



Ученый Совет Санкт-  
Петербургского госуниверситета  
31 октября 2016 года

---

# **Генетические ресурсы микроорганизмов как фактор развития цивилизации**

**И.А.Тихонович**

ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии  
Санкт-Петербургский госуниверситет, кафедра генетики и  
биотехнологии

Санкт-Петербург. Пушкин

---

2016

Более 100 лет микробное сообщество почвы изучали на питательных средах.

Численность микробов в 1 г почвы считали равной  $10^6$ , а количество видов исчисляли десятками.

Сейчас подтверждено предсказание

С.Н.Виноградского - численность занижена более чем в 1000 раз и составляет  $10^9$

Большинство микроорганизмов не растет на лабораторных питательных средах, т.е. они являются некультивируемыми.



# Определения

Микробиом – вся совокупность микроорганизмов, обитающих в данной экологической нише.

**Под метагеномикой предлагается понимать область экологической генетики, изучающей закономерности формирования генетических систем в сообществах организмов, обеспечивающих их выживание в разнообразных условиях окружающей среды за счет изменения набора генов у составляющих общность индивидуумов.**

# Примеры определяющего влияния микробиома на глобальные процессы

Микробиом влияет на состав и свойства нашей атмосферы

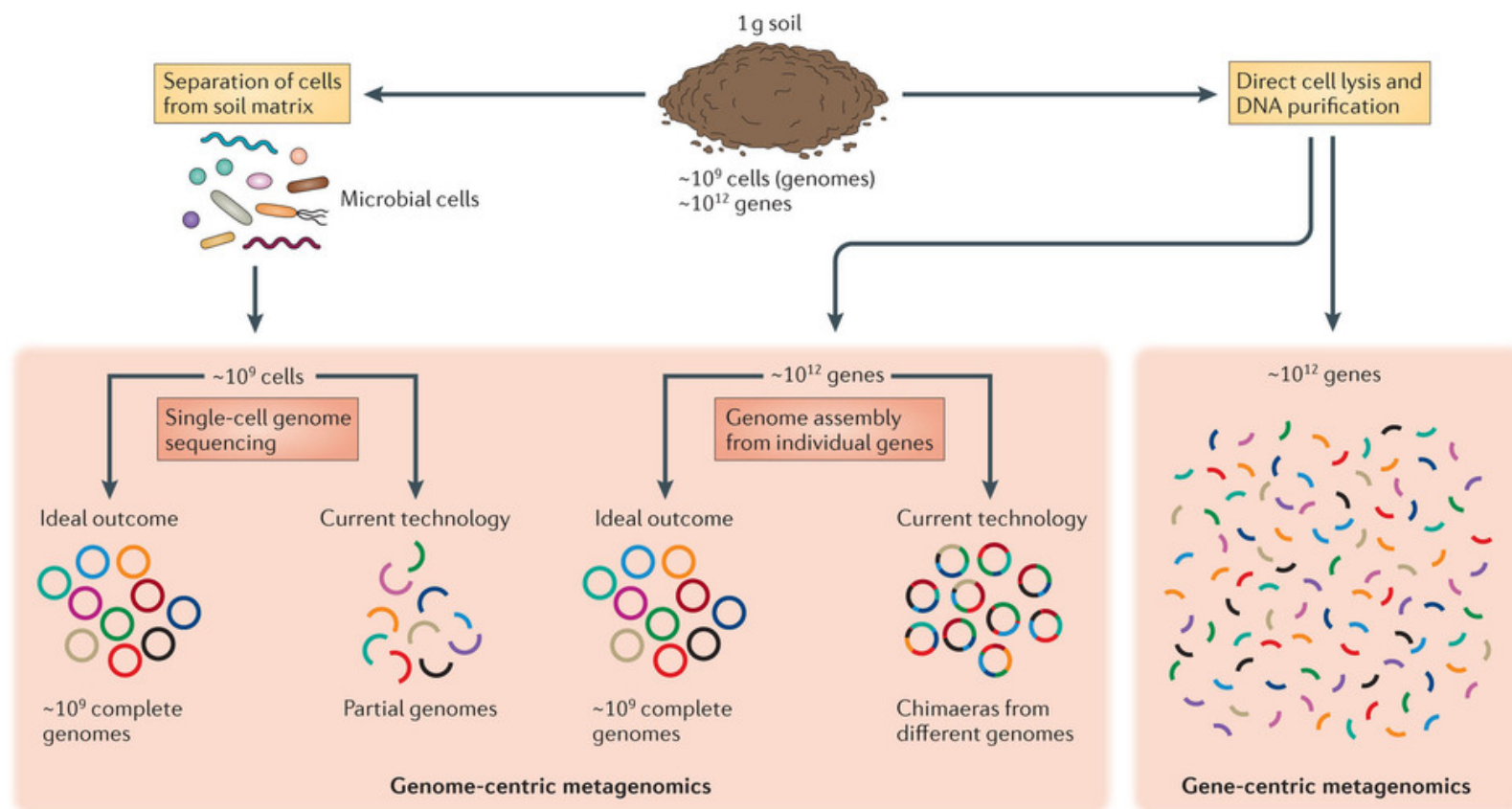
Микробиом обеспечивает здоровье человека и животных

Микробиом поддерживает рост растений и подавляет развитие болезней

Микробиом поддерживает чистоту окружающей среды

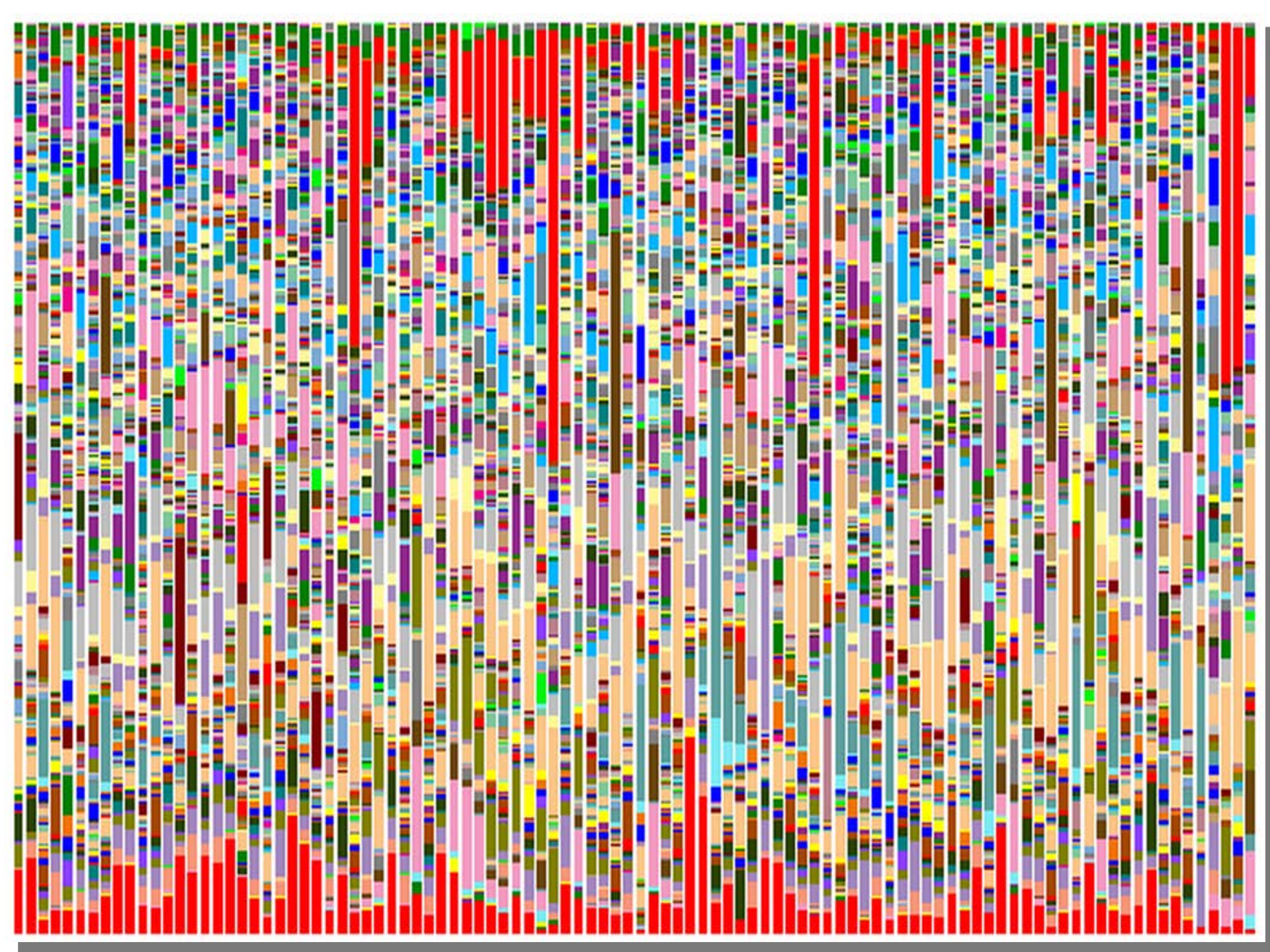


# Основные подходы в исследованиях почвенного микробиома



Геномный ассемблер  
SPAdes

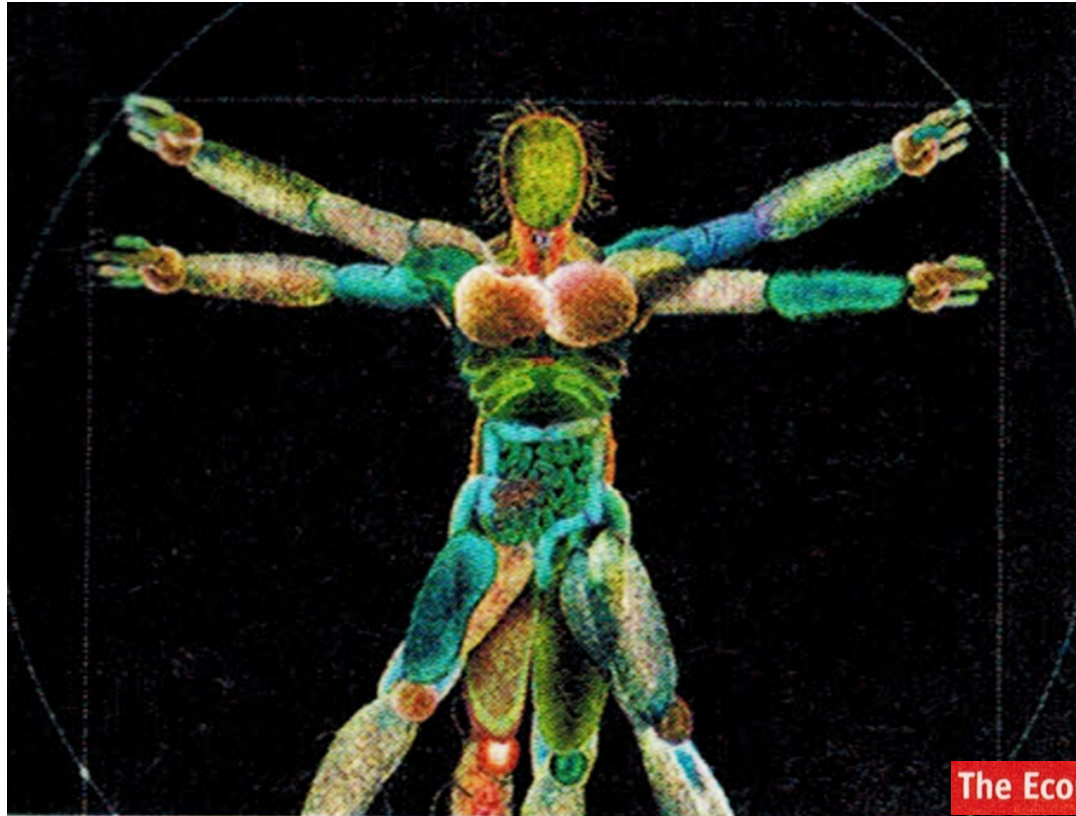






# Microbes maketh man

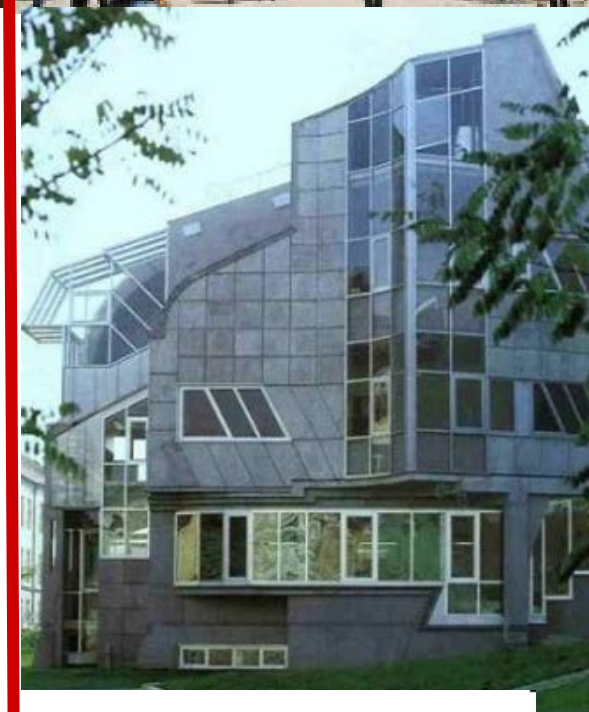
People are not just people. They are an awful lot of microbes, too



The Economist August 18th 2012

This may be because geneticists have been looking at the wrong set of genes – the 23,000 rather than the 3m. For those 3m are still inherited.

