

УДК 579.262: 579.64:631.46

## БИОИНЖЕНЕРИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ: СОЗДАНИЕ НОВЫХ АССОЦИАТИВНЫХ СИМБИОЗОВ С ПОМОЩЬЮ ЛЕКТИНОВ НА ПРИМЕРЕ ТАБАКА И РАПСА

© 2011 г. З. Р. Вершинина, Ан. Х. Баймиев, Д. К. Благова, А. В. Князев,  
Ал. Х. Баймиев, А. В. Чемерис

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, 450054  
e-mail: zilyaver@mail.ru

Поступила в редакцию 18.04.2010 г.

С помощью дикого штамма *Agrobacterium rhizogenes* 15834, трансформированного плазмидой pSAMBA 1305.1, содержащей полноразмерный ген лектина гороха посевного *psl*, получены трансгенные по гену лектина “бородатые корни” на табаке и рапсе. Исследовано влияние экспрессии гена лектина на колонизацию трансгенных корней симбионтом гороха посевного *Rhizobium leguminosarum*. Численность адгезированных бактерий на трансформированных геном лектина корнях оказалась выше в  $\approx 14$  (табак) и  $\approx 37$  (рапс) раз, по сравнению с контролем, что доказывает взаимодействие *R. leguminosarum* с лектином гороха на поверхности трансформированных корней табака и рапса. Разработанный экспериментальный подход, основанный на симуляции процессов узнавания и ранних симбиотических взаимодействий с помощью лектинов бобовых растений, в перспективе может быть использован для получения стабильных ассоциаций экономически ценных несимбиотрофных видов растений с ризобиями.

К ассоциативным симбиозам относят многочисленные взаимодействия растений с разнообразными колонизирующими корень диазотрофами, например с бактериями родов *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Klebsiella*, некоторыми штаммами *Clostridium* и цианобактериями родов *Anabaena*, *Calothrix*, *Gloeothechia*, *Nostoc*, фотосинтезирующими бактериями родов *Chromatium*, *Rhodospirillum*, археями *Methanococcus* [1, 2]. Эффективность азотфиксации в подобных системах по сравнению с клубеньковыми симбиозами незначительна, однако ассоциативные азотфиксаторы помогают растению в его росте и развитии путем синтеза фитогормонов, улучшения минерального питания, защиты от фитопатогенов и разрушения токсических веществ [3].

Ризосфера, в отличие от азотфиксирующих клубеньков, не является структурно ограниченной симбиотической нишей и специфичность ее колонизации почвенными микробами относительно невелика. Однако состав ризосферной микрофлоры можно сделать гораздо более контролируемым путем придания растению способности синтезировать специфические вещества, распознаваемые определенными микросимбионтами. Использование подобной стратегии дает ключ к конструированию “искусственной ризосферы”, специфически колонизируемой только теми микробами, которые выполняют полезные для растений трофические, ростостимулирующие или защитные функции [4].

Лектины – белки, способные узнавать и избирательно связывать разнообразные углеводы. Как показали исследования последних лет, функции лектинов у растений чрезвычайно многообразны. Эти белки участвуют в межклеточных взаимодействиях, регулируют взаимоотношения с бактериями-симбионтами, защищают растения от патогенных бактерий и грибов и от растительноядных животных, участвуют в транспорте гормонов, белков и РНК, а также влияют на деление, рост и дифференцировку клеток. Накопленные за последние десятилетия данные свидетельствуют о том, что, по крайней мере, лектины злаковых и бобовых растений могут связываться с бактериями-симбионтами, в том числе и с ассоциативными, вызывая у них перестройки, значимые для формирования и функционирования симбиоза [5]. Таким образом, модификация процессов узнавания и ранних симбиотических взаимодействий с помощью лектинов – это интересный экспериментальный подход для получения новых симбиозов растений с азотфиксирующими микроорганизмами.

Вирулентные штаммы *Agrobacterium rhizogenes*, содержащие Ri-плазмиды, способны трансформировать клетки многих двудольных растений с образованием “бородатых корней”. Растения, которые регенерируют из такой трансформированной ткани, часто морфологически изменены из-за встраивания в геном растения дополнительного локуса *rol*. Это значительно ограничивает возможности коммерческого использования подобных растений [6].

