

© Воробьев Н. И.,
Проворов Н. А.

ГУ ВНИИ сельскохозяйственной
микробиологии
Россельхозакадемии, Пушкин,
Санкт-Петербург

✿ Предложена математическая модель эволюции азотфиксирующего бобово-ризобияльного симбиоза в условиях мультиштаммовой конкуренции бактерий за инокуляцию симбиотических ниш (ризосферы, клубеньков). Конкуренентоспособность каждого штамма характеризуется степенными коэффициентами, которые отражают давление частотно-зависимого отбора в популяции ризобий. Анализ модели показал, что при взаимодействии полиморфных популяций бактерий с диморфной растительной популяцией давление отбора в пользу специфичных симбионтов (образующих N_2 -фиксирующие клубеньки только с одним из растительных генотипов) выше, чем в пользу неспецифичных симбионтов (образующих такие клубеньки с обоими генотипами растений).

Максимальная эффективность мутуалистического симбиоза достигается при промежуточном уровне изменчивости растительной популяции.

✿ **Ключевые слова:** клубеньковые бактерии; симбиотическая N_2 -фиксация; мутуалистические симбиозы; естественный отбор; положительные обратные связи партнеров; полиморфизм популяций; мультиштаммовая конкуренция; инокуляция и колонизация симбиотических ниш.

Поступила в редакцию 28.08.2008
Принята к публикации 18.10.2008

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭВОЛЮЦИИ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА ПРИ МУЛЬТИШТАММОВОЙ КОНКУРЕНЦИИ БАКТЕРИЙ ЗА ИНОКУЛЯЦИЮ СИМБИОТИЧЕСКИХ НИШ

ВВЕДЕНИЕ

Анализ популяционно-генетических механизмов эволюции микробно-растительных симбиозов представляет большой интерес в связи с необходимостью выявления механизмов самоорганизации систем факультативного мутуализма, поскольку эти механизмы не могут быть сведены к действию Дарвиновского отбора (Person et al., 1962; Maynard Smith, 1989; Frank, 1994). Ранее мы (Проворов и др., 2008; Provorov, Vorobyov, 2008a) показали, что при клональном размножении ризобий в клубеньках эволюция признаков мутуализма у бактерий может осуществляться посредством группового (междемового, родственного) отбора. При смешанном инфицировании клубеньков фиксирующими и не фиксирующими N_2 штаммами ризобий эволюция мутуализма обусловлена частотно-зависимым и Дарвиновским отборами, действующими в популяциях бактерий при инокуляции и колонизации симбиотических (ризосферной, клубеньковой) ниш (Проворов, Воробьев, 2009). Характер этой эволюции определяется положительными обратными связями партнеров, которые основаны на их обмене С- и N-метаболитами и вызывают предпочтительное размножение N_2 -фиксирующих штаммов ризобий в симбиотических нишах.

Ранее действие частотно-зависимого отбора (ЧЗО) в системе мутуалистического симбиоза было изучено нами для диморфных популяций ризобий, в которых конкуренция за инфицирование клубеньков описывалась эмпирически установленной нелинейной зависимостью (Amarger, Lobreau, 1982):

$$\frac{\psi_{N,1}}{\psi_{N,2}} = c \cdot \left(\frac{\psi_{I,1}}{\psi_{I,2}} \right)^a, \quad (1)$$

где $\psi_{I,1}$ и $\psi_{I,2}$ — частоты 1-го и 2-го штаммов в инокулюме ($\psi_{I,1} + \psi_{I,2} = 1$); $\psi_{N,1}$ и $\psi_{N,2}$ — то же в клубеньках ($\psi_{N,1} + \psi_{N,2} = 1$); 'a' и 'c' параметры, характеризующие данную пару штаммов ($c > 0$; $0 < a < 1$).

При изучении модели двухштаммовой конкуренции (1) выяснилось (Provorov, Vorobyov, 2008b; Проворов, Воробьев, 2009), что для не специфичного по отношению к хозяину симбионта (фиксирующего N_2 при взаимодействии с обоими имеющимися в системе растительными генотипами) условия закрепления в симбиосистеме более ограничены, чем для специфичного симбионта (фиксирующего N_2 только с одним из растительных генотипов). При этом максимальная эффективность мутуалистического симбиоза (ЭМС), которую определяли на основании частоты неспецифичного симбионта, может быть достигнута как при высоких, так и при низких уровнях полиморфизма растительной популяции.

В настоящей статье для анализа механизмов связи ЭМС со специфичностью взаимодействия партнеров была проведена модификация модели, которая позволила нам приступить к анализу эволюционных эффектов мультиштаммовой конкуренции. Необходимость этой модификации очевидна из того, что в природных условиях установление симбиоза происходит при взаимодействии бобовых с высоко полиморфными популяциями ризобий, которые насчитывают десятки или даже сотни генотипов, варьирующих по интенсивности симбиотической азотфиксации, а также по специфичности, проявляемой в отношении разных форм растений (см. обзоры: Проворов, Воробьев, 2000; Проворов, 2000). Анализ модифицированной модели позволил нам сопоставить действие отбора в пользу различных типов симбионтов, что открыло возможность для выяснения селективных механизмов связи ЭМС со специфичностью взаимодействия партнеров и с уровнем полиморфизма их популяций.