**Человек, переполненный микроорганизмами, естественно, носит их ..  
на себе и в себе (С.П.Костычев, 1928 г.)**



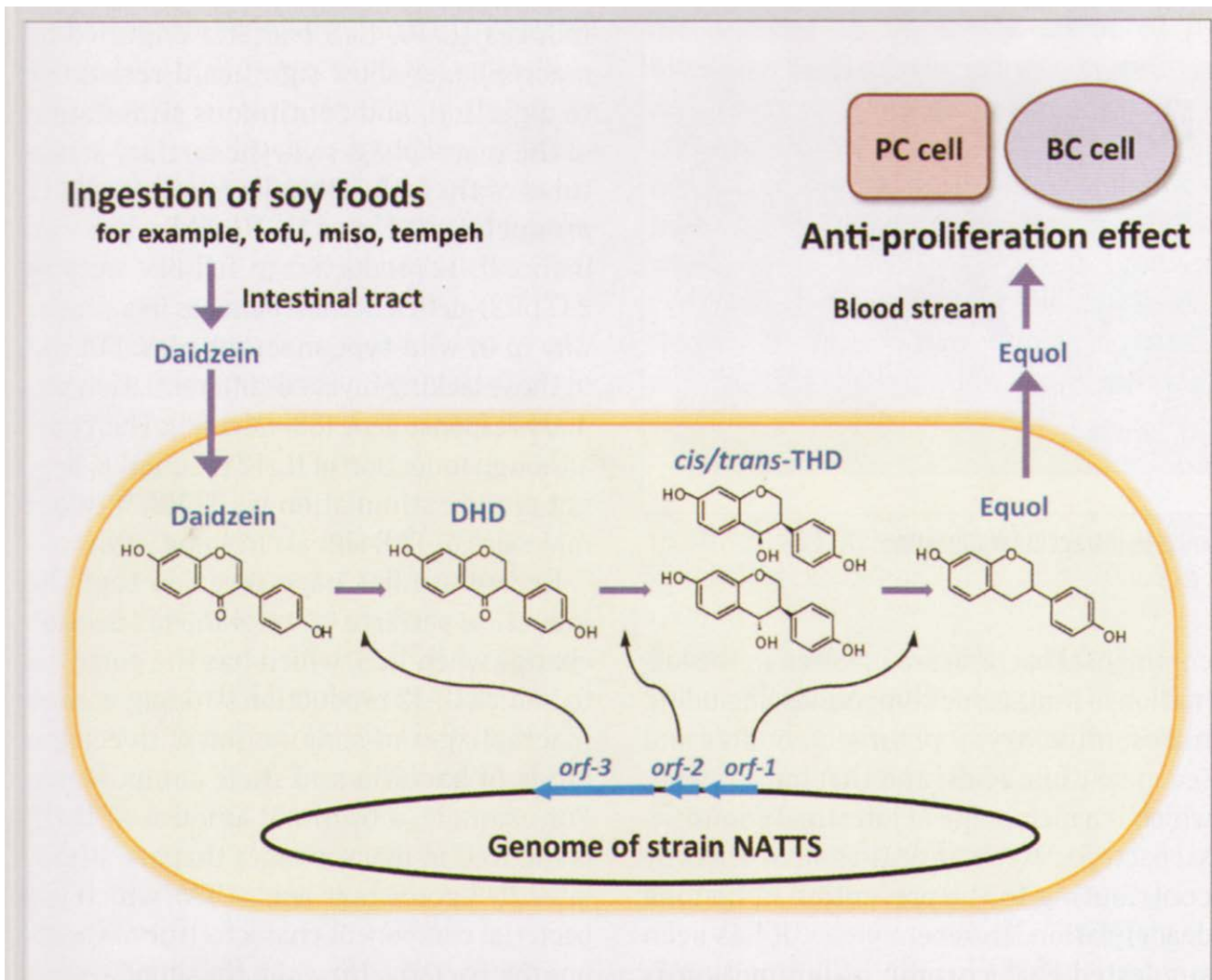
# Microbial ecology & biotechnology



Institut für Umweltbiotechnologie  
Technische Universität Graz





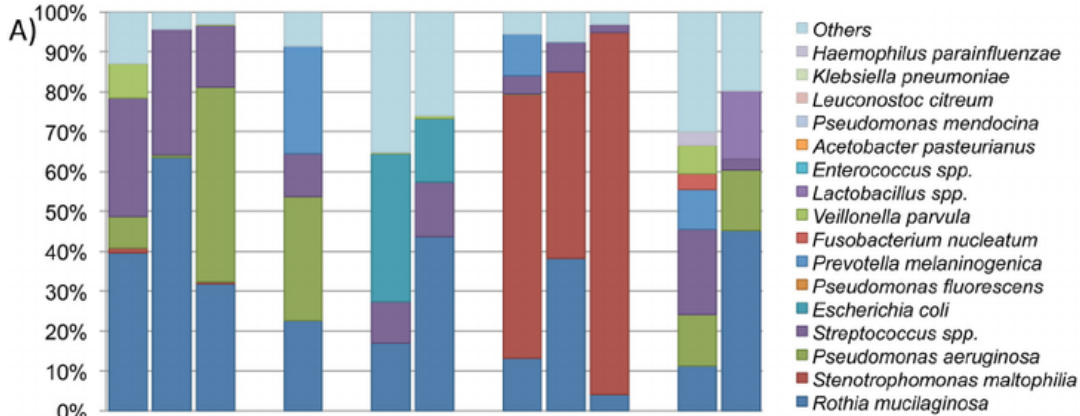


| Molecular mechanism of daidzein–equol conversion in *Slackia* sp. strain NATTS. This strain has a unique enzyme system composed of three proteins that convert daidzein to equol through the intermediate products DHD and THD. BC, breast cancer; PC, prostate cancer.

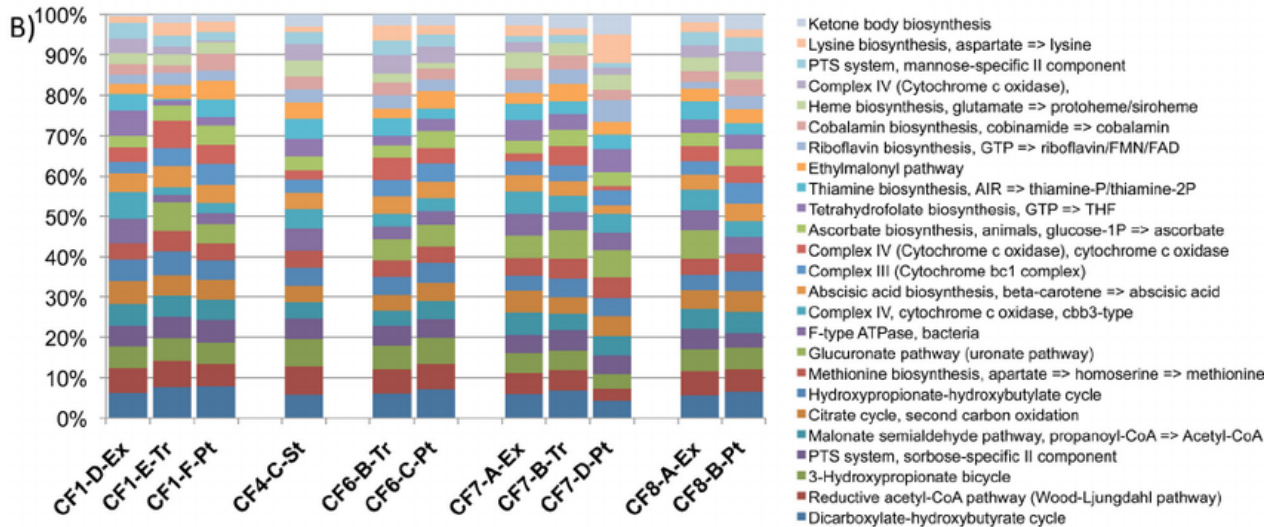
TAKAHIRO MATSUKI ET AL.,  
NATURE, VOL. 489, № 7415, 13 SEPT. 2012

Для выживания сообщества важны не виды, а гены, которыми располагают его члены

Виды  
бактерий

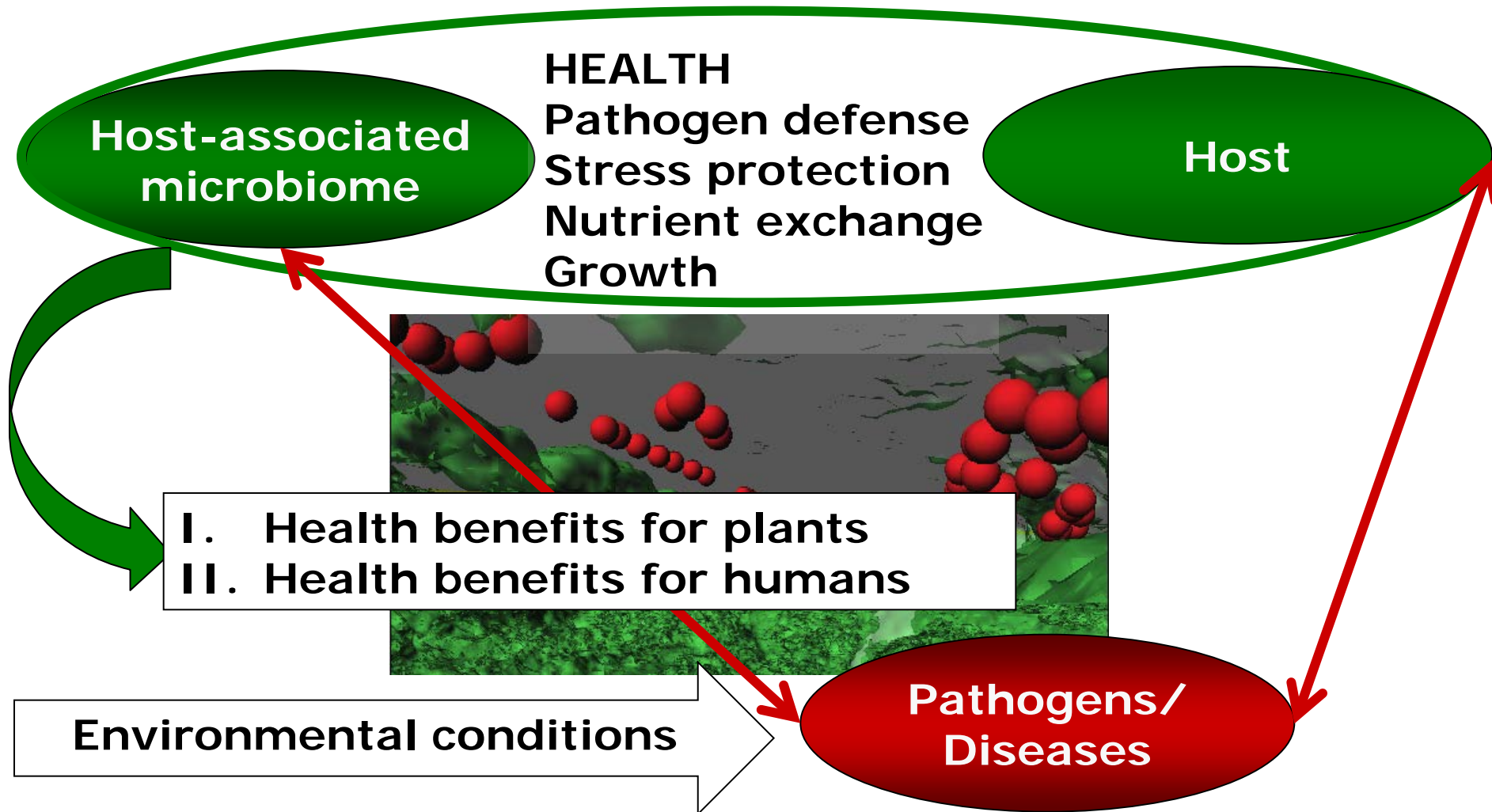


Функции



Таксономическая и функциональная структура микробиома слюны человека. Quinn et al., 2014

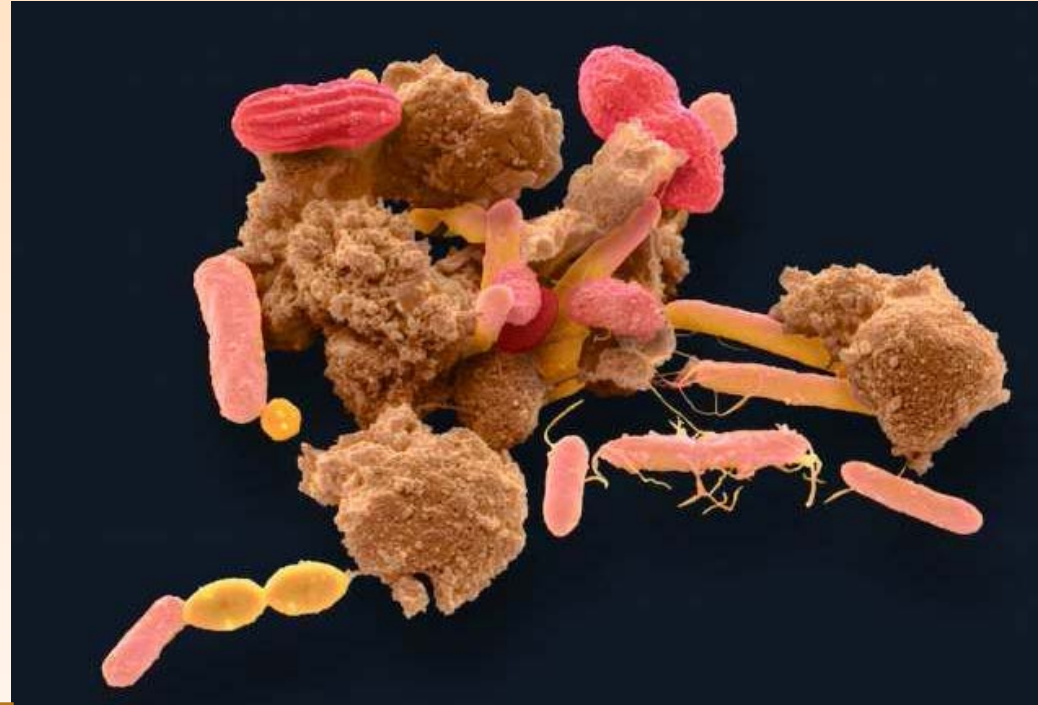
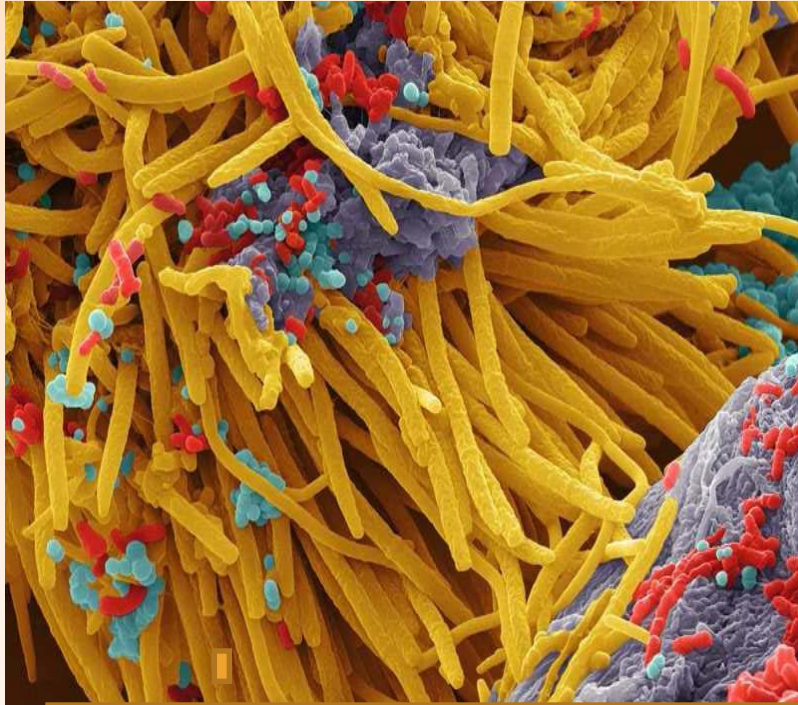
# Holobionts and hologenomes are biological units





## Nature/News

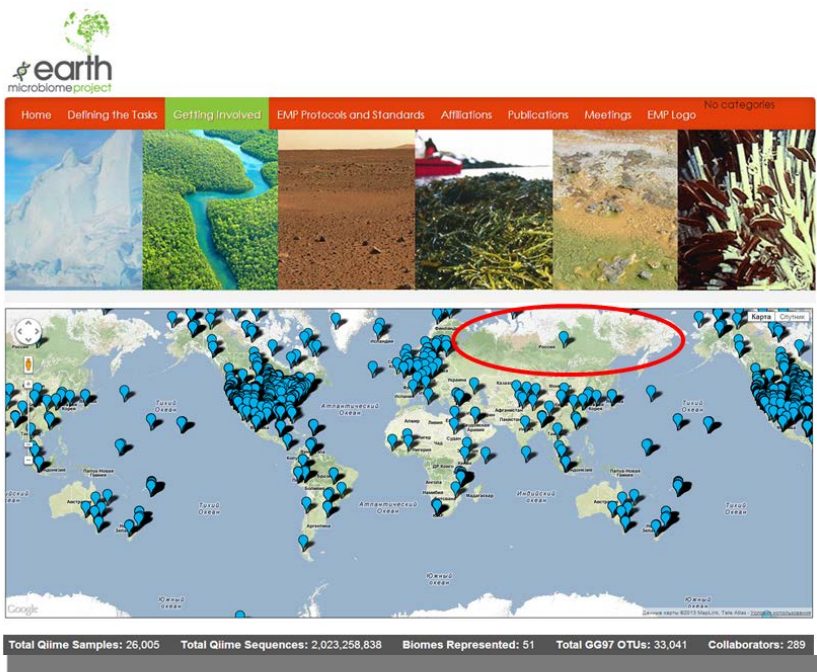
**White House goes big on microbiom research.  
US government and private team up for proposed effort to study  
Earth's microbes (Sara Reardon, 13/05/2016)**



Steve Gscmeissner  
/ Science Photo Library

Department of Energy  
National Aeronautics and Space Administration (NASA)  
National Institutes of Health  
National Science Foundation 1 scales.  
U.S. Department of Agriculture nce.

