

И.А. Тихонович,  
Н.А. Проворов

Всероссийский НИИ  
сельскохозяйственной  
микробиологии Россельхоз-  
академии, Санкт-Петербург

## СИМБИОГЕНЕТИКА МИКРОБНО-РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

✿ На основе изучения различных форм микробно-растительного взаимодействия сформулированы общие положения симбиогенетики. Ее предметом являются надорганизменные генетические системы, возникающие в результате функциональной интеграции генов партнеров. Мы постулируем наличие у симбиозов не только генотипов, но и фенотипов, формируемых в результате взаимодействия генов партнеров и представляющих норму реакции объединенной генной системы на условия внешней среды. Формирование симбиозов обычно не связано с рекомбинацией наследственного материала партнеров, однако обеспечивает направленное расширение их адаптивных возможностей за счет приобретения признаков, отсутствующих вне взаимодействия.

✿ **Ключевые слова:** симбиоз, симбиогенетика, микробно-растительные взаимодействия, клубеньковые бактерии, арбускулярная микориза, фитопатогены, коэволюция, надорганизменные генетические системы, симбиотическая азотфиксация, бобовые растения.

### ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействия с микроорганизмами играют огромную роль в жизни растений: одни микробы улучшают их развитие, выполняя широкий круг адаптивно значимых функций (питание, биоконтроль патогенов, регуляция развития, выживание в стрессовых условиях), тогда как другие снижают выживаемость хозяев или даже приводят их к гибели. Для характеристики этих взаимодействий Антон де Бари (цит. по [19]) в 1879 г. предложил понятие «симбиоз», который определил как длительное сосуществование неродственных организмов. Позднее это понятие было сужено и долгое время использовалось для обозначения лишь мутуалистических (взаимовыгодных) отношений. Однако в настоящее время целесообразно возвратиться к исходно широкому определению симбиоза, поскольку оказалось, что мутуалистические и антагонистические взаимодействия контролируются сходными молекулярными механизмами, а также связаны многочисленными эволюционными переходами [6, 60]. С генетической точки зрения наиболее существенным является разделение симбиозов на факультативные, экологически облигатные и генетически облигатные. Эти типы симбиозов различаются по степени зависимости микроорганизмов от растений, а также по уровню специализации, достигнутому в ходе коэволюции партнеров и выявляемому при генетическом анализе взаимодействия (табл. 1).

Активное изучение молекулярно-генетических процессов, лежащих в основе формирования, функционирования и эволюции симбиозов, требует от генетиков определить место знаний об их контроле в системе современных биологических концепций. Микробно-растительные симбиозы, имеющие большое экологическое и практическое значение, предоставляют ряд удобных моделей для решения этой задачи.

### СИМБИОЗ КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ФЕНОМЕН

А. де Бари предложил рискованный термин «симбиоз» (греч. *συμβίωσις* — незаконное сожительство, адюльтер), усматривая сходство между взаимодействиями неродственных организмов и половыми процессами, происходящими при контактах близкородственных организмов. Правомочность этого подхода стала очевидной благодаря активному изучению молекулярных основ взаимодействия, поскольку выяснилось, что симбиоз, как и половой процесс, основан на объединении генных систем, ранее принадлежащих разным индивидам. Однако стало ясным и то, что тонкие механизмы, а также эволюционные последствия этого объединения различны (табл. 2). Действительно, при симбиозе расширение экологических возможностей про-

Таблица 1

## Основные типы микроорганизмов, взаимодействующих с растениями

Ключевые свойства микросимбионтов		Действие на жизнеспособность хозяина	
Зависимость от хозяина	Генетические основы адаптации при симбиозе	Положительное: мутуализм	Отрицательное: паразитизм
Факультативная	Взаимодействуют с хозяином, используя те же функции/гены, что и при адаптации во внешней среде	Ризосферные бактерии, бессимптомные и амбивалентные эндофиты и эпифиты	
Экологически облигатная*	Взаимодействуют с хозяином за счет функций/генов, не используемых вне симбиоза	Ризобии, <i>Frankia</i> , азотфиксирующие эндофиты ( <i>Acetobacter</i> , <i>Azoarcus</i> ), эктомикоризные грибы	Большинство фитопатогенных грибов и бактерий
Генетически облигатная	Хозяин — единственно возможная среда для развития и размножения (утрата функций/генов, необходимых для осуществления этих функций во внешней среде)	Гломусовые грибы	Микоплазмы, вирусы

Примечание: \* Понятие экологической облигатности симбиоза, изначально предложенное для характеристики адаптивного потенциала растений-хозяев [50], мы используем в отношении их генетически специализированных микросимбионтов, которые осуществляют колонизацию хозяина на четко дифференцированной часто обязательной стадии жизненного цикла.

Таблица 2

## Симбиоз и (пара)сексуальные процессы: основные формы генетической интеграции организмов

Сравнения	Симбиоз	Половой процесс у эукариот	Парасексуальные процессы у прокариот
Родство партнеров	Неродственные формы (часто прокариоты и эукариоты)	Принадлежат к одному (близким) видам	Варьирует
Субъекты интеграции	Целые организмы	Специализированные клетки (целые организмы у одноклеточных)	Геномы или их фрагменты
Рекомбинация генов партнеров	Нерегулярная* (возможен спорадический перенос генов)	Обязательная (обычно объединение целых геномов)	Обязательная (обычно перенос небольших фрагментов генома)
Организмы, у которых повышается адаптивный потенциал	Симбиотические партнеры**	Мейотические потомки партнеров	Реципиенты перенесенных генов
Механизмы повышения адаптивного потенциала	Взаимодействия (функциональная интеграция) генов партнеров (по типу комплементации или эпистаза)	Появление новых генотипов и их сегрегация путем гомологичной рекомбинации и мейоза	Интеграция новых генов в геном реципиента путем гомологичной или сайт-специфической рекомбинации
Основные эволюционные последствия	Сальтации (включая возникновение новых жизненных форм)	Градualные изменения (в пределах экологической амплитуды родительских форм)	Сальтации (колонизация рекомбинантами новых ниш, ранее доступных лишь донору)

Примечание: \* За исключением систем «*Agrobacterium*-растение»; \*\* микросимбионты при паразитизме, оба партнера при мутуализме.

исходит непосредственно у взаимодействующих организмов путем функциональной интеграции генов, что обычно не требует их рекомбинации, тогда как при половом процессе рекомбинация открывает возможность

для повышения адаптивного потенциала лишь у потомков взаимодействующих (родительских) особей. В этой связи интересно отметить сходство симбиоза с парасексуальными процессами у прокариот, в которые часто

вовлекаются таксомномически удаленные организмы и которые могут обеспечивать сальтационные изменения их адаптивных свойств.