Однако трансгенные “бородатые корни” — это замечательная модель для проведения различного рода экспериментов, в том числе и по созданию искусственных симбиотических систем [7–10]. В ряде работ показано, что “бородатые корни” способны к нормальному клубенькообразованию с различными микросимбионтами [11, 12].

Табак (*Nicotiana tabacum*) и рапс (*Brassica napus* L. var. *napus*) входят в число несимбиотрофных видов растений, которые не вступают в симбиоз ни с ризобиями, ни с актиномицетами [13], поэтому большой интерес вызывает создание искусственных ассоциативных симбиозов этих растений с клубеньковыми бактериями. Отметим, что табак — прекрасное модельное растение для генетических манипуляций, а рапс является одной из наиболее ценных и перспективных сельскохозяйственных культур.

На сегодняшний день существуют несколько работ по созданию ассоциаций каллусной ткани табака с различными азотфиксирующими микросимбионтами, в частности с ризобиями [14] и цианобактериями [15]. Также на корнях табака были получены азотфиксирующие псевдоклубеньки при использовании ассоциативных комплексов микроорганизмов, выделенных из природных синцианозов саговниковых растений и папоротников рода *Azolla* [16].

подавляющее большинство работ по ассоциативным микросимбионтам рапса посвящены улучшению минерального питания растений. *Delftia acidovorans* и *Achromobacter piechaudii* ускоряют рост растений и повышают урожайность, так как активно участвуют в метаболизме соединений серы [17]. Представители родов *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Bacillus* и *Azotobacter* могут выступать в качестве ассоциативных азотфиксирующих партнеров [18].

Клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, фиксирующие азот в симбиозе с бобовыми растениями, могут выступать в качестве ассоциативных микросимбионтов для многих экономически ценных небобовых культур, таких, как рис, кукуруза, пшеница, рапс, подсолнечник и т.д. Эти бактерии способны колонизировать корневую систему и повышать урожайность растений, выделяя ростостимулирующие вещества и защищая от фитопатогенов. Как показали исследования последних лет, ризобии принимают активное участие в усвоении растениями труднорастворимых соединений фосфора и даже, проникая в надземную часть растения, могут усиливать процесс фотосинтеза [19–27]. Поэтому получение искусственных симбиотических ассоциаций этих бактерий является одним из наиболее перспективных направлений на пути создания экологически ориентированного сельского хозяйства.

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 природный микросимбионт гороха посевного *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

Цель работы — получение трансгенных по гену лектина гороха посевного (*psl*) “бородатых корней” на табаке и рапсе и анализ колонизации трансгенных корней симбионтом гороха посевного *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

## МЕТОДИКА

**Вектор для трансформации растений и бактериальные штаммы.** В экспериментах был использован бинарный вектор pCAMBIA1305.1, любезно предоставленный фирмой “Cambia” (Австралия) [<http://www.cambia.org.au>]. Данный вектор, способный реплицироваться в клетках и *E. coli* и *Agrobacterium* sp., содержит в области T-ДНК репортерный ген *gus* с каталазным интроном, ответственный за расщепление β-D-глюкуронидов, и селективный ген *hptII* гигромицинофосфотрансферазы, придающей устойчивость к гигромицину. Для анализа симбиотических реакций в T-ДНК вектора был клонирован ген лектина гороха посевного *psl* [28] под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (рис. 1). Генетическая конструкция pCAMBIA1305.1-*psl* была перенесена методом электропорации в штамм *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, полученный из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (Санкт-Петербург).

Для экспериментов по получению “бородатых корней” использовали 2 сут культуры *A. rhizogenes* (pCAMBIA1305.1-*psl*) и *A. rhizogenes* (исходный), выращенные при 28°C на качалке (150 об/мин) в жидкой среде TY (состав %): дрожжевой экстракт — 0.1, бакто-триптон — 1, CaCl<sub>2</sub> — 0.1), с добавлением 100 мг/л канамицина и 200 мкМ ацетосиригона в первом случае, и только ацетосиригона во втором [29].

Перед инокуляцией культуры агробактерий центрифугировали (2054 g, 10 мин) и ресуспендировали в жидкой среде Min A [30]. Плотность суспензии агробактерий была доведена до 10<sup>8</sup> КОЕ/мл с использованием спектрофотометра СФ-46 (Россия).