Почвы России почти не представлены в известных метагеномных базах данных. При этом по почвенному разнообразию Россия является одним из крупнейших мировым депозитарием почвенного разнообразия.



Earth Microbiome Project

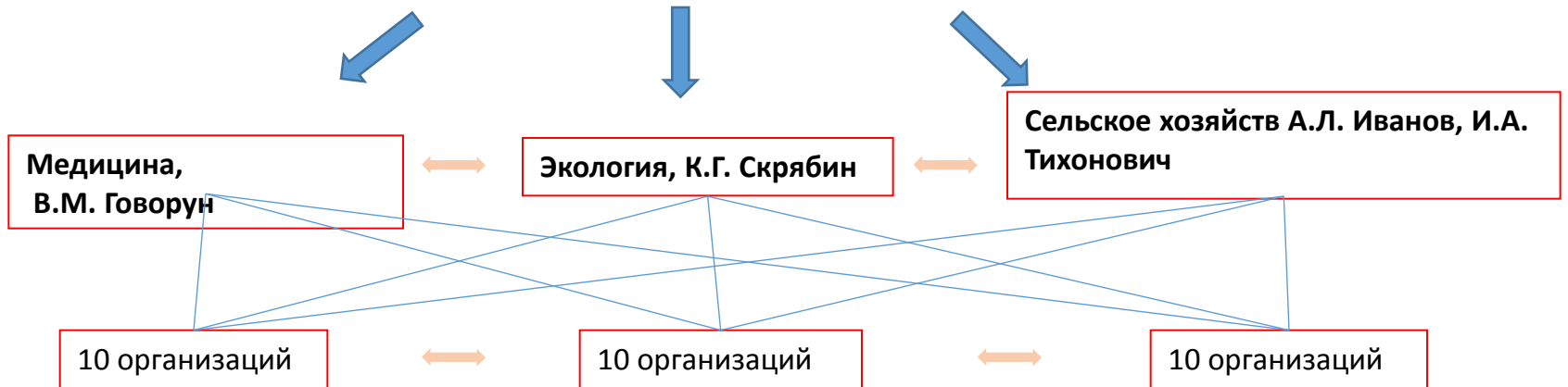


Почвенная карта России

Очевидно, что задача по формированию большого отечественного проекта, направленного на создание метагеномного центра для хранения и анализа метагеномных данных как в интересах фундаментальной науки, так и в интересах народного хозяйства является весьма актуальной.

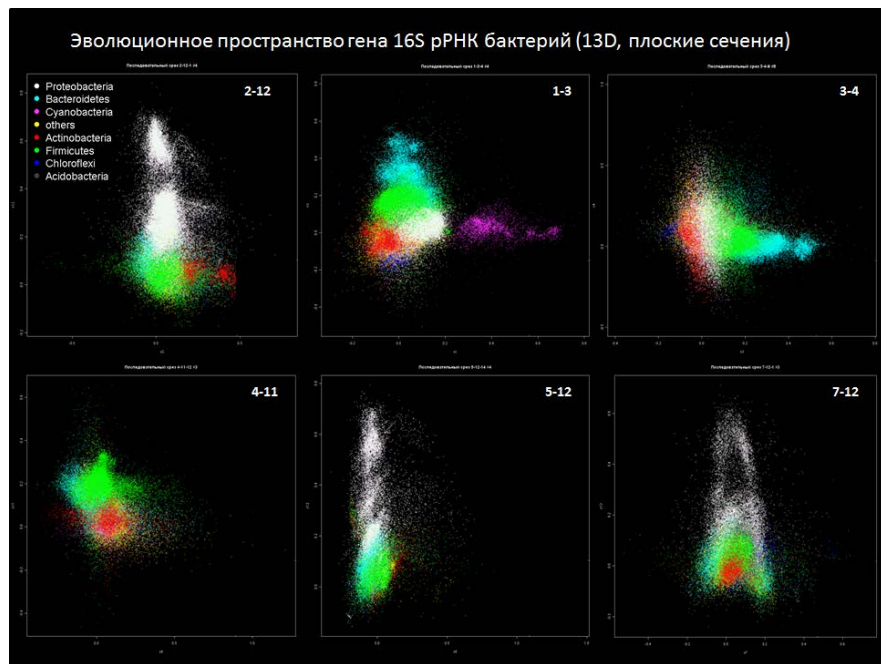


МИКРОБИОМ РОССИИ





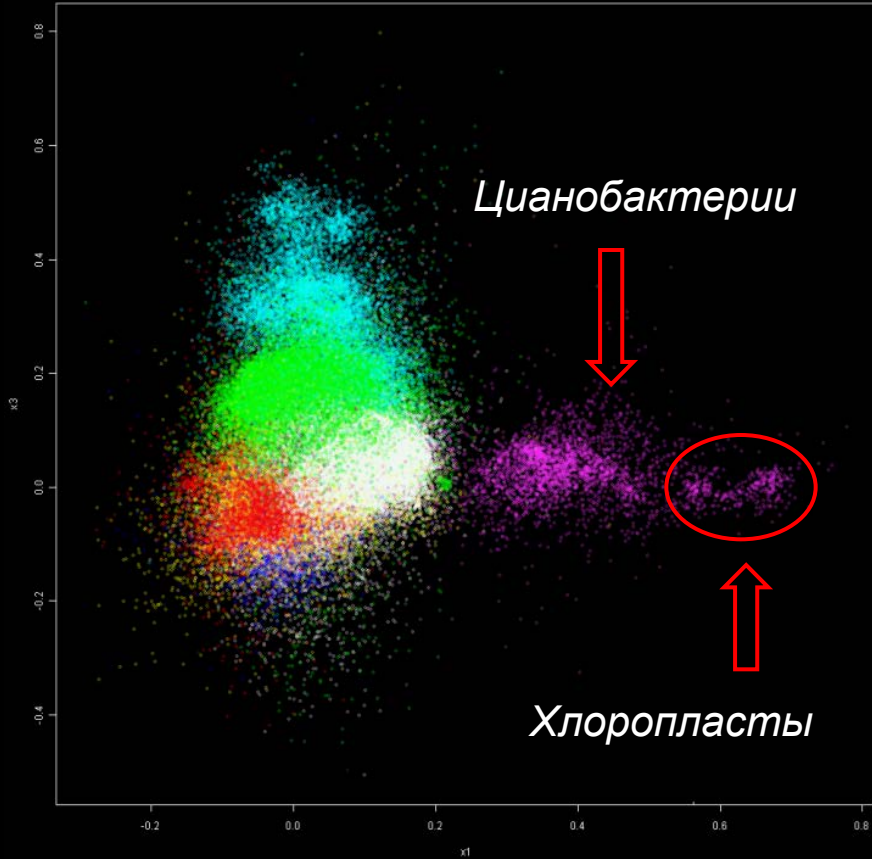
## Новое операционное поле для метагеномики почвы: эволюционное пространство



В рамках текущей гипотезы, глобальное разнообразие микробиоты (16S рРНК) может быть представлено в многомерном эволюционном пространстве в виде структуры, обладающей некоторыми свойствами неупорядоченного фрактала, отражающем эволюционные паттерны в таксонах различного ранга. Практические исследования осложняются большой размерностью целевого пространства и тем, что в строгом смысле оно может быть не метрическим.

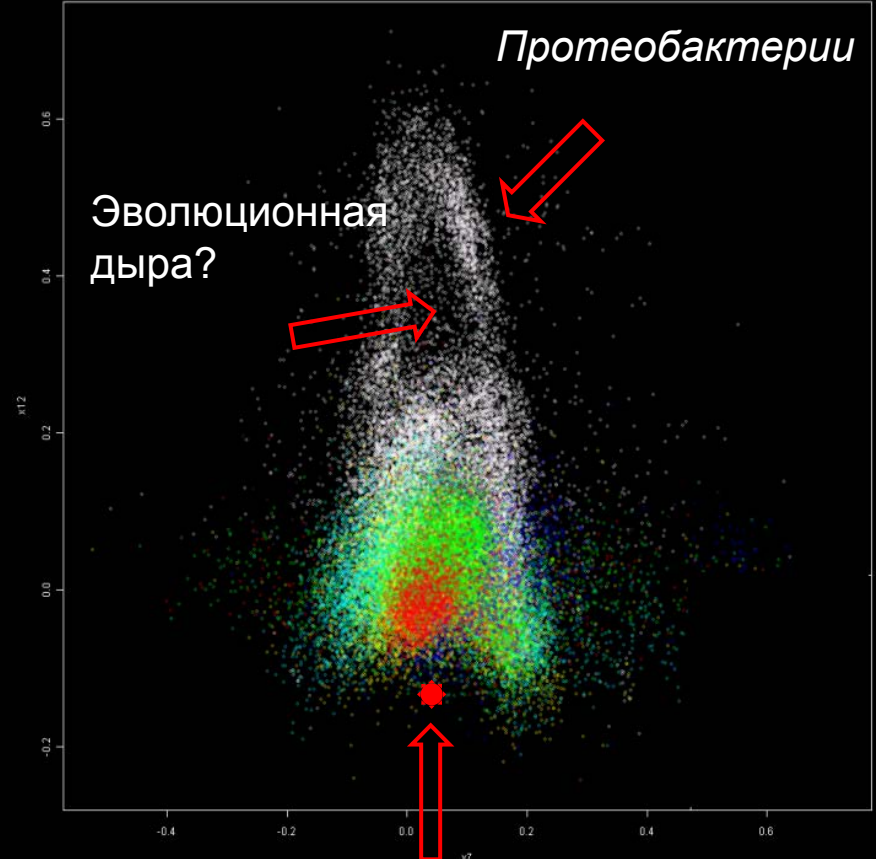
## «Эволюционная пушка»

Последовательный срез 1-3-4 #4



## «Эволюционная свечка»

Последовательный срез 7-12-1 #3



Последний общий предок бактерий?

# Scientific (biological) approaches for improvement of agriculture

- ▣ Efficient adaptation will require access (both physical and legal through appropriate intellectual property rules) to **genetic resources, both of existing crops, livestock and their wild relatives**, as well as varieties that may be used in the future. **Crop genes for drought and flood tolerance should be identified and shared. Yield stability traits of species under variable conditions are particularly important areas where more understanding and research is needed.**
- ▣ What kind of genetic information may be used to obtain sustainability?

**Source: FAO Report “Climate change, water and food security”, 2011**

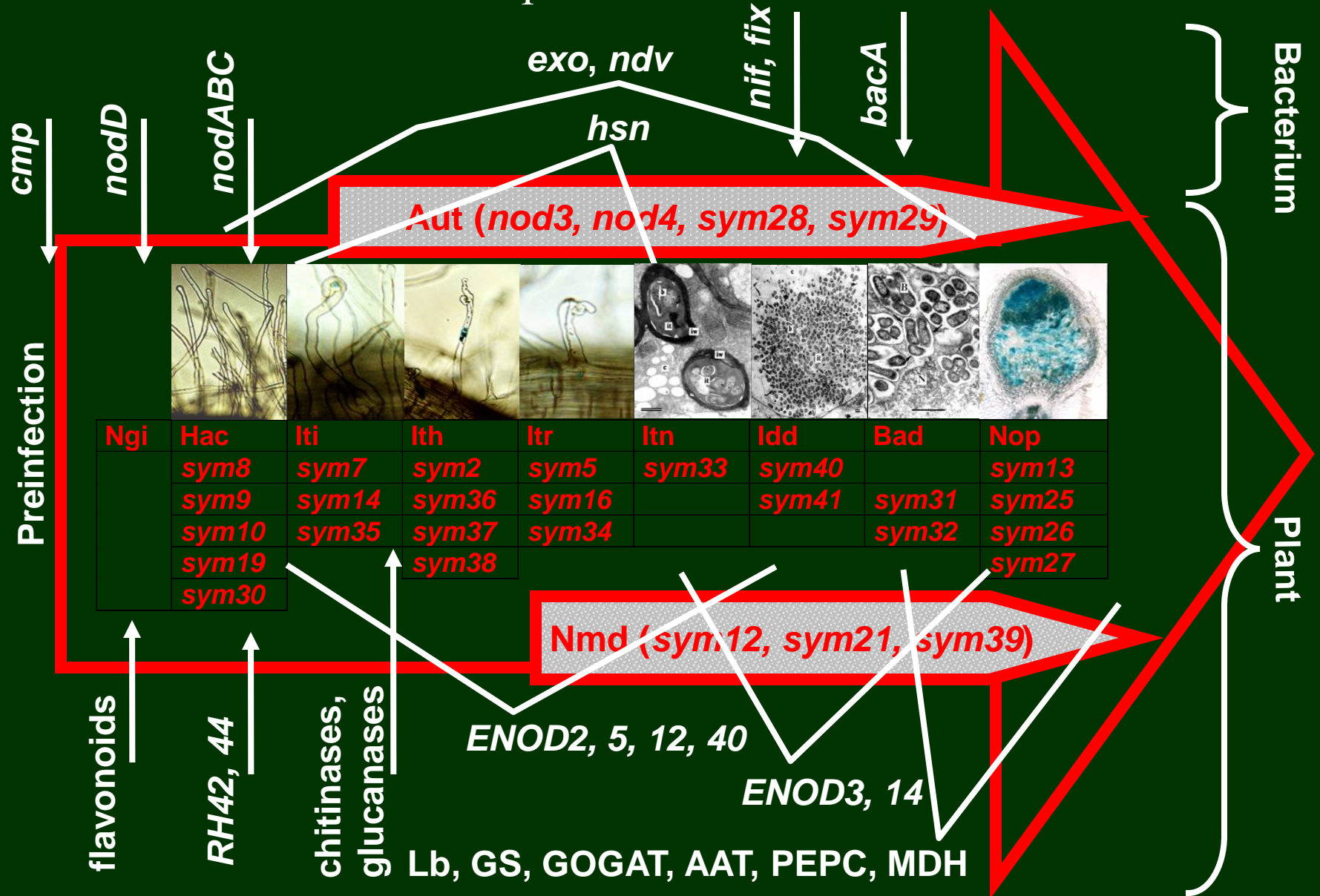
# Николай Владимирович Тимофеев-Ресовский

## Гены и адаптация

«... Количество генов не может быть равным сотням тысяч или миллионам, десятки тысяч – это то, что нам нужно. Кажется, что ...эволюционный прогресс связан не со специализацией и специализированными адаптациями к специфическим условиям, как кажется многим ботаникам и зоологам, но наоборот, морфофизиологическая дифференцировка связана с максимумом omnipotentности т.е. в определенной степени с отсутствием специальных приспособлений...»



