

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 576.6:575.8+631.461.52

ПОЛИМОРФИЗМ КОРОВЫХ И СИМБИОТИЧЕСКИ
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ГЕНОВ У ПОЛИТИПИЧЕСКИХ ВИДОВ
КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

© 2023 г. Н. А. Проворов^{1, *}, А. К. Кимеклис^{1, 2}, Е. С. Карасев¹, С. Хосид¹,
О. П. Онищук¹, О. Н. Курчак¹, Е. Е. Андронов^{1, 3}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Санкт-Петербург, 196608 Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

³Почвенный институт им. В.В. Докучаева, Москва, 109017 Россия

*e-mail: provorovnik@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.05.2023 г.

После доработки 04.07.2023 г.

Принята к публикации 12.07.2023 г.

Политипические виды клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* (включает биовары *viciae* и *trifolii*) и *Neorhizobium galegae* (биовары *orientalis* и *officinalis*) различаются по нуклеотидному полиморфизму генов “домашнего хозяйства” (*hkg*) и симбиотически специализированных генов (*sym*), контролирующих образование N₂-фиксирующих клубеньков у бобовых растений. У *R. leguminosarum* величины *p*-distance по *sym*-генам выше, чем по *hkg*-генам у штаммов, относящихся как к одному, так и к разным биоварам. У *N. galegae* различия между биоварами по *sym*-генам выше, чем по *hkg*-генам, однако у штаммов одного биовара полиморфизм *sym*-генов ниже, чем *hkg*-генов. Коэффициенты дифференциации биоваров по обеим группам генов выше у *N. galegae*, чем у *R. leguminosarum*, что может быть связано с пространственной изоляцией биоваров *N. galegae*. У данного вида ризобий конгруэнтность (сходство) филогений *sym*- и *hkg*-генов более выражена, чем у *R. leguminosarum*. Это указывает на активный перенос *sym*-генов в популяциях *R. leguminosarum*, который может быть важным фактором глубокой диверсификации этого вида ризобий по признакам симбиоза.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии (ризобии), нуклеотидный полиморфизм, эволюция симбиоза, *Rhizobium leguminosarum*, *Neorhizobium galegae*, конгруэнтность филогений и перенос генов.

DOI: 10.31857/S0016675823120081, **EDN:** QCSMBNH

Клубеньковые бактерии (ризобии), N₂-фиксирующие симбионты бобовых растений обладают сложно устроенными геномами, которые состоят из консервативных коровых и варибельных аксессуарных частей [1]. Гены коровой части генома отвечают за функции “домашнего хозяйства” — основной метаболизм, развитие и размножение, матричные процессы (*hkg*, от house-keeping genes), и их дивергенция определяет видообразование. Аксессуарные гены кодируют различные адаптивные функции, включая симбиоз с растениями (*sym*-гены), и их дивергенция характеризует микроэволюционные процессы [2]. Многие виды ризобий являются политипическими: они состоят из биоваров, контрастно различающихся по хозяйской специфичности [3]. Среди этих видов наиболее изучены *Rhizobium leguminosarum*, включающий bv. *viciae* (симбионты растений трибы Fabeae, роды *Lathyrus*, *Lens*, *Pisum*, *Vavilovia*, *Vicia*), bv. *trifolii* (симбионты рода *Trifolium* из трибы Trifolieae), bv.

phaseoli (симбионты *Phaseolus vulgaris* из трибы Phaseoleae) и *Neorhizobium galegae*, разделяемый на bv. *orientalis* и bv. *officinalis* — симбионты козлятника восточного (*Galega orientalis*) и лекарственного (*G. officinalis*).

Ранее мы показали [4–6], что штаммы *R. leguminosarum* и *N. galegae* существенно варьируют по нуклеотидным последовательностям *sym*- и *hkg*-генов. Поскольку эти виды ризобий различаются по геномной организации [2] и по ареалам распространения, мы решили сопоставить полиморфизм *sym*- и *hkg*-генов у *R. leguminosarum* и *N. galegae*.