**Получение “бородатых корней” на листовых пластинках табака.** Для получения “бородатых корней” были использованы растения *Nicotiana tabacum* сорта SR-1 2 мес возраста. Срезались листья табака от здорового растения, росшего в стандартных условиях полива, температуры и освещения [31]. Листья промывали 70%-ным этанолом, затем стерилизовали с дальнейшей 5-кратной промывкой стерильной дистиллированной водой. После этих процедур листья переносили в стерильные чашки Петри, отрезали побелевшие края и

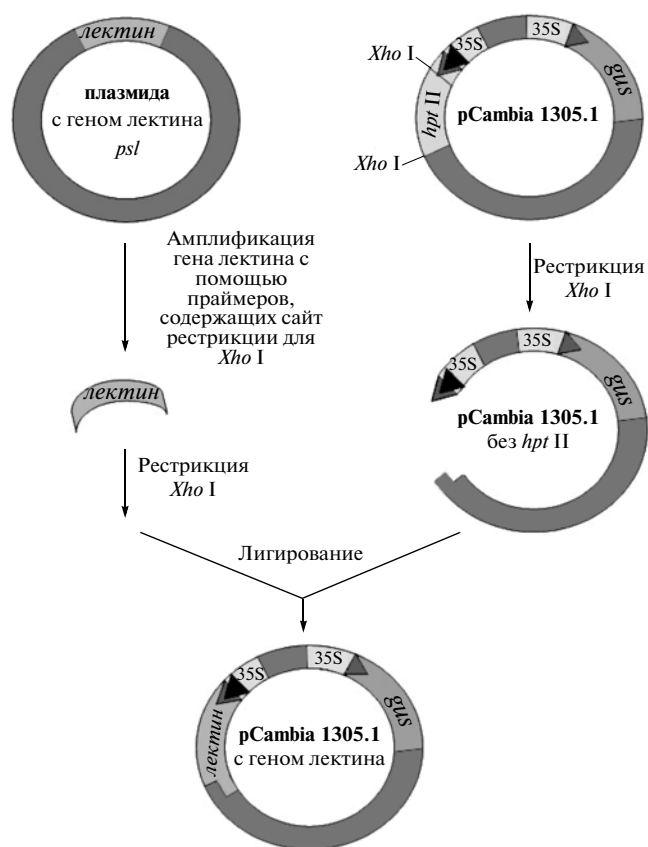


Рис. 1. Схема клонирования гена лектина *psl* семян гороха в составе вектора *pCambia 1305.1*.

стерильным скальпелем нарезали на экспланты размером примерно 0.5 см<sup>2</sup>. Далее экспланты выдерживали в течение 15 мин в суспензии агробактерий и переносили в чашки Петри, содержащие по 20–25 мл агаризованной среды MS [32]. Часть эксплантов оставляли в качестве контроля и переносили в чашки Петри без инокуляции агробактериями. После 4 сут совместного культивирования производилась отмывка эксплантов от агробактерий и их помещение на среду MS с добавлением аугментина и цефотаксима (по 250 мг/л). В дальнейшем тщательно следили за чашками, во избежание их зарастания агробактериями и при необходимости экспланты промывали антибиотиком.

После достижения “бородатыми корнями” длины 3–4 см проводили их гистохимический анализ на *gus*-активность и ПЦР-анализ ДНК на наличие гена лектина. В качестве контрольных “бородатых корней” выступали корни, полученные с помощью исходного штамма *A. rhizogenes*.

**Получение композитных растений рапса.** Поверхность семян рапса сорта Hanna стерилизовали в течение 1 мин в 70%-ном спирте и затем 20 мин в 5%-ном растворе гипохлорита натрия с добавлением нескольких капель Твин-20. После 5-кратной промывки стерильной водой семена проращи-

вали на среде, содержащей половину дозы солей среды MS, 10% сахарозы, 8 г/л агарозы (рН 5.7), в течение 1 сут при 8°C в темноте, а затем в течение 4–5 сут при 25°C и 16-часовом световом дне в климатической камере KBW 240 (“Binder”, Германия).

Недельные проростки растений длиной 1–2 см инокулировали суспензией *A. rhizogenes* с помощью инсулинового шприца, делая укол в зоне гипокотыля. Для повышения эффективности инокуляции растения содержали в условиях высокой влажности. Для получения контрольных “бородатых корней” растения были инокулированы исходным штаммом *A. rhizogenes* (без *pCAMBIA1305.1-psl*).

