

© Н. А. Проворов,  
Н. И. Воробьев

Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии  
Россельхозакадемии

## ЭВОЛЮЦИЯ МИКРОСИМБИОНТОВ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ

### ВВЕДЕНИЕ

✿ **Формирование культурной флоры привело к снижению симбиотического потенциала растений, основанного на взаимодействиях с полезными микроорганизмами. Результатом этого стала трансформация микросимбионтов растений в неадаптивные формы, обусловленная: а) блокированием отбора в пользу штаммов-мутуалистов; б) горизонтальным переносом генов в микробных сообществах, вызывающим возникновение вирулентных «ложных симбионтов».**

**Математическое моделирование показало, что преодолению этих тенденций способствует формирование оптимальной популяционной структуры симбиосистемы, обладающей высокой целостностью и специфичностью взаимодействия партнеров, а также устойчивостью к внедрению неактивных аборигенных симбионтов из почвенных популяций.**

✿ **Ключевые слова:**

мутуалистический симбиоз; эволюция;  $N_2$ -фиксация; корневые клубеньки; горизонтальный перенос генов; естественный отбор; математические модели; экологическая эффективность симбиоза; генотипическая специфичность взаимодействия растений и бактерий; полиморфизм популяций.

Одной из основных и, к сожалению, неблагоприятных закономерностей эволюции культурной флоры является ее обеднение наследственными факторами, определяющими симбиотические адаптации, которые основаны на взаимодействиях растений с полезной микрофлорой ( $N_2$ -фиксирующие бактерии, микоризные грибы, защитные эндо- и экто-симбионты). На примере  $N_2$ -фиксирующего бобово-ризобияльного симбиоза мы показали, что окультуривание растений резко снизило вклад симбиотрофного питания азотом в их метаболизм (в связи с «переключением» бобовых на использование минеральных удобрений), однако способность формировать клубеньки при этом сохранилась (Проворов, 1996; Тихонович, Проворов, 2009). Результатом этого стало снижение  $N_2$ -фиксирующего потенциала популяций ризобий, обусловленное распространением в сельскохозяйственных почвах «ложных симбионтов» — вирулентных, но не фиксирующих  $N_2$  штаммов. Выяснение механизмов их распространения, а также путей преодоления его негативных последствий является целью нашей статьи.

### 1. ПОЛИМОРФИЗМ СИМБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Особенностью симбиотических микроорганизмов является их необычайно высокий популяционный полиморфизм: по данным изоферментного анализа, средние значения коэффициента генетической гетерогенности (Nei, 1978) составляют: для ризобий 0,59, для специализированных патогенов животных и человека 0,45, для энтеробактерий 0,37 (Provovov, Vorobyov, 2008). Помимо этого, для ризобий характерны особые формы полиморфизма, связанные с симбиотическим взаимодействием:

- 1) экотипический полиморфизм, который затрагивает способность к образованию клубеньков ( $Nod^+/Nod^-$ , от: nodulation);
- 2) полиморфизм по способности к симбиотической азотфиксации ( $Fix^+/Fix^-$ ), который поддерживается среди клубенькообразующих ( $Nod^+$ ) штаммов;
- 3) полиморфизм по специфичности проявления мутуализма, проявляемый при взаимодействии  $Fix^+$  штаммов с разными генотипами растений.

Важную роль в повышении полиморфизма симбиотических бактерий играет образование панмиктичных популяций, утративших неравновесие по сцеплению генов (Maynard Smith et al., 1993). Для ризобий характерна высокая мобильность «симбиотических» генов, которая определяется их локализацией на плазидах или в геномных островах (Finan, 2002). Важно отметить, что панмиктичные популяции могут формироваться на фоне низкой активности горизонтального переноса генов (ГПГ), которая компенсируется частотно-зависимым отбором, способствующим размножению редких рекомбинантов (Проворов, Воробьев, 1998).

У ризобий ГПГ активируется при интродукции бобовых растений-хозяев из центров происхождения в регионы возделывания, куда растения обычно переходят в сопровождении аборигенной симбиотической микрофлоры (Richardson et al., 2000). Затем в результате гибридизации бактерий-мигрантов с местными штаммами могут возникать вирулентные рекомбинанты, которые, как правило, не способны к азотфиксации (Provovov, Vorobyov, 2008). В популяциях таких рекомбинантов, взаимодействующих с растениями при дефиците связанного азота, индуцируется отбор в пользу  $N_2$ -фиксирующих генотипов (раздел 2). Однако в условиях

Поступила в редакцию 01.10.2010.  
Принята к публикации 11.08.2011.

избытка азота этот отбор блокируется, и в системах «растение—почва» накапливаются неактивные штаммы, которые препятствуют инокуляции бобовых высокоактивными (производственными) штаммами. Этому накоплению могут способствовать регулярные обработки почв и севообороты, в результате чего мобильность симбиотических генов в агроценозах оказывается более высокой, чем в природных экосистемах (Wernegreen et al., 1997).

