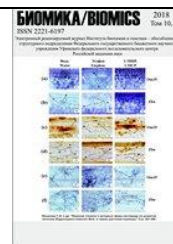




БИОМИКА/BIOMICS

ISSN 2221-6197 <http://biomics.ru>



**ЛЕКТИН КОЗЛЯТНИКА ВОСТОЧНОГО КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ СОЗДАНИЯ
АССОЦИАЦИЙ МЕЖДУ КУЛЬТУРНЫМИ РАСТЕНИЯМИ И ПОЛЕЗНЫМИ БАКТЕРИЯМИ**

*Чубукова О.В., Баймиев Ан.Х., Вершинина З. Р., Князев А.В., Баймиев Ал.Х.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра РАН
450054, г. Уфа, пр. Октября, 71. *E-mail: chubukova@bk.ru

Резюме

Получены трансгенные растения табака, экспрессирующие ген *GORL* лектина козлятника восточного *Galega orientalis* под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты. Исследование адгезии на корнях данных растений флуоресцентно меченых бактерий *Rhizobium galegae* (микросимбионтов козлятника восточного) показало, что на корнях табаков, трансгенных по гену лектина *GORL* сорбировалось в 4 раза больше бактерий *R. galegae*, по сравнению с контрольными нетрансгенными растениями. Полученные результаты свидетельствуют об участии лектина *GORL* в прикреплении бактерий к поверхности корней трансгенных растений, однако, данное взаимодействие носит малоспецифичный характер. Тем не менее, подобная стратегия, основанная на использовании лектинов бобовых растений в качестве трансгенов для инициации процессов узнавания, может быть использована в дальнейшем для получения новых ассоциативных систем экономически ценных несимбиотрофных видов растений и бактерий, обладающих различными полезными свойствами.

Ключевые слова: козлятник восточный, *Galega orientalis*, лектин, трансгенные растения, табак, колонизация корней, ризобии, бобово-ризобиальный симбиоз

Цитирование: Чубукова О.В., Баймиев Ан.Х., Вершинина З. Р., Князев А.В., Баймиев Ал.Х. Лектин козлятника восточного как инструмент для создания ассоциаций между культурными растениями и полезными бактериями. *Биомика*. 2018. Т. 10(4). С. 400-409. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-51

**LECTIN OF GALEGA ORIENTALIS AS THE TOOL FOR CREATION OF
ASSOCIATIONS BETWEEN CULTURAL PLANTS AND USEFUL BACTERIA**

*Chubukova O.V., Baymiev An.K., Vershinina Z.R., Knyazev A.V., Baymiev Al.K.

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Russia, Ufa, 450054, 71 Prospect Oktyabrya, *E-mail: chubukova@bk.ru

Resume

Transgenic tobacco plants expressing gene *GORL* of east goat's-rue *Galega orientalis* lectin under control of the cauliflower mosaic virus 35S promotor were obtained. Research of adhesion on roots of these plants fluorescently labeled bacteria *Rhizobium galegae* (goat's-rue microsymbiont) showed that on transgenic tobacco roots with lectin gene *GORL* were absorbed in 4 times more bacteria *R. galegae* in comparison with control non-transgenic plants. The received results testify to participation of the *GORL* lectin in attachment of bacteria to a surface of transgenic plant roots, however, this interaction has low-specific character. Nevertheless, the similar strategy based on use of legume plants lectin as transgenes for

initiation of recognition processes can be used further for receiving new associative systems economically valuable the non-symbiotic plants and bacteria species possessing various useful properties.

Keywords: goat's-rue, *Galega orientalis*, lectin, transgenic plants, tobacco, root colonization, rhizobia, legume-rhizobial symbiosis

Citation: Chubukova O.V., Baymiev An.K., Vershinina Z.R., Knyazev A.V., Baymiev Al.K. Lectin of *Galega orientalis* as the tool for creation of associations between cultural plants and useful bacteria. *Biomics*. 2018. V.10(4). P. 400-409. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-51 (In Russian)

Введение

Клубеньковые бактерии (ризобии) - почвенные грамотрицательные микроорганизмы, способные вступать в высокоэффективный азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями. Молекулярный азот, получаемый в ходе микробиологической азотфиксации, является альтернативой дорогостоящим и экологически небезопасным азотным удобрениям. Поэтому последние десятилетия активно ведутся исследования, конечной целью которых является получение стабильных искусственных азотфиксирующих комплексов между несимбиотрофными растениями и ризобиями.

В попытке создания несимбиотрофных растений, способных вступать в азотфиксирующий симбиоз с ризобиями, различными авторами получены трансгенные растения, содержащие гены, продукты которых необходимы на ранних этапах развития бобово-ризобияльных отношений - кальций и кальмодулин-зависимой протеинкиназы CcCaMK, изофлавоносинтазы, LysM рецепторных киназ [Sreevidya et al., 2006; Radutoiu et al., 2007; Li et al., 2011]. Некоторое время назад выполнена большая работа, в которой в несимбиотрофные растения переносили сразу семь генов сигнального каскада, запускаемого специфической рецепцией Nod-факторов, и инициирующего процесс образования клубеньков [Untergasser et al., 2012].

