

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01 – биология

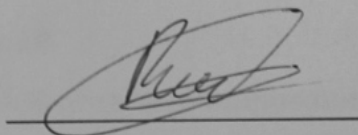
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

**ХАРАКТЕРИСТИКА ГОРМОНАЛЬНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В
РАСТЕНИЯХ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ФИТОПАТОГЕННЫМИ
ПЕКТОБАКТЕРИЯМИ С ПОМОЩЬЮ ТРАНСКРИПТОМНОГО
ПРОФИЛИРОВАНИЯ**

Работа завершена:

" 1 " июня 2017 г.

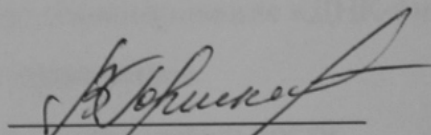


(Р.Ф. Губаев)

Работа допущена к защите:

Научные руководители
к.б.н., с.н.с., ст. преп.

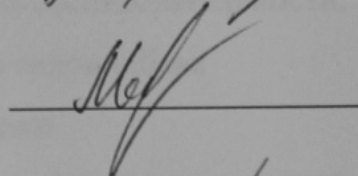
" 1 " июня 2017 г.



(В.Ю. Горшков)

к.б.н., ассистент

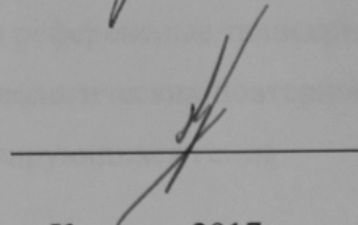
" 1 " июня 2017 г.



(Е.С. Медведева)

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор

" 1 " июня 2017 г.



(В.М. Чернов)

Казань – 2017

	Стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Основные принципы взаимодействия растений с фитопатогенами	7
1.2 Роль фитогормональных систем при взаимодействии растений с микроорганизмами	10
1.3 Общая характеристика фитопатогенов рода <i>Pectobacterium</i>	16
1.4 Транскриптомное профилирование с помощью высокопроизводительного секвенирования	18
1.4.1 Высокопроизводительное секвенирование в транскриптомике	18
1.4.2 Подготовка библиотек (к)ДНК и их секвенирование	20
1.4.3 Анализ данных транскриптомного профилирования	22
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	27
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	27
2.1 Объект исследований	27
2.2 Методы исследований	27
2.2.1 Культивирование бактерий	27
2.2.2 Культивирование растений и их инфицирование	27
2.2.3 Выделение РНК и синтез кДНК-библиотек	29
2.2.4 Высокопроизводительное секвенирование кДНК-библиотек	29
2.2.5 Оценка качества и сортировка ридов	29
2.2.6 Подготовка референсной последовательности, классификация транскриптов генов табака по функциональным категориям	29
2.2.7 Выравнивание ридов на референсные транскрипты, поиск самосогласованных биологических повторностей и дифференциально экспрессирующихся генов	30

2.2.8 Классификация ДЭГ по метаболическим путям, визуализация результатов	31
2.2.9 Построение филогенетического дерева на основании последовательностей табака, кодирующих экспансины	32
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	33
3.1 Проведение высокопроизводительного секвенирования, первичная обработка данных	33
3.2 Подготовка референсной последовательности, выравнивание прочтений на референсную последовательность, поиск самосогласованных биологических повторностей	36
3.3 Поиск и функциональная классификация генов, экспрессирующихся дифференциально в интактных и инфицированных растениях табака	39
3.4 Активация/репрессия фитогормональных систем, а также регулируемых ими физиологических процессов при инфекции, вызванной <i>P. atrosepticum</i> , у растений табака	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	54
ВЫВОДЫ	56
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	57
Приложение 1	68
Приложение 2	71
Приложение 3	75

ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействие растений и патогенов представляет собой сложный процесс, в результате которого макро- и микроорганизм начинают функционировать как единая патологическая система. При формировании патологической системы происходит глубокое физиологическое преобразование макроорганизма, которое во многом регулируется фитогормональными системами. Фитогормоны могут, с одной стороны, участвовать в активации защитных ответов, направленных на сдерживание развития патогена в растении. С другой стороны, фитогормоны способны запускать реакции восприимчивости, определяющие особое преобразование внутренней среды хозяина, которое выгодно для патогена. Изменение активности определенных гормональных систем растения может являться следствием обманной тактики патогена, направленной, на оптимизацию их экологической ниши. Считается, что такая манипуляция является неотъемлемой частью взаимодействия биотрофных патогенов и растений.

Некротрофные пектобактерии, которых называют «чумой растений», взаимодействуют с хозяевами, используя «грубую силу», а именно, массивную продукцию экстраклеточных ферментов, разрушающих клетки и ткани растений. Считается, что наличие такой силы у пектобактерий освобождает их от необходимости тонко манипулировать хозяином, в том числе, воздействуя на его регуляторные системы, как это делают биотрофные патогены. Однако широкое распространение бессимптомных (латентных) инфекций, вызываемых этими бактериями, а также наличие у факторов вирулентности биотрофных патогенов (коронафациевая кислота, система секреции третьего типа), указывает на то, что стратегия их взаимодействия с хозяином не ограничивается «грубой силой». Такие факторы вирулентности используются для манипулирования регуляторными системами хозяина, в том числе, гормональными. В связи с этим, нами была выдвинута рабочая гипотеза о важной роли гормональных перестроек, приводящих к

глобальному изменению физиологии макроорганизма, во взаимодействии пектобактерий и растений.

Удобным и информативным инструментом для комплексного описания физиологических процессов организма служат методы транскриптомики основанные на высокопроизводительном секвенировании. С помощью методов транскриптомики можно одновременно проанализировать большой массив дифференциально экспрессирующихся генов, распределить их по функциональным категориям и выявить те из них, которые активируются или репрессируются при исследуемых состояниях организма.

В связи с этим целью нашего исследования была оценка уровня индукции/репрессии фитогормональных систем и регулируемых ими физиологических процессов при инфекции, вызванной *Pectobacterium atrosepticum*, в растениях табака с помощью высокопроизводительного секвенирования.

В рамках указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Подготовка и секвенирование кДНК-библиотек, соответствующих пулу мРНК интактных и инфицированных *P. atrosepticum* растений табака.
2. Поиск генов, экспрессирующихся дифференциально в интактных и инфицированных *P. atrosepticum* растениях табака.
3. Классификация генов, экспрессирующихся дифференциально в интактных и инфицированных *P. atrosepticum* растениях табака, по функциональным категориям и метаболическим путям.
4. Выявление активируемых/репрессируемых в ходе инфекции, вызванной *P. atrosepticum*, функциональных категорий, связанных с фитогормональными системами, а также физиологическими процессами, находящимися под их контролем.