

© И. А. Тихонович

ВНИИ сельскохозяйственной  
микробиологии,  
Санкт-Петербург

✿ **Представлена аннотация лекционного курса «Симбиогенетика», которая представляет собой новое направление биологии. Ее предметом являются надорганизменные генетические системы, образующиеся в результате взаимодействия неродственных организмов (в том числе про- и эукариот) и обеспечивающие формирование у них новых признаков, расширяющих экологические возможности партнеров. Выявление универсальных механизмов, обеспечивающих установление межорганизменных отношений, позволяет разрабатывать технологии совершенствования уже существующих и конструирования новых систем для широкого практического использования.**

✿ **Ключевые слова:** симбиоз, симбиогенетика, надорганизменные генетические системы, микробно-растительные взаимодействия, передача сигналов, онтогенез симбиотических систем, эволюция симбиоза, симбиотическая азотфиксация, экологически устойчивое сельское хозяйство

## ЗНАЧЕНИЕ СИМБИОГЕНЕТИКИ В СИСТЕМЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ

### ВВЕДЕНИЕ

Симбиогенетика как отдельная отрасль генетических знаний возникла в последнее десятилетие в связи с бурным развитием исследований по взаимодействию различных организмов. Поэтому представляемый в данной статье курс симбиогенетики затрагивает широкий круг вопросов, подводя студентов к пониманию основ экологической генетики, которая изучает влияние окружающей среды на процессы реализации генетической информации, однако к ней не сводится. Целью симбиогенетики мы считаем изучение особенностей реализации законов изменчивости и наследственности в надорганизменных системах.

Созданный нами совместно с Н. А. Проворовым курс симбиогенетики, как нам представляется, способствует проникновению генетической идеологии к студентам других специальностей. Это связано с тем, что симбиогенетика исследует признаки, а точнее адаптации, от реализации которых зависит само существование жизни на Земле и ради обладания которыми различные организмы, часто весьма далекие систематически, объединяют свои «усилия» и возможности. Симбиогенетика позволяет представить эволюцию живых существ как использование уникальной генетической информации, независимо от того, где она (эта информация) возникла. Важным является то, что эта информация позволяет приобретать жизненно важные адаптации, обеспечивающие выживание не только отдельных видов, но и сообществ любого уровня сложности. Усвоив это положение, студенты-биологи получают представление о том, что выживание организмов достигается в том числе и объединением, поскольку одна и та же сложная генетическая информация не может независимо возникать у разных систематических групп. Надеемся, что это способствует консолидации усилий биологов самых различных специальностей для исследования общебиологических проблем.

К адаптациям, которые реализуются в процессе взаимодействия относятся: способность усваивать углекислый газ, молекулярный азот атмосферы, труднорастворимые фосфаты почвы, приобретение устойчивости к неблагоприятным факторам и стрессам, получение доступа к веществам, которые не синтезируются в организме и т. д. Даже из этого весьма ограниченного перечня видно, сколь фундаментальные процессы находят свое объяснение в терминах симбиогенетики и реализуются только в биосистемах. Процесс взаимодействия организмов изучают едва ли не все биологические специальности, но генетический метод дает свой, как мы надеемся показать, уникальный подход к пониманию данного явления. Таким образом, нам представляется вполне оправданным чтение курса симбиогенетики для всего потока биолого-почвенного факультета. Анализ анкет студентов показывает, что большинство находят данный курс «в основном новым». Интересно, что, несмотря на ограниченность примеров взаимодействия сферами микроорганизмов и растений, студенты далеких специальностей, в частности изучающие высшую нервную деятельность, показывают хорошие знания. Связано это и с тем, что в курсе значительное место занимают вопросы системного контроля, который делает организм единым целым. Это также общая проблема биологии. Дальнейшее совершенствование курса направлено как раз на то, чтобы расширить перечень примеров и явлений из других царств, однако это возможно только параллельно развитию соответствующих направлений исследований. В данной статье сделана попытка дать общую характеристику курса, отмечая особенности вклада симбиогенетики в общую систему генетических и биологических

знаний. Не раскрывая всех вопросов, излагаемых в курсе (они выделены жирным шрифтом), мы отмечаем те вопросы, изложение которых в симбиогенетике дается впервые, модифицируется или отличается по сравнению с классическими представлениями.

## 1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ СИМБИОГЕНЕТИКИ

**Понятие симбиоза. Классическое определение (А. де Бари) и современные представления о симбиозе. Симбиоз как форма взаимодействия организмов, как адаптивная стратегия и как надорганизменная система. Соотношение понятий симбиоза, биоценоза и популяции.**

Экология изучает организацию и функционирование надорганизменных систем разных уровней: популяций, биоценозов, биогеоценозов и биосферы. Она также может быть определена как наука о взаимодействии организмов с окружающей средой и между собой. Синэкология изучает сообщества организмов, аутоэкология изучает действие факторов окружающей среды на отдельные популяции и виды. Симбиогенетика наиболее близка к синэкологии, но имеет свою специфику, так как основное внимание уделяет становлению новых интегрированных генетических систем, состоящих из генов разных организмов. Таким образом, симбиогенетика вычленяет наиболее существенные взаимодействия, которые ведут к возникновению новых адаптаций.

