

ЭВОЛЮЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СИМБИОТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ: МИНИ-ОБЗОР*

Н.А. ПРОВОРОВ, О.П. ОНИЩУК

Микробно-растительные симбиозы играют огромную роль в развитии и эволюции растений, обеспечивая их минеральное (азотное, фосфорное) питание, устойчивость к патогенным микроорганизмам и животным-фитофагам, а также регуляцию развития в стрессовых условиях (R.J. Rodriguez с соавт., 2009). Конструирование высокоэффективных симбиозов должно базироваться на знании механизмов коэволюции микроорганизмов и растений в природных экосистемах и агроценозах. На примере азотфиксирующего бобово-ризобияльного симбиоза мы показали, что основные этапы коэволюции могут быть воспроизведены с использованием подходов симбиотической инженерии. Она направлена на оптимизацию процессов переноса между партнерами соединений азота и углерода, связанного с образованием объединенных путей обмена веществ и энергии; ослабление конкуренции партнеров за трофические и энергетические ресурсы окружающей среды; вступление партнеров в отношения альтруизма, основанные на отказе микросимбионтов от автономного существования, например образование ризобиями неспособных к размножению бактериоидов. Первое направление конструирования связано с активацией транспорта в бактерии дикарбоновых кислот, которые используются для питания бактериоидов. Реализация этого подхода связана с получением рекомбинантных штаммов ризобий, которые содержат дополнительные копии *nif*- и *dct*-генов, кодирующих синтез нитрогеназы и ее снабжение энергией. Однако использование этого подхода ограничено нарушением баланса биохимических и ростовых процессов, в связи с чем значительное (на 70-80 %) повышение азотфиксирующей активности ризобий сопровождается гораздо меньшей прибавкой массы растений (15-20 %). Это ограничение может быть преодолено посредством создания бактериальных штаммов, оптимизирующих развитие растений на основе синтеза биологически активных веществ (фитогормонов, витаминов, люмихрома), которые обеспечивают максимально полное вовлечение продуктов азотфиксации в формирование урожая. Второе направление конструирования связано с повышением способности производственных штаммов ризобий конкурировать за инокуляцию растений с аборигенными почвенными штаммами, обладающими высокой вирулентностью в сочетании с низкой азотфиксирующей активностью. Этот подход базируется на инактивации генов, служащих негативными регуляторами ранних стадий развития симбиоза, а также на амплификации его позитивных регуляторов. Третье направление конструирования связано с модификациями модуляторов эффективности симбиоза — *eff*-генов, которые были выявлены у быстрорастущих ризобий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) прямым отбором Tn5-мутантов, способных повышать урожайность растений. Возрастающие симбиотической эффективности при инактивации этих генов основано на утрате ризобиями функций, необходимых для автономного существования в почве, но снижающих симбиотическую эффективность. К их числу относится синтез запасных питательных веществ (поли-β-гидроксипутирата, гликогена), ассимиляция «несимбиотических» (не используемых для питания бактериоидов) источников углерода — сахаров, а также формирование поверхностных компонентов клетки, активирующих защитные реакции растений (липо- и экзополисахаридов). Обсуждаются перспективы создания систем симбиотрофного питания азотом у небобовых (например, злаковых) растений, включая формирование ими азотфиксирующих клубеньков на основе использования гомологов *Sut*-генов бобовых растений (G. Oldroyd с соавт., 2014); введение *nif*-генов в митохондрии или пластиды, которые возникли из азотфиксирующих бактерий в процессе симбиогенной эволюции эукариотической клетки (G. Lurez-Tottejup с соавт., 2016); конструирование новых клеточных органелл — аммонипластов, которое может быть связано с модификацией симбиосом бобовых, обеспечивающих оптимальные условия для синтеза и функционирования нитрогеназы.

Ключевые слова: микробно-растительные взаимодействия, биологическая N₂-фиксация, клубеньковые бактерии, генетическое конструирование, симбиотическая инженерия, клеточные органеллы, симбиотрофное питание растений, экологически устойчивое растениеводство.

Микробно-растительные симбиозы (МРС) играют ключевую роль в питании растений (фиксация N₂, ассимиляция питательных веществ почвы), их защите от патогенов и фитофагов (синтез антибиотиков и токсинов), а также в регуляции развития и адаптации к стрессам (синтез фитогормонов и витаминов, влияющих на ростовые процессы) (1). Экологиче-

* Работа поддержана РФФИ, грант № 14-26-00094П.

ская значимость МРС определяется тем, что наземные растения представляют собой симбиогенную по происхождению форму жизни: они колонизировали сушу в тесной кооперации с микробными сообществами, состоявшими из микоризных грибов-гломеромицетов, ассоциированных с фото- и гетеротрофными бактериями (2). Создание экологически устойчивых агроценозов, высокая продуктивность которых достигается при минимальном использовании химических удобрений и средств защиты, требует существенного повышения симбиотической активности растений (3, 4).