Хотя генетическое изучение началось одновременно для мутуалистических [40] и патогенных [20] микробно-растительных взаимодействий, в течение полувека эти исследования развивались независимо, что было связано с формированием фитопатологии *in se*, а также с трудностями рассмотрения мутуализма в рамках теории естественного отбора [41]. Однако по мере накопления данных о генетике «полезных» и «вредных» взаимодействий выяснилось, что и те, и другие основаны на становлении фенотипов, которые не обнаруживаются у партнеров вне взаимодействия, что открыло возможность описания мутуализма и антагонизма в единых генетических терминах. Поэтому симбиозы привлекли внимание генетиков возможностью не только выявления новых генов, но и перевода генетического анализа в принципиально новую плоскость межорганизменной генетики [34]. Почву для синтеза знаний о контроле мутуализма и антагонизма создало выяснение сходства молекулярных механизмов их контроля со стороны как растений, так и микроорганизмов [51, 53, 56]. Этот синтез привел к оформлению нового направления генетики — *симбиогенетики*, в развитии которой ключевую роль сыграли модели микробно-растительных взаимодействий [7].

Будучи широкой областью знаний, симбиогенетика обладает собственным предметом и методологией исследований. Предмет симбиогенетики может быть определен как *надорганизменные генетические системы*, состоящие из «симбиотических» (*symb*) генов неродственных, но очень тесно взаимодействующих организмов (часто — прокариот и эукариот). При этом симбиотические адаптации взаимодействующих партнеров должны рассматриваться как результат фенотипической реализации надорганизменных генетических систем, тогда как морфофизиологические или поведенческие адаптации свободноживущих организмов являются итогом фенотипической реализации индивидуальных генотипов.

Уже в первых симбиогенетических работах было выявлено два типа взаимодействия генов партнеров: 1) комплементарное — симбиотический фенотип развивается лишь при наличии у партнеров определенной пары генов (системы «ген-на-ген»; [20]); 2) эпистатическое — нарушение симбиоза, вызванное мутацией одного из партнеров, супрессируется мутацией другого партнера [40]. Впоследствии выяснилось, что в симбиотической системе «взаимодействия генов» являются не менее тесными, чем в индивидуальном организме: они часто опосредованы сходными молекулярными сигналами, которые при симбиозе поступают в растительный организм через киназные системы [56], а в бактерии — через одно- или двухкомпонентные моду-

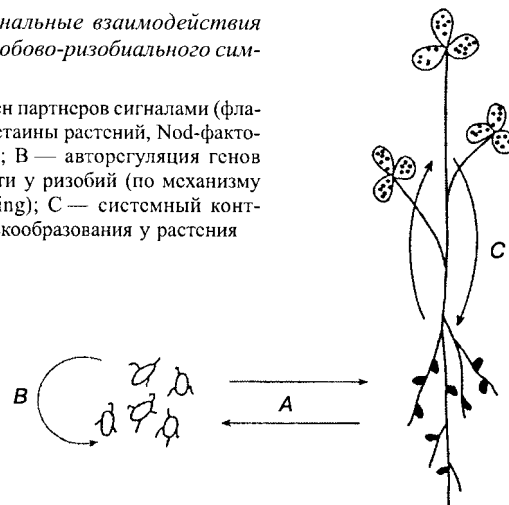
ляторы транскрипции [16, 47]. Кроме того, обмен партнерами сигналами часто сопровождается вторичными регуляторными процессами, индуцируемыми в организме хозяина (системные или локальные сигналы) или в популяции микросимбионтов (авторегуляция по типу «*quorum sensing*»), что открывает дополнительные возможности для повышения целостности симбиотической системы (рис. 1).

Таким образом, рассматривая симбиозы как высоко интегрированные биологические комплексы, мы должны признать наличие у них не только фенотипов [34], но и генотипов — надорганизменных генетических систем. Для симбиоза соотношение между генотипом и фенотипом обычно реализуется в формах: 1) тесной метаболической интеграции, включающей образование общих путей биосинтеза и катаболизма, которые начинаются в одном из партнеров и заканчиваются в другом; 2) развития новых структур, которые имеют химерную природу — содержат компоненты, кодируемые генами обоих партнеров (рис. 2). В отличие от фенотипа свободноживущего организма, который формируется как норма реакции его генотипа на условия окружающей среды [3], фенотип симбиотической системы является продуктом интегративного взаимодействия генотипов двух или более партнеров, а также каждого из них с внешней средой (при эндосимбиозе взаимодействие микроорганизмов со средой опосредовано хозяином).

Функциональная целостность надорганизменных генетических систем определяет методологию симбиогенетики, основанную на том, что функции большинства *symb*-генов не могут быть адекватно изучены в отсутствие специфического партнера. При факультативных и экологически облигатных симбиозах *symb*-гены могут быть изменены у каждого из партнеров по отдельности, после чего удается значительно расширить возможности генетического анализа за счет различных сочетаний генотипов партнеров.

Рис. 1. Сигнальные взаимодействия в системе бобово-ризобийного симбиоза.

А — обмен партнеров сигналами (флавоноиды и бетайны растений, Nod-факторы ризобий); В — авторегуляция генов вирулентности у ризобий (по механизму *quorum sensing*); С — системный контроль клубенькообразования у растения