# Разграничение симбиогенеза на стадии в соответствии с их генетическим контролем – всего 50 генов



## Количество генов в геномах культурных растений по данным полногеномного секвенирования

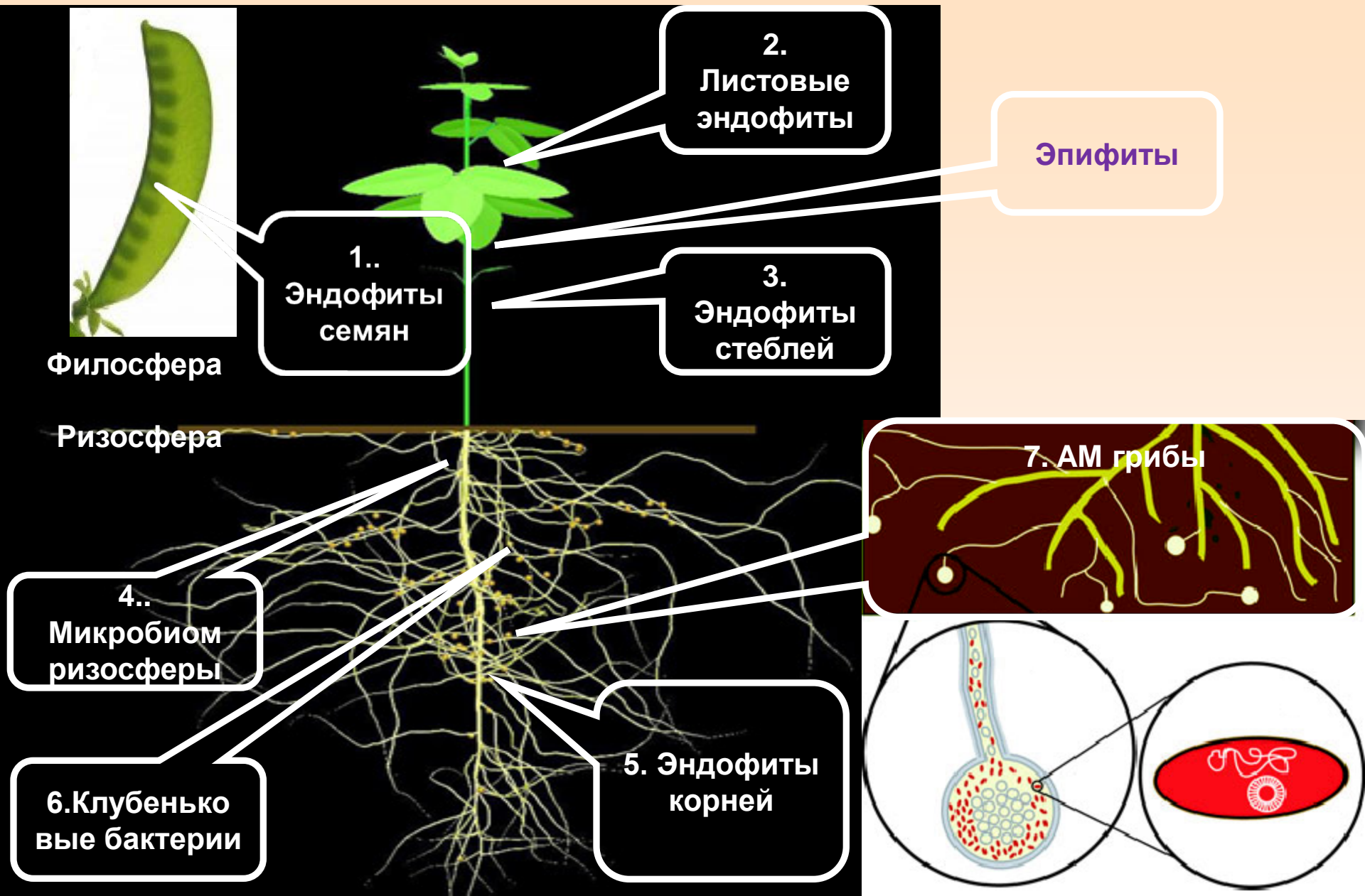
	растение		генов
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	арабидопсис	26990
	<i>Carica papaya</i>	папайя	25536
	<i>Prunus persica</i>	персик	28689
	<i>Populus trichocarpa</i>	тополь	45778
	<i>Medicago trunculata</i>	люцерна	38834
	<i>Glycine max</i>	соя	75778
	<i>Vitis vinifera</i>	виноград	30434
	<i>Oryza sativa</i>	рис	30192
	<i>Sorghum bicolor</i>	сорго	34496
	<i>Zea mays</i>	кукуруза	32540

Количество генов в геномах почвенных бактерий варьирует в пределах от **3** до **10** тыс.

В отличие от растений у бактерий к неизменной части генома относится лишь часть генома (**40%** у некоторых бактерий), остальная часть генома является «дополнительной» и содержит гены, ответственные за широкий круг адаптаций

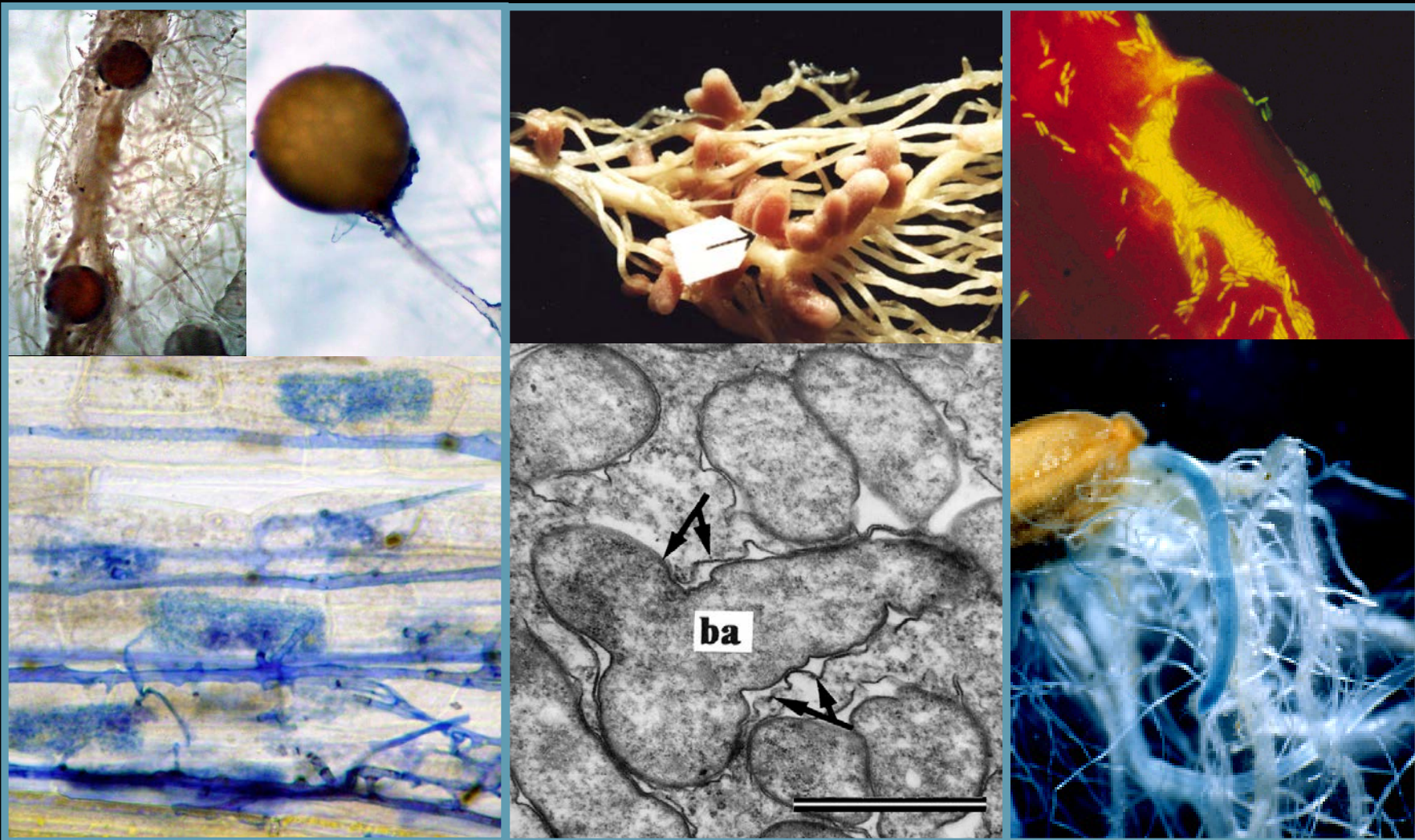
Генетическое и функциональное разнообразие почвенного микробиома – огромно. В 1 г почвы находится несколько млрд. живых микроорганизмов, относящихся многим тысячам видов. Совокупный генетический материал 1 г почвы превышает миллион человеческих геномов

# Наземные растения, как растительно-микробная система (компиляция рисунков, взятых из Интернета)





# Примеры основных мутуалистических растительно-микробных систем



Арбускулярная микориза, симбиоз питания, P и др.

Симбиотическая азотфиксация, симбиоз питания, N.

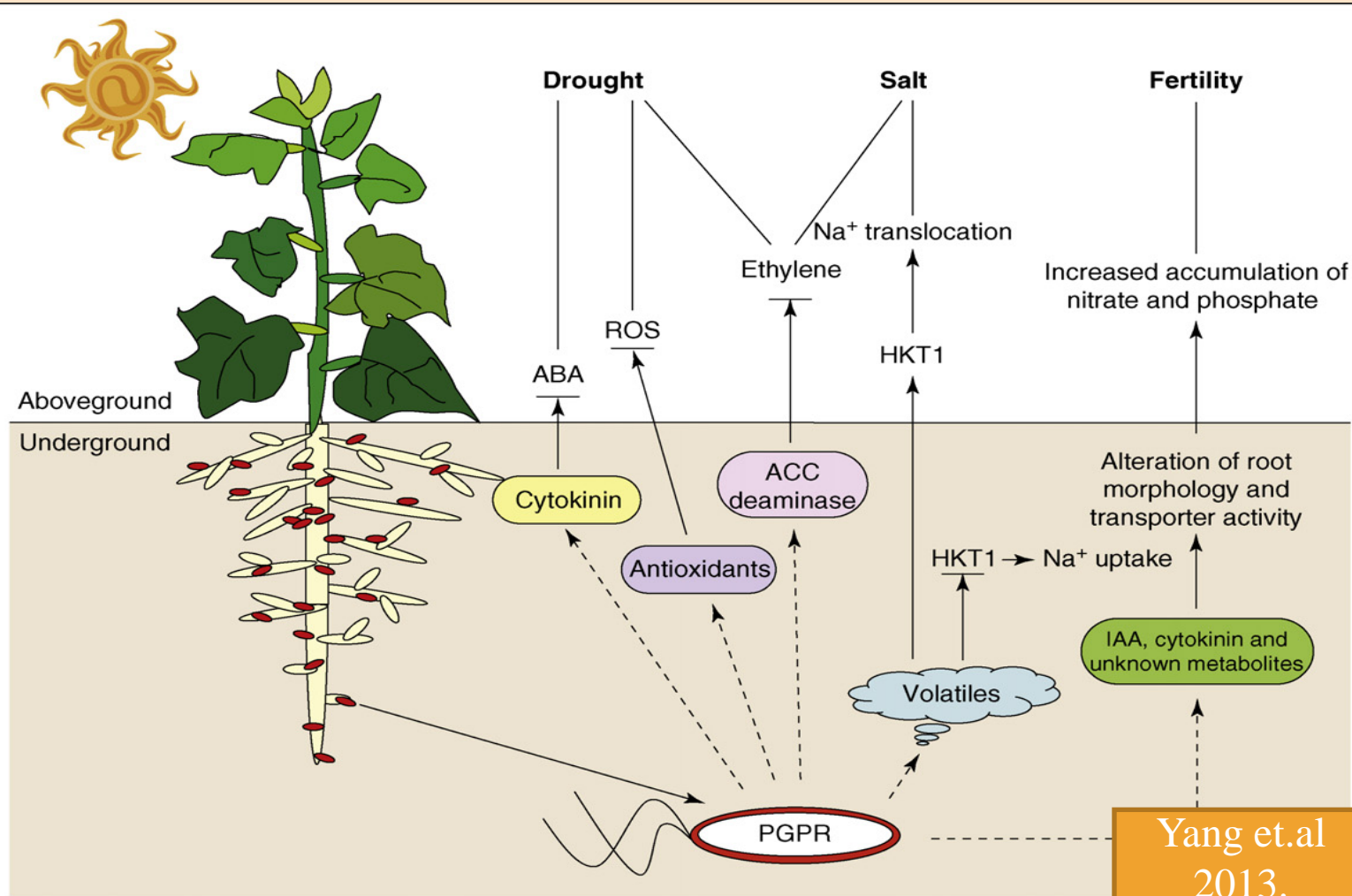
Ассоциации с ризосферными бактериями, защитный симбиоз.

