

УДК 576.8.095.38:851.155

## СОВМЕСТНАЯ МИГРАЦИЯ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ И БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ В НОВЫЕ МЕСТООБИТАНИЯ: МЕХАНИЗМЫ КОЭВОЛЮЦИИ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ (ОБЗОР)

© 2013 г. Н. А. Проворов\*, В. А. Жуков\*, О. Н. Курчак\*, О. П. Онищук\*, Е. Е. Андронов\*, А. Ю. Борисов\*, Е. П. Чижевская\*, Т. С. Наумкина\*\*, А. О. Овцына\*, Н. И. Воробьев\*, Б. В. Симаров\*, И. А. Тихонович\*\*\*

\*Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, С.-Петербург, 196608

\*\*Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур Россельхозакадемии, Орел, 303112

\*\*\*Санкт-Петербургский госуниверситет, С.-Петербург, 199034

e-mail: provorov@newmail.ru

Поступила в редакцию 17.05.2012 г.

В обзоре обобщены результаты изучения совместной миграции клубеньковых бактерий и бобовых растений в новые местообитания, которая часто сопровождается снижением эффективности их симбиоза в связи с утратой разнообразия по генам, контролирующим взаимодействие. Эта миграция может приводить к появлению новых симбионтов в результате переноса генов из исходных симбионтов в местные бактерии. Показано, что новые симбионты обычно лишены способности к фиксации  $N_2$ , но обладают высокой конкурентоспособностью, блокируя инокуляцию бобовых культур производственными штаммами. Конструирование ко-адаптированных систем узнавания и сигнального взаимодействия партнеров является перспективным подходом для обеспечения конкурентного преимущества эффективных штаммов ризобий, интродуцируемых в агроценозы совместно с хозяевами, над неактивными местными штаммами.

DOI: 10.7868/S0555109913030148

Растительно-микробные симбиозы (РМС), которые формируются в результате мутуалистического (взаимовыгодного) взаимодействия растений и микроорганизмов – эффективная стратегия ко-адаптации партнеров к неблагоприятным условиям среды [1, 2]. Симбиозы с бактериями или грибами улучшают минеральное питание растений (на основе фиксации  $N_2$  или мобилизации питательных ресурсов почвы), а также их устойчивость к патогенам и фитофагам (благодаря синтезу токсинов и антибиотиков, либо индукции иммунных реакций растений) и к ряду абиотических стрессов [3]. Поэтому интродукция растений в новые местообитания (которая происходит в процессе как естественной эволюции, так и доместикации растений) наиболее успешна в том случае, если она осуществляется в комплексе с полезной микрофлорой, обеспечивающей быструю адаптацию хозяев к стрессовым условиям [4].

Удобной моделью для изучения адаптивных процессов, происходящих при совместной миграции растений и бактерий в новые условия, является  $N_2$ -фиксирующий бобово-ризобиальный (клубеньковый) симбиоз, изучение которого проводится с помощью широкого арсенала совре-

менных подходов, включая методы молекулярной экологии и математического моделирования [5, 6]. Развитие клубенькового симбиоза определяется комплементарными генными системами партнеров, которые возникли в результате их продолжительной (60–70 млн. лет) коэволюции [2]. Ключевую роль в развитии симбиоза играют бактериальные *nod*-гены, которые кодируют синтез липо-хито-олигосахаридных *Nod*-факторов – сигналов, активирующих системные и локальные ответы у растений. В результате сигнального взаимодействия партнеров происходит инфицирование и развитие клубеньков, кульминацией которого является эндоцитоз бактерий в растительные клетки, где образуются  $N_2$ -фиксирующие бактериоиды (у эволюционно продвинутых бобовых “галегоидного” комплекса, включающего роды *Galega* L., *Medicago* L., *Pisum* L., *Trifolium* L., дифференцировка бактерий в бактериоиды является необратимой). Бактериоиды поддерживаются в органеллоподобных внутриклеточных компартментах, симбиосомах, которые осуществляют активный экспорт продуктов нитрогеназной реакции (главным образом, аммоний) и импорт С-соединений (дикарбоновые кислоты), используемых для ее обеспечения энергией.