1. МУЛЬТИШТАММОВАЯ КОНКУРЕНЦИЯ В ПОПУЛЯЦИИ РИЗОБИЙ

Модификация созданной ранее модели была начата с замены параметров 'a' и 'c' из формулы (1), которые являются «общими» для рассматриваемых штаммов, на индивидуальные параметры (индексы инокуляции) каждого штамма. Эта замена основана на предположении о том, что при взаимодействии полиморфной популяции ризобий с растением-хозяином вклад в инокуляцию новой (симбиотической) ниши, вносимый *i*-тым штаммом, зависит от его частоты, возведенной в степень 'bi':

$$\psi_{n,i} = \psi_{o,i}^{b_i} / U, \quad (2)$$

где: $\psi_{n,i}$ и $\psi_{o,i}$ — частоты *i*-того штамма в новой и исходной нишах; b_i — индекс инокуляции, характеризующий конкурентоспособность *i*-того штамма при миграции бактерий в новую нишу;

$U = \sum_{i=1}^N \psi_{o,i}^{b_i}$ — нормирующая величина, которая обеспечивает выполнение условия

$\sum_{i=1}^N \psi_{n,i} = 1$ (N — общее число штаммов, вовлеченных в конкурентный процесс).

Если в конкуренции за симбиотические ниши участвуют два штамма, у которых индексы инокуляции равны ($b_1 = b_2 = a$), то формула (2) может быть преобразована в формулу (1) при условии $c = 1$ (которое соответствует равной конкурентоспособности изучаемых штаммов). Исходя из предположения о том, что конкуренция ризобий за инокуляцию ризосферной и клубеньковой ниш подчиняется единым закономерностям, мы представили их инокуляцию как два последовательных процесса, причем инокуляция клубеньков осуществляется

бактериями из популяции, которая сформировалась в ризосфере в результате ее инокуляции. При этом мы считали, что колонизация ризосферы и клубеньков (размножение в них бактерий) начинается после инокуляции клубеньков и происходит параллельно в обеих нишах. В соответствии с этими предположениями, инокуляция симбиотических ниш почвенной популяцией ризобий, состоящей из N штаммов, представлена системой уравнений:

$$\left\{ \begin{array}{l} \psi_{R,1} = \psi_{I,1}^{r,1} : \theta_r, \quad \psi_{N,1} = \psi_{R,1}^{n,1} : \theta_n \\ \psi_{R,2} = \psi_{I,2}^{r,2} : \theta_r, \quad \psi_{N,2} = \psi_{R,2}^{n,2} : \theta_n \\ \psi_{R,3} = \psi_{I,3}^{r,3} : \theta_r, \quad \psi_{N,3} = \psi_{R,3}^{n,3} : \theta_n \\ \dots \\ \psi_{R,N} = \psi_{I,N}^{r,N} : \theta_r, \quad \psi_{N,N} = \psi_{R,N}^{n,N} : \theta_n \end{array} \right. \quad (3)$$

где: $\psi_{I,1}, \psi_{I,2}, \psi_{I,3}, \dots, \psi_{I,N}$ — частоты 1-го, 2-го, 3-го, ..., N -го штаммов в почве;

$\psi_{R,1}, \psi_{R,2}, \psi_{R,3}, \dots, \psi_{R,N}$ — то же в ризосфере;

$\psi_{N,1}, \psi_{N,2}, \psi_{N,3}, \dots, \psi_{N,N}$ — то же в клубеньках;

$r,1, r,2, r,3, \dots, r,N$ — индексы инокуляции ризосферы;

$n,1, n,2, n,3, \dots, n,N$ — индексы инокуляции клубеньков;

$\theta_r = \sum_{i=1}^N \psi_{I,i}^{r,i}$ — нормирующая величина, которая обеспечивает выполнение условия $\sum_{i=1}^N \psi_{R,i} = 1$, $\theta_n = \sum_{i=1}^N \psi_{R,i}^{n,i}$; — то же для условия $\sum_{i=1}^N \psi_{N,i} = 1$.

Сравнение описаний конкурентных процессов новой моделью (3) и исходной моделью (1), проведенное с использованием экспериментальных данных о двухштаммовой конкуренции ризобий фасоли (табл. 1), демонстрирует большую точность модели (3). Она определяется тем, что модель (3) описывает процесс инокуляции клубеньковых ниш посредством четырех параметров (по два индекса инокуляции для каждого штамма), а модель (1) — только двумя параметрами. Кроме того, модель (3) основана на наиболее реалистичных представлениях о конкурентных процессах в популяциях симбиотических бактерий, в соответствии с которыми инокуляция каждой новой ниши определяется состоянием бактериальной популяции в предшествующей нише (например, частотой физиологически активных клеток, способных мигрировать в новую нишу).

Проведенная модификация модели открыла возможность для расширенного изучения свойств микробно-растительной системы, в первую очередь — для анализа действия ЧЗО в полиморфной бактериальной популяции. Давление отрицательного ЧЗО при инокуляции бактериями новой ниши определяется индекса-

Таблица 1

Сравнение экспериментальных и расчетных частот двух конкурирующих штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* в клубеньках фасоли (*Phaseolus vulgaris*) при разных соотношениях штаммов в инокулюме (по данным: Beattie et al., 1989)

