

## ИСКУССТВЕННАЯ АССОЦИАТИВНАЯ СИМБИОТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА РАПСА С РИЗОБИЯМИ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОТ ФИТОПАТОГЕНОВ

©2013 З.Р. Вершинина<sup>1</sup>, Д.К. Благова<sup>1</sup>, Л.Р. Нигматуллина<sup>1</sup>, А.М. Оркодашвили<sup>2</sup>,  
Ал.Х. Баймиев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

<sup>2</sup>Башкирский государственный университет, г. Уфа

Поступила 01.06.2013

Данная статья посвящена созданию искусственного ассоциативного симбиоза между рапсом, трансгенным по гену лектина гороха и штаммом ризобий *Rhizobium leguminosarum*, обладающим фунгистатической активностью, и оценке эффективности полученной системы против фитопатогена *Fusarium oxysporum*.

**Ключевые слова:** лектин, ризобии, «бородатые корни», искусственные симбиотические системы, рапс, фитопатоген.

Рапс (*Brassica napus* L.) является одной из наиболее ценных и перспективных сельскохозяйственных культур. Однако он подвержен множеству болезней, в том числе и вызываемых фитопатогенными грибами (например, *Fusarium sp.*). Использование химических средств защиты может привести к нарушению устойчивости агроэкосистем, поэтому необходимо искать альтернативные экологически безопасные способы борьбы с патогенами.

Ризобии, вступающие в природе в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями, могут выступать в качестве ассоциативных микросимбионтов для многих небобовых культур, в том числе и для рапса [1]. Эти бактерии способны колонизировать корневую систему и повышать урожайность растений, выделяя ростостимулирующие вещества и защищая от фитопатогенов. Например, было показано, что некоторые штаммы *Rhizobium leguminosarum* могут стимулировать рост молодых проростков рапса [2] и повышать урожайность этой культуры [3]. К сожалению, в природе полезные бактерии зачастую не выдерживают конкуренции с менее эффективными дикими штаммами, поэтому одним из важнейших факторов при образовании ассоциативных взаимоотношений является способность ризобий колонизировать корневые системы растений. Так, ранее было обнаружено, что некоторые штаммы ризобий могут колонизировать [4, 5] и даже формировать биопленки на корнях рапса [6]. Однако важнейшей задачей исследователей всегда являлось придание способности растениям узнавать и прикреплять к своей поверхности определенные полезные для них штаммы бактерий. И в качестве специфического, узнаваемого ризобиями вещества для инженерии корневых ассоциаций могут выступать лектины бобовых растений, которые индуцирует у ризобий синтез ряда факторов, которые могут специфично агглютинировать бактерии к корням [7].

В данной работе был использован ген лектина гороха посевного *psl*, так как этот лектин является наиболее изученным по сравнению с лектинами других бобовых растений, и узнающий данный лектин природный микросимбионт гороха посевного *R. leguminosarum*. Именно лектин гороха был использован в ряде работ по изменению специфичности симбиоза бобовых растений [8] и, более того, экспрессия этого гена позволила значительно повысить количество ризобий, колонизирующих трансгенный рис [9], табак, томат и рапс [10, 11].

В качестве модельной корневой системы для получения симбиотических ассоциаций служили трансгенные по гену лектина гороха «бородатые корни», которые являются удобным объектом на начальных этапах экспериментов, направленных на повышение эффективности симбиоза, а также в создании новых симбиотических комплексов, обладающих ростостимулирующей и фунгицидной активностями [12, 13]. Целью данной работы являлось исследование возможности создания искусственных ассоциаций *Rhizobium leguminosarum* с корнями рапса для защиты этого растения от фитопатогенных грибов рода *Fusarium*.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для получения трансгенных «бородатых корней» был использован штамм *Agrobacterium rhizogenes* A4, трансформированный вектором pCambia 1301 со встроенным в область T-ДНК геном лектина гороха посевного *psl* [11]. В эксперименте использовали суточные культуры *A. rhizogenes* (pCambia 1301-*psl*) и *A. rhizogenes* (исходный), выращенные при 28°C на шейкере (150 об/мин) в минимальной среде Min A [14], с добавлением 100 мг/л рифампицина и 50 мг/л канамицина. Перед инокуляцией культуру агробактерий центрифугировали (3500 об/мин, 10 мин) и ресуспендировали в жидкой среде Min A. Плотность суспензии агробактерий была доведена до 10 КОЭ/мл.