Повышение эффективности РМС и их широкое использование в сельскохозяйственной практике основано на изучении эколого-генетических и молекулярных механизмов взаимодействия партнеров, определяющего их взаимную адаптацию к различным агроклиматическим условиям. Хотя в условиях почвы не способные к азотфиксации штаммы ризобий часто проявляют более высокую экологическую приспособленность, чем активные азотфиксаторы, основным направлением коэволюции партнеров клубенькового симбиоза является повышение эффективности симбиотрофного питания растений азотом, сопровождаемое возрастанием структурной организованности и функциональной целостности симбиоза. Знания о популяционных факторах и молекулярных механизмах этой эволюции могут быть использованы для конструирования улучшенных РМС и их широкого внедрения в экологически устойчивое агропроизводство, основанное на замене химических микробными препаратами [3].

**Интродукция растительно-микробных систем из центров происхождения в регионы возделывания.** Эволюция РМС в условиях агроценоза определяется совместной миграцией растений и микроорганизмов из центров происхождения (где наблюдается большое разнообразие партнеров и их высокая зависимость от симбиоза) в регионы возделывания (где разнообразие партнеров снижено, а эффективность их взаимодействия ограничена активным применением удобрений и пестицидов). В том случае, если новые условия обитания неблагоприятны для исходных симбионтов (ИС), мигрировавших совместно с хозяевами, эволюция РМС может идти по разным сценариям. Один из них заключается в адаптации ИС к новым условиям, которая приводит к выживанию ограниченного спектра микробных генотипов. Второй сценарий подразумевает возникновение новых симбионтов (НС) путем переноса симбиотических (*sym*) генов из ИС в местные бактерии, интенсивность которого может повышаться в ходе симбиотического взаимодействия. И наконец, третий эволюционный сценарий предусматривает расширение спектра симбионтов, способных вступать в симбиоз с растением, за счет утраты последним избирательности взаимодействия с почвенными микроорганизмами.

Первый сценарий был показан для ризобий клевера (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*), интродукция которых вместе с клевером переменчивым (*Trifolium ambiguum* Vieb.) из кавказского центра происхождения в североамериканские регионы возделывания резко снизила полиморфизм бактериальных популяций [7]. Широкое таксономическое разнообразие симбионтов культурной сои, *Glycine max* (L.) Merr. и *G. soja* Siebold & Zucc. (*Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, *Sinorhizobium fredii*) наблюдается в Китайском центре проис-

хождения, тогда как в сельскохозяйственных зонах США это разнообразие ограничено лишь некоторыми генотипами *B. japonicum* [2].

Второй сценарий – возникновение НС путем переноса *sym*-генов из ИС в местные бактерии (таблица) – обеспечивается локализацией генов симбиоза на *Sym*-плазмидах (**pSym**) или в “геномных островах”, которые содержат гены образования клубеньков (**nod-гены**) и фиксации N<sub>2</sub> (**nif/fix-гены**, кодирующие синтез и функционирование нитрогеназы). Хотя частоты переноса этих генов невелики, его вклад в эволюцию симбиотических бактерий весьма значителен, поскольку при взаимодействии с растениями редко возникающие рекомбинанты подхватываются частотнозависимым отбором и быстро вовлекаются в микроэволюционные процессы [8].

Такая адаптивная стратегия была осуществлена при интродукции: а) фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) из южноамериканского центра происхождения в Европу совместно с ризобиями *R. tropici* и *R. etli*, которые послужили для местных бактерий донорами pSym [9, 10]; б) лядвенца (*Lotus corniculatus* L.) из Средиземноморья в Австралию совместно с ризобиями *Mesorhizobium loti*, которые послужили для местных бактерий донорами хромосомных “симбиотических” островов [11]. Рекомбинанты, возникающие при гибридизации интродуцированных и местных бактерий, закрепляются в популяциях благодаря экспрессии *nod*-генов, обеспечивающей размножение бактерий в клубеньках. Однако N<sub>2</sub>-фиксирующая активность вновь возникших НС обычно является низкой или нулевой, что связано с нарушениями экспрессии *nif/fix*-генов на новом генетическом фоне [12].

Мы изучили эти эволюционные процессы, сравнив полиморфизм популяций *R. leguminosarum* bv. *viciae* из Украины (область интенсивного возделывания вики, *Vicia sativa* L. и *V. villosa* Roth.) и Средней Азии (центр разнообразия рода *Vicia* L.) [13]. Среднеазиатские популяции *R. leguminosarum* bv. *viciae* оказались высоко полиморфными по составу плазмид (что связано с таксономическим разнообразием хозяев, представленных более чем 15 видами *Vicia*) и обладали низкой активностью утилизации сахаров (отсутствующих в низкоплодородных сероземных почвах полупустынной зоны, покрытых редкой растительностью). Однако эти штаммы проявляли высокую активность симбиоза, которая отражает сильную зависимость бактерий от растений.