Другим подходом к созданию искусственных симбиозов является получение трансгенных растений, синтезирующих вещества, способствующие прикреплению к корням растений ризосферных бактерий с полезными свойствами. Одними из таких веществ, активно используемых для получения искусственных растительно-микробных симбиозов, являются лектины - белки, способные специфично и обратимо связывать углеводы. Предполагается, что функции растительных лектинов чрезвычайно разнообразны и включают в себя регуляцию роста и развития растения, участие в межклеточных взаимодействиях, защиту растений от стрессовых воздействий, транспортные функции [Шакирова, Безрукова (Shakirova, Bezrukova), 2007]. У бобовых

растений лектины находятся на поверхности корневых волосков и за счет специфического взаимодействия с полисахаридами клеточной стенки ризобий осуществляют двойное специфическое связывание последних с корнями растений [Laus et al., 2006]. В ряде работ было показано, что перенос гена лектина из одного бобового растения в другое приводил к тому, что трансгенное растение приобретало способность инфицироваться и в ряде случаев образовывать клубеньки при заражении неспецифичным для него штаммом ризобий [Diaz et al., 1989; Diaz et al., 1995; van Rhijn et al., 2001]. Однако, несмотря на значительные усилия исследователей, новых симбиозов ризобий с трансгенными небобовыми растениями до сих пор не удалось получить.

В тоже время есть данные о возможности использования ризобий в качестве ассоциативных микросимбионтов для многих экономически ценных небобовых культур, таких как томаты, перец, рис, пшеница и др. [Mishra et al., 2006; García-Fraile et al., 2012]. Азотфиксация в данном симбиозе невелика и по данным литературы на порядок ниже уровня симбиотической азотфиксации, однако ризобии способны улучшить рост растения за счет синтеза гормоноподобных соединений, сидерофоров, антибиотиков, растворения фосфатов, защиты от фитопатогенов и ряда других процессов [Моргун и др. (Morgun et al.), 2009; Dimkpa et al., 2009].

Ранее в нашей лаборатории были проведены успешные эксперименты по созданию искусственных симбиотических ассоциаций небобовых растений табака, томата и рапса, трансгенных по гену лектина гороха (*psl*) с клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* [Вершинина и др. (Vershinina et al.), 2011]. Однако, данный вид клубеньковых бактерий имеет повсеместное распространение в почве и есть вероятность, что в подобной ассоциации в естественных условиях искусственно интродуцированный штамм «полезных» ризобий будет вытеснен «местными» бактериальными штаммами.

Бобовое растение козлятник восточный - перспективная многолетняя кормовая культура.

Симбиоз козлятника восточного с клубеньковыми бактериями *Rhizobium galegae* bv. *orientalis* характеризуется исключительно строгой специфичностью партнеров [Radeva et al., 2001]. Естественным ареалом произрастания данного растения является Кавказ [Andronov et al., 2003]. В средней полосе России в диком виде козлятник не растет, что является причиной отсутствия в почвах специализированных клубеньковых бактерий, способных полноценно инфицировать это бобовое растение. Данные обстоятельства позволяют предположить, что трансгенные растения, синтезирующие лектин козлятника восточного, будут способны адгезировать на корнях только определенный вид ризобий, с которым не смогут конкурировать «дикие» ризосферные штаммы.

Целью нашего исследования было получение трансгенных по гену лектина (*GORL*) козлятника восточного растений табаков и анализ колонизации корней данных растений микросимбионтом козлятника восточного *R. galegae*.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы, плазмиды, генно-инженерные манипуляции, последовательности олигонуклеотидных праймеров

В работе были использованы бактерии *Escherichia coli* штамма XL-Blue и *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0. При создании генно-инженерных конструкций использовался бинарный вектор pCambia 1301 (Cambia, Австралия), содержащий в области Т-ДНК репортерный ген *GUS* и ген устойчивости к гигромицину. Для удобства клонирования в pCambia 1301 по сайту *Sma*I была вставлена 35S кассета, состоящая из 35S промотора, полилинкера и 35S polyA последовательности. Тотальную ДНК табака выделяли методом солевой экстракции [Aljanabi, Martinez, 1997], которую затем очищали с помощью набора фирмы «Цитокин» (Россия). Для анализа рекомбинантных клонов применяли быстрый метод щелочного лизиса бактериальных колоний. ПЦР проводили на амплификаторе Терцик (ДНК-технология, Россия) с использованием стандартных наборов для амплификации ДНК. Фрагменты ДНК элюировали из агарозного геля после препаративного электрофореза с помощью набора для очистки ДНК (Цитокин, Россия). Выделенные препараты ДНК и продукты амплификации анализировали в 1%-ном агарозном геле при напряжении 6 В/см длины геля. Секвенирование проводили на автоматических секвенаторах ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) и GenomeLab GeXP (Beckman Coulter, США).

Компьютерный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с

помощью пакета компьютерных программ Lasergene (DNASTAR, Inc., США).

Бактерии *A. tumefaciens* трансформировали методом электропорации с помощью прибора Micropulser (Bio-Rad Laboratories, США).

Для амплификации полноразмерной кодирующей последовательности гена *GORL* лектина козлятника восточного использовали праймеры *gorlf* 5'-ATACATATATACAATGGCTTCT-3' и *gorlr* 5'-TACATACAACACATACATCTA-3', фланкирующие ген. Наличие гена *GORL* в геноме табака проверяли с помощью ПЦР с использованием следующих пар праймеров: *gorlf-gorlr* и *gorlf-rGorLseq* 5'-AATGCACGACCTACTATCTCCT-3'.

