

## ЭВОЛЮЦИИ РИЗОБИЙ КОЗЛЯТНИКА (*Neorhizobium galegae*): АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФИКСАЦИИ АЗОТА И РАЗВИТИЯ КЛУБЕНЬКОВ

© 2019 г. Е. С. Карасев<sup>1, \*</sup>, Е. Е. Андронов<sup>1, 2, 3</sup>, Т. С. Аксенова<sup>1</sup>,  
Е. П. Чижевская<sup>1</sup>, А. Е. Тупикин<sup>4</sup>, Н. А. Проворов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,  
Санкт-Петербург, 196608 Россия

<sup>2</sup>Почвенный институт им. В.В. Докучаева Российской академии наук, Москва, 119017 Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии,  
Санкт-Петербург, 199034 Россия

<sup>4</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук,  
Новосибирск, 630090 Россия

\*e-mail: evgenii1991.karasev@gmail.com

Поступила в редакцию 06.03.2018 г.

После доработки 12.06.2018 г.

Принята к публикации 19.06.2018 г.

Ризобии козлятника (*Neorhizobium galegae*) – удобная модель для изучения эволюции и видообразования симбиотических бактерий. Для этого вида ризобий выделяют два биотипа (bv. *orientalis*, bv. *officinalis*), каждый из которых образует N<sub>2</sub>-фиксирующие клубеньки с определенным видом козлятника (*Galega orientalis*, *G. officinalis*). Перекрестная инокуляция между ними приводит к образованию не фиксирующих азот клубеньков. По данным полногеномного секвенирования мы изучили нуклеотидный полиморфизм 11 штаммов *N. galegae*, выделенных из экосистем Северного Кавказа, где *G. orientalis* характеризуется гораздо более высоким разнообразием, чем *G. officinalis*. Низкий уровень различий по уровню полиморфизма в группе *sym*-генов по сравнению с “несимбиотическими” генами может быть связан с активным участием растений-хозяев в эволюции ризобий. Внутригенный полиморфизм у bv. *orientalis* оказался значительно выше, чем у bv. *officinalis*. Уровень полиморфизма “несимбиотических” генов по сравнению с функционально более однородными симбиотическими генами оказался ниже. Дивергенция генов азотфиксации (*nif/fix*) биотипов *N. galegae* более выражена, чем по генам клубенькообразования (*nod*). Эти факты указывают на ведущую роль хозяин-специфичной азотфиксации в эволюции изучаемого вида ризобий.

**Ключевые слова:** клубеньковые бактерии, *Neorhizobium galegae* (bv. *orientalis*, bv. *officinalis*), N<sub>2</sub>-фиксирующий симбиоз, нуклеотидный полиморфизм, геномный полиморфизм, северокавказский центр происхождения козлятника, дивергентная эволюция.

DOI: 10.1134/S0016675819020085

Высокая скорость эволюции симбиотических бактерий, с одной стороны, определяется отбором и дрейфом генов на стадии симбиоза с растением-хозяином, а с другой – пластичностью микробных геномов [1]. Для изучения закономерностей и механизмов эволюции симбиотических (*sym*) генов мы использовали в качестве модели клубеньковые бактерии *Neorhizobium galegae*, азотфиксирующие симбионты козлятника – рода многолетних травянистых бобовых, включающего два вида: козлятник восточный (*Galega orientalis*) и лекарственный (*G. officinalis*). Вид *N. galegae* разделяют на два биотипа – bv. *orientalis* и bv. *officinalis*, фиксирующие азот в симбиозе только с растениями “своего” вида, а при инокуляции ге-

терологичного хозяина образующих клубеньки, не способные фиксировать азот [2]. В связи с этим логично предположить, что дивергенция bv. *orientalis* и bv. *officinalis* по генам N<sub>2</sub>-фиксации (*nif/fix*) должна быть выражена сильнее, чем по генам образования клубеньков (*nod*). Для проверки этого предположения мы изучили нуклеотидный полиморфизм двух групп генов: симбиотические гены (*sym*-группа, включая гены клубенькообразования и азотфиксации) и группу генов домашнего хозяйства в качестве референсной группы. Группа *sym* включает гены, которые экспрессируются только при взаимодействии с хозяевами и локализованы на плазмиде. Гены второй груп-