В противоположность этому, украинская популяция *R. leguminosarum* bv. *viciae* была низко полиморфной по составу плазмид, активно усваивала сахара (доступные в плодородных черноземных почвах, покрытых плотной растительностью). Однако симбиотическая эффективность украинских штаммов по сравнению со среднеазиатскими была

Эволюция новых видов ризобий путем горизонтального переноса *sym*-генов в местные бактерии, связанного с интродукцией бобовых растений-хозяев в новые местообитания (библиография дана в обзоре [2]).

Растение-хозяин	Направление (возраст) интродукции растений	Ризобии, интродуцированные вместе с хозяином, доноры <i>sym</i> -генов	Местные бактерии, предполагаемые реципиенты <i>sym</i> -генов	Новые симбионты, возникшие в областях интродукции	Передаваемые генетические элементы
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Европа → Новая Зеландия (7 лет)	<i>Mesorhizobium loti</i>	Асимбиотические штаммы <i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	Хромосомные острова (до 611 т.п.н.)
<i>Biserrula pelecinus</i> L.	Средиземноморье → Австралия (12 лет)	<i>Mesorhizobium</i> sp.	То же	То же	То же
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Северная Америка → Европа (≈300 лет)	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	Местные ризобии и агробактерии	<i>M. loti</i> , <i>M. amorphae</i> , <i>R. leguminosarum</i> , <i>R. tropici</i>	Возможно, симбиотические острова
<i>Amorpha fruticosa</i> L.	Северная Америка → Китай (≈50 лет)	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	Местные ризобии	<i>Mesorhizobium</i> sp., <i>R. leguminosarum</i> , <i>B. elkanii</i>	То же
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Северная и Центральная Америка → Европа (≈500 лет)	<i>Rhizobium tropici</i> , <i>R. etli</i>	Местные ризобии и агробактерии	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> , <i>R. gallicum</i> , <i>R. giardinii</i>	Возможно, <i>Sym</i> -плазмиды
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Северная Америка → Южная Америка (≈80 лет)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Местные ризобии и агробактерии	<i>Rhizobium</i> sp., <i>B. elkanii</i>	Нет данных

снижена, что отражало меньшую зависимость от хозяев, которая проявлялась у бактерий в благоприятных эдафических условиях [13].

Высокая зависимость популяционной структуры бактерий, интродуцированных вместе с хозяевами в новую экологическую зону, от адаптации к местным эдафическим факторам была показана также для популяций *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, мигрировавших совместно с красным и белым клевером (*Trifolium pratense* L., *T. repens* L.) в бореальную экосистему о. Средний (Белое море), где эти бактерии взаимодействовали с генетически родственными штаммами *R. leguminosarum* bv. *viciae* – симбионтами местных видов вики (*Vicia* L.) и чины (*Lathyrus* L.) [14]. Эта адаптация выразилась в повышенном разнообразии хромосомных маркеров у *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (показанного путем ПЦР-анализа локуса IGS), тогда как разнообразие находящихся на *pSym* локусов *nod* и *nif* было низким, показывая, что интродуцированные ризобии клевера эволюционировали путем адаптации к почвенным нишам, контролируемой в основном хромосомными генами. В объединенной популяции *R. leguminosarum* (bv. *trifolii* + bv. *viciae*) выявлена высокая панмиктичность (случайное комбинирование плазмидных и хромосомных локусов), показавшая значительный вклад гори-

зонтального переноса *sym*-генов в формирование популяционной структуры. Этот фактор играет ключевую роль в эволюции симбиоза, обеспечивая формирование у ризобий новых генных систем, контролируемых взаимодействием с растениями [2].

Для того чтобы выяснить, почему бактерии, интродуцированные совместно с хозяевами в новые условия, эволюционируют главным образом благодаря адаптациям к эдафическим факторам, а не к растению-хозяину, мы использовали методологию математического моделирования эволюционных процессов, которые происходят в бактериальных популяциях на автономных и симбиотических стадиях жизненного цикла.