# Soil science comes to life

- ★ R. Rodrigues «The capacity to withstand heat stress was not a genetic adaptation of the plant itself, but rather a characteristic that was expressed only in partnership with the fungus»”
- ★ D. Daffonchio « These PGPBs in turn mediate their host’s response to drought helping to reduce water consumption while increasing metabolic functions. As a result, the plants have to 40% more biomass and perform more efficient photosynthesis»



# Различные механизмы защиты растений PGPR от абиотических факторов



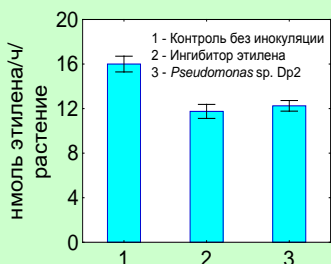
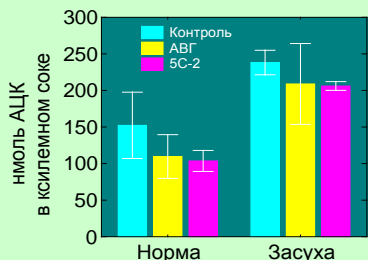
# Микробиологический способ повышения адаптации растений к засухе на основе симбиотических АЦК-утилизирующих бактерий

**ЗАСУХА**

Повышение биосинтеза 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) в растениях

Синтез стрессового этилена и ингибирование роста растений

Бактерии содержат фермент АЦК дезаминазу и устраняют негативное действие этилена



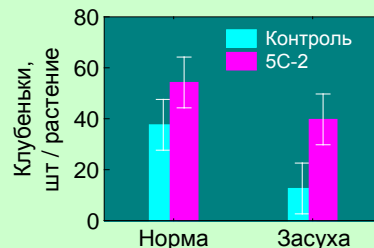
## Горох

Стимуляция роста корней и корневых волосков



## Активизация азотфиксирующего симбиоза

Активизация азотфиксирующего симбиоза

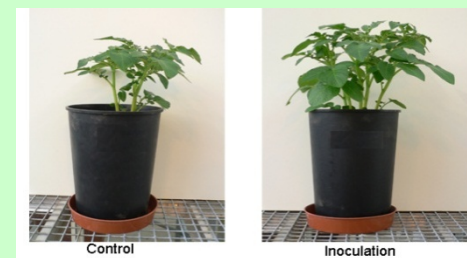


## Повышение урожая



## Томаты

Стимуляция роста побегов

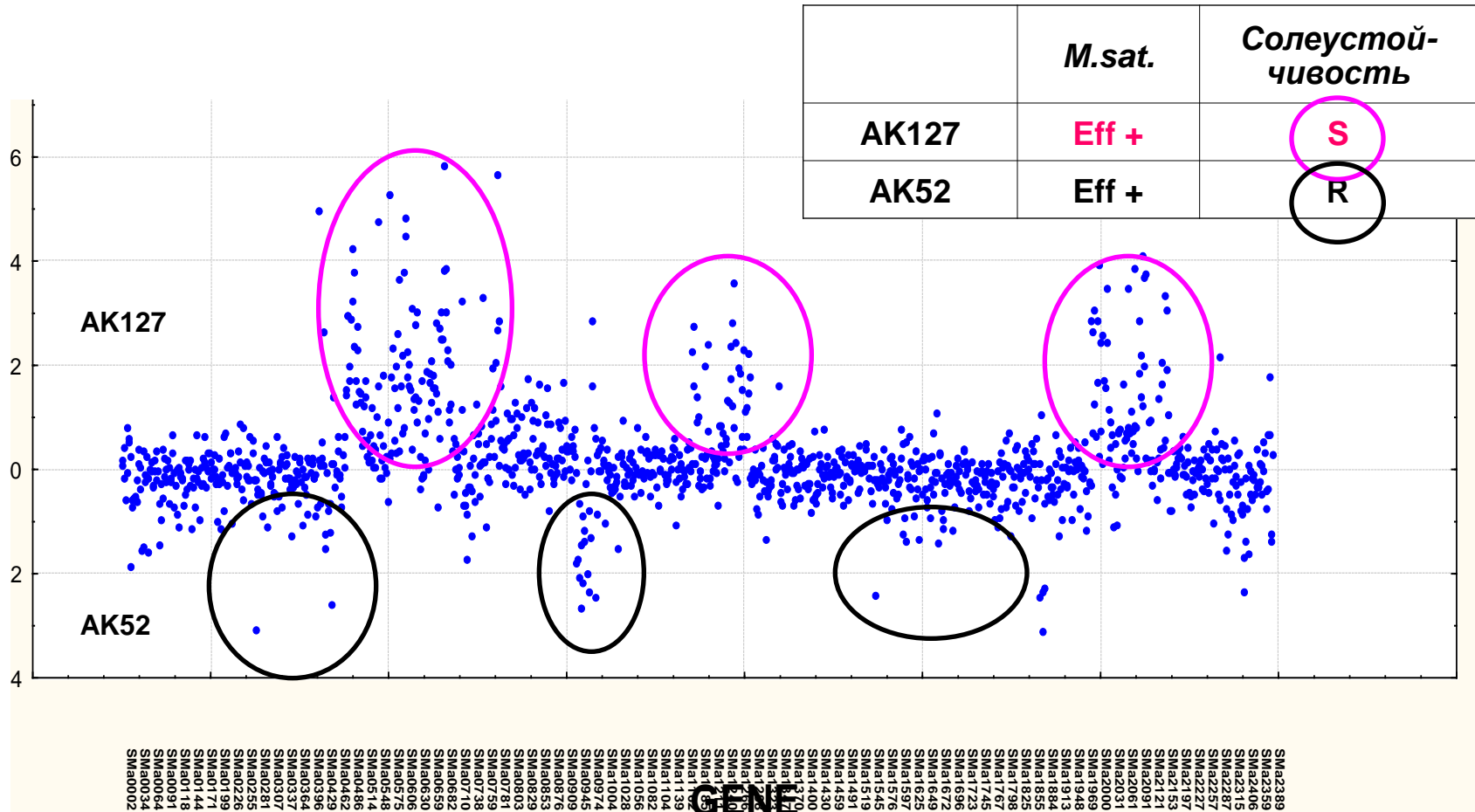


## Повышение урожая



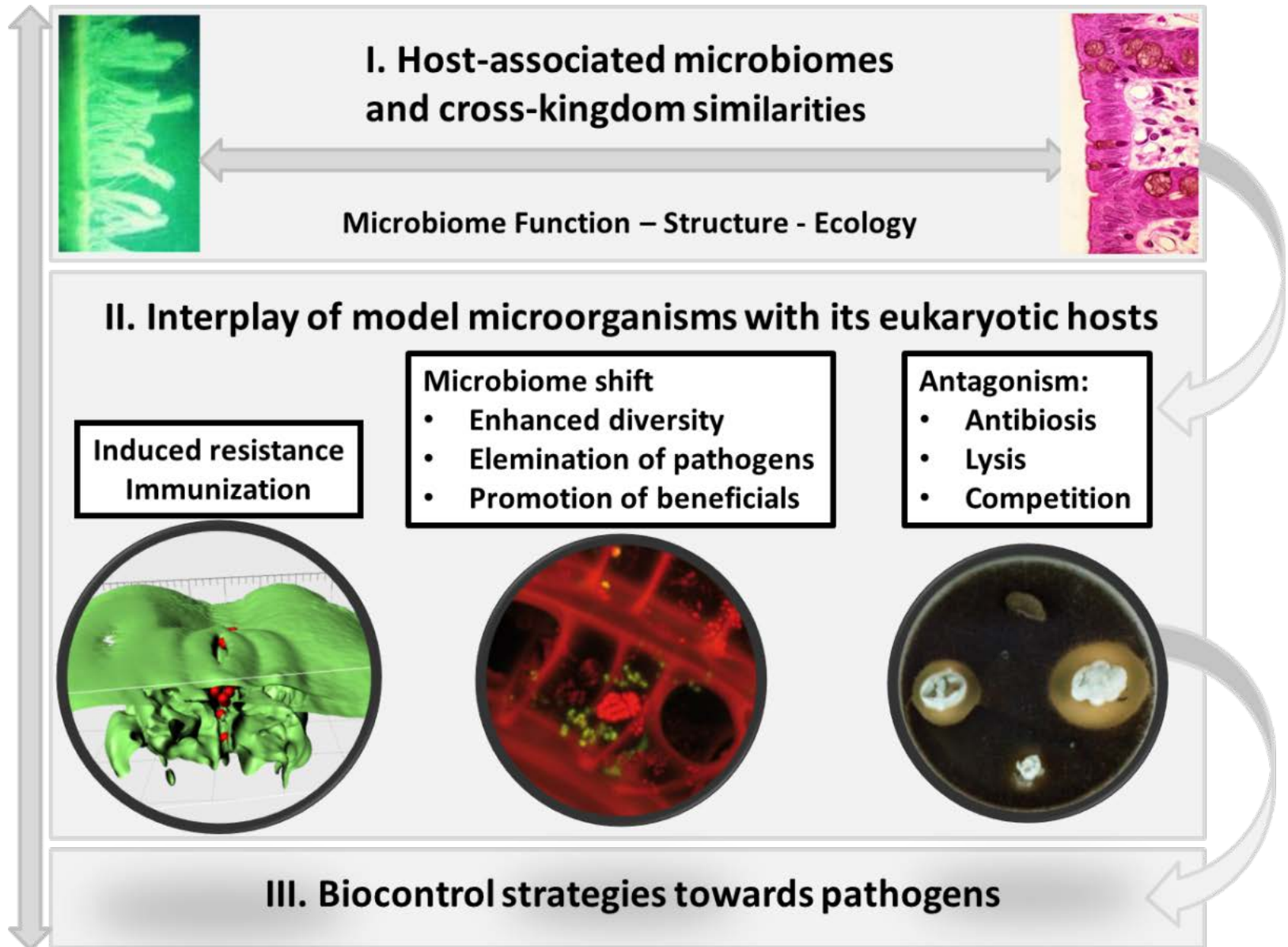


# Графическое изображение ДНК-гибризационного анализа штаммов *S.meliloti* с использованием биочипов



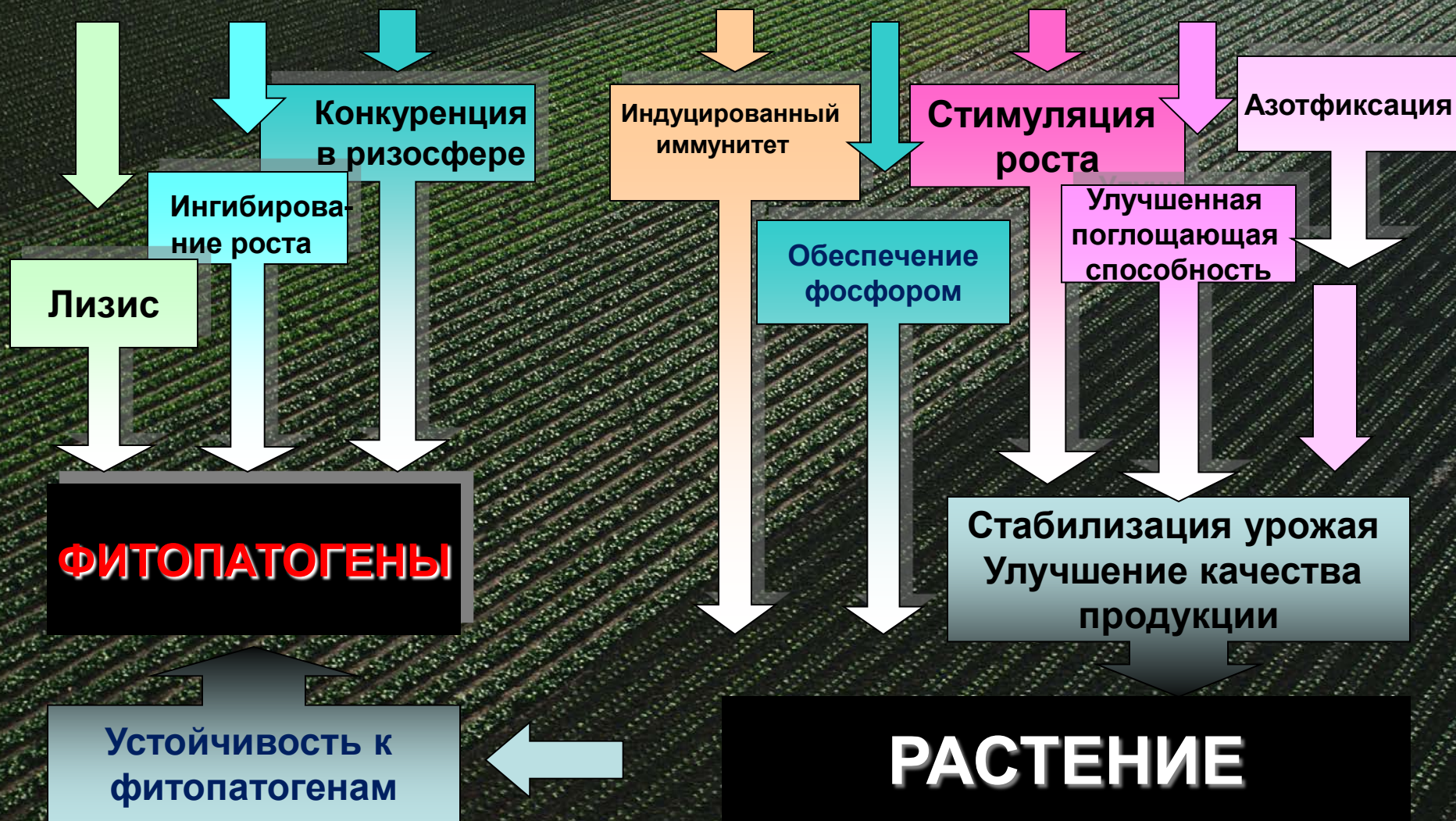
Использование компьютерной модели анализа гибридизаций ДНК-биочипов симбиотических плазмид (*pSymA*) природных штаммов *S. meliloti* выявило специфические области дивергентных генов для изученных штаммов.

# CONCLUSION: Cross-kingdom similarities





# Микробиом растений

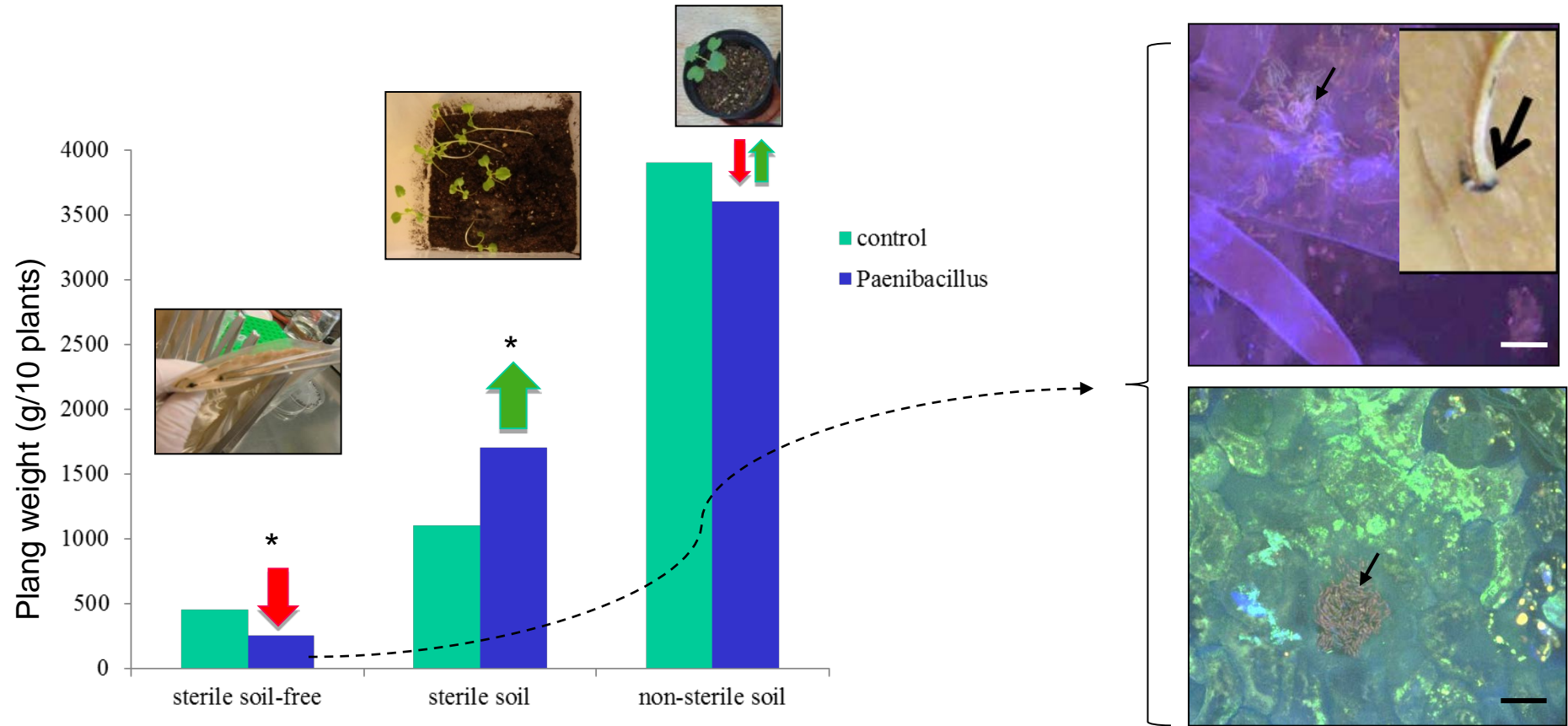




BIOCOMES

New biological control products  
for sustainable farming and forestry

# Plant-microbe interaction is shaped by environment



*Paenibacillus polymyxa* vs. oilseed rape:

➤ Root damage in the soil-free sterile conditions; plant growth promotion in the sterile soil

# Принцип дополнительности в микробно-растительных системах

Стабильный и ограниченный по объему информации эукариотический геном дополняется изменчивым метагеномом, обладатели которого расширяют адаптацию к конкретным условиям среды для всей надвидовой системы в целом (симбиогеном).