Экспериментальные данные*			Расчетные данные				
I,1	I,2	$\Psi_{N,I}$	Модель (1)		Модель (3)		
			$\Psi_{N,I}$	c, a	$\Psi_{N,I}$	Ризосфера г.1, г.2	Клубеньки п.1, п.2
89	11	90,0±8	92,0	c = 4,945 a = 0,403	90,0	г.1 = + 0,663 г.2 = - 0,055	п.1 = + 0,028 п.2 = + 3,707
50	50	85,0±7	83,2		85,0		
20	80	74,0±19	73,9		74,0		
7	93	63,0±11	63,6		63,0		
8,9	1,1	90,0±5	90,5	c = 4,267 a = 0,385	90,0	г.1 = + 0,380 г.2 = + 0,147	п.1 = + 0,335 п.2 = + 2,830
5	5	81,5±6	81,0		81,5		
2	8	71,5±9	71,4		71,5		
0,7	9,3	61,0±7	61,2		61,0		
0,89	0,11	92,5±5	90,2	c = 4,930 a = 0,297	92,5	г.1 = + 0,783 г.2 = + 0,303	п.1 = - 0,293 п.2 = + 2,331
0,5	0,5	82,0±9	83,1		82,0		
0,2	0,8	74,0±10	76,6		74,0		
0,07	0,93	71,5±6	69,6		71,5		
0,089	0,011	94,5±5	90,8	c = 4,617 a = 0,365	94,5	г.1 = + 0,493 г.2 = + 0,700	п.1 = - 0,180 п.2 = + 1,661
0,05	0,05	80,0±12	82,2		80,0		
0,02	0,08	71,0±11	73,6		71,0		
0,007	0,093	66,5±9	64,3		66,5		
0,0089	0,0011	91,5±7	93,5	c = 4,831 a = 0,519	91,5	г.1 = + 0,719 г.2 = - 0,017	п.1 = + 0,156 п.2 = + 3,931
0,005	0,005	84,5±11	82,9		84,5		
0,002	0,008	70,0±10	70,2		70,0		
0,0007	0,0093	55,5±15	55,8		55,5		
Доверительный интервал, %			±3,8	—	±0,0	—	—

* I.1 и I.2 — количество клеток конкурирующих штаммов в инокулюме ($\times 10^5$ /мл); $\Psi_{N,I}$ — доля 1-го штамма в клубеньках (%).

ми инокуляции $0 < g_i, p_i < 1$ (чем они ближе к 0, тем выше давление отрицательного ЧЗО, осуществляемого в пользу i-того штамма). В то же время, в некоторых вариантах опыта (табл. 1) величины индексов инокуляции могут выходить за пределы указанного интервала, что указывает на возможность рассмотрения в рамках модифицированной модели действия и других форм отбора, например, положительного ЧЗО.

3. МИКРОЭВОЛЮЦИЯ СИМБИОЗА ПРИ МУЛЬТИШТАММОВОЙ КОНКУРЕНЦИИ

Мы рассмотрели микроэволюцию симбиотической системы, включающей родительский штамм ризобий (P), который образует у обоих имеющихся в системе растительных генотипов не фиксирующие N₂ клубеньки, и его мутанты:

- M1, фиксирующий N₂ в симбиозе только с 1-м растительным генотипом;
- M2, фиксирующий N₂ только со 2-м растительным генотипом;
- M3, фиксирующий N₂ с обоими растительными генотипами.

Математическое описание циклической эволюции симбиоза (структуры t-го микроэволюционного цикла) соответствует предложенному ранее (Provoov, Vorobyov, 2008b) за исключением процессов инокуляции симбиотических ниш, модификация которых представлена в разделе 2. Как и ранее, ЭМС охарактеризована с использованием параметров положительной обратной связи партнеров (основанной на их обмене C- и N-метаболитами), благодаря которой доля N₂-фиксирующего штамма в клубеньках определяет репродуктивный потенциал как самих бактерий, так и растений-хозяев.

Таблица 2

Индексы генного разнообразия и эффективность мутуалистического симбиоза (ЭМС), характерные для различных микробно-растительных систем в финальном состоянии

Штаммы ризобий, входящие в системы (типы систем)*	Индексы генного разнообразия**		ЭМС (см. раздел 3.1)		Частоты (%) Р-генотипа в почве
	Бактерии	Растения	Бактерии	Растения	
P+M1 (A)	0,98	0,01	0,524	0,537	42,6
P+M2 (A)	0,98	0,01	0,524	0,537	42,6
P+M3 (C)	0,99	1,0	0,527	0,541	45,4
P+M1+M2 (C)	0,999	1,0	0,355	0,370	31,6
P+M1+M3 (УА)	0,995	0,56	0,598	0,609	28,5
P+M2+M3 (УА)	0,995	0,56	0,598	0,609	28,5
P+M1+M2+M3 (C)	0,999	1,0	0,520	0,533	22,6

* Симбиотические фенотипы штаммов описаны в вводной части раздела 3. Типы симбиотических систем: С — симметричные (растительные генотипы имеют равное число N_2 -фиксирующих симбионтов), А — асимметричные (N_2 -фиксирующие симбионты имеются только для одного растительного генотипа), УА — умеренно асимметричные (для одного растительного генотипа имеется два N_2 -фиксирующих симбионта, а для другого генотипа — только один).

** Индексы рассчитывали по формуле: $H = (1 - \sum p_i^2) \times [n / (n - 1)]$, где p_i — частота i-го генотипа, n — общее число генотипов (Nei, 1978).

