



# БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



## ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ ПОДХОДОВ К ГЕНОСИСТЕМАТИКЕ ПРОКАРИОТ В ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ РИЗОСФЕРНОЙ МИКРОФЛОРЫ

Щеголев С.Ю., Бурьгин Г.Л.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН  
410049, Саратов, просп. Энтузиастов 13, email: [shegolev\\_s@ibppm.ru](mailto:shegolev_s@ibppm.ru)

### Резюме

Проведенные нами исследования и литературные данные демонстрируют неоднозначность видовой идентификации изолятов с применением традиционных филогенетических маркеров – последовательностей ДНК генов 16S рРНК и интергенного спейсера ITS1. Подобная неоднозначность отмечена также при использовании последовательностей ДНК групп генов, отличающихся в подавляющем большинстве независимой эволюцией и собственной эволюционной историей. Применение тестов, рекомендуемых в рамках геномной таксономии микробов с привлечением результатов полногеномного секвенирования ДНК штаммов, показало зависимость оценок их систематического положения от типа используемых полногеномных данных, относящихся к базовой и подвижной составляющим пангенома. К этому добавляется ограниченность набора расшифрованных референтных геномов для достаточно широкого списка представителей различных таксономических групп, из-за чего видовая идентификация изолятов оказывается, как минимум, неполной. Обсуждаемые наблюдения иллюстрируют отсутствие единой генетической системы видовой идентификации изолятов (как и самой видовой классификации прокариот), что делает более оправданным применение в их систематике полифазного подхода с сочетанием традиционных молекулярно-генетических тестов и соответствующих наборов фенотипических признаков исследуемых штаммов. Следует учитывать, что указанные тесты оперируют, как правило, филогенетическими маркерами из базовой составляющей пангенома и отражают лишь часть эволюционной истории организмов, ограниченную во времени в той или иной степени без учета горизонтального переноса генов. Последний может играть определяющую роль в приобретении прокариотами разнообразных признаков, обеспечивающих их существование в конкретных экологических нишах и оказывающих решающее влияние на их видовую идентификацию.

**Ключевые слова:** Прокариоты, геносистематика, ризосферная микрофлора, таксономические исследования, полногеномное секвенирование ДНК, геномная таксономия микробов, полифазный подход.

**Цитирование:** Щеголев С.Ю., Бурьгин Г.Л. Опыт применения современных подходов к геносистематике прокариот в таксономических исследованиях ризосферной микрофлоры. *Биомика*. 2018. Т. 10(2). С. 157-161. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-20

## APPLICATION OF MODERN APPROACHES TO GENETIC SYSTEMATICS OF PROKARYOTES IN TAXONOMIC STUDIES OF RHIZOSPHERE MICROFLORA

Shchyogolev S.Yu., Burygin G.L.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences  
13 Prospekt Entuziastov, 410049, Saratov, Russia. Email: [shegolev\\_s@ibppm.ru](mailto:shegolev_s@ibppm.ru)

### Resume

Our studies and others' reveal ambiguity in the species identification of isolates with traditional phylogenetic markers – 16S rRNA gene DNA sequence and the intergenic spacer ITS1. This ambiguity is also observed in the use of DNA sequences of gene sets, most of which have evolved independently and have their own evolutionary history. Applying the tests recommended within the genomic taxonomy of microbes, alongside whole genome DNA sequencing, has shown that evaluations of strains' taxonomic positions depend on the type

of whole genome data used, as related to the core and variable pangenome component. In addition, the number of deciphered reference genomes is limited for a sufficiently large number of taxonomic group members, making species identification incomplete at minimum. The discussed observations demonstrate the lack of a unified genetic system for species identification of isolates (as well as for prokaryote species classification itself), which justifies the use of the polyphasic approach in their systematics, combining traditional molecular genetic tests with phenotypic traits of strains. These tests, as a rule, use phylogenetic markers from the core pangenome component. They reflect only part of the evolution history of the organisms (somewhat limited in time), without allowance for horizontal gene transfer. The latter can be decisive in the acquisition of various traits by prokaryotes, which help them live in specific ecological niches and are crucial to species identification.

**Keywords:** prokaryotes, genetic systematics, rhizosphere microflora, taxonomic studies, whole genome DNA sequencing, genomic taxonomy of microbes, microbial genomic taxonomy, polyphasic approach.