Объектом исследований являлся рапс (*Brassica napus* var. *napus*) сорта Ратник. Поверхность семян стерилизовали в течение 2 мин в 70% спирте и затем 15 мин в 15% растворе гипохлорита натрия с добавлением нескольких капель Tween-20. Для получения композитных растений семена проращивали в течение

Вершинина Зилья Рифовна, к.б.н., научный сотрудник, e-mail: ziluyaver@mail.ru; Благова Дарья Константиновна, младший научный сотрудник, e-mail: blagova\_darya@mail.ru; Нигматуллина Лилия Ралисовна, аспирант, e-mail: lili-nigmatullina@bk.ru; Оркодашвили Анна Михайловна, студент, e-mail: owlwoman@mail.ru; Баймиев Алексей Ханифович, д.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: baymiev@mail.ru

2 недель на стерильной MS среде. Затем у проростков отрезали настоящий корень, срез 15 сек инокулировали в суспензии *A. rhizogenes*, после чего растения кокультивировали на агаризованной среде MS с ацетосериноном (10 мг/л) в течение 3 дней. Далее их пересаживали на MS среду с цефотаксимом (200 мг/л), для подавления роста агробактерий. Через месяц после кокультивации растения с развитой корневой системой пересаживали в автоклавированную смесь почвы и песка.

Гистохимический анализ корней на *gus*-активность проводили по Jefferson [15]. ДНК выделяли фенольно-хлороформным методом. Выделение тотальной РНК и проведение ревертазной реакции осуществляли с использованием наборов TRizol Reagents («Invitrogen», США) и GenePak RT Core НПФ («Галарт-Диагностикум», Россия).

Наличие гена лектина *psl* в препаратах ДНК и кДНК проверяли с помощью ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих участок гена лектина, и стандартных наборов в амплификаторе Терцик МС2 («ДНК-технология», Россия) при оптимальной для каждой пары праймеров температуре отжига.

В качестве микросимбионтов в полученных симбиотических системах был использован штамм *R. leguminosarum* 116, выделенный из клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и обладающий фунгистатической активностью. Степень агглютинации данного штамма семенным лектином гороха посевного проверялась согласно методике, описанной в статье [11]. В качестве фитопатогена был выбран штамм *Fusarium oxysporum*, выделенный из корней рапса, пораженных фузариозом. Антагонистическую активность *R. leguminosarum* 116 по отношению к грибу оценивали, используя метод двойной культуры [16].

Для инокуляции комбинированных растений использовали бактерии *R. leguminosarum*, которые наращивали при 28°C в течение суток в жидкой среде YM до концентрации 10<sup>7</sup> КОЕ/мл. Далее в течение суток в инокуляте выдерживали корни растений. После чего корни отмывали стерильной водой, растения пересаживали в почву, содержащую 10 мл суспензии спор гриба *F. oxysporum* с концентрацией 10<sup>5</sup>/мл, и выращивали в течение трех суток. Затем корни растений отмывали и окрашивали толуидиновым синим в течение часа. При этом гифы грибов приобретали фиолетовую окраску, а клетки растений – голубую. После отмывания в цитратном буфере корни рассматривали и фотографировали с помощью микроскопа Axio Imager M1 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После инокуляции суспензией *A. rhizogenes* «бородатые корни» начинали образовываться через 10-12 дней на 98% растений (рис. 1). *Gus*-окрашивающиеся корни были обнаружены у 90% проростков, обработанных *A. rhizogenes* (pCambia 1301-*psl*). ПЦР-анализ этих корней показал присутствие гена лектина и на уровне мРНК его конститутивную экспрессию (рис. 2). У контрольных комбинированных растений (полученных с помощью исходного штамма *A. rhizogenes*), ПЦР и *gus*-окрашивание дали отрицательный результат.



Рис. 1. Полученные трехнедельные комбинированные растения рапса

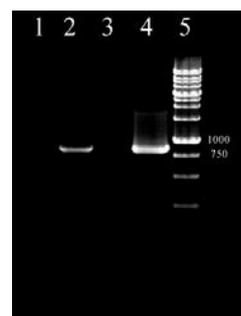


Рис. 2. Электрофореграмма ОТ-ПЦР-анализа экспрессии гена лектина в «бородатых корнях». 1 – контроль на наличие ДНК в препарате мРНК; 2 – «бородатые корни», в которых идет экспрессия гена лектина; 3 – отрицательный контроль без генетического материала; 4 – продукт ПЦР на наличие гена лектина в «бородатых корнях»; 5 – 1 Кб ДНК маркер (250-10000 п.н.)