**Принципы классификации и основные типы симбиотических взаимодействий. Факультативные, экологически облигатные и генетически облигатные симбиозы. Мутуалистические и антагонистические взаимодействия в симбиозе. Функциональные концепции симбиоза: метаболическая и экологическая. Программы развития симбиотических систем (узнавание, инфекционный процесс, морфогенез, регуляция, метаболическая интеграция, поддержание, выход партнеров в свободноживущее состояние).**

В случае мутуализма, возникающие адаптации способствуют достижению все большей самодостаточности и это понятие рассматривается на примере гипотезы К. С. Мережковского, который более века назад отметил коренное различие жизненных стратегий животных и растений, основанное на том, что растения, обладая пластидами, сами обеспечивают себя важнейшим элементом питания — углеродом. Сейчас микробное происхождение ДНК-содержащих органелл у эукариот уже не вызывает серьезных дискуссий. Вероятно, решающим, в переходе свободноживущих предков цианобактерий в регулярные органеллы растительной клетки было то, что потребность в углероде была постоянным лимитирующим фактором среды, в связи с чем симбионты перешли целиком на связанное существование. Такого типа взаимодействие определяется как генетически обли-

гатное — микросимбионт не может существовать вне организма хозяина. Эта же ситуация наблюдается и при рассмотрении примеров симбиотических отношений бактерий и насекомых, симбиотических грибов и растений. Известны случаи, когда не только микросимбионт, но и хозяин (орхидные) не могут существовать вне симбиоза.

**Симбиоз и половой процесс — основные формы генетической интеграции организмов. Роль моделей микробно-растительного взаимодействия в развитии генетики симбиоза. Концепция «ген-на-ген» и зарождение симбиогенетики. Соотношение симбиогенетики с экологической генетикой и с генетикой популяций. Взаимосвязь генотипа и фенотипа и соотношение «ген-признак» в симбиотических системах.**

Симбиоз является не единственной стратегией генетической интеграции организмов: она происходит также при половых и парасексуальных процессах, однако, экологические и эволюционные последствия этих форм генетической интеграции различны. При симбиозе расширение адаптивных возможностей происходит непосредственно у взаимодействующих организмов благодаря функциональной интеграции их генов, что обычно не требует рекомбинации партнеров. В то же время, при половом процессе именно рекомбинация открывает возможность для повышения адаптивного потенциала у потомков взаимодействующих (родительских) особей.

В этом разделе курса уточняется и понятие фенотипа организма, как суммы признаков, определяемых его генотипом. В свете симбиотических отношений ясно, что ряд важнейших адаптаций находятся под контролем генов, которые входят в геном сожителя, а не хозяина. У хозяина часто сохраняются лишь генетические детерминанты, определяющие способность к взаимодействию. Формальная генетика описывает такие явления в терминах комплементарного взаимодействия и эпистаза. В данном случае, однако, речь идет о генах не одного организма, но разных, часто находящихся систематически в различных царствах. Однако эти гены равнозначны в том плане, что мутация любого из них изменяет показатели симбиоза, следовательно, мы можем говорить о функциональной интеграции генов разных организмов в единую систему, определяющую течение сложного процесса.

**Понятие о надорганизменной генетической системе. Взаимодействия генов в системах симбиоза и элементарные признаки в симбиогенетике. Особенности мутационного и гибридологического анализа в надорганизменной генетической системе. Выявление единиц наследственности и наследования при генетическом анализе симбиоза. Основные функции надорганизменных генетических систем: сигнальные взаимодействия, развитие симбиотических структур, метаболическая интеграция партнеров.**

**Онтогенез симбиотических систем. Разнообразие морфогенетических процессов при симбиозах, образуемых растениями или животными с микроорганизма-**

ми. Тканевые и клеточные структуры, формируемые при симбиозе. Типы азотфиксирующих микробно-растительных систем: ризосферные, межклеточные и внутриклеточные симбиозы. Симбиотические модели генетики развития.

Наиболее сложные отношения развиваются в случае экологически облигатных симбиозов. В этом случае партнеры сохраняют способность к раздельному существованию, однако, если условия окружающей среды этому способствуют, вступают в симбиоз с целью выработки новых адаптаций. Следовательно, налицо способ существенного расширения нормы реакции такого суперорганизма на условия окружающей среды за счет использования варьирования как макро-, так и микросимбионта. Рассмотрение особенностей генетического подхода к взаимодействию как новому наследственному признаку начинается с анализа становления симбиотического аппарата или экологических ниш, предоставляемых организмом-хозяином в распоряжение сожителя. При этом для студентов важно подчеркнуть, что понятие «освоения экологической ниши» охватывает довольно большое разнообразие явлений. В простейшем случае — это, например, заселение бактериями поверхности растения-хозяина, которое не сопровождается видимыми морфологическими изменениями. В более сложных случаях у хозяина наблюдается образование новых органов (или модификация уже существующих) как ответ на появление партнера. Наконец, это также случаи, когда симбиоз является постоянным и симбионт обитает внутри организма хозяина практически без выхода в окружающую среду или превратился в органеллу клетки. Наиболее полно вся последовательность событий, ведущих к образованию суперорганизма, предстает в случае экологически облигатных симбиозов, где имеют место следующие стадии: узнавание партнерами друг друга, проникновение внутрь организма-хозяина, трансформация микросимбионта в специфическую симбиотическую форму, метаболическая интеграция партнеров, регуляция параметров симбиотического аппарата и времени поддержания симбиотических отношений. В связи с тем, что указанная последовательность событий или развитие адаптации реализуется не для всех взаимодействий, целесообразно рассматривать положения симбиогенетики на примерах, содержащих наиболее полную цепь событий. Таким примером является бобово-ризобийный симбиоз, на основе которого разработана методология генетического анализа самых разнообразных надорганизменных биосистем.

**Физиология симбиотических систем. Соотношение метаболических и экологических взаимодействий при симбиозе. Симбиозы про- и эукариот как результат комплементации их биохимических функций. Понятие о доноре и реципиенте биохимической функции в симбиозе. Дифференциальная экспрессия генов, направленные модификации генетического материала**

(полиплоидизация, амплификация, генетические перестройки) и перенос генов — основные механизмы интеграции партнеров симбиоза.