Реализация этого принципа на практике зависит от наличия промышленных технологий производства и применения микробиологических препаратов



# ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ микробных препаратов по данным многолетних испытаний ВНИИСХМ



+18..34%



+15..25%



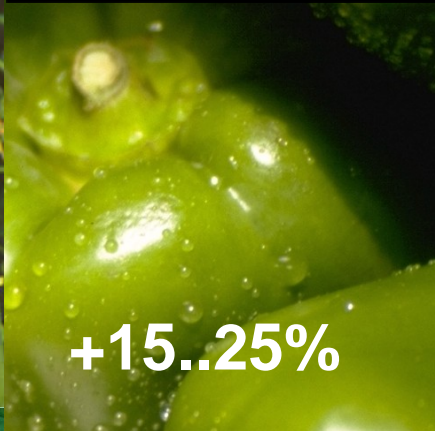
+15..32%



+12..20%



+25...70%



+15..25%



+15..25%



22.AUG.2003



+14..25 ц/га



+18..40%



+20..45%



+12..20%



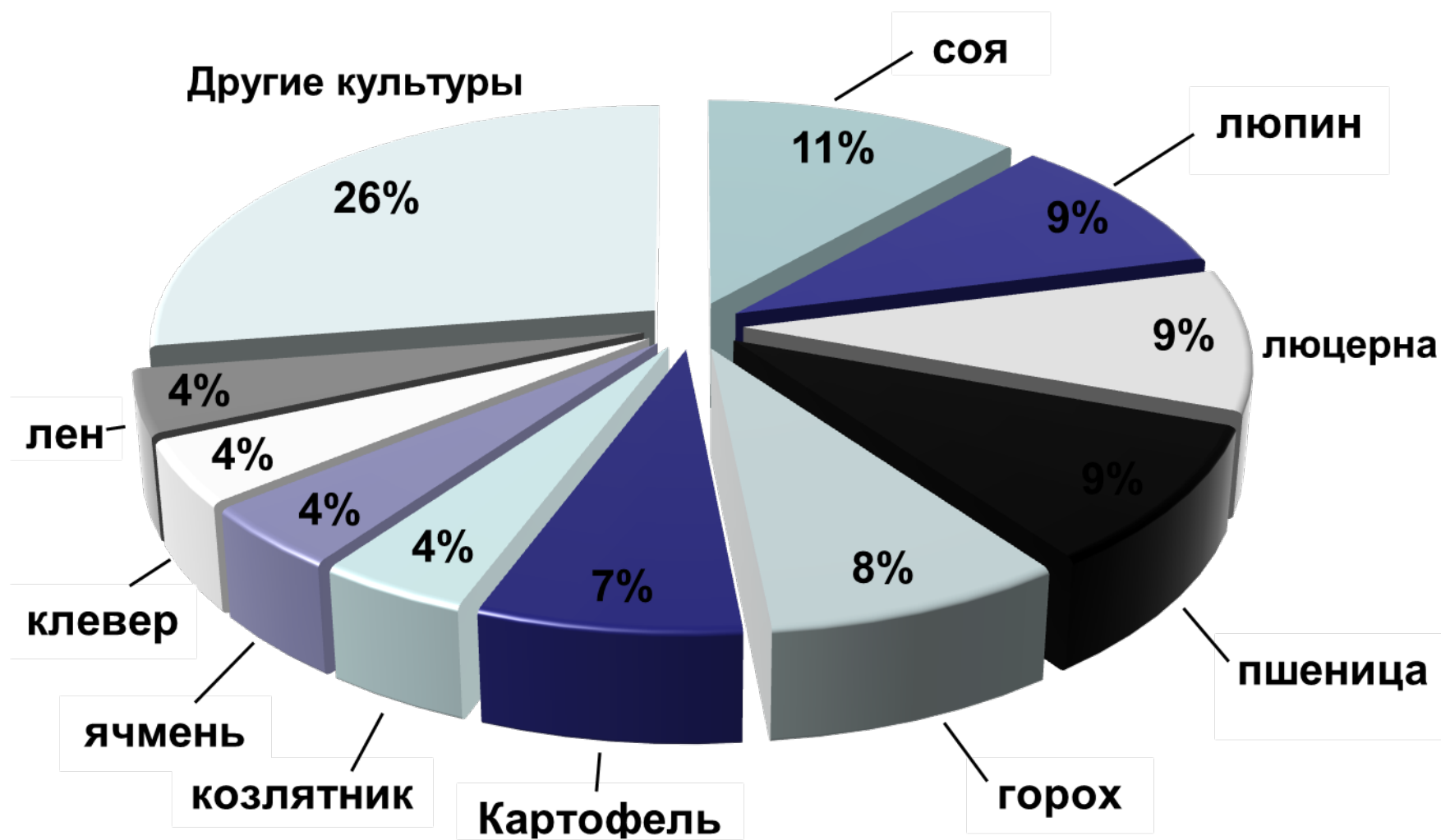
# Эффект от инокуляции сои в условиях отсутствия в почве специфических штаммов клубеньковых бактерий



Презентация Microsoft PowerPoint.pptx



**Основные виды сельскохозяйственных культур, на которых были проведены испытания биопрепаратов в ГСО за период 2008 – 2012 гг.**  
(в ГСО было проведено 273 опыта на более 30 с/х культур)



***Роботизированная система хранения -  
принципиально новый подход к проблеме надежного  
поддержания генетических ресурсов микроорганизмов***

**Вместимость в 200 000 образцов позволит  
разместить Национальные ресурсы  
полезных микроорганизмов  
сельскохозяйственного назначения в  
оптимальных условиях  
с сохранением всех полезных свойств;**

**Надежная бесперебойная работа  
хранилища благодаря двухступенчатой  
противоаварийной системе защиты;**

**Авторизованный доступ к депонированным  
штаммам, препятствующий их  
несанкционированному отбору.**



# Регионы применения инокулянтов и биопрепаратов группы Фармат в 2013-2014гг

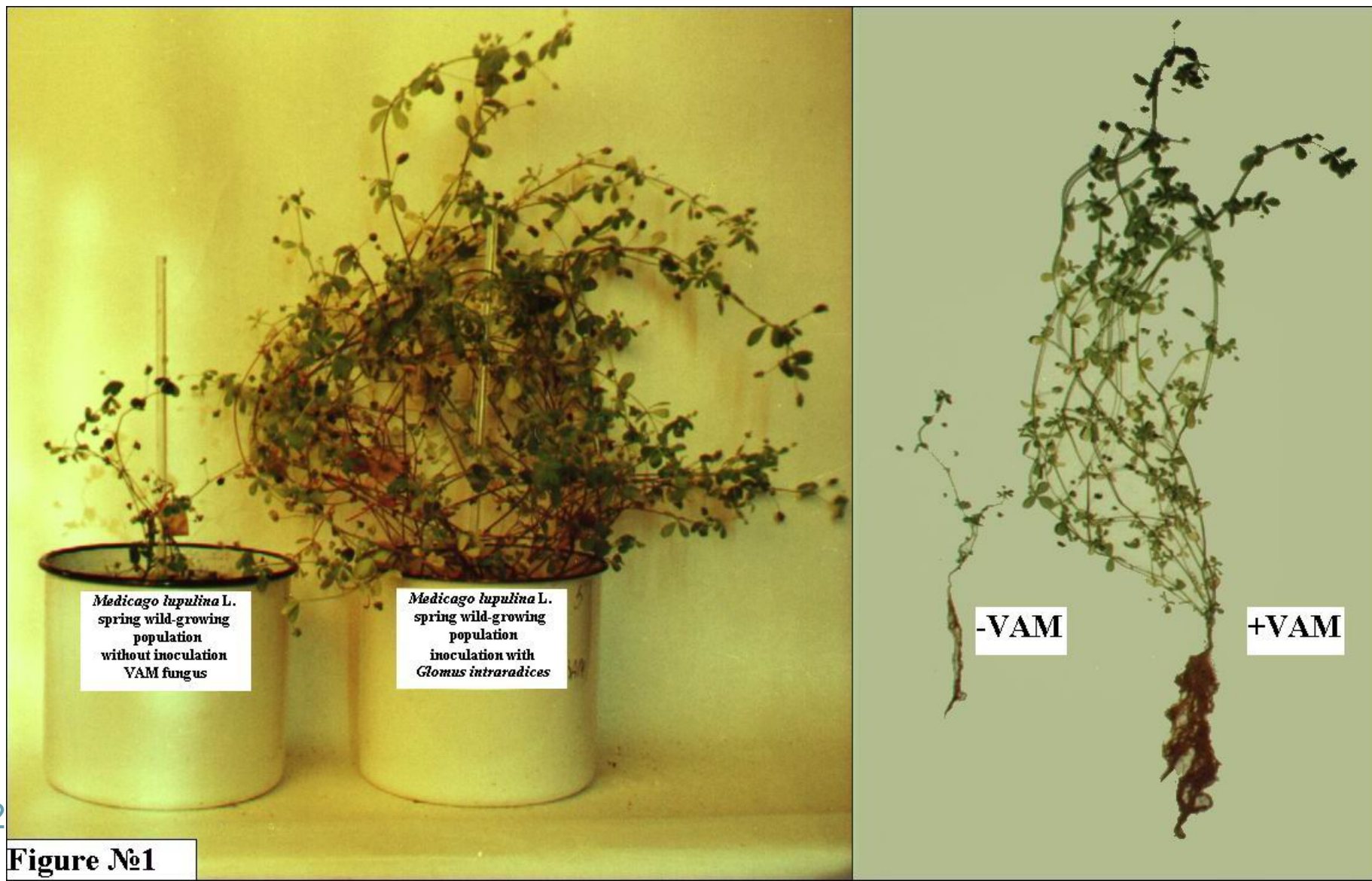


регионы поставки 2013года

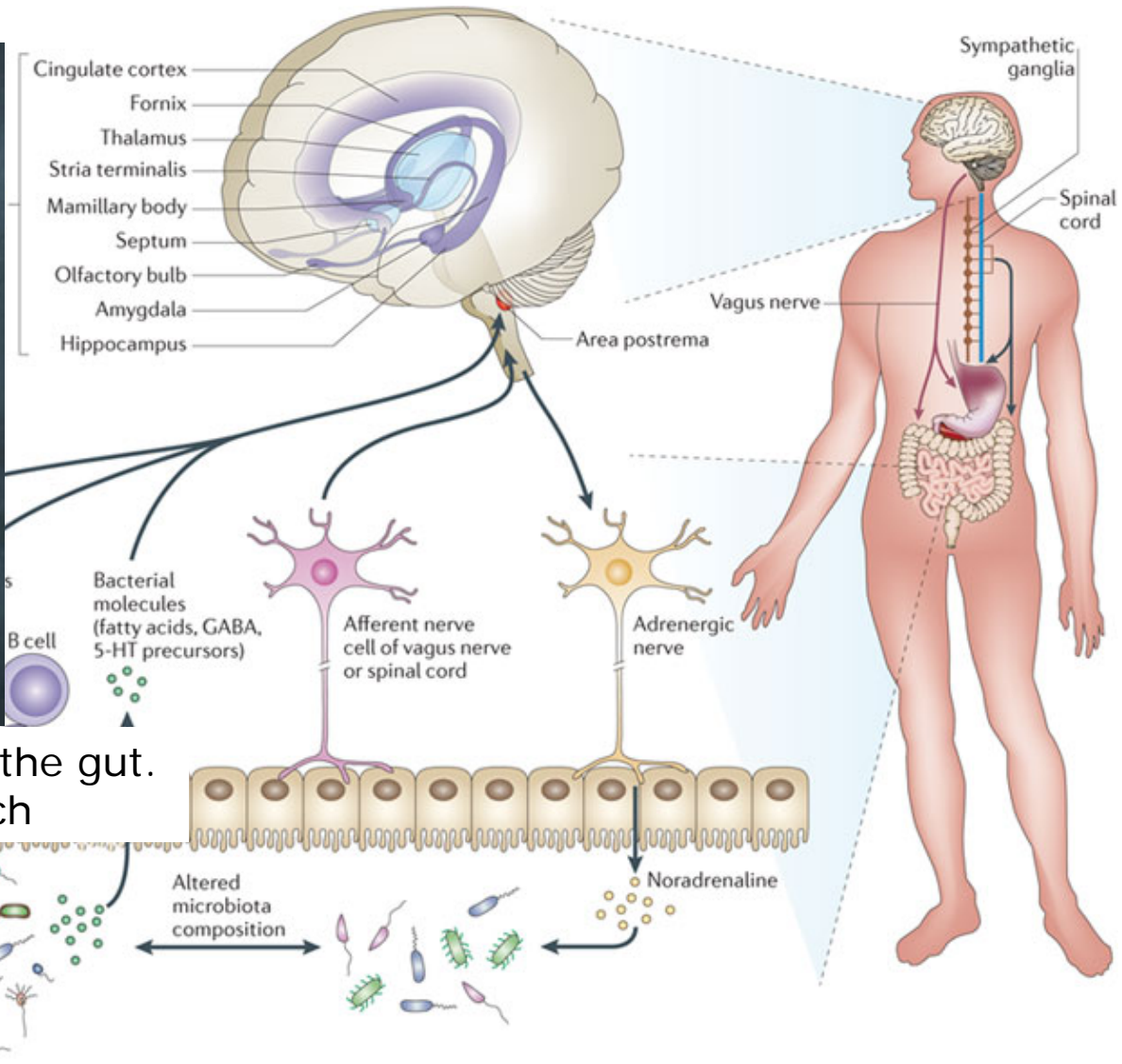
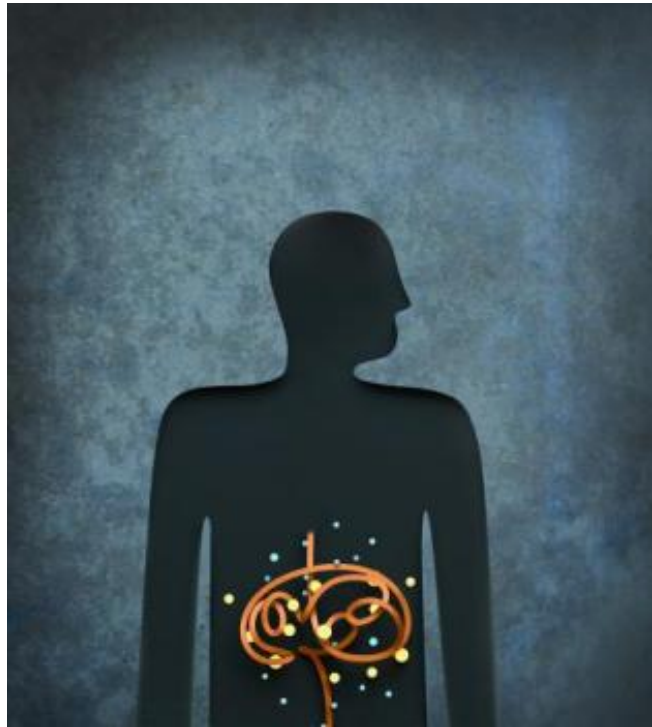
новые регионы поставки в 2014году