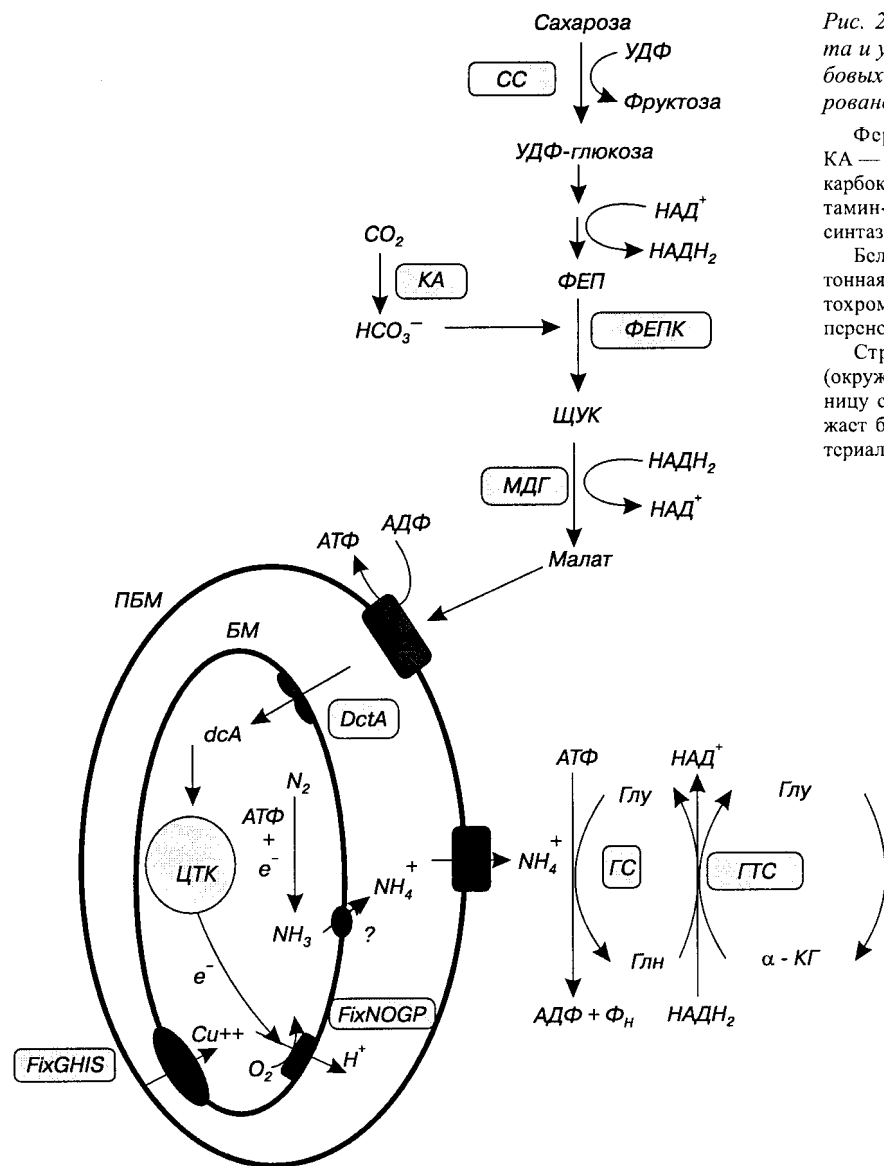


Рис. 2. Объединенная система метаболизма азота и углерода при внутриклеточном симбиозе бобовых растений с ризобиями (из [28]; модифицировано).

Ферментные системы: СС — сахарозосинтаза, КА — карбоангидраза, ФЕПК — фосфонолпируват-карбоксилаза, МДГ — малат-дегидрогеназа, ГС — глутамин-синтаза, ГТС — НАДФ-зависимая глутамат-синтаза, ЦТК — цикл трикарбоновых кислот.

Белки-переносчики: FixGHIS —  $\text{Cu}^{++}$ -зависимая протонная помпа, FixNOPQ — клубень-специфическая цитохром-оксидаза, DctA — сукцинат-пермеаза (dca — переносимы в бактериод дикарбоновых кислот).

Структуры: ПБМ — перибактероидная мембрана (ограждает симбиосому — основную субклеточную единицу симбиоза), БМ — бактериодная мембрана (ограждает бактериод — глубоко дифференцированную бактериальную клетку, фиксирующую  $\text{N}_2$ ).

При этом комбинирование генотипов микросимбионтов и хозяев может рассматриваться как особая форма гибридологического анализа, что соответствует представлению о симбиозе как о форме скрещиваний, в которую вовлекаются неродственные организмы [5]. В результате этого двухуровневого гибридологического анализа выясняется, что для симбиоза единицей наследственности является не ген (как у индивидуального организма), а как минимум пара генов, принадлежащих разным организмам. Действительно, сходство простейшей из схем «ген-на-ген» (квадратная сетка), характерной для фитопаразитарных отношений, с менделевской схемой наследования моногенного признака (3 : 1) свидетельствует о том, что отношения симбиотических партнеров могут быть описаны в терминах не только межгенных, но межклеточных взаимодействий [34].

Взаимоотношения между единицами наследственности и наследования в симбиотических системах определяются обязательностью симбиоза для партнеров. В том случае, если растения и микробы сохраняют способность к автономному существованию, объединяясь лишь на определенных стадиях своих жизненных циклов, их *сут*-гены передаются в поколениях независимо. Таким образом, в системах факультативного и экологически облигатного симбиоза единицы наследования и наследственности не совпадают. Однако при генетически облигатных симбиозах, сопровождаемых вертикальной передачей микробов в поколениях хозяина (например, передача эндофитов *Epichloe* через семена у злаков [27] или трансвариальная передача бактерий *Buchnera* у тлей [10]), наследование *сут*-генов партнеров тесно сопряжено. Следовательно, по мере повышения интегри-

рованности партнеров «симбиотические» единицы наследственности могут приобретать статус единиц наследования, что соответствует трансформации симбиоза в целостный организм.

### СИМБИОТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ РАЗВИТИЯ И КОНЦЕПЦИЯ РЕКРУТИРОВАНИЯ ГЕНОВ

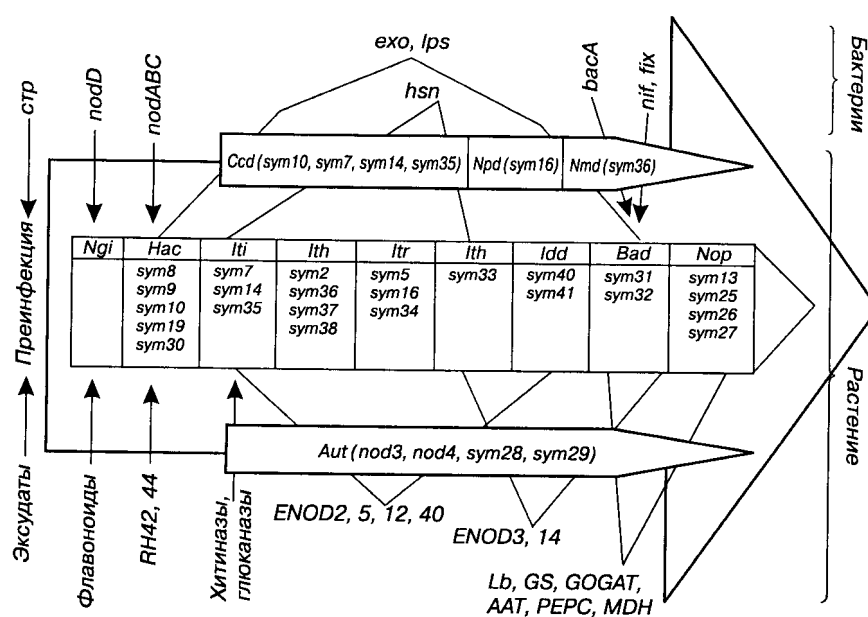
Одним из наиболее ярких свидетельств реальности надорганизменных генетических систем является развитие новых клеточных и тканевых структур, характерное для многих мутуалистических и антагонистических симбиозов. Например, фитопатологами детально изучены клеточные изменения при реакции сверхчувствительности [1], формирование у растений галлов или синцитиев при инфицировании нематодами [61], а также неопластические трансформации при инфицировании агробактериями [38]. Среди мутуалистических симбиозов наиболее изученным примером являются клубеньки бобовых, которые возникают из примордиев, формируемых у хозяина *de novo*. Для основных типов клубеньков (недетерминированные: *Pisum*, *Trifolium*, *Medicago*; детерминированные: *Phaseolus*, *Glycine*) морфогенетические программы удалось разделить на ряд подпрограмм, среди которых ключевыми являются подпрограммы образования симбиотических компартментов (инфекционные нити, симбиосомы) и развития азотфиксирующих тканей (рис. 3). Основное различие между ними состоит в том, что гистогенез клубеньков может частично происходить в отсутствие бактериального партнера (напри-

мер, при добавлении липо-хито-олигосахаридных Nod-факторов), тогда как инфекционные нити и симбиосомы формируются только живыми бактериями.

