

## ПОЛИМОРФИЗМ И ЭВОЛЮЦИЯ РИЗОБИЙ КОЗЛЯТНИКА (*NEORHIZOBIUM GALEGAE*)

Е.С. Карасев<sup>1</sup>, Е.Е. Андронов<sup>1,2,3</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, e-mail: evgenii1991.karasev@gmail.com

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

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург 199034

<sup>4</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090

### Резюме

Ризобии козлятника (*Neorhizobium galegae*) – удобная модель для изучения эволюции и видообразования у симбиотических бактерий. Этот вид ризобий состоит из двух биотипов (bv. *orientalis*, bv. *officinalis*), которые образуют N<sub>2</sub>-фиксирующие клубеньки с разными видами козлятника (*Galega orientalis*, *G. officinalis*), тогда как перекрестная инокуляция между ними приводит к образованию клубеньков, лишенных нитрогеназной активности. Мы изучили нуклеотидный полиморфизм 11 штаммов *N. galegae*, выделенных из экосистем Северного Кавказа, где *G. orientalis* характеризуется гораздо более высоким разнообразием, чем *G. officinalis*. Оказалось, что как для симбиотически специализированных плазмидных *sym*-генов, контролирующих образование клубеньков (*nod*) и N<sub>2</sub>-фиксацию (*nif/fix*), так и для симбиотически неспециализированных хромосомных генов, кодирующих разнообразные клеточные функции, полиморфизм у bv. *orientalis* выше, чем у bv. *officinalis*, что указывает на ведущую роль растений-хозяев в эволюции этих симбионтов. Дивергенция bv. *orientalis* и bv. *officinalis* по *nif/fix*-генам выражена сильнее, чем по *nod*-генам и по “несимбиотическим” генам, указывая на ключевую роль хозяин-специфичной N<sub>2</sub>-фиксации в эволюции *N. galegae*.

**Ключевые слова:** клубеньковые бактерии; *Neorhizobium galegae* (bv. *orientalis*, bv. *officinalis*); нуклеотидный полиморфизм; дивергентная эволюция; коровые и акцессорные части генома.

**Цитирование:** Карасев Е.С., Андронов Е.Е., Чижевская Е.П., Тупикин А.Е., Проворов Н.А. Полиморфизм и эволюция ризобий козлятника (*Neorhizobium galegae*). *Биомика*. 2018. Т.10(4). С. 327-331. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-41

## ANALYSIS OF POLYMORPHISM IN THE GENES CONTROLLING NITROGEN FIXATION AND NODULATION FOR STUDYING THE EVOLUTION OF GOAT'S RUE RHIZOBIA (*NEORHIZOBIUM GALEGAE*)

Karasev E.S.<sup>1</sup>, Andronov E.E.<sup>1,2,3</sup>, Chizhevskaya E.P.<sup>1</sup>, Tupikin A.E.<sup>4</sup>, Provorov N.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russia Reserch Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, 196608, e-mail: evgenii1991.karasev@gmail.com

<sup>2</sup>Dokuchaev's Soil Institute of RAS, Moscow, 119017

<sup>3</sup>Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034

<sup>4</sup>Institute of Chemical Biology and fundamental medicine SO RAS, Novosibirsk, 630090

### Resume

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 between these legume plants leads to the formation of nodules that are devoid

of 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*. At the same time, differences in the level of polymorphism are higher for *sym*-genes than for functionally more heterogeneous "non-symbiotic" genes, which may be due to the multidirectional selection induced by host plants in the analyzed *nod*- and *nif/fix*-genes. The divergence between bv. *orientalis* and bv. *officinalis* for *nif/fix*-genes is more pronounced than in *nod*-genes and in "non-symbiotic" genes, indicating the key role of host-specific N<sub>2</sub>-fixation in the evolution of *N. galegae*.

**Keywords:** nodule bacteria; *Neorhizobium galegae* (bv. *orientalis*, bv. *officinalis*); nucleotide polymorphism; divergent evolution; core and accessor parts of genome.

**Citation:** Karasev E.S., Andronov E.E., Chizhevskaya E.P., Tupikin A.E., Provorov N.A. Analysis of polymorphism in the genes controlling nitrogen fixation and nodulation for studying the evolution of goat's rue rhizobia (*Neorhizobium galegae*). *Biomics*. 2018. V.10(4). P. 327-331. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-41 (In Russian)

Симбиотические бактерии характеризуются высокой скоростью эволюции, индуцируемой растениями-хозяевами и определяющей пластичность микробных геномов. Их эволюция приводит к формированию кластеров симбиотических генов, которые наиболее подробно изучены у клубеньковых бактерий (ризобий) [Проворов и др. (Provorov et al.) 2016]. 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 2 биотипа – bv. *orientalis* и bv. *officinalis*, фиксирующие азот в симбиозе только с растениями "своего" вида, а при инокуляции гетерологичного хозяина образующих недоразвитые клубеньки, лишённые нитрогеназной активности [Andronov et al., 2003]. В связи с этим, логично предположить, что дивергенция bv. *orientalis* и bv. *officinalis* по генам N<sub>2</sub>-фиксации (*nif/fix*) выражена сильнее, чем по генам образования клубеньков (*nod*).

Для проверки этого предположения мы изучили нуклеотидный полиморфизм двух групп генов: 1) специфически участвующих в симбиозе и экспрессирующихся только при взаимодействии с хозяевами *sym*-генов (входят в состав акцессорной части генома, имеют внехромосомную локализацию); 2) не связанных специфически с симбиозом генов, кодирующих разнообразные клеточные функции (входят в состав корового генома, расположены в хромосоме).

Для сравнительного анализа были выбраны три несцепленных участка бактериального генома – два хромосомных и плазмидный. Гены в участках хромосомы не являются специфичными для симбиоза и выполняют разнородные функции. Симбиотический регион, расположенный на *Sym*-плазмиде, содержит гены, функционирующие только при взаимодействии с хозяевами. Эти гены определяют два признака: образование клубеньков (*nod*) и фиксацию азота (*nif/fix*), то есть они функционально более однородны, чем "несимбиотические" гены.

Таблица 1.

Сравнение нуклеотидного полиморфизма (p-distance) разных групп генов у двух биотипов *Neorhizobium galegae*  
Table 1. The comparison of nucleotide polymorphism (p-distance) of different gene groups in two biovars of *Neorhizobium galegae*

Биотипы ризобий Rhizobial biovars	Группы генов / Gene groups		t-Стюдента (для сравнения групп генов)* t-Student (for comparison of gene groups)*
	Симбиотически специализированные (плазмидные) Symbiologically specialized (plasmid)	Несимбиотические (хромосомные) Non-symbiotic (chromosomal)	
<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
t-Стюдента (для сравнения биотипов)* t-Student (for comparison of biovars)*	9,80	29,89	

\*Все различия достоверны при P<sub>0</sub> < 0,01

\*All differences are significant for P<sub>0</sub> < 0.01

Ризобии козлятника *Neorhizobium galegae*

