

## II. АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИКИ РАСТЕНИЙ

### ПРИНЦИПЫ СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С СИМБИОТИЧЕСКИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

**И.А. Тихонович, Н.А. Проворов**

ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии,  
Санкт-Петербург–Пушкин, e-mail: contact@arriam.spb.ru

Адаптация к условиям внешней среды путем симбиотических взаимодействий с микроорганизмами является одним из фундаментальных свойств высших растений [1]. Обладая способностью полностью обеспечивать себя углеродом и энергией, получаемыми в процессе фотосинтеза, большинство растений испытывает недостаток во многих других элементах минерального питания, в первую очередь – в азоте и фосфоре. Поэтому симбиозы с микроорганизмами, фиксирующими азот (ризобии, актиномицеты, цианобактерии, эндофитные и ризосферные бактерии) или оптимизирующими получение питательных веществ из почвы (микоризные грибы), характерны для подавляющего большинства растений [2]. Кроме того, многие растения поддерживают в своих тканях или на поверхности микроорганизмы, которые регулируют развитие хозяина путем выработки фитогормонов, защищают его от фитофагов благодаря синтезу токсинов, либо подавляют развитие патогенов [3].

К сожалению, созданная человеком культурная флора характеризуется резким снижением природного симбиотического потен-

циала [4]. Следствием этого является необходимость восполнять утраченные симбиотические функции растений путем использования агрохимикатов (удобрения, средства защиты, регуляторы роста), которые являются одним из основных источников загрязнения окружающей среды. Поэтому создание систем устойчивого сельского хозяйства (sustainable agriculture), с которым экологи не без основания связывают выживание человека и сохранение биосферы, немыслимо без восстановления и преумножения симбиотического потенциала культурных растений.

#### Генетическая система симбиоза

Концепция симбиоза, предложенная Антоном де Бари более 120 лет назад [5], рассматривает его как длительное сосуществование неродственных организмов, в ходе которого осуществляется широкий спектр взаимовыгодных (мутуалистических) и паразитарных (антагонистических) взаимодействий. Впоследствии эти типы отношений стали противопоставлять друг другу, что выразилось в становлении фитопатологии и

паразитологии в качестве самостоятельных дисциплин. Однако к концу 1980-х гг. стало очевидным, что мутуализм и антагонизм в отношениях партнеров могут быть разделены только на популяционном и экологическом уровнях, тогда как генетические и биохимические механизмы этих отношений имеют больше сходства, чем различий [6, 7].

Выяснение этого факта имело огромное методологическое значение, так как создало возможность для синтеза знаний о генетике мутуализма и антагонизма, что привело к становлению новой области знаний – симбиогенетики. Ее предметом являются надорганизменные генетические системы симбиоза, формируемые в результате функциональной, а иногда и структурной интеграции «симбиотических» (*sym*) генов-партнеров [8]. Благодаря работе этих систем осуществляются: 1) сигнальные взаимодействия партнеров, приводящие к перекрестной регуляции и дифференциальной экспрессии их *sym*-генов; 2) развитие комбинированных структур, содержащих компоненты от разных партнеров; 3) их метаболическая интеграция, которая приводит к появлению у организмов новых адаптивно значимых свойств.

Наиболее изученный пример сигнальных взаимодействий – это обмен партнерами регуляторными факторами на ранних стадиях симбиоза бобовых растений и клубеньковых бактерий или ризобий [9]. Он начинается с узнавания ризобиями флавоноидов, выделяемых прорастающими семенами и корнями хозяина и воздействующих на белковый продукт конститутивного бактериального гена *nodD*. В результате этого белок NodD активирует систему генов клубенькообразования, функцией которых является синтез липо-хито-олигосахаридных Nod-факторов. Одни из этих генов (*nodABC*) являются общими для всех видов ризобий и кодируют коровую часть молекулы Nod-фактора. Другие гены (например, *nodPQ*, *nodH*, *nodEF*, *nodX*) являются видо- или даже штаммоспецифичными. Они контролируют модификации химической структуры Nod-фактора, определяющие специфичность последующего взаимодействия. Например, гены *nodPQ* и *nodH*, выявленные у клубеньковых бактерий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*), определя-

ют присоединение к Nod-фактору сульфатной группы, необходимой для индукции клубенькообразования у люцерны. Инактивация данных генов приводит к утрате бактериями способности инокулировать люцерну, однако при этом появляется способность вызывать ранние симбиотические реакции у нехарактерного хозяина – вики.

Сигнальные процессы при симбиозе часто сводятся к узнаванию партнеров и к их обмену факторами, обеспечивающими запуск совместной программы развития. Это не совсем правильно, так как в результате перекрестного обмена сигналами у каждого из партнеров индуцируются собственные сигнальные процессы, обеспечивающие тонкую регуляцию симбиоза. Клубеньковые примордии, возникающие у бобовых под действием Nod-факторов, вырабатывают сигналы, поступающие в листья и приводящие к формированию авторегуляторного ответа. Он ограничивает число формируемых растением клубеньков, ограждая растение от перерасхода энергии и определяя формирование симбиоза только в условиях недостатка азота [10]. Благодаря действию системных факторов растение взаимодействует с микробами, локализованными лишь в одном из его органов, как единое целое, что и обеспечивает высокую адаптивную значимость сформированного симбиоза.