Для этого мы изучили нуклеотидный полиморфизм (*p*-distance) у выборки штаммов ризобий из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), включающей 16 штаммов *R. leguminosarum* (10 — bv. *viciae*, 6 — bv. *trifolii*) и 14 штаммов *N. galegae* (8 — bv. *officinalis*, 6 — bv. *orientalis*) по конкатенированным (объединенным) последовательностям 4 *sym*-генов (*nodA*, *nodC*, *nodD*, *nifH*) и 4 *hkg*-генов

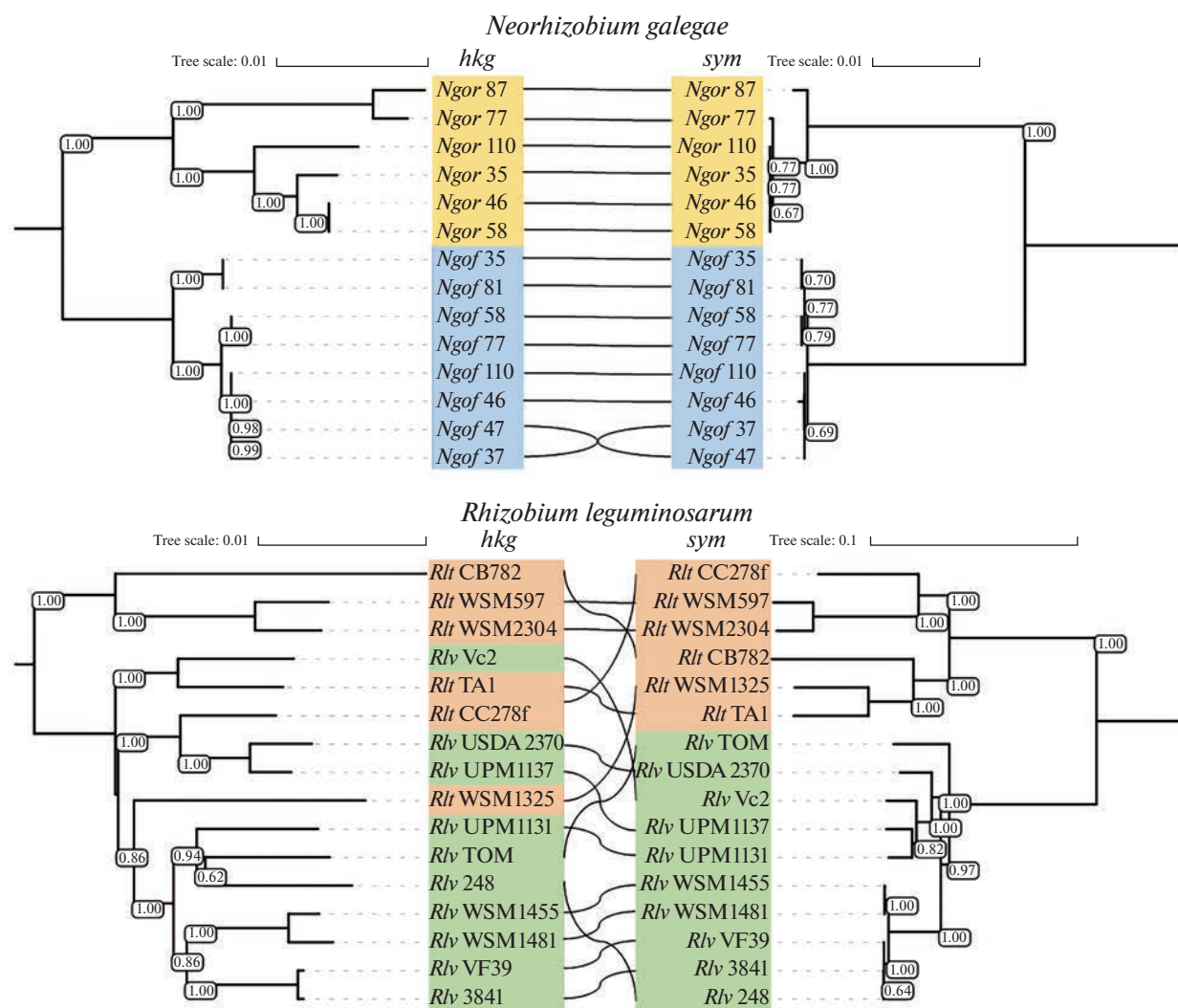


Рис. 1. Сопоставление филогений конкатенированных (объединенных) последовательностей генов “домашнего хозяйства” (*hkg*) и симбиотически специализированных генов (*sym*) у биоваров, входящих в виды *Neorhizobium galegae* (*Ngor* – *bv. orientalis* выделен желтым, *Ngof* – *bv. officinalis* выделен синим) и *Rhizobium leguminosarum* (*Rlt* – *bv. trifolii* выделен оранжевым, *Rlv* – *bv. viciae* выделен зеленым). Филогении генов построены с применением метода Neighbor joining и изображены с сохранением эволюционных расстояний, на узлах представлены значения bootstrap в долях от 1. Линии соединяют названия одного и того же штамма на *hkg*- и *sym*-дендрограммах.