Кульминацией развития клубеньков у большинства бобовых является формирование в растительных клетках симбиосом — стабильных структур, содержащих азотфиксирующие формы ризобий (бактероиды). При этом клетки обоих партнеров претерпевают глубокую дифференцировку, а также обмениваются продуктами действия *sym*-генов. Например, белки, синтезируемые *de novo* в растительной клетке, включаются не только в состав симбиосомной мембраны (производной аппарата Гольджи и эндоплазматической сети), но и в перибактероидное пространство (заполненное в основном продуктами бактериального происхождения) и даже в состав мембраны бактериоида [49]. В свою очередь, бактериальные белки включаются в перибактероидную мембрану, которая, таким образом, является химерной структурой, возникшей при объединении макромолекул прокариотического и эукариотического происхождения [62].

Ценность клубеньков как модели генетики развития заключается в том, что они являются факультативными структурами: нарушающие их мутации обычно не влияют на образование других органов, а в условиях достаточного обеспечения азотом не снижают жизнеспособность растений. Это дает возможность выявить практически любой растительный ген, участвующий в образовании клубеньков, то есть преодолеть основное ограничение генанализа развития, связанное с трудно-

Рис. 3. Генетическая программа развития недетерминированных клубеньков гороха.



Ngj-Hac-lti-lth-ltr-ltn-ldd-Bad-Nop — подпрограмма развития симбиотических компартментов; Ccd-Npd-Nmd — подпрограмма гистогенеза клубеньков ([42], модифицировано).

Aut — системная авторегуляция клубенькообразования. Символами *sym* и *nod* обозначены растительные гены, выявленные путем формально-генетического анализа [54]. RH — белки, синтезируемые при инфекции корневых волосков. ENOD — ранние нодулины (индуцируемые до начала азотфиксации). MDH — малат-дегидрогеназа, PEPC — фосфонолпируваткарбоксилаза, AAT — аспаратамино-трансфераза, GOGAT — НАДФ-зависимая глутамат-синтаза, GS — глутамин-синтаза, Lb — леггемоглобин (поздние нодулины). Бактериальные гены кодируют: *str* — конкуренцию за образование клубеньков; *nodD* — транскрипционную активацию *nod*-генов; *nodABC* — синтез коровой части Nod-фактора; *hsn* — специфичные по отношению к хозяину модификации Nod-фактора; *exo*, *lps* — синтез экзо- и липополисахаридов, ответственных за диалог бактерий с защитными системами растений; *bacA* — формирование бактериоидов; *nif*, *fix* — фиксацию N<sub>2</sub>.

Таблица 3

## Параллельная изменчивость структуры клубеньков у мутантных и дикорастущих растений (двудольные: Rosid-1)

Топология клубеньков	Дефинитивные характеристики	Мутанты*	Дикорастущие формы*
Стеблевая (периферические проводящие пучки)	Инфекционные нити формируются, однако эндоцитоз отсутствует	Var <sup>-</sup>	<i>Cassia</i> ( <i>Caesalpinioideae</i> ), <i>Andira</i> ( <i>Papilionoideae</i> )
	Инфекционные нити отсутствуют, симбиосомы образуются при эндоцитозе бактерий из межклетников	Не выявлены	<i>Arachis</i> , <i>Stylosanthes</i> ( <i>Papilionoideae</i> )
	Бактерии делятся после эндоцитоза (в симбиосомах), бактериоиды слабо дифференцированы	Bad <sup>-</sup>	<i>Glycine</i> , <i>Phaseolus</i> , <i>Vigna</i> ( <i>Papilionoideae</i> )
	Формируются инфекционные нити и симбиосомы, бактерии не делятся после эндоцитоза, бактериоиды глубоко дифференцированы	<i>Pisum</i> , <i>Trifolium</i> , <i>Medicago</i> ( <i>Papilionoideae</i> ) — «дикий тип»	
Корневая (центральный проводящий пучок)	Клубеньки развиваются из расположенных в перицикле примордиев боковых корней (небобовые) или из вновь возникающих кортикальных примордиев (мутанты бобовых)	Pvb <sup>-**</sup>	<i>Parasponia</i> ( <i>Ulmaceae</i> ), актиноризные растения
Клубеньки отсутствуют	Бактерии поддерживаются в межклетниках, иногда проникая в клетки и формируя структуры, сходные с инфекционными нитями	Nod <sup>-</sup> Itt <sup>+</sup>	<i>Gleditsia</i> , <i>Ceratonia</i> , <i>Cercis</i> ( <i>Caesalpinioideae</i> )

Примечание: \*Мутанты, имеющие данный фенотип, получены у бобовых, образующих эволюционно продвинутое недетерминированное (горох, люцерна) или детерминированное (фасоль, соя) клубеньки. Эти мутанты обычно лишены способности фиксировать N<sub>2</sub>, тогда как у дикорастущих бобовых сходные морфотипы клубеньков обеспечивают эту возможность.

\*\*Данное нарушение выявлено для детерминированных клубеньков при мутациях как растений-хозяев, так и микросимбионтов [29, 48].

стью изучения мутантов по «обязательным» морфогенам [4]. Использование этой симбиотической модели позволяет проводить анализ таких процессов, как прохождение основных стадий клеточного цикла или преобразования внутриклеточных мембранных структур [14, 32], многие нарушения которых вне симбиоза являются летальными. Еще большие возможности для генетики развития клубеньков открывает тот факт, что многие их морфогены вынесены за рамки растительного генома и кодируются бактериями (Nod-факторы, внеклеточные полисахариды), гораздо более доступными для молекулярного анализа, чем растения.

Детальная генетическая характеристика онтогенеза клубеньков позволила перейти к изучению его соотношения с филогенезом симбиотической системы. Путем мутационного анализа у бобовых удалось получить различные нарушения развития клубеньков, в том числе полное отключение некоторых подпрограмм или их блокировку на промежуточных стадиях. Анализ мутантных фенотипов позволил выявить их сходство с морфотипами клубеньков, характерными для различных групп бобовых, в том числе и для анцестральных (табл. 3). Этот факт позволяет рассматривать эволюцию клубеньков как процесс включения новых стадий (генов) в ранее существовавшие более простые морфогенетические программы (генные системы) [26, 42]. Важно отметить, что усложнение организации клубеньков происходило параллельно в различных подсемействах бобовых (у

мотыльковых и цезальпиниевых) и было сопряжено с их эволюцией от деревянистых и кустарниковых к травянистым формам [52]. Параллельное варьирование структуры клубеньков выявляется также при сравнении бобовых с родственными им «актиноридными» двудольными, вступающими в симбиоз с азотфиксирующими актиномицетами *Frankia* [59]. Таким образом, в онтогенезе клубеньков наблюдается достаточно четкое воспроизведение (рекапитуляция) основных этапов их исторического развития.