**Citation:** Shchyogolev S.Yu., Burygin G.L. Application of modern approaches to genetic systematics of prokaryotes in taxonomic studies of rhizosphere microflora. *Biomcs.* 2018. V.10(2). P.157-161. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-20 [In Russian]

Публикации последних лет по систематике прокариот [Oren, Garrity, 2014; Thompson et al., 2013], сравнительной геномике и биоинформатике [Кунин Коопин), 2014], а также наш опыт таксономических исследований представителей ризосферной микрофлоры [Бурьгин и др. (Burygin), 2017; Щеголев (Shchyogolev), 2018], демонстрируют неоднозначность видовой идентификации изолятов с применением традиционных филогенетических маркеров – последовательностей ДНК генов 16S рРНК и интергенного спейсера ITS1, обусловленную как консервативностью генов 16S рРНК, так и внутригеномной гетерогенностью рибосомного оперона *rrn*, связанной с гомологичной рекомбинацией ДНК и горизонтальным переносом генов (ГПГ) [Maslunka et al., 2015; Maroniche et al., 2017]. Подобной неоднозначности (в дополнение к эффектам ГПГ) следует ожидать также при использовании последовательностей ДНК не только тех или иных отдельных генов, но и наборов таких генов, поскольку их подавляющее большинство (за исключением относительно небольшого числа генов информационного типа) отличается, строго говоря, независимой эволюцией и собственной эволюционной историей [Кунин (Koonin), 2012].

Смягчение этих проблем связывают с развитием геномной таксономии микробов на основе данных полногеномного секвенирования ДНК штаммов с использованием соответствующего набора тестов: ANI, AAI, GGDC, сигнатур Карлина [Thompson et al., 2013]. В работе [Щеголев (Shchyogolev), 2018] приведены результаты их применения в таксономических исследованиях ассоциативных для растений бактерий рода *Azospirillum* на всем доступном во время проведения исследований комплексе биоинформатических данных для бактерий этого рода, показавшие зависимость оценок систематического положения штаммов от типа используемых полногеномных данных, относящихся к базовой и подвижной составляющим пангенома. К этому

добавляется ограниченность набора расшифрованных референтных геномов для достаточно широкого списка представителей различных таксономических групп, из-за чего видовая идентификация изолятов оказывается пока, как минимум, неполной.

В настоящей публикации мы демонстрируем результаты распространения таких оценок на представителей рода *Ochrobactrum*, обнаруживаемых в широком спектре экологических ниш, включая ризосферу растений, образцы почв в промышленных зонах, биологические жидкости животных и др. С применением технологии 16S рРНК и полифазного подхода [Oren, Garrity, 2014] в работе [Бурьгин и др. (Burygin et al.), 2017] установлена таксономическая близость изолята IPA7.2 из ризосферы картофеля (*Solanum tuberosum* L.) к типовому штамму *O. lupini* LUP21, способному реинфицировать бобовые растения рода *Lupinus* и несущему гены нодуляции и азотфиксации (*nodD* и *nifH*), полученные им от ризобийных видов посредством ГПГ [Trujillo et al., 2005]. Однако тест MLSA (рис.1) с использованием набора последовательностей ДНК шести генов, кодирующих конститутивные бактериальные ферменты (*gap*, *rpoB*, *dnaK*, *trpE*, *aroC*, *recA*), полученных по результатам полногеномного секвенирования ДНК штамма IPA7.2, проведенного сотрудниками лаборатории молекулярной биологии Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ\\_MOECS000000000.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_MOECS000000000.1)), показал его близость также и к типовому штамму *O. cytisi* LMG 22713. Данный штамм, поименованный вначале его авторами как *O. cytisi* ESC1, был обнаружен [Бурьгин и др. (Burygin et al.), 2017] в составе таксономической группы *O. anthropi*, объединяющей штамм IPA7.2 с представителями 10 видов рода *Ochrobactrum*, практически неразличимых в тесте 16S рРНК на уровне «золотого стандарта» внутривидовой идентичности последовательностей (>97%) ([old.ezbiocloud.net/eztaxon/taxonomic\\_group](http://old.ezbiocloud.net/eztaxon/taxonomic_group)).