3.1. Общие закономерности

При сопоставлении 7 симбиосистем, включающих 2–4 штамма ризобий, можно видеть (табл. 2), что максимальная гетерогенность (индексы генного разнообразия близки к 1) в финальном состоянии системы (при $t \rightarrow \infty$) всегда реализуется для бактериальной популяции. В растительной популяции величина $H = 1$ характерна только для симметричных систем «P+M3», «P+M1+M2» и «P+M1+M2+M3», в которых численности растительных генотипов равны, так как они имеют равные возможности для образования N_2 -фиксирующего симбиоза. В асимметричных системах («P+M1» и «P+M2») растительная популяция близка к гомогенности ($H=0,01$): не образующий N_2 -фиксирующие клубеньки генотип сохраняется в системе с частотой 0,2 % только благодаря действию ЧЗО на стадии прорастания семян. В умеренно асимметричных системах («P+M1+M3» и «P+M2+M3») гетерогенность растительной популяции имеет промежуточное значение ($H=0,56$), которое соответствует наличию доминирующего и минорного генотипов (первый образует N_2 -фиксирующие клубеньки с двумя штаммами ризобий, а второй — только с одним штаммом).

Анализ модели позволил нам количественно охарактеризовать ЭМС, которую мы определяли, вычисляя «пиковые» численности, реально достигаемые каждым из партнеров на t-том микроэволюционном цикле (бактериями — по окончании колонизации симбиотических ниш, растениями — после формирования семян) в финальном состоянии системы (при $t \rightarrow \infty$) при характерной для нее частоте N_2 -фиксирующих бактерий в клубеньках, Ψ_t ($0 < \Psi_t < 1$). Затем эти численности относили к максимально допустимым «пиковым» численностям, которые могут быть достигнуты при $\Psi_t = 100$ %.

Оказалось, что наиболее высокие из полученных при этом значений ЭМС (близкие к 0,6) достигаются обоими партнерами в умеренно асимметричных системах («P+M1+M3» и «P+M2+M3»), то есть при промежуточном уровне полиморфизма растений (табл. 2).

Для того чтобы изучить динамику формирования симбиоза, мы проанализировали зависимость показателей его финальной структуры (частоты генотипов партнеров при $t \rightarrow \infty$) от системных параметров, характеризующих давления отбора в популяциях бактерий и растений, а также эффективность их метаболических связей. Для этого мы путем компьютерных экспериментов, проведенных в вычислительной среде MathCad2000, определяли относительные изменения показателей генетической структуры, происходящие при изменении системных параметров на 1 % по сравнению с базовыми значениями (табл. 3). В каждом компьютерном эксперименте мы меняли только один параметр, а остальные сохраняли равными базовым значениям. По своему биологическому смыслу получаемые при этом относительные изменения параметров генетической структуры симбиосистемы близки к коэффициентам отбора, индуцируемого в популяциях партнеров в ходе симбиотического взаимодействия, и мы будем далее называть эти относительные изменения коэволюционными ответами (КЭТ). Величины КЭТ характеризуют чувствительность моделируемой системы к частным изменениям ее системных параметров, которые могут происходить в результате внешних воздействий.

Таблица 3

Системные параметры модели, использованные для проведения компьютерных экспериментов

Микроэволюционные факторы	Параметры модели, характеризующие действие микроэволюционных факторов				
	Наименования	Обозначения	Величины, выражающие параметры	Базовые значения	
Частотно-зависимый отбор в бактериальной популяции	Индексы инокуляции ризосферы	P	г.0	Безразмерные величины	0,6
		M1	г.1		0,6
		M2	г.2		0,6
		M3	г.3		0,6
	Индексы инокуляции клубеньков	P	п.0	Безразмерные величины	0,6
		M1	п.1		0,6
		M2	п.2		0,6
		M3	п.3		0,6
Дарвиновский отбор в бактериальной популяции	Относительные скорости размножения М:Р в ризосфере	M1	v1	Безразмерные величины	1,1 и 1,0*
		M2	v2		1,0 и 1,1*
		M3	v3		1,1
	Относительные скорости размножения М:Р в клубеньках	M1	ω1	Безразмерные величины	1,1 и 1,0*
		M2	ω2		1,0 и 1,1*
		M3	ω3		1,1
Относительные скорости отмирания М:Р в почве	M1	w1	Безразмерные величины	1,01	
	M2	w2		1,01	
	M3	w3		1,02	
Частотно-зависимый отбор в растительной популяции	Степенной индекс в модели конкуренции, происходящей в растительной популяции при прорастании семян**		λ	Безразмерная величина	0,6
Индукцированный бактериями отбор в растительной популяции**	Максимальное количество семян, образуемых каждым растением (при 100 % частоте F _{ix} + бактерий в клубеньковой нише)		P _{max}	Число семян	20
Метаболические обратные связи партнеров	Объем инокуляции ризосферной ниши		R ₀	Число клеток	10 ¹²
	Максимальный объем колонизации ризосферной ниши (при 100 % частоте F _{ix} + бактерий в клубеньковой нише)		R _{max}		30 · 10 ¹²
	Объем инокуляции клубеньковой ниши		N ₀		10 ¹⁴
	Максимальный объем колонизации клубеньковой ниши (при 100 % частоте в ней F _{ix} + бактерий)		N _{max}		30 · 10 ¹⁴
*Для 1-го и 2-го генотипов растений приняты разные базовые значения (для остальных параметров подобные различия не предусмотрены).					
**Математические описания индуцированного бактериями отбора и процессов конкуренции в растительной популяции представлены в статье: Проворов, Воробьев, 2009.					