Образование новых тканевых и клеточных структур характерно для большинства микробно-растительных симбиозов. Наиболее изученными их примерами являются клубеньки бобовых, которые закладываются *de novo* в наружном или внутреннем кортексе корня [11]. Для большинства бобовых характерны недетерминированные клубеньки, способные к длительному росту благодаря активности апикальной меристемы. В этих клубеньках выявляется несколько зон, соответствующих основным стадиям развития симбиоза (инфицирование растительных клеток; дифференцировка бактерий во внутриклеточные бактериоиды, содержащиеся в особых клеточных компартментах – симбиосомах; индукция в бактериоидах нитрогеназной активности; старение и деградация бактериоидов). Однако у некоторых бобовых (соя, фасоль) возникают более простые детерминированные клубеньки, лишенные ста-

бильной меристемы и не подразделяемые на гистологически выраженные зоны.

Характерной чертой многих симбиозов является их строгая регуляция со стороны растения-хозяина, которая обеспечивает оптимальное количество и биохимическую активность эндосимбионтов, предотвращая переход мутуалистического взаимодействия в патогенный процесс. Тем не менее на биохимическом и генетическом уровнях механизмы регуляции мутуализма и патогенеза имеют много общего. В частности, в клубеньках бобовых наблюдают ограниченный синтез фенолов, флавоноидов и активных форм кислорода, которые в больших количествах образуются при реакции сверхчувствительности, вызванной внедрением патогенов. В нормальных клубеньках эти факторы функционируют не как подавители микросимбионтов, а как регуляторы их активности. Чрезмерная активация этих регуляторов, происходящая, например, при нарушении у ризобий синтеза поверхностных полисахаридов, блокирует развитие симбиоза [12].

К аналогичным выводам привело изучение регуляции растениями арбускулярной микоризы. При ее развитии в эпидермисе и кортексе корня индуцируется синтез фенолов, пероксидаз, глюкеназ, хитиназ, каллозы и других факторов, используемых растениями для защиты от фитопатогенов [13]. В случае микоризы эти реакции гораздо менее интенсивны и более дифференцированы в пространстве и во времени, чем при патогенном процессе, что связано с регуляцией защитных реакций растения сигналами симбионта-мутуалиста. Учитывая, что грибы арбускулярной микоризы являются анцестральными симбионтами наземных растений, которые возникли уже на самых ранних этапах становления наземной флоры, можно сделать вывод о том, что и функции поддержания растениями этих симбионтов являются весьма древними. Позднее эти функции могли быть преобразованы для защиты растений от патогенов, а также для взаимодействия с более молодыми симбионтами-мутуалистами. Об этом говорит, например, наличие ряда общих факторов, регулирующих развитие арбускулярной микоризы и клубеньков [11]. Наличие у растений единой системы контроля над развитием различных

форм симбиоза является основой для разработки методов биоконтроля патогенов, осуществляемого при использовании микробных препаратов [14].

Итогом сигнальных и морфогенетических процессов, сопровождающих развитие симбиоза, является формирование у партнеров комплекса новых признаков, которые отсутствовали у них в свободном состоянии и развитие которых приводит к расширению адаптивных возможностей одного или обоих взаимодействующих организмов. Это расширение часто происходит путем метаболической интеграции партнеров, которая открывает им доступ к новым источникам питания и энергии.

Необходимо различать несколько типов метаболических взаимодействий при симбиозе. Наиболее простым из них является установление между партнерами тесных трофических связей, которые, однако, сводятся к передаче неспецифических метаболитов: обычно эндосимбионты получают от хозяина вещества, которые могут вырабатывать и сами. При паразитизме взаимодействие партнеров обычно ограничивается этими связями. При мутуализме взаимодействие часто оказывается более сложным: наблюдается предоставление одним из партнеров другому новой биохимической функции, которую последний не может выполнять самостоятельно. Подобные отношения часто оформляются в виде обобщенных (межорганизменных) метаболических систем, которые объединяют биохимические пути партнеров. Во многих симбиозах объединению подвергаются пути азотного и углеродного обмена партнеров, что обеспечивает оптимизацию их базовых жизненных функций – получение энергии и синтез белка [5].