Организмы, участвующие в симбиозе, могут обладать специальными механизмами увеличения изменчивости с целью более успешного завоевания экологических ниш, представляемых хозяином. Например, при заселении корневой зоны смесью штаммов бактерий способность конкурировать за места поселения контролировал один из генов, участвующих в репарации. Вероятно, для заселения новых экологических ниш у растения-хозяина бактериям требовался механизм увеличения частоты мутаций, позволяющий быстро адаптироваться к новым условиям существования. Выявлена тесно сцепленная группа генов, определяющих возможность проникновения бактерий внутрь растений. Большое взаимное сходство структуры таких генов заставило говорить о том, что путем усиления рекомбинации, в том числе и нерегулярной, возможно создание новых рецепторов бактериального сигнала для регуляции взаимодействия.

Таким образом, взаимное влияние на течение матричных процессов у взаимодействующих организмов могло возникнуть как механизм адаптации, ускоряющий изменение свойств партнеров для достижения большей комплементарности. Этот пример показывает, что классические представления экологической генетики — влияние внешней среды на течение генетических процессов — также получает новое звучание в сфере симбиогенетики.

## ПРЕДМЕТ СИМБИОГЕНЕТИКИ

Прежде всего необходимо уточнить с какими признаками имеет дело симбиогенетика. Естественно, что это — симбиоз. Однако подробное рассмотрение понятия симбиоза, с точки зрения мутуализма или паразитизма, которое дается во вводной лекции, приводит к выводу о том, что ключевым предметом симбиогенетики является как сам процесс взаимодействия живых организмов, так и возникающие в результате него новые признаки, которыми партнеры не обладали до взаимодействия. В этом заключается явное отличие симбиогенетики от классических представлений, сформированных при генетическом анализе отдельных организмов. В последнем случае нельзя говорить об отсутствии признака, все признаки сохраняются у отдельного организма, различаются только степени их проявления. При взаимодействии же само появление признака, ради которого организмы вступают в симбиоз, зависит от многих факторов, но наиболее значимым представляется адаптивная целесообразность в его появлении. Примером из этой области является биологическая фиксация азота, которая необходима растениям только в случае дефицита этого элемента в почве. Следовательно, здесь окружающая среда выступает не только как фактор, влияющий на прояв-

ление признака, но и как решающее условие самого его возникновения. При этом особенно важно подчеркнуть, что подобная трактовка взаимодействия позволяет преодолеть различия между подходами, которые развиваются специалистами по вредному взаимодействию, например фитопатологами, и теми, кто анализирует полезные взаимодействия. Комплементарность при взаимодействии паразитического типа была установлена Флором более 50 лет тому назад и нашла свое выражение в теории «ген-на-ген».

Симбиогенетика таким образом исследует явления, которые, практически не доступны классическому генетическому анализу, оперирующему индивидуальным геномом. А поскольку, как уже указывалось, эти признаки или адаптации лежат в основе поддержания жизни на Земле, то симбиогенетика — это весьма существенное расширение приложения генетической идеологии в сферы, наиболее интересные с точки зрения медицины, селекции, экологии.

Генетический анализ позволяет вычленировать события и признаки, развивающиеся на основе интеграции генетических систем организмов из круга тех явлений, которые происходят при контактах, пусть и длительных, но основанных на использовании признаков, не зависящих от взаимодействия. Типичным примером такого рода является симбиоз рака-отшельника и актинии. Критерием для отчленения процесса интеграции от взаимодействия с «попутчиками» является экспрессия генов, вовлеченных во взаимодействие. С точки зрения симбиогенетики, взаимодействие можно считать состоявшимся только тогда, когда в результате мы наблюдаем экспрессию генов, не работающих вне взаимодействия. Это позволяет выработать четкие качественные критерии для вычленения взаимодействий, входящих в сферу рассматриваемой науки.

## 2. СИГНАЛЬНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СИМБИОЗЕ

**Специфичность взаимодействия организмов как основа становления симбиоза. Уровни проявления симбиотической специфичности (генотипический, видовой, надвидовой). Роль плазмид в контроле симбиотической специфичности клубеньковых бактерий (ризобий). Основные группы *symb*-генов ризобий. Адаптивное значение специфичности для микросимбионта и хозяина. Специфичность образования мутуалистических симбиозов и паразитарных систем. Понятие сигнального взаимодействия, иерархия сигнальных взаимодействий при симбиозе.**

Первым этапом взаимодействия является узнавание партнерами друг друга. Данный процесс обеспечивает специфичность взаимодействия как по отношению к предотвращению попадания внутрь растения фитопа-

тогенов, так и по поиску среди многочисленных обитателей корневой зоны растений партнеров, обладающих комплементарными генетическими факторами. Специфичность понимается как способность неродственных организмов опознавать партнеров по симбиозу, способных обеспечить запуск программы взаимодействия, не функционирующей в отсутствие адекватного партнера. Поэтому первым условием обеспечения специфичности является узнавание. Узнавание означает переход в качественно иное состояние, которое подразумевает наступление тех или иных последствий. В случае симбиоза — это переход от свободноживущего состояния партнеров — в состояние, предшествующее развитию симбиоза — «индуцированное» состояние. Узнавание происходит на основе характерных признаков, отличающих опознаваемый предмет. Такие признаки можно определить как сигнальные. Таким образом, задача молекулярно-генетического описания специфичности сводится к характеристике процесса обмена сигналами между потенциальными партнерами. Для анализа сигнальных взаимодействий наиболее подходящим является именно генетический анализ, суть которого составляет выявление и исследование носителей информации в организме. Возможности генетического анализа демонстрируют примеры расшифровки ранних процессов взаимного узнавания растениями и микроорганизмами партнеров по симбиозу.