3.2. Обратные связи партнеров

Для анализа коэволюции партнеров на повышение эффективности мутуализма мы вычислили величины КЭТ, которые характеризуют перекрестные влияния селективных процессов, происходящих в популяциях растений и бактерий. Оказалось, что усиление отбора в пользу бактериального мутанта M1 (возрастание параметров v1 и ω1, либо убывание w1, г.1 и п.1; см. табл. 3) повышает частоту 1-го растительного генотипа (КЭТ>0), а усиление отбора в пользу мутанта M2 (возрастание v2 и ω2, либо убывание w2, г.2 и п.2) — на-

против, снижает частоту 1-го растительного генотипа (КЭТ < 0). Усиление отбора в пользу 1-го генотипа растений (возрастание P_{max}, либо убывание λ) повышает частоту бактериального мутанта M1 (КЭТ > 0), а усиление отбора в пользу 2-го генотипа растений снижает частоту мутанта M1 (КЭТ < 0).

Возрастание эффективности метаболических связей партнеров (выраженной через максимальные объемы колонизации симбиотических ниш, достигаемые при ψ_t = 100 %) повышает равновесные частоты бактериальных генотипов, фиксирующих N₂ в симбиозе с раз-

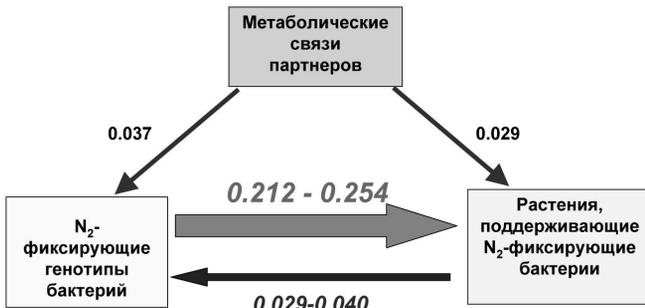


Рис. 1. Диаграмма селективных процессов, определяющих эволюцию мутуалистического симбиоза (построена на основании величин коэволюционных ответов, КЭТ).

Цифры рядом со стрелками представляют собой величины КЭТ, которые отражают давления отбора в популяции того партнера, на которого указывает стрелка. Величины КЭТ приведены для специфичных по отношению к хозяину мутантов М1 и М2 (система «Р+М1+М2+М3»).

личными генотипами растений. Так, при повышении параметров R_{\max} и N_{\max} величины КЭТ > 0 были получены для М1 и М3 при взаимодействии с 1-м растительным генотипом, а также для М2 и М3 при взаимодействии со 2-м генотипом. Для 1-го растительного генотипа величины КЭТ, вычисленные в зависимости от параметров обратных связей, близки к величинам КЭТ для М1 (0,029 и 0,037, соответственно).

Анализ результатов компьютерных экспериментов позволил нам построить диаграмму действия селективных факторов, определяющих эволюцию N_2 -фиксирующего симбиоза (рис. 1). Согласно этой диаграмме, положительная метаболическая обратная связь, обусловленная обменом партнеров продуктами азотфиксации и фотосинтеза, преобразуется в положительную популяционную обратную связь, обусловленную перекрестными влияниями селективных факторов, действующих на растения и бактерии. Величины КЭТ, вычисленные для генотипов обоих партнеров в зависимости от интенсивности метаболических обратных связей (0,029–0,037), близки к величинам КЭТ, вычисленным для бактерий в зависимости от давления отбора в растительной популяции (0,029–0,040). Однако величины КЭТ, вычисленные для растений в зависимости от давления отбора в бактериальной популяции, на порядок выше (0,212–0,254). Следовательно, при воздействии бактерий на растительную популяцию действие положительных обратных связей усиливается, что может быть одним из основных факторов повышения ЭМС в симбиотической системе.

3.3. Специфичность симбиоза

Компьютерные эксперименты, проведенные на основе модели, позволили нам выявить различия в динамике специфичных и неспецифичных по отношению к

хозяину мутуалистов: при действии метаболических или популяционных обратных связей отбор в пользу бактериальных мутантов М1 или М2, образующих эффективный симбиоз только с одним из растительных генотипов, более интенсивен (величины КЭТ значительно выше), чем отбор в пользу мутанта М3, образующего эффективный симбиоз с обоими растительными генотипами (табл. 4). В то же время максимальные величины ЭМС, вычисленные для каждого из партнеров, достигаются в умеренно асимметричных системах («Р+М1+М3» и «Р+М2+М3»), то есть требуют наличия неспецифичного симбионта М3 (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ имеющихся в литературе моделей бобово-ризобиального симбиоза (Jimenez, Casadesus, 1989; Olivieri, Frank, 1994; Simms, Bever, 1998; Bever, Simms, 2000; West et al., 2001, 2002; Provorov, Vorobyov, 2000, 2006, 2008b) показал, что эволюция признаков мутуализма в этой системе может происходить весьма эффективно, хотя она не связана с переходом отношений партнеров из факультативных или экологически облигатных, не наследуемых форм в генетически облигатные, вертикально наследуемые формы (которые обеспечивает наибольшую эволюционную стабильность симбиоза). Ранее мы показали, что эволюция микробно-растительного мутуализма осуществляется благодаря селективным процессам, которые индуцируются положительными обратными связями партнеров, обусловленными преимущественным распределением растительных С-метаболитов в азотфиксирующие клубеньки (Provorov, Vorobyov, 2008a). Форма этого отбора зависит от структуры популяции, образуемой микросимбионтами в нишах *in planta*: при клональном размножении азотфиксирующих (Fix^+) ризобий в клубеньках происходит групповой (междомовый, родственный) отбор в пользу N_2 -фиксирующих штаммов, а при смешанном ($Fix^+ + Fix^-$) размножении основным фактором эволюции мутуализма становится ЧЗО, действующий в популяциях ризобий при конкуренции за инфицирование клубеньков (Проворов и др., 2008).

