3-пируватдекарбоксилазы (*ipdC*).

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Получить безмаркерный мутантный штамм с делетированным геном индол-3-пируватдекарбоксилазы *P. brenneri* 3.2 $\Delta ipdC$.
- 2) Провести сравнительный анализ фенотипических свойств нативного и мутантного штаммов *P. brenneri* 3.2.
- 3) Оценить влияние нативного и мутантного штаммов *P. brenneri* 3.2 на рост и развитие пшеницы.

ВЫВОДЫ

1) Получили безмаркерный мутантный штамм с делегированным геном индол-3-пируватдекарбоксилазы *P. brenneri* 3.2 $\Delta ipdC$.

2) Установили, что мутантный штамм *P. brenneri* 3.2 $\Delta ipdC$ синтезировал ИУК на 31.2% меньше, потерял способность ферментировать мелибиозу, на 36.1% снижалась способность формировать биопленки и на 12% - биосурфактанты по сравнению с нативным штаммом. Делеция гена *ipdC* не повлияла на динамику роста штамма, его подвижность, способность солиобилизировать трикальцийфосфат и секретировать сидерофоры.

3) Установили, что длина корней и побегов растений не отличалась при инокуляции суспензией клеток мутантного и нативного штаммов *P. brenneri* 3.2. Проростки, инокулированные мутантным штаммом, имели менее разветвленную корневую систему, биомасса корней снижалась на 23.3%, а биомасса побегов – на 17% по сравнению с нативным штаммом.