Получение трансгенных растений табака

Трансгенные растения *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1 получали путем агробактериальной трансформации листовых пластинок табака рекомбинантным штаммом *A. tumefaciens* [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2011]. Первичные трансгенные T₀-побеги отбирали на селективной среде (соли МС с добавлением 1 мг/л 6-БАП, 0.1 мг/л НУК), содержащей 25 мг/л гигромицина. Анализ активности гена *GUS* в листьях T₀-побегов проводили по методу, описанному R.A. Jefferson с небольшими модификациями [Jefferson, 1987]. Растительный материал инкубировали в растворе X-Gluc, содержащем 1 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-глюкуронид, 0.5% тритон X-100, 100 мМ Na₂ЭДТА, 20% метанола, 0.5 мМ K₃Fe(CN)₆, 0.5 мМ K₄Fe(CN)₆ и 50 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 7.0). Корни инкубировали при 37°C в течение ночи, отбеливали в 70% этиловом спирте, выдерживали в 50% растворе глицерина в воде и проводили визуальный анализ при помощи микроскопа.

Проверенные на *GUS* активность T₀-побеги переносили на среду для укоренения (соли МС, витамины среды Гамборга, 3% сахароза, 0.1 мг/л ИУК, 25 мг/л гигромицина), затем в почвенную смесь и выращивали на светоплощадке до получения семян (T₁-потомство). Часть T₁-семян от каждой полученной линии проращивали на среде МС с добавлением гигромицина. Через три недели производили подсчет устойчивых и неустойчивых к селективному агенту сеянцев и определяли расщепление при наследовании гена селективного маркера. Результаты обрабатывали методом χ^2 по стандартной методике и выделяли для дальнейшей работы линии, характеризующиеся расщеплением 3:1, что косвенно свидетельствует о наличии одной интегрированной копии трансгена в геноме табака.

В качестве контроля использовали нетрансгенные растения исходного сорта Petit Havana линии SR1 и трансгенные растения, содержащие

Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1301 без целевого гена.

Трансгенные растения табака выращивали одновременно с контрольными в условиях светоплощадки при 25°C, 16-часовом фотопериоде и при освещенности 5 тыс. лк на универсальном грунте (Terra vita, Россия)

ОТ-ПЦР

Тотальную РНК из листьев табака выделяли с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Ревертазную реакцию проводили с помощью олиго(dT) праймера (Силекс, Россия) и обратной транскриптазы MINT (Евроген, Россия). Наличие гена *GORL* в препаратах кДНК проверяли с помощью ПЦР с использованием праймеров *gorlf* и *gGorLseq*.

Иммунофлуоресцентный анализ

Для локализации лектина *GORL G. orientalis* на поверхности табака проводили иммунофлуоресцентный анализ с использованием первичных антиполилектиновых антител к фрагменту углеводсвязывающего участка *GORL* длиной 25 аминокислотных остатков (НПФ ВЕРТА, Россия) и вторичных антител, меченных Alexa Fluor 488 (Cell Signaling Technology, USA) по методике, описанной Diaz с соавт. с модификацией [Diaz et al., 1986]. Корни табаков, трансгенных по гену лектина *GORL*, и корни контрольных растений разрезали на фрагменты длиной около 5 см и помещали в 10 мл пластиковые пробирки с 5% раствором сухого обезжиренного молока (Applichem, Германия) в 0.1 М карбонатном буфере, pH 9.6. Инкубировали в течение ночи на качалке при +4°C. На следующий день корни трижды отмывали в TBS буфере и далее инкубировали на качалке в течение 1 часа с первичными антителами к лектину *GORL*, в разведении 1:5000. После инкубации корни снова отмывали в TBS буфере, затем переносили в TBS буфер с вторичными антителами, мечеными Alexa Fluor 488 в разведении 1:50000, и сразу микроскопировали.

Обработка корней табака *R. galegae* и подсчет количества адсорбированных на поверхности корней бактерий

Для анализа колонизации корней использовали растения, трансгенные по гену *GORL*, выращенные из семян первого поколения и достигшие месячного возраста. Из бактерий использовали штаммы ризобий *R. galegae* bv. *orientalis* 0702 из коллекции ВНИИСХМ, которые для удобства детектирования были маркированы флуоресцентным белком GFP [Баймиев и др. (Baumiev et al.), 2011]. Бактерии выращивали при 28°C в течение 1 - 2 сут в жидкой среде ТУ (дрожжевой экстракт – 0.1%, бакто-триптон – 1%, CaCl₂ – 0.1%) до концентрации 10⁸ КОЕ/мл.

Затем их разбавляли стерильной водой до концентрации 10⁶/мл. Корни табаков, трансгенных по гену *GORL*, и корни контрольных растений разрезали на сегменты длиной 1 см, и по 100 мг корней вносили в пробирки с суспензией бактерий. После инкубации на качалке с бактериями в течение ночи при температуре 28°C корни трижды отмывали стерильной средой ТУ, 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 флуоресцентно меченых колоний, которые потом пересчитывали на массу корней.

Микроскопирование

Флуоресцентно окрашенные бактерии и иммулокализацию лектина *GORL* на корнях трансгенного табака наблюдали с помощью флуоресцентных микроскопов BioZero Analyzer (Keyence, Япония), Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Германия) и конфокального микроскопа Zeiss LSM 5 Exciter (Carl Zeiss, Германия).

Статистическая обработка данных

Эксперименты включали не менее 10 биологических повторностей при подсчете количества адсорбированных на поверхности корней бактерий. На рисунках приведены средние результаты опыта и их стандартные ошибки. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием компьютерных программ Microsoft Office Excel.