**Таблица 1.** Сравнение нуклеотидного полиморфизма (*p*-distance) разных групп генов у двух биотипов *Neorhizobium galegae*

Биотип ризобий	Группы генов		<i>t</i> -Стьюдента (для сравнения групп генов)*
	симбиотически специализированные (плазмидные)	несимбиотические (хромосомные)	
<i>orientalis</i>	0.0041 ± 0.0003	0.0520 ± 0.0015	35.90
<i>officinalis</i>	0.0010 ± 0.0001	0.0056 ± 0.0004	11.16
<i>t</i> -Стьюдента (для сравнения биотипов)*	9.80	29.89	

\* Все различия достоверны при  $P_0 < 0.01$ .

пы (референс) отвечают за разнообразные клеточные функции (в основном это – хромосомные гены “домашнего хозяйства”) и специфически не связаны с симбиозом.

Мы секвенировали полные геномы 11 штаммов *Neorhizobium galegae* (6 – bv. *officinalis*, 5 – bv. *orientalis*). Эти штаммы выделены в Северокавказском регионе, в котором *G. orientalis* характеризуется гораздо большим морфологическим и эколого-генетическим разнообразием, чем *G. officinalis* (Северный Кавказ является центром происхождения для *G. orientalis* [3]). Геномы штаммов Ng37 (bv. *officinalis*) и Ng87 (bv. *orientalis*) секвенированы с помощью технологии PacBio. Последовательности этих штаммов использовали в качестве референсов. Остальные штаммы (Ng35, Ng46, Ng47, Ng58, Ng77, Ng110, Ng35\*, Ng77\*, Ng110\* [2, 3]) секвенировали с помощью технологии shotgun на приборе MiSeq Illumina. Сборку последовательностей проводили с помощью программы CLC Genomic Workbench. Данные, полученные с помощью технологии PacBio, собирали с помощью HGAP (Hierarchical Genome Assembly Process). Аннотацию геномов проводили с помощью сервера RAST (<http://rast.nmpdr.org/>). Выравнивание нуклеотидных последовательностей, вычисление нуклеотидного полиморфизма и стандартных ошибок осуществляли с помощью программы MEGA5.1.

Статистический анализ проводили с использованием конкатенатов всех генов в каждом из исследуемых участках. Последовательности выравнивали, а затем определяли величину нуклеотидного полиморфизма (*p*-distance) и его стандартные ошибки в программе MEGA5.1. Вероятность нулевых гипотез об отсутствии различий по уровню полиморфизма между биотипами ризобий или группами геном ( $P_0$ ) рассчитывали с помощью функции СТЬЮДЕНТ.РАСП.2Х (MS Excel), с помощью полученных в тесте Уэлша значений *t*-критерия и чисел степеней свободы (различия считали значимыми при  $P_0$  не более 0.05).

Для сравнительного анализа были выбраны три несцепленных участка бактериального гено-

ма – два хромосомных и плазмидный. Один из хромосомных участков имел длину 10 тпн и содержал 12 генов, а другой имел длину 11 тпн и содержал девять генов. Гены в этих участках выполняют разнородные функции “домашнего хозяйства”, включая образование клеточной стенки, контроль деления и метаболизма клеток. Симбиотический регион, расположенный на *Sym*-плазмиде, содержит 26 генов, функционирующих только в ассоциации с растением. Эти гены определяют два признака: образование клубеньков (*nod*) и фиксацию азота (*nif/fix*), т.е. они функционально более однородны, чем “несимбиотические” гены. Размер этого участка у изученных штаммов варьирует, составляя в среднем 32 тпн.

После выравнивания последовательностей для каждого из генов был проведен анализ нуклеотидного полиморфизма. Оказалось, что нуклеотидный полиморфизм как симбиотических, так и несимбиотических генов у bv. *orientalis* выше, чем у bv. *officinalis* (табл. 1; рис. 1, а, б). На филогенетических деревьях эти биотипы образуют два статистически различающихся (bootstrap 100%) кластера (данные не приводятся). Таким образом, наиболее разнообразному растению-хозяину соответствует наиболее разнообразный симбионт, что согласуется с ранее полученными результатами анализа геномных AFLP-фингерпринтов [2, 3].