Для изучения селективных процессов, направляющих эволюцию бобово-ризобиального симбиоза в сторону усиления мутуализма, мы предположили, что симбиотическая N_2 -фиксация, основанная на метаболических обратных связях партнеров, индуцирует в популяции каждого из них отбор, который вызывает в популяции другого партнера коэволюционный ответ, обеспечивающий усиление мутуализма. Преимущество представленной в настоящей статье модели мультиштаммовой конкуренции по сравнению с моделью двухштаммовой конкуренции (Проворов, Воробьев, 2009) заключается в возможности сравнительной характеристики селективных давлений, определяющих

Таблица 4

Величины коэволюционного ответа (КЭТ) для бактериальных мутантов, которые различаются по специфичности, проявляемой при образовании N₂-фиксирующего симбиоза с разными растительными генотипами

Варьируемые параметры	Симбиотические системы	Величины КЭТ при образовании эффективного симбиоза, рассчитанные для	
		специфичных мутуалистов М1 или М2	неспецифичного мутуалиста М3
N _{max} [*]	P+M1, P+M2, P+M3	0,032	0,014
	P+M1+M2, P+M1+M3, P+M2+M3	0,019–0,052	0,008
	P+M1+M2+M3	0,037	0,007
P _{max} , λ ^{**}	P+M1, P+M2, P+M3	0,0001–0,0007	0
	P+M1+M2, P+M1+M3, P+M2+M3	0,029–0,040	0
	P+M1+M2+M3	0,019–0,034	0,002–0,008

* Параметр положительной обратной связи между финальной численностью N₂-фиксирующих бактерий в клубеньковой нише и ее максимальной емкостью.
 ** Параметры давления отбора в популяции растений (см. табл. 3).

эволюцию разных типов микросимбионтов в полиморфных популяциях бактерий. Для оценки этих давлений мы использовали показатели коэволюционного ответа, КЭТ (близкие по своему биологическому смыслу к коэффициентам отбора), которые позволяют оценивать перекрестные влияния селективных факторов, действующих на растения и бактерии.

Использование этого подхода позволило нам объяснить многие важные закономерности, выявленные при эмпирическом изучении эффективности бобово-ризобияльных систем. Ранее было показано, что при взаимодействии разных видов бобовых и штаммов *Bradyrhizobium japonicum* наиболее эффективный симбиоз формируется на фоне его высокой специфичности: штаммы, обладающие максимальной активностью азотфиксации в симбиозе с соей, не проявляли эту активность в симбиозе с люпином, а эффективные симбионты люпина формировали на сое не фиксирующие N₂ клубеньки (Доросинский, Лазарева, 1968). Использование метода двухфакторного дисперсионного анализа подтвердило эту связь: наибольшая эффективность симбиоза была выявлена при максимальном проявлении неаддитивных сорто-штаммовых взаимодействий (являющихся мерой специфичности), причем повышенная внутрисортовая изменчивость растений подавляла проявление высокой симбиотической эффективности бактерий (Проворов, Симаров, 1992; Проворов, Тихонович, 2003; Provoov, Simarov, 1990).

Анализ модели двухштаммовой конкуренции показал (Проворов, Воробьев, 2009), что доминирование неспецифичных по отношению к растениям N₂-фиксирующих симбионтов по отношению к не фиксирующим N₂ симбионтам осуществляется в более узком диапазоне условий (только в монотонном режиме микроэво-

люции), чем доминирование специфичных симбионтов (оно возможно как в монотонном, так и в колебательном режиме). При этом возрастание ЭМС может быть связано как со снижением уровня изменчивости растительной популяции (при наиболее характерном для мутуализма монотонном режиме микроэволюции), так и с его повышением (при менее характерном для мутуализма колебательном режиме) (рис. 2). В соответствии с представленной в настоящей статье моделью мультиштаммовой конкуренции, данные закономерности могут быть обусловлены тем, что в полиморфных популяциях ризобий давление отбора в пользу специфичных мутуалистов выше, чем в пользу неспецифичных мутуалистов (табл. 4). При этом максимальные величины ЭМС достигаются при промежуточном уровне полиморфизма растительной популяции, то есть тогда, когда в ней присутствуют доминирующий и минорный генотипы (табл. 2).

Представленные результаты могут быть использованы в селекционных программах при создании моделей сортов растений и комплементарных им бактериальных инокулюмов, сочетание которых обеспечивает высокую эффективность мутуализма в условиях конкуренции производственных штаммов ризобий с неэффективными местными штаммами. Эти модели могут быть основаны на том, что оптимальные условия для вытеснения из клубеньковой ниши не фиксирующих N₂ ризобий создаются при наличии в бактериальной популяции штамма, специфичного к доминирующему генотипу растений (его частота составляет 83 %), в сочетании с неспецифичным штаммом, который образует N₂-фиксирующие клубеньки как с доминирующим, так и с минорным растительными генотипами (частота последнего равна 17 %). В этих системах частоты специфичных и неспе-