**Моделирование коэволюционных процессов.** Используя методы математической композиции, мы разработали схемы компьютерных экспериментов по изучению эволюции РМС в природных экосистемах и агроценозах [15]. Созданные модели позволили нам объединять процессы конкуренции ризобий за почвенные, ризосферные и клубеньковые ниши в серию циклов, представляющих длительный (неограниченный во времени) эволюционный процесс. Компьютерные эксперименты показали, что возникновение у микросимбионтов адаптаций к выживанию в почве и к

образованию клубеньков являются результатом быстро протекающих микроэволюционных процессов, которые зависят от индивидуального (Дарвиновского, частотно-зависимого) отбора, происходящего при конкуренции между различными штаммами бактерий на ранних стадиях симбиоза (преинфекция, проникновение в корневые волоски). Благодаря этим процессам из почв могут “извлекаться” очень редкие (возникающие с частотами менее  $10^{-12}$ ) рекомбинанты, для закрепления которых в ассоциированных с растениями микробных популяциях оказывается достаточным небольшого числа (10–15) микроэволюционных циклов [2].

В то же время эволюция высокой активности  $N_2$ -фиксации является гораздо более длительным процессом, основанным на групповом отборе, который происходит при конкуренции между внутриклубеньковыми клонами за трофические ресурсы, предоставляемые хозяином на поздних стадиях симбиоза (функционирование глубоко дифференцированных бактериоидов в составе зрелых симбиосом). Этот отбор особенно важен для эволюции ризобий – симбионтов бобовых “галегоидного” комплекса, поскольку характерная для них необратимая дифференцировка бактериоидов является результатом межвидового альтруизма, “запрещенного” в рамках Дарвиновской парадигмы адаптивной эволюции [16].

Кроме того, эволюция ризобий на повышение активности  $N_2$ -фиксации происходит *in planta*, где она определяется дифференциальным размножением  $N_2$ -фиксаторов под контролем метаболических обратных связей с растением-хозяином, поставляющим С-соединения в активно фиксирующие  $N_2$  клубеньки [17]. Если растения испытывают дефицит азота, характерный для природных экосистем, то эти обратные связи весьма эффективны, что и позволяет растениям развиваться на основе симбиотрофного питания азотом. Однако регуляторные связи партнеров могут нарушаться при активном внесении удобрений, продукты ассимиляции которых подавляют развитие симбиоза. Поэтому в естественных экосистемах эволюция НС продолжается вплоть до их преобразования в активные азотфиксаторы, тогда как в агроценозах это преобразование резко замедлено или даже полностью блокировано, в связи с чем в почвенных популяциях накапливаются вирулентные штаммы, не способные к активной фиксации  $N_2$ .

Результаты математического моделирования эволюционной динамики симбиоза показали, что интродукция РМС в агроценозы должна базироваться на быстро возникающих ко-адаптациях партнеров и будет успешной лишь в том случае, если совместно мигрировавшие генотипы обладают высоко специфичными механизмами узна-

вания, обеспечивающими избирательную инокуляцию растений эффективными микросимбионтами [18]. Такие механизмы позволяют исключить неэффективные штаммы (НС или местные генотипы) из инфицирования растений, которые таким образом инокулируются только специально подобранными или сконструированными активными  $N_2$ -фиксаторами. Моделирование популяционной динамики симбиоза может быть использовано и для оценки эколого-генетических последствий интродукции в агроценозы модифицированных штаммов ризобий, которые могут оказаться по отношению к аборигенному микробиоценозу источниками генов, влияющих на развитие растений [2, 18].

**Интродукция ко-адаптированных микробно-растительных систем в агроценозы.** На молекулярном уровне сопряженная эволюция растений и бактерий основана на их высокоспецифичном узнавании и сигнальном взаимодействии, которые обеспечивают формирование коадаптированных генетических комбинаций партнеров и, как следствие, устойчивость симбиоза к неблагоприятным факторам среды. Образующие бактериями Nod-факторы имеют высокое сходство с сигнальными молекулами грибов арбускулярной микоризы – Muc-факторами [19, 20]. Бобовые растения способны распознавать структуру Nod-факторов за счет белковых комплексов, в состав которых входит не менее двух высокоспецифичных рецепторных киназ [21]. Одиночные замены аминокислот в последовательностях данных белков могут приводить к смене специфичности распознавания Nod-факторов различными видами бобовых [22–24]. Генетическая трансформация растений люцерны *M. truncatula* Gaertn. экспрессионными конструкциями с генами, кодирующими рецепторные киназы *Nfr1* и *Nfr5* лядвенца японского (*Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen), приводит к тому, что люцерна начинает формировать клубеньки с “чужеродными” симбионтами лядвенца, *Mesorhizobium loti* [25]. Однако фиксации азота в таких клубеньках не происходит, что указывает на различие лядвенца и люцерны по генам, контролирующим последующие стадии симбиоза, например, глубокую дифференцировку бактериоидов [26]. В ходе эволюции система узнавания Nod-факторов растением, вероятно, возникла на основе рецепторов, распознающих Muc-факторы, либо хитинподобные элиситоры защитных реакций растения. У бобовых данная система обеспечивает проникновение в растение лишь строго определенных ризобий, не допуская, таким образом, превращения мутуалистических взаимодействий в паразитические.