**Генетика узнавания симбиотических партнеров. Выявление растительных сигналов, активирующих гены вирулентности микроорганизмов. Доменный принцип организации рецепторов. Одно- и двухкомпонентные рецепторы растительных сигналов.**

**Сигнальные взаимодействия в системе мутуалистического симбиоза. Разнообразие и специфичность действия растительных флавоноидов — индукторов *nod*-генов ризобий.**

Явление специфичности (способность устанавливать симбиоз только между партнерами с определенными генотипами) получило исчерпывающее объяснение на уровне передачи сигналов, предшествующей установлению симбиотических отношений. На лекции раскрывается значение генетического анализа, в том числе и мутационного, в выяснении природы сигнальных взаимодействий. Были разработаны методы, позволяющие отбирать бактериальных мутантов по способности индуцировать процесс клубенькообразования у растений. Оказалось, что бактериальные гены взаимодействия обладают структурными особенностями, которые отличают их от остальных факторов. Это — наличие общих промоторных последовательностей, свидетельствующих о том, что все они находятся под общим контролем, вероятно связанным с получением растительного сигнала.

Обращают на себя внимание особенности специальных моделей, позволяющих проводить скрининг сигнальных соединений среди вторичных метаболитов, обладающих способностью активировать гены бактерий, не ра-



ботающие вне взаимодействия. Суть создания таких моделей состоит в использовании «репортерных» слияний, содержащих общие для всех генов клубенькообразования промоторы, и выявлении с их помощью соединений, активных в запуске экспрессии. Однако оказалось, что этого не достаточно. Специфика таких тест-систем заключается в том, что помимо репортерного слияния, т.е. мишени, система должна содержать еще и элементы передачи сигнала, поскольку искомые соединения являются не просто индукторами, а истинными сигналами, запускающими цепь внутренних событий в клетке, не обязательно проникая внутрь.

В результате было показано, что каждое бобовое растение обладает определенным химическим «портретом», который определяется спектром флавоноидных соединений, специфичных для каждого вида бобовых. Сигнальные молекулы флавонов и флавоноидов способны регулировать экспрессию бактериальных генов так, что одни соединения вызывают экспрессию *Sym*-генов бактерий при специфичном взаимодействии (нарингенин — у клубеньковых бактерий гороха, лютеолин — у клубеньковых бактерий люцерны, дайдзеин — у клубеньковых бактерий сои и т.д.), а при неспецифичном взаимодействии те же соединения могут играть роль подавителей клубенькообразования.

**Структура регуляторного гена *nodD* и его роль в специфичности образования клубеньков. Основные группы генов клубенькообразования ризобий (общие, специфические, регуляторные), их функции и продукты действия. Липо-хито-олигосахаридные Nod-факторы — молекулярные сигналы, определяющие специфичность симбиоза. Синтез минимального Nod-фактора. Структурные модификации Nod-фактора, приводящие к смене спектра растений-хозяев.**

Генетический анализ рецептора ярко демонстрирует характерные черты молекул, вовлекаемых в цепь передачи сигналов. Общие принципы поиска и анализа таких молекул на основе генетического подхода представляются очень весомым вкладом симбиогенетики в анализ сигнальных взаимодействий, работающих как внутри организма, так и вне его. Манипулирование сигналами — это один из наиболее действенных и экологически приемлемых способов воздействия на организм в желательном направлении, это особенно подчеркивается на лекциях, в том числе и в плане практического использования.

Экспрессия симбиотических генов бактерий ведет к выработке ответного сигнала, известного под названием Nod-фактор, который является одним из наиболее активных гормонов, индуцирующих деление клеток у растений и запускающий симбиотические программы бобового растения. Его открытие является ярким примером того, как генетический анализ позволяет описывать характерные черты информационной молекулы. Их разнообразие и создает уникальность комбинаций сигналов и рецепторов, обеспечивающую возможность различить

партнера среди многочисленных форм неспецифических клубеньковых бактерий и патогенной микрофлоры.

**Сигнальные взаимодействия в паразитарных системах. Механизмы активации и функционирования системы генетической трансформации растений агробактериями. Системы секреции III и IV типов у бактериальных патогенов растений и животных. Многоступенчатые сигнальные взаимодействия.**

Рассмотрение системы узнавания позволяет конкретизировать ранее заявленную стратегию использования сигнальных молекул как в фундаментальных исследованиях, так и при создании адаптивных систем земледелия. Прежде всего необходимо подчеркнуть, что до настоящего времени сигнальные взаимоотношения, в частности, узнавание партнерами друг друга, мало учитывается в паразитарных системах. Многочисленные исследования того, как растения опознают фитопатоген, к сожалению, не дополняются столь же интенсивным анализом обратного процесса — как фитопатоген опознает своего потенциального хозяина. Между тем, общая методология формирования интегрированных генетических систем указывает, что партнеры и гены, участвующие в создании такого суперорганизма, равнозначны в отношении симбиотического фенотипа. Следовательно, для предотвращения нежелательных последствий или усиления полезных необходимо совершенствовать «портрет» хозяина за счет модификации его сигнальных признаков.

Это положение логично приводит к необходимости анализа растительных факторов, как пример необходимого анализа генов хозяина, участвующих во взаимодействии.