(16S рДНК, *dnaK*, *glnA*, *gltA*); обозначения штаммов даны на рис. 1. Для построения филогений использовали метод Neighbor Joining [7], эволюционные расстояния рассчитывали с помощью метода *p*-distance [8], bootstrap-тест [9] проведен с 1000 итераций в программе Mega X [10], конечная обработка данных проведена с помощью онлайн-утилиты iTOL [11].

Сопоставление двух политипических видов ризобий по степени полиморфизма нуклеотидных последовательностей показало (табл. 1), что у *R. leguminosarum* внутри биоваров наиболее изменчивы *sym*-гены, а у *N. galegae* – *hkg*-гены. Расхождение биоваров по *hkg*-генам одинаково для обоих видов, тогда как *sym*-гены наиболее сильно различаются у биоваров *R. leguminosarum*. У обоих

видов ризобий различия биоваров по уровню полиморфизма сильнее выражены для *sym*-генов, чем для *hkg*-генов, причем у *R. leguminosarum* эти различия более существенны, чем у *N. galegae*. Коэффициенты дифференциации (КД) биоваров по нуклеотидным последовательностям *sym*- и *hkg*-генов (отношения различий между биоварами к общей изменчивости генов [12]) у *N. galegae* выше, чем у *R. leguminosarum*, по обеим группам генов, причем наиболее сильно различие КД выражено для *hkg*-генов.

Анализ конгруэнтности (совпадения) филогений *sym*- и *hkg*-генов показал (рис. 1), что среди 14 изученных штаммов *N. galegae* одинаковое положение на дендрограммах этих генов занимают 12 (85.7%) штаммов, тогда как среди 16 штаммов

Таблица 1. Нуклеотидный полиморфизм (p -distance) генов симбиоза (sym) и домашнего хозяйства (hkg) у политипических видов ризобий

Гены	<i>Rhizobium leguminosarum</i>		<i>Neorhizobium galegae</i>	
	bv. <i>viciae</i>	bv. <i>trifolii</i>	bv. <i>orientalis</i>	bv. <i>officinalis</i>
Сравнение штаммов одного биовара				
<i>sym</i>	0.0393 <	0.1351	0.0018 >	0.0007
<i>hkg</i>	0.0192 <	0.0307	0.0177 >	0.0035
<i>sym/hkg</i>	2.05	4.40	0.10	0.20
<i>t</i> _{St} (<i>P</i> ₀)	9.52 (<0.001)	27.13 (<0.001)	10.52 (<0.001)	4.87 (<0.01)
Сравнение штаммов из разных биоваров				
<i>sym</i>	0.2485 >		0.0444	
<i>hkg</i>	0.0290 ≈		0.0313	
<i>sym/hkg</i>	8.48		1.42	
<i>t</i> _{St} (<i>P</i> ₀)	36.92 (<0.001)		3.34 (<0.01)	
Коэффициенты дифференциации биоваров				
<i>sym</i>	0.4404 <		0.9492	
<i>hkg</i>	0.0228 <		0.4842	
<i>sym/hkg</i>	19.31		1.96	
<i>t</i> _{St} (<i>P</i> ₀)	29.12 (<0.001)		17.61 (<0.001)	

Примечание. Средние значения параметров полиморфизма sym - и hkg -генов сравнивали с помощью критерия Стьюдента (t_{St}). Знаки "<" и ">" указывают на достоверность различий ($P_0 < 0.01$) между находящимися в соседних колонках значениями параметров, вычисленными для разных биоваров или видов ризобий ("≈" – различие недостоверно, $P_0 > 0.05$).

R. leguminosarum такое положение занимают лишь 2 (12.5%) штамма ($t_{St} = 5.86$, $P_0 < 0.001$). Это позволяет предположить, что выявленные нами межвидовые различия по степени полиморфизма sym - и hkg -генов связаны с более высокой интенсивностью переноса sym -генов в популяциях *R. leguminosarum*, что согласуется с различием видов по величинам КД. Известно, что геном этого вида ризобий состоит из хромосомы и плазмид, одна из которых ($pSym$), имеющая размер 200–500 тпн, содержит sym -гены и обычно способна к конъюгативному переносу между разными штаммами [1]. У *N. galegae* sym -гены расположены на хромиде, имеющих размер более 1600 тпн и не способных к переносу. Эти хромиды имеют системы репликации плазмидного типа *repABC*, однако содержат гены $pRHK$ и $tRHK$, которые у большинства видов ризобий расположены в хромосомах [13].