Рассмотренный выше третий сценарий эволюции РМС, предполагающий расширение симбиотической специфичности растения при интродукции в новые местообитания, вероятно, реали-

зается благодаря молекулярной эволюции генов, кодирующих рецепторы Nod-факторов. В пределах вида горох посевной (*Pisum sativum* L.) выделяется группа дикорастущих “афганских” линий (представители подвида *P. sativum* ssp. *abyssinicum*), несущих аллель гена *sym2<sup>A</sup>*, которая блокирует инфицирование растений подавляющим большинством штаммов ризобий из европейских почв [27, 28]. Устойчивость, кодируемая аллелью *sym2<sup>A</sup>*, может быть преодолена штаммами *R. leguminosarum* bv. *viciae*, которые несут ген *nodX*, редко встречающийся в европейских популяциях [29–31]. Этот эффект связан с тем, что ген *nodX* кодирует повторное ацетилирование Nod-фактора, который приобретает сродство к гипотетическому белковому рецептору, кодируемому геном *Sym2*.

В то же время вариант рецептора, кодируемый доминантной аллелью *Sym2<sup>E</sup>*, характерной для культурных форм гороха (*P. sativum* ssp. *sativum*), обладает низкой специфичностью к бактериальным сигналам и “разрешает” нодуляцию растений широким спектром штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae*, как содержащих ген *nodX*, так и лишенных его. Вероятно, возникновение такой аллели явилось необходимой предпосылкой для продвижения предковых форм культурного гороха из Малой Азии в Европу, где широко распространены аборигенные штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* – симбионтов дикорастущих видов *Lathyrus* spp. и *Vicia* spp. Эти штаммы не несут гена *nodX*, однако подавляют инокуляцию гороха *nodX*-содержащими штаммами, интродуцированными совместно с горохом.

На основе описанного эволюционного сценария может быть разработана эффективная стратегия для интродукции комплементарных сочетаний генотипов партнеров в агроценозы. Такая интродукция очень важна для гороха (*P. sativum*), производственная инокуляция которого часто неэффективна из-за того, что штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae*, отселектированные на высокую азотфиксирующую активность, оказываются неспособными конкурировать за образование клубеньков с аборигенными штаммами *R. leguminosarum* bv. *viciae* – симбионтами чины и вики. По отношению к гороху эти штаммы неэффективны, однако при его инокуляции оказываются более конкурентоспособными, чем эффективные коммерческие штаммы-инокулянты.

Для обеспечения высокой конкурентоспособности производственных штаммов в сорта культурного гороха (*P. sativum* ssp. *sativum*) из дикорастущих “афганских” линий (*P. sativum* ssp. *abyssinicum*) путем возвратного скрещивания была введена аллель *sym2<sup>A</sup>*, которая блокирует инфицирование растений подавляющим большинством аборигенных штаммов. Введение гена *nodX* в производственные штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* позволяет

им вступать в симбиоз со специально сконструированными линиями *P. sativum* ssp. *sativum* генотипа *sym2<sup>A</sup>/sym2<sup>A</sup>*, устойчивыми к инфицированию неэффективными (аборигенными или вновь возникшими) штаммами. Специфичность этой системы “ген-на-ген” может быть еще более повышена благодаря замене гена *nodX* на гетерологичный (выявленный у ризобий сои, но отсутствующий у ризобий гороха) ген *nodZ*, который позволяет рекомбинантным штаммам *R. leguminosarum* bv. *viciae* преодолевать *sym2<sup>A</sup>*-кодируемую устойчивость гороха к инокуляции ризобиями благодаря фукозилированию Nod-фактора [31].