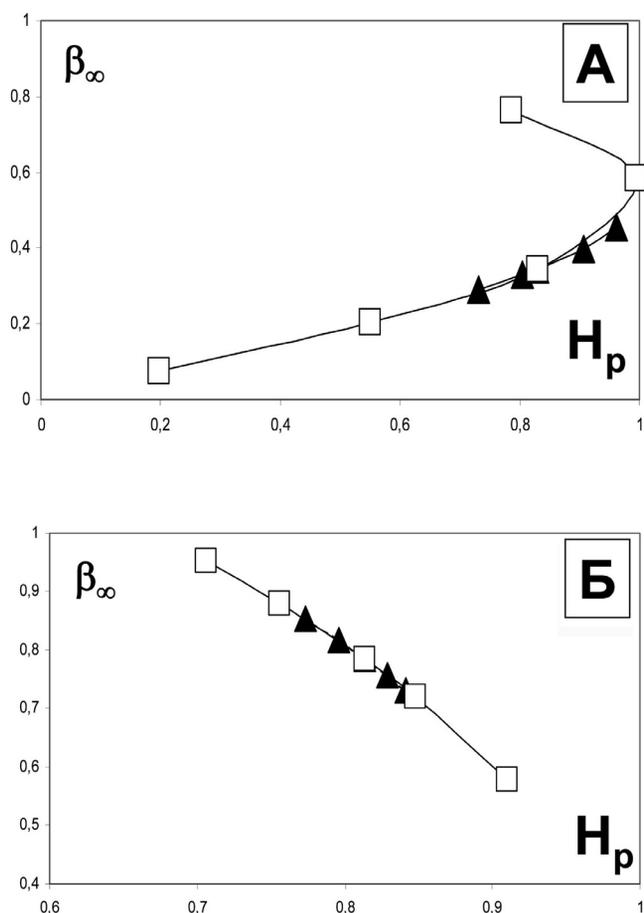


Рис. 2. Связь эффективности симбиоза с полиморфизмом растительной популяции при колебательном (А) и монотонном (Б) режимах микроэволюции

Эффективность мутуалистического симбиоза (ЭМС) оценивали по финальной частоте неспецифичного симбионта (β_{∞}), который образует N_2 -фиксирующие клубеньки с обоими имеющимися в системе растительными генотипами (Проворов, Воробьев, 2009); полиморфизм растительной популяции характеризовали индексом генного разнообразия, H_r (Nei, 1978). Линии, соединяющие белые квадраты, показывают динамику ЭМС при изменении индекса относительной конкурентоспособности 1-го растительного генотипа от 1 до 4 (А) или от 1 до 3 (Б); линии, соединяющие черные треугольники — динамику ЭМС при изменении индекса частотно-зависимого отбора в растительной популяции от 0,8 до 1,05 (А) или от 0,5 до 0,7 (Б)

цифичных к хозяину азотфиксаторов близки (36,8 % и 34,7 %) и превосходят частоту фиксирующего N_2 «симбионта-обманщика» (28,5 %). Анализ результатов компьютерных экспериментов (табл. 2) показал, что величины ЭМС для бактерий и растений коррелируют между собой ($r = 0,95$; $P < 0,01$), но не коррелируют с частотой не фиксирующего N_2 (родительского) штамма в почвенной нише ($r = -0,07$; $P > 0,50$). Это предполагает, что достижение штаммами-интродуцентами высо-

кой эффективности симбиоза не требует их повышенной приживаемости в почве.

Другой практически значимый аспект анализа предложенной модели заключается в анализе генетических последствий поддержания в популяции ризобий сбалансированного полиморфизма. Сам факт его установления означает, что в симбиотической системе действуют селективные факторы, направленные как на повышение, так и на снижение N_2 -фиксирующей активности (Foster, Kokko, 2006), а следовательно, в геномах бактерий должны существовать гены, функционирование которых обеспечивает как высокую, так и низкую интенсивность симбиотической N_2 -фиксации. Выявление генов обеих групп представляет большой интерес для конструирования хозяйственноценных штаммов ризобий, которое может быть связано как с усилением активности генов первой категории, так и с элиминацией генов второй категории. Генетические модификации обоих типов описаны в литературе (Bosworth et al., 1992; Sharypova et al., 1998), однако, как показала наша работа, они смогут обеспечить существенное возрастание эффективности симбиоза только в сочетании с оптимизацией общей структуры микробно-растительной системы, обеспечивающей высокие частоты N_2 -фиксирующих штаммов в клубеньках растений.

Работа поддержана грантами РФФИ 06-04-48800а и 09-04-00907а.

Литература

1. Доросинский Л. М., Лазарева Н. М. 1968. О специфичности клубеньковых бактерий сои и люпина // Микробиология. Т. 37. Вып. 1. С. 115–121.
2. Проворов Н. А., 2000. Популяционная генетика клубеньковых бактерий // Журн. общей биологии. Т. 61. № 3. С. 229–257.
3. Проворов Н. А., Воробьев Н. И., 2000. Эволюционная генетика клубеньковых бактерий: молекулярные и популяционные аспекты // Генетика. Т. 36. № 12. С. 1573–1587.
4. Проворов Н. А., Воробьев Н. И., 2009. Моделирование ко-эволюции бактерий и растений в системе мутуалистического симбиоза // Генетика. Т. 45. № 3. С. 12–28.
5. Проворов Н. А., Воробьев Н. И., Андронов Е. Е., 2008. Макро- и микроэволюция бактерий в системах симбиоза // Генетика. Т. 44. № 1. С. 12–28.
6. Проворов Н. А., Симаров Б. В., 1992. Генетический полиморфизм бобовых культур по способности к симбиозу с клубеньковыми бактериями // Генетика. Т. 28. № 6. С. 5–14.
7. Проворов Н. А., Тихонович И. А., 2003. Эколого-генетические принципы селекции растений на повышение эффективности взаимодействия с микроорганизмами // С.-х. биология. № 3. С. 11–25.

