

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2014 * № 3

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2014

УДК 579.262: 579.64:631.46

А.М. Лавина, Л.Р. Нигматуллина, З.Р. Вершинина, А.Х. Баймиев

СОЗДАНИЕ АССОЦИАТИВНЫХ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ОГУРЦА С РИЗОБИЯМИ

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

Цель. Создание и исследование свойств искусственной ассоциативной симбиотической системы огурца обыкновенного с ризобиями, обладающими противогрибковой и ростостимулирующей активностью.

Материалы и методы. Клонирование гена *psl* в плазмиду pJN105TurboGFP, электропорация данной конструкции в ризобии, инокуляция растений огурца трансформированным штаммом и оценка эффективности клубенькообразования, определение противогрибковой активности штамма методом двойной культуры и анализ ростостимулирующего эффекта штамма.

Результаты. Было выявлено уменьшение количества гиф грибов на корнях растений, инокулированных в суспензии ризобий. Обнаружен ростостимулирующий эффект ризобий на растения огурца.

Заключение. Обработка растений огурца ризобиями способствует их росту и защите от фитопатогенов.

Ключевые слова: ризобии, лектин, *lec*, противогрибковая и ростостимулирующая активность.

A.M. Lavina, L.R. Nigmatullina, Z.R. Vershinina, A.Kh. Baymiev

THE CREATION OF ARTIFICIAL ASSOCIATIVE SYMBIOTIC SYSTEMS OF THE CUCUMBER WITH RHIZOBIA

Institute of Biochemistry and Genetics, USC RAS, Ufa, Russia.

Objective. To create and study the properties of artificial associative symbiotic systems of cucumber with rhizobia possessing antifungal and growth-stimulating activity.

Materials and methods. The cloning of the gene *psl* into a plasmid pJN105TurboGFP, electroporation of this design into rhizobia, the inoculation of cucumber plants transformed by that strain and the evaluation of nodulation, the determination of antifungal activity of the strain by dual culture method and the analysis of growth-promoting effect of strain.

Results. The decrease of the number of hyphae of fungi in the roots of plants inoculated in suspension of rhizobia was revealed. The growth-promoting effect of rhizobia on cucumber plants was found.

Conclusions. The treatment of cucumber plants by the rhizobia promotes their growth and the protection against plant pathogens.

Key words: rhizobia, lectin, *lec*, antifungal and growth-promoting activity.

Введение

Огурец является наиболее распространенной культурой защищенного грунта и занимает самые большие площади в тепличных хозяйствах РФ. Приемы защиты растений и увеличения урожайности огурца обыкновенного совершенствуются в направлении повышения их защитных реакций [1].

Экологически безвредным методом является использование ростостимулирующих ризобактерий (Plantgrowthpromoting rhizobacteria – PGPR). Эта перспективная группа бактерий может быть использована в качестве ассоциативных микросимбионтов, так как PGPR, способны улучшать рост и урожайность растений, а также защищать их от фитопатогенов и негативного воздействия окружающей среды. Данные грамотрицательные бактерии, способны вступать в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями, образуя на их корнях клубеньки. Кроме того имеются данные, указывающие на их потенциал в качестве ассоциативных микросимбионтов и для небобовых культур [2-4].

Для улучшения колонизации ризобактериями корней небобовых растений и создания более стабильных ассоциативных симбиозов применяются различные методы, в том числе, получение трансгенных растений, синтезирующих лектины. Это – секретируемые белки, которые связываются с полисахаридами на клеточных стенках ризобий, тем самым фиксируя микроорганизмы на поверхности корневых волосков и вызывая у них перестройки, значимые для формирования симбиоза [5].

Одним из вариантов положительного влияния ризобий на растения в ассоциативном симбиозе является подавление ими роста патогенных грибов, другим вариантом влияния является их ростостимулирующий эффект.

Целью данной работы являлось создание и исследование свойств искусственной ассоциативной симбиотической системы огурца обыкновенного с ризобиями, обладающими противогрибковой и ростостимулирующей активностью.