# Влияние микоризации на рост и развитие люцерны



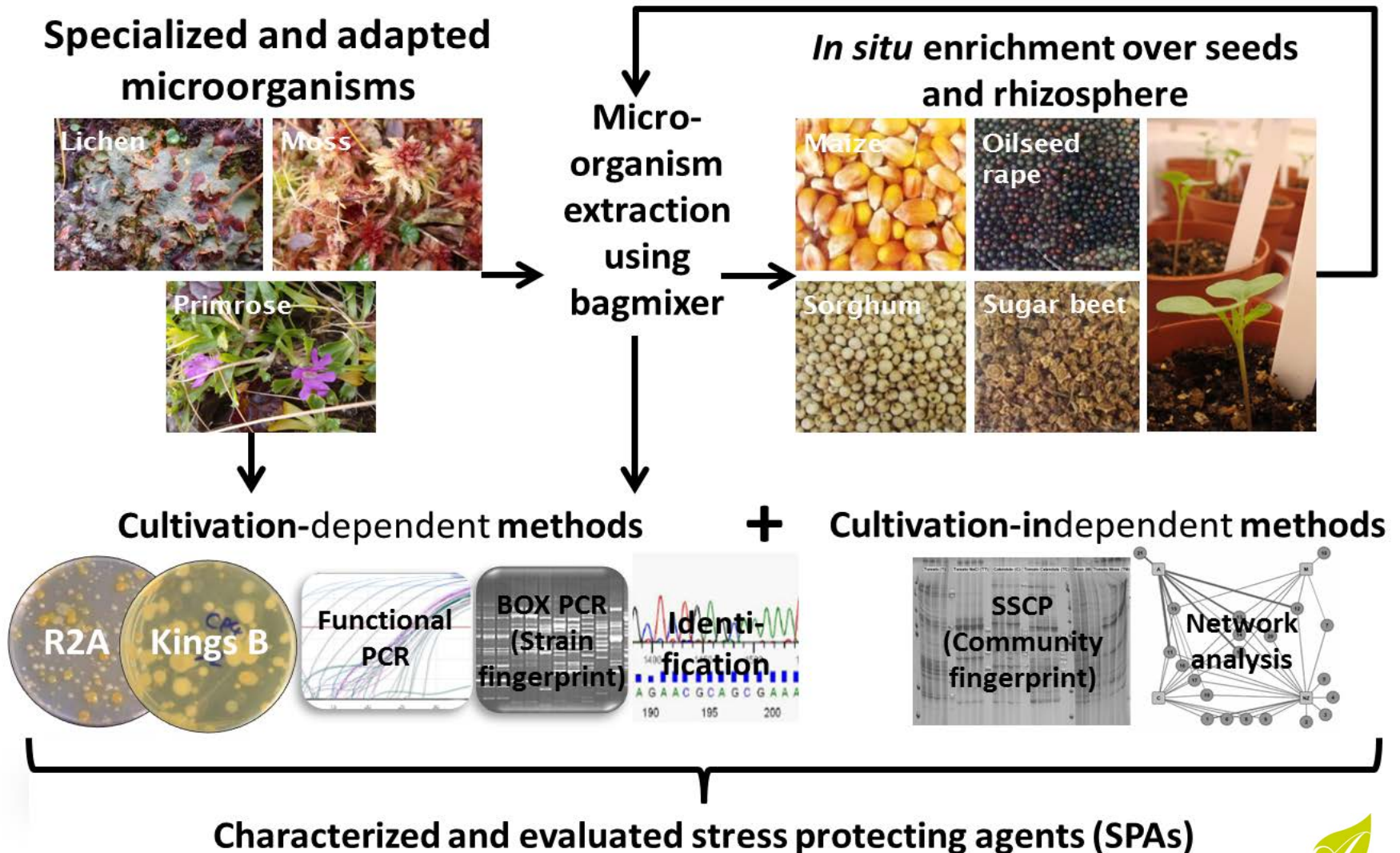
# Gut-brain axis and gut feeling



90% of serotonin is made in the gut.  
Image credit: E. Hsiao/Caltech



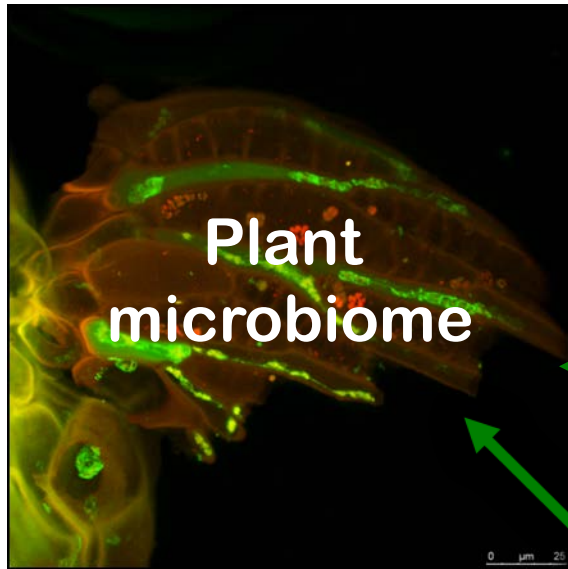
# Biosprospecting diversity



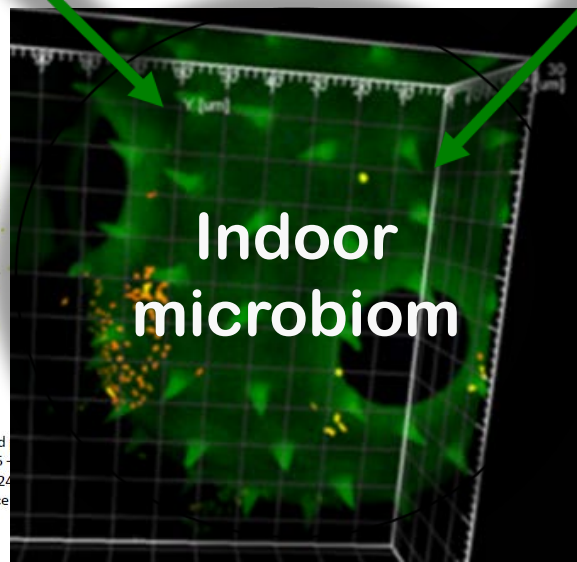
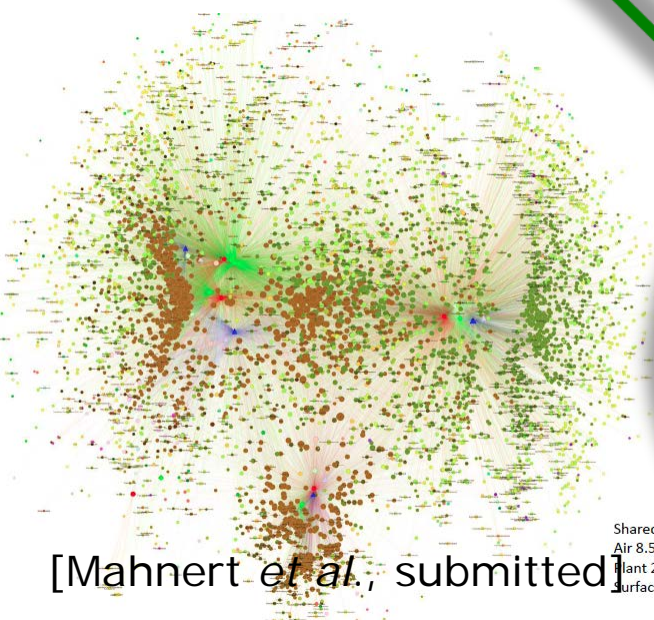
[Zachow *et al.* Agronomy 2013]



# Microbiome transfer

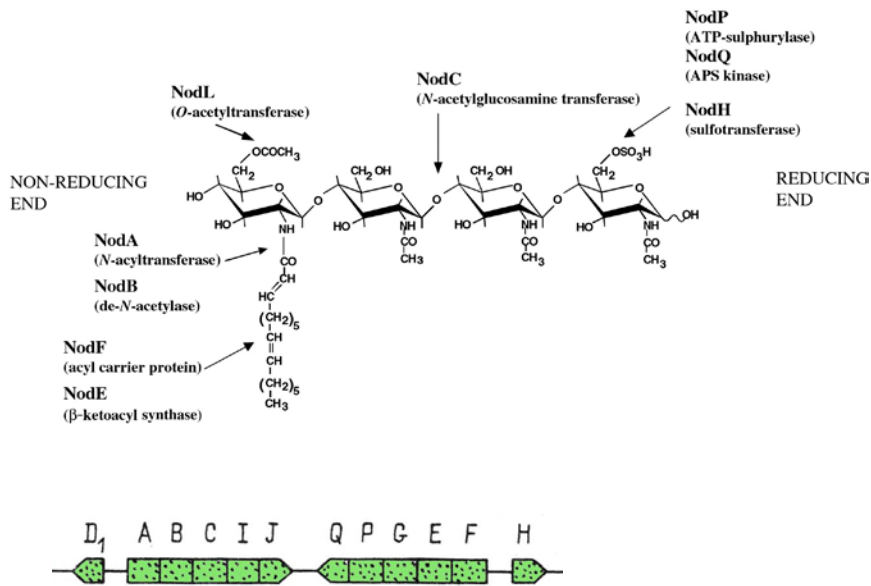


[Davis *et al.* Nature 2014]

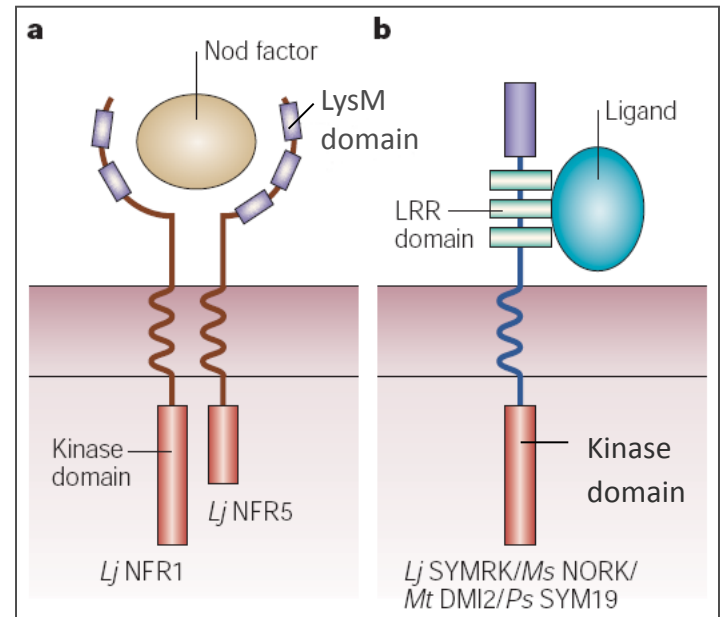


[Qian *et al.* Indoor Air 2012]

# Nod-фактор ризобий и его синтез

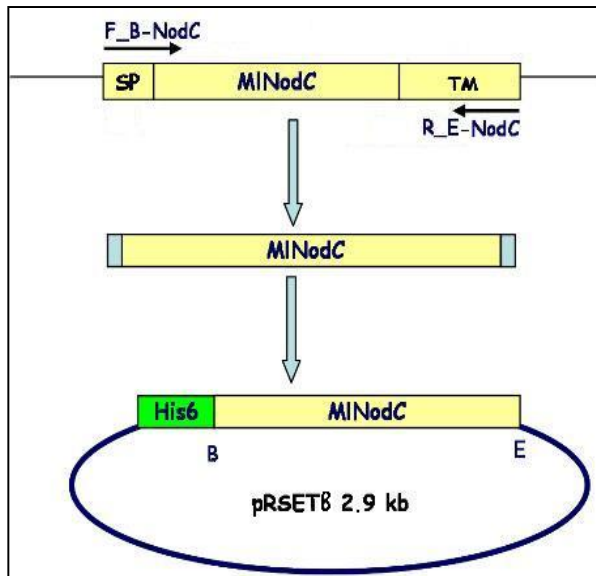


# Растительные рецепторы симбиотического сигнала

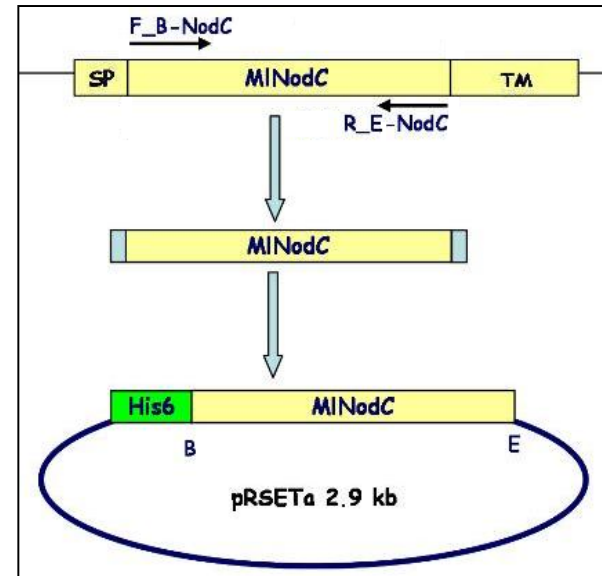


Oldroyd and Downie, 2004

# Генетические конструкции для гетерологической экспрессии (*NodC*) ацетилглюкозаминил трансферазы



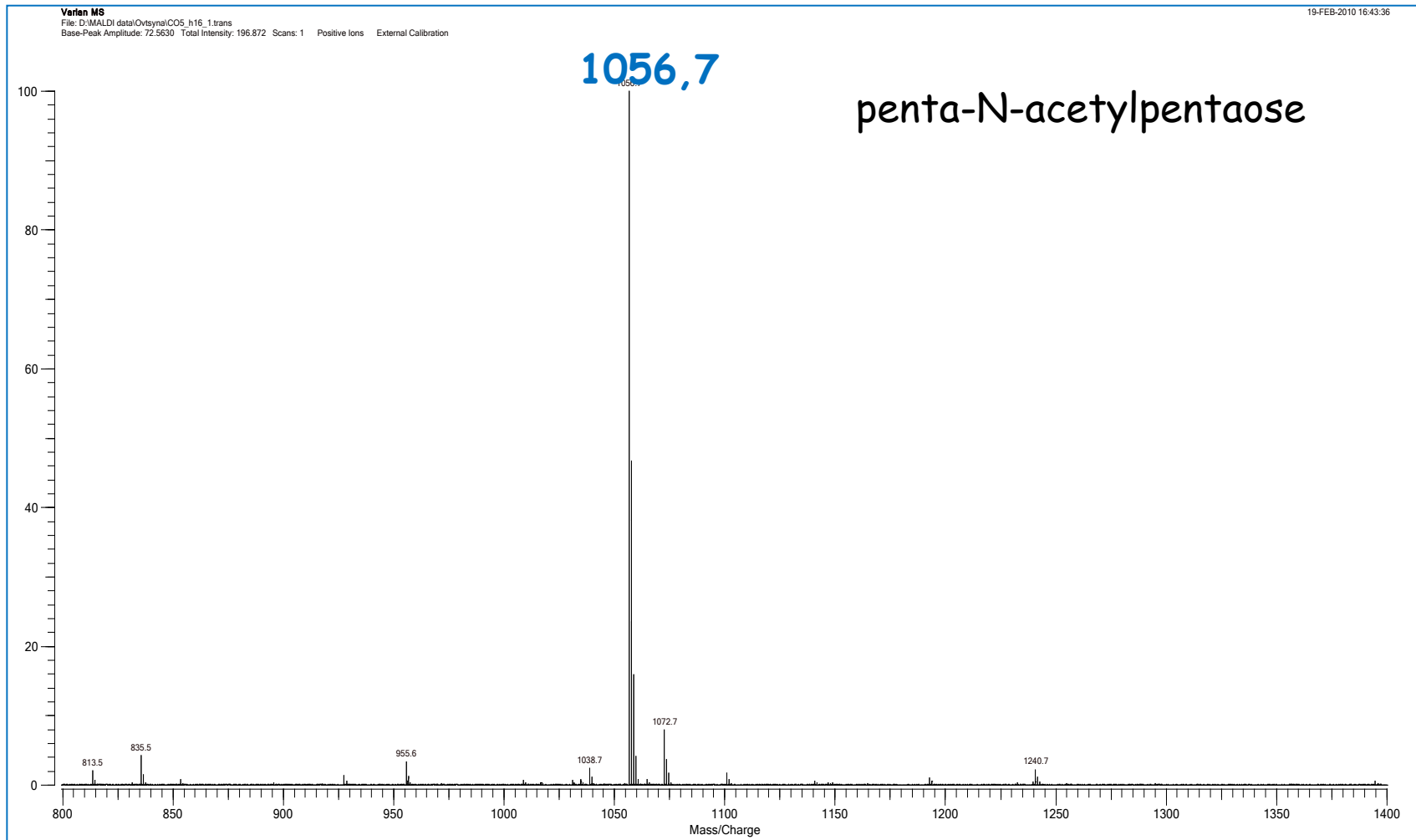
Cloning in pRSETA and pUC19 vectors of whole gene