Результаты и обсуждение

Для амплификации гена *GORL* были подобраны праймеры к полноразмерной последовательности гена лектина *G. orientalis*, зарегистрированной в GenBank под номером AY253985.1. Размер ожидаемого ПЦР-продукта составил 877 п.н. Полноразмерная кодирующая последовательность гена лектина *GORL G. orientalis* была амплифицирована *Pfu*-полимеразой (рис.1.) и клонирована за 3'-концом конститутивного 35S промотора вируса мозаики цветной капусты по сайту *SmaI* в Т-ДНК модифицированного вектора pCambia 1301.

Полученная генетическая конструкция pCambia 1301 *GORL* была перенесена методом электропорации в агробактерии *A. tumefaciens* штамма AGL0, которые далее были использованы для трансформации листовых пластинок табака. Трансгенную природу табака проверяли гистохимическим анализом на активность гена *GUS*.

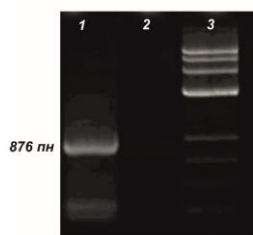


Рис.1. Электрофореграмма ПЦР-продукта гена *GORL*. 1 - ампликон гена *GORL*; 2 - отрицательный контроль без ДНК; 3 - маркер, плазида pBSK, расщепленная рестрикционной эндонуклеазой *HpaII*.

Fig.1. The gel electrophoresis image of PCR products of *GORL* gene. 1- PCR product of *GORL* gene; 2-negative control without DNA; 3- marker, pBSK digested with *HpaII*

Присутствие гена *GORL* *G. orientalis* в геноме трансгенных растений определяли ПЦР с тотальной растительной ДНК с праймерами *gorlf* и *gorlr*, фланкирующими полноразмерную последовательность искомого гена. Транскрипционную активность гена лектина *GORL* в трансгенных растениях табака подтверждали ОТ-ПЦР (рис. 2). В контрольных растениях гистохимический анализ, ПЦР и ОТ-ПЦР дали отрицательный результат.

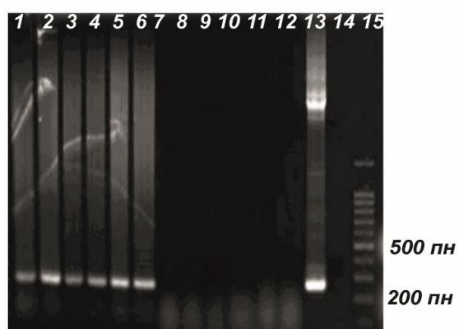


Рис.2. Электрофореграмма результатов ОТ-ПЦР фрагмента гена *GORL* в трансгенных растениях табака поколения T_1 . 1-6 - продукты ОТ-ПЦР табаков, трансгенных по гену *GORL*;

7-12 - контроль на наличие ДНК в препаратах мРНК; 13 - положительный контроль (ампликон фрагмента гена *GORL* с плазмиды pCambia 1301 *GORL*); 14 - отрицательный контроль без ДНК; 15 - маркер молекулярного веса (100-1000 п.н.)

Fig.2. The gel electrophoresis image of RT-PCR product of *GORL* gene in transgenic tobacco T_1 . 1-6 - products of RT-PCR of tobacco transformed with *GORL* gene; 7-12 - DNA control in mRNA preparations; 13 - positive control (PCR product of *GORL* gene with pCambia 1301*GORL*); 14 - negative control without DNA; 15 - DNA marker, 100-1000 bp.

Локализация целевого белка на поверхности корней табака, трансгенного по гену *GORL*, была подтверждена с помощью иммунофлуоресцентного анализа с использованием первичных антител к лектину *GORL* козлятника восточного и вторичных антител, меченных Alexa Fluor 488 (рис. 3). В качестве контроля для исключения автофлуоресценции брали фрагменты корней трансгенных и контрольных растений, которые инкубировали только с вторичными антителами.

Корни табаков в возрасте одного месяца, трансгенных по гену *GORL*, и корни контрольных табаков заражали клубеньковыми бактериями - микросимбионтами козлятника восточного *R. galegae* штаммом CIAM 0702, маркированными зеленым флуоресцентным белком (GFP). После инкубации с бактериями проводили подсчет числа адгезированных клеток на корнях контрольных и трансгенных растений. Анализ показал, что на корнях табаков, трансгенных по гену лектина *GORL* сорбировалось в 4 раза больше бактерий *R. galegae*, по сравнению с контрольными растениями (рис. 4). При этом наблюдался значительный разброс в результатах для трансгенных растений, что может быть связано с различным уровнем экспрессии гена *GORL* в отдельных растениях.

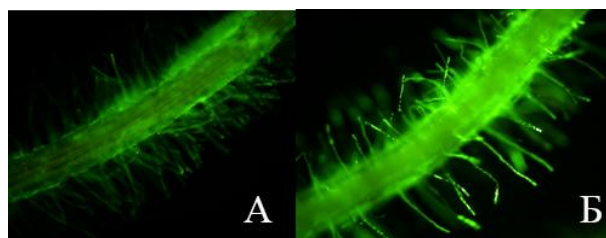


Рис.3. Иммунолокализация лектина козлятника восточного на поверхности корней контрольного нетрансгенного (А) и трансгенного (Б) по гену *GORL* растений табака.