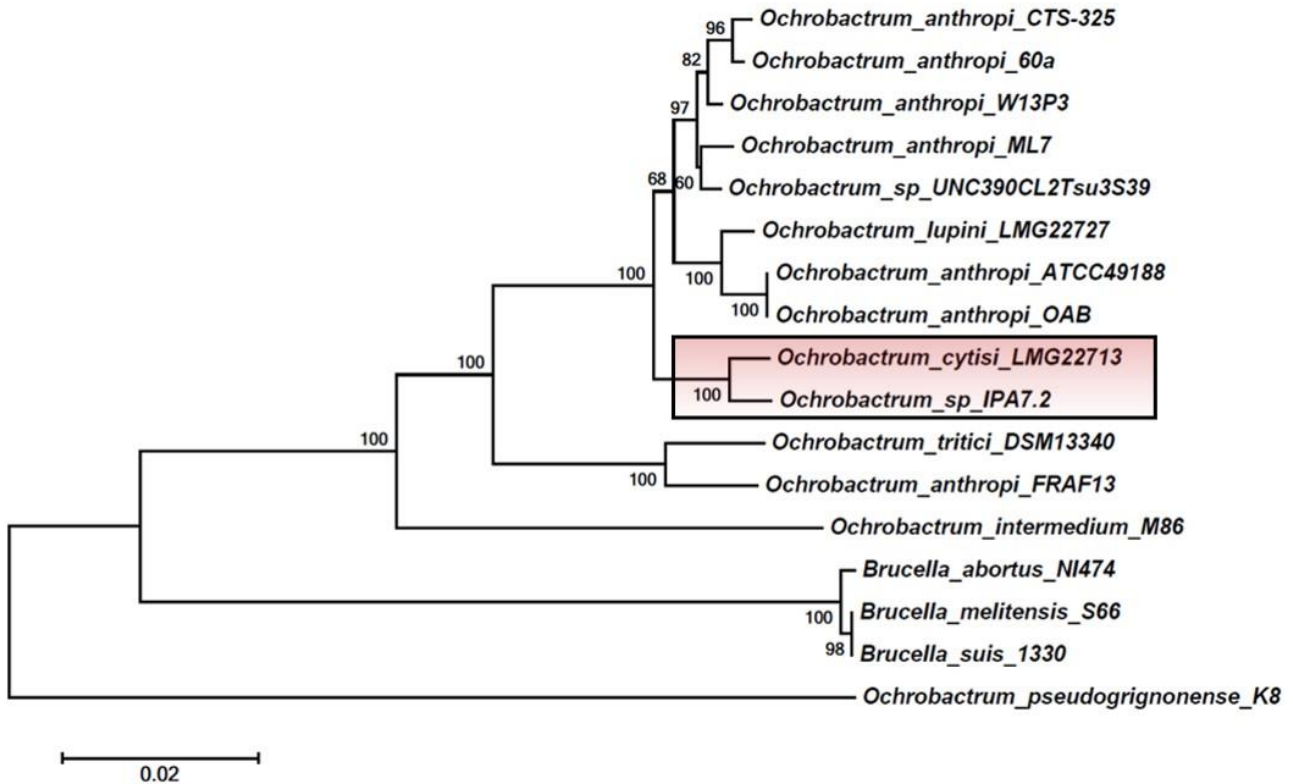


Рис. 1. Филогенетическое древо (NJ) по результатам мультилокусного анализа нуклеотидных последовательностей (MLSA) представителей родов *Ochrobactrum*, *Brucella* и штамма IPA7.2. Цифры около узлов – значения их статистической поддержки в циклах бутстрепинга.

Fig. 1. The phylogenetic tree (NJ) resulted from the multilocus nucleotide sequence analysis (MLSA) for the genus *Ochrobactrum* and *Brucella* representatives with the strain IPA7.2. The digital symbols near nodes show their statistical support in bootstrap iterations.

