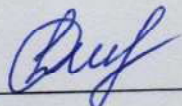


Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Направление подготовки: 06.04.01– Биология

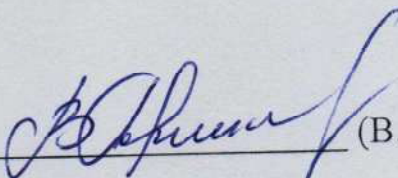
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
ИДЕНТИФИКАЦИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ФОСФОНАТОВ ФИТОПАТОГЕНА
PESTOBACTERIUM ATROSEPTOCUM SCRI1043

Студент 2 курса

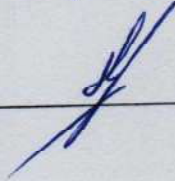
" 6 " мая 20__ г.  (О.И. Парфирова)

Научные руководители

к.б.н., доцент, с.н.с.

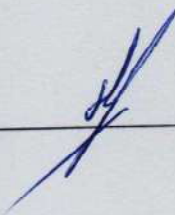
" 6 " мая 20__ г.  (В.Ю. Горшков)

д.б.н., профессор

" 6 " мая 20__ г.  (В.М. Чернов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

" 6 " мая 20__ г.  (В.М. Чернов)

Казань–2020

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Характеристика фитопатогенных бактерий <i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCRI1043	8
1.2 Общее представление о фосфонатах.....	9
1.3 Классификация фосфонатов.....	11
1.3.1 Высокомолекулярные фосфонаты.....	11
1.3.2 Низкомолекулярные фосфонаты	13
1.4 Метаболизм фосфонатов	16
1.4.1 Биосинтез фосфонатов.....	16
1.4.2 Катаболизм фосфонатов	17
1.5 Распространение фосфонатов среди фитопатогенных бактерий.....	21
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	25
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	25
2.1 Объекты исследований	25
2.2 Методы исследований	25
2.2.1 Культивирование растений и их инфицирование.....	25
2.2.2 Культивирование бактерий.....	26
2.2.3 Получение экстракта клубней картофеля.....	27
2.2.4 Анализ нуклеотидных последовательностей и конструирование праймеров.....	27
2.2.5 Выделение РНК и синтез кДНК	27
2.2.6 Полимеразная цепная реакция в реальном времени	28
2.2.7 Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле.....	28
2.2.8 Расчет относительного уровня экспрессии генов.....	29
2.2.9 Нарботка и экстракция фосфонатов	29
2.2.10 Очистка фосфонатов	30

2.2.11 ЯМР-спектроскопия.....	30
2.2.12 Сайт-направленный мутагенез	31
2.2.12.1 Нарботка целевого гена Eca0487 и прилегающих областей с помощью ПЦР	31
2.2.12.2 Аденилирование ПЦР фрагмента.....	31
2.2.12.3 Лигирование аденилированного ПЦР-фрагмента с вектором pGEM-T	31
2.2.12.4 Получение химически компетентных клеток <i>E. coli</i> NovaBlue.....	32
2.2.12.5 Трансформация клеток <i>E. coli</i> Nova Blue	32
2.2.12.6 Проверка клонов на наличие плазмиды.....	33
2.2.12.7 Выделение плазмидной ДНК.....	33
2.2.12.8 Замена целевого локуса Eca0489 на канамициновую кассету методом CPES	33
2.2.12.9 Очистка ДНК от реакционных смесей.....	34
2.2.12.10 Рестрикция плазмиды pKNG101	34
2.2.12.11 Лигирование мутантного локуса с вектором для мутагенеза.....	34
2.2.12.12 Получение электрокомпетентных клеток <i>E. coli</i> cc118.....	34
2.2.12.13 Трансформация клеток <i>E. coli</i> cc118 при помощи электропорации	35
2.2.12.14 Трехродительское скрещивание.....	35
2.2.13 Анализ данных высокопроизводительного секвенирования.....	36
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	37
3.1 Анализ транскриптомных профилей фитопатогена <i>P.atrosepticum</i> SCRI1043 на ранней и поздней стадиях колонизации растения	37
3.2 Подбор условий <i>in vitro</i> , индуцирующих синтез фосфонатов пектобактериями	40
3.3 Детекция низкомолекулярных фосфонатов пектобактерий.....	42
3.4 Получение нокаут-мутанта по гену <i>fom1</i>	48
3.5 Сравнение фенотипов дикого типа <i>P. atrosepticum</i> SCRI1043 и его мутантной формы по гену <i>fom1</i>	56