Молекулярные основы параллельной эволюции клубеньков, выявляемой при сопоставлении различных филогенетических линий двудольных, проясняются по мере накопления данных о тонкой организации *sym*-генов. У бобовых ее изучение началось с открытия нодулинов — многочисленных генов (генных продуктов), активно экспрессируемых в клубеньках, но отсутствующих в стерильных корнях [22]. Один из основных итогов изучения нодулинов состоит в том, что они не являются уникальными детерминантами клубеньков: экспрессия этих генов может быть выявлена в надземных органах бобовых, а также у растений, не образующих клубеньки (табл. 4). Эти данные позволили предположить, что магистральным путем эволюции клубенькообразования было «рекрутирование» генов, ранее выполнявших различные функции свободноживущего растения, в регуляторные системы симбиоза [25]. Очевидно, что параллелизмы, выявляемые при сравнительно-морфологиче-

Клубенек-специфичные белки бобовых и их «несимбиотические» гомологи

Белок	Активаци	Функция при симбиозе	Присутствие «несимбиотических» гомологов
ENOD	Nod-факторами	Развитие (пре)инфекционных нитей	В стеблях и цветках гороха
N-26	При эндоцитозе	Биогенез перибактероидных мембран	В тонопласте разных растений и в хрусталике глаза быка
<sup>1</sup> PEPC	Одновременно с азотфиксацией (возможно, под действием микроаэробных условий)	Рециклизация CO <sub>2</sub> при дыхании клубеньков	У C <sub>4</sub> -растений
<sup>2</sup> AAT-2		Ассимиляция фиксированного азота (синтез аспартата)	В хлоропластах разных растений
<sup>3</sup> Lb		Защита нитрогеназы от кислорода и его транспорт к симбиосомам	У разных растений (кислородсенсорные белки)

Примечание: <sup>1</sup>Фосфосолпируваткарбоксилаза, <sup>2</sup>аспартат-аминотрансфераза (пластидная форма), <sup>3</sup>леглоббин.

ском и генетическом анализе клубенькообразования, могут быть обусловлены тем, что у разных двудольных в выполнение симбиотических функций вовлекались одни и те же факторы, входившие в состав анцестрального генного пула.

Дальнейшее развитие концепция рекрутирования получила в связи с расшифровкой структур *symb*-генов, выявленных путем мутационного анализа растений. В этих работах ключевую роль сыграли модельные бобовые — *Medicago truncatula* [17] и *Lotus japonicus* [46], *symb*-гены которых удалось клонировать и использовать в качестве проб при изучении культурных видов. Оказалось, что многие *symb*-гены кодируют регуляторы транскрипции и киназы, участвующие в передаче сигналов от бактерий к хозяину, а также от его инфицированных к неинфицированным органам [13, 24, 31, 56].

Одним из центральных компонентов программы развития клубеньков является белок Nin *L. japonicus*, который, как и его гомолог Sym35 *Pisum sativum*, содержат домены, кодирующие передачу сигналов, регуляцию транскрипции, а также формирование четвертичной структуры и интеграцию в цитоплазматические мембраны [13]. В составе этих белков выявлен участок, сходный с одним из участков белка Mid *Chlamydomonas*, который обеспечивает гаметогенез на безазотной среде, то есть, как и белок Nin/Sym35, вовлечен в развитие, индуцируемое азотным голоданием. Таким образом, в эволюции симбиоза могло происходить комбинирование не только функционально разнородных растительных генов, но и доменов, ранее входившие в разные гены.

#### МИКРОБНО-РАСТИТЕЛЬНЫЕ СИМБИОЗЫ КАК ЭВОЛЮЦИОННЫЙ КОНТИНУУМ

Структурно-функциональная целостность симбиозов тесно связана с их эволюционной целостностью: надор-

ганизменные генетические системы являются объектами действия особых факторов, обеспечивающих тесно скоординированные изменения (ко-эволюцию) партнеров. В случае микробно-растительных симбиозов происходящие преобразования часто приводят к тому, что в их орбиту вовлекаются новые микробные партнеры, для взаимодействия с которыми растения используют генные системы, сложившиеся в процессе коэволюции с более древними симбионтами.

В начале 90-х годов было показано, что у бобовых многие гены клубенькообразования участвуют также и в формировании арбускулярной микоризы (АМ) — древнейшей симбиотической системы, образуемой 75–90% наземных растений с гломусовыми грибами [50]. Более того, многие белки, специфически индуцируемые в микоризованных корнях, оказались идентичными ранним нодулинам, активируемым в клубеньках до начала азотфиксации. Изучение многочисленных общих факторов, участвующих в развитии клубеньков и АМ, позволило вскрыть комплексные схемы их контроля, которые можно рассматривать как программы исторического и индивидуального развития единого трехкомпонентного симбиоза [21, 35, 44, 58] (рис. 4, 5).

Результаты генетического изучения ризобий показывают, что формирование системы их *symb*-генов определялось адаптацией к растительным факторам, регулирующим развитие АМ. Действительно, ризобии индуцируют закладку клубеньков с помощью Nod-факторов, представляющих собой олигомеры хитина — основного компонента клеточной стенки грибов [18]. Системы синтеза Nod-факторов сформированы из генов, продукты которых (трансферазы, лигазы, гидролазы, транскрипционные регуляторы) имеют близких гомологов у несимбиотических бактерий [47]. Однако лишь у ризобий эти гены организованы в особые опероны и регулируют, что обеспечивает уникальную для бактерий функ-

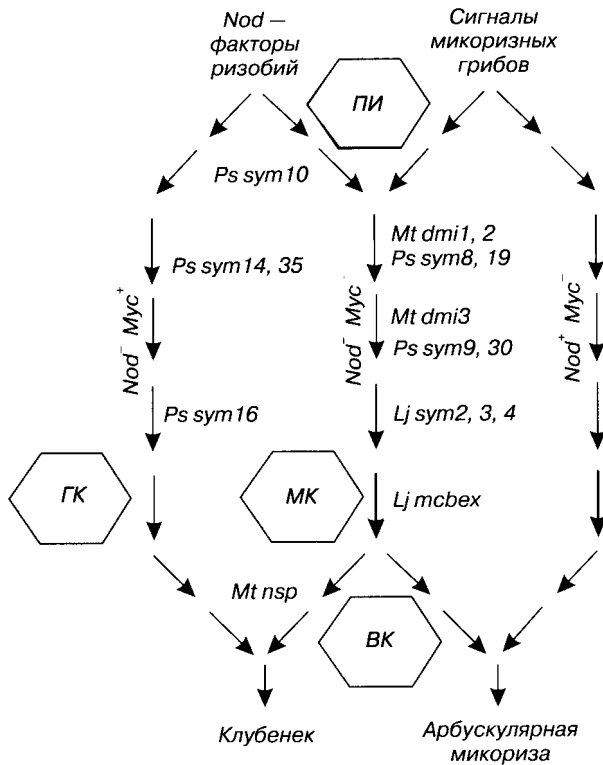


Рис. 4. Комбинированная программа развития азотфиксирующих клубеньков и арбускулярной микоризы (из [35]; модифицировано с учетом данных [54]).