Несмотря на высокую генетическую изученность МРС, микробные препараты для инокуляции сельскохозяйственных культур до сих пор готовят почти исключительно на штаммах дикого типа, выделенных из природных источников (растений, почвы) методами аналитической селекции (5, 6). Хотя генетический контроль симбиотической эффективности (СЭ) — способности микроорганизмов повышать продуктивность растений — изучен весьма подробно (7), генно-инженерные и биотехнологические подходы пока не нашли широкого применения для улучшения этого признака. Причины этого заключаются в сложности контроля СЭ, которая зависит от многофакторного взаимодействия генотипов нескольких партнеров, находящихся под влиянием варьирующих внешних условий, а также в отсутствии генетически обоснованных программ управления симбиотрофным развитием растений. Эти программы должны быть основаны на механизмах их природной коэволюции с микроорганизмами, которая может быть изучена на фенотипическом (8), геномном (9) и транскриптомном (10) уровнях.

Оптимальная модель для разработки методологии конструирования МРС — N_2 -фиксирующий бобово-ризобияльный симбиоз, развитие которого со стороны бактерий определяется двумя группами генов. Это *nod*-гены, контролирующие синтез липо-хито-олигосахаридных Nod-факторов (NF), которые активируют программу клубенькообразования, и *nif/fix*-гены, определяющие синтез и функционирование нитрогеназного комплекса *in planta* (1). Изучение бобово-ризобияльного симбиоза показало, что в природных условиях эволюция МРС направлена на повышение эффективности кооперативного (мутуалистического) взаимодействия партнеров, определяемой на основе показателей их биологической продуктивности — численности популяций, скорости размножения, биомассы. При этом могут быть выделены три этапа эволюции симбиоза, на которых возрастает СЭ.

Плейотропный симбиоз — наименее специализированная его форма, характеризующая подвижным равновесием кооперативных и антагонистических эффектов. Оно зависит не только от проявления микроорганизмами благоприятных для хозяина признаков (например, N_2 -фиксирующей активности), но и от взаимодействия симбионтов с защитными системами растений, контролируемыми гомеостаз их внутренней среды. Плейотропные симбиозы основаны на отрицательных обратных связях партнеров, обеспечивающих стабильное сосуществование растений и микроорганизмов, а также их сбалансированный полиморфизм по признакам симбиоза (11).

Взаимная эксплуатация партнеров — более специализированная и эффективная форма симбиоза, основанная на эквивалентном метаболическом обмене растений и микроорганизмов, включая формирование встречных потоков углерода и азота (12, 13). Благодаря становлению надорганизменных путей обмена веществ и энергии между партнерами устанавливаются положительные обратные связи: чем больше продуктов N_2 -фиксации получает растение, тем выше активность фотосинтеза и тем больше С-соединений оно поставляет своим микросимбионтам. Важную роль в по-

вышении СЭ играют ослабление антагонизма партнеров, например, утрата медленнорастущими ризобиями синтеза ризобиотоксинов (14), и модификация сигнально-рецепторных комплексов, включая образование ризобиями NF и поверхностных полисахаридов, а также белков-эффекторов, передаваемых в растительные клетки через системы секреции третьего типа (15).

Межвидовой альтруизм — глубоко специализированная форма симбиоза, основанная на утрате жизнеспособности внутриклеточными микросимбионтами, модифицированными для выполнения полезных хозяйину функций, например бактероидами ризобий, развивающимися аномально высокую нитрогеназную активность, что сопровождается «отказом» от размножения. При этом общая приспособленность популяций микросимбионтов возрастает благодаря групповому (междемовому, родственному) отбору в пользу клонов-альтруистов, обладающих повышенной СЭ (16). В процессе эволюции увеличивается целостность симбиоза, основанная на устойчивых регуляторных связях между микробными и растительными клетками клубенька, а также между клубеньками и надземными органами растений, в которых осуществляется фиксация N₂ и CO₂.

В нашей статье представлена эволюционно обоснованная схема конструирования высокоэффективных микробно-растительных симбиозов. Она включает активацию целевой метаболической функции симбионтов в сочетании с повышенной способностью конкурировать за инфицирование хозяев; придание симбионтам новых ростстимулирующих функций, которые обеспечивают переключение хозяев на симбиотрофное развитие; согласованное повышение морфометрических и биохимических параметров растений посредством усиления «альтруистических» свойств их симбионтов.

1. Повышение нодуляционной конкурентоспособности (НКС) ризобий при изменениях генов, контролирующих ранние стадии симбиоза (17)

Виды <i>Rhizobium</i> и <i>Sinorhizobium</i>	Растения-хозяева	Гены (их продукты)	Возрастание НКС (%)
Амплификация генов — позитивных регуляторов НКС			
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	<i>rosR</i> (активатор синтеза экзополисахаридов)	41 → 69
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>cmp-107</i> (гидрофобный белок с неизвестной функцией)	40 → 51
<i>S. meliloti</i>	<i>M. sativa</i>	<i>putA</i> (пролин-дегидрогеназа)	71 → 87
Инактивация генов — негативных регуляторов НКС			
<i>S. medicae</i>	<i>M. truncatula</i> , <i>M. sativa</i>	<i>nodR</i> (репрессор <i>nod</i> -генов)	25 → 71
<i>S. meliloti</i>	<i>M. sativa</i>	<i>Smb21195</i> (ABC-переносчик олигопептидов)	57 → 85
<i>S. meliloti</i>	<i>M. truncatula</i> , <i>M. sativa</i>	<i>truB</i> (НАДФ-зависимая дегидрогеназа)	50 → 68
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>praR</i> (репрессор образования биопленок)	10 → 90
Примечание. Возрастание НКС определяли при совместной инокуляции растений генетически модифицированными и родительскими штаммами (1:1).			