## 2. ОТБОР ПО ПРИЗНАКАМ МУТУАЛИЗМА

Особенность симбиоза как субъекта микроэволюционного процесса заключается в том, что давления отбора, вызывающие коэволюцию партнеров, возникают непосредственно в результате их взаимодействия (Provorov, Vorobyov, 2009). Основную роль в этом отборе играют положительные обратные связи партнеров: метаболические и регуляторные связи (обмен партнеров сигналами, приводящий к взаимной регуляции их генов; образование объединенных систем С/N метаболизма) преобразуются в популяционные связи (перекрестные давления отбора). Например, перенос продуктов фиксации N<sub>2</sub> из клубеньков в надземные органы растений стимулирует встречный поток продуктов фотосинтеза, который индуцирует в эндосимбиотических популяциях бактерий отбор на повышение эффективности мутуализма. При строго клональной структуре этих популяций закрепление признаков мутуализма происходит благодаря междомовому отбору (его единицами являются внутриклубеньковые клоны, конкурирующие за С-соединения). При более распространенной смешанной структуре эндосимбиотической бактериальной популяции в ней действует иерархически организованная система индивидуальных (Дарвиновский, частотно-зависимый) и групповых (междомовый, родственный) форм отбора, возникающих в

результате перестроек растительной популяции, связанных с переходом к симбиотрофному питанию азотом.

Однако при нарушении симбиотрофии, вызванном доместикацией и селекцией растений, метаболические связи партнеров нарушаются, вследствие чего отбор бактерий на повышение эффективности симбиоза блокируется, и происходит их трансформация в неадаптивные формы — «ложные симбионты» (Provorov, Vorobyov, 2009).

## 3. УСКОРЕНИЕ ЭВОЛЮЦИИ ЭФФЕКТИВНОГО СИМБИОЗА

Снижение количества удобрений, вносимых под бобовые, вызывает их переключение на симбиотрофное питание азотом: растения создают в своих тканях и клетках ниши для микросимбионтов (Brewin, 2004), а также стимулируют эволюцию бактерий на повышение эффективности мутуализма (Provorov, Vorobyov, 2009). Эта стимуляция обусловлена несколькими механизмами.

- 1) При дефиците азота начальные стадии инокуляционного процесса происходят с максимальной скоростью (так как в корнях возникает избыток углерода, необходимого для быстрых перестроек клеточных стенок при захвате ризобий корневыми волосками; Яковлева, 1975), что создает условия для проникновения в клубеньки единичных бактериальных клеток.
- 2) При клональности эндосимбиотической популяции ризобий растения применяют против Fix<sup>-</sup> штаммов «санкции», связанные с активизацией защитных реакций (Denison, 2000). Путем математического моделирования показано, что в результате индуцируемого при этом отбора происходит координированное повышение эффективности и специфичности мутуализма (табл. 1), а также функциональной целостности симбиоза (Проворов,

Таблица 1

### Моделирование эволюции адаптивно значимых свойств бобово-ризобияльного симбиоза при повышении клональности внутриклубеньковой популяции ризобий\*

Схемы развития симбиоза	Штаммы, способные размножаться в клубеньках растений генотипа Г1	Соотношения растительных генотипов Г1:Г2	Соотношение давлений отбора Г1→М3/ Г1→М1**	ЭМС***
C <sub>0</sub>	Р, М1, М2, М3	50:50	+ 0,244	0,270
C <sub>1</sub>	М1, М2, М3	58:42	- 0,007	0,324
C <sub>2</sub>	М1, М3	68:32	- 1,071	0,376

\* Система состоит из диморфной популяции растений (генотипы Г1, Г2) и низко-полиморфной популяции бактерий (родительский штамм Р, который образует не фиксирующие N<sub>2</sub> клубеньки с обоими растительными генотипами, и его три N<sub>2</sub>-фиксирующие мутанта — М1, М2, М3). N<sub>2</sub>-фиксирующие комбинации партнеров разделили на специфичные — обладающие максимальной активностью (Г1/М1, Г2/М2); неспецифичные — с промежуточной активностью (Г1/М3, Г2/М3); и анти-специфичные — с наименьшей активностью (Г1/М2, Г2/М1). Модель подробно описана ранее (Воробьев, Проворов, 2010).

\*\* Отбор, действующий на «специфичного» мутуалиста М1 со стороны растительного генотипа Г1, всегда положителен (отношения Г1/М1 мутуалистические). Отбор, действующий на «неспецифичного» мутуалиста М3 со стороны Г1, по мере возрастания клональности эндосимбиотической популяции ризобий (C<sub>0</sub>→C<sub>1</sub>→C<sub>2</sub>) переходит от положительного к отрицательному (отношения Г1/М3 переходят от мутуализма к антагонизму).

\*\*\* Эффективность мутуалистического симбиоза (ЭМС) определяли как соотношение количеств семян, сформированных растениями после колонизации бактериями клубеньков, к максимально возможным количествам семян, формируемых при 100 %-й частоте N<sub>2</sub>-фиксирующих бактерий в клубеньках.

Тихонович, 2003; Воробьев, Проворов, 2010), которое характерно для естественной эволюции ризобий.