“Несимбиотические” гены продемонстрировали более низкий уровень нуклеотидного полиморфизма, чем симбиотические гены (табл. 2). Среди несимбиотических генов наиболее консервативными оказались гены рибосомного протеина (S70EA) и протеина, связанного с делением *MraZ* [4]. Среди *sym*-генов самыми консервативными оказались общие *nod*-гены (*nodABC*) и структурные гены нитрогеназы *nifHDK*, которые кодируют наиболее консервативные компоненты симбиоза. Наибольший полиморфизм обнаружен в генах *fixB*, *fixC*, *fixX*, которые являются гомологами электрон-транспортной цепи митохондрий [5]. Высокий полиморфизм обнаружен в гене *nodU*,



**Таблица 2.** Коэффициенты вариации нуклеотидного полиморфизма (*p*-distance) разных групп генов у *Neorhizobium galegae*

Биотип ризобий	Группы генов		<i>t</i> -Стьюдента (для сравнения групп генов)
	симбиотически специализированные	несимбиотические	
<i>orientalis</i>	133.4 ± 18.2%	35.5 ± 5.5%	5.16**
<i>officinalis</i>	88.1 ± 12.2%	59.2 ± 9.1%	1.89
Сумма двух биотипов	186.2 ± 18.0%	95.1 ± 10.4%	4.37**
<i>t</i> -Стьюдента (для сравнения биотипов)	2.07*	2.22*	

Примечание. Различия достоверны при \*  $P_0 < 0.05$  или \*\*  $P_0 < 0.01$ .

кодирующем 6-О-карбамоилтрансферазу, модифицирующую Nod-фактор [6].

Важно отметить, что bv. *orientalis* превосходит bv. *officinalis* по размаху варьирования (коэффициентам вариации) уровней полиморфизма симбиотических генов, но уступает ему по размаху варьирования полиморфизма *sum*-генов (табл. 2). Данное явление может быть связано с разной экологической стратегией этих биотипов ризобий в Северокавказском регионе, который является центром происхождения и разнообразия именно для козлятника восточного [3]. В частности, можно предположить, что у симбионтов козлятника восточного (*G. orientalis*) взаимодействие с хозяевами занимает большую часть жизненного цикла, чем у симбионтов козлятника лекарственного (*G. officinalis*), распространение которого в Северокавказском регионе ограничено.

Крайне интересная тенденция прослеживается при анализе различий между bv. *orientalis* и bv. *officinalis* по разным группам генов: наибольшая дивергенция биотипов наблюдается по генам фиксации азота (*nif/fix*), тогда как по *nod*-генам различия между биотипами минимальные (рис. 1,  $\theta$ ). Эти данные согласуются с фенотипическими различиями биотипов, выявляемыми при перекрестной инокуляции, указывая на ключевую роль хозяин-специфичной N<sub>2</sub>-фиксации в дивергентной эволюции вида *N. galegae*. Ранее было показано, что для биотипов вида *Rhizobium leguminosarum* характерна значительная дивергенция по генам клубенькообразования, связанная с тем, что bv. *viciae* образует клубеньки на вике, горохе и чине, а bv. *trifolii* – на клевере, тогда как перекрестная инокуляция между ними не приводит к образованию клубеньков [7]. Четких различий этих биотипов по генам домашнего хозяйства выявлено не было [8]. Поэтому можно предположить, что генетические механизмы дивергентной эволюции у видов *R. leguminosarum* и *N. galegae* существенно различаются.