Ограниченный перенос генов в популяциях *N. galegae* может быть связан с тем, что *Galega orientalis* и *G. officinalis* обычно произрастают раздельно [14], что определяется конкуренцией родственных видов козлятника за общие биотопы, а также разной экологической специализацией этих видов. В то же время хозяева биоваров *R. leguminosarum*, относящиеся к разным трибам бобовых (например, *Trifolium*, *Lathyrus*, *Vicia*), часто произрастают совместно, что создает возможность для стабильного сосуществования bv. *viciae* и bv. *trifolii* и для их обмена генами.

Ранее было показано, что эколого-генетические механизмы эволюции sym - и hkg -генов у ризобий существенно различаются. Эволюция sym -генов происходит под действием селективных факторов (различные формы индивидуального и группового отбора), индуцируемых растениями-хозяевами, тогда как эволюция hkg -генов определяется не изученными пока факторами, которые могут быть связаны с почвенно-климатическими условиями [2]. Представленные нами данные позволяют предположить, что у *N. galegae* благодаря ограниченному переносу генов в популяциях, индуцируемый растениями дизруптивный отбор, определяющий формирование политипической структуры вида, не ограничен sym -генами и распространяется на hkg -гены.

Причиной межвидовых различий ризобий по уровню полиморфизма может быть также разная степень их дивергенции хозяев, которые у *N. galegae* относятся к одному роду бобовых, а у *R. leguminosarum* – к разным родам и трибам. Анализ величин КД (табл. 1) позволяет предположить, что у *R. leguminosarum* популяции обладают большей, чем у *N. galegae*, панмиктичностью, что согласуется с результатами филогенетического анализа (рис. 1). Интересно отметить, что у обоих видов ризобий дифференциация биоваров менее выражена для hkg -генов, чем для sym -генов. Низкая дифференциация биоваров *R. leguminosarum* по hkg -генам (КД = 0.0228) указывает на то, что интенсивность

внутривидового переноса для этих хромосомных генов может быть достаточно высокой, например в связи с характерными для ризобий процессами трансформации и трансдукции [15].

Таким образом, мы показали, что у политипических видов *N. galegae* и *R. leguminosarum* нуклеотидный полиморфизм *hkg*- и *sym*-генов существенно различается, поскольку: а) изменчивость генов обеих групп у *R. leguminosarum* выше, чем у *N. galegae*, причем это различие наиболее выражено для *sym*-генов (отношения *sym/hkg* для всех показателей полиморфизма у *R. leguminosarum* выше, чем у *N. galegae*); б) величины КД по обоим группам генов у *N. galegae* выше, чем у *R. leguminosarum*; в) у *N. galegae* конгруэнтность филогений *sym*- и *hkg*-генов более выражена, чем у *R. leguminosarum*.

Таким образом, выявленная нами видоспецифичность нуклеотидного полиморфизма генов ризобий, по-видимому, определяется особенностями организации геномов *N. galegae* и *R. leguminosarum*, влияющими на мобильность *sym*-генов. Наиболее велика она у *R. leguminosarum*, что соответствует глубокой диверсификации этого вида ризобий по хозяйской специфичности, определяющей более широкое географическое распространение *R. leguminosarum* по сравнению с *N. galegae*. Логично предположить, что в эволюции *sym*-генов, наряду с индуцируемым хозяевами отбором существенную роль играет перенос этих генов в бактериальных популяциях, интенсивность которого определяется как их пространственной структурой, так и геномной локализацией *sym*-генов. Поэтому влияние географической изоляции растений-хозяев на дивергенцию их симбионтов может быть не менее значимым, чем влияние индуцируемых растениями селективных факторов.

Механизмы связи между интенсивностью переноса генов в популяциях ризобий и их полиморфизмом представляют большой интерес для дальнейших исследований. Особое внимание привлекают механизмы эволюции коровой части генома, которая: а) происходит независимо от симбиоза — наиболее изученного, и, как долго считалось, основного фактора эволюции ризобий; б) включает перенос хромосомных *hkg*-генов в популяциях обоих видов ризобий, который, как показал анализ КД, может происходить не менее интенсивно, чем перенос вне хромосомных *sym*-генов в связи с характерными для этих бактерий процессами трансформации и трансдукции [15].