Наиболее изученным примером такого объединения является сопряжение растительного фотосинтеза с микробной азотфиксацией, наблюдаемое в бобово-ризобиальном симбиозе. Поступающие в клубенек продукты фотосинтеза используются в двух направлениях – для обеспечения процесса азотфиксации энергией и для ассимиляции ее продуктов. Согласно данным В.Л. Кретовича [15], для симбиотической фиксации 1 г азота бобовым необходимо затратить 15–20 г глюкозы, из которых более половины расходуется на дыхание клубеньков и менее трети

преобразуется в транспортные формы азота, возвращаемые в надземные органы. Взаимная адаптация метаболических систем партнеров является результатом их длительной коэволюции, направленной на максимально экономное расходование поступающего в клубеньки углерода. Эта эволюция привела к параллельному формированию в нескольких группах бобовых клубеньков детерминированного типа, в которых в качестве транспортных форм азота образуются уреиды – аллантаин и аллантаиновая кислота [16]. В этих соединениях соотношение С : N равно 1 : 1, тогда как в амидах и аминокислотах это соотношение вдвое выше.

Таким образом, упрощение тканевой структуры клубенька оказалось весьма прогрессивным с функциональной точки зрения – оно было сопряжено с повышением эффективности его функционирования. Совершенствование механизма ассимиляции фиксированного азота достигается благодаря тому, что внешне однородная ткань детерминированного клубенька состоит из чередующихся клеток двух типов – инфицированных ризобиями, в которых фиксируется азот и происходит его первичная ассимиляция (образование аминокислот и амидов), и неинфицированных, в которых амиды трансформируются в уреиды [17]. Такое преобразование симбиотической системы, позволяющее резко снизить затраты углерода на ассимиляцию азота, несомненно, имело большое адаптивное значение для растений и было закреплено отбором в нескольких группах бобовых.

Тесное метаболическое взаимодействие партнеров наблюдается и в других типах микробно-растительного симбиоза. В случае арбускулярной микоризы поступающие от растения фотосинтаты используются в качестве источников энергии для осмотрофного питания гриба и для транспорта по его мицелию больших количеств фосфата, который передается растению через утонченные стенки особых структур гриба – арбускул, проникающих в растительные клетки [18]. При симбиозе злаков с эндифитными грибами *Neotyphodium* поступающий от растения углерод используется для синтеза токсинов, ограждающих хозяина от животных-фитофагов [19].

Итак, взаимодействия с микроорганизмами осуществляются благодаря наличию у

растений высокоинтегрированных генных систем, сложившихся в результате длительной эволюции и являющихся неотъемлемой частью растительного генома. Конкретные механизмы действия этих систем в разных симбиозах могут существенно различаться, однако они вызывают единый экологический эффект – повышение адаптивного потенциала растений, который может и должен быть использован в практических целях.

### Симбиотический потенциал культурных растений

Наиболее полный цикл работ по характеристике симбиотического потенциала растений был выполнен на бобовых, которые имеют два типа азотного питания – симбиотрофное (осуществляемое при симбиозе с ризобиями) и автотрофное (усвоение азотных соединений из почвы или удобрений). Анализ баланса этих типов питания показал [20], что для «традиционных» бобовых культур, имеющих продолжительную историю окультуривания и селекции, характерно либо преобладание автотрофного типа азотного питания (горох, люцерна, вика посевная), либо равная эффективность авто- и симбиотрофного питания (фасоль, соя). Для этих культур характерен высокий полиморфизм по типу азотного питания: одни сорта развивают максимальную продуктивность при инокуляции ризобиями, а другие – при внесении азота. Преобладание симбиотрофного питания выявлено лишь у некоторых молодых бобовых культур (вика мохнатая, клевер сходный, козлятник восточный), которые по физиологическим свойствам еще близки к своим дикорастущим предкам. Более того, при анализе генетического полиморфизма гороха и люцерны было установлено, что примитивные сорта и дикорастущие формы превосходят сорта интенсивного типа по азотфиксирующей активности. Эти данные показывают, что в ходе окультуривания и селекции растений происходило существенное снижение их симбиотического потенциала. Оно могло быть связано с тем, что селекцию растений проводили на фоне достаточного, а часто и избыточного снабжения азотом, что привело к отбору генотипов, «склонных» к энергетически менее затратному автотрофному питанию.

К аналогичному выводу приводит и изучение растений по эффективности других типов симбиоза. Так, дикорастущие диплоидные формы пшеницы в 20–40 раз превосходят гексаплоидные сорта по эффективности поддержания ризобактерий, рассчитанной на единицу выделяемого корнями углерода [21]. У дикорастущих форм и местных сортов гороха при инокуляции грибами арбускулярной микоризы прибавки составили в среднем по массе растений +184,0 %, а по накоплению в них фосфора +356,9 % [22]. В то же время для сортов интенсивного типа эти прибавки составили только +12,3 % и +42,6 %. Представленные данные показывают, что одной из наиболее актуальных задач селекции растений является восстановление их природного симбиотического потенциала, утраченного в ходе адаптации к условиям агроценоза.