Работа поддержана грантом РНФ 14-26-00094П и проводилась с использованием оборудования ЦКП “Геномные технологии, протеомика и кле-

точная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ. Геномное секвенирование было выполнено в ЦКП “Геномика” СО РАН (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Проворов Н., Тихонович И., Андронов Е. и др. Генетические основы эволюции бактерий – симбионтов растений. СПб.: Информ-Навигатор, 2016.
2. Andronov E.E., Terefework Z., Roumiantseva M.L. 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. P. 1067–1074. doi 10.1128/AEM.69.2.1067-1074.2003
3. Osterman J., Chizhevskaya E.P., Andronov E.E. et al. *Galega orientalis* is more diverse than *Galega officinalis* in Caucasus – whole-genome AFLP analysis and phylogenetics of symbiosis-related genes // Mol. Ecol. 2011. V. 20. P. 4808–4821. doi 10.1111/j.1365-294X.2011.05291.x
4. Eraso J., Markillie L., Mitchell H. et al. The highly conserved MraZ protein is a transcriptional regulator in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 2014. V. 196(11). P. 2053–2066. doi 10.1128/JB.01370-13
5. Earl C., Ronson C., Ausubel F. Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* *fixA*, *fixB*, *fixC* and *fixX* genes // J. Bacteriol. 1987. V. 169(3). P. 1127–1136. doi 0021-9193/87/031127-10\$02.00/0
6. Jabbouri S., Fellay R., Talmont F. et al. Involvement of *nodS* in N-Methylation and *nodU* in 6-O-Carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod Factors // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 22968–22973.
7. Андронов Е.Е., Иголкина А.А., Кимеклис А.К. и др. Характеристика естественного отбора в популяциях клубеньковых бактерий (*Rhizobium leguminosarum*), взаимодействующих с различными видами растений-хозяев // Генетика. 2015. Т. 51. № 10. С. 1108–1116.
8. Kumar N., Lad G., Giuntini E. et al. Bacterial genospecies that are not ecologically coherent: population genomics of *Rhizobium leguminosarum* // Open Biol. 2015. V. 5:140133. doi 10.1098/rsob.140133

## Evolution of Goat's Rue Rhizobia (*Neorhizobium galegae*): An Analysis of the Polymorphism of the Nitrogen Fixation Genes and the Genes of Nodule Formation

E. S. Karasev<sup>a,\*</sup>, E. E. Andronov<sup>a,b,c</sup>, T. S. Aksenova<sup>a</sup>,  
E. P. Chizhevskaya<sup>a</sup>, A. E. Tupikin<sup>d</sup>, and N. A. Provorov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, 196608 Russia

<sup>b</sup>Dokuchaev's Soil Institute of Russian Science Academy, Moscow, 119017 Russia

<sup>c</sup>Department of Genetics and Biotechnology Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia

<sup>d</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine Siberian Branch  
Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

\*e-mail: evgenii1991.karasev@gmail.com

The goat's rue rhizobia (*Neorhizobium galegae*) represent a convenient model for studying the evolution and speciation in symbiotic bacteria. This rhizobia species is composed of two biovars (bv. *orientalis*, bv. *officinalis*) forming N<sub>2</sub>-fixing nodules with different species of goat's rue (*Galega orientalis*, *G. officinalis*) whereas the cross-inoculation leads to the formation of nodules lacking nitrogenase activity. We studied the nucleotide polymorphism of 11 strains of *N. galegae* isolated from the North Caucasus ecosystems, where *G. orientalis* has a much higher diversity than *G. officinalis*. It turned out that the intragenic polymorphism of bv. *orientalis* is significantly higher than of bv. *officinalis*, indicating the leading role of the host plant in the evolution of the species *N. galegae*. This conclusion is consistent with a lower level of polymorphism of "non-symbiotic" genes in comparison with functionally more homogeneous symbiotic genes. With the active participation of host plants in the evolution of rhizobia, a lower level of differences in the level of polymorphism in the symgene group can also be associated with "non-symbiotic" genes. The divergence of the biotypes of *N. galegae* is more pronounced in the nitrogen fixation genes (*nif/fix*) than in the nodule formation genes (*nod*), indicating the leading role of host-specific nitrogen fixation in the evolution of the rhizobium species.

**Keywords:** root bacteria, *Neorhizobium galegae* (bv. *orientalis*, bv. *officinalis*), N<sub>2</sub>-fixing symbiosis, nucleotide polymorphism, genome polymorphism, North Caucasus Centre of origin for goat's rue, divergent evolution.