Стрелками обозначены стадии развития клубеньков (Nod) и микоризы (Muc), которые нарушаются при мутациях растительных генов. Эти гены, выявленные у *Pisum sativum* (Ps), *Medicago truncatula* (Mt), *Lotus japonicus* (Lj), контролируют преинфекционные (ПИ) взаимодействия, развитие межклеточных компартментов (МК), внутриклеточных компартментов (ВК) и гистогенез клубенька (ГК)

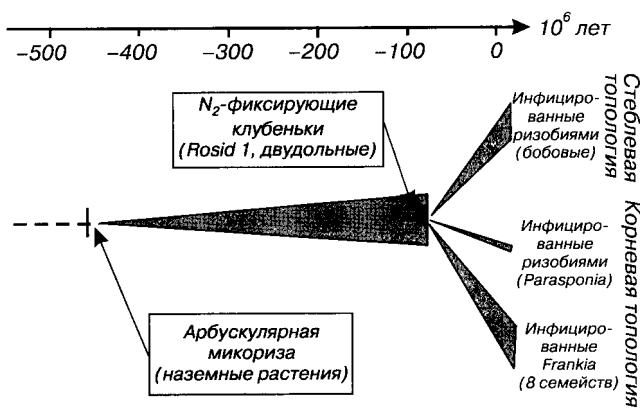


Рис. 5. Эволюционная взаимосвязь арбускулярной микоризы и азотфиксирующих клубеньков.

Способность к образованию клубеньков возникла на основе значительно более древней системы микоризации корней, а также преадаптации, которые специфичны для двудольных, относящихся к кладу *Rosid 1*

цию синтеза хитиноподобных сигналов. Логично предположить, что в процессе ко-эволюции с хозяевами ризобии приобрели способность к молекулярной мимикрии более древних грибных симбионтов, для взаимодействия с которыми растение имело уже сложившиеся генные системы. При этом со стороны бактерий, как и со стороны растений, эволюция симбиотических свойств происходила по сценарию «рекрутирования» генов, ранее выполнявших независимые клеточные функции.

Еще более тесная историческая связь АМ и клубенькообразования может быть прослежена на основании данных о том, что в гифах и спорах некоторых гломусовых грибов стабильно поддерживаются бактерии, близкие к *Burkholderia* [11, 36]. Эти бактерии, известные как растительные патогены [57] и как системные азотфиксирующие эндофиты [9, 12], недавно были обнаружены среди клубенькообразующих симбионтов бобовых [37]. Логично предположить, что анцестральные формы ризобий произошли от эндосимбионтов гломусовых грибов, тем более что развитие АМ включает регулярную деградацию арбускул, при которой содержимое грибной гифы освобождается в растительную цитоплазму [23].

Ключевой особенностью программ развития азотфиксирующих клубеньков и микоризы является наличие элементов, общих с системами защиты растений от патогенов. Действительно, в регуляции этих симбиозов важную роль играют флавоноиды, фенолы, пероксидазы, каллоза, литические ферменты (хитиназы, глюканазы), а также активные формы кислорода, то есть факторы, блокирующие проникновение фитопатогенов при реакции гиперчувствительности. Однако синтез этих факторов при мутуалистических симбиозах происходит гораздо менее активно, чем при патогенезе, и тонко регулируется сигналами, поступающими от микросимбионтов [30]. Молекулярные механизмы этой регуляции подробно изучены на примере ризобий: их экзо- и липополисахариды играют ключевую роль в диалоге с защитными системами растений. При бактериальных мутациях, нарушающих биогенез поверхностных структур, активность защитных реакций растения-хозяина резко возрастает, что приводит к ранней блокировке развития клубеньков [29, 39], а иногда и к глубокой реорганизации их структуры [48]. Интересно отметить, что недавно у ризобий были выявлены системы секреции белков III типа, которые используются многими фитопатогенными бактериями для доставки белков-эффекторов в растительные клетки [15].

Представленные данные показывают, что у растений имеются универсальные системы регуляции симбиотических взаимодействий, которые в зависимости от формы микросимбионта используются либо для его подавления (при патогенезе), либо для тесного объединения с



ним (при мутуализме). Таким образом, большинство известных форм микробно-растительного взаимодействия являются элементами единого эволюционного континуума, который начал складываться еще на заре становления наземной флоры. Недавно проведенные исследования мха *Physcomitrella patens* показали, что его защита от бактериальных патогенов (*Erwinia*) происходит с использованием тех же факторов, что и у цветковых растений [8].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адаптивный потенциал растений в значительной степени определяется комплексом их взаимодействий с симбиотическими микроорганизмами: наличие генетически и функционально разнородного микробиоценоза позволяет растению компенсировать отсутствие многих адаптивно важных биохимических функций. Изучение микробно-растительных взаимодействий вносит в развитие современной биологии все больший вклад, связанный с оформлением новой области знаний — симбиогенетики, предметом которой являются надорганизменные генные системы. В то же время значение симбиогенетики выходит далеко за рамки изучения симбиоза: она предоставляет исследователям возможности для разработки широкого круга общебиологических проблем, связанных с индивидуальным развитием, формированием адаптивного потенциала и эволюцией растений, животных и микроорганизмов.

Примером использования подходов симбиогенетики для решения фундаментальных биологических проблем является изучение эволюции клубенькообразования, которое стало возможным благодаря детальному анализу их развития. Накопленные данные позволили построить достаточно цельную картину рекапитуляции морфогенетических программ симбиоза у растений [42], для которых действие биогенетического закона изучено гораздо менее полно, чем для животных [2, 45]. Эта модель открывает перед биологами уникальную пока возможность познания молекулярных механизмов прогрессивной эволюции: параллельное усложнение структуры клубеньков в различных линиях растений, по-видимому, было основано на закономерном рекрутировании в регуляторные системы симбиоза наследственных факторов из анцестрального генного пула двудольных.

Одним из мощных стимулов для развития симбиогенетики являются работы, направленные на реконструкцию процессов, которые привели к становлению полуавтономных клеточных органелл эукариот — митохондрий, пластид, гидрогеносом. В настоящее время уже не вызывает серьезных сомнений то, что эти органеллы, имеющие собственные геномы, возникли из предковых прокариотических микроорганизмов, претерпевших глубокую генетическую редукцию, а затем и рекомбинацию

с клеткой-хозяином [63]. Изучение современных микросимбионтов растений и животных уже позволило восстановить некоторые этапы перехода симбиотических микробов в состояние полной подчиненности клетке-хозяину [33, 55]. Более того, выяснилось, что симбиозы, образуемые ризобиями в клубеньках бобовых, по ряду морфологических и биохимических критериев могут считаться аналогами регулярных клеточных органелл [45]. Построение филогенетических рядов, связывающих свободноживущие бактерии и органеллы — увлекательная задача для будущих исследований. И наконец, изучение генетики и эволюции симбиозов не следует считать чисто академическим направлением науки — оно освещает пути развития биоинженерии, направленной на создание новых организмов и высокопродуктивных надорганизменных комплексов.

Работа поддержана грантами Президента России (НШ-1103.2003.04), РФФИ (01-04-48580, 03-04-49555), НАТО-Россия (JSTC.RCLG.979133), CRDF (ST-012-0).