### 3. ГЕНЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ СИМБИОЗ

**Выявление растительных генов, контролирующих мутуалистические симбиоза и паразитарные системы. Системы «ген-на-ген». Супрессируемые и не супрессируемые бактериями мутации бобовых, нарушающие развитие симбиоза. Методические основы и особенности геноанализа симбиотических признаков бобовых.**

Особенности генетического анализа симбиотических систем состоят в том, что одни и те же модели могут быть использованы для поиска как бактериальных, так и растительных мутантов по симбиозу. К обычным требованиям генетического анализа по генетической чистоте используемых линий добавляется еще и требование микробиологической чистоты материала, а также соответствующие условия среды, позволяющие проявить искомый признак. Важно отметить, что здесь под воздействием окружающей среды наблюдается не просто возникновение новых признаков, но и формирование генетических систем, их контролирующих. Если условия существования сохраняются на достаточное вре-

мя, то мы будем наблюдать их повторное возникновение и совершенствование, что представляет несомненный интерес с точки зрения не прекращающихся дискуссий о возможности наследования таких «благоприобретенных» признаков. Но если условия решающим образом изменятся, например в почву будет внесен минеральный азот, то симбиоза бобовых и азотфиксирующих бактерий не будет, признак не сформируется, хотя растения и бактерии сохраняют потенциальные возможности для его развития. Таким образом, изучение симбиотических отношений позволяет несколько по-новому взглянуть на проблему нормы реакции и становления адаптаций под воздействием окружающей среды и их наследование. В результате мутационного анализа генов растений, участвующие во взаимодействии не могут быть выявлены при анализе отдельного организма и поэтому их описание — это существенный вклад в расшифровку функции генов в постгеномную эпоху.

**Природная изменчивость симбиотических генов растений. Выделение симбиотических мутантов с использованием методов индуцированного мутагенеза.**

Особенностью индуцированных симбиотических мутаций является то, что они практически никогда не могут быть супрессированы со стороны второго партнера. Это позволяет использовать положение Н. И. Вавилова о двух типах мутаций (структурные и физиологические) и подчеркнуть, что система «ген-на-ген» — это результат эволюции рецепторов и сигналов у взаимодействующих организмов и для появления супрессорного эффекта необходимо определенное эволюционное событие. Это полностью подтверждается при анализе свойств спонтанных симбиотических мутантов, первые из которых — афганские горохи — были описаны нашим соотечественником — Л. И. Говоровым еще в 1928 году. Важно подчеркнуть, что в полном соответствии с положениями Н. И. Вавилова в центрах происхождения растений наблюдается максимальная изменчивость не только по признакам растений, но также и по симбиотическим характеристикам микросимбионта. Именно из мест происхождения гороха удалось выделить и штамм клубеньковых бактерий, который способен инокулировать мутанты гороха. В дальнейшем расшифровка системы специфичности афганских горохов и их микросимбионта явилась блестящим подтверждением теории сигнальных взаимодействий, а также наиболее полным из известных на сегодня молекулярно-генетических объяснений теории «ген-на-ген».

**Анализ последовательности действия симбиотических генов. Соотношение генетических систем развития азотфиксирующих клубеньков и арбускулярной микоризы.**

Наличие насыщенного спектра мутаций по становлению сложной экологической ниши — клубенька позволяет определить последовательность действия нарушенных генов. Эта работа выполняется с использованием двойных мутантов и позволяет разделить весь этап ста-

новления ниши на ряд стадий, контролируемых генами со сходной функцией. Таким образом можно получить временную шкалу развития событий по исследованному признаку. Эти шкалы могли быть различными. Первая — это последовательность событий, происходящих при попадании клубеньковой бактерии внутрь растения. По действию генов можно разделить весь процесс на 8 стадий, но конкретные механизмы остаются неизученными.

Вторая шкала может быть основана на поведении микоризного гриба. Мутации по клубеньковому симбиозу у растений часто приводят к тому, что растение не может вступать в симбиоз и с грибами. Это означает, что выявленные гены бобовых не являются уникальными генами только этого семейства, поскольку к микоризному симбиозу способны 80 % растений. Выявленные гены поэтому предстают как генетическая преадаптация к взаимодействию с широким кругом партнеров, включая и фитопатогены. Однако временная последовательность событий развития микоризного симбиоза оказалась несколько иной по сравнению с бактериальной. И, наконец, эти же гены вовлечены в развитие самих растений — формирование меристемы, из которой будет образован клубенек. И здесь временная шкала, также не во всем совпадала с двумя вышеописанными. Вопрос о том, как отдельные гены «выбирают» подходящую для себя программу остается открытым.

**Выявление генов, контролирующих развитие инфекционных нитей, образование внутриклеточного симбиоза и поддержание стабильности структур клубенька. Симбиосома — основная структурно-функциональная единица внутриклеточного симбиоза. Использование модельных бобовых в генетическом анализе симбиотических систем.**

На примере основной структурной единицы симбиоза — симбиосомы — мы видим процесс формирования устойчивых органелл в растительной клетке, где возможности функциональной интеграции генов партнеров особенно велики. Примеры внутриядерных симбионтов также показательны в этом отношении.

По ряду косвенных данных можно считать, что количество генов растений, выявляемых мутационным анализом, близко к насыщению и многие гены у разных видов бобовых являются ортологами, что позволяет использовать знания, полученные в модельных системах, на хозяйственно значимых объектах. Конкретные примеры такого перехода подробно анализируются в курсе. Использование модельных систем упрощает задачу клонирования и секвенирования симбиотических генов и в настоящий момент расшифровка их структуры ясно указывает, что в основном это регуляторные гены, способные обеспечить восприятие сигнала и его передачу на аппарат транскрипции.

Несмотря на большие успехи мутационного анализа, одновременно появляется и его ограниченность. По многим генам, вовлеченным во взаимодействие, не уда-

ется получать мутации в силу наличия в геноме их многих копий. Следовательно, необходимо использование методов, позволяющих определить гены, вовлеченные в симбиотический процесс, на основе появления их продуктов в ответ на взаимодействие.

**Применение методов «обратной генетики», транскриптомики и протеомики для выявления симбиотических генов растений. Дифференциальная экспрессия генов симбиоза и синтез нодулинов. Роль нодулинов в развитии и функционировании бобово-ризобиального симбиоза.**

Особенностью симбиотических систем является то, что далеко не все гены, участвующие во взаимодействии, могут быть обнаружены классическими методами. Современные подходы позволяют определить количество генов, участвующих в изучаемом процессе, на основе их продуктов с последующей индивидуализацией кодирующих последовательностей ДНК.