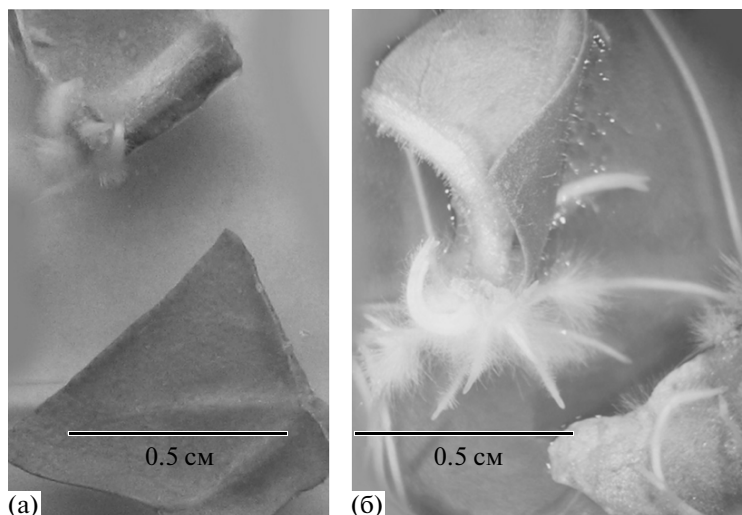
После достижения “бородатыми корнями” длины 3–4 см проводили их гистохимический анализ на *gus*-активность и ПЦР-анализ ДНК на наличие гена лектина. У проростков с положительным результатом в обоих случаях отрезали настоящий корень и растения сажали “бородатыми корнями” в стакан со стерильным вермикулитом, насыщенным 1%-ной стерильной средой Хогланда–Арнона [33]. Таким образом, мы получили композитные растения, состоящие из трансгенного корня и нетрансгенной надземной части. В качестве контрольных композитных растений выступали проростки с “бородатыми корнями”, полученными с помощью исходного штамма *A. rhizogenes*.

**Анализ β-глюкуронидазной (*gus*) активности.** Гистохимический *gus*-анализ проводили по методу, описанному Джефферсоном [34] с небольшими модификациями Касуги [35]. Кусочки “бородатых корней” инкубировали в реактиве X-Gluc (состав: 1 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-глюкуронид, 0.5% тритон X-100, 100 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 20% метанола, 0.5 мМ K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.5 мМ K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> и 50 мМ натриевый фосфатный буфер с рН 7.0). Корни инкубировали при 37°C в течение ночи, выдерживали в 50%-ном растворе глицерина в воде и микроскопировали.

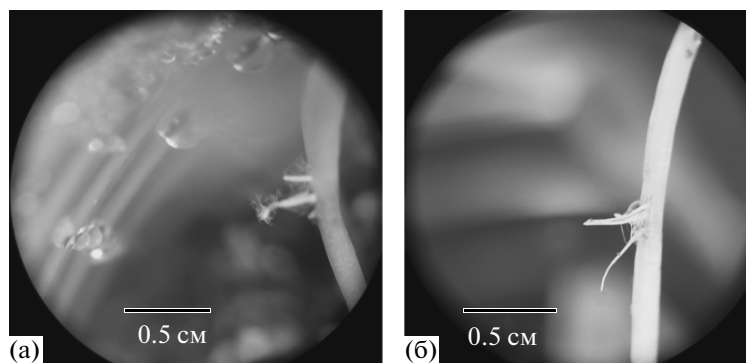
**ПЦР-анализ ДНК и РНК из “бородатых корней”.** ДНК выделяли фенольно-хлороформным методом. Выделение тотальной РНК и проведение ревертазной реакции осуществляли с использованием наборов TRizol Reagents (“Invitrogen”, США) и GenePak RT Core НПФ (“Галарт-Диагностикум”, Россия).

Наличие гена лектина *psl* в препаратах ДНК и кДНК проверяли с помощью ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих участок гена лектина [28] и стандартных наборов в амплификаторе Терцик МС2 (“ДНК-технология”, Россия) при оптимальной для каждой пары праймеров температуре отжига.

**Обработка “бородатых корней” микросимбионтом *R. leguminosarum* и подсчет количества адсорбированных на поверхности корней ризобий.** Для инокуляции “бородатых корней” использовали ри-



**Рис. 2.** Развитие “бородатых корней” на листовых пластинках табака: через 1 нед после инокуляции (а), через 2 нед после инокуляции (б).