Другим выводом из проведенных работ является то, что дикорастущие и малокультурные формы растений должны максимально широко использоваться в качестве исходного материала для селекции симбиотически активных форм. Наиболее изучена изменчивость гороха посевного и его микросимбионтов (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*) на Ближнем Востоке – в центре происхождения гороха. Здесь были выявлены мелкосемянные «афганские» формы, не заражающиеся штаммами ризобий европейского происхождения [23, 24]. Позднее было показано, что эти горохи дефектны по наиболее ранним стадиям сигнального взаимодействия, связанным с синтезом и рецепцией Nod-факторов [25]. Бактериальные штаммы, инокулирующие ближневосточные формы гороха, были выделены из почв Афганистана, Израиля и Турции [26]. У них обнаружен ген *nodX*, определяющий присоединение к Nod-фактору дополнительной ацетильной группы. Такая структура сигнала оказалась необходимой для преодоления устойчивости растений к инокуляции, определяемой рецессивным геном *sym2*, по которому гомозиготны афганские горохи и который кодирует один из компонентов рецептора для Nod-факторов [27].

К счастью, культурные сорта бобовых утратили симбиотический потенциал далеко не полностью, вследствие чего для большинства из них характерен высокий поли-

морфизм по признакам симбиоза. Его характерной чертой является преобладание в сортовых популяциях генотипов с низкой азотфиксирующей активностью, среди которых с невысокими частотами могут быть обнаружены высокоактивные генотипы [28]. Опыты с различными бобовыми культурами, включая перекрестноопылителей (люцерна посевная, козлятник восточный, клевер луговой) и самоопылителей (горох посевной, фасоль обыкновенная), показали, что на основе этих редких генотипов могут быть получены линии, стабильно поддерживающие высокий уровень азотфиксации и пригодные для использования в качестве ее доноров при селекции на повышение симбиотической активности [29]. Высокая наследуемость признаков симбиоза, а также наличие высоких корреляций между азотфиксирующей активностью и урожайностью растений свидетельствуют о том, что такая селекция может быть весьма результативной [30].

Симбиотическая селекция требует оценки большого количества растительных генотипов на эффективность взаимодействия с микроорганизмами, что технически часто оказывается сложным. Поэтому было разработано несколько групп экспресс-методов, позволяющих решать данную задачу [30].

1. Отбор растений на обедненных субстратах. Для бобовых весьма эффективным является отбор растений, способных активно развиваться при инокуляции ризобиями на безазотном (резко обедненном по азоту) фоне.
2. Учет интенсивности колонизации растений микроорганизмами, например числа образующих клубеньков. В то же время отбор по этому показателю имеет некоторые ограничения, связанные с тем, что число клубеньков хорошо коррелирует с азотфиксирующей и симбиотической активностью лишь для форм с низкими уровнями проявления этих признаков. Повышение числа клубеньков выше определенного предела может вызвать снижение урожайности растений, обусловленное перерасходом продуктов фотосинтеза на поддержание избытка симбиотических структур.
3. Измерение ферментативных активностей, обеспечивающих эффективность симбиоза. При изучении азотфиксирующих сис-

тем в первую очередь должна быть изменена активность нитрогеназы, катализирующей восстановление  $N_2$ . Для этого используют прямые и косвенные методы. Прямые методы, связанные с использованием нерадиоактивного изотопа  $^{15}N$ , дают наиболее точную оценку количества фиксируемого азота [31], однако для экспресс-анализа селекционного материала применение этих дорогостоящих и трудоемких методов не целесообразно. Поэтому широкое распространение получил косвенный метод, связанный со способностью нитрогеназы восстанавливать ацетилен до этилена [32]. Несмотря на некоторые методические ограничения, ацетиленредуктазная активность может быть использована для сравнительной оценки большого числа генотипов, так как систематические ошибки метода нивелируются в ходе сравнения. Особенно удобен этот метод на первых этапах селекции, когда решается задача отбраковки большого числа симбиотически неактивных растений [33, 34].

Поскольку микробно-растительный симбиоз является продуктом сопряженной эволюции партнеров, то и его эффективность зависит от генотипов как микросимбионта, так и растения-хозяина. Поэтому для улучшения эффективности симбиоза необходима координированная работа с растениями и микроорганизмами. Для организации этой работы важно знать, каковы относительные генотипические вклады партнеров в определение симбиотической эффективности. Общим подходом к решению данной задачи является двухфакторный дисперсионный анализ данных об эффективности симбиоза, образуемого различными генотипами растений и микроорганизмов. Этот подход позволяет разделить общее варьирование симбиотической активности на составляющие, которые соответствуют аддитивным (неспецифическим) действиям сортов растений и штаммов бактерий, а также их неаддитивному (специфическому) взаимодействию [35].

Анализ различных бобово-ризобиальных систем показал, что вклады партнеров в варьирование показателей симбиотической активности зависят от вида растений, изучаемого признака, а также от условий прове-

дения опыта. При этом была выявлена важная закономерность: аддитивные действия генотипов растений или бактерий не коррелируют с общей эффективностью симбиоза, тогда как для их неаддитивного взаимодействия эта корреляция четко проявляется при сравнении эффективных и неэффективных симбиозов, формируемых различными бобовыми культурами в разных почвенно-климатических условиях [36]. Таким образом, наиболее эффективный симбиоз формируется в тех случаях, когда в максимальной степени реализуется специфичность взаимодействия растений и бактерий. Очевидно, что высокая симбиотическая эффективность может быть достигнута путем создания комплементарных сочетаний генотипов партнеров, для чего и должна проводиться их координированная селекция.