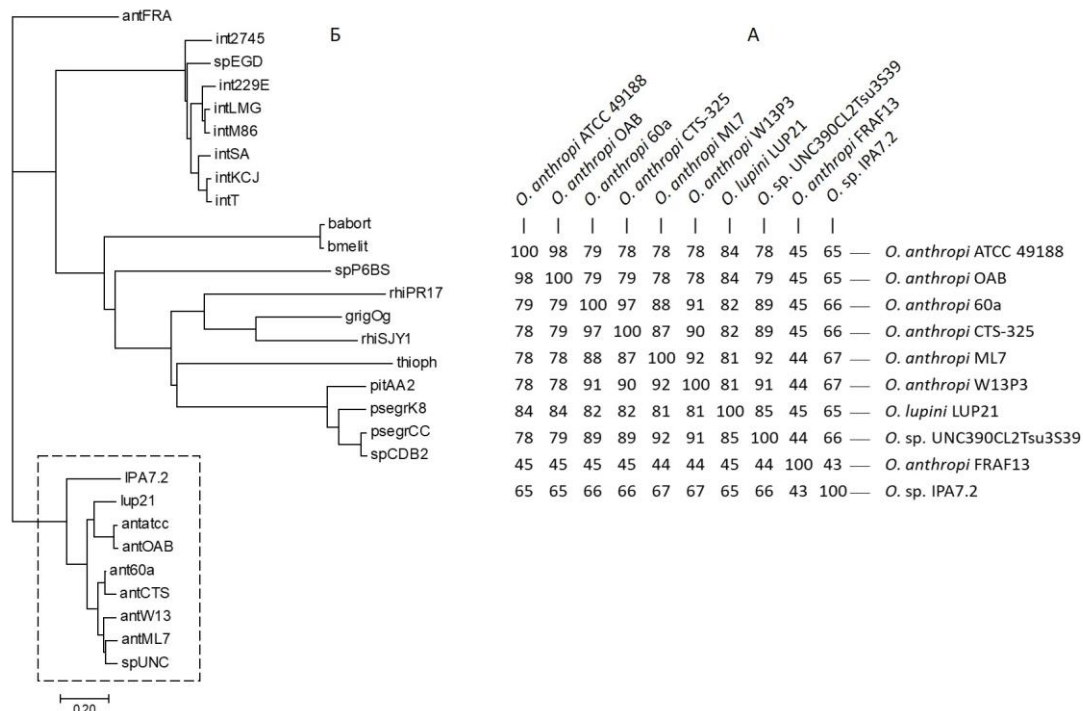


Рис. 2. Фрагмент матрицы попарных сравнений (A) и филограмма видов *Ochrobactrum*, *Brucella* и штамма IPA7.2 по методу NJ (Б) в тесте GGDC (формула 2).

Fig. 2. A fragment of the pairwise comparison matrix (A) and the NJ phylogram of the genus *Ochrobactrum* and *Brucella* species with the strain IPA7.2 in GGDC test (formula 2).

Применение отмеченных выше тестов ANI, AAI, GGDC и сигнатур Карлина ко всем результатам полногеномного секвенирования ДНК 29 штаммов рода *Ochrobactrum*, доступным в базах данных во время проведения исследований (2017 год), подтвердило основные выводы работы [Щеголев (Shchyogolev), 2018], полученные со штаммами рода *Azospirillum*. При этом оба варианта гибридизации ДНК-ДНК *in silico* в тесте GGDC определителя эволюционных расстояний между геномами (ggdc.dsmz.de/ggdc.php#) – обозначенные разработчиками как «формула 1» и «формула 2» – дали результаты, согласующиеся между собой и с тестом ANI. В варианте формулы 1 расчет проводится по длинам пар сегментов с высоким счетом, деленным на общую длину сегментов (полный геном). В то время как в варианте формулы 2 – по значениям идентичности, деленным на длину пар сегментов с высоким счетом (базовая часть пангенома). Для примера на рисунке 2 представлены результаты использования теста GGDC (формула 2), показавшие, что изолят IPA7.2 образует отдельную

ветвь в составе монофилетической группы, объединяющей виды *O. lupini* и *O. anthropi*, также входящие в состав таксономической группы *O. anthropi* (см. выше), однако (в отличие от 16S рРНК [Бурыгин и др. (Burygin et al.), 2017]) имеет с ними межвидовые значения попарной гибридизации ДНК-ДНК штаммов (<70%). Полученные результаты иллюстрируют условность оценок таксономического положения прокариот с рассмотренными нами тестами и фактическое отсутствие единой генетической системы видовой идентификации изолятов (как, вероятно, и самой видовой классификации прокариот), что отражает схема, приведенная на рисунке 3. Отметим, что на ней представлена лишь часть проблем геносистематики прокариот, связанная с использованием филогенетических маркеров в основном из базовой составляющей пангенома и не рассматривающая детально эффектов ГПГ, обсуждение эволюционных аспектов которого можно найти в фундаментальных исследованиях, суммированных в книге [Кунин, 2014 / Koonin, 2012].