**Рис. 3.** Развитие “бородатых корней” на рапсе: через 2 нед после инокуляции (а), через 3 нед после инокуляции (б).

зобии *R. leguminosarum* bv. *viceae*, выделенные из клубеньков гороха посевного. Видовую принадлежность бактерий определяли секвенированием генов 16S рРНК. Для облегчения скрининга клубеньковые бактерии предварительно трансформировали плазмидой pSAMВIA1304 (несущей в области Т-ДНК ген *gus*, способный экспрессироваться в бактериальных клетках), что позволяло легко идентифицировать их по синему окрашиванию колоний, выросших на среде с X-Gluc. Бактерии наращивали при 28°C в течение 2 сут в жидкой среде ТУ до концентрации 10<sup>8</sup> КОЕ/мл.

Колонизацию *R. leguminosarum* на поверхности корней оценивали следующим образом. “Бородатые корни” опытных, с геном лектина гороха, и контрольных эксплантов/композитных растений разрезали на сегменты длиной 1 см, и по 100 мг корней вносили в пробирки диаметром 20 мм, длиной 10 см, содержащие по 3 мл суспензии бактерий. Пробирки помещали на качалку (130 об/мин) при комнатной температуре (19–

21°C). После инкубации с бактериями в течение 1 ч корни трижды отмывали стерильной средой ТУ в течение 5 с на микрошейкере, гомогенизировали в ступке и доводили объем стерильной средой ТУ до 10 мл. После этого 0.1 мл суспензии из последовательных десятикратных разведений рассеивали на чашки Петри с твердой средой ТУ и выращивали в термостате при 28°C в течение 2 сут. Количество адгезированных жизнеспособных клеток определяли по числу выросших колоний *R. leguminosarum*, которые идентифицировали по β-глюкуронидазной активности.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через 1 нед после инокуляции у 100% листовых эксплантов табака по краям начинали появляться “бородатые корни” (рис. 2). На контрольных эксплантах (неинокулированные) появления корней не наблюдалось. Практически 50% всех “бородатых корней”, полученных с помощью

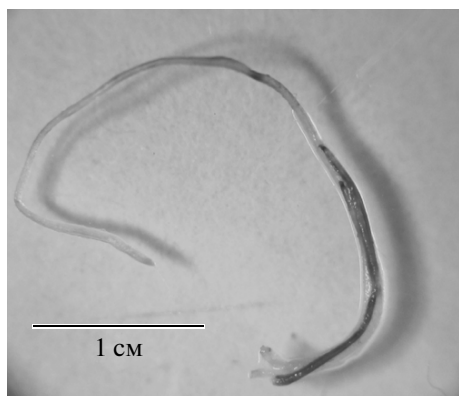


Рис. 4. Gus-анализ “бородатых корней”.

штамма *A. rhizogenes*, несущего конструкцию pSAMBA1305.1-*psl*, оказались одновременно трансформированными и *gus*, и *psl*, что подтвердили *gus*-анализ и ПЦР на наличие и конститутивную экспрессию на уровне мРНК гена лектина. В качестве контроля были использованы “бородатые корни”, полученные с помощью исходного штамма *A. rhizogenes*. Гистохимический и ПЦР анализы в этом случае дали отрицательный результат.

В случае рапса у 25% проростков “бородатые корни” появлялись в течение 2 нед после введения суспензии агробактерий в гипокотиль (рис. 3). На растениях, проколотых инсулиновым шприцом со стерильной средой ТУ, появления корней не наблюдали. Трансгенная природа корней была подтверждена активностью *gus*-гена у 40% проростков, “бородатые корни” которых были получены с помощью штамма *A. rhizogenes*, трансформированного pSAMBA1305.1-*psl* (рис. 4). ПЦР-анализ этих корней показал присутствие гена лектина и на уровне мРНК его конститутивную экспрессию (рис. 5). В качестве контроля были использованы “бородатые корни”, полученные с помощью исходного штамма *A. rhizogenes*. ПЦР- и *gus*-анализы в этом случае дали отрицательный результат. Полученные данные согласуются с результатами других авторов, где на летних культурах рапса Drakkar, Janetzki, Duplo, Andor и Topas были получены “бородатые корни” с помощью этого же агропинового штамма *A. rhizogenes* ATCC 15834 на 22% растений [36].