#### **Биоинженерия симбиотических систем**

Вскрытие генетической системы симбиоза позволяет нам приступить к направленному повышению его эффективности, а также к созданию новых симбиотических комплексов. Одним из подходов для этого является модификация процессов узнавания и ранних симбиотических взаимодействий, на которых растение выбирает оптимального партнера из состава обширной и генетически разнородной микробной популяции. Решение этой задачи весьма важно потому, что используемые для инокуляции растений производственные штаммы вступают в конкурентные отношения с аборигенной микрофлорой, представители которой обычно не обладают высокой симбиотической эффективностью, однако хорошо приспособлены к местным условиям и более активно инокулируют растение, чем штаммы-интродуценты [37].

Очевидно, что для решения проблемы конкуренции производственных и местных микроорганизмов необходима, в первую очередь, работа с их собственными генами. Действительно, у ризобий выявлено значительное количество факторов, которые контролируют конкуренцию за образование клубеньков и перенос которых в высокоэффективные производственные штаммы может существенно улучшить их конкурентоспособность [38]. Однако в этой работе важно использовать и

генетические ресурсы растения-хозяина, которое оказывает существенное влияние на исход конкуренции между микросимбионтами. Например, рассмотренные выше афганские горохи были использованы в качестве доноров гена *sym2*, интрогрессия которого в коммерческие сорта исключает их инокуляцию местными малоэффективными штаммами *R. leguminosarum* bv. *viceae*. Изогенные аналоги сортов, отличающиеся от них только аллельным состоянием гена *sym2*, в полевых условиях образуют клубеньки только с высокоэффективным штаммом A1, способным преодолеть *sym2*-контролируемую устойчивость хозяина, благодаря присутствию гена *nodX*. Такое повышение симбиотической специфичности позволяет существенно увеличить массу растений и особенно по накоплению в ней азота, получаемую при инокуляции штаммом A1 (табл.). Аналогичный подход был использован при селекции сои, в центре происхождения которой (Китай) выявлены аллели *Rj*-генов, ограничивающие инокуляцию малоэффективными штаммами ризобий, распространенными в почвах США [39].

Конструирование новых сигнальных отношений является заманчивым подходом не только для повышения эффективности взаимовыгодных микробно-растительных взаимодействий, но и для исключения нежелательных отношений паразитарного типа. Оно может быть достигнуто благодаря изменению «химического портрета» растения путем модификации сигналов, используемых паразитом для активации генов вирулентности. Такими сигналами обычно являются соединения, которые не играют самостоятельной роли в обмене веществ, и поэтому их изменение не приводит к нарушению адаптивных свойств растения. Наиболее ин-

тересной на сегодняшний день попыткой такого рода является метод получения комплексной устойчивости картофеля к фитофторе [40]. Как известно, ее споры начинают активно прорастать, если растение выделяет определенный набор стерингов, необходимых для развития гриба, синтез которых у патогена отсутствует. Изменение спектра стерингов может сделать растение бесполезным как объект паразитизма, и не исключено, что гриб идентифицирует такие «неподходящие» генотипы уже на стадии прорастания.

Важно отметить, что манипуляции сигналлингом являются в противоположность использованию пестицидов «экологически безопасными». Более того, они не предполагают уничтожения патогена, а лишь делают недоступной одну из его потенциальных ниш. При этом организм имеет все шансы сохраниться в природе, меняя своего хозяина, например, атакуя сорные растения.

Еще один подход к использованию сигналлинга основан на том, что шансы на образование клубеньков у внесенного в почву штамма ризобий тем выше, чем раньше начнут работать гены клубенькообразования. Оказывается, что для восприятия растительного сигнала и формирования адекватного ответа бактериям необходимо значительное время. Для того чтобы ускорить эти процессы, можно обработать бактерии, находящиеся в препарате, флавоноидом-индуктором, синтезируемым растением-хозяином. Будучи преадаптированным к скорой встрече с макросимбионтом, коммерческий штамм получит преимущество перед аборигенными штаммами, которые до появления экссудатов ничего не «знали» о потенциальной симбиотической нише.

Однако использование сигналлинга в сельскохозяйственной практике еще ждет

**Таблица**

Повышение симбиотической активности гороха после интродукции аллели *sym2*  
(штамм A1 имеет ген *nodX*)

Генотип	Число клубеньков		Нитрогеназная активность, мкм С <sub>2</sub> Н <sub>4</sub> на растение в час		Прибавка (%) при инокуляции штаммом A1	
	К	A1	К	A1	масса	азот
Nord	18	14	19,8	27,6	+71	+7
Nord <i>sym2/sym2</i>	0	41	0	24,6	+84	+45

своего часа, между тем как негативные последствия его нарушения уже проявляются. Так, некоторые пестициды и инсектициды, используемые при выращивании бобовых (ДДТ, 2,4-D, 2,4,6-T), подавляют клубенькообразование, хотя не являются токсичными ни для растений, ни для микросимбионтов [41]. Причина заключается в том, что по своей структуре данные вещества сходны с флавоноидными соединениями-регуляторами клубенькообразования. Этот пример показывает, что негативный экологический эффект ксенобиотиков может быть гораздо шире, чем их токсическое воздействие, что заставляет анализировать влияние новых агрохимикатов на тест-системы, основанные не только на индивидуальных организмах, но и на образующих ими биосистемах.