8. *Amarger N., Lobreau J. P.*, 1982. Quantitative study of nodulation competitiveness in Rhizobium strains // *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 44. N 3. P. 583–588.
9. *Beattie G. A., Clayton M. K., Handelsman J.*, 1989. Quantitative comparison of the laboratory and field competitiveness of Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli // *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 55. P. 2755–2761.
10. *Bever J. D., Simms E. L.*, 2000. Evolution of nitrogen fixation in spatially structured populations of Rhizobium // *Heredity.* Vol. 85. P. 366–372.
11. *Bosworth A. H., Williams M. K., Albrecht K. A. et al.*, 1994. Alfalfa yield response to inoculation with the recombinant strains of Rhizobium meliloti with an extra copy of dctABD and/or modified nifA expression // *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 60. N 10. P. 3815–3832.
12. *Foster K. R., Kokko H.*, 2006. Cheating can stabilize cooperation in mutualisms // *Proc. Roy. Soc. B.* Vol. 273. P. 2233–2239.
13. *Frank S. A.*, 1994. Genetics of mutualism: the evolution of altruism between species // *J. Theor. Biol.* Vol. 17. P. 393–400.
14. *Jimenez J., Casadesus J.*, 1989. An altruistic model of Rhizobium–legume association // *J. Heredity.* Vol. 80. P. 335–337.
15. *Maynard Smith J.*, 1989. Generating novelty by symbiosis // *Nature.* Vol. 341. N 6240. P. 284–285.
16. *Nei M.*, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // *Genetics.* Vol. 89. P. 583–590.
17. *Olivieri I., Frank S. A.*, 1994. The evolution of nodulation in Rhizobium: altruism in the rhizosphere // *J. Heredity.* Vol. 85. P. 46–47.
18. *Person C., Samborski D. J., Rohringer R.*, 1962. The gene-for-gene concept // *Nature.* Vol. 194. P. 561–562.
19. *Provorov N. A., Simarov B. V.*, 1990. Genetic variation in alfalfa, sweet clover and fenugreek for the activity of symbiosis with Rhizobium meliloti // *Plant Breeding.* Vol. 105. N 3. P. 300–310.
20. *Provorov N. A., Vorobyov N. I.*, 2000. Population genetics of rhizobia: construction and analysis of an «infection and release» model // *J. Theor. Biol.* Vol. 205. P. 105–119.
21. *Provorov N. A., Vorobyov N. I.*, 2006. Interplay of Darwinian and frequency–dependent selection in the host–associated microbial populations // *Theor. Populat. Biol.* Vol. 70. P. 262–272.
22. *Provorov N. A., Vorobyov N. I.*, 2008a. Evolution of symbiotic bacteria in «plant–soil» systems: interplay of molecular and population mechanisms // *Progress in Environmental Microbiology.* Ed. Kim M. — B. Nova Sci. Publ. Inc. New York. P. 11–67.
23. *Provorov N. A., Vorobyov N. I.*, 2008b. Simulation of plant–bacteria co–evolution in the mutually beneficial symbiosis // *Ecological Genetics.* Vol. 6. N 2. P. 35–48.
24. *Sharypova L. A., Yurgel S. N., Keller M. et al.*, 1998. The eff–482 locus of Sinorhizobium meliloti CXM1–105 that influences symbiotic effectiveness consists of three genes encoding an endoglucanase, a transcriptional regulator and an adenylate cyclase // *Molec. Gen. Genet.* Vol. 261. P. 1032–1044.
25. *Simms E. L., Bever J. D.*, 1998. Evolutionary dynamics of rhizopine within spatially structured Rhizobium populations // *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* Vol. 265. P. 1713–1719.
26. *West S. A., Kiers E. T., Pen I., Denison R. F.*, 2001. Sanctions and mutualism stability: when should less beneficial mutualists be tolerated? // *J. Evol. Biol.* Vol. 15. P. 830–837.
27. *West S. A., Kiers E. T., Simms E. L., Denison R. F.*, 2002. Sanctions and mutualism stability: why do rhizobia fix nitrogen? // *Proc. Roy. Soc. B.* Vol. 269. P. 685–694.

Simulation of legume-rhizobia symbiosis evolution under the multi-strain competition of bacteria for inoculation of symbiotic habitats

N. I. Vorobyov, N. A. Provorov

✳ **SUMMARY:** The model is suggested for evolution of N₂-fixing legume-rhizobia symbiosis implemented under the conditions of multi-strain bacteria competition for inoculation of symbiotic habitats (rhizosphere, nodules). Competitiveness of each strain is characterized by the power coefficients which reflect the operation of frequency-dependent selection in the rhizobia population. When polymorphic bacteria populations are interacting with the dimorphic plant population, the selective pressures in favor of host-specific symbionts (forming N₂-fixing nodules only with one of the available plant genotypes) are higher than the pressures in favor of non-host-specific symbionts (forming these nodules with both plant genotypes). The highest mutualism efficiency is reached under an intermediate level of plant population diversity.

✳ **KEY WORDS:** nodule bacteria; symbiotic N₂-fixation; mutualistic symbioses; natural selection; positive partners' feedbacks; polymorphism of populations; multi-strain competition; inoculation and colonization of symbiotic niches.

Информация об авторах:

Воробьев Николай Иванович, ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, 196608, Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, 3. E-mail: nik4@newmail.ru.

Проворов Николай Александрович, ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, 196608, Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, 3. E-mail: provorov@newmail.ru.