Приложение методов обратной генетики к симбиозу позволило описать клубенек-специфические белки (нодулины). Анализ структуры нодулинов, особенностей регуляции соответствующих генов позволяет предположить, что их экспрессия находится под сложным контролем, элементами которого могут быть не только внутренние сигналы растений, но и бактериальные сигналы.

Особенности методов обратной генетики позволяют установить структуру генов и наиболее сложной становится задача выяснения их конкретных функций. В ряде случаев эти функции могут с высокой степенью достоверности предсказаны из их структуры, однако для некоторых нодулинов найти функцию не удастся.

**Рецепция микробных сигналов хозяевами. Роль киназ, ионов кальция и гидролитических ферментов в передаче микробных сигналов растению. Выявление генов, контролирующих специфичность симбиоза, в генцентрах происхождения бобовых культур. Использование синтетических аналогов Nod-факторов для выявления растительных рецепторов. Роль лектинов в контроле специфичности бобово-ризобиального симбиоза. Универсальные симбиотические рецепторы растений и животных. Значение генетики сигнальных взаимодействий для развития молекулярной биологии и геномики.**

Знание последовательности работы генов оказалось весьма полезным при анализе механизмов обмена сигналами, в частности, при расшифровке воздействия Nod-фактора на растения. Анализ структуры гена и доменного строения кодируемого им белка показал, что такие гены действительно несут все необходимые признаки регуляторных факторов. Они обладают участками, которые находятся вне клетки и могут воспринимать внешние сигналы, кроме того, домены таких белков погружены в мембрану растительной клетки, т.е. способны передавать внешний сигнал внутрь клетки, запуская цепь событий, которые приводят в конечном счете к измене-

нию активности генов. В настоящий момент эта работа является наиболее «горячей точкой» в симбиогенетике. Число расшифрованных *Sym*-генов стремительно растет, однако понимание принципов их работы по созданию симбиотических структур еще далеко от завершения.

Большой интерес представляет выявленная серия генов, белки которых отличаются наличием лейцин-богатых повторов. Вероятно, именно с эволюцией этой серии генов связано возникновение у растений новых рецепторов бактериальных и иных сигналов, запускающих взаимодействие. Сходные последовательности, вовлеченные в процесс регуляции проникновения микробов внутрь многоклеточного организма описывают у насекомых и позвоночных животных, включая человека.

Молекулярно-генетическое описание последовательности формирования экологических ниш таким образом дает многочисленные примеры сходства механизмов восприятия и обработки сигнала у различных организмов, тем самым внося весомый вклад в общепроизводственные представления. Именно проблемой общей биологии является и системная регуляция.

**Системная регуляция — основа развития симбиоза. Генетический контроль системной регуляции бобово-ризобиального симбиоза и фитопаразитарных систем. Иерархия растительных факторов, контролирующих симбиоз: гены-организаторы и гены-исполнители.**

Важнейшее значение для эффективности симбиоза и других типов взаимодействия представляют гены, разрешающие его возникновение или определяющие количественные характеристики симбиотического аппарата. Без такой регуляции любые взаимоотношения будут носить черты паразитизма, а не адаптаций. Это положение ярко проявляется на примере азотфиксирующего симбиоза, где видны черты, присущие целостному организму. Чувствительность симбиоза к азотному статусу почвы предполагает наличие специальных рецепторов, определяющих физиологический порог концентрации азота, критический для клубенькообразования. Ясно, что на примере таких генов мы приближаемся к пониманию молекулярных механизмов, регулирующих развитие организма в ответ на особенности окружающей среды. Кроме того, выявлены гены, которые определяют количество клубеньков и работают по принципу системной регуляции, при которой информация о количестве клубеньков поступает от корня в надземную часть растения, вызывая образование ответных сигналов. Их строение и функции могут оказаться общими для регуляторных механизмов, действующих в растениях при образовании и поддержании меристем. В общей биологии найдется немного примеров, когда природа системного контроля может быть столь ясно прослежена. С этим может сравниться только явления образования азотфиксирующих гетероцист цианобактерий, где системность обнаруживается уже на уровне нескольких десятков клеток.

Таким образом, последовательное изучение генетики взаимодействия на примере микробно-растительного взаимодействия вообще и азотфиксирующего симбиоза в частности постепенно ведет к обобщениям общебиологического характера.

#### 4. МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНТЕГРАЦИЯ ОРГАНИЗМОВ В СИСТЕМАХ СИМБИОЗА

Приобретение новых метаболических функций и формирование межорганизменных биохимических путей в системах симбиоза. Сопряжение фотосинтеза и азотфиксации в симбиотических системах. Структурно-функциональная организация генов нитрогеназы у свободноживущих и симбиотических азотфиксаторов. Особенности регуляции симбиотической азотфиксации. Относительная роль партнеров в защите нитрогеназы от кислорода, в энергетическом обеспечении азотфиксации и в ассимиляции ее продуктов.

Генетический контроль и регуляция синтеза леггемоглобина. Основные биохимические процессы, обеспечивающие интеграцию растительных и бактериальных клеток в клубеньках. Формирование межорганизменной системы азотно-углеродного обмена в азотфиксирующем симбиозе. Энергетический баланс симбиотической системы. Сравнительный анализ процессов метаболической интеграции в различных типах азотфиксирующего симбиоза (клубеньки двудольных, симбиозы растений с цианобактериями).

Метаболическая интеграция растений и грибов. Разнообразие и общая характеристика микориз. Основные этапы развития и генетика арбускулярной микоризы (АМ). Объединенная система азотного и фосфорного обмена в АМ. Молекулярный диалог растений и грибов при образовании АМ. Развитие, физиология и генетика эктомикориз. Орхидная микориза.