Одним из факторов, определяющих эффективность симбиотической азотфиксации, является ее высокая энергетическая стоимость, покрываемая за счет поступающих в клубеньки продуктов фотосинтеза. Бактероиды получают от растения углерод в форме дикарбоновых кислот, метаболизируемых в цикле Кребса с целью выработки АТФ. Лимитирующей стадией этого процесса является перенос дикарбоновых кислот через перибактероидную мембрану, осуществляемый бактериальной пермеазой DctA [42]. Введение в клубеньковые бактерии люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) дополнительных копий генов, кодирующих синтез этого фермента, может повысить нитрогеназную активность клубеньков в 1,5–2 раза [43]. В условиях стерильных вегетационных опытов это может привести к возрастанию количества азота, накапливаемого в зеленой массе люцерны, на 70–80 %. Однако сама биомасса растений возрастает при этом только на 15–20 % [44]. Этот факт еще раз убедительно показывает, что современные сорта бобовых усваивают фиксируемый азот неэффективно и существенное повышение продуктивности симбиоза возможно только в процессе параллельной селекции обоих партнеров.

Один из путей оптимизации метаболической системы симбиоза был открыт благодаря сравнительному биохимическому анализу рассмотренных выше диплоидных и гексаплоидных пшениц. Оказалось, что их различие по эффективности поддержания в ризосфере по-

лезной микрофлоры связано с особенностями состава корневых экссудатов: у диплоидов в них преобладают органические кислоты – оптимальные для ризобактерий питательные субстраты, тогда как гексаплоиды выделяют преимущественно сахара, стимулирующие развитие патогенной микрофлоры [21]. Очевидно, что селекция зерновых культур на способность выделять в почву углерод в форме органических кислот может существенно повысить эффективность ассоциативных симбиозов.

Инженерия корневых ассоциаций представляет существенные трудности, потому что ризосфера, в отличие от клубеньков, не является структурно ограниченной симбиотической нишей, и специфичность ее колонизации почвенными микробами относительно невелика. Однако состав ризосферной микрофлоры можно сделать гораздо более контролируемым путем придания растению способности синтезировать специфические питательные вещества, доступные для утилизации только специально внесенными в почву штаммами-интродуцентами. Пробразом для такого рода отношений является взаимодействие растений с агробактериями, которые в процессе «генетической колонизации» придают своим хозяевам способность синтезировать опины – уникальные производные аминокислот или сахаров, которые доступны для утилизации только самим агробактериям [45]. В модельных опытах было показано, что трансгенные линии люцерны (*Lotus corniculatus*) с введенными в них генами биосинтеза опинов (нопалина и маннопина) приобретают способность избирательно поддерживать на своей поверхности рекомбинантные штаммы псевдомонад, содержащие гены катаболизма этих соединений [46]. Использование подобной стратегии дает ключ к конструированию «искусственной ризосферы», специфически колонизируемой только теми микробами, которые выполняют полезные для растений трофические, ростстимулирующие или защитные функции.

### Заключение

Несмотря на то, что генетика микробно-растительных взаимодействий развивается в настоящее время очень быстро, наши знания в этой области пока ограничены несколько-



ми относительно простыми модельными системами. Поэтому весьма актуальным является распространение опыта симбиогенетики на более сложные, многокомпонентные симбиотические системы (например, рубец жвачных), а также и на биоценоотические комплексы (почвенная микрофлора). Итогом этих работ может стать создание принципиально новых форм агроценоза, в которых применение агрохимикатов будет весьма ограниченным, поскольку основные адаптивно значимые функции сельскохозяйственных растений и животных выполняют микроорганизмы. Сочетание высокой эффективности сельского хозяйства, достигнутой в ходе «зеленой революции», с его экологической безопасностью требует оптимизации сочетаний агрохимических и микробиологических приемов в растениеводстве. В этой связи весьма важной представляется организация фундаментальных исследований в области экологии симбиоза, которые пока еще находятся в зачаточном состоянии.

Решение комплекса проблем, связанных с организацией симбиотической селекции, требует проведения междисциплинарных исследований, в которых участвуют специалисты разных профилей. Природные микробно-растительные системы могут быть познаны и улучшены только «научными симбиозами» – сообществами ученых, владеющих знаниями и методами в комплементарных областях изучения макро- и микроорганизмов. Создание тесно интегрированных научных коллективов, изучающих фундаментальные и прикладные аспекты симбиотических взаимодействий, – чрезвычайно актуальная задача, для решения которой должны быть использованы организационные возможности современной науки.