Cloning in pRSETA vector gene fragment encoding catalytic domain of enzyme



# Масс-спектрометрия синтезированных соединений (MALDI-TOF)



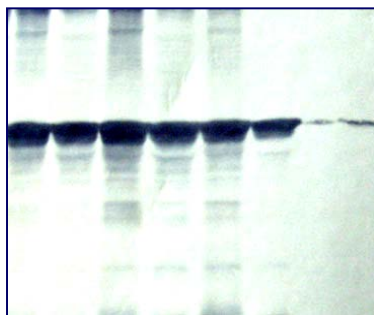
# Экспрессия белков-рецепторов SYM10 и SYM37 в бактериальных системах (*E. coli*)

Western blot with anti-His6  
(SYM10-ED)

A

④	③	②	①
+	-	+	-
+	-	+	-
+	-	+	-

SYM10-ED  
~ 45 kD



- (without IPTG)  
+ (with IPTG)

Western blot with anti-His6  
(SYM37-ED)

①	②
-	+

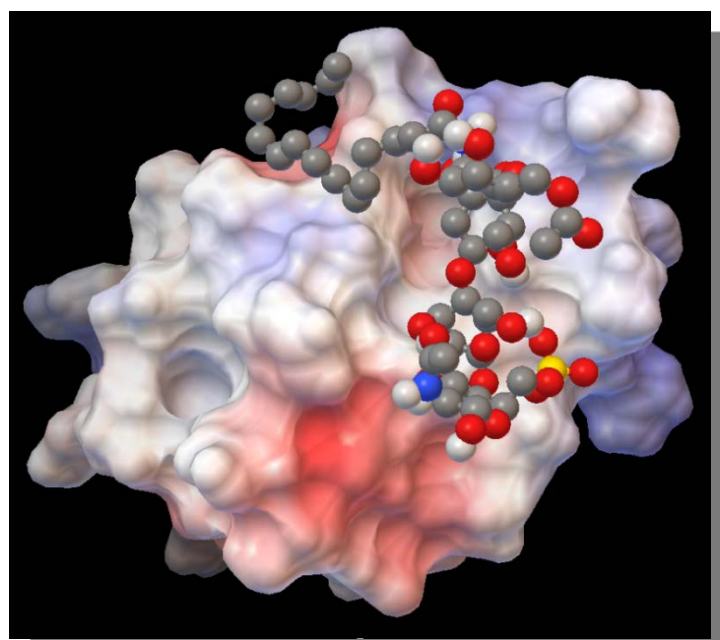
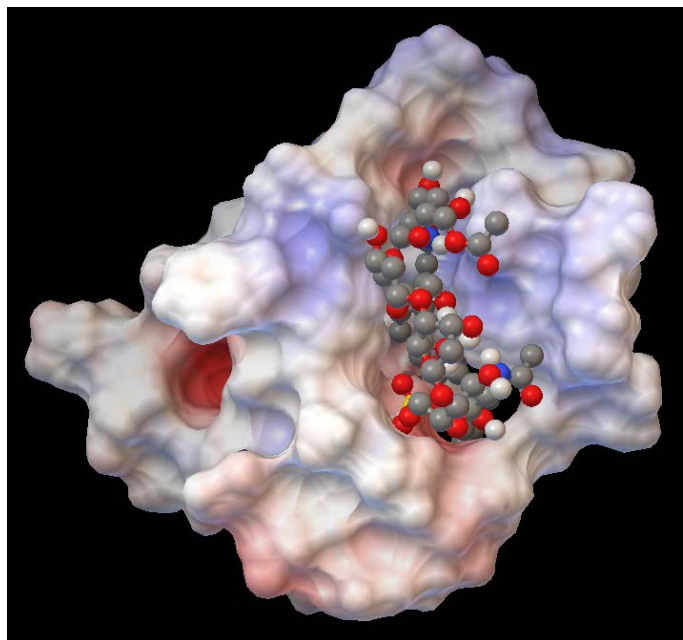
SYM37-ED  
~ 35 kD



- (without IPTG)  
+ (with IPTG)

Знание структуры рецепторов открывает перспективу их редактирования для конструирования новых симбиотических систем.

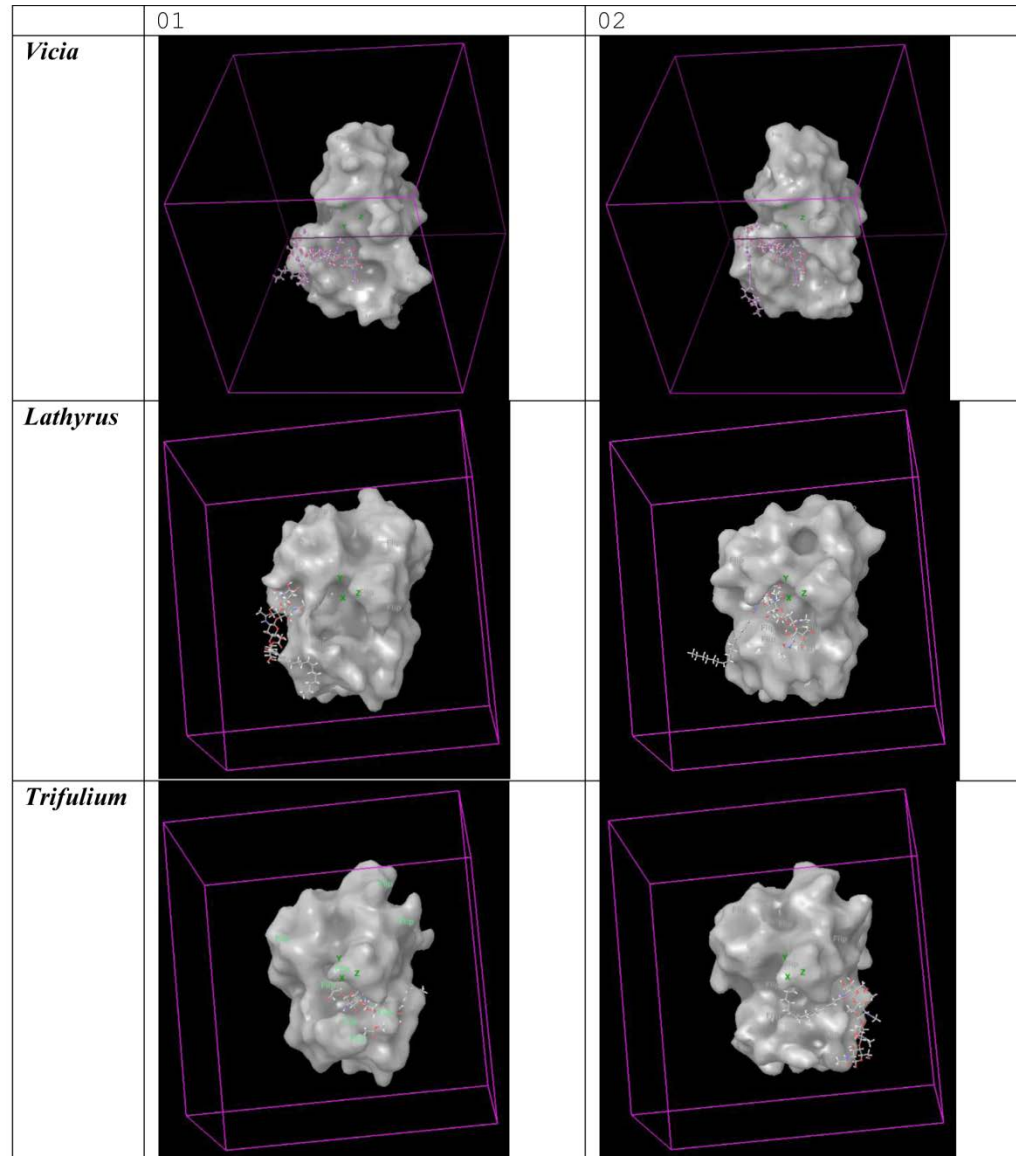
Влияние замены Ser на Asp в положении 131 рецептора NFR5 на пространственную структуру и связывание под-фактора



Порозов, Мунтян и др. 2012



Молекулярное моделирование взаимодействия растительного рецептора *nft5* с различными *nod*-факторами продемонстрировало специфичность взаимодействия *nod*-факторов со «своими» рецепторами



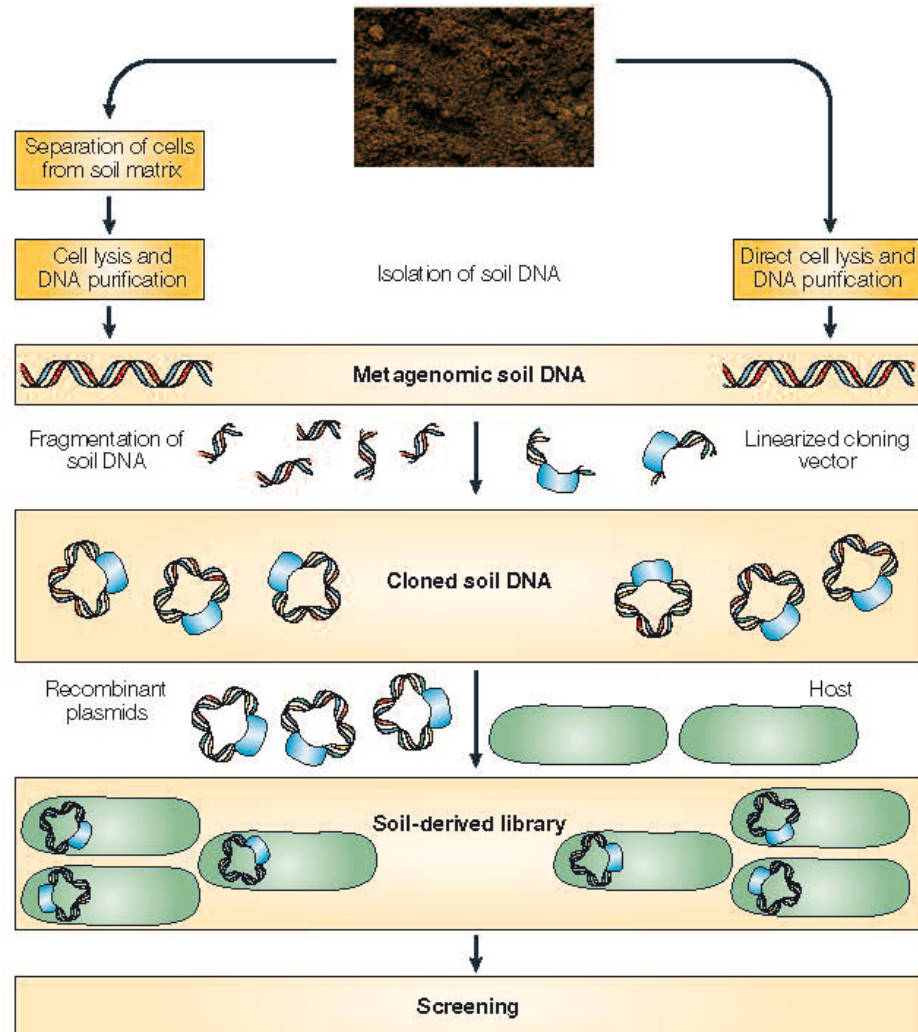


Figure 1 | **Essential steps to explore and exploit the genomic diversity of soil microbial communities by metagenomics.** Shown is a flow diagram of the main steps in the construction of a metagenomic DNA library from a soil sample. Soil DNA is recovered through separation of cells from soil particles followed by cell lysis and DNA recovery, or through direct lysis of cells contained within soil and recovery of DNA. Recovered soil DNA is fragmented and ligated into the linearized cloning vector of choice which might be a plasmid, cosmid, fosmid or BAC (bacterial artificial chromosome). Following the introduction of the recombinant vectors into a suitable bacterial cloning host, screening strategies can be designed to identify those clones which might contain new and useful genes.

# Задачи по конструированию новых симбиотических систем

Редактирование структуры рецепторов

Включение новых структур в геномы сортов

Выделение новых генов

Введение новых генов в коммерческие штаммы

Сигналы, комплементарные рецепторам хозяина

Новые МРС с комплексом полезных свойств



**ARRIAM,  
SPB,  
RU!**

В докладе использованы  
данные сотрудников  
института Андропова Е.Е.,  
Румянцевой М.Л., Борисова  
А.Ю., Мунтян-Беловой В.С.,  
Белимова А.А.



**Спасибо за внимание!**

Актуальным трендом на сегодняшний день, по всей видимости, является не столько поиск перспективных генотипов растений и штаммов микроорганизмов, сколько освоение самой стихии изменчивости посредством современных технологий генетического анализа (высокопроизводительное секвенирование, молекулярное моделирование, биоинформатика и эволюционный анализ).

Один из желательных результатов – основанная на понимании причин и механизмов изменчивости возможность «канализировать» природные силы, управляющие эволюционным процессом, в направлениях, востребованных нуждами современного земледелия.

# Консорция, Симбиогенез

(Козо-Полянский, 1924);

## Holobiont

(Mindell, 1992. *Biosystems* 27:53–62;

Rohwer et al., 2002. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 243:1–10)

## and Hologenome theory of evolution

(Rosenberg et al., 2007. *Nature Reviews Microbiology* 5 (5): 355–362.);

## Аутоценоз и аутогеномная теория эволюции

(Савинов А.Б., 2012. *Журнал общей биологии*. Т. 73.  
№ 4. С. 281–298).