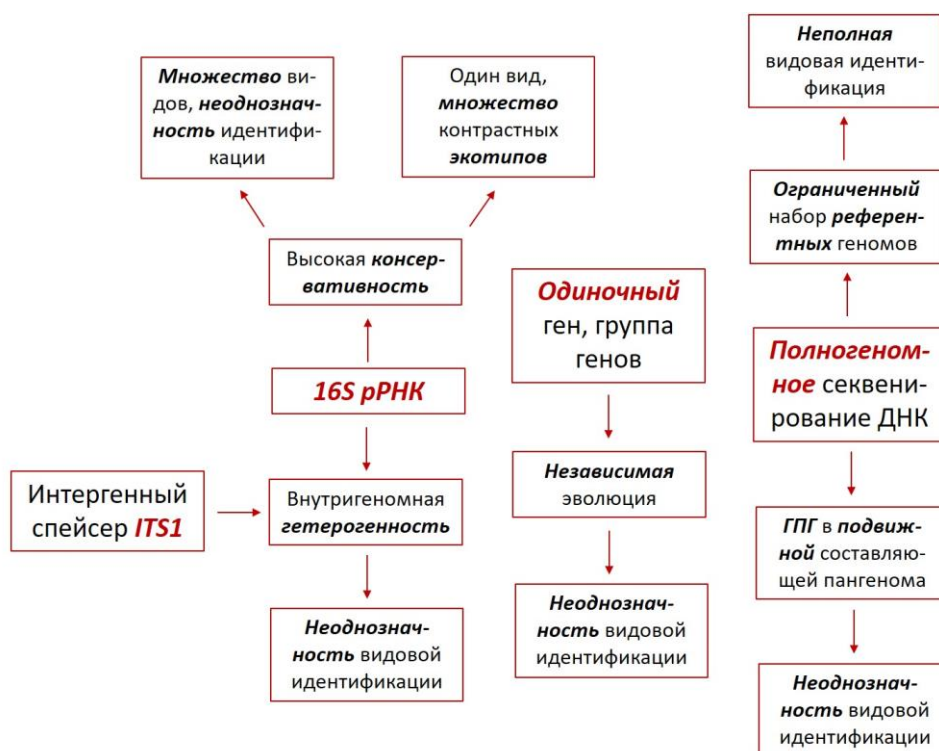


Рис. 3. Проблемы геносистематики прокариот. Пояснения в тексте.  
 Fig. 3. The problems of prokaryotes systematics. See the article for comments.

Таким образом, более оправданным следует считать применение полифазного подхода с сочетанием традиционных молекулярно-генетических тестов и соответствующих наборов фенотипических признаков исследуемых штаммов [Oren, Garrity, 2014; Бурыгин и др. (Burygin et al.), 2017]. Целесообразно учесть, что указанные тесты отражают лишь «древовидную» часть эволюционной истории организмов [Кунин (Koonin), 2012], ограниченную во времени в той или иной степени без

учета ГПГ. К примеру, для бактерий рода *Azospirillum* в работе [Wisniewski-Dye et al., 2011] показано, что примерно половина их геномов может состоять из генов, кодирующих признаки, определяющие их ассоциативные взаимодействия с растениями, привнесенных горизонтально от соответствующих наземных бактерий. При том что исторически на уровне базовой составляющей пангенома (16S рРНК) азоспириллы были и остаются представителями водной микрофлоры (www.arb-

silva.de/projects/living-tree), перебравшимися на сушу примерно 400 млн. лет тому назад, почти одновременно с появлением на ней сосудистых растений [Wisniewski-Dye et al., 2011]. Так что ГПГ может играть определяющую роль в приобретении прокариотами разнообразных признаков, обеспечивающих их существование в конкретных экологических нишах [Wiedenbeck, Cohan, 2011] и оказывающих решающее влияние на их видовую идентификацию.