Метаболическая интеграция животных и бактерий. Симбиотическая природа феномена растительности. Разнообразие и функции микроорганизмов, населяющих пищеварительные полости животных-фитофагов. Микробиота рубца жвачных и кишечника термитов: многокомпонентные симбиотические системы. Внутриклеточные симбионты насекомых: разнообразие, функции, генетическая организация. Формирование единой системы метаболизма аминокислот при симбиозе тлей и бактерий *Buchnera*.

Важным для понимания смысла образования единых генетических систем является рассмотрение конкретных метаболических связей в такой системе. В результате становится очевидным, что интеграция генетических систем тесно и неразрывно связана с биохимическими путями и их организацией. В курсе подробно рассматриваются примеры взаимного дополнения метаболизма взаимодействующих микроорганизмов, обеспечивающие

самодостаточность системы. Важным для понимания основ взаимодействия является происхождение генов, контролирующих процесс симбиоза. Оказывается, что для осуществления универсальных реакций, например в цикле азота и углерода, растение использует особые формы ферментов, специфические для клубеньков, а гены данных ферментов часто локализованы в геномах органелл, имеющих микробное происхождение. При образовании единой биохимической системы азотно-углеродного обмена клубеньки бобового растения воспроизводят характерные черты цианобактерий, где также происходит сопряжение азотфиксации и фотосинтеза. После данной лекции студенты оказываются подготовленными для рассмотрения эволюционных аспектов взаимоотношений организмов.

#### 5. ЭВОЛЮЦИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Роль симбиоза в органической эволюции. Симбиоз как стратегия формирования новых форм жизни и новых экосистем. Понятие коэволюции организмов в симбиотических системах. Роль симбиоза в эволюции эукариотической клетки. Эволюция бактериального генома при симбиозах с высшими организмами. Комбинативная и редуционная эволюция бактерий в системах симбиоза. Генетические механизмы эволюции клеточных органелл. Типы генома симбиотических бактерий (мультипотентный, редуцированный, рудиментарный). Микроэволюция бактерий при взаимодействиях с высшими организмами. Альтруистические модели эволюции симбиоза. Эволюционное соотношение мутуализма и антагонизма. Микробно-растительные симбиозы как эволюционный континуум.

Одной из задач курса симбиогенетики является демонстрация того, что симбиоз представляет собой одну из ключевых стратегий адаптивной эволюции, которая обеспечивает становление высших форм жизни и сложноорганизованных биосистем. На примере различных групп симбиотических бактерий продемонстрированы специфические молекулярные и популяционно-генетические механизмы эволюции симбиоза, которые отличают ее от эволюции свободноживущих организмов.

К особенностям молекулярной эволюции относятся: рекрутирование в системы симбиоза генов из различных и метаболических, и регуляторных систем клетки, резкое повышение темпов эволюции генома, а также его переход в новые формы (мультипотентная, редуцированная или рудиментарная), который обеспечивает повышение целостности симбиотических систем. На примере органелл эукариотической клетки, а также лишайниковых симбиозов показано, что эта эволюция может сопровождаться преобразованием надорганизменной системы в единый организм, обладающий принципиально новыми адаптивными возможностями по сравнению с исходными компонентами.



Особенностью популяционно-генетических механизмов эволюции симбиоза является то, что циркуляция симбиотических микробов в системе «хозяин-среда» является индуктором действия специфических микроэволюционных факторов, направляющих адаптивную эволюцию бактериального генома. По мере трансформации симбиозов в мутуалистические формы в их эволюции возрастает роль групповых форм отбора (междемовый, родственный), которые приводят к становлению в симбиозе отношений реципрокного альтруизма.

Раскрытие генетических механизмов эволюции симбиоза имеет существенное методологическое значение для развития эволюционной биологии. Оно заключается, в первую очередь, в демонстрации тесной связи макро- и микроэволюции, которые в системах симбиоза направляются одними и теми же молекулярными и популяционными факторами. В заключение рассмотрения эволюционных процессов подчеркивается, что в формировании экосистем и биоценозов огромную роль играет кооперативная стратегия межорганизменного взаимодействия, которая по своему адаптивному потенциалу не уступает, а по многим параметрам и превосходит стратегии антагонизма и конкуренции.

## 6. ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СИМБИОГЕНЕТИКИ

Экосистемное и биосферное значение симбиотических взаимодействий. Экологическая концепция симбиоза. Функции симбиозов в круговороте элементов в биосфере. Роль микроорганизмов в жизни растений (минеральное питание, защита от патогенов и вредителей, адаптация к стрессам, регуляция развития). Основные типы микробно-растительных симбиозов (азотфиксирующие клубеньки, микоризы, эндوفитные системы, ризосферные и эпифитные ассоциации). Прямое и косвенное взаимодействие микроорганизмов с растениями. Экологические функции микоризы (концепция фитомикозеноза).

Понятие об экологически устойчивых агроэкосистемах, выявление их природных аналогов. Микробно-растительные взаимодействия и экологически сбалансированные сельскохозяйственные системы. Использование микробных препаратов в растениеводстве и животноводстве. Ризосферные рост-стимулирующие бактерии (PGPR): азотфиксация, биоконтроль патогенов, стимуляция развития растений. Интеграция растений с ризобактериями и концепция искусственной биосферы.

Соотношение симбиотического и автотрофного типов азотного питания растений. Генетическая инженерия и биотехнология симбиотических систем. Аналитические и генетические методы получения хозяйственно ценных форм симбиотических микроор-

ганизмов. Симбиотический потенциал дикорастущих и культурных растений. Эволюционно-генетические основы селекции растений на симбиоз. Относительные вклады растений и бактерий в контроль симбиотической эффективности. Решение проблемы конкуренции интродуцированных и местных штаммов за колонизацию растений. Координированная селекция партнеров и конструирование новых симбиозов.