Однако участие подобных систем “ген-на-ген” и кодируемых ими высокоспецифичных факторов узнавания в контроле бобово-ризобиального симбиоза ограничено [27], поскольку, в отличие от фитопаразитарных взаимодействий, при мутуализме растение “заинтересовано” в сохранении способности к симбиозу с широким спектром микросимбионтов, находящихся в почве. В отсутствие таких систем проблема конкуренции между производственными и местными штаммами ризобий может быть решена путем конструирования рекомбинантных штаммов, у которых интенсивная фиксация N<sub>2</sub> сочетается со способностью активно конкурировать с неактивными азотфиксаторами за образование клубеньков и выживание в почве. У клубеньковых бактерий клевера (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*) такое сочетание было достигнуто благодаря введению генов *tfx*, кодирующих синтез олигопептидного антибиотика трифолиотоксина, в симбиотически активные штаммы: полученные рекомбинанты приобрели высокую конкурентоспособность донора, сохранив характерный для реципиента уровень нитрогеназной активности [32]. Аналогичный эффект был достигнут и при передаче *tfx*-генов в ризобии фасоли (*R. etli*) и люцерны (*Sinorhizobium meliloti*): полученные рекомбинанты приобрели способность успешно конкурировать с родительским штаммом за образование клубеньков у *Phaseolus vulgaris* L. и *Medicago sativa* L. соответственно [33].

Для комбинирования высокой симбиотической активности и выживаемости в почве у ризобий вики (*R. leguminosarum* bv. *viciae*) мы [34] использовали плазмиду pSym1032 штамма R11032, кодирующую широкий комплекс адаптивно значимых признаков, включая активную фиксацию N<sub>2</sub>, успешную конкуренцию за образование клубеньков у вики мохнатой (*Vicia villosa*) и устойчивость к кислой реакции среды. Конъюгативный перенос этой плазмиды в штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae*, обладающие низкой активностью N<sub>2</sub>-фиксации (изоляты из местных популяций Украины) позволил получить широкий спектр рекомбинантов, среди которых 10% оказались активными N<sub>2</sub>-фиксаторами, обладающими высо-

кой конкурентоспособностью и кислотоустойчивостью [34].

Для генетического конструирования ризобий люцерны (*S. meliloti*), обладающих повышенной конкурентоспособностью, мы [35] с использованием метода неспецифического Tn5-мутационеза получили серию мутаций, вызывающих нарушения данного признака. Гены *cmp*, маркированные этими мутациями, были локализованы на всех трех репликациях (хромосома и две мегаплазмиды) высокоэффективного и конкурентоспособного штамма СХМ1-105 *S. meliloti*. Некоторые из этих генов кодируют адаптивно значимые признаки бактерий, которые могут быть изучены на лабораторных средах (скорость роста, устойчивость к антибиотикам или фагам, синтез липо-, экзо- или капсулярных полисахаридов). Однако для целей генетического конструирования наиболее привлекательными оказались гены, лишенные проявления *ex planta*, так как перенос этих генов (путем трансдукции фагом фМ12 или конъюгации с помощью различных векторных плазмид) в исходные мутанты вызывает повышение их конкурентоспособности до уровня “дикого типа”. При введении одного из этих генов, *cmp-107* (расположен на мегаплазмиде-1, кодирует мембранный белок с неизвестными функциями) в дефектный по данному гену мутант в составе низкокопийной плазмиды рLw107-8 удалось добиться повышения конкурентоспособности рекомбинантов по сравнению с высокоактивным родительским штаммом [36].

Приведенные примеры показывают возможность использования знаний об эволюционной генетике и молекулярной экологии РМС для развития сельскохозяйственных биотехнологий, основанных на широком использовании микробных препаратов в растениеводстве. Изучение происходящей в природе коэволюции растений и микроорганизмов дает исследователям продуктивные подходы для улучшения РМС, которое направлено на повышение эффективности взаимодействия партнеров [2].