### Литература

1. Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г., Бигирова С.Ф. Общая и молекулярная фитопатология. — М.: Общество фитопатологов, 2001. — 302 с.
2. Козо-Полянский Б.М. Основной биогенетический закон с ботанической точки зрения. Воронежское областное книгоиздательство, 1937. — 255 с.
3. Лобашов М.Е. Генетика. — 2-е изданиис. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1967. — 751 с.
4. Лутова Л.А., Проворов Н.А., Тиходеев О.Н. и др. Генетика развития растений / Под ред. С.Г. Ингс-Вечтомова. — СПб.: Наука, 2000. — 539 с.
5. Любищев А.А. Из переписки С.В. Мейсена и А.А. Любищевой (1968–1972) // Природа. — 1990. — № 4. — С. 81.
6. Проворов Н.А. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе // Журн. Общей биологии. — 2001. — Т. 62. — № 6. — С. 472–495.
7. Тихонович И.А., Проворов Н.А. (ред.). Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции. — СПб.: Наука, 1998. — 194 с.
8. Akita M., Andersson R.A., Pirhonen M. et al. Moss as a model system for studies on plant-pathogen interactions // Biology of Plant-Microbe Interactions. Vol. 4. / Eds. Tikhonovich I.A., Lugtenberg B.J.J., Provorov N.A. St.-Petersburg: IS-MPMI, 2004 (in press).
9. Balandreau J., Viillard V., Cournoyer B. et al. *Burkholderia cepacia* Genomovar III is a common plant-associated bacterium // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — Vol. 67. — N 2. — P. 982–985.
10. Baumann P., Moran N.A., Baumann L. The evolution and genetics of aphid endosymbionts // BioSci. — 1997. — Vol. 47, N 1. — P. 12–20.
11. Bianciotto V., Lumini E., Lanfranco L. et al. Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family Gigasporaceae // Appl. Environ. Microbiol. — 2000. — Vol. 66. — P. 4503–4509.
12. Bodley R.M., Reis V.M., Urquigava S. et al. N<sub>2</sub> fixation in sugar cane: the role of *Acetobacter diazotrophicus* // Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications / Eds. Tikhonovich I.A., Provorov N.A., Romanov V.I., Newton B.E. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. — P. 641–646.
13. Borisov A.Y., Madsen L.H., Tsyganov V.E. et al. The *Sym35* gene required for root nodule development in pea is an ortholog of *Nin*

- from *Lotus japonicus* // *Plant Physiol.* — 2003. — Vol. 131. — P. 1009–1017.
14. *Brewin N.J.* Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes // *The Rhizobiaceae* / Eds. Spaink H., Konodorosi A., Hooykaas P.J. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. Publ. — 1998. — P. 417–429.
  15. *Buttner D., Bonas U.* Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria // *Current Opinions in Plant Biology.* — 2003. — Vol. 6. — P. 312–319.
  16. *Charles T.C., Shouguang J., Nester E.W.* Two-component sensory transduction systems in phytobacteria // *Ann. Rev. Phytopathol.* — 1992. — Vol. 30. — P. 463–484.
  17. *Cook D.R.* *Medicago truncatula* — a model for making! // *Current Opinions in Plant Biology.* — 1999. — Vol. 2. — P. 301–304.
  18. *Denarie J., Debelle F., Rosenberg C.* Signaling and host range variation in nodulation // *Annu. Rev. Microbiol.* — 1992. — Vol. 46. — P. 497–511.
  19. *Douglas A.E.* Symbiotic interactions. Oxford; New York; Toronto: Oxford Univ. Press, 1994. — 148 p.
  20. *Flor H.H.* Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini* // *J. Agric. Res.* — 1946. — Vol. 73. — P. 335–357.
  21. *Franken P., Requena N.* Analysis of gene expression in arbuscular mycorrhizas: new approaches and challenges // *New Phytologist.* — 2001. — Vol. 150. — P. 517–523.
  22. *Franssen H.J., Nap J.P., Bisseling T.* Nodulins in root nodule development // *Biological Nitrogen Fixation* / Eds. Stacey G., Burris R.H., Evans H.J. New York, London: Chapman and Hall. — 1992. — P. 598–624.
  23. *Gianinazzi-Pearson V.* Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis // *The Plant Cell.* — 1996. — Vol. 8. — P. 1871–1883.
  24. *Gresshoff P.M., Buzas D.M., Laniya T.* et al. Systemic regulation of nodulation by a leaf-controlled LRR-receptor kinase // *Biology of Plant-Microbe Interactions.* V. 4. / Eds. Tikhonovich I.A., Lugtenberg B.J.J., Provorov N.A. St.-Petersburg: IS-MPMI, 2004 (in press).
  25. *Gualtieri G., Bisseling T.* The evolution of nodulation // *Plant Mol. Biol.* — 2000. — Vol. 42. — P. 181–194.
  26. *Guinel F.C., Geil R.D.* A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment of these two symbioses // *Canad. J. Bot.* — 2002. — Vol. 80. — P. 695–720.
  27. *Herd S., Christensen M.J., Saunders K.* et al. Quantitative assessment of *in planta* distribution of metabolic activity and gene expression of an endophytic fungus // *Microbiology.* — 1997. — Vol. 143. — P. 267–275.
  28. *Kaminski P.A., Batut J., Boistard P.* A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia // *The Rhizobiaceae* / Eds. Spaink H., Konodorosi A., Hooykaas P.J.J. Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ. — 1998. — P. 431–460.
  29. *Kannenberg E.L., Reuhs B.L., Forsberg L.S., Carlson R.W.* Lipopolysaccharides and K-antigens: their structures, biosynthesis and functions // *The Rhizobiaceae* / Eds. Spaink H., Konodorosi A., Hooykaas P.J. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. Publ. — 1998. — P. 119–154.
  30. *Kapulnik Y., Volpin H., Itzhaki H.* et al. Suppression of defense responses in mycorrhizal alfalfa and tobacco roots // *New Phytologist.* — 1996. — Vol. 133. — P. 59–64.
  31. *Kistner C., Parniske M.* Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis // *Trends in Plant Sci.* — 2002. — Vol. 7. — N 11. — P. 511–518.
  32. *Kondorosi A., Vinardell J.-M., Nikovics K.* et al. Plant-microbe interactions — a tool for studying plant development // *Biology of Plant-Microbe Interactions.* V. 4. / Eds. Tikhonovich I.A., Lugtenberg B.J.J., Provorov N.A. St.-Petersburg: IS-MPMI, 2004 (in press).
  33. *Lang B.F., Gray M.W., Burger G.* Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes // *Annu. Rev. Genet.* — 1999. — Vol. 33. — P. 351–397.
  34. *Loegering W.Q.* Current concepts of interorganismal genetics // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 1978. — Vol. 16. — P. 309–320.
  35. *Marsh J.F., Schultze M.* Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis defective plant mutants // *New Phytologist.* — 2001. — Vol. 150. — P. 525–532.
  36. *Minerdi D., Fani R., Gallo R.* et al. Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2001. — Vol. 67. — P. 725–732.
  37. *Moulin L., Munive A., Dreyfus B., Boivin-Masson C.* Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria // *Nature.* — 2001. — Vol. 411. — P. 948–950.
  38. *Nester E., Wood D., Pantoja M., Liu P.* *Agrobacterium*-plant interactions: unfinished business and continuing surprises // *Biology of Plant-Microbe Interactions.* — Vol. 4. / Eds. Tikhonovich I.A., Lugtenberg B.J.J., Provorov N.A. St.-Petersburg: IS-MPMI, 2004 (in press).
  39. *Niehaus K., Kapp D., Puhler A.* Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS-1)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant // *Planta.* — 1993. — Vol. 190. — P. 415–425.
  40. *Nutman P.S.* Genetic factors concerned in the symbiosis of clover and nodule bacteria // *Nature.* — 1946. — Vol. 157. — N 3989. — P. 463–465.
  41. *Person C., Samborski D.J., Rohringer R.* The gene-for-gene concept // *Nature.* — 1962. — Vol. 194. — P. 561–562.
  42. *Provorov N.A., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A.* Developmental genetics and evolution of symbiotic structures in nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza // *J. Theor. Biol.* — 2002. — Vol. 214. — N 2. — P. 215–232.
  43. *Quispel A.* Evolutionary aspects of symbiotic adaptations: *Rhizobium* contribution to evolution of associations // *The Rhizobiaceae* / Eds. Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas P.J.J. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. — 1998. — P. 487–507.
  44. *Renzel Z.* Breeding for better symbiosis // *Plant and Soil.* — 2002. — Vol. 245. — N 1. — P. 147–162.
  45. *Ruse M.* Limits to our knowledge of evolution // *Evolutionary Biology.* Vol. 32 / Eds. Clegg M.T., Hecht M.K., Macintyre R.J. Kluwer Acad. Plenum Publ. New York, 2000. — P. 3–33.
  46. *Schauser L., Roussis A., Stiller J., Stougaard J.* A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules // *Nature.* — 1999. — Vol. 402. — P. 191–195.
  47. *Schultze M., Kondorosi A.* Regulation of symbiotic root nodule development // *Annu. Rev. Genet.* — 1998. — Vol. 32. — P. 33–57.
  48. *Shizliffe S.J., Vessey J.K.* A nodulation (Nod+/Fix-) mutant of *Phaseolus vulgaris* L. has nodule-like structures lacking peripheral vascular bundles (Pvb-) and is resistant to mycorrhizal infection (Myc-) // *Plant Sci.* — 1996. — Vol. 118. — P. 209–220.
  49. *Simonsen A.C.W., Rosendahl L.* Origin of *de novo* synthesized proteins in the different compartments of pea-*Rhizobium* sp. symbiosomes // *Mol. Plant-Microbe Interact.* — 1999. — Vol. 12. — N 4. — P. 319–327.
  50. *Smith S.E., Read D.J.* *Mycorrhizal Symbiosis* (second edition). San Diego, London, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, 1997. — 590 p.
  51. *Spaink H.P.* The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of sympathogenesis // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 1995. — Vol. 33. — P. 345–368.
  52. *Sprent J.I.* Nodulation in legumes. Cromwell Press Ltd. Royal Botanical Gardens, Kew, 2001. — 146 p.
  53. *Steinert M., Hentschel U., Hacker J.* Symbiosis and pathogenesis: evolution of the microbe-host interaction // *Naturwissenschaften.* — 2000. — Vol. 87. — P. 1–11.
  54. *Tsyganov V.E., Voroshilova V.A., Priefer U.B.* et al. Genetic dissection of the initiation of the infection process and nodule tissue development in the *Rhizobium* — pea (*Pisum sativum* L.) symbiosis // *Annals of Botany.* — 2002. — Vol. 89. — P. 357–366.