Конкурентные процессы. Взаимовыгодная кооперация микроорганизмов и растений в системах мутуалистического симбиоза сопровождается интенсивной конкуренцией, происходящей как между взаимодействующими партнерами, так и в популяциях каждого из них. Наиболее жесткая конкуренция наблюдается между разными генотипами симбионтов при инфицировании хозяев. У ризобий способность конкурировать за образование клубеньков (нодуляционная конкурентоспособность, НКС) определяется обширной системой *cmp*-генов, включающей позитивные и негативные регуляторы ранних симбиотических функций — узнавания хозяев и сигнального взаимодействия с ними, колонизации ризосферы и ризопланы, инфицирования корней (17). Их изучение позволило предложить разнообразные генетические подходы к повышению НКС, включая амплификацию позитивных регуляторов этого признака и инактивацию его

негативных регуляторов (табл. 1), а также совмещение в одном микробном генотипе факторов высокой СЭ и НКС.

На поздних стадиях развития клубеньков, связанных с переходом растений к симбиотрофному питанию азотом, усиливается конкуренция между бактериями и растительными клетками клубенька за продукты фотосинтеза, которые поступают из надземных органов и используются ризобиями для энергообеспечения азотфиксации и размножения. В этой конкуренции могут быть задействованы факторы антагонизма микросимбионтов с хозяевами, включая ризобиотоксины, например 2-амино-4-(2-амино-3-гидропропокси)-транс-3-еноиновую кислоту, образуемую эволюционно примитивными медленнорастущими симбионтами *Bradyrhizobium elkanii*, а также белки-эффекторы, передаваемые бактериями в растительные клетки через системы секреции третьего типа (ССЗТ).

Эти факторы, характерные для примитивных форм симбиоза, по мере повышения его эффективности эволюционируют в сторону смягчения патогенных эффектов. Так, в эволюции медленнорастущих ризобий происходила утрата синтеза ризобиотоксинов, которая сопровождалась повышением N_2 -фиксирующей активности клубеньков (14). Иные закономерности характерны для эволюции ССЗТ, которые в процессе диверсификации ризобий усложнялись и у быстрорастущих ризобий (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*) приобрели функции дополнительных по отношению к NF регуляторов хозяйской специфичности (15). Более того, в эволюционно продвинутых бобово-ризобиальных симбиозах факторы антагонизма используются для повышения эффективности кооперации партнеров. Например, богатые цистеином NCR-белки бобовых галегоидного комплекса, сходные с факторами защиты растений от патогенов (дефензинами), служат индукторами дифференцировки эндосимбиотических клеток *Rhizobium* и *Sinorhizobium* в неспособные к размножению бактериоиды, обладающие чрезвычайно высокой нитрогеназной активностью (18).

Симбиотрофное развитие растений. Попытки конструирования штаммов ризобий с повышенной СЭ показали, что усиление только одной целевой функции (N_2 -фиксации) вызывает ограниченный эффект: рекомбинанты ризобий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) с повышенным (от 1 до 2-5) числом копий генов, контролирующих синтез нитрогеназы (*nif*) и снабжение бактериоидов дикарбоновыми кислотами (*det*), обеспечивают 70-80 % прибавки по накоплению азота в растениях, однако их масса возрастает лишь на 15-20 % (19). Эта диспропорция, по-видимому, связана с тем, что растительные и микробные клетки конкурируют за углеводы, необходимые для энергообеспечения нитрогеназной реакции и для ассимиляции ее продуктов. При усилении конкуренции партнеров за углерод возможно замедление оттока азотных соединений в надземные органы. Однако такая конкуренция может быть ограничена посредством создания штаммов ризобий, стимулирующих развитие побеговых меристем благодаря синтезу фитогормонов или витаминов (20). При этом возрастает соотношение между длиной и массой побегов и корнями (изменяется габитус растений), что приводит к наиболее полному использованию растениями фиксируемого азота, а также преодолению метаболического дисбаланса симбиосистемы, который определяется перерасходом энергии в связи с усилением N_2 -фиксирующей активности.

В эволюции бобово-ризобиального симбиоза повышение СЭ достигалось двумя способами (1): резким возрастанием N_2 -фиксирующей активности бактерий, преобразуемых в нежизнеспособные бактериоиды, что характерно для микросимбионтов бобовых галегоидного комплекса

(включая трибы *Galegae*, *Trifolieae* и *Vicieae*), и переходом растений к детерминированной структуре клубеньков, типичной для триб *Loteae* и *Phaseoleae* (в этом случае бактериоиды сохраняют способность к размножению и после отмирания клубеньков переходят в состав почвенных популяций). Реализация второго («экономного») способа обеспечила существенное снижение энергоемкости симбиоза, а в трибе *Phaseoleae* — также диверсификацию путей усвоения фиксированного и почвенного азота. Эта диверсификация связана с тем, что в клубеньках фасоли и сои фиксированный азот включается в состав особых транспортных форм — уреидов (аллантаина и аллантаиновой кислоты), которые передаются в надземные органы, позволяя растениям сочетать симбиотрофное и автотрофное азотное питание. В то же время при реализации первого («затратного») способа симбиотрофное питание ограничено, поскольку в клубеньках люцерны, гороха и клевера транспортными формами азота служат те же амиды, которые образуются при усвоении азотных удобрений.

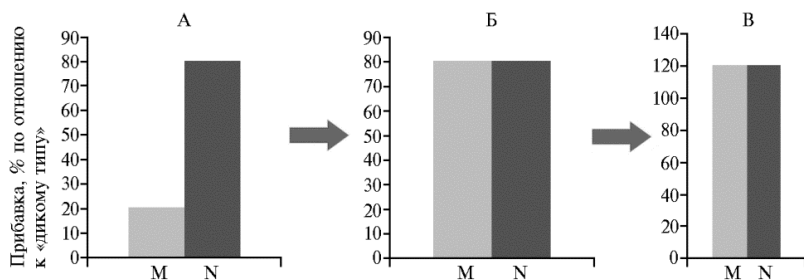
В связи с этим одним из направлений конструирования симбиотрофных растений может быть совмещение детерминированной структуры клубеньков со способностью активировать дифференцировку ризобий в нежизнеспособные бактериоиды (21). Возможность такого совмещения была показана в опытах по переносу от однолетней люцерны (*Medicago truncatula*) в лядвенец японский (*Lotus japonicus*) гена *dfn1-1*, контролирующего развитие бактериоидов. В результате интродукции дикого аллеля этого гена лядвенец, сохранив детерминированную структуру клубеньков, приобрел характерную для люцерны способность формировать монобактериальные симбиосомы с повышенной степенью дифференцировки бактериоидов (18).

Межвидовой альтруизм. Утрата бактериями функций свободного существования — важнейший фактор их перехода к мутуалистическому взаимодействию с растениями. На ранних этапах эволюции клубенькового симбиоза у медленнорастущих ризобий (*Bradyrhizobium*) произошла утрата фототрофности (она была функционально замещена системой клубенькообразования, обеспечившей бактериям доступ к продуктам растительного фотосинтеза) и diaзотрофности (в связи со специализацией *nif*-генов к функционированию *in planta*) (22). Эта тенденция получила развитие на поздних этапах эволюции симбиоза, когда у быстрорастущих ризобий (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*) возникла способность к трансформации в нежизнеспособные бактериоиды, обладающие чрезвычайно высокой N_2 -фиксирующей активностью. NCR-белки растений, стимулирующие эту трансформацию (23), сыграли роль ключевых факторов перехода партнеров к альтруистическим отношениям, которые по мере повышения целостности симбиоза преобразуются из внутривидового адаптивного механизма, ограниченного популяцией симбионтов, в контролируемый хозяином «межвидовой альтруизм» (16, 24).

В рамках генно-инженерных программ усиление этой тенденции может быть достигнуто посредством инактивации *eff*-генов ризобий, определяющей повышение СЭ благодаря утрате функций, которые необходимы для автономного выживания бактерий в почве, однако интерферируют с развитием эффективного симбиоза. К их числу относится синтез бактериями запасных питательных веществ (конкурирует с катаболизмом продуктов фотосинтеза, снабжающего нитрогеназный комплекс энергией), усвоение «несимбиотических» (не участвующих в питании бактериоидов) источников углерода (например, сахаров), а также образование поверхностных компонентов микробной клетки (экзо- и липополисахаридов), которые служат элиситорами защитных реакций растений, ограничиваю-

ших размножение эндосимбионтов (25). В системе *S. meliloti*—*M. sativa* утрата бактериями этих функций сопровождается сбалансированным повышением биомассы и накопления азота у растений, что свидетельствует об оптимизации соотношения их биохимических и морфометрических параметров. Актуальность этого направления симбиотической инженерии определяется тем, что при развитии бактерий в почве они часто теряют признаки мутуализма, однако сохраняют вирулентность и переходят к паразитированию на растениях (26). Очевидно, что адаптивный потенциал надвидовой системы может быть полностью реализован только с использованием методов симбиотической инженерии и агробιοтехнологии, которые позволяют предотвратить утрату бактериями признаков мутуализма, часто происходящую в стрессовых условиях.

Перспективы симбиотической инженерии. Рассмотренные подходы к конструированию высокоэффективных МРС могут быть объединены в универсальный генно-инженерный алгоритм со следующими составляющими: усиление целевых биохимических функций симбиоза; их координация с ростовыми процессами, обеспечивающая симбиотрофное развитие растений; снижение выживаемости микросимбионтов во внешней среде, обеспечивающее возрастание эффективности их взаимодействия с хозяевами (рис.).



Основные этапы конструирования высокоэффективных микробно-растительных симбиозов (на примере N_2 -фиксирующего бобово-ризобияльного симбиоза): А — повышение нитрогеназной активности бактерий, Б — оптимизация габитуса растений-хозяев, В — инактивация бактериальных генов — негативных регуляторов симбиоза; М — надземная масса растений, N — накопление азота в надземной массе.

Изучение бобово-ризобияльного симбиоза показало, что переключение бобовых с автотрофного питания азотом (усвоения удобрений и азотных соединений почвы) на симбиотрофное питание (ассимиляцию продуктов N_2 -фиксации) сопряжено с изменением общего плана развития растений. При инокуляции ризобиями их габитус меняется в пользу надземной части. Это может быть связано с активацией микросимбионтами развития побеговых меристем либо с ингибированием корневых меристем, что повышает эффективность использования продуктов N_2 -фиксации для формирования вегетативной массы и семян (20).

Предложенный нами алгоритм симбиотической инженерии может быть использован для повышения эффективности уже существующих форм МРС, однако для конструирования новых симбиозов необходимы принципиально иные подходы. В настоящее время широко обсуждается создание азотфиксирующих систем у небобовых (злаковых) культур, которое еще более 40 лет назад было определено в качестве приоритетной задачи генетической инженерии растений (27). Однако оказалось, что наиболее простой путь решения этой задачи, связанный с интродукцией генов азотфиксации в ядерные геномы растений, не оптимален: экспрессия бактериальных *nif*-генов и формирование активной нитрогеназы in

planta затруднены, поскольку работа этого фермента по непонятным пока причинам несовместима с метаболизмом эукариотической клетки (27, 28).

2. Подходы для конструирования азотфиксирующих растений (27, 39)

Подход	Достоинства	Экспериментальное обоснование	Ограничения
Введение <i>nif</i> -генов в ядерные хромосомы растений	Стабильное наследование <i>nif</i> -генов	Недостаточное (N_2 -фиксирующие эукариоты неизвестны)	Отсутствие экспрессии <i>nif</i> -генов (синтеза функционально активной нитрогеназы) в цитозоле эукариотической клетки
Создание N_2 -фиксирующих органелл на основе митохондрий или пластид	Изоляция нитрогеназы от цитозоля растительной клетки	Генетическое родство органелл и свободноживущих N_2 -фиксаторов	Ограниченный объем и низкая стабильность геномов органелл
Создание небобовых (злаковых) растений, способных формировать N_2 -фиксирующие клубеньки	Возможность использовать гомологи <i>Sym</i> -генов, широко распространенные у высших растений	Активация гомологов <i>Sym</i> -генов бактериальными сигналами (Nod-факторами). Образование при действии 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D) клубенькоподобных структур, заселяемых ризосферными N_2 -фиксаторами (<i>Azospirillum</i>)	Неполная экспрессия <i>Sym</i> -генов у небобовых при инокуляции ризобиями, низкая стабильность образуемых при этом симбиотических структур

Более реалистичным представляется использование подходов симбиогенетики, включая введение *nif*-генов в органеллы растительной клетки — митохондрии или пластиды, многие свободноживущие аналоги которых (α -протеобактерии и цианобактерии) способны к азотфиксации (табл. 2). В модельных опытах было показано, что функционально активные белки-нитрогеназы могут быть синтезированы в митохондриях дрожжей, однако в их цитозоле эти белки остаются неактивными даже в том случае, если дрожжи культивируют в анаэробных условиях, благоприятных для работы нитрогеназы (табл. 3).

3. Образование функционально активной малой субъединицы нитрогеназы (Fe-белка NifH) в рекомбинантных дрожжах (40)

Локализация синтеза NifH в клетках дрожжей	Ко-синтезируемые белки	Активность редукции	
		C_2H_2	N_2
Митохондрии	NifM	1600±27	826±60
Митохондрии	Отсутствуют	0	0
Цитозоль (+ O_2)	NifM	0	0
Цитозоль (- O_2)	NifM	102±2	0
Контрольные белки из <i>Azotobacter vinelandii</i>		1652±23	849±25

Примечание. Активность редукции измеряли in vitro в расчете на 1 мг MoFe-белка NifDK (большой субъединицы нитрогеназы): для C_2H_2 — по образованию этилена, нМ/мин, для N_2 — по образованию аммония, нМ/мин.

Важно отметить, что симбиосомы с бактериоидами, образуемые в клубеньках бобовых и представляющие собой структурно-функциональные аналоги митохондрий и пластид, с которыми симбиосомы вступают в тесные метаболические отношения, могут рассматриваться как прототипы новых клеточных органелл — аммонипластов (29). Начальные этапы их возникновения иллюстрируют генетически редуцированные цианобактерии *Nostoc azollae* — строго облигатные симбионты папоротника *Azolla filiculoides*, передаваемые вертикально при его споровом размножении (30). В случае бобово-ризобиального симбиоза одним из подходов для вовлечения таких органелл в клеточный цикл растений может быть их регенерация из культур клеток, содержащих симбиосомы с бактериоидами.

Еще одно перспективное направление инженерии N_2 -фиксирующего симбиоза — формирование у небобовых растений генетических программ развития клубеньков. Для этого могут быть использованы гомологи *Sym*-генов бобовых, многие из которых (гены LysM- и LRR-содержащих

рецепторов) имеются у всех высших растений и в определенных условиях активируются Nod-факторами ризобий (31). У злаковых культур (пшеницы и кукурузы) посредством обработки аналогом ауксина — 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-D) удалось индуцировать развитие клубенькоподобных структур, которые оказались удобными нишами для хостинга ризосферных азотфиксаторов, например *Azospirillum*. Поселяясь в этих «псевдоклубеньках», азоспириллы развивают гораздо более высокую нитрогеназную активность, чем на поверхности корней, а также эффективно передают растениям продукты N₂-фиксации (32).

Дальнейшее развитие симбиотической инженерии может быть связано с использованием эндофитных бактерий (33), в первую очередь тех, которые наследуются растениями через семена (34). Этой способностью обладают также эндофитные грибы семейства Спорыньевые (*Neotyphodium*), способные подавлять вредителей зерновых культур посредством выработки токсичных алкалоидов (35). Для симбиотической инженерии представляют интерес β-протеобактерии рода *Burkholderia*, включающего фитопатогенные и симбиотические, в том числе N₂-фиксирующие, формы. Показано, что биоконтроль паразитических штаммов *B. glumae* может быть осуществлен симбиотическим штаммом *Burkholderia* sp. с введенным в него геном *iiaA*, который нарушает экспрессию генов вирулентности патогена, определяемую механизмом «чувство кворума» (quorum sensing) (36). Значительным фитостимулирующим потенциалом обладают эндофиты листьев — эволюционно молодая группа симбиотических бактерий, способных стимулировать фотосинтез и подавлять развитие листовых патогенов (37). Ограничения, накладываемые на эволюцию перечисленных типов МРС условиями природных экосистем, могут быть преодолены с помощью методов геномной и клеточной инженерии, симбиогенетики и биотехнологии (38).

Таким образом, в настоящее время накоплены обширные данные о генетическом контроле, молекулярной организации и механизмах эволюции микробно-растительных симбиозов, что позволяет формировать генетически обоснованные программы их конструирования для адаптивного земледелия и растениеводства. Это позволит заменить экологически опасные агрохимикаты (удобрения, средства защиты растений) совершенно безопасными и гораздо более дешевыми микробными препаратами. Создание хозяйственно ценных микробно-растительных симбиозов включает две задачи: генетическое улучшение симбиозов, сформировавшихся в процессе природной коэволюции микробов и растений, и конструирование принципиально новых симбиозов. Успешное развитие симбиотической инженерии требует широкой кооперации специалистов разного профиля и остается одной из наиболее актуальных задач современной агробиологии.

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
микробиологии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: provorovnik@yandex.ru ✉, olony@yandex.ru

Поступила в редакцию
8 ноября 2017 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 3, pp. 464–474

EVOLUTIONARY-GENETIC BASES FOR SYMBIOTIC ENGINEERING IN PLANTS — a mini review

N.A. Provorov, O.P. Onishchuk

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail provorovnik@yandex.ru ✉ corresponding author, olony@yandex.ru ORCID:

Abstract

Microbe-plant symbioses have a great role in development and evolution of plants providing their mineral (nitrogenous, phosphorous) nutrition, resistance to pathogens and phytophagans and the developmental regulation under stress conditions (R.J. Rodriguez et al., 2009). Construction of the highly efficient symbioses should be based on the knowledge on pathways and mechanisms of partners' coevolution occurring in the natural ecosystems and agroecosystems. Using the model of N₂-fixing legume-rhizobia symbiosis we show that three major stages of its evolution should be simulated using the methods of symbiotic engineering. It should be aimed at: (i) optimization of partners' exchange by C- and N-compounds; (ii) suppression of partners' competition for nutrients and energy obtained from the environment; (iii) activation of partners' altruistic interactions based on the decrease of microsymbiont survival, for example, development of non-reproducible bacteroids by rhizobia. The first approach may be achieved by an increased assimilation by bacteria of the plant-delivered dicarboxylic acids required for the bacteroid nutrition. It is based on the generation of rhizobia recombinants containing the amplified copies of *nif* and *dct* genes encoding for the synthesis and energy supply of nitrogenase. However, this approach is limited by disbalancing the biochemical and developmental processes: a significant (by 70-80 %) increase in N₂-fixing activity is accompanied by a limited increase of plant biomass (by 15-20 %). This limitation can be overcome via construction of bacterial strains optimizing the plant development using the biologically active substances (phytohormones, vitamins, lumichrome) ensuring a complete involvement of N₂ fixation products in the yield formation. The second approach may be implemented by improving the ability of commercial rhizobia genotypes to compete for inoculation of host plants with the aboriginal strains which possess a high virulence combined with a low N₂-fixing activity. Realization of this approach is based on inactivation of genes regulating negatively the early stages of symbiosis development and on the amplification of genes regulating this development positively. The third approach may be realized via manipulations with the rhizobia *eff* genes identified using Tn5 mutants selected directly in fast-growing alfalfa rhizobia (*Sinorhizobium meliloti*) for an increased symbiotic efficiency, i.e. the impact of bacteria on the plant yield. This increase is achieved by knockout of the functions required for autonomous (ex planta) bacteria survival in soil but interfering with the symbiotic cooperation. These functions include synthesis of storage compounds (poly-β-hydroxybutyrate, glycogen), assimilation of «non-symbiotic» (not involved in the nutrition bacteroid) carbon sources (sugars) and formation of the cell surface components inducing the host defense responses (lipo- and exopolysaccharides). Prospects for the further increasing the input of «biological» nitrogen in crop nutrition are associated with establishing the nodular symbiosis in the non-legume (e.g., cereal) plants. The relevant approaches include establishment of the plant ability to form N₂-fixing nodules based on modifications of homologs of legume *Sym* genes (G. Oldroyd et al., 2014), introduction of *nif* genes into mitochondria or plastids which originated from N₂-fixing bacteria during symbiogenesis of eukaryotic cell (G. Lypez-Torrejn et al., 2016), and the construction of novel N₂-fixing cellular organelles (ammonio-plasts) providing the optimal conditions for the nitrogenase synthesis and operation.

Keywords: microbial-plant interactions, biological N₂ fixation, nodule bacteria, genetic construction, symbiotic engineering, cellular organelles, symbiotrophic plant nutrition, sustainable crop production.

REFERENCES

1. Provorov N.A., Tikhonovich I.A. *Geneticheskie osnovy evolyutsii bakterii — simbiotov rastenii* [Genetic fundamentals of evolution of symbiotic bacteria of plants]. St. Petersburg, 2016 (in Russ.).
2. Provorov N.A., Shtark O.Yu., Dolgikh E.A. *Zhurnal obshchei biologii*, 2016, 77: 329-345 (in Russ.).
3. Barrow J.R., Lucero M.E., Reyes-Vera I., Havstad K.M. Do symbiotic microbes have a role in plant evolution, performance and response to stress? *Communicative & Integrative Biology*, 2008, 1: 69-73.
4. Rodriguez R., Redman R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *J. Exp. Bot.*, 2008, 59: 1109-1114 (doi: 10.1093/jxb/erm342).
5. Dorosinskii L.M. *Kluben'kovye bakterii i nitragin* [Nodulation bacteria and nitragin]. Leningrad, 1970 (in Russ.).
6. Tikhonovich I.A., Kruglov Yu.V. *Biopreparaty v sel'skom khozyaistve* [Biologicals in agriculture]. Moscow, 2005 (in Russ.).

7. Terpolilli J.J., Hood G.A., Poole P.S. What determines the efficiency of N₂-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? *Adv. Microb. Physiol.*, 2012, 60: 325-389 (doi: 10.1016/B978-0-12-398264-3.00005-X).
8. Friesen M.L. Widespread fitness alignment in the legume-rhizobium symbiosis. *New Phytol.*, 2012, 194: 1096-1111 (doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04099.x).
9. Heath K.D. Intergenic epistasis and coevolutionary constraint in plants and rhizobia. *Evolution*, 2010, 64: 1446-1458 (doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00913.x).
10. Heath K.D., Burke P.V., Stinchcombe J.R. Coevolutionary genetic variation in the legume-rhizobium transcriptome. *Mol. Ecol.*, 2012, 21: 4735-4747 (doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05629.x).
11. Provorov N.A., Vorobyov N.I. Simulation of evolution implemented in the mutualistic symbioses towards enhancing their ecological efficiency, functional integrity and genotypic specificity. *Theor. Popul. Biol.*, 2010, 78: 259-269 (doi: 10.1016/j.tpb.2010.08.005).
12. Law R., Dieckmann U. Symbiosis through exploitation and the merger of lineages in evolution. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.*, 1998, 265: 1245-1253 (doi: 10.1098/rspb.1998.0426).
13. Provorov N.A., Dolgikh E.A. *Zhurnal obshchei biologii*, 2006, 67: 403-422 (in Russ.).
14. Okazaki S., Sugawara M., Yuhashi K.I., Minamisawa K. Rhizobitoxine-induced chlorosis occurs in coincidence with methionine deficiency in soybeans. *Annals of Botany*, 2007, 100: 55-59 (doi: 10.1093/aob/mcm087).
15. Yang Y., Zhao J., Morgan R.L., Ma W., Jiang T. Computational prediction of type III secreted proteins from gram-negative bacteria. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11(Suppl. 1): S47 (doi: 10.1186/1471-2105-11-S1-S47).
16. Provorov N.A., Vorob'ev N.I. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2015, 51: 363-370 (doi: 10.7868/S0555109915040145) (in Russ.).
17. Onishchuk O.P., Vorob'ev N.I., Provorov N.A. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2017, 53: 127-135 (doi: 10.7868/S0555109917020131) (in Russ.).
18. Van de Velde W., Zehirov G., Szatmari A., Debreczeny M., Ishihara H., Kevei Z., Farkas A., Mikulass K., Tiricz H., Satiat-Jeunemaotre B., Alunni B., Bourge M., Kucho K., Abe M., Kereszt A., Maroti G., Uchiumi T., Kondorosi E. Mergaert P. Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science*, 2010, 327: 1122-1126 (doi: 10.1126/science.1184057).
19. Onishchuk O.P., Vorob'ev N.I., Provorov N.A., Simarov B.V. *Ekologicheskaya genetika*, 2009, 7: 3-10 (doi: 10.1134/S2079059711020067) (in Russ.).
20. Provorov N.A., Onishchuk O.P., Kurchak O.N. Impacts of inoculation with *Sinorhizobium meliloti* strains differing in salt tolerance on the productivity and habitus of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2016, 51: 343-350 (doi: 10.15389/agrobiology.2016.3.343eng).
21. Provorov N.A., Vorob'ev N.I. *Geneticheskie osnovy evolyutsii rastitel'no-mikrobnogo simbioza /Pod redaktsiei I.A. Tikhonovicha*. St. Petersburg, 2012.
22. Provorov N.A., Andronov E.E. *Mikrobiologiya*, 2016, 2: 195-206 (doi: 10.7868/S0026365616020166) (in Russ.).
23. Maroti G., Downie J.A., Kondorosi E. Plant cystein-rich peptides that inhibit pathogen growth and control rhizobial differentiation in legume nodules. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2015, 26: 57-63 (doi: 10.1016/j.pbi.2015.05.031).
24. Denison R.F., Kiers E.T. Why are most rhizobia beneficial to their plant hosts, rather than parasitic? *Microbes Infect.*, 2004, 6: 1235-1239 (doi: 10.1016/j.micinf.2004.08.005).
25. Provorov N.A., Onishchuk O.P., Yurgel' S.N., Kurchak O.N., Chizhevskaya E.P., Vorob'ev N.I., Zatovskaya T.V., Simarov B.V. *Genetika*, 2014, 50: 1273-1285 (doi: 10.7868/S0016675814110113) (in Russ.).
26. Sachs J.L., Russell J.E., Hollowell A.C. Evolutionary instability of symbiotic function in *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS ONE*, 2011, 6: e26370 (doi: 10.1371/journal.pone.0026370).
27. Ausubel F.M. Twists and turns: my carrier path and concerns about the future. *Genetics*, 2014, 198: 431-434 (doi: 10.1534/genetics.114.169102).
28. Berman J., Gershoni J.M., Zamir A. Expression of nitrogen fixation genes in foreign hosts. Assembly of nitrogenase Fe protein in *Escherichia coli* and in yeast. *J. Biol. Chem.*, 1985, 260: 5240-5243.
29. Udvardi M., Poole P.S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2013, 64: 201-225 (doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120235).
30. Ran L., Larsson J., Vigil-Stenman T., Nylander J.A.A., Ininbergs K., Zheng W.W., Lapidus A., Lowry S., Haselkorn R., Bergman B. Genome erosion in a nitrogen-fixing vertically transmitted endosymbiotic multicellular cyanobacterium. *PLoS ONE*, 2010, 5: e11486 (doi: 10.1371/journal.pone.0011486).
31. Delaux P.M., Radhakrishnan G.V., Jayaramana D., Cheema J., Malbreild M., Volkening J.D., Sekimoto H., Nishiyama T., Melkonian M., Pokorný L., Rothfels C.J., Sederoff H.W., Stevenson D.W., Surek B., Zhang Y., Sussman M.R., Dunand C., Morris R.J., Roux C., Wong G. Oldroyd G.E., Ane J.M. Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *PNAS USA*, 2015, 112: 13390-13395 (doi: 10.1073/pnas.1515426112).

32. Saikia S.P., Jain V., Khetarpal S., Aravind S. Dinitrogen fixation activity of *Azospirillum brasilense* in maize (*Zea mays*). *Current Science*, 2007, 93: 1296-1300.
33. Chebotar V.K., Shcherbakova A.V., Maslennikova S.N., Zaplatkin A.N., Kanarskiy A.V., Zavalin A.A. Endophytic bacteria of woody plants as a basis of complex microbial preparations for agriculture and forestry. *Russian Agricultural Sciences*, 2016, 42: 339-342 (doi: 10.3103/S1068367416050037).
34. Rodriguez R.J., Freeman D.C., McArthur E.D., Kim Y.O., Redman R.S. Symbiotic regulation of plant growth, development and reproduction. *Communicative & Integrative Biology*, 2009, 2: 141-143.
35. Clay K., Schardl C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*, 2002, 160: S99-S127 (doi: 10.1086/342161).
36. Cho H.S., Park S.Y., Ryu C.M., Kim J.F., Kim J.G., Park S.H. Interference of quorum sensing and virulence of the rice pathogen *Burkholderia glumae* by an engineered endophytic bacterium. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2007, 60: 14-23 (doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00280.x).
37. Lemaire B., Vandamme P., Merckx V., Smets E., Dessein S. Bacterial leaf symbiosis in angiosperms: host specificity without co-speciation. *PLoS ONE*, 2011, 6: e24430 (doi: 10.1371/journal.pone.0024430).
38. Vavilov N.I. *Selektsiya kak nauka. Teoreticheskie osnovy selektsii. Tom 1. Obshchaya selektsiya rastenii* [Breeding as a field of science. V. 1. Plant selection]. Moscow, 1935 (in Russ.).
39. Oldroyd G., Dixon R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Curr. Opin. Biotech.*, 2014, 26: 19-24 (doi: 10.1016/j.copbio.2013.08.006).
40. López-Torrejón G., Jiménez-Vicente E., María Buesa J., Hernandez J.A., Verma H.K., Rubio L.M. Expression of a functional oxygen-labile nitrogenase component in the mitochondrial matrix of aerobically grown yeast. *Nature Communications*, 2016, 7: 11426 (doi: 10.1038/ncomms11426).