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	59
ВЫВОДЫ	61
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	62
Приложение 1	69

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии рода *Pectobacterium* вызывают заболевания, выражающиеся развитием так называемых мягких гнилей, и приводят к потере до 70% урожая [Mansfield *et al.*, 2012]. В то же время показано, что пектобактерии могут колонизировать растения, не вызывая симптомов заболевания [Perombelon, 2002; Czajkowski *et al.*, 2011]. Следовательно, эти микроорганизмы способны взаимодействовать с растениями по разным сценариям, вызывая не только типичные, сопряженные с развитием гнилей, инфекции, но и латентные (бессимптомные).

Развитие типичных симптомов заболевания обусловлено переходом пектобактерий от неагрессивной стратегии колонизации растений к агрессивной. По всей вероятности, существуют молекулярные механизмы, определяющие смену одной стратегии на другую.

Примером «переключателя поведения» *Pectobacterium atrosepticum* можно считать коронафациевую кислоту. Коронафациевая кислота синтезируется *P. atrosepticum* на ранней стадии колонизации растения и, будучи функциональным аналогом жасмоновой кислоты растений, повышает уровень ее содержания в растении. Это приводит к тому, что растение становится более восприимчивым к патогену, который в свою очередь вызывает развитие тяжелых симптомов заболевания. Неспособные синтезировать коронафациевую кислоту мутанты *P. atrosepticum* вызывают лишь латентные инфекции и не приводят к развитию манифестных. Вероятно, что коронафациевая кислота является не единственным «переключателем поведения» пектобактерий.

Цель данной работы заключалась в поиске генов фитопатогенной бактерии *Pectobacterium atrosepticum* SCR11043, экспрессирующихся дифференциально при реализации альтернативных стратегий взаимодействия микроорганизма с растениями, а также характеристике соответствующих генных продуктов и их роли в развитии инфекции.

В рамках данной цели были поставлены следующие задачи:

1) Выявить гены *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043, характеризующиеся разным уровнем экспрессии на разных стадиях колонизации растений табака (*Nicotiana tabacum*): 1) бессимптомной стадии и 2) стадии, сопряженной с развитием мягкой гнили.

2) Провести анализ продуктов одного из генов *P. atrosepticum* SCRI1043, экспрессирующихся дифференциально на разных стадиях колонизации растений табака.


3) Получить нокаут-мутант *P. atrosepticum* SCRI1043 по гену, дифференциально экспрессирующемуся на разных стадиях колонизации растений табака, и сравнить фенотипы дикой и мутантной форм.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.Структура

Автор работы	Парфирова Ольга Игоревна
Подразделение	
Тип работы	Магистерская диссертация
Название работы	Идентификация низкомолекулярных экстраклеточных фосфонатов фитопатогена <i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCRI1043
Название файла	ПарфироваО.И._вкр2020.pdf
Процент заимствования	4.52 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	1.81 %
Процент оригинальности	93.66 %
Дата проверки	16:04:21 22 мая 2020г.
Модули поиска	Модуль поиска ИПС "Адилет"; Модуль выделения библиографических записей; Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Модуль поиска переводных заимствований по elibrary (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по интернет (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по Wiley (RuEn); Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Коллекция Патенты; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов; Коллекция Wiley
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович ФИО проверяющего
Дата подписи	22.05.2020 

Чтобы убедиться
в подлинности справки,
используйте QR-код, который
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.