Fig.3. Immunolocalization of *Galega orientalis* lectin on the roots surface, control (A) and transgenic (B) *GORL* tobacco plants.

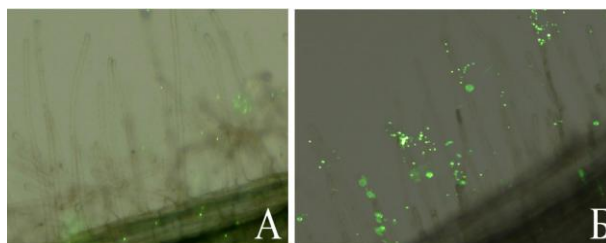


Рис.4. Адгезия бактерий на поверхности корней растений табака. А) корни контрольных растений, обработанных *R. galegae*; Б) корни трансгенных по гену *GORL* растений, обработанных *R. galegae*.
Fig.4. Bacterial adhesion on the root surface of tobacco. A) roots of non-transgenic plants treated by *R. galegae*; B) roots of transgenic *GORL* plants treated by *R. galegae*.



Рис. 5. Количественный анализ бактерий *R.galegae*, адгезированных на поверхности корней трансгенных ($GORL^+$) и контрольных ($GORL^-$) растений табака.

Fig. 5. The number of adhered bacteria *R.galegae* onto the root surface of transgenic ($GORL^+$) and control non-transgenic ($GORL^-$) tobacco plants.

Сравнительно низкий уровень адгезии бактерий *R. galegae* на корнях трансгенных табаков в сравнении с контрольными растениями может быть объяснен наличием у козлятника восточного нескольких отличных друг от друга лектинов. Ранее У. Тредсон с соавт. при изучении процессов узнавания в симбиозе *Galega* – *R. galegae* изолировали несколько растительных генов, один из которых был идентифицирован ими как ген лектина

[Troedsson et al., 2006]. Полноразмерная кодирующая последовательность этого гена (*GORL*) была выбрана нами в качестве объекта данного исследования. Вторым ген лектина козлятника восточного (*GORIENT*) был идентифицирован позднее в нашей лаборатории, однако для него известна только часть последовательности, включающей углеводсвязывающий домен соответствующего белка [Баймиев и др. (Baimiev et al.), 2005]. При этом белки, кодируемые генами *GORL* и *GORIENT*, не изучались.

Сравнительный анализ нуклеотидных и выведенных аминокислотных последовательностей, проведенный методом множественного выравнивания показал достаточно низкий уровень гомологии транслируемых областей лектинов *GORL* и *GORIENT* козлятника восточного, включая значительные различия в области пептида, определяющего специфичность молекулы данного белка к моносахариду (рис. 6). Подобный пептид был впервые обнаружен К. Ямамото с соавт. [Yamamoto et al., 1992] в составе лектина *Bauhinia purpurea*, а затем и в лектинах других бобовых. Экспериментально было показано, что даже единичная аминокислотная замена в области УСП лектина бобовых может вызвать изменение или потерю углеводсвязывающей активности соответствующего белка [van Eijsden et al., 1992]. Окончательная тонкая специфичность лектина формируется с участием аминокислотных остатков окружающих углеводсвязывающий пептид [Young, Oomen, 1992].

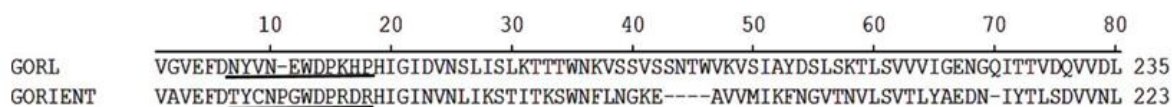


Рис. 6. Сравнительный анализ предсказанных аминокислотных последовательностей фрагментов лектинов *GORL* и *GORIENT* козлятника восточного, включающих углеводсвязывающие последовательности (подчеркнуты).

Fig. 6. Comparative analysis of the predicted amino acid sequences of the lectin fragments *GORL* and *GORIENT* of *G. orientalis*, including carbohydrate binding sequences (underlined)

Таким образом, вероятно, гены лектина *GORL* и *GORIENT* козлятника восточного кодируют белки с разными функциями и углеводсвязывающей активностью. Отметим, что в литературе описаны случаи наличия в бобовом растении нескольких изолектинов или лектинов, различающихся по углеводной специфичности [Baumann et al., 1979; Moreira et al., 2013]. Причем лектины из различных растений могут быть более подобны друг другу, нежели разные лектины из одного и того же растения [Konami et al., 1991]. Поэтому, возможно, что выявленная низкая избирательность взаимодействия

лектина *GORL* с микросимбионтом козлятника восточного на корневых волосках табаков, трансгенных по гену *GORL*, вызвана тем, что данный лектин не принимает участие в процессах специфического узнавания и прикрепления ризобий при формировании симбиоза *G. orientalis* – *R. galegae*. В то же время, вероятно, из-за некоторого сходства в строении углеводсвязывающих центров двух лектинов *GORL* и *GORIENT* происходит низкоспецифичное взаимодействие белка *GORL* с углеводными компонентами клеточной стенки бактерий *R. galegae*, что приводит к увеличению на

трансгенных корнях числа сорбированных ризобий относительно контроля.