Материалы и методы

Для трансформации растений и получения на них «бородатых корней» использовался штамм *Agrobacterium rhizogenes* A4, трансформированный вектором pCambia 1301 содержащей в области T-ДНК ген *gus* с каталазным интроном и полноразмерный ген лектина гороха посевного *psl* [6].

Гистохимический анализ корней на *gus*-активность проводили по мето-

дике Jefferson [7]. Наличие гена лектина *psl* в препаратах ДНК и кДНК проверяли с помощью ПЦР.

Для визуализации взаимодействия микроорганизмов с корнями растений использован обладающий противогрибковой активностью штамм *Rhizobium leguminosarum* 116GFP, выделенный из клубеньков гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и трансформированный вектором pJN105, содержащим ген флуоресцентного белка TurboGFP.

В качестве фитопатогена был выбран штамм *Fusarium oxysporum*, выделенный из корней огурца обыкновенного, пораженного фузариозом. Антагонистическую активность *R. leguminosarum* 116GFP по отношению к грибу оценивали, используя метод двойной культуры [8]

Для инокуляции композитных растений использовали бактерии *Rhizobium leguminosarum* 116 GFP. В течение суток в инокуляте выдерживали корни растений, после чего растения пересаживали в почву, содержащую 10 мл суспензии спор гриба *F. oxysporum* с концентрацией 10^5 /мл, и выращивали в течение трех суток. Затем корни растений отмывали и окрашивали в растворе толуидинового синего в течение часа. При этом гифы грибов приобретали фиолетовую окраску, а клетки растений – голубую. После отмывания в цитратном буфере корни рассматривали и фотографировали с помощью микроскопа AxioImager M1 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Для определения ростостимулирующего эффекта *R. leguminosarum* 116 GFP семена и проростки огурца инокулировали суспензией ризобактерий. Для определения ростостимулирующего эффекта *R. leguminosarum* 116 GFP на взрослые растения, а также исследование этого эффекта в присутствии патогена – опытные композитные растения, обрабатывали суспензией ризобактерий в конечной концентрации 10^3 КОЕ/мл почвы. Через 7 суток после обработки бактериями измеряли высоту стебля, а также ширину и длину самого большого листа на побеге. Для определения данного эффекта в присутствии патогена растения после обработки ризобактериями заражали грибами. После этого анализировалось изменение высоты стебля, длины и ширины листа.

Результаты и обсуждение

Через 10-12 суток после инокуляции суспензией *A. rhizogenes* «бородастые корни» образовывались у 50% растений. У проростков обработанных *A. rhizogenes* (pCambia 1301-*psl*) *gus*-окрашивающиеся корни были обнаружены в 56% случаев. ПЦР-анализ этих корней показал присутствие гена лектина

(рис. 1).

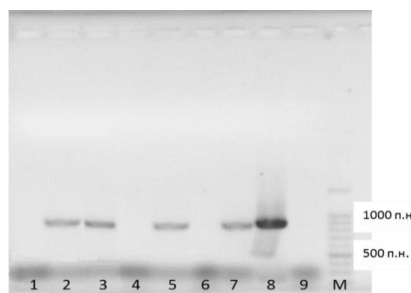


Рис. 1. Электрофореграмма результатов ОТ-ПЦР гена лектина из «бородатых» корней огурца.

Обозначение: 1 – контроль на наличие ДНК в препарате мРНК, 2-7 – от ПЦР-продукт гена *psl* из бородатых корней огурца, 8 – ПЦР-продукт гена *psl* из плазмиды pCambia1301, 9 – отрицательный контроль без генетического материала; М – 100 bp+1.5 Kb+3 Kb ДНК маркер (Sibenzyme, Россия).

Количество ризобий, адгезированных на корнях опытных огурцов, в 10 раз превосходило значение контрольных растений.

Антагонистическая активность *R. leguminosarum* 116GFP по отношению к *F. oxysporum* определялась методом двойной культуры и составила 62,5% (рис. 2).