В заключении курса рассматривается возможность практического применения достижений симбиогенетики в различных областях. В частности, знание особенностей формирования микробно-растительных систем полезно селекционерам растений, озабоченных созданием так называемых пластичных сортов, способных поддерживать продуктивность на стабильном уровне, несмотря на различные условия в которых их возделывают.

В терминах классической генетики такое явление вряд ли может быть описано, если не исходить из весьма экзотических представлений об изменении набора генов в разных условиях и т.д. Симбиогенетика же объясняет подобные явления, исходя из того, что наличие системы генов, определяющих «размещение» сожителей внутри хозяйского организма, позволяет последнему вступать в симбиоз с партнерами, различающимися по эффективности обеспечения искомой адаптации.

Практическое значение такого подхода очевидно — микробно-растительные системы, например, обладают значительной самодостаточностью, позволяющей резко сократить расходы на производство сельскохозяйственной продукции и на этой основе осуществлять принципы организации земледелия с минимальным экологическим риском.

Исследование генетических ресурсов растений в отношении взаимодействия с микроорганизмами показало, что дикие формы обладают несравненно более высокими потенциями в этом отношении. Современные же сорта растений зачастую предпочитают удовлетворять свои потребности в азоте и фосфоре за счет минеральных удобрений, а не симбиотического питания. В результате «симбиоза» микробиологов и растениеводов уже реализуются программы селекции, включающие и отбор на максимальное эффективное взаимодействие — минимизацию затрат растения на фиксацию и усвоение молекулярного азота. Необходимость реорганизации селекционного процесса на предмет усиления взаимодействия требует тесной кооперации специалистов разного профиля.

Накопленные знания о взаимодействии микроорганизмов и растений и прилагаемые практические решения позволяют ставить новые задачи перед современным земледелием. Этими задачами является не просто культивирование растений, а создание условий для успешного образования, поддержания и эффективного функционирования высокоинтегрированных микробно-растительных систем. Такие системы обладают максимальной

степенью самодостаточности, поскольку сочетают в себе полезные свойства не только растений, но и микроорганизмов, включая и уникальные признаки, возникающие только в процессе взаимодействия.

Направленное создание микробно-растительных систем и их широкое использование позволило бы обеспечить качественно иной уровень сельскохозяйственного производства, сделав его малозатратным, экологически более безопасным, а, следовательно, и более конкурентоспособным. Если же говорить о более отдаленных перспективах, то знание общих механизмов формирования интегрированных систем открывает путь к созданию объединений, не известных в природе, но обладающих нужными для человека адаптациями. Возможность манипулирования целыми организмами — это биоинженерия будущего, возможности которой сейчас даже трудно представить.

Работа поддержана грантами РФФИ (04-04-48457, 06-04-89000NWO), CRDF и Министерства образования и науки РФ (Аппех ВР2М12, Award RWXO-012-ST-05; Y2-B-12-05), Государственным контрактом с Министерством образования и науки РФ (N02.445.11.74.92) и грантом «Ведущие научные школы» НШ-7623.2006.4

## Литература

1. Генетика развития растений / Лутова Л. А., Проворов Н. А., Тиходеев О. Н. [и др.]; Ред. С. Г. Инге-Вечтомов. — СПб.: Наука, 2000. — 539 с.
2. Дьяков Ю. Т. Общая и молекулярная фитопатология / Дьяков Ю. Т., Озерецковская О. Л., Джавахия В. Г., Багирова С. Ф. — М.: Общество фитопатологов, 2001. — 302 с.
3. Маргелис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки / Маргелис Л. — М.: Мир, 1983. — 352 с.
4. Проворов Н. А. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе / Проворов Н. А. — Журн. общей биологии. — 2001. — Т. 62, № 6. — С. 472–495.
5. Проворов Н. А. Генетические основы биотехнологии в симбиотической азотфиксации / Проворов Н. А., Тихонович И. А. // В кн.: Сельскохозяйственная биотехнология (2-е изд.) / Ред. Шевелуха В. С. — М., Высшая школа, 2003. — С. 161–191.
6. Снайк Г. *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Снайк Г., Кондороши А., Хукас П.; Перевод под ред. Тихоновича И. А., Проворова Н. А. — С.-Петербург, 2002. — 567 с.
7. Тихонович И. А. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции / Тихонович И. А., Проворов Н. А. — С.-Петербург: Наука, 1998. — 194 с.
8. Тихонович И. А. Симбиогенетика микробно-растительных взаимодействий / Тихонович И. А., Проворов Н. А. — Экологич. генетика. — 2004. — Т. I, Вып. 0. — С. 36–46.
9. Douglas A. E. Symbiotic Interactions / Douglas A. E. — Oxford; NY; Toronto: Oxford Univ. Press, 1994. — 148 p.
10. Symbiosis: Mechanisms and Model Systems. — Ed. J. Seckbach. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Boston, London, 2002. — 796 p.

## Meaning of symbiogenetics for biological education

I. A. Tikhonovich

✿ **SUMMARY:** The annotation of lecture course “Symbiogenetics” is suggested which represents the novel brunch of modern biology. It addresses the super-organism genetic systems which are formed due to interactions of non-related organisms (including pro- and eukaryotes) and ensure formation of the novel properties which extend the partners' ecological capacities. Elucidation of the universal mechanisms for establishment of inter-organisms communications enables us to develop the technologies for improving the extant symbiotic complexes and to construct the novel ones for being used in different areas of applied biology.

✿ **KEY WORDS:** symbiosis, symbiogenetics, super-organism genetic systems, microbe-plant interactions, signal transduction, ontogeny of symbiotic systems, evolution of symbiosis, symbiotic nitrogen fixation, sustainable agriculture