Полученные данные продемонстрировали участие трансгенного лектина GORL в прикреплении бактерий, на примере ризобий *R. galegae* к поверхности корней. Однако, данное приращение носит, по-видимому, неспецифический характер, тогда как в предлагаемом подходе для развития успешных ассоциативных отношений необходима активная колонизация ризобиями ризосферы растения-хозяина, за счет специфического направленного взаимодействия бактериальных клеток с лектином на поверхности корней.

В дальнейшем нами планируется определить полноразмерную последовательность гена *GORIENT* лектина козлятника восточного и провести исследование, аналогичное вышеописанному, с целью изучения возможности использования лектина *GORIENT* в качестве якорного белка для получения стабильных искусственных ассоциаций между растениями и ризобиями.

Работа была выполнена с привлечением приборного парка ЦКП «Биомика» Института биохимии и генетики УФИЦ РАН в рамках госзадания (тема № АААА-А16-116020350028-4) при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований № 16-04-00902а, №18-34-00033 мол_а, № 18-34-20004 мол_а_вед.

Литература

1. Баймиев Ал.Х., Губайдуллин И.И., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Вклад структуры углеводсвязывающих пептидов лектина в определении специфичности бобово-ризобиального симбиоза у козлятников восточного и лекарственного // *Молекулярная биология*. 2005. Т. 39. №1. С. 103–111. DOI: 10.1007/s11008-005-0013-0
2. Баймиев Ан.Х., Ямиданов Р.С., Матниязов Р.Т., Благова Д.К., Баймиев Ан.Х., Чемерис А.В. Получение флуоресцентно меченных штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для их детекции in vivo и in vitro // *Молекулярная биология*. 2011. Т. 45. № 6. С. 984-991.
3. Вершинина З.Р., Баймиев Ан.Х., Благова Д.К., Князев А.В. Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Биоинженерия симбиотических систем: создание новых ассоциативных симбиозов с помощью лектинов на примере табака и рапса // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2011. Т. 47. № 3. С. 336–342. DOI: 10.1134/S0003683811030173
4. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Ильясова А.А., Чемерис А.В. Конститутивная экспрессия гена *ARGOS* в растениях табака под контролем промотора вируса мозаики георгина // *Физиол. растений*. 2011. Т. 58. №3. С.443–452. DOI: 10.1134/S1021443711030083
5. Моргун В.В., Коць С.Я., Кириченко Е.В. Ростстимулирующие ризобактерии и их практическое применение // *Физиология и биохимия культ. растений*. 2009. Т. 41. №3. С. 187-207.
6. Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений // *Журн. общ. биологии*. 2007. Т. 68. №2. С. 109–125.
7. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR based techniques // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4692–4693.
8. Andronov E., Terefework Z., Roumiantseva M.L., Dzyubenko N.I., Onichtchouk O.P., Kurchak O.N., Dresler-Nurmi A., Young J.P., Simarov B.V., Lindström K. Symbiotic and genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolates collected from the *Galega orientalis* gene center in the Caucasus // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V.69. № 2. P. 1067-1074. DOI: 10.1128/AEM.69.2.1067-1074.2003
9. Baumann C., Rudiger H., Strosberg A.D. A comparison of the two lectins from *Vicia cracca* // *FEBS Lett.* 1979. V. 102. P. 216-218. DOI: 10.1016/0014-5793(79)80003-4
10. Diaz C.L., Logman T.J.J., Stam H.C., Kijne J.W. Sugar-binding activity of pea lectin expressed in white clover hairy roots // *Plant Physiol.* 1995. V. 109. P. 1167-1177. DOI: 10.1104/pp.109.4.1167
11. Diaz C.L., Melchers L.S., Hooykaas P.J., Lugtenberg B.J., Kijne J.W. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis // *Nature*. 1989. V. 338. P. 579-581. DOI: 10.1038/338579a0
12. Diaz C.L., Van Spronsen P.C., Bakhuizen R., Logman G.J., Lugtenberg B.J., Kijne J.W. Correlation between infection by *Rhizobium leguminosarum* and lectin on the surface of *Pisum sativum* L. roots // *Planta*. 1986. V. 168. P. 350–358. DOI: 10.1007/BF00392360
13. Dimkpa C., Weinand T., Asch F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions // *Plant Cell Environ.* 2009. V. 32. P. 1682-1694. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x
14. García-Fraile P., Carro L., Robledo M., Ramírez-Bahena M.H., Flores-Félix J.D., Fernández M.T., Mateos P.F., Rivas R., Igual J.M., Martínez-Molina E., Peix A., Velázquez E. *Rhizobium*

- promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans // *PLoS One*. 2012. V. 7(5). e38122. DOI: 10.1371/journal.pone.0038122
15. Jefferson R.A. Chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system // *Plant Mol. Biol. Rep.* 1987. V. 5. P. 387–405. DOI: 10.1007/BF02667740
 16. Konami Y., Yamamoto K., Toyoshima S. The primary structure of the *Laburnum alpinum* seed lectin // *FEBS Letters*. 1991. V. 286. P. 33–38. DOI: 10.1016/0014-5793(91)80934-U
 17. Laus M.C., Logman T.J., Lamers G.E., Van Brussel A.N., Carlson R.W., Kijne J.W. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin // *Mol. Microbiol.* 2006. V. 59. № 6. P. 61704–61713. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05057.x
 18. Li X., Qin J.C., Wang Q.Y., Wu X., Lang C.Y., Pan H.Y., Gruber M.Y., Gao M.J. Metabolic engineering of isoflavone genistein in *Brassica napus* with soybean isoflavone synthase // *Plant Cell Rep.* 2011. V. 30. P. 1435–1442. DOI: 10.1007/s00299-011-1052-8
 19. Mishra R.P., Singh R. K., Jaiswal H. K., Kumar V., Maurya S. *Rhizobium* mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.) // *Curr. Microbiol.* 2006. V. 52. P. 383–389. DOI: 10.1007/s00284-005-0296-3
 20. Moreira G., Conceicao F., McBride A., Pinto S. Structure predictions of two *Bauhinia variegata* lectins reveal patterns of C-terminal properties in single chain legume lectins // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 11. DOI: 10.1371/journal.pone.0081338
 21. Radeva G., Jurgens G., Niemi M., Nick G., Suominen L., Lindström K. Description of two biovars in the *Rhizobium galegae* species: biovar *orientalis* and biovar *officinalis* // *Syst. Appl. Microbiol.* 2001. V. 24. № 2. P. 192–205. DOI: 10.1078/0723-2020-00029
 22. Radutoiu S., Madsen L., Madsen E., Jurkiewicz A., Fukai E., Quistgaard E., Albrektsen A., James E., Thirup S. and Stougaard J. LysM domains mediate lipochitin–oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range // *The EMBO Journal*. 2007. V. 26. P. 3923–3935. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601826
 23. Sreevidya V.S., Srinivasa Rao C., Sullia S.B., Ladha J.K., Reddy P.M. Metabolic engineering of rice with soybean isoflavone synthase for promoting nodulation gene expression in rhizobia // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 1957–1969. DOI: 10.1093/jxb/erj143
 24. Troedsson U., Terefework Z., Jarl-Sunesson C. Cloning of four chitinase genes and a lectin gene in *Galega orientalis* // *Symbiosis*. 2006. V. 42. № 11. P. 25–37.
 25. Untergasser A., Bijl G., Liu W., Bisseling T., Schaart J., Geurts R. One-step *Agrobacterium* mediated transformation of eight genes essential for rhizobium symbiotic signaling using the novel binary vector system pHUGE. *PLOS*. 2012. V. 7(10). e47885. DOI: 10.1371/journal.pone.0047885
 26. van Eijsden R.R., Hoedemaeker F.J., Diaz C.L. Mutational analysis of pea lectin. Substitution of Asn125 for Asp in the monosaccharide binding site eliminates mannose/glucose-binding activity // *Mol. Biol.* 1992. V. 20. № 6. P. 1049–1058. DOI: 10.1007/BF00028892
 27. van Rhijn P., Fujishige N.A., Lim P.O., Hirsh A.M. Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // *Plant Physiology*. 2001. V. 126. P. 133–134. DOI: 10.1104/pp.126.1.133
 28. Yamamoto K., Konami Y., Osawa T., Irimura T. Carbohydrate binding peptides from several anti-H(O) lectins // *J. Biochem.* 1992. V. 111. № 4. P. 436–439. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123775
 29. Young N.M., Oomen R.P. Analysis of sequence variation among legume lectins. A ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 228. P. 924–934. DOI: 10.1016/0022-2836(92)90875-K

References

1. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR based techniques. *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4692–4693.
2. Andronov E., Terefework Z., Roumiantseva M.L., Dzyubenko N.I., Onichtchouk O.P., Kurchak O.N., Dresler-Nurmi A., Young J.P., Simarov B.V., Lindström K. Symbiotic and genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolates collected from the *Galega orientalis* gene center in the Caucasus. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V.69(2). P. 1067–1074. DOI: 10.1128/AEM.69.2.1067-1074.2003
3. Baimiev A.Kh., Gubaidullin I.I., Chemeris A.V., Vakhitov V.A. Contribution of lectin sugar - binding peptides structure determines specificity of rhizobium - legume symbiosis in *Galega orientalis* and *G. officinalis*. *Mol. Biol.* 2005. V. 39(1). P. 90–97. DOI: 10.1007/s11008-005-0013-0. (In Russian).