Котрансформированные геном лектина гороха и контрольные (без этого гена) “бородатые корни” композитных растений рапса и эксплантов табака были обработаны микросимбионтом гороха посевного *R. leguminosarum* (рис. 6). Подсчет количества адсорбированных на поверхности корней ризобий показал более чем на порядок увеличение численности бактерий на трансформированных геном *psl* корнях (в среднем  $\approx 14$  раз у табака и  $\approx 37$  раз у рапса), по сравнению с контрольными

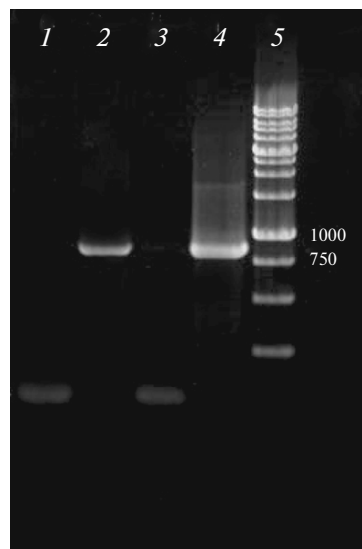


Рис. 5. Электрофореграмма ОТ-ПЦР-анализа экспрессии гена лектина в “бородатых корнях”: 1 – контроль на наличие ДНК в препарате мРНК, 2 – “бородатые корни”, в которых идет экспрессия гена лектина, 3 – отрицательный контроль без генетического материала, 4 – продукт ПЦР на наличие гена лектина в “бородатых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

“бородатыми корнями” (количества адгезированных бактерий представлены в таблице). При этом был обнаружен достаточно большой разброс результатов в опытах с трансгенными корнями. Возможно, данный факт объясняется разным уровнем экспрессии гена лектина гороха в “бородатых корнях” (эффект положения гена является характерным недостатком трансгенов, введенных с помощью агробактериальной трансформации).

Известно, что адсорбция ризобий на корневых волосках происходит за счет двойного специфич-

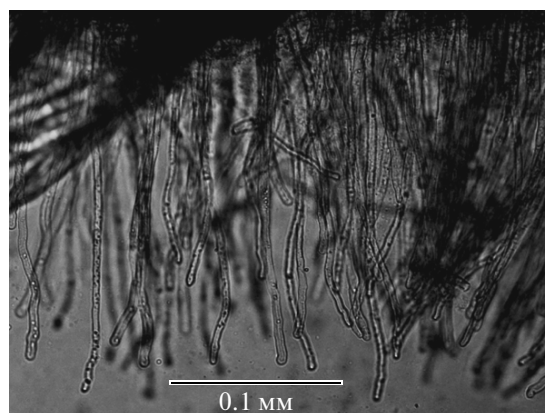


Рис. 6. Корневые волоски на “бородатых корнях”, обработанных *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

Количество адгезированных на поверхности “бородатых корней” ризобий

“Бородатые корни”	Бактерии	Количество бактерий, адгезированных на корешках, кл./г × 10 <sup>7</sup>		Повторность
		табак	рапс	
Контрольные (без <i>psl</i> )	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	2.01–2.25	3.76–3.81	10
Опытные ( <i>psl</i> )		22.6–38.2	105–175	

ного связывания лектина и с бактериями, и с растительными клетками. По всей видимости, лектин индуцирует у ризобий синтез ряда факторов, которые могут специфично агглютинировать бактерии с корнями растений. Таким образом, на первом этапе бобово-ризобияльного симбиоза бактерии колонизируют ризоплану растения-хозяина, в результате которой их численность в прикорневой зоне возрастает на 3–4 порядка за счет взаимодействия их поверхностных липополисахаридов с растительными лектинами [7, 37, 38]. Разработанный нами подход к созданию искусственных корневых ассоциаций, основанный на использовании лектинов в качестве трансгенов, позволил более чем на порядок увеличить количество ризобий, колонизирующих трансформированные корни таких несимбиотрофных растений, как табак и рапс.

Хотя в природе табак не вступает в симбиоз с ризобиями, ранее были попытки получить искусственные ассоциации этих бактерий с каллусной тканью табака. Была показана даже некоторая нитрогеназная активность подобных систем [14]. В случае рапса при обработке целлюлазой и пектолиазой корневых волосков в присутствии ризобий происходило образование клубеньков, морфологически и структурно подобных клубенькам бобовых и обладающих незначительной нитрогеназной активностью [39]. Следовательно, если обеспечить специфическое взаимодействие ризобий с трансгенными по гену лектина корневыми волосками табака и рапса, то вполне возможно добиться, если не получения настоящих клубеньков, то хотя бы полноценных ассоциативных отношений между этими растениями и ризобиями.