Работа поддержана грантами РФФИ (11-04-01899а, 12-04-00409а), Президента РФ НШ-337.2012.4 и Госконтрактами с Минобрнауки РФ (16.552.11.7085, 12.740.11.0233).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Seckbach J.* Symbiosis: Mechanisms and Model System. Dordrecht, Boston, L.: Kluwer Acad. Publ., 2002. 820 p.
2. *Provorov N.A., Vorobyov N.I.* Evolutionary Genetics of Plant-Microbe Symbioses / Ed. I. Tikhonovich. N.Y.: NOVA Sci. Publ., 2010. 290 p.
3. *Tikhonovich I.A., Provorov N.A.* // Ann. Appl. Biol. 2011. V. 159. № 2. P. 155–168.
4. *Richardson D.M., Allsopp N., d'Antonio C.M., Milton S.J., Rejmanek M.* // Biol. Rev. 2000. V. 75. № 1. P. 65–93.
5. *Franche C., Lindstrom K., Elmerich C.* // Plant and Soil. 2009. V. 321. № 1. P. 35–59.
6. *Kiers E.T., West S.A., Denison R.F.* // J. Appl. Ecol. 2002. V. 39. № 5. P. 745–754.
7. *Seguin P., Graham P.H., Sheaffer C.C., Ehlke N.J., Russele M.P.* // Canad. J. Microbiol. 2001. V. 47. № 1. P. 81–85.
8. *Проворов Н.А., Воробьев Н.И.* // Генетика. 1998. Т. 34. № 12. С. 1712–1719.
9. *Laguerre G., Nour S.M., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P., Amarger N.* // Microbiology. 2001. V. 147. № 6. P. 981–993.
10. *Brom S., Girard L., Garcia de los Santos A., Sanjuan-Pinilla J.M., Olivares J., Sanjuan J.* // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 12. P. 2555–2561.
11. *Sullivan J.T., Trzebiatowski J.R., Cruickshank R.W., Gouzy J., Brown S.D., Elliot R.M., Fleetwood D.J., McCalum N.G., Rossbach U., Stuart G.S., Weaver J.E., Webby R.J., de Bruijn F., Ronson C.* // J. Bacteriol. 2002. V. 184. № 14. P. 3086–3095.
12. *Sanjuan J., Herrera-Cervera J., Sanjuan-Pinilla J., Munoz S., Nogales J., Olivares J.* // Nitrogen Fixation: from Molecules to Crop Productivity / Ed. F. Pedrosa. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2000. P. 593–594.
13. *Курчак О.Н., Проворов Н.А., Ситаров Б.В.* // Генетика. 2011. Т. 47. № 4. С. 484–491.
14. *Проворов Н.А., Андронов Е.Е., Онищук О.П., Курчак О.Н., Чижевская Е.П.* // Микробиология. 2012. Т. 81. № 2. С. 244–253.
15. *Provorov N.A., Vorobyov N.I.* // Theor. Popul. Biol. 2010. V. 78. № 2. P. 259–269.
16. *Проворов Н.А., Воробьев Н.И., Тихонович И.А.* // Чарльз Дарвин и современная биология / Ред. Э.И. Колчинский. СПб.: Нестор-История, 2010. С. 470–485.
17. *Provorov N.A., Vorobyov N.I.* // Phytochem. Rev. 2009. V. 8. № 4. P. 519–534.
18. *Проворов Н.А., Воробьев Н.И.* // Усп. соврем. биол. 2010. Т. 130. № 4. С. 336–345.
19. *Dénarié J., Debelle F., Promé J.C.* // Annu. Rev. Biochem. 1996. V. 65. № 4. P. 503–535.
20. *Maillet F., Poinsot V., André O., Puech-Pages V., Haouy A., Gueunier M., Cromer L., Giraudet D., Formey D., Niebel A., Martínez E.A., Driguez H., Becard G., Dénarié J.* // Nature. 2011. V. 469. № 7328. P. 58–63.
21. *Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Felle H.H., Umehara Y., Gronlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J.* // Nature. 2003. V. 425. № 6958. P. 585–592.
22. *Smit P., Limpens E., Geurts R., Fedorova E., Dolgikh E., Gough C., Bisseling T.* // Plant Physiol. 2007. V. 145. № 2. P. 183–191.
23. *Zhukov V., Radutoiu S., Madsen L.H., Rychagova T., Ovchinnikova E., Borisov A., Tikhonovich I., Stougaard J.* // Mol. Plant-Microbe Interact. 2008. V. 21. № 8. P. 1600–1608.
24. *Madsen E.B., Antolin-Llovera M., Grossmann C., Ye J., Vieweg S., Broghammer A., Krusell L., Radutoiu S.,*

