

УДК 575.86  
ГРНТИ 34.03.17

**АНАЛИЗ АЛЛЕЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ ГЕНА NODX У БАКТЕРИЙ ВИДА *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM*, СИМБИОНТОВ БОБОВЫХ *TRIFOLIUM* И *VAVILOVIA*.**

DOI: [10.31618/ESU.2413-9335.2020.2.73.662](https://doi.org/10.31618/ESU.2413-9335.2020.2.73.662)

**Аксенова Татьяна Сергеевна, Кимеклис Анастасия Кирилловна**

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,  
196608, г. Санкт-Петербург, Пушкин 8, ш. Подбельского, д.3

**АННОТАЦИЯ**

Ризобии вида *Rhizobium leguminosarum* делятся на два биовара в соответствии с растением-хозяином, с которым они вступают в симбиоз: *viciae* – с бобовыми из трибы *Fabeae*, *trifolii* – с бобовыми рода *Trifolium*. При этом внутри биовара *viciae* выделяется обособленная группа симбионтов реликтового растения *Vavilovia formosa*, демонстрирующая анцестральные признаки геномов. В данном исследовании мы сравниваем выборки симбионтов *Vavilovia* и *Trifolium* с целью выявления общих закономерностей в строении симбиотических генов. Результаты показывают, что по ряду анцестральных признаков эти группы ризобий сходны между собой. Полученные данные позволяют предположить, что симбионты *Vavilovia* и *Trifolium* могут быть также похожи на общего предка вида *R. leguminosarum*, существовавшего до разделения вида на биовары *viciae* и *trifolii*.

**ABSTRACT**

*Rhizobium leguminosarum* species is divided into two biovars according to the host plant which they have the ability to nodulate: *viciae* with legumes from the tribe *Fabeae*, *trifolii* with legumes of the genus *Trifolium*. However, a separate group of symbionts of the relict plant *Vavilovia formosa* separates from biovar *viciae*, demonstrating ancestral features of genomes. In this study, we compare the selection of the *Vavilovia* and *Trifolium* symbionts in order to identify common patterns in the structure of symbiotic genes. The results show that, both these rhizobia groups share several ancestral features. The data obtained suggest that the symbionts *Vavilovia* and *Trifolium* can also show some resemblance to the common ancestor of the species *R. leguminosarum*, which existed before the division of the species into *viciae* and *trifolii* biovars.

**Ключевые слова:** *Rhizobium leguminosarum*, симбиоз, ризобии, эволюция ризобий, протосимбионт

**Key words:** *Rhizobium leguminosarum*, symbiosis, rhizobia, evolution of rhizobia, protosymbiont

**Введение**

Ризобии, азотофикирующие симбионты бобовых, являются удобной моделью для изучения эволюционной симбиогенетики бактерий. Наиболее широко распространённые в умеренных широтах симбиотические азотфиксаторы – бактерии вида *Rhizobium leguminosarum* (*Rl*). Растения-хозяева ризобий вида *Rl* относятся к обширному семейству *Fabaceae*, и их симбионты разделяются по хозяйствской специфичности на два биовара: *bv. viciae* (симбионты вики, гороха, чины, чечевицы и вавиловии) и *bv. trifolii* (симбионты клевера) [1].

Недавно было показано, что по типу организации симбиотической части геномов, ризобии *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* можно разделить на две группы [2]. К первой группе относятся симбионты вавиловии красивой, растения, близкого к последнему общему предку всей трибы *Fabeae* [3]. Ризобии, входящие в эту группу обладают комплексом анцестральных черт генома. Вторая группа – производная или эволюционно «продвинутая». При переходе из анцестральной формы в «продвинутую» происходит компактизация генома, структурная и функциональная, увеличение интенсивности азотофиксации и сужение хозяйствской специфичности. Эти данные могут свидетельствовать о том, что ризобии, выделенные из *V. formosa*, близки к протосимбионту трибы *Fabeae* *R. leguminosarum* *bv. viciae*.

В эволюции ризобий *Rl* имела место еще одна более ранняя дивергенция между *R. leguminosarum* *bv. viciae* и *R. leguminosarum* *bv. trifolii*, отправной точкой которой являлся протосимбионт всего вида *R. leguminosarum*, существовавший до его разделения на биовары *viciae* и *trifolii*. В геномах штаммов симбионтов клевера также были найдены анцестральные признаки (в печати), выявленные у симбионтов вавиловии красивой, в то время как у большинства штаммов *R. leguminosarum* *bv. viciae* эти признаки утрачены [2]. Исходя из этих данных, можно предположить, что протосимбионт *R. leguminosarum* мог быть близок к ризобиям клевера.

Один из анцестральных признаков, характерных для всех симбионтов вавиловии и большинства симбионтов клевера, является наличие в *nod*-опероне гена *nodX*. Роль гена *nodX* для симбиоза с клевером не изучена, а его утрата у «продвинутых» штаммов *R. leguminosarum* *bv. viciae* связана с сужением хозяйствской специфичности и с повышением уровня азотофиксации [4]. В связи с этим целью данного исследования было провести анализ аллельного разнообразия гена *nodX* у нескольких популяций симбионтов *T. repens*, *T. praetense* и *V. formosa* относительно аллельного разнообразия контрольного гена *nodA*, который является общим для всего вида *R. leguminosarum*. Полученные данные позволяют приблизиться к пониманию

эволюционных отношений между этими группами симбионтов бобовых.

#### Материалы и методы

В работе были использованы последовательности генов *nodA* и *nodX* *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, симбионтов клевера, и *R. leguminosarum* bv. *viciae*, симбионтов вавиловии, и симбиотические регионы из предыдущих работ [5,6], а также референсные последовательности этих генов, доступные в GenBank (список штаммов, использованных в работе, представлен в таблице 1).

Для амплификации гена *nodA* использовали праймеры *nodA-1* (TGCRGTGGAARNTRNNCTGGGAAA) и *nodA-2* (GGNCCGTCRTCRAAWGTCARGTA) [5]; гена *nodX* - oMP199 (CCATGGGACCATCCAATGAAC) и oMP196 (TTAAGCGACGGAAAGCCTTC) [6]. Секвенирование проводили с помощью генетического анализатора ABI PRISM 3500xl (Applied Biosystems, США) в ЦКП “Геномные технологии и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ.

Таблица 1.

#### Штаммы, использованные в работе.

Штамм	Растение-хозяин	Идентификатор записи в GenBank
Rl bv. <i>viciae</i>	<i>Vavilovia formosa</i>	KY930250- KY930273, MK676140- MK676161
Rl bv. <i>viciae</i> TOM	<i>Pisum sativum</i> Afg	AQUC01000001-AQUC01000006
Rl bv. <i>viciae</i> Vc2	<i>Vicia cracca</i>	ARDP01000001-ARDP01000143
Rl bv. <i>trifolii</i> CB782	<i>Trifolium semipilosum</i>	NZ_CP007067, NZ_CP007070
Rl bv. <i>trifolii</i> CC275e	<i>Trifolium repens</i>	JRXL01000001-JRXL01000028
Rl bv. <i>trifolii</i> CC278f	<i>Trifolium nanum</i>	AJUI01000001-AJUI01000052
Rl bv. <i>trifolii</i> CC283b	<i>Trifolium ambiguum</i>	AZXS01000001-AZXS01000109
Rl bv. <i>trifolii</i> Rt24.2	<i>Trifolium pratense</i>	MAMO01000001-MAMO01000179
Rl bv. <i>trifolii</i> SRDI565	<i>Trifolium subterraneum</i>	AQUD01000001-AQUD01000007
Rl bv. <i>trifolii</i> SRDI943	<i>Trifolium subterraniuum</i>	AQUN01000001-AQUN01000005
Rl bv. <i>trifolii</i> TA1	<i>Trifolium spumosum</i>	AKIA01000001-AKIA01000037
Rl bv. <i>trifolii</i> WSM1325	medditerian clovers	NC_012850, NC_012848
Rl bv. <i>trifolii</i> WSM1689	<i>Trifolium uniflorum</i>	NZ_CP007045, NZ_CP007048
Rl bv. <i>trifolii</i> WSM2304	<i>Trifolium polymorphum</i>	NC_011369, NC_011368
Rl bv. <i>trifolii</i> WSM597	<i>Trifolium pallidum</i>	AKHZ01000001-AKHZ01000053
Rl bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium praetense</i> , <i>Trifolium repens</i>	MN747670-MN747700, MN747572- MN747602
Rl bv. <i>viciae</i> 248	<i>Vicia faba</i>	ARRT01000001-ARRT01000007

Выравнивание нуклеотидных последовательностей алгоритмом ClustalW, выбор нуклеотидной модели и построение филогенетии проводились в программе Mega7 [7].

#### Результаты

Для реконструкции филогенетии были использованы последовательности генов *nodA* и

*nodX* *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, симбионтов клевера, и *R. leguminosarum* bv. *viciae*, симбионтов вавиловии, из предыдущих работ [8,9], а также референсные последовательности этих генов, доступные в GenBank (таб. 1).

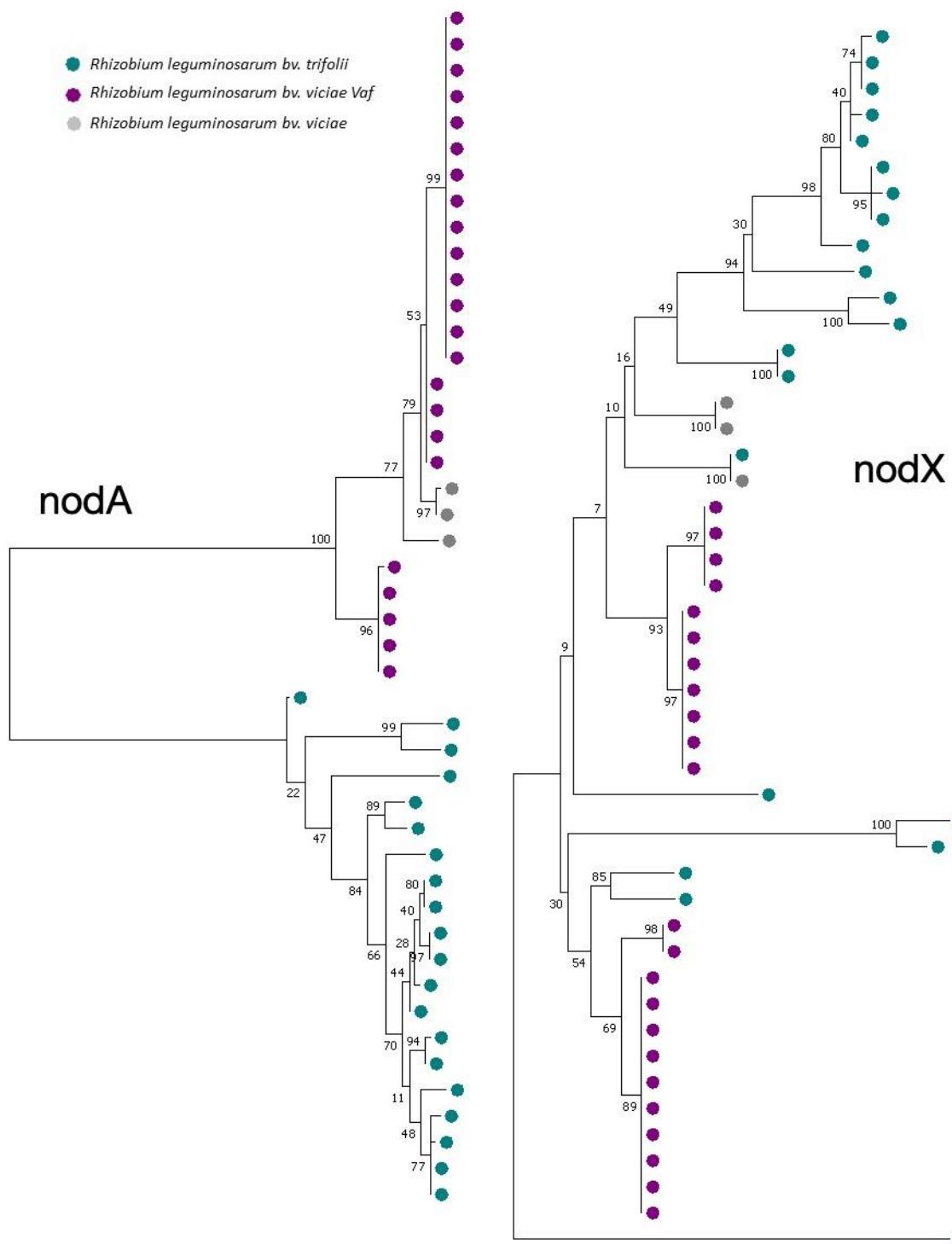


Рисунок 1. Сравнение филогенетических деревьев генов *nodX* и *nodA*.

Как видно из рисунка 1, для гена *nodA* характерно четкое распределение на отдельные кластеры штаммов *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Для гена *nodX* такого разделения нет. Напротив, часть

последовательностей *nodX* *R. leguminosarum* bv. *trifolii* кластеризуются вместе с последовательностями *nodX* симбионтов вавиловии.

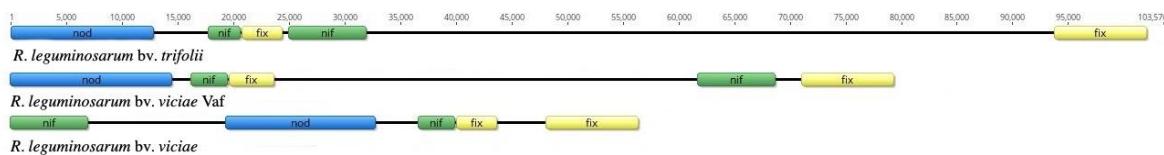


Рисунок 2. Схема расположения symb-оперонов в symb-регионах. Синим цветом обозначены nod-опероны, зеленым - nif и желтым - fix. Шкала вверху рисунка - длина симбиотических регионов, п. о. [9].

При сравнении состава и организации симбиотических регионов (рис. 2) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и *R. leguminosarum* bv. *viciae* видна очевидная схожесть этих регионов у симбионтов клевера и симбионтов вавиловии, для которых характерна избыточность межгенных расстояний и похожее расположение *nod*-, *nif*- и *fix*-оперонов.

#### Обсуждение

Несмотря на то, что ризобии вавиловии и клевера не обладают возможностью к перекрестной инокуляции своих растений-хозяев, они обладают рядом общих сходных черт, одним из которых является наличие гена *nodX* в *nod*-опероне. Для более глубокого анализа этого сходства мы изучили полиморфизм аллелей гена *nodX* у выборки ризобий вавиловии и клевера.

В предыдущих работах было показано, что симбионты вавиловии диверсифицированы от симбионтов клевера как по генам домашнего хозяйства, так и по симбиотическим генам [8]. В нашей работе мы наблюдаем такую же диверсификацию для симбиотического гена *nodA*. Для гена *nodX* мы видим противоположную картину: некоторые последовательности *nodX* штаммов симбионтов клевера и симбионтов вавиловии кластеризуются вместе, а разделение на отдельные кластеры не выражено.

Ранее для гена *nodX* было показано, что он необходим для симбиоза *R. leguminosarum* bv. *viciae* с дикорастущими "афганскими" ("древними") линиями гороха (*Pisum sativum*) [10]. Для ризобий *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, симбионтов клевера, и *R. leguminosarum* bv. *viciae*, симбионтов вавиловии, характерно присутствие гена *nodX* в аксессорном геноме, что рассматривается как анцестральный признак [2, 8, 9].

Помимо наличия схожих аллелей гена *nodX*, у симбионтов клевера и вавиловии обнаруживаются общие анцестральные признаки в строении симбиотического региона генома. Это является еще одним доказательством того, что симбионты вавиловии и клевера могут быть близки к общему предку вида *Rl*, существовавшего до разделения вида на биовары *viciae* и *trifolii*.

Работа поддержана грантами РФФИ № 18-34-00839 (содержание и работа с коллекцией симбионтов *T. repens* и *T. pratense*) и № 18-316-00124 (содержание и работа с коллекцией симбионтов *V. formosa*).

#### Список литературы

1. Jordan D.C. Rhizobiaceae. In *bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, MD, 1984.
2. Chirak E. R., Kimeklis A. K., Karasev E. S., et al. Search for ancestral features in genomes of rhizobium leguminosarum bv. *viciae* strains isolated from the relict legume *Vavilovia formosa*. *Genes*. 2019; 10(12): 990. <https://doi.org/10.3390/genes10120990>
3. Mikič A., Smýkal P., Kenicer G., et al., The bicentenary of the research on 'beautiful' *vavilovia* (*Vavilovia formosa*), a legume crop wild relative with taxonomic and agronomic potential., *Bot. J. Linn. Soc.* 2013; 172(4): 524-531. <https://doi.org/10.1111/boj.12060>
4. Provorov N., Tikhonovich I. Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-rhizobia symbiosis. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2003; 50: 89–99. <https://doi.org/10.1023/A:1022957429160>
5. Haukka, K.; Lindstrom, K.; Young, J.P. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64: 419–426.
6. Ovtyna, A.O.; Rademaker, G.-J.; Esser, E.; Weinman, J.; Rolfe, B.G.; Tikhonovich, I.A.; Lugtenberg, B.J.J.; Thomas-Oates, J.E.; Spaink, H.P. Comparison of Characteristics of the *nodX* Genes from Various Rhizobium leguminosarum Strains. *MPMI* 1999; 12: 252–258. <https://doi.org/doi:10.1094/MPMI.1999.12.3.252>
7. Stecher G, Kumar S, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016; 33(7): 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
8. Kimeklis, A. K., Chirak, E. R., Kuznetsova et al. Rhizobia Isolated from the Relict Legume *Vavilovia formosa* Represent a Genetically Specific Group within Rhizobium leguminosarum biovar *viciae*. *Genes*. 2019; 10(12): 991. <https://doi.org/10.3390/genes10120991>
9. Аксенова Т.С. , Чирак Е.Р. , Онищук О.П. и др. Выявление анцестральных характеристик генома у *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. В печати.
10. Ma SW, Iyer VN. New Field Isolates of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *Viciae* That Nodulate the Primitive Pea Cultivar Afghanistan in Addition to Modern Cultivars. *Appl Environ Microbiol*. 1990; 56(7): 2206-12.