4. Baymiev A.K., Yamidanov R.S., Matniyazov R.T., Blagova D.K., Chemeris A.V. Preparation of fluorescent labeled nodule bacteria strains of wild legumes for their detection in vivo and in vitro. *Molecular Biology*. 2011. V.45(6). P. 904-910. DOI: 10.1134/S0026893311060033
5. Baumann C., Rudiger H., Strosberg A.D. A comparison of the two lectins from *Vicia cracca*. *FEBS Lett.* 1979. V. 102. P. 216-218. DOI: 10.1016/0014-5793(79)80003-4
6. Diaz C.L., Logman T.J.J., Stam H.C., Kijne J.W. Sugar-binding activity of pea lectin expressed in white clover hairy roots. *Plant Physiol.* 1995. V. 109. P. 1167-1177. DOI: 10.1104/pp.109.4.1167
7. Diaz C.L., Melchers L.S., Hooykaas P.J., Lugtenberg B.J., Kijne J.W. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature*. 1989. V. 338. P. 579-581. DOI: 10.1038/338579a0
8. Diaz C.L., Van Spronsen P.C., Bakhuizen R., Logman G.J., Lugtenberg B.J., Kijne J.W. Correlation between infection by *Rhizobium leguminosarum* and lectin on the surface of *Pisum sativum* L. roots. *Planta*. 1986. V. 168. P. 350-358. DOI: 10.1007/BF00392360
9. Dimkpa C., Weinand T., Asch F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ.* 2009. V. 32. P. 1682-1694. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x
10. García-Fraile P., Carro L., Robledo M., Ramírez-Bahena M.H., Flores-Félix J.D., Fernández M.T., Mateos P.F., Rivas R., Igual J.M., Martínez-Molina E., Peix A., Velázquez E. *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS One*. 2012. V. 7(5). e38122. DOI: 10.1371/journal.pone.0038122
11. Jefferson R.A. Chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1987. V. 5. P. 387-405. DOI: 10.1007/BF02667740
12. Konami Y., Yamamoto K., Toyoshima S. The primary structure of the *Laburnum alpinum* seed lectin. *FEBS Letters*. 1991. V. 286. P. 33-38. DOI: 10.1016/0014-5793(91)80934-U
13. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Iljassowa A.A., Chemeris A.V. Constitutive expression of the ARGOS gene driven by dahlia mosaic virus promoter in tobacco plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2011. V. 58(3). P. 507-515. DOI: 10.1134/S1021443711030083 (In Russian).
14. Laus M.C., Logman T.J., Lamers G.E., Van Brussel A. N., Carlson R. W., Kijne J. W. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Mol. Microbiol.* 2006. V. 59(6). P. 61704-61713. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05057.x
15. Li X., Qin J.C., Wang Q.Y., Wu X., Lang C.Y., Pan H.Y., Gruber M.Y., Gao M.J. Metabolic engineering of isoflavone genistein in *Brassica napus* with soybean isoflavone synthase. *Plant Cell Rep.* 2011. V. 30. P. 1435-1442. DOI: 10.1007/s00299-011-1052-8
16. Mishra R.P., Singh R. K., Jaiswal H. K., Kumar V., Maurya S. *Rhizobium* mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). *Curr. Microbiol.* 2006. V. 52. P. 383-389. DOI: 10.1007/s00284-005-0296-3
17. Moreira G., Conceicao F., McBride A., Pinto S. Structure predictions of two *Bauhinia variegata* lectins reveal patterns of C-terminal properties in single chain legume lectins. *PLoS One*. 2013. V. 8(11). e81338. DOI: 10.1371/journal.pone.0081338
18. Morgun V.V., Kots S.Ya., Kirichenko E.V. Roststimuliruyushchiye rizobakterii i ikh prakticheskoye primeneniye. *Fiziologiya i biokhimiya kult. rasteniy*. 2009. V. 41(3). S. 187-207. [Growth promoting rhizobacteria and their use on practice]. (In Russian).
19. Radeva G., Jurgens G., Niemi M., Nick G., Suominen L., Lindström K. Description of two biovars in the *Rhizobium galegae* species: biovar *orientalis* and biovar *officinalis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 2001. V. 24(2). P. 192-205. DOI: 10.1078/0723-2020-00029
20. Radutoiu S., Madsen L., Madsen E., Jurkiewicz A., Fukai E., Quistgaard E., Albrechtsen A., James E., Thirup S., Stougaard J. LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *The EMBO Journal*. 2007. V. 26. P. 3923-3935. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601826
21. Shakirova F.M., Bezrukova M.V. Sovremennyye predstavleniya o predpolagayemykh funktsiyakh lektinov rasteniy. *Zhurn. obshch. biologii*. 2007. V.68(2). P. 109-125. [Current knowledge about presumable functions of plant lectins]. (In Russian).
22. Sreevidya V.S., Srinivasa Rao C., Sullia S.B., Ladha J.K., Reddy P.M. Metabolic engineering of rice with soybean isoflavone synthase for promoting nodulation gene expression in rhizobia. *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 1957-1969. DOI: 10.1093/jxb/erj143
23. Troedsson U., Terefework Z., Jarl-Sunesson C. Cloning of four chitinase genes and a lectin gene in *Galega orientalis*. *Symbiosis*. 2006. V. 42(11). P. 25-37.
24. Untergasser A., Bijl G., Liu W., Bisseling T., Schaart J., Geurts R. One-step *Agrobacterium* mediated transformation of eight genes essential for

- rhizobium symbiotic signaling using the novel binary vector system pHUGE. *PLOS*. 2012. V. 7(10). e47885. DOI: 10.1371/journal.pone.0047885
25. van Eijsden R.R., Hoedemaeker F.J., Diaz C.L. Mutational analysis of pea lectin. Substitution of Asn125 for Asp in the monosaccharide binding site eliminates mannose/glucose binding activity. *Mol. Biol.* 1992. V. 20(6). P. 1049–1058. DOI: 10.1007/BF00028892
 26. van Rhijn P., Fujishige N.A., Lim P.O., Hirsh A.M. Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Plant Physiology*. 2001. V. 126. P. 133–134. DOI: 10.1104/pp.126.1.133
 27. Vershinina Z.R., Baimiev A.K., Blagova D.K., Knyazev A.V., Chemeris A.V. Bioengineering of symbiotic systems: creation of new associative symbiosis with the use of lectins on the example of tobacco and oil seed rape. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011. V.47(3). P. 304–310. DOI: 10.1134/S0003683811030173. (In Russian).
 28. Yamamoto K., Konami Y., Osawa T., Irimura T. Carbohydrate binding peptides from several anti-H(O) lectins. *J. Biochem.* 1992. V. 111(4). P. 436–439. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123775
 29. Young N.M., Oomen R.P. Analysis of sequence variation among legume lectins. A ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. *J. Mol. Biol.* 1992. V. 228. P. 924–934. DOI: 10.1016/0022-2836(92)90875-K