Работа выполнена при поддержке грантов Президента РФ (НШ-1103.2003.4) и Американского фонда гражданских исследований и развития, CRDF (ST-012-0).

### Литература

1. Возняковская Ю.М. Микрофлора растений и урожай. Л.: Колос, 1969. 240 с.
2. Лутова Л.А., Проворов Н.А., Тиходеев О.Н., Тихонович И.А., Ходжайова Л.Т., Шишкова С.О. Генетика развития растений / Ред. С.Г. Инге-Вечтомов. СПб.: Наука, 2000. 539 с.
3. Biology of Plant-Microbe Interactions. V. 4. Molecular Plant-Microbe Interactions: New Bridges between Past and Future (Proc. 11-th Intern. Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions). IS-MPMI / Eds I.A. Tikhonovich, B.J.J. Lugtenberg, N.A. Provorov. St.-Petersburg, Russia, 2004. 634 p.
4. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Пути использования адаптивного потенциала систем «растение – микроорганизм» для конструирования высокопродуктивных агрофитоценозов // С.-х. биология. 1993. № 5. С. 36–46.
5. Douglas A.E. Symbiotic Interactions. Oxford; New York; Toronto: Oxford Univ. Press, 1994. 148 p.
6. Spaink H.P. The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of symbiogenesis // Annu. Rev. Phytopathol. 1995. V. 33. P. 345–368.
7. Проворов Н.А. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе // Журн. общ. биологии. 2001. Т. 62, № 6. С. 472–495.
8. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиогенетика микробно-растительных взаимодействий // Экол. генетика. 2004. Т. 1, № 0. С. 36–46.
9. Овцына А.О., Тихонович И.А. Структура, функции и возможность практического применения сигнальных молекул, инициирующих развитие бобово-ризобияльного симбиоза // Экол. генетика. 2004. Т. 1, № 3. С. 14–24.
10. Gresshoff P.M., Buzas D.M., Laniya T. et al. Systemic regulation of nodulation by a leaf-controlled LRR-receptor kinase // Proc. 11-th Intern. Congr. on Molecular Plant-Microbe Interactions / Eds. I.A. Tikhonovich, B.J.J. Lugtenberg, N.A. Provorov. IS-MPMI. St.-Petersburg, Russia. 2004. P. 369–372.
11. Проворов Н.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Сравнительная генетика и эволюционная морфология симбиозов растений с микробами-азотфиксаторами и эндомикоризными грибами // Журн. общ. биологии. 2002. Т. 63, № 6. С. 451–472.
12. Niehaus K., Kapp D., Puhler A. Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS-1)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant // Planta. 1993. V. 190. P. 415–425.
13. Kapulnik Y., Volpin H., Itzhaki H. et al. Suppression of defense responses in mycorrhizal alfalfa and tobacco roots // New Phytologist. 1996. V. 133. P. 59–64.
14. Lugtenberg B.J.J., Dekkers L., Bloemberg G. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas* // Annu. Rev. Phytopathol. 2001. V. 39. P. 461–490.
15. Кретович В.Л. Биохимия усвоения азота воздуха растениями. М.: Наука, 1994. 168 с.