#### Литература

1. Бурьгин Г.Л., Попова И.А., Каргаполова К.Ю., Ткаченко О.В., Матора Л.Ю., Щеголев С.Ю. Бактериальный изолят из ризосферы картофеля (*Solanum tuberosum* L.), идентифицированный как *Ochrobactrum lupini* IPA7.2. *Сельхоз. биол.* 2017. Т. 52, №1. С. 105-115.
2. Кунин Е.В. Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции. М.: ЗАО Изд-во Центрполиграф, 2014. 527 с.
3. Щеголев С.Ю. О систематике прокариот: актуальные проблемы и пути выхода из кризиса. *Вестник физико-химической биологии и биотехнологии.* 2018. Т. 14, № 1. С. 5-14.
4. Maroniche G.A., García J.E., Salcedo F., Creus C.M. Molecular identification of *Azospirillum* spp.: Limitations of 16S rRNA and qualities of *rpoD* as genetic markers. *Microbiol. Res.* 2017. V. 195. P. 1-10. doi: 10.1016/j.micres.2016.11.009
5. Maslunka C., Gürtler V., Seviour R.J. The impact of horizontal gene transfer on targeting the internal transcribed spacer region (ITS) to identify *Acinetobacter junii* strains. *J. Appl. Microbiol.* 2015. V. 118. P. 1435-1443. doi: 10.1111/jam.12800
6. Oren A., Garrity G.M. Then and now: a systematic review of the systematics of prokaryotes in the last 80 years. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2014. V. 106. P. 43-56. doi: 10.1007/s10482-013-0084-1
7. Thompson C.C., Chimento L., Edwards R.A., Swings J., Stackebrandt E., Thompson F.L. Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics.* 2013. V. 14, No. 913. P. 1-8. doi: 10.1186/1471-2164-14-913
8. Trujillo M.E., Willems A., Abril A., Planchuelo A.-M., Rivas R., Ludeña D., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Velázquez E. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl. Environ. Microb.* 2005. V. 71, No. 3. P. 1318-1327. doi: 10.1128/AEM.71.3.1318-1327.2005
9. Wiedenbeck J., Cohan F.M. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011. V. 35. P. 957-976. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00292.x
10. Wisniewski-Dye F., Borziak K., Khalsa-Moyers G., Alexandre G., Sukharnikov L.O., Wuichet K., Hurst G.B., McDonald W. H., Robertson J.S., Barbe V., Calteau A., Rouy Z., Mangenot S., Prigent-Combaret C., Normand P., Boyer M., Siguier P., Dessaux Y., Elmerich C., Con-demine G., Krishnen G., Kennedy I., Paterson

A.H., Gonzalez V., Mavingui P., Zhulin I.B. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. *PLoS Genetics.* 2011. V. 7. No. 12 e1002430. P. 1-13. doi: 10.1371/journal.pgen.1002430

#### References

1. Burygin G.L., Popova I.A., Kargapolova K.Yu., Tkachenko O.V., Matora L.Yu., Shchyogolev S.Yu. A bacterial isolate from the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.) identified as *Ochrobactrum lupini* IPA7.2. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*. 2017. V. 52, № 1. P. 105-115. doi: 10.15389/agrobology.2017.1.105rus (In Russian).
2. Koonin E.V. The logic of chance: the nature and origin of biological evolution. New Jersey: Pearson Education, Inc., 2012. 516 p.
3. Maroniche G.A., García J.E., Salcedo F., Creus C.M. Molecular identification of *Azospirillum* spp.: Limitations of 16S rRNA and qualities of *rpoD* as genetic markers. *Microbiol. Res.* 2017. V. 195. P. 1-10. doi: 10.1016/j.micres.2016.11.009
4. Maslunka C., Gürtler V., Seviour R.J. The impact of horizontal gene transfer on targeting the internal transcribed spacer region (ITS) to identify *Acinetobacter junii* strains. *J. Appl. Microbiol.* 2015. V. 118. P. 1435-1443. doi: 10.1111/jam.12800
5. Oren A., Garrity G.M. Then and now: a systematic review of the systematics of prokaryotes in the last 80 years. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2014. V. 106. P. 43-56. doi: 10.1007/s10482-013-0084-1
6. Shchyogolev S.Yu. On prokaryote systematics: topical problems and ways out of the crisis. *Yu.A. Ovchinnikov bulletin of biotechnology and physical and chemical biology.* 2018. V. 14, No. 1. P. 5-14. (In Russian).
7. Thompson C.C., Chimento L., Edwards R.A., Swings J., Stackebrandt E., Thompson F.L. Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics.* 2013. V. 14, No. 913. P. 1-8. doi: 10.1186/1471-2164-14-913
8. Trujillo M.E., Willems A., Abril A., Planchuelo A.-M., Rivas R., Ludeña D., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Velázquez E. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl. Environ. Microb.* 2005. V. 71, No. 3. P. 1318-1327. doi: 10.1128/AEM.71.3.1318-1327.2005
9. Wiedenbeck J., Cohan F.M. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011. V. 35. P. 957-976. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00292.x
10. Wisniewski-Dye F., Borziak K., Khalsa-Moyers G., Alexandre G., Sukharnikov L.O., Wuichet K., Hurst G.B., McDonald W. H., Robertson J.S., Barbe V., Calteau A., Rouy Z., Mangenot S., Prigent-Combaret C., Normand P., Boyer M., Siguier P., Dessaux Y., Elmerich C., Con-demine G., Krishnen G., Kennedy I., Paterson