Ранее были получены полностью трансгенные растения табака, а также химерные растения рапса и томатов, экспрессирующие ген лектина гороха [10, 11]. На данных растениях было обнаружено увеличение количества бактерий *R. leguminosarum* 1078 на порядок и более по сравнению с нетрансгенными растениями. Этот факт подтверждал взаимодействие ризобий с лектином на поверхности трансгенных корней. Аналогичные результаты были получены и для штамма *R. leguminosarum* 116 (рис. 3а,б). Определенная методом двойной культуры антагонистическая активность этого микросимбионта по отношению к *F. oxysporum* составила около 70% (рис. 3в).

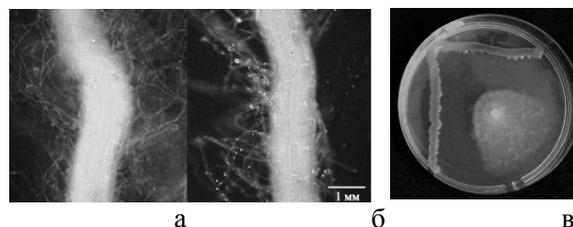
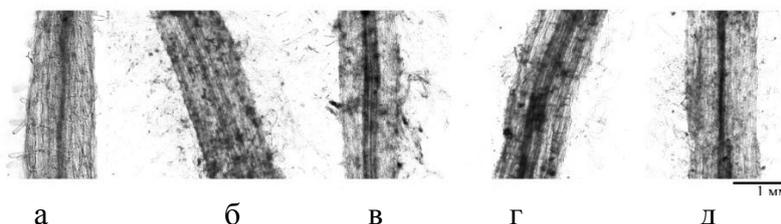


Рис. 3. Колонизация фунгицидным штаммом *R. leguminosarum* 116, маркированным TurboGFP, не трансгенных (а) и трансгенных (б) по гену лектина гороха посевного корней рапса; (в) ингибирование *R. leguminosarum* 116 роста колоний *F. oxysporum*

Таким образом, экспериментально были получены все предпосылки для создания искусственной симбиотической системы, повышающей устойчивость растений рапса к фитопатогену *F. oxysporum*. Для достижения данной цели комбинированные растения рапса с трансгенными по гену лектина корнями и обычны-

ми, инокулировали суспензией штамма *R. leguminosarum* 116, пересаживали в почву, содержащую споры гриба *F. oxysporum* и выращивали в течение трех суток. После окрашивания корней растений толуидиновым синим, проводили их микроскопический анализ (рис. 4 а,д). В результате проведенных экспериментов было выяснено, что обработка транс-

генных по гену *psl* корней штаммом *R. leguminosarum* 116 уменьшает количество гиф патогена *F. oxysporum* в ризосфере рапса (рис. 4д). Такой же эффект, но в гораздо меньшей степени, наблюдается на корнях контрольных растений, на которых адсорбция *Rhizobium* происходит менее эффективно (рис. 4в).



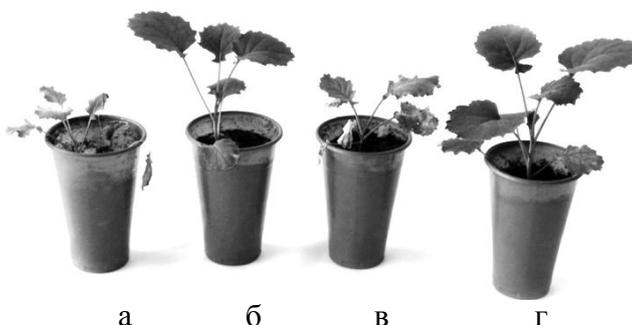
**Рис. 4.** Заражение растений рапса *F. oxysporum*: а – неинокулированные контрольные растения; б – контрольные растения + *F. Oxysporum*; в – контрольные растения + *F. oxysporum*+*R. leguminosarum* 116; г – растения с трансгенными по *psl* корнями + *F. oxysporum*; д – растения с трансгенными по *psl* корнями + *F. oxysporum*+ *R. leguminosarum* 116

Через неделю после инокуляции *F. oxysporum* преимущественно выживали лишь растения с трансгенной ризосферой, обработанные *R. leguminosarum* 116 (рис. 5).