16. Sprent J.I. Nodulation in Legumes. Kew, Royal Botanical Gardens: Cromwell Press Ltd., 2001. 146 p.
17. Vance C.P., Heichel G.H. Carbon in N<sub>2</sub> fixation: limitation or exquisite adaptation? // Annu. Rev. Plant Physiol. 1991. V. 42. P. 373–392.
18. Bago B., Pfeffer P.E., Shacher Hill Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas // Plant Physiology. 2000. V. 124. P. 949–957.
19. Schardl C.L., Leuchtmann A., Chung K.R., Penny D., Siegel M.R. Coevolution by common descent of fungal symbionts (*Epichloe* spp.) and grass hosts // Mol. Biol. Evol. 1997. V. 14, N 2. P. 133–143.
20. Проворов Н.А. Соотношение симбиотрофного и автотрофного питания азотом у бобовых растений: генетико-селекционные аспекты // Физиол. раст. 1996. Т. 43. С. 127–135.
21. Кравченко Л.В., Азарова Т.С., Достанко О.Ю. Влияние корневых экзометаболитов пшеницы с различной плоидностью на рост *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 1993. Т. 62. С. 863–868.
22. Якоби Л.М., Кукалев А.С., Ушаков К.В., Цыганов В.Е., Наумкина Т.С., Проворов Н.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Полиморфизм форм гороха посевного по эффективности симбиоза с эндомикоризным грибом *Glomus* sp. в условиях инокуляции ризобиями // С.-х. биология. 2000. № 3. С. 94–102.
23. Говоров Л.И. Горох Афганистана // Тр. по прикл. ботан. и селекции. 1928. Т. 19. Вып. 2. С. 497–522.
24. Разумовская З.Г. Образование клубеньков у различных сортов гороха // Микробиология. 1937. Т. 6. Вып. 3. С. 321–328.
25. Firmin J.L., Wilson K.E., Carlson R.W. *et al.* Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by *nodX* which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipooligosaccharide nodulation factor // Mol. Microbiol. 1993. V. 10, N 2. P. 351–360.
26. Lie T.A. Symbiotic specialization in pea plants: the requirement of specific *Rhizobium* strains for peas from Afghanistan // Ann. Appl. Biol. 1978. V. 88, N 3. P. 462–465.
27. Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Felle H.H., Umehara Y., Granlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases // Nature. 2003. V. 425, N 6958. P. 585–592.
28. Проворов Н.А., Симаров Б.В. Генетический полиморфизм бобовых культур по способности к симбиозу с клубеньковыми бактериями // Генетика. 1992. Т. 28, № 6. С. 5–14.
29. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции / Ред. И.А. Тихонович, Н.А. Проворов. СПб.: Наука, 1998. 194 с.
30. Проворов Н.А., Тихонович И.А. Эколого-генетические принципы селекции растений на повышение эффективности взаимодействия с микроорганизмами // С.-х. биология. 2003. № 3. С. 11–25.
31. Hardarson G. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation // Plant and Soil. 1993. V. 152. P. 1–17.
32. Hardy R.W.F., Burns R.C., Holsten R.D. Application of acetylene reduction assay for measurement of nitrogen fixation // Soil Biol. Biochem. 1973. V. 5. P. 47–81.
33. Barnes D.K., Heichel G.H., Vance C.P., Ellis W.R. A multiple-trait breeding program for improving the symbiosis for N<sub>2</sub> fixation between *Medicago sativa* L. and *Rhizobium meliloti* // Plant and Soil. 1984. V. 32. P. 303–314.
34. Меглицкая Е.Н., Проворов Н.А., Симаров Б.В., Райг Х.А. Создание популяций козлятника восточного, различающихся интенсивностью развития и продуктивностью, путем селекции растений по нитрогеназной активности // Докл. РАСХН. 1995. № 6. С. 7–9.
35. Phillips D.A., Teuber L.R. Plant genetics of symbiotic nitrogen fixation // Biolog. Nitrogen Fixation / Eds. G. Stacey *et al.* Chapman and Hall, N.Y., London, 1992. P. 625–647.
36. Provorov N.A., Tikhonovich I.A. Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-rhizobia symbiosis // Genetic Resources and Crop Evolution. 2003. V 50, N 1. P. 89–99.
37. Доросинский Л.М. Клубеньковые бактерии и нитрагин. Л.: Колос, 1970. 191 с.
38. Онищук О.П., Симаров Б.В. Гены, контролирующие нодуляционную конкурентоспособность клубеньковых бактерий // Генетика. 1996. V. 32. P. 1157–1166.
39. Devine T.E., Kuykendall L.D. Host genetic control of symbiosis in soybean (*Glycine max* L.) // Plant and Soil. 1996. V. 186. P. 173–187.
40. Khodjaiova L., Andreeva E., Zhan Xi Chun, Lutova L. Plant resistance to *Phytophthora* based on the sterol composition // Proc. 11-th Intern. Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions / Eds. I.A. Tikhonovich, B.J.J. Lugtenberg, N.A. Provorov. IS-MPMI. St.-Petersburg, Russia. 2004. P. 166–169.
41. Fox J.E., Starcevic M., Kow K.Y., Burow M.E., McLachlan J.A. Endocrine disrupters and flavonoid signaling // Nature. 2001. V. 413. P. 128–129.
42. Jording D., Uhde C., Schmidt R., Puhler A. The C4-dicarboxylate transport system of *Rhizobium meliloti* and its role in nitrogen fixation during symbiosis with alfalfa (*Medicago sativa*) // Experientia. 1994. V. 5. P. 874–883.

43. Bosworth A.H., Williams M.K., Albrecht K.A., Kwiatkowski R., Beynon J., Hankinson T.R., Ronson C.W., Cannon F., Wacek T.J., Triplett E.W. Alfalfa yield response to inoculation with recombinant strains of *Rhizobium meliloti* with an extra copy of *dctABC* and/or modified *nifA* expression // Appl. Environ Microbiol. 1994. V. 60, N 10. P. 3815–3832.
44. Проворов Н.А., Джординг Д., Энгелке Т., Пюлер А. Повышение симбиотической эффективности клубеньковых бактерий люцерны (*Rhizobium meliloti*) при введении дополнительных копий *dct*-генов, контролирующих транспорт дикарбоновых кислот // Генетика. 1994. Т. 30 (Приложение). С. 127.
45. Пирузян Э.С., Андрианов В.М. Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений. М.: Наука, 1985. 289 с.
46. Дессо И., Пети А., Фарранд С.К., Марфи П.Д. Опины и опин-подобные молекулы, вовлеченные во взаимодействия растений с бактериями семейства Rhizobiaceae // Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Ред. Г. Спайнк, А. Кондороши, П. Хукас. СПб.: Бионт, 2002. С. 199–224.