

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА БОТАНИКИ И ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Направление 06.03.01 биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

**РОЛЬ ЭНТЕРОБАКТИН – ПОДОБНОГО СИДЕРОФОРА
PESTOVACTERIUM ATROSEPTICUM В РАЗВИТИИ МЯГКИХ
ГНИЛЕЙ РАСТЕНИЙ**

Работа завершена:

«21» июль 2020 г.

(Пайгачева Н.О.)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.б.н., доцент, с.н.с.

«25» июль 2020 г.

(Горшков В.Ю.)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«27» июль 2020 г.

(Тимофеева О.А.)

Казань - 2020

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1 Общая характеристика бактерий рода <i>Pectobacterium</i>	8
1.2 Структурно-функциональная характеристика сидерофоров.....	10
1.2.1 Структура и разновидности сидерофоров	10
1.2.2 Биосинтез сидерофоров.....	16
1.2.3 Сидерофоры как фактор вирулентности.....	19
1.2.4 Роль сидерофоров в устойчивости.....	22
1.2.5 Сидерофоры как противопатогенные агенты	25
1.3 Структурно-функциональная характеристика энтеробактина.....	30
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	35
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	35
2.1 Объекты исследования и их культивирование	35
2.2 Создание мутантных форм пектобактерий.....	37
2.2.1 Конструирование мутантного локуса и наработка последовательности ОРС ЕСА0481 с помощью ПЦР.....	37
2.2.2 Электрофорез ДНК и лигирование фрагмента с вектором pGEM-T... 38	38
2.2.3 Получение химически компетентных клеток <i>E. coli</i> NovaBlue их трансформация	38
2.2.4 Выделение плазмидной ДНК и замена целевого локуса ЕСА0481 (ген <i>entA</i>) на канамициновую кассету	40
2.2.5 Помещение мутантного локуса в плазмиду pKNG101 и определение нуклеотидной последовательности ДНК.....	40
2.2.6 Трансформация клеток <i>E.coli</i> CC118 с помощью метода электропорации	41
2.2.7 Трехродительское скрещивание и отбор мутантов.....	42

2.2.8	Построение кривых роста дикого типа и нокаут-мутанта <i>P. atrosepticum</i>	43
2.3	Оценка влияния мутаций на способность <i>P. atrosepticum</i> вызывать мацерацию растительных тканей	43
2.3.1	Культивирование бактерий	43
2.3.2	Культивирование растений и их инфицирование	43
2.4	Оценка устойчивости бактерий к окислительному шоку	44
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	45
3.1	Создание модели мутантного локуса <i>in silico</i>	45
3.2	Конструирование мутантного локуса <i>in vitro</i> для направленного мутагенеза гена <i>entA</i> <i>P. atrosepticum</i>	46
3.3	Создание клонов <i>Pectobacterium atrosepticum</i> , содержащих мутантный локус 53	53
3.4	Сравнение кривых роста дикого штамма <i>P. atrosepticum</i> и его мутантной по гену белка EntA формы	54
3.5	Влияние нокаут-мутации гена на вирулентность и стрессоустойчивость <i>Pectobacterium atrosepticum</i>	56
	ВЫВОДЫ	60
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	61

- ISR – индуцированная системная приобретенная устойчивость
- LB – среда Luria-Bertani
- MPS – major facilitator superfamily
- NCBI – National Center for Biotechnological Information
- NGAL – Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin
- NRPS – nonribosomal peptide synthetase
- OMR – outer membrane receptor
- Pta – *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043
- PBP – penicillin binding protein
- PCWDEs – Plant Cell Wall Degrading Enzymes
- Poh – полигалактуронид

ВЫВОДЫ

1. Получена мутантная форма *P. atrosepticum* по гену *entA*, кодирующему фермент биосинтеза энтеробактин-подобного сидерофора.
2. Дикая и мутантная по гену *entA* формы *P. atrosepticum* не различаются по ростовым характеристикам при культивировании *in vitro* на неселективных средах.
3. Нокаут-мутация гена *entA* приводит к увеличению восприимчивости *P. atrosepticum* к окислительному шоку.
4. Вирулентность *entA*-мутантного штамма *P. atrosepticum* в отношении предобработанных салициловой кислотой растений табака ниже, чем у дикого типа; при этом вирулентность дикого и мутантного штаммов в отношении необработанных салициловой кислотой растений не различается.