

Author: ELENA ANDRIŪNAITĖ

Dissertation title: Application of endophytic bacteria to improve growth and adaptation of antibiotic-treated tobacco shoots *in vitro*

Science field: Biochemistry N 004

Scientific supervisor: dr. Danas Baniulis

Thesis defence day: 2022-12-21

ANNOTATION

Antibiotics are often used to inhibit or prevent contamination or to control microbial overgrowth during bacteria-mediated genetic transformation. Antibiotic timentin, commonly employed in genetic transformation procedures, has a low phytotoxic effect on plant tissues *in vitro*; however, the long-term impact of the antibiotic use on plant tissue growth is not well understood. Antibiotic treatment could induce perturbations in composition and/or interactions within the plant-associated microbial community, which lead to negative consequences on growth and the adaptive capacity of plant tissue culture. The aim of the study was to evaluate the long-term effects of the timentin on tobacco shoot culture *in vitro* and to use endophytic bacterial isolates to improve adaptation and growth of antibiotic-treated transgenic tobacco shoot culture following the genetic transformation procedure. The results revealed that timentin treatment had an enduring residual negative effect on tobacco *in vitro* shoot culture which was related to an increased level of oxidative stress. The microbiome analysis revealed a diverse microbial community in the tobacco *in vitro* shoots, including 59 bacterial families, mainly dominated by the *Mycobacteriaceae* family. The timentin treatment resulted in a decline in microbial diversity reducing the number of identified families 4.5-fold, as well as increased dominance of *Mycobacteriaceae* and several other families which was likely associated with antibiotic resistance traits of the bacteria. Additionally, the potential of co-cultivation with growth-promoting endophytes to improve the efficacy of *in vitro* tissue culture following antibiotic treatment was investigated. It was established that pure isolates of endophytic bacteria of the *Bacillus cereus* group obtained from tobacco leaves could promote biomass accumulation in tobacco *in vitro* shoot culture. Furthermore, the endophytic isolates showed a capability to mitigate the reduced growth vigour in the transgenic tobacco shoots. Co-cultivation with endophytes reduced oxidative stress symptoms and enhanced the accumulation of shoot biomass of the transgenic tobacco shoots without interfering with the recombinant protein accumulation.

Autorius: ELENA ANDRIŪNAITĖ

Disertacijos pavadinimas: Endofitinių bakterijų panaudojimas antibiotiku apdorotų tabako ūglių *in vitro* augimui ir adaptacijai gerinti

Mokslo sritis: Biochemija N 004

Mokslinis vadovas: dr. Danas Baniulis

Gynimo data: 2022-12-21

ANOTACIJA

Antibiotikai yra plačiai naudojami siekiant slopinti arba užkirsti kelią mikrobiologinei taršai, taip pat kontroliuoti mikroorganizmų augimą bakterijų sukeltos genetinės transformacijos metu. Antibiotikas timentinas, dažnai naudojamas genetinės transformacijos procese, turi mažą fitotoksinį poveikį augalų audiniams *in vitro*, tačiau ilgalaikis antibiotiko poveikis augalų kultūros augimui nėra ištirtas. Naudojami antibiotikai gali skatinti su augalais susijusių mikroorganizmų sudėties ir jų tarpusavio sąveikos pokyčius, ir turėti neigiamą įtaką augalų audinių kultūros augimui ir prisitaikymui. Šio darbo tikslas, įvertinti ilgalaikį antibiotiko poveikį tabako ūglių kultūrai *in vitro* ir panaudoti endofitinių bakterijų izoliatus antibiotikais apdorotų transgeninių tabako ūglių adaptacijai ir augimui *in vitro* pagerinti. Buvo nustatyta, kad apdorojimas timentinu turėjo išliekamąjį neigiamą poveikį tabako ūglių *in vitro* augimui, kuris yra susijęs su padidėjusiu oksidacinio streso lygiu. Mikrobiomo analizė atskleidė gausią tabako *in vitro* ūglių bakterinę bendruomenę, kurią sudarė 59 bakterijų šeimos, tarp kurių dominuoja *Mycobacteriaceae*. Ūglių apdorojimas timentinu lėmė mikrobiomo įvairovės sumažėjimą: bakterinių šeimų skaičius sumažėjo 4,5 karto ir padidėjo *Mycobacteriaceae* ir kelių kitų šeimų dominavimas, kuris tikriausiai buvo susijęs su bakterijų atsparumu antibiotikui. Taip pat, įvertinta galimybė panaudoti augalų endofitinių bakterijų inokuliaciją augalų streso slopinimui ir augimo pagerinimui tabako ūglių audinių kultūroje. Tyrimo rezultatai parodė, kad *Bacillus cereus* grupės endofitinių bakterijų izoliatai, gauti iš tabako lapų, gali skatinti biomasės kaupimą tabako *in vitro* ūglių kultūroje. Be to, nustatyta, kad transgeninių ūglių inokuliacija endofitiniais izoliatais sumažino oksidacinės pažaidos lygį, padidino transgeninių tabako ūglių biomasės kaupimą, ir neturėjo poveikio baltymų gamybos biologinėms funkcijoms ir nekeitė rekombinantinio baltymo kaupimo.