- Jensen O.N., Stougaard J., Parniske M. // *Plant J.* 2011. V. 65. № 3. P. 404–417.
25. Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Jurkiewicz A., Fukai E., Quistgaard E.M., Albrektsen A.S., James E.K., Thirup S., Stougaard J. // *EMBO J.* 2007. V. 26. № 12. P. 3923–3935.
26. Velde van de W., Zehirov G., Szatmari A., Debreczeny M., Ishihara H., Kevei Z., Farkas A., Mikulass K., Nagy A., Tiricz H., Satiat-Jeunemaitre B., Alunni B., Bourge M., Kucho K., Abe M., Kereszt A., Maroti G., Uchiumi T., Kondorosi E., Mergaert P. // *Science.* 2010. V. 327. № 5969. P. 1122–1126.
27. Tikhonovich I.A., Kozhemyakov A.P., Ovtsyna A.O., Provorov N.A. // *New Approaches and Techniques in Breeding Sustainable Fodder Crops and Amenity Grasses* / Eds. N.A. Provorov, I.A. Tikhonovich, F. Veronesi. St.-Petersburg: N.I. Vavilov All-Russia Research Institute of Plant Industry Publ., 2000. P. 131–135.
28. Naumkina T. // *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications* / Eds. I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov, W.E. Newton. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. P. 174.
29. Четкова С.А., Тихонович И.А. // *Микробиология.* 1986. Т. 55. № 1. С. 143–147.
30. Ma S.W., Iyer V.N. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V. 56. № 11. P. 2206–2212.
31. Ovtsyna A.O., Rademaker G.J., Esser E., Weinman J., Lugtenberg B., Tikhonovich I.A. // *Molec. Plant-Microbe Interact.* 1999. V. 12. № 2. P. 252–258.
32. Triplett E.V. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V. 56. № 1. P. 98–103.
33. Robledo E.A., Kmiecik K., Oplinger E.S., Nienhuis J., Triplett E.W. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. V. 64. № 11. P. 2630–2633.
34. Курчак О.Н., Проворов Н.А., Ситаров Б.В. // *Генетика.* 2001. Т. 37. № 9. С. 1225–1232.
35. Onishchuk O.P., Sharypova L.A., Simarov B.V. // *Plant and Soil.* 1994. V. 197. № 2. P. 267–274.
36. Chizhevskaya E.P., Onishchuk O.P., Sharypova L.A., Simarov B.V. // *Biology of Plant-Microbe Interactions* / Eds. I.A. Tikhonovich, B. Lugtenberg, N. Provorov. St. Paul, St.-Petersburg: IS-MPMI, 2004. P. 549–553.

## Comigration of Root Nodule Bacteria and Bean Plants to New Habitats: Coevolution Mechanisms and Practical Importance (Review)

N. A. Provorov<sup>a</sup>, V. A. Zhukov<sup>a</sup>, O. N. Kurchak<sup>a</sup>, O. P. Onishchuk<sup>a</sup>, E. E. Andronov<sup>a</sup>,  
A. Yu. Borisov<sup>a</sup>, E. P. Chizhevskaya<sup>a</sup>, T. S. Naumkina<sup>b</sup>, A. O. Ovtsyna<sup>a</sup>, N. I. Vorob'yov<sup>a</sup>,  
B. V. Simarov<sup>a</sup>, and I. A. Tikhonovich<sup>c</sup>

<sup>a</sup> All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences,  
St. Petersburg, 196608 Russia  
e-mail: provorov@newmail.ru

<sup>b</sup> All-Russian Research Institute of Legumes and Groat Crops, Russian Academy of Agricultural Sciences, Orel, 303112 Russia  
<sup>c</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

Received May 17, 2012

**Abstract**—The review summarizes the results of studies on the comigration of tubercular bacteria and bean plants to new habitats, which is often accompanied by a decrease in the symbiosis efficiency due to a loss of the diversity of genes responsible for the interaction. This migration may lead to a rise in new symbionts as a result of gene transfers from initial symbionts to local bacteria. It was demonstrated that typically new symbionts lack an ability for N<sub>2</sub> fixation but are highly competitive, blocking the inoculation of bean cultures by industrial strains. The design of coadapted systems of recognition and signal interaction of partners is a perspective approach to ensure competitive advantages of efficient rhizobia strains introduced into agrocenoses, together with host plants, over inactive local strains.