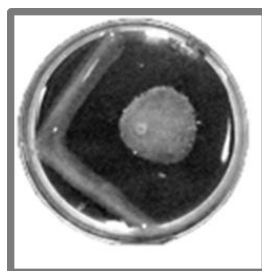


Рис. 2. Антагонистическая активность штамма *R. leguminosarum* 116 GFP.

Нами была доказана противогрибковая активность штамма *R. leguminosarum* 116 GFP на растениях. Выявлено уменьшение количества гиф грибов на корнях трансгенных растений, инокулированных в суспензии ризобий. У нетрансгенных растений также было выявлено различие между количеством грибов на корнях с ризобиями и без ризобий (рис. 3).



Рис. 3. Заражение растений огурца *F. oxysporum*:

- а – не инокулированные контрольные растения;
- б – контрольные растения +*F. oxysporum*
- в – контрольные растения +*F. oxysporum*+*R. leguminosarum*116
- г – растения с трансгенными по *psl* корнями +*F. oxysporum*
- д – растения с трансгенными по *psl* корнями +*F. oxysporum*+ *R. leguminosarum*116

Таким образом, обнаружено, что трансгенные корни исследуемых растений с геном лектина гороха лучше колонизируются ризобиями с противогрибковой активностью, что может способствовать защите растений от фитопатогенов.

Кроме того выявлено, что инокуляция семян и проростков огурца бактериями *R. leguminosarum* 116 GFP на 9% увеличивает всхожесть семян и на 64% – длину корней проростков. Обнаружено, что обработка композитных и контрольных растений огурца бактериями *R. leguminosarum* 116 GFP приводит к росту стебля в высоту, а также увеличению размеров листьев. В условиях действия фитопатогена (*F. oxysporum*) рост растений огурца замедляется, в то время как растения, обработанные ризобиями, растут быстрее растений необработанных ризобиями. Эти результаты аналогичны данным, полученным в работе по обработке сахарной свеклы бактериями *R. leguminosarum* bv. *viciae* для стимуляции роста свеклы и защиты ее от патогенов рода *Pythium* [9].

Заключение

Полученные результаты подтверждают возможность создания искусственной симбиотической ассоциации огурца с ризобиями, обладающими повышенной устойчивостью к грибным фитопатогенам. Данное исследование расширяет возможности использования биологических средств защиты растений, что в перспективе позволит сократить использование химических пестицидов и может найти широкое применение в различных отраслях сельского хозяйства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Будынков Н.И., Юваров В.Н. Болезни овощных тепличных культур. Источники инфекции, защита растений. Профилактика мероприятий с использованием преп. серии «CID LINES». Большие Вяземы. 2008: 21–22.
2. Ashraf M. A. Asif M., Zaheer A., Malik A., Ali Q., Rasool M. Plant growth promoting rhizobacteria and sustainable agriculture: A review. African Journal of Microbiology Research. 2013. 7(9): 704-709.
3. Glick B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica. 2012.
4. 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. 52: 383–389.
5. De Hoff P.L., Brill L.M., Hirsch A.M. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. Mol. Genet. Genomics. 2009. 282: 1–15.
6. Vershinina Z. R., Baymiev An. K., Blagova D. K., Chubukova O. V., Baymiev Al. K., Chemeris A. V. Artificial colonization of non-symbiotic plants roots with the use of lectins. Symbiosis. 2012. 56(1): 25–33.

7. Jefferson R. A. Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1987. 5: 387–405.
8. Whipps J.M. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glass-house pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist.* 1987. 107: 127–142.
9. Bardin S.D., Huang H.C., Pinto J., Amundsen E.J., Erickson R.S. Biological control of *Pythium* damping-off of pea and sugar beet by *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. *Can J Bot.* 2004. 82: 291–296.

Поступила 30.07.2014

(Контактная информация: Лавина Анна Михайловна – аспирант лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и генетики УНЦ РАН; адрес: 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71; тел. 89174604680; e-mail: owlwoman@mail.ru)