Предложенная методика моделирования может быть использована для определения оптимальной популяционной структуры (формирования прототипа) эффективного симбиоза, который характеризуется высокой целостностью и специфичностью взаимодействия партнеров, а также устойчивостью к внедрению неактивных аборигенных симбионтов из почвенных популяций. Работа поддержана РФФИ, грант 09-04-00907а.

## Литература

1. Воробьев Н. И., Проворов Н. А., 2010. Моделирование эволюции бобово-ризобиального симбиоза на повышение функциональной интегрированности партнеров и экологической эффективности их взаимодействия // Экологическая генетика. Т. 8. № 4. С. 16–26.
3. Проворов Н. А., 1996. Соотношение симбиотрофного и автотрофного питания азотом у бобовых растений: генетико-селекционные аспекты // Физиология растений. Т. 43. № 1. С. 127–135.
4. Проворов Н. А., Воробьев Н. И., 1998. Роль межштаммовой конкуренции в эволюции генетически полиморфных популяций клубеньковых бактерий // Генетика. Т. 34. № 12. С. 1712–1719.
5. 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.
6. Тихонович И. А., Проворов Н. А., 2009. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агро-систем будущего. Изд-во СПбГУ, С.-Петербург, 210 с.
7. Яковлева З. М., 1975. Бактериоды клубеньковых бактерий. Новосибирск, Наука. 172 с.
8. Brewin N. J., 2004. Plant cell wall remodeling in the *Rhizobium*-legume symbiosis // Crit. Rev. Plant. Sci. Vol. 23. P. 1–24.
9. Denison R. F., 2000. Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia // The Amer. Naturalist. Vol. 156. P. 567–576.
10. Finan T., 2002. Evolving insights: symbiotic islands and horizontal gene transfer // J. Bacteriol. Vol. 184. P. 2855–2856.

### ✿ Информация об авторах

**Проворов Николай Александрович** — д. б. н., заместитель директора. Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. Шоссе Подбельского, д. 3, Санкт-Петербург, Пушкин-8, 196608. E-mail: provorov@newmail.ru.

**Воробьев Николай Иванович** — к. техн. н., руководитель группы биоинформатики и математического моделирования. Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии. Шоссе Подбельского, д. 3, Санкт-Петербург, Пушкин-8, 196608. E-mail: vorobyov@arriam.spb.ru.

11. Maynard Smith J., Smith N. H., O'Rourke M., Spratt B. G., 1993. How clonal are bacteria? // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 90. P. 4384–4388.
12. Nei M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. Vol. 89. P. 583–590.
13. Provorov N. A., Vorobyov N. I., 2008. Evolution of symbiotic bacteria in “plant-soil” systems: interplay of molecular and population mechanisms // In: Progress in Environmental Microbiology. Ed. Kim M.-B. Nova Science Publishers, Inc., New York. P. 11–67.
14. Provorov N. A., Vorobyov N. I., 2009. Host plant as an organizer of microbial evolution in the beneficial symbioses // Phytochemical Reviews. Vol. 8. P. 519–534.
15. Richardson D. M., Allsopp N., d'Antonio C. M., Milton S. J., Rejmanek M., 2000. Plant invasions — the role of mutualisms // Biol. Reviews. Vol. 75. P. 65–93.
16. Wernegreen J. J., Harding E. E., Riley M. A., 1997. *Rhizobium* gone native: unexpected plasmid stability of indigenous *Rhizobium leguminosarum* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 94. P. 5483–5488.

## EVOLUTION OF MICRO-SYMBIONTS OF CULTURED PLANTS: EXPERIMENTAL AND MATHEMATICAL MODELS

Provorov N. A., Vorobyov N. I.

✿ **SUMMARY:** Formation of the cultured flora resulted in a decrease of plant symbiotic potential based on interactions with beneficial microorganisms. This decrease leads to transformation of plant micro-symbionts into the non-adaptive forms caused by: a) blocking the selection in favor of mutualistic strains; b) horizontal gene transfer in the microbial communities resulted in formation of virulent “symbiotic cheaters”. Mathematical simulation suggests that these tendencies may be overcome by formation of the optimal population structures in symbiotic system which should possess a high integrity and specificity of partners' interactions as well as by a tolerance to the invasions of non-active aboriginal strains from the local soil populations.

✿ **KEY WORDS:** mutualistic symbiosis; evolution;  $N_2$  fixation; root nodules; horizontal gene transfer; natural selection; mathematical models; ecological efficiency of symbiosis; genotypic specificity of plant-microbe interactions; population polymorphism.

**Provorov Nikolay Alexandrovich** — Doctor of Biological Sciences, Deputy Director. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. Podbelsky Chaussee 3, St. Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia. E-mail: provorov@newmail.ru.

**Vorobyov Nikolay Ivanovich** — Candidate of Technical Sciences, Head of the Group of Bioinformatics and Mathematical Simulation. All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. Podbelsky Chaussee 3, St. Petersburg, Pushkin 8, 196608, Russia. E-mail: vorobyov@arriam.spb.ru.