Работа поддержана грантом РНФ 19-16-00081П.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Young J.P., Crossman L.C., Johnston A.W.B. et al. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components // *Genome Biol.* 2006. V. 7. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-4-r34>
2. Provorov N.A., Andronov E.E., Kimeklis A.K. et al. Microevolution, speciation and macroevolution in rhizobia: Genomic mechanisms and selective patterns // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1026943>
3. Rogel M.A., Ormeño-Orrillo E., Martínez-Romero E. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes // *Syst. Appl. Microbiol.* 2011. V. 34. № 2. P. 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.015>
4. Карасев Е.С., Андронов Е.Е., Аксенова Т.С. и др. Эволюция ризобий козлятника (*Neorhizobium galegae*): анализ полиморфизма генов фиксации азота и развития клубеньков // *Генетика.* 2019. Т. 55. № 2. С. 234–238. <https://doi.org/10.1134/S0016675819020085>
5. Кимеклис А.К., Кузнецова И.Г., Сазанова А.Л. и др. Дивергентная эволюция симбиотических бактерий: ризобии реликтового бобового *Vavilovia formosa* формируют обособленную группу в пределах вида *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // *Генетика.* 2018. Т. 54. № 7. С. 851–855. <https://doi.org/10.1134/S0016675818070068>
6. Kimeklis A., Chirak E., Kuznetsova I. et al. Rhizobia isolated from the relict legume *Vavilovia formosa* represent a genetically specific group within *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* // *Genes.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3390/genes10120991>
7. Saitou N., Nei M. The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. V. 4. № 4. P. 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
8. Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* N. Y.: Oxford Univ. Press, 2000. 248 p.
9. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution.* 1985. V. 39. № 4. P. 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420>
10. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
11. Letunic I., Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation // *Nucl. Ac. Res.* 2021. V. 47(W1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>
12. Verity R., Nichols R. What is genetic differentiation, and how should we measure it — GST, D, neither or both? // *Mol. Ecol.* 2014. V. 23. № 17. P. 4216–4225. <https://doi.org/10.1111/mec.12856>

13. Österman J., Marsh J., Laine P.K. et al. Genome sequencing of two *Neorhizobium galegae* strains reveals a *noe* T gene responsible for the unusual acetylation of the nodulation factors // BMC Genomics. 2014. V. 15. № 1.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-500>
14. Andronov E., Terefework Z., Roumiantseva M. et al. Symbiotic and genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolates collected from the *Galega orientalis* gene center in the Caucasus // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. № 2. P. 1067–1074.
[https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1067–1074.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1067-1074.2003)
15. Beringer J.E., Brewin N.J., Johnston A.W.B. The genetic analysis of *Rhizobium* in relation to symbiotic nitrogen fixation // Heredity. 1980. V. 45. № 2. P. 161–186.

Polymorphism of Core and Symbiotically Specialized Genes in the Polytypic Species of Nodule Bacteria

N. A. Provorov^{a, *}, A. K. Kimeklis^{a, b}, E. S. Karasev^a, S. Khosid^a,
O. P. Onishchuk^a, O. N. Kurchak^a, and E. E. Andronov^{a, c}

^aAll-Russia Research Institute of Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, 196608 Russia

^bSaint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia

^cDokuchaev Soil Institute, Moscow, 109017 Russia

*e-mail: provorovnik@yandex.ru

The polytypic species of nodule bacteria *Rhizobium leguminosarum* (includes biovars *viciae* and *trifolii*) and *Neorhizobium galegae* (biovars *orientalis* and *officinalis*) differ in the nucleotide polymorphism of housekeeping genes (*hkg*) and of symbiotically specialized genes (*sym*) that control the formation of N₂-fixing nodules in leguminous plants. In *R. leguminosarum*, *p*-distance values for *sym* genes are higher than for *hkg* genes in strains from the same and from different biovars. In *N. galegae*, differences between biovars in *sym* genes are higher than in *hkg* genes while within biovars, polymorphism in *sym* genes is lower than in *hkg* genes. Coefficients of biovar differentiation for both groups of genes are higher in *N. galegae* than in *R. leguminosarum*, possibly reflecting the spatial isolation of *N. galegae* biovars. In these species of rhizobia, the phylogenetic congruence of *sym* and *hkg* genes is more pronounced in *N. galegae* than in *R. leguminosarum*. This difference indicates an active transfer of *sym* genes in *R. leguminosarum* populations possibly representing an important factor of the deep diversification for symbiotic traits in this rhizobia species.

Keywords: nodule bacteria (rhizobia), nucleotide polymorphism, evolution of symbiosis, *Rhizobium leguminosarum*, *Neorhizobium galegae*, phylogenetic congruence and transfer of genes.