Ранее в ряде работ была показана способность ризобий ингибировать рост различных штаммов грибов *in vivo* и возможность использования данных бактерий для защиты небобовых растений от фитопатогенов. Так, *B. japonicum* KUMH 569, *R. meliloti* KUMH 139 и *R. leguminosarum* KUMH 551 были способны замедлять рост *F. solani* в опытах с подсолнечником и бамией [17], а также стимулировать рост этих растений. Отдельные штаммы *S. meliloti* и *R. trifolii* могут использоваться для биоконтроля *F. oxysporum*, заражающего подсолнечник и томат [18, 19]. В работе

Chandra с соавт. [20] было показано, что штамм *M. loti* MP6 способен ингибировать *in vitro* рост патогена *Sclerotinia sclerotiorum* и защищать от заражения корней рапса.

Существует ряд статей, подтверждающий фунгистатические свойства лектинов выделенных из семян бобовых, в том числе, и из гороха посевного [21, 22]. Однако, трансгенные корни рапса, обработанные исключительно *F. oxysporum*, по степени заражения практически ничем не отличались от контрольных корней, обработанных этим же штаммом грибов. Данный факт говорит об отсутствии фунгистатических свойств у лектина гороха посевного, который мы использовали в качестве фактора модификации симбиотических взаимодействий.



**Рис. 5.** Растения рапса через неделю после заражения *F. oxysporum*: а - контрольное без бактерий, б - контрольное, инокулированное *R. leguminosarum* 116, в - с трансгенной корневой системой без бактерий, г - с трансгенной корневой системой, инокулированное *R. leguminosarum* 116

На основании полученных результатов можно утверждать, что колонизация трансгенных по гену лектина гороха посевного *psl* корней рапса микросимбиотом гороха посевного *R. leguminosarum* 116, обладающим фунгистатической активностью, способствует получению стабильной ассоциации микроорганизмов с растениями и защите от фитопатогенных грибов *F. oxysporum*. Проведенные эксперименты подтверждают принципиальную возможность получения таким способом искусственных симбиотических ассоциаций рапса с ризобиями, обладающих повышенной устойчивостью к грибным фитопатогенам.

Лектины бобовых растений, отвечающие за распознавание и прикрепление ризобий к корням, являются одним из инструментов для расширения круга сим-

биотических партнеров у бобовых и получения ассоциативных симбиозов с клубеньковыми бактериями у небобовых растений. Использование лектинов в качестве трансгенов позволяет получать искусственные корневые ассоциации с ризобиями у несимбиотрофных растений, таких как рапс, что в сочетании с использованием микроорганизмов с фунгистатической активностью может более эффективно защищать корневую систему растений от патогенов. Это расширяет возможности использования биологических средств защиты растений, что в перспективе позволит сократить использование химических пестицидов.

Данная работа проводилась при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы» (Гос-

контракт 16.740.11.0671, Соглашения 8115, 8046), РФФИ (Соглашения 12-04-31277, 12-04-31284).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mehboob I., Naveed M., Zahir A.Z., Ashraf M. Potential of Rhizobia for Sustainable Production of Non-legumes // Crop Production for Agricultural Improvement. Springer, 2012. P. 659-704.
2. Noel T.C., Sheng C., Yost C.K., Pharis R.P., Hynes M.F. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce // Can. J. Microbiol. 1996. V. 42. P. 279-283.
3. Lupwayi N.Z., Clayton G.W., Hanson K.G., Rice W.A., Biederbeck V.O. Endophytic rhizobia in barley, wheat and canola roots // Can. J. Plant Sci. 2004. V. 84. P. 37-45.
4. Hoflich G., Wiehe W., Buchholz C.H. Rhizosphere colonization of different crops with growth promoting *Pseudomonas* and *Rhizobium* bacteria // Microbiol. Res. 1995. V. 150. P. 139-147.
5. Chabot R.H., Antoun H., Kloepper J., Beauchamp C. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseolus* // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 2767-2772.
6. Santaella C., Schue M., Berge O., Heulin T., Achouak W. The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization // Environ Microbiol. 2008. V. 10. P. 2150-2163.
7. Kijne J.W., Diaz C.L., Pater S. Lectins in the symbiosis between *Rhizobia* and leguminous plants // Adv. Lectin Res. / Eds Franz H. et al. Berlin: Ullstein Mosby, 1992. P. 15-50.
8. Diaz C.L., Spaink H.P., Wiffelman C.A., Kijne J.W. Genomic requirements of *Rhizobium* for nodulation of white clover hairy roots transformed with the pea lectin gene // Mol. Plant-Microbe Interact. 1995. V. 8. P. 348-356.
9. Sreevidya V.S., Hernandez-Oane R.J., So R.B., Sullia S.B., Stacey G., Ladha J.K., Reddy P.M. Expression of the legume symbiotic lectin genes *psl* and *gs2* promotes rhizobial colonization of roots in rice // Plant Science. 2005. V. 169. P. 726-736.
10. Вершинина З.Р., Баймиев А.Х., Благова Д.К., Князев А.В., Баймиев А.Х., Чемерис А.В. Бионженерия симбиотических систем: создание новых ассоциативных симбиозов с помощью лектинов на примере табака и рапса // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. № 3. С. 336-342.
11. Vershinina Z.R., Baymiev A.Kh., Blagova D.K., Chubukova O.V., Baymiev A.Kh., Chemeris A.V. Artificial colonization of non-symbiotic plants roots with the use of lectins // Symbiosis. 2012. V. 56. N. 1. P. 25-33.
12. Akasaka Y., Mii M., Daimon H. Morphological alterations and root nodule formation in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy roots of peanut (*Arachis hypogaea* L.) // Ann. Bot. 1998. V. 81. P. 355-362.
13. Diaz C.L., Spaink H.P., Kijne J.W. Heterologous rhizobial lipochitin oligosaccharides and chitin oligomers induce cortical cell divisions in red clover root, transformed with the pea lectin gene // Mol. Plant Microbe Interact. 2000. V. 13. P. 268-276.
14. Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab., 1972. 432 p.
15. Jefferson R.A. Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System // Plant Mol. Biol. Rep. 1987. V. 5. P. 387-405.
16. Whipps J.M. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi // New Phytologist. 1987. V. 107. P. 127-142.
17. Ehteshamul-Haque S., Ghaffar A. Use of rhizobia in the control of root rot diseases of sunflower, okra, soybean and mungbean // J. Phytopathol. 1993. V. 138. P. 157-163.
18. Perveen S., Ehteshamul-haque S., Ghaffar A. Biological control of soilborne root infecting fungi in tomato and okra // Pak. J. Bot. 1994. V. 26. N. 1. P. 181-186.
19. Siddiqui I. A., Ehteshamul-Haque S., Ghaffar A. Effect of Rhizobia and fungal antagonists in the control of root infecting fungi on sunflower and chickpea // Pak. J. Bot. 1998. V. 30. P. 279-286.
20. Chandra S., Choure K., Dubey R.C., Maheshwari D.K. Rhizosphere competent *Mesorhizobium loti* MP6 induces root hair curling, inhibits *Sclerotinia sclerotiorum* and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*) // Braz. J. Microbiol. 2007. V. 38. P. 128-130.
21. Sitohy M., Doheim M., Badr H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds // Food Chemistry. 2007. V. 104. P. 971-979.
22. Charungchittrak S., Petsom A., Sangvanich P., Karnchanatat A. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen // Food Chemistry. 2011. V. 126. P. 1025-1032.

#### ARTIFICIAL ASSOCIATIVE SYMBIOTIC SYSTEM OF OILSEED RAPE WITH RHIZOBIA FOR PROTECTION AGAINST PHYTOPATHOGENS

©2013 Z.R. Vershinina<sup>1</sup>, D.K. Blagova<sup>1</sup>, L.R. Nigmatullina<sup>1</sup>, A.M. Orkodashvili<sup>2</sup>, A.Kh. Baymiev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Sci. Center of RAS, Ufa

<sup>2</sup>Bashkir State University, Ufa

This article is dedicated to the creation of associative symbiosis between rape and *Rhizobium leguminosarum* having fungistatic activity and effectiveness of the systems obtained against phytopathogen *Fusarium oxysporum*.

**Key words:** lectin, rhizobia, hairy roots, artificial symbiotic system, oilseed rape, phytopathogen.

Zilya Vershinina, Candidate of Biology, researcher, e-mail: zilyaver@mail.ru; Dariya Blagova, junior researcher, e-mail: blagova\_darya@mail.ru; Liliya Nigmatullina, postgraduate, e-mail: lili-nigmatullina@bk.ru; Anna Orkodashvili, student, e-mail: owlwoman@mail.ru; Aleksey Baymiev, Doctor of Biology, leading researcher, e-mail: baymiev@mail.ru.