55. Turmel M., Otis C., Lemieux C. The chloroplast and mitochondrial genome sequences of the charophyte *Chaetosphaeridium globosum*: insights into the timing of the events that restructured organelle DNAs within the green algal lineages that lead to land plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99. — N 17. — P. 11275–11280.
56. Van der Holst P.P.G., Gronlund M., Stougaard J., Spaink H.P. Symbiosis and defense: two sides of one coin // Biology of Plant-Microbe Interactions. V. 4. / Eds. Tikhonovich I.A., Lugtenberg B.J.J., Provorov N.A. St.-Petersburg: IS-MPMI, 2004 (in press).
57. Vivian A., Murillo J., Jackson R.W. The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals // Microbiology. — 2001. — Vol. 147. — P. 763–780.
58. Walker S.A., Viprey V., Downie J.A. Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97. — N 24. — P. 13413–13418.
59. Wall L.G. The actinorhizal symbiosis // J. Plant Growth Regul. — 2000. — Vol. 19. — P. 167–182.
60. Wilkinson D.M. At cross purposes. How do we cope with scientific terms that have two different definitions? // Nature. — 2001. — Vol. 412. — P. 485.
61. Williamson V.M., Gleason C.A. Plant-nematode interactions // Current Opinions in Plant Biology. — 2003. — Vol. 6. — P. 327–333.
62. Winzer T., Baird A., Linder M. et al. A novel 53-kDa noduline of the symbiosome membrane of soybean nodules, controlled by *Bradyrhizobium japonicum* // Mol. Plant-Microbe Interact. — 1999. — Vol. 12. — N 3. — P. 218–226.
63. Zerges W. Does complexity constrain organelle evolution? // Trends in Plant Science. — 2002. — Vol. 7. — N 4. — P. 175–182.

#### Symbiotic genetics of plant-microbe interactions

I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov

Russian Science Research Institute of agricultural microbiology of the Russian agricultural academy, Saint Petersburg.

✿ THE SUMMARY: We present the concept of symbiogenetics defined as a branch of general genetics which investigates the Super-Organism Genetic Systems (SOGS) formed due to functional integration of partners' genes during symbiotic interactions. The minimal hereditary unit within SOGS involves no less than a pair of genes that belong to different partners and interact according to the models of complementation or epistasis. Using the examples of plant-microbe interactions we demonstrate that the integrity of SOGS is maintained due to tight signal interactions between partners and is manifested as formation of common biochemical pathways and as development of special symbiotic structures. Using the models of nodule development we demonstrate that the origin of SOGS involves recruiting of genes, which performed diverse functions in free-living organisms, into the symbiotic regulatory networks. The progressive evolution of nodule structures in different dicot lineages was based on the parallel recruiting of genes from the ancestral gene pool into symbiotic regulatory networks. The majority of mutualistic and antagonistic plant-microbe symbioses represent the components of an evolutionary continuum that originated early in land plants and underwent intensive transformations due to high plasticity of SOGS based on inter- and intra-gene recombination.

✿ KEY WORDS: symbiosis, symbiogenetics, plant-microbe interactions, nodule bacteria, arbuscular mycorrhiza, phytopathogens, co-evolution, super-organism genetic system, symbiotic N<sub>2</sub>-fixation, leguminous plants.