

Сборка генетических конструкций для инактивации генов сурфактина и сидерофора в геноме бацилл, ответственных за формирование ISR-прайминга

Научный руководитель – Шарипова Маргарита Рашидовна

*Васильева Ю.А.*¹, *Хасанов Д.И.*², *Гильмутдинова А.И.*³, *Ласточкина Е.Э.*⁴, *Волкова Е.С.*⁵

1 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: vasileva891@mail.ru*; 2 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: hasda2149@gmail.com*; 3 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: aigwinrygilmuzn@gmail.com*; 4 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: lelya_lastochkina@bk.ru*; 5 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия, *E-mail: katenvol@mail.ru*

Различные стрессовые факторы, такие как изменение климата, вредители и патогены, вызывают снижение урожайности сельскохозяйственных культур, что приводит к нехватке продовольствия наряду с быстрым ростом населения [1]. Поэтому необходимо найти новые долгосрочные биотехнологические решения для улучшения растениеводства.

Микроорганизмы рода *Bacillus* обладают широким спектром антагонистической активности против различных патогенов растений. Успешно выживают в почвенной среде благодаря их способности формировать споры и биопленки, а также вырабатывают различные ферменты, антибактериальные соединения, сурфактин и сидерофоры. Взаимодействие бацилл с корнями приводит к возникновению устойчивого защитного состояния, называемого индуцированной системной резистентностью (ISR), однако механизм этого процесса еще не полностью изучен [2]. В связи с этим, бактерии рода *Bacillus* являются перспективными агентами для использования в сфере биологической защиты растений.

Актуальность исследования обусловлена изучением малоизученного механизма формирования системной устойчивости (ISR) у растений вызванного представителями рода *Bacillus* с применением технологии CRISPR/Cas9 для определения роли ключевых молекул в данном процессе.

Целью данного исследования являлось создание векторных конструкций для целенаправленной инактивации генов сурфактина и сидерофора в геноме представителей рода *Bacillus*, ответственных за формирование ISR-прайминга. Для инактивации генов мишеней в работе использовался шаттл-вектор pJOE9282.1, содержащий систему CRISPR/Cas9. Путем гибридизации праймеров были получены спейсерные фрагменты (sgRNA), которые интегрировали по сайту рестрикции *BsaI*. Фрагменты генов сурфактина и сидерофора были амплифицированы с геномной ДНК *B. subtilis* 168 и встроены в плазмиды по сайту *SfiI*. Полученные конструкции pVYs07.23 и pGAb07.23, содержащие систему CRISPR/Cas9, sgRNA и фрагменты генов, клонировали в клетках *E. coli* DH5a. Целостность созданных векторов подтверждали секвенированием. Полученные плазмиды pVYs07.23 и pGAb07.23 были внедрены в клетки *B. subtilis* 168 методом химической трансформации. Наличие плазмид с CRISPR/Cas9 системой подтверждали ПЦР-анализом.

Таким образом, нами были созданы и трансформированы векторные конструкции pVYs07.23 и pGAb07.23 для инактивации генов сурфактина и сидерофора соответственно. В дальнейшем планируется инактивация генов ответственных за синтез сурфактина и сидерофор в геноме различных штаммов *Bacillus*.

Работа выполнена за счет средств гранта РНФ №22-16-00138.

Источники и литература

- 1) 1. Olanrewaju, O. S., Babalola, O. O. The rhizosphere microbial complex in plant health: A review of interaction dynamics // Journal of Integrative Agriculture. 2022, №21(8). p. 2168–2182.
- 2) 2. Zhen, C., Ge, X. F., Lu, Y.T., Liu, W. Z. Chemical structure, properties and potential applications of surfactin, as well as advanced strategies for improving its microbial production // AIMS microbiology. 2023, №9(2). p. 195–217.