Создание искусственных азотфиксирующих ассоциаций культурных растений с эндофитными микроорганизмами, которые выделены из природных симбиозов, является относительно новым направлением в биоинженерии симбиотических систем. На сегодняшний день уже выделены штаммы *Rhizobium*, которые успешно колонизируют в природе корни небобовых растений. Например, показано, что наиболее перспективными штаммами для создания азотфиксирующих ассоциаций риса являются ризобии клевера *R. leguminosarum* bv. *trifolii* R4, так как эти бактерии способны колонизировать корни и заселять межклетники, способствуя увеличению урожая [23–25]. В

случае кукурузы и латука в качестве подобного штамма можно использовать ризобии фасоли *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* P31 и R1, которые успешно колонизируют корни этих растений в почве [21, 22]. Использование лектинов бобовых растений в качестве трансгенов может стать следующим шагом к получению стабильных ассоциаций экономически ценных несимбиотрофных видов растений с ризобиями.

Данная работа проводилась при финансовой поддержке ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы” (госконтракт 02.518.11.7138), программы “Государственная поддержка молодых российских ученых и ведущих научных школ России” (гранты МД-43.2008.4 и НШ-649.2008.4) и гранта по инновационным исследованиям “У.М.Н.И.К.” З.Р. Вершининой (ГР 001200850086).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yemtsev V.T.* // Eurasian Soil Sci. 1994. V. 26. № 9. P. 42–57.
2. *Vallad G.E., Goodman R.M.* // Crop Sci. Soc. Amer. 2004. V. 44. № 6. P. 1920–1934.
3. *Игнатов В.В.* // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 9. С. 28–33.
4. *Тихонович И.А., Проворов Н.А.* // Вестник ВОГиС. 2005. Т. 9. № 3. С. 295–305.
5. *Шакирова Ф.М., Безрукова М.В.* // Журн. общ. биологии. 2007. Т. 68. № 2. С. 109–125.
6. *Радчук В.В., Блюм Я.Б.* // Цитология и генетика. 2005. № 3. С. 13–29.
7. *Diaz C.L., Melchers L.S., Hooykaas P.J.J., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W.* // Nature. 1989. V. 338. № 6216. P. 579–581.
8. *Pheler M., Petit M., Martin L., Duhoux E., Tempe J.* // Lam. Biotechnol. 1991. V. 9. № 5. P. 461–466.
9. *Diouf D., Gherbi H., Prin Y., Franche C., Duhoux E., Bogusz D.* // Mol. Plant Microbe Interact. 1995. V. 8. № 4. P. 532–537.
10. *Akasaka Y., Mii M., Daimon H.* // Ann. Bot. 1998. V. 81. № 2. P. 355–362.
11. *Hirsch A.M., Brill L.M., Lim P.O., Scambray J., Van Rhijn P.* // Symbiosis. 1995. V. 19. № 2–3. P. 155–173.
12. *Diaz C.L., Spaink H.P., Kijne J.W.* // Mol. Plant Microbe Interact. 2000. V. 13. № 3. P. 268–276.

13. *Diouf D., Diop T.A., Ndoye I.* // Afr. J. Biotechnol. 2003. V. 2. № 1. P. 1–7.
14. *Gibson A.H., Child J.J., Pagan J.D., Scowcroft W.R.* // Planta. 1976. V. 128. № 3. P. 233–242.
15. *Баулина О.И., Агафодорова М.Н., Корженевская Т.Г., Гусев М.В., Бутенко Р.Г.* // Микробиология. 1984. Т. 53. № 6. С. 997–1002.
16. *Горелова О.А., Лобакова Е.С., Корженевская Т.Г.* // Вестн. МГУ. Сер. 16. Биология. 2004. № 3. С. 39–44.
17. *Banerjee M., Yesmin L.* US Patent. 2002. № 07491535.
18. *Ковальская Н.Ю., Лобакова Е.С., Умаров М.М.* // Микробиология. 2001. Т. 50. № 5. С. 701–708.
19. *Chao W.L.* // Lett. Appl. Microbiol. 1990. V. 10. № 5. P. 213–215.
20. *Hoflich G., Wiehe W., Buchholz C.H.* // Microbiol. Res. 1995. V. 150. № 2. P. 139–147.
21. *Chabot R.H., Antoun H., Kloepper J., Beauchamp C.* // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 8. P. 2767–2772.
22. *Gutierrez-Zamora M.L., Martinez-Romero E.* // J. Biotechnol. 2001. V. 91. № 2–3. P. 117–126.
23. *Chi F., Shen S.H., Cheng H.P., Jing Y.X., Yanni Y.G., Dazzo F.B.* // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 11. P. 7271–7278.
24. *Perrine-Walker F.M., Prayitno J., Rolfe B.G., Weinman J.J., Hocart C.H.* // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. № 12. P. 3343–3350.
25. *Biswas J.C., Ladha J.K., Dazzo F.B., Yanni Y.G., Rolfe B.G.* // Agron. J. 2000. V. 92. № 5. P. 880–886.
26. *Тильба В.А., Бегун С.А., Якименко М.В.* // Вестн. РАСХН. 2004. № 5. С. 28–30.
27. *Черемных А.В., Егоров С.Ю., Куприянова-Ашина Ф.Г.* // Казан. гос. ун-т. Ученые зап. Серия: Естеств. науки. 2007. Т. 149. С. 94–104.
28. *Gatehouse J.A., Bown D., Evans I.M., Gatehouse L.N., Jobs D., Preston P., Croy R.R.D.* // Nucleic Acids Res. 1987. V. 15. № 18. P. 7642.
29. *Henzi M.X., Christey M.C., McNeil D.L.* // Plant Cell Rep. 2000. V. 19. № 10. P. 994–999.
30. *Miller J.H.* Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab., 1972. 432 p.
31. *Horsch R.B., Fry J.E., Hoffman N.L., Eichholtz D., Rogers S.C., Fraley R.T.* // Science. 1985. V. 227. № 4691. P. 1229–1231.
32. *Murashige T., Skoog F.* // Physiol. Plant. 1962. V. 15. № 3. P. 473–497.
33. *Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М.* Краткий справочник по физиологии растений. Киев: Наукова думка, 1973. 591 с.
34. *Jefferson R.A.* // Plant Mol. Biol. Rep. 1987. V. 5. № 1. P. 387–405.
35. *Kosugi S., Ohashi Y., Nakajima K., Arai Y.* // Plant Sci. 1990. V. 70. № 4. P. 133–140.
36. *Menze A., Mollers C.* // Proc. 10th Int. Rapeseed Congress. Canberra, Australia, 1999. P. 15–20.
37. *Dazzo F.B., Truchet G.L.* // J. Membr. Biol. 1983. V. 73. № 3. P. 4–11.
38. *Kijne J.W., Diaz C.L., Pater S.* // Adv. Lectin Res. / Eds. H. Franz, E. van Driessche, K.J. Kasai. Berlin: Ullstein Mosby, 1992. P. 15–50.
39. *Cocking E.C., Davey M.R.* // Chem. Industry. 1991. V. 22. № 6. P. 831–835.

## Bioengineering of Symbiotic Systems: Creation of New Associative Symbiosis with the Use of Lectins on the Example of Tobacco and Colza

**Z. R. Vershinina, An. Kh. Baimiev, D. K. Blagova, A. V. Knyazev,  
Al. Kh. Baimiev, and A. V. Chemeris**

*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences,*

*pr. Octyabrya 71, Ufa, 450054 Russia*

*e-mail: zilyaver@mail.ru*

Received April 18, 2010

**Abstract**—“Barbate roots” in tobacco and colza transgenic on lectin gene were obtained with the use of a wild strain of *Agrobacterium rhizogenes* 15834 transformed with pCAMBIA1305.1 plasmid containing the full-size lectin gene (*psl*) from the *Pisum sativum*. Influence of expression of lectin gene on colonization of transgenic roots with symbiont of pea (*Rhizobium leguminosarum*) was investigated. The number of adhered bacteria onto the roots transformed with lectin gene was 14-fold and 37-fold higher in comparison with the control; this confirms the interaction of *R. leguminosarum* with pea lectin at the surface of the transformed roots of tobacco and colza. The developed experimental approach, based on the simulation of recognition processes and early symbiotic interactions with lectins of pea plants, may, in perspective, be used for obtaining stable associations of economically valuable, nonsymbiotic plant species with rhizobia.