

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

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, азотфиксирующие 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 хозяйской 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 азотфиксации и сужение хозяйской 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 хозяйской специфичности и с повышением уровня азотфиксации [4]. В связи с этим целью данного исследования было провести анализ аллельного разнообразия гена *nodX* у нескольких популяций симбионтов *T. repens*, *T. pratense* и *V. formosa* относительно аллельного разнообразия контрольного гена *nodA*, который является общим для всего вида *R. leguminosarum*. Полученные данные позволят 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 вавилови, 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>	Vavilovia formosa	KY930250- KY930273, MK676140- MK676161
Rl bv. <i>viciae</i> TOM	Pisum sativum Afg	AQUC01000001-AQUC01000006
Rl bv. <i>viciae</i> Vc2	Vicia cracca	ARDP01000001-ARDP01000143
Rl bv. <i>trifolii</i> CB782	Trifolium semipilosum	NZ_CP007067, NZ_CP007070
Rl bv. <i>trifolii</i> CC275e	Trifolium repens	JRXL01000001-JRXL01000028
Rl bv. <i>trifolii</i> CC278f	Trifolium nanum	AJUI01000001-AJUI01000052
Rl bv. <i>trifolii</i> CC283b	Trifolium ambiguum	AZXS01000001-AZXS01000109
Rl bv. <i>trifolii</i> Rt24.2	Trifolium pratense	MAMO01000001-MAMO01000179
Rl bv. <i>trifolii</i> SRDI565	Trifolium subterraneum	AQUD01000001-AQUD01000007
Rl bv. <i>trifolii</i> SRDI943	Trifolium subterraneum	AQUN01000001-AQUN01000005
Rl bv. <i>trifolii</i> TA1	Trifolium spumosum	AKIA01000001-AKIA01000037
Rl bv. <i>trifolii</i> WSM1325	medditerian clovers	NC_012850, NC_012848
Rl bv. <i>trifolii</i> WSM1689	Trifolium uniflorum	NZ_CP007045, NZ_CP007048
Rl bv. <i>trifolii</i> WSM2304	Trifolium polymorphum	NC_011369, NC_011368
Rl bv. <i>trifolii</i> WSM597	Trifolium pallidum	AKHZ01000001-AKHZ01000053
Rl bv. <i>trifolii</i>	Trifolium praetense, Trifolium repens	MN747670-MN747700, MN747572- MN747602
Rl bv. <i>viciae</i> 248	Vicia faba	ARRT01000001-ARRT01000007

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

Результаты

Для реконструкции филогении были использованы последовательности генов *nodA* и

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

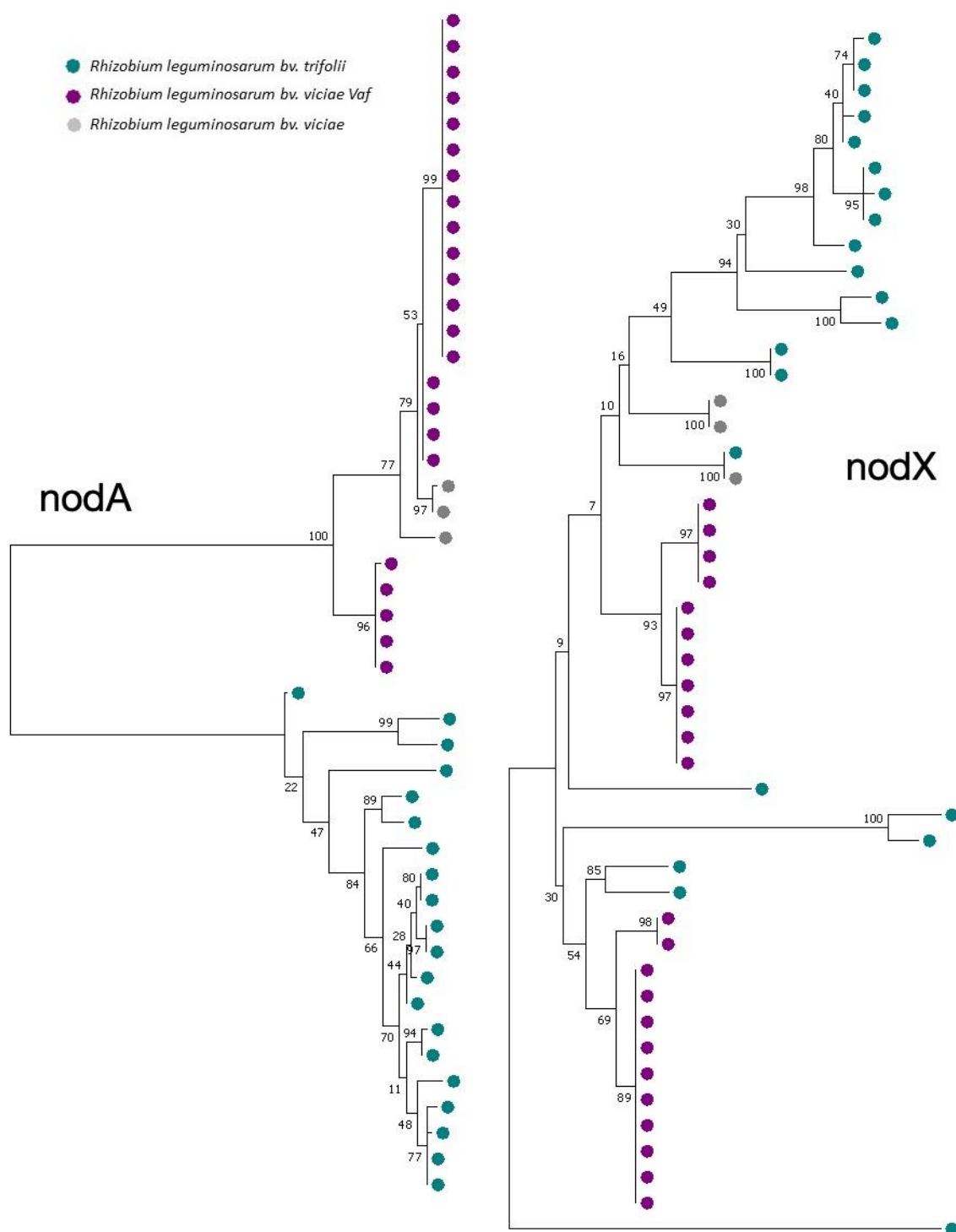


Рисунок 1. Сравнение филогеней генов *nodX* и *nodA*.

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.

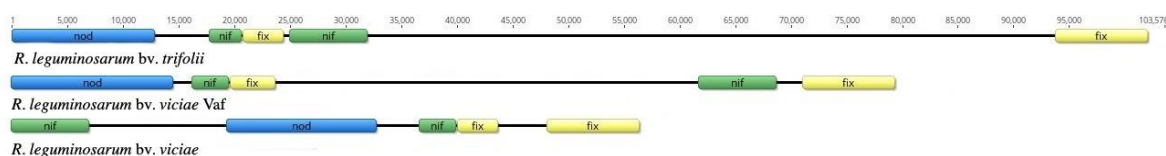


Рисунок 2. Схема расположения сим-оперонов в сим-регионах. Синим цветом обозначены *nod*-опероны, зеленым - *nif* и желтым - *fix*. Шкала сверху рисунка - длина симбиотических регионов, п. о. [9].

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 акцессорном 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. Ovtsyna, 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.