

УДК 579.262: 579.64:631.46

З.Р. ВЕРШИННИНА\*, Д.К. БЛАГОВА, Л.Р. НИГМАТУЛЛИНА, А.М. ЛАВИНА, А.Х. БАЙМИЕВ, А.В. ЧЕМЕРИС  
ФГБУН «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, 450054  
e-mail: zyliaver@mail.ru

## Ассоциативный симбиоз трансгенных томатов с ризобиями повышает устойчивость растений к *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Показано, что растения томата сорта Грунтовый Грибовский 1180, трансгенные по гену лектина гороха посевного *psl*, образуют устойчивый ассоциативный симбиоз со штаммом бактерий *Rhizobia leguminosarum*, обладающим фунгистатической активностью, что способствует защите корневой системы растений от фитопатогена *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Так, выживаемость растений, трансгенных по гену *psl* и инкубированных с ризобиями, после контаминации грибом составляет 81,5%. Аналогичная цифра для нетрансгенных растений равна 47,6%.

*Ключевые слова:* лектин гороха, ризобии, трансгенный томат, фунгистатическая активность.

Томат (*Lycopersicon esculentum*) является важнейшей сельскохозяйственной культурой, которая возделывается почти во всех регионах России. Однако различные заболевания грибковой природы обуславливают резкое падение урожайности данных растений. Фузариозное увядание томатов — довольно распространенное и опасное заболевание — поражает в основном растения, выращиваемые в закрытом грунте в монокультуре и без обеззараживания почвы. В последние годы из-за несоблюдения севооборота возрастает вредоносность фузариозного увядания и на огородах. Данное заболевание вызывают почвенные грибы р. *Fusarium*: *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. nivale* и др.

Борьба с фузариозными заболеваниями обычно включает использование широкого круга пестицидов, которые потенциально представляют опасность как для окружающей среды, так и для здоровья человека. Экологически ориентированное сельское хозяйство предполагает альтернативные меры борьбы, в том числе и использование микроорганизмов, обладающих защитными свойствами, например, таких, как ризобии.

Общеизвестно, что бактерии р. *Rhizobium* в природе вступают в симбиоз с бобовыми растениями, образуя азотфиксирующие клубеньки. Однако существуют данные, что эти бактерии могут вступать в ассоциативные взаимоотношения и с небо-

Вершинина Зилия Рифовна, Благова Дарья Константиновна, Нигматуллина Лилия Ралисовна, Лавина Анна Михайловна, Баймиев Алексей Ханифович, Чемерис Алексей Викторович.

*Список сокращений:* ИМК — индолилмасляная кислота; ИУК — индолилуксусная кислота; КОЕ — колониеобразующая единица; ОТ-ПЦР — ПЦР с использованием обратной транскриптазы; п.н. — пар нуклеотидов; ПЦР — полимеразная цепная реакция; среда LB — среда Лурия—Бертани; среда MS — среда Мурасиге—Скуга; ЭДТА — этилендиаминтетраацетат; dT — дезокситимидин; Mes — 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота; PSL (pea seed lectin) — лектин семян гороха; TBS-T — буфер TBS (0,05M трис, 0,15 M NaCl, pH 7,6) + 0,1% твин-20.

\* Автор для переписки.

бовыми культурами, такими как рапс, пшеница, рис, подсолнечник, спаржа, колонизуя корни без образования клубеньков и способствуя повышению урожайности за счет различных механизмов, в том числе защиты от фитопатогенных грибов [1]. Защитные механизмы в последнем случае состоят из индукции системной устойчивости растений [2], выделения антибиотических соединений [3], конкуренции с грибами за места заселения на корнях и за питательные вещества [4, 5].

Колонизация «полезными» ризобиями корней небобовых растений зачастую достаточно эффективна лишь в лабораторных условиях; в природе эти бактерии не выдерживают конкуренции с «дикими» штаммами и обычно полностью замещаются [6]. Существуют различные способы придать растениям способность контролировать бактериальный состав собственной ризосферы. В их числе обработка корней изофлавоноидами, ауксиноподобными веществами и ферментами различной природы [7—9], использование рекомбинантных бактерий [10], а также создание трансгенных растений, экспрессирующих гены, участвующие в узнавании и прикреплении ризобий к корням [11—14].

К этим генам относятся, в частности, гены лектинов бобовых растений, продукты которых стимулируют прикрепление ризобий к корневым волоскам и оказывают опосредованное влияние на процессы, протекающие на разных этапах формирования симбиоза [15—17]. Ранее уже были получены положительные результаты по колонизации данными бактериями модельных небобовых растений, корни которых были трансгенны по гену лектина гороха посевного *psl* [11, 18—21].

Для создания искусственных симбиотических систем растений с ризобиями достаточным условием является выработка лектина исключительно в корнях. Поэтому большой интерес представляет создание небобовых растений, экспрессирующих ген лектина под контролем корнеспецифичного промотора. Одним из таких промоторов является RB7, выделенный из растений табака [22]. Ранее уже были проведены успешные эксперименты по трансформации томатов геном тионина арабидопсиса *Thi2.1* под контролем RB7-промотора, что повышало устойчивость растений к фитопатогенным грибам и бактериям [23].

Целью данной работы являлось получение трансгенных растений томата сорта Грунтовый Грибовский 1180, экспрессирующих ген *psl* под управлением корнеспецифичного промотора RB7, и изучение колонизации их корней штаммом клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* 1027,

обладающим фунгистатической активностью, в присутствии фитопатогена томата *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

#### УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**Стерилизация и проращивание семян томата.** Для экспериментов семена томата (*Solanum lycopersicum* L.) сорта Грунтовый Грибовский 1180 поверхностно стерилизовали в течение 1 мин в 70%-ном растворе этилового спирта (ОАО «Башспирт») и затем 20 мин в 20%-ном водном растворе коммерческого препарата гипохлорита натрия «Белизна» (ОАО «Каустик») с добавлением нескольких капель твина-20 (Sigma-Aldrich, Германия). После пятикратной промывки стерильной водой семена проращивали на среде MS1 (состав всех использованных питательных сред представлен в табл. 1) в течение 7—8 сут при температуре 25° и 16-часовом световом дне в климатической камере KBW 400 (Binder, Германия). Для получения эксплантов использовали недельные проростки.

**Вектор для трансформации растений и штамм *Agrobacterium tumefaciens*.** Для трансформации использовали штамм *A. tumefaciens* AGL0 (коллекция ИБГ УНЦ РАН), несущий векторную конструкцию pCAMBIA1301(*psl*), Т-ДНК которой содержит гены *psl* [24] под контролем промотора RB7, *gus* с каталазным интроном, ответственный за расщепление β-D-глюкуронидов, и селективный ген *hptII* гигромицинофосфотрансферазы, придающей устойчивость к гигромицину (рис. 1). Промотор RB7 размером 1385 п.н. был предварительно амплифицирован из тотальной ДНК табака согласно работе [25] с использованием праймеров 5'-TGACACCATGCCAAGCATAC-3', 5'-TTCTCACTAGAAAATGCCCC-3'.

**Агробактериальная трансформация.** В опытах по трансформации использовали свежую ночную культуру *A. tumefaciens*, выращенную при 28° на качалке (150 об/мин) в среде LB с добавлением 100 мг/л рифампицина (ЗАО «Брынцалов А») и 50 мг/л канамицина («Синтез АКОМП»). Далее культуру агробактерий центрифугировали (1370g, 10 мин) и ресуспендировали в исходном объеме среды Min A с добавлением ацетосирингона (200 мкМ, Sigma-Aldrich). Затем агробактерии растили еще в течение 1 ч при 28° на шейкере (150 об/мин) и перед инокуляцией разбавляли средой MS2 до 10<sup>8</sup> КОЕ/мл, контролируя процесс с помощью спектрофотометра СФ-46.

Агробактериальную трансформацию томата осуществляли согласно методике McCormick с соавторами [26] с небольшими модификациями. В

**Состав использованных питательных сред**

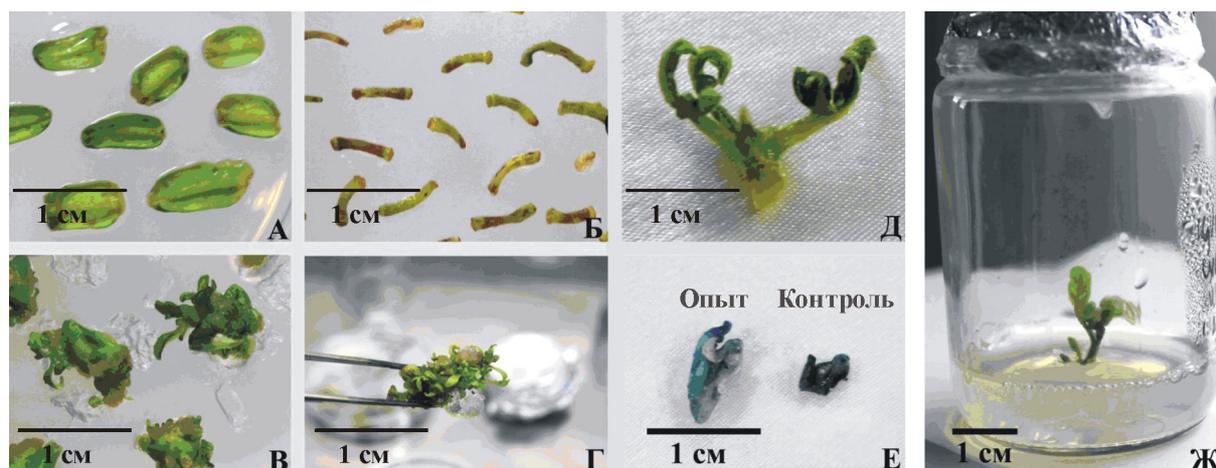
Название среды	Состав	Назначение
LB	Бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,5%) (ООО «Компания Хеликон»), NaCl (1%, «Химреактивснаб»)	Предварительное выращивание культуры <i>A. tumefaciens</i>
Min A	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,040%), цитрат Na (0,020%), K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,550%), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,180%), сахараза (0,200%, Serva Feinbiochemica), MgSO <sub>4</sub> (0,012%, все соли производства «Химреактивснаб»)	Выращивание культуры <i>A. tumefaciens</i> перед трансформацией
MS1	Половина дозы солей MS [27] (Sigma-Aldrich, Германия), сахараза (10%), гелерит (0,2%), Mes (Serva Feinbiochemica) (0,05%), pH 5,8	Проращивание семян
MS2	Соли MS, витамины B5 [28] (Serva Feinbiochemica), сахараза (3%), инозит (0,01%, Serva), Mes (0,05%), pH 5,8	Разбавление культуры <i>A. tumefaciens</i> до необходимой концентрации перед трансформацией, отмывание эксплантов после сокультивации
MS3	MS2 с добавлением гелерита (0,2 %, «Компания Хеликон»)	Со- и субкультивирование эксплантов и регенерантов
TY	Бакто-триптон (0,3%), дрожжевой экстракт (0,2%), CaCl <sub>2</sub> (0,1%, «Химреактивснаб»), агар-агар (1,5%, «Компания Хеликон»)	Выращивание культуры ризобий
YM	Маннит (1%, «Химреактивснаб»), дрожжевой экстракт (0,04%), NaCl (0,01%), MgSO <sub>4</sub> (0,01%), K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O (0,05%) (соли производства «Химреактивснаб»), агар-агар (1,5%)	Выращивание культуры гриба

качестве эксплантов для трансформации были использованы 200 эксплантов семядолей и 200 сегментов гипокотилей (рис. 2, А, 2, Б, соответственно). Их предварительное культивирование осуществляли на среде MS3 с добавлением 1,0 мг/л зетаина (Sigma-Aldrich) и 0,1 мг/л ИУК (Fermentas, Литва) при температуре 25° в темноте в течение

2 сут (35—40 эксплантов на чашку Петри), после чего скальпелем наносили на них 2—3 насечки. Далее экспланты переносили в колбу с суспензией *A. tumefaciens*, помещали на шейкер (40 об/мин) и в течение 30 мин осуществляли сокультивирование. Затем экспланты подсушивали на стерильной фильтровальной бумаге и переносили



**Рис. 1.** Схема области Т-ДНК векторной конструкции pCAMBIA1301: *psl* — целевой ген, кодирующий лектин гороха посевного; *gus* — ген β-D-глюкуронидазы; *hptII* — ген гидримицинофосфотрансферазы II *E. coli*; RB7 — корнеспецифичный промотор гена аквапорина табака; 35S — конститутивный промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; LB и RB — левая и правая последовательности, ограничивающие Т-область



**Рис. 2.** Этапы генетической трансформации томата сорта Грунтовый Грибовский 1180 геном лектина гороха посевного *psl*: А — трансформированные экспланты семядолей; Б — трансформированные сегменты гипокотилей; В — формирование каллуса и начало регенерации побегов на селективной среде; Г — массовая регенерация гигромицин-устойчивых побегов из семядольных эксплантов; Д — гипергидратированный регенерант; Е — слева *gus*-анализ фрагментов листьев регенерированных побегов, справа *gus*-анализ листьев контрольных нетрансформированных растений; Ж — укоренение побегов на среде для ризогенеза с добавлением 15 мг/л гигромицина

на чашки Петри со средой MS3, дополненной 2,0 мг/л зеатина и 0,1 мг/л ИУК. Последующее сокультивирование проводили в темноте при температуре 25° в течение 2 сут до появления слабого бактериального ореола.

После сокультивирования с *A. tumefaciens* экспланты отмывали в среде MS2 на качалке (40 об/мин) в течение 15 мин и помещали на среду MS3 с добавлением 2,0 мг/л зеатина, 0,1 мг/л ИУК и 300 мг/л цефотаксима (ЗАО «Фармацевтическая фирма «ЛЕККО»») с целью подавления роста и размножения агробактерий. Через 7 дней субкультивации экспланты переносили на среду MS3 с добавлением 15 мг/л селективного антибиотика гигромицина (Sigma-Aldrich). Пересадку на свежую селективную среду проводили каждые 10—14 дней. На четвертом пассаже количество зеатина в среде уменьшали до 1 мг/л. Регенеранты пересаживали в пробирки со средой MS3, содержащей 300 мг/л цефотаксима, 0,1 мг/л ИМК (ООО «ДиаМ») и 15 мг/л гигромицина для индукции корнеобразования. Укоренившиеся на селективной среде побеги высаживали в грунт и адаптировали к условиям светоплощадки.

**Анализ β-глюкуронидазной (*gus*) активности.** Гистохимический анализ с использованием гена *gus* (*gus*-анализ) проводили по методу, описанному Jefferson [29], с небольшими модификациями по Kosugi с соавт. [30]. Части отрезанных листочков предположительно трансгенных побегов инкубировали в X-gluc-реактиве, содержащем 1 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индоллил-β-D-глюкуронида (Fer-

mentas), 0,5% тритона X-100 (ООО «Компания Хеликон»), 100 мМ Na<sub>2</sub>-ЭДТА (Serva Feinbiochemica), 20% метанола (ООО «Русхимсеть»), 0,5 мМ K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0,5 мМ K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> · 3H<sub>2</sub>O (ООО «НПП «Альфасервис»») в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,0) (компоненты производства «Химреактивснаб»). Ткани инкубировали при 37° в течение ночи, отбеливали в 70%-ном этиловом спирте, выдерживали в 50%-ном растворе глицерина в воде и микроскопировали.

**ПЦР-анализ ДНК и РНК из трансгенных растений.** ДНК из растений выделяли методом солевой экстракции. Тотальную РНК выделяли с использованием тризола (Invitrogen, США). Первую цепь кДНК строили при помощи ММуLV-обратной транскриптазы (NEB, США) с использованием олиго(dT)-праймера («Силекс»). ПЦР и ОТ-ПЦР гена *psl* осуществляли с использованием праймеров 5'-АТААТGGСТТСТСТСАААС-СС-3' и 5'-GСААААААСТАТGCАТСТGСА-3' и стандартных наборов в амплификаторе Терцик МС2 фирмы («ДНК-технология»).

**Имунолокализация.** Для выявления локализации лектина гороха посевного на поверхности корней были получены поликлональные кроличьи антитела к данному лектину («Евроген», Россия). Иммуногистохимический анализ проводили согласно Diaz et al. [31]. Корни были инкубированы с первичными антителами, после отмывки от которых (3 раза по 5 мин в TBS—Т) их выдерживали 1 ч в растворе вторичных антител, разведенных 0,2%-ным молоком в TBS-Т (1:6000).

В качестве вторичных антител использовали препарат Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) фирмы Cell Signaling Technology (США), что делало возможным локализацию исследуемого белка с помощью флуоресцентной микроскопии. Для этой цели в работе был использован флуоресцентный микроскоп модели Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, Германия).

**Определение фунгистатической активности и маркирование штамма *Rhizobium leguminosarum*.** В качестве микросимбионта в экспериментах был использован коммерческий штамм *Rhizobium leguminosarum* 1027 из «Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения» (ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург), выделенный из клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и обладающий фунгистатической активностью. Степень агглютинации данного штамма лектином из семян гороха посевного (PSL) проверялась согласно методике, описанной в статье [18]. В качестве фитопатогена был выбран штамм *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* F-140, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Антагонистическую активность *Rh. leguminosarum* по отношению к грибу оценивали, используя метод двойной культуры [32].

Для визуализации симбиотических взаимодействий ризобии были маркированы флуоресцентным белком TurboGFP [33]. Векторные конструкции в бактерии переносили методом электропорации. В качестве селективного антибиотика использовали гентамицин (50 мг/мл, «Вирион»).

**Оценка количества бактерий, адгезированных на корнях трансгенных растений.** Для инокуляции использовали бактерии *Rh. leguminosarum* 1027 (меченные TurboGFP), которые выращивали при 28° на шейкере (150 об/мин) в течение 2 сут в среде ТУ без агар-агара до концентрации 10<sup>8</sup> КОЕ/мл. Суспензию бактерий разбавляли до 10<sup>5</sup> КОЕ/мл и выдерживали в ней корни растений в течение 1 сут. После этого от каждого растения отбирали 3 фрагмента корня длиной 1 см, отмывали их трижды стерильной водой по 5 мин на микрошейкере и гомогенизировали в 50 мкл среды LB. Полученный объем разбавляли в 1000 раз и 50 мкл этой суспензии рассеивали на агаризованную среду ТУ с гентамицином (50 мг/мл) и выращивали в термостате при 28° в течение 2 сут. Количество адгезированных бактерий определяли по числу выросших колоний. Визуальное наблюдение меченых бактерий на трансгенных и нетрансгенных корнях проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия).

**Совместная обработка растений патогенным грибом *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* и штаммом *Rh. leguminosarum* 1027, обладающим фунгистатической активностью.** Для получения суспензии спор гриба выращивали на чашке Петри со средой YM в течение 5 сут. Затем в чашку добавляли 20 мл стерильной воды и ставили на ночь в холодильник. Количество выделившихся спор подсчитывали в камере Горяева (при их среднем содержании 10<sup>5</sup>/мл). Для инокуляции растений использовали культуру бактерий *Rh. leguminosarum*, которую выращивали при 28° на качалке (150 об/мин) в течение 1 сут в жидкой среде ТУ до концентрации 10<sup>7</sup> КОЕ/мл. Корни растений инкубировали в бактериальной суспензии в течение 1 сут и далее отмывали в стерильной воде 20 мин. После этого растения пересаживали в почву с концентрацией спор гриба 10<sup>4</sup>/г и выращивали в течение 3 сут. Затем корни растений очищали от субстрата, окрашивали толуидиновым синим (ООО «Югсинтез») в течение 1 ч, отмывали в цитратном буфере (компоненты производства «Химреактивснаб») и анализировали на флуоресцентном микроскопе Axio Imager M1 (Carl Zeiss).

**Статистическую обработку результатов экспериментов** проводили с помощью стандартных пакетов программы Microsoft Excel 2007.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Агробактериальная трансформация томата сорта Грунтовый Грибовский 1180

В период первого пассажа на всей поверхности трансформированных и контрольных семядолей наблюдалось появление множества центров образования глобулярного каллуса. На сегментах гипокотилей развитие каллуса происходило лишь по краям срезов. Частота каллусообразования для всех эксплантов составила в среднем около 85,0% (см. рис 2, В, табл. 2).

После помещения эксплантов на селективную среду, содержащую 15 мг/л гигромицина, у большинства контрольных и трансформированных семядольных эксплантов начинался некроз образовавшихся каллусных структур; на сегментах гипокотилей интенсивность некротизации каллуса была значительно ниже. Регенерировавшие за время двух первых пассажей побеги на всех эксплантах в дальнейшем проявляли симптомы хлороза, что свидетельствовало об отсутствии в них трансгена.

После 4 мес селекции семядольных эксплантов на среде с гигромицином были получены 5 рас-

**Эффективность каллусообразования и селекции трансформантов томата сорта Грунтовый Грибовский 1180**

Тип экспланта	Количество эксплантов									
	общее		образовавших каллус		погибших				прошедших селекцию	
	шт.	%	шт.	%	от контакта с агробактериями		от присутствия гигромицина		шт.	%
					шт.	%	шт.	%		
Семядоли	200	100	173	86,5	0	0	167	83,5	5	2,5
Гипокотили	200	100	167	83,5	38	19	162	81,0	0	0

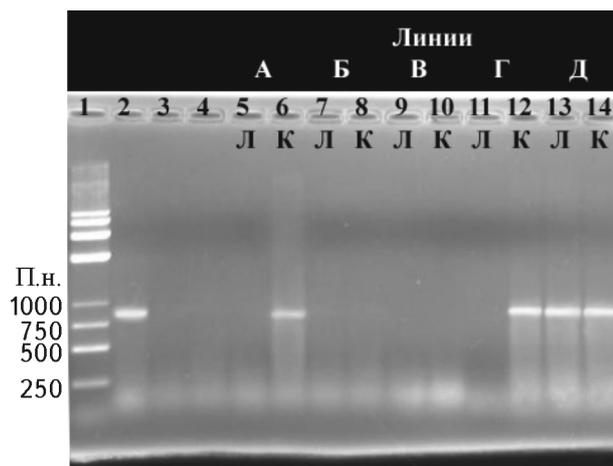
тущих каллусов. Из каждого из них в дальнейшем были получены по 5 зеленых регенерантов (вероятных клонов). Регенеранты, которые формировали хорошо развитые корни на среде для укоренения (см. рис. 2, Ж), содержащей 15 мг/л гигромицина, рассматривались как предположительно трансгенные и подвергались *gus*- и ПЦР-анализу. Стоит отметить, что часть регенерированных побегов была витрифицирована (гипергитратирована), что, возможно, связано с длительным культивированием на среде с высокой концентрацией цитокининов (см. рис. 2, Д). Для уменьшения количества случаев проявления данного нежелательного эффекта на четвертом пассаже концентрацию зеатина в среде уменьшали вдвое.

Трансгенность растений-регенерантов была проверена анализом активности β-D-глюкоуронидазы в тканях листа; у всех пяти линий наблюдалось устойчивое окрашивание в синий цвет (см. рис. 2, Е), которое означало наличие трансгена. ПЦР-анализ на наличие гена лектина во всех пяти линиях дал положительный результат. ОТ-ПЦР на экспрессию гена лектина *psl* на уровне мРНК в корнях и листьях выявил, что лишь в линиях А и Г лектин вырабатывается исключительно в корнях, в линиях Б и В экспрессия данного гена не происходит ни в корнях, ни в листьях, и в линии Д лектин вырабатывается и в листьях, и в корнях (рис. 3). Полученный результат, вероятнее всего, связан с различным нуклеотидным окружением внедренных генов, другими словами, с эффектом положения.

В работе Chan с соавт. [23] для трансформации томатов использовали короткий вариант промотора RB7 размером 635 п.н. Однако в этой работе экспрессия целевого гена происходила не толь-

ко в корнях, но и в листьях полученных трансгенных растений. Наши результаты доказывают, что с помощью промотора RB7 размером 1385 п.н. можно получить растения с экспрессией целевого гена исключительно в корнях (см. рис. 3, линии А и Г), что согласуется с данными Conkling и Yamamoto [25].

Линии томатов А, Г и Д были пересажены в почву и впоследствии из них были отобраны семена для получения второго поколения растений. Эти семена были высеяны на селективную среду с гигромицином (20 мг/л), где линии А и Д показали соотношение выживших и погибших, близкое к 3:1, что предполагает наличие в их геноме единич-



**Рис. 3.** Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР-анализа экспрессии гена *psl* под контролем промотора RB7/2: 1 — ДНК-маркер (250—10000 п.н., Fermentas); 2 — положительный контроль ПЦР; 3 — контроль на наличие ДНК в препарате мРНК; 4 — отрицательный контроль (без генетического материала); 5,7,9,11,13 — листья трансгенных растений (Л); 6,8,10,12,14 — корни трансгенных растений (К)

**Анализ наследования гена *hptII* в поколении T1 трансгенных растений томата ( $\chi^2$ \* теор. = 3,84; df=1;  $\alpha=0,05$ )**

Линия	Количество проростков, шт.			$\chi^2$	Расщепление на выживших : погибших
	общее	устойчивых к гигромицину	чувствительных к гигромицину		
А	120	92	28	0,57	3:1
Г	120	110	10	0,89	15:1
Д	120	87	33	0,40	3:1

$\chi^2$  — критерий соответствия; df — число степеней свободы;  $\alpha$  — уровень значимости.

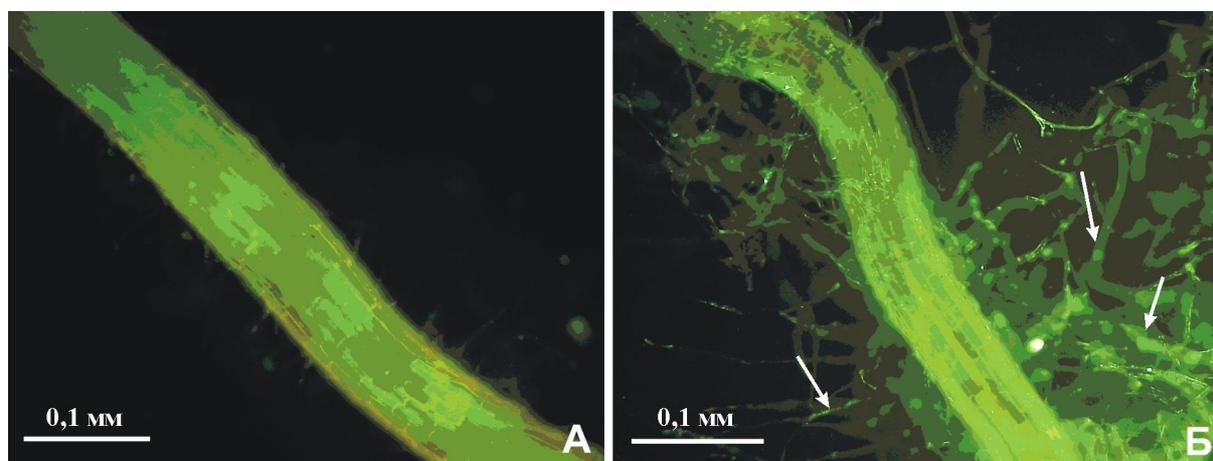
ной копии встроенного трансгена. Для линии Г данное соотношение было близко к 15:1 (табл. 3), поэтому в дальнейших экспериментах эта линия не использовалась, так как целью являлось получение линии с одной копией трансгена. В наших исследованиях был использован корнеспецифичный промотор RB7; в связи с этим опыты по созданию искусственных симбиотических систем с ризобиями были проведены с поколением T1 линии А, которая характеризовалась экспрессией гена лектина в корнях трансгенных растений (в отличие от линии Д, где экспрессия происходила и в корнях, и в листьях).

Эффективность разработанного метода трансформации томата сорта Грунтовый Грибовский 1180 составила около 2,5% (см. табл. 2), что сравнимо с эффективностью, достигнутой для ряда отечественных промышленных сортов томата при селекции на среде с канамицином [34, 35].

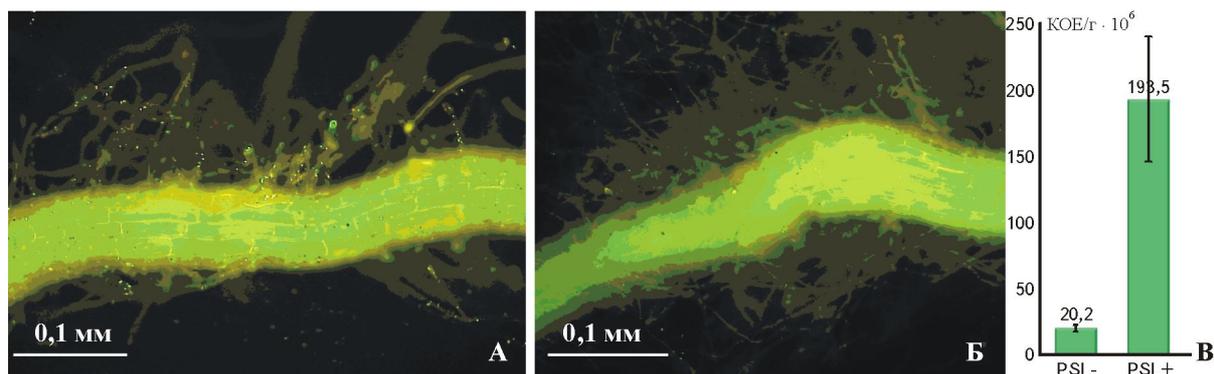
При этом следует учесть, что в данной работе селекция проводилась с использованием гигромицина, который значительно токсичнее канамицина для растительных тканей, и, следовательно, является более сильным селективным маркером. Так же, как и для сорта Рекордсмен [35] (см. табл. 2), использование гипокотилей в качестве эксплантов в нашей работе не приводило к получению трансгенных растений.

#### **Иммунолокализация лектина и адгезия ризобий на поверхности корней**

Иммунохимический анализ с использованием антител, специфичных в отношении PSL, доказал наличие этого лектина на поверхности корневых волосков трансгенных растений томата и отсутствие таковых у контрольных растений (рис. 4).



**Рис. 4.** Иммунолокализация PSL на поверхности корней томата: А — корень контрольного нетрансгенного растения; Б — корень трансгенного растения. Стрелками показана локализация лектина на поверхности корневых волосков



**Рис. 5.** Адгезия ризобий на поверхности корней: А — корень трансгенного растения; Б — корень контрольного нетрансгенного растения; В — диаграмма, показывающая количество адгезированных на поверхности корней бактерий

Полученный результат согласуется с данными статей [36, 37], где описывается преимущественно такая локализация лектина.

Для оценки количества бактерий, адгезированных на поверхности корней, растения инкубировали в суспензии штамма *Rh. leguminosarum* (GFP) в течение 1 сут, после чего микроскопировали. Было обнаружено активное прикрепление бактерий к трансгенным корням томата, что было нехарактерно для контрольных растений (рис. 5, А, Б). Подсчет количества адгезированных бактерий показал, что в среднем их численность на корнях трансгенных растений была более чем в 9 раз выше, чем контрольных (см. рис. 5, В) растений. Этот факт полностью согласуется с результатами, полученными нами ранее для композитных растений томата сортов Ред Хантер и Дубок [18, 19]. Стоит отметить, что упомянутые исследования проводили с использованием векторных конструкций, содержащих в качестве регуляторного элемента конститутивный CaMV35S-промотор. Данные по адгезии, полученные при использовании RB7-промотора, подтвердили, что уровень экспрессии гена *psl*, обеспечиваемый данным промотором, вполне достаточен, чтобы ризобии узнавали лектин и прикреплялись к поверхности трансгенных корней в таком же количестве, как и при использовании 35S-промотора (в том числе и в линиях с исключительно корневой экспрессией гена лектина). Этот результат открывает перспективы для дальнейшего использования промотора RB7 в создании искусственных симбиотических систем.

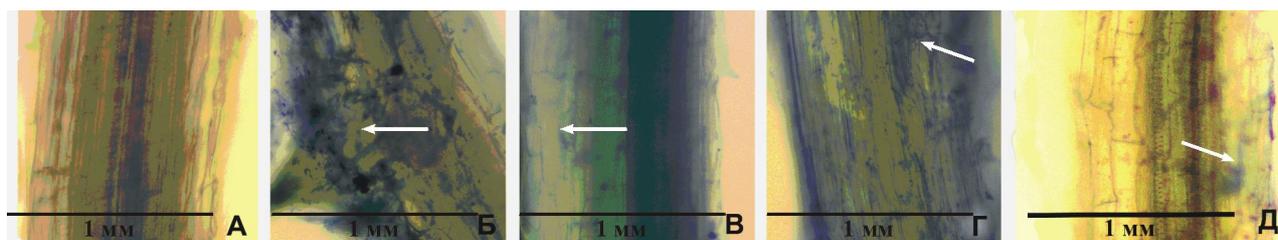
### Совместная обработка растений *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* и *Rh. leguminosarum*

Определенная методом двойной культуры антагонистическая активность *Rh. leguminosarum*

по отношению к *F. oxysporum* составила около 75% (рис. 6). Полученный результат вместе с повышенной адгезией бактерий к корням трансгенных томатов явился предпосылкой для создания искусственной симбиотической системы, повышающей устойчивость растений томата к фитопатогену *F. oxysporum*. Для достижения данной цели корни контрольных и трансгенных растений томата инкубировали с суспензией штамма *Rh. leguminosarum* и затем культивировали в субстрате, который содержал споры *F. oxysporum*. С помощью микроскопирования было выяснено, что обработка трансгенных по гену *psl* корней ризобиями уменьшает количество гиф патогена *F. oxysporum*



**Рис. 6.** Ингибирование *Rh. leguminosarum* роста колоний *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Степень подавления роста гриба составила 75% и была вычислена по формуле  $T=(R2-R1)/R2 \cdot 100\%$ , где  $R1$  — средний радиус колоний гриба по направлению к бактериям, а  $R2$  — средний радиус в направлении к краю чашки

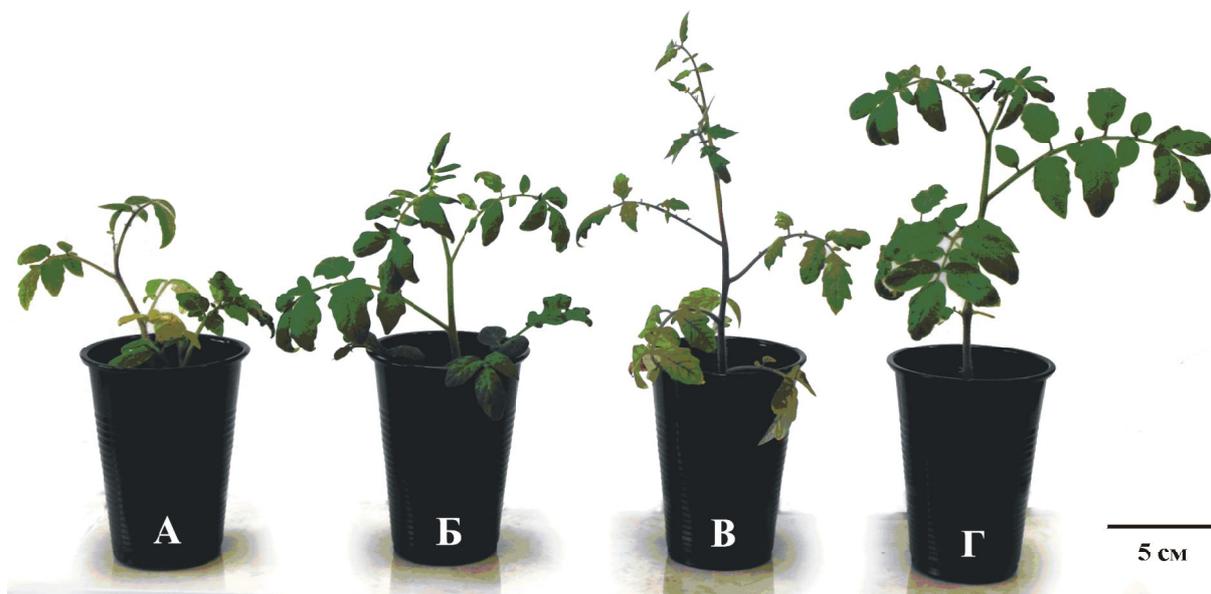


**Рис. 7.** Корни томата при заражении растений грибом *F. oxysporum*: А — неинокулированные контрольные растения; Б — контрольные растения + *F. oxysporum*; В — контрольные растения + *F. oxysporum*+*Rh. leguminosarum* 116; Г — трансгенные растения + *F. oxysporum*; Д — трансгенные растения + *F. oxysporum*+*Rh. leguminosarum* 116. Стрелками показаны окрашенные в фиолетовый цвет гифы патогена *F. oxysporum*

в ризосфере томата (рис.7, Д) по сравнению с нетрансгенными и не обработанными ризобиями корнями (см. рис. 7, Б). Такой же эффект, но в гораздо меньшей степени, наблюдается для корней контрольных растений (см. рис. 7, В), на которых адсорбция ризобий хотя и происходит, но менее эффективно, чем на корнях трансгенных. Через 2 нед после инокуляции *F. oxysporum* несмотря на то, что все растения в эксперименте были живы, устойчивость к фузариозу преимущественно проявляли трансгенные растения с корнями, обработанными *Rh. leguminosarum* (рис. 8). Данные о выживаемости опытных и контрольных растений томата на почве, зараженной спорами *F. oxysporum*, после 1 мес культивирования представлены в табл. 4.

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. В частности, отдель-

ные штаммы *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* потенциально могут быть использованы в качестве агентов для биоконтроля грибов из р. *Fusarium*, заражающих томат [38, 39]. Однако, чтобы защита была достаточно эффективной, необходимо обеспечить высокую степень колонизации ризобиями прикорневой зоны, что не всегда возможно для небобовых растений. Решить данную проблему помогают использованные в качестве трансгенов лектины, которые, выделяясь в ризосферу, взаимодействуют с полисахаридами клеточных стенок ризобий, тем самым прикрепляя бактерии к корням. В результате этого численность микросимбионтов может возрасти в ризосфере на несколько порядков, что было уже подтверждено в более ранних работах на модельных «композитных» растениях, у которых лишь корни были трансгенными по гену лектина [20, 21]. Благовой с соавт. было доказано, что колонизация подобных модельных корневых систем томата ризобиями, обладающими фун-



**Рис. 8.** Растения томата через 2 нед после заражения *F. oxysporum*: А — контрольное (без бактерий); Б — контрольное + *Rh. leguminosarum*; В — трансгенное без инкубации с бактериями; Г — трансгенное, инкубированное с *Rh. leguminosarum*

**Выживаемость растений томата на почве, зараженной спорами *F. oxysporum* (10<sup>6</sup>/1 г почвы), после 1 мес культивирования**

Растение	Всего растений, шт.	Погибло, шт.	Выжило, шт.	Выживаемость, %
Контрольное без бактерий	78	75	3	3,85
Контрольное, инкубированное с <i>R. leguminosarum</i>	82	43	39	47,56
Трансгенное (линия А) без бактерий	85	85	0	0
Трансгенное (линия А), инкубированное с <i>Rh. leguminosarum</i>	81	15	66	81,48

гистатической активностью, способствует защите от фитопатогенных грибов *F. oxysporum* [19]. Данная работа является продолжением вышеупомянутых экспериментальных исследований. Результаты, полученные на модельных композитных объектах, были подтверждены на растениях томата, полностью агробактериально трансформированных геном *psl*, находящимся под контролем RB7-промотора. На основании этих данных можно сделать вывод, что интеграция в геном небобовых растений генов лектинов бобовых под контролем корнеспецифичного RB7-промотора позволяет получать трансгенные растения, способные к устойчивой корневой ассоциации с ризобиями, обладающими фунгистатическими свойствами.

Таким образом, в результате настоящей работе создана система агробактериальной трансформации томата промышленного сорта Грунтовый Грибовский 1180 геном лектина гороха посевного *psl*, что позволило получить устойчивые корневые ассоциации этой важной для сельского хозяйства культуры с ризобиями, защищающими от фитопатогенных грибов. Полученные данные показали, что промотор RB7 обеспечивает достаточную для формирования ассоциативного симбиоза экспрессию гена лектина в корневой системе растений.

Работа выполнена с привлечением приборного парка ЦКП «Биомика» Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН и при финансовой поддержке гранта РФФИ-Поволжье № 14-04-97005 программы поддержки ведущих научных школ № НШ-5923.2014.4.

Получено 10.06.15

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Garcia-Fraile, P. *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans / P. Garcia-Fraile, L. Carro, M. Robledo, M.H. Ramirez-Bahena, J.D. Flores-Felix, M.T. Fernandez, P.F. Mateos, R. Rivas, J.M. Igual E. Martinez-Molina, A. Peix, E. Velazquez // PLoS One. — 2012. — V. 7. e38122. doi: 10.1371/journal.pone.0038122
2. Arfaoui, A. Biochemical analysis of chickpea protection against *Fusarium* wilt afforded by two *Rhizobium* isolates / A. Arfaoui, B. Sifi, M.E. Hassni, I.E. Hadrami, A. Boudabous, M. Cherif // Plant Pathol. J. — 2005. — V. 4. — P. 35—40.
3. Ehteshamul-Haque, S. Use of rhizobia in the control of root rot diseases of sunflower, okra, soybean and mungbean / S. Ehteshamul-Haque, A. Ghaffar // J. Phytopathol. — 1993. — V. 138. — P. 157—163.
4. Handelsman, J. Biocontrol of soilborne plant pathogens / J. Handelsman, E.V. Stabb // Plant Cell. — 1996. — V. 8. — P. 1855—1869.
5. Essalmani, H. *In vitro* antagonistic activity of some microorganisms towards *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* / H. Essalmani, H. Lahlou // Cryptogamie-Mycologie. — 2002. — V. 23. — P. 221—234.
6. Archana, G. Engineering nodulation competitiveness of rhizobial bioinoculants in soils: Microbes for Legume Improvement [Eds. M.S. Khan, J. Musarrat, A. Zaidi]. — Wien: Springer, 2010. — P. 157—194. doi: 10.1007/978-3-211-99753-6\_8
7. Stone, P.J. *Azorhizobium caulinodans* ORS571 colonizes the xylem of *Arabidopsis thaliana* / P.J. Stone, K.J. O'Callaghan, M.R. Davey, E.C. Cocking // Mol. Plant-Microbe Interact. — 2001. — V. 14. — P. 93—97.
8. Biabani, A.H. Bacterial nodulation of wheat plants / A.H. Biabani, N.Y. Kovalskaya, M.M. Umarov // Mol. Plant-Microbe Interact.: New bridges between Past and Future. 11-th Int.

- Congr. on Molecular Plant-Microbe Interactions: — St. Petersburg, 2003. — P. 350.
9. Di Gregorio, S. Combined application of TritonX-100 and *Sinorhizobium* sp. Pb002 inoculum for the improvement of lead phytoextraction by *Brassica juncea* in EDTA amended soil / S. Di Gregorio, M. Barbafieri, S. Lampis, A.M. Sanangelantoni, E. Tassi, G. Vallini // *Chemosphere*. — 2006. — V. 63. — P. 293—299.
  10. Rolfe, B.G., Bender, G.L. Evolving a *Rhizobium* for non-legume nodulation in Nitrogen fixation: Achievements and objectives / [Ed. P.M. Gresshoff, L.E. Rolh, G. Stacey, W.E. Newton]. — New York: Chapman and Hall, 1990. — P. 329—339.
  11. Sreevidya, V.S. Metabolic engineering of rice with soybean isoflavone synthase for promoting nodulation gene expression in rhizobia / V.S. Sreevidya, C. Srinivasa Rao, S.B. Sullia, J.K. Ladha, P.M. Reddy // *J. Exp. Bot.* — 2006. — V. 57. — P. 1957—1969.
  12. Li, X. Metabolic engineering of isoflavone genistein in *Brassica napus* with soybean isoflavone synthase / X. Li, J.C. Qin, Q.Y. Wang, X. Wu, C.Y. Lang, H.Y. Pan, M.Y. Gruber, M.J. Gao // *Plant Cell Rep.* — 2011. — V. 30. — P. 1435—1442.
  13. Tirichine, L., Jensen, J.S., Sandal, N., Madsen, L.H. Spontaneous nodulation in plants // Patent No.: US 8273955, A 01 H 5/00; A 01 H 5/10; A 01 H 1/06; A 01 H 1/02; C 12 N 15/82. 2012.
  14. Untergasser, A. One-step *Agrobacterium* mediated transformation of eight genes essential for *Rhizobium* symbiotic signaling using the novel binary vector system pHUGE / A. Untergasser, G.J. Bijl, W. Liu, T. Bisseling, J.G. Schaart, R. Geurts // *PLoS One*. — 2012. — V. 7. e47885. doi: 10.1371/journal.pone.0047885
  15. Brelles-Marino, G. Enhancement of infection thread formation by *Rhizobium elii* incubated with bean seed lectin / G. Brelles-Marino, G.A. Costa, J.L. Boiardi // *Microbiol. Res.* — 1996. — V. 151. — P. 243—246.
  16. Jayaraman, V. Interaction of peanut root lectin (PRAII) with rhizobial lipopolysaccharides / V. Jayaraman, H.R. Das // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1998. — V. 1381. — N.1. — P. 7—11.
  17. Perez-Gimenez, J. Soybean lectin enhances biofilm formation by *Bradyrhizobium japonicum* in the absence of plants / J. Perez-Gimenez, E.J. Mongiardini, M.J. Althabegoiti, J.I. Quelas, S.L. Lopez-Garcia, A.R. Lodeiro // *Int. J. Microbiol.* — 2009. ID 719367 (<http://dx.doi.org/10.1155/2009/719367>).
  18. Verzhinina, Z.R. Artificial colonization of non-symbiotic plants roots with the use of lectins / Z.R. Verzhinina, An.K. Baymiev, D.K. Blagova, O.V. Chubukova, Al.K. Baymiev, A.V. Chemeris // *Symbiosis*. — 2012. — V. 56. — N.1 — P. 25—33.
  19. Благова Д.К. Создание новых ассоциативных симбиозов между томатом и ризобиями / Д.К. Благова, З.Р. Вершинина, А.М. Оркодашвили, Ал.Х. Баймиев // *Вестник БГАУ*. — 2013. — Т. 26. — №2. — С. 7—10.
  20. Вершинина З.Р. Искусственная ассоциативная симбиотическая система рапса с ризобиями для защиты от фитопатогенов / З.Р. Вершинина, Л.Р. Нигматуллина, Д.К. Благова, А.М. Оркодашвили, Ал.Х. Баймиев // *Изв. Самарского НЦ РАН*. — 2013. — Т.15. — №3(5). — С. 1579—1582.
  21. Лавина А.М. Создание ассоциативных симбиотических систем огурца с ризобиями / А.М. Лавина, Л.Р. Нигматуллина, З.Р. Вершинина, А.Х. Баймиев // *Бюлл. Оренбургского научного центра УРО РАН*. — 2014. — №3.
  22. Yamamoto, Y.T. Characterization of cis-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco / Y.T. Yamamoto, C.G. Taylor, G.N. Acedo, C.L. Cheng, M.A. Conkling // *Plant Cell*. — 1991. — V. 3. — P. 371—382.
  23. Chan, Y.L. Transgenic tomato plants expressing an Arabidopsis thionin (*Thi2.1*) driven by fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack / Y.L. Chan, V. Prasad, Sanjaya, S.K.H. Chen, P.C. Liu, M.-T. Chan, C.-P. Cheng // *Planta*. — 2005. — V. 221. — P. 386—393.
  24. Gatehouse, J.A. Sequence of the Seed Lectin from Pea (*Pisum sativum* L.) / J.A. Gatehouse, D. Bown, I.M. Evans, L.N. Gatehouse, D. Jobs, P. Preston, R.R.D. Croy // *Nucleic Acids Res.* — 1987. — V. 15. — P. 7642.
  25. Conkling, M.A., Yamamoto, Y.T. Root specific gene promoter // Patent No.: US 5459252, C 07 H 21/04; C 12 N 15/11; C 12 N 15/29; A 01 H 5/00. 1995.
  26. McCormick, S. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens* / S. McCormick, J. Niedermeyer, J. Fry, A. Barnason, R. Horsch, R. Fraley // *Plant Cell Rep.* — 1986. — V. 15. — N. 2. — P. 81—84.
  27. Murashige, T. A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant*. — 1962. — V. 15. — P. 473—497.
  28. Gamborg, O.L. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells / O.L. Gamborg, R.A. Miller, K. Ojima // *Exp. Cell Res.* — 1968. — V. 50. — P.151—158.
  29. Jefferson, R.A. Assaying chimeric genes in plants: The *gus* gene fusion system // *Plant. Mol. Biol. Rep.* — 1987. — V. 5. — P.387—405.
  30. Kosugi, S. An improved assay for  $\beta$ -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous  $\beta$ -glucuronidase activity // S. Kosugi, Y. Ohashif, K. Nakajima, Y. Arai // *Plant Sci.* — 1990. — V. 70. — P. 133—140.
  31. Diaz, C.L. Correlation between infection by *Rhizobium leguminosarum* and lectin on the surface of *Pisum sativum* L. roots / C.L. Diaz, P.C. Van Spronsen, R. Bakhuizen, G.J.J. Logman, B.J.J. Lugtenberg, J.W. Kijne // *Planta*. — 1986. — V. 168. — P. 350—358.
  32. 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.
  33. Баймиев Ал.Х. Получение флуоресцентно меченых штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для их детекции *in vivo* и *in vitro* / Ал.Х. Баймиев, Р.С. Ямиданов, Р.Т. Матниязов, Д.К. Благова, Ал.Х. Баймиев, А.В. Чемерис // *Мол. биол.* — 2011. — Т. 45. — № 6. — С. 984—991.

34. Серенко Е.К. Получение трансгенных растений томата с геном Fe-зависимой супероксиддисмутазы / Е.К. Серенко, В.Н. Овчинникова, Л.В. Куренина, Е.Н. Баранова, А.А. Гулевич, А.Н. Майсуриян, П.Н. Харченко // Докл. РАСХН. — 2009. — № 4. — С. 12—14.
35. Халилуев М.Р. Разработка системы регенерации и изучение трансформационного потенциала томата промышленного сорта / М.Р. Халилуев, П.Н. Харченко, С.В. Долгов // Докл. РАСХН. — 2010. — № 3. — С. 22—26.
36. Carlson, R.W. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin / R.W. Carlson, J.W. Kijne, G.E. Lamers, M.C. Laus, T.J. Logman, A.A.N. Van Brussel // Mol. Microbiol. — 2006. — V. 59. — P. 1704—1713.
37. Rodriguez-Navarro, D.N. Attachment of bacteria to the roots of higher plants / D.N. Rodriguez-Navarro, M.S. Dardanelli, J.E. Ruiz-Sainz // FEMS Microbiol Lett. — 2007. — V. 272. — P. 127—136.
38. Perveen, S. Biological control of soilborne root infecting fungi in tomato and okra / S. Perveen, S. Ehteshamul-Haque, A. Ghaffar // Pak. J. Bot. — 1994. — V. 26. — N.1. — P. 181—186.
39. Parveen, G. Suppression of root pathogens of tomato by rhizobia, *Pseudomonas aeruginosa* and mineral fertilizers / G. Parveen, S. Ehteshamul-Haque, V. Sultana, J. Ara, M. Athar // Int. J. Vegetable Sci. — 2008. — V. 14. — P. 205—215.

Z.R. VERSHININA\*, D.K. BLAGOVA,  
L.R. NIGMATULLINA, A.M. LAVINA,  
A.Kh. BAYMIEV, and A.V. CHERMERIS

The Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russ. Acad. Sci., 450054, Ufa Russia

e-mail: zyliaver@mail.ru

### Associative Symbiosis between Rhizobia and Transgenic Tomatoes Increases Plant Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

It has been shown that a tomato cultivar Gruntovy Gribovsky 1180 transformed with pea lectin gene (*psl*) has been shown to form a stable associative symbiosis with a *Rhizobium leguminosarum* bacteria that have fungistatic activity. This provides the protection of the plant root system from the phytopathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. The survival of the plants transgenic for the *psl* gene and incubated with rhizobia made up 81.5% after the fungal contamination. The analogous value for the nontransgenic plants was equal to 47.6%.

*Key words:* fungistatic activity, pea lectin, rhizobia, transgenic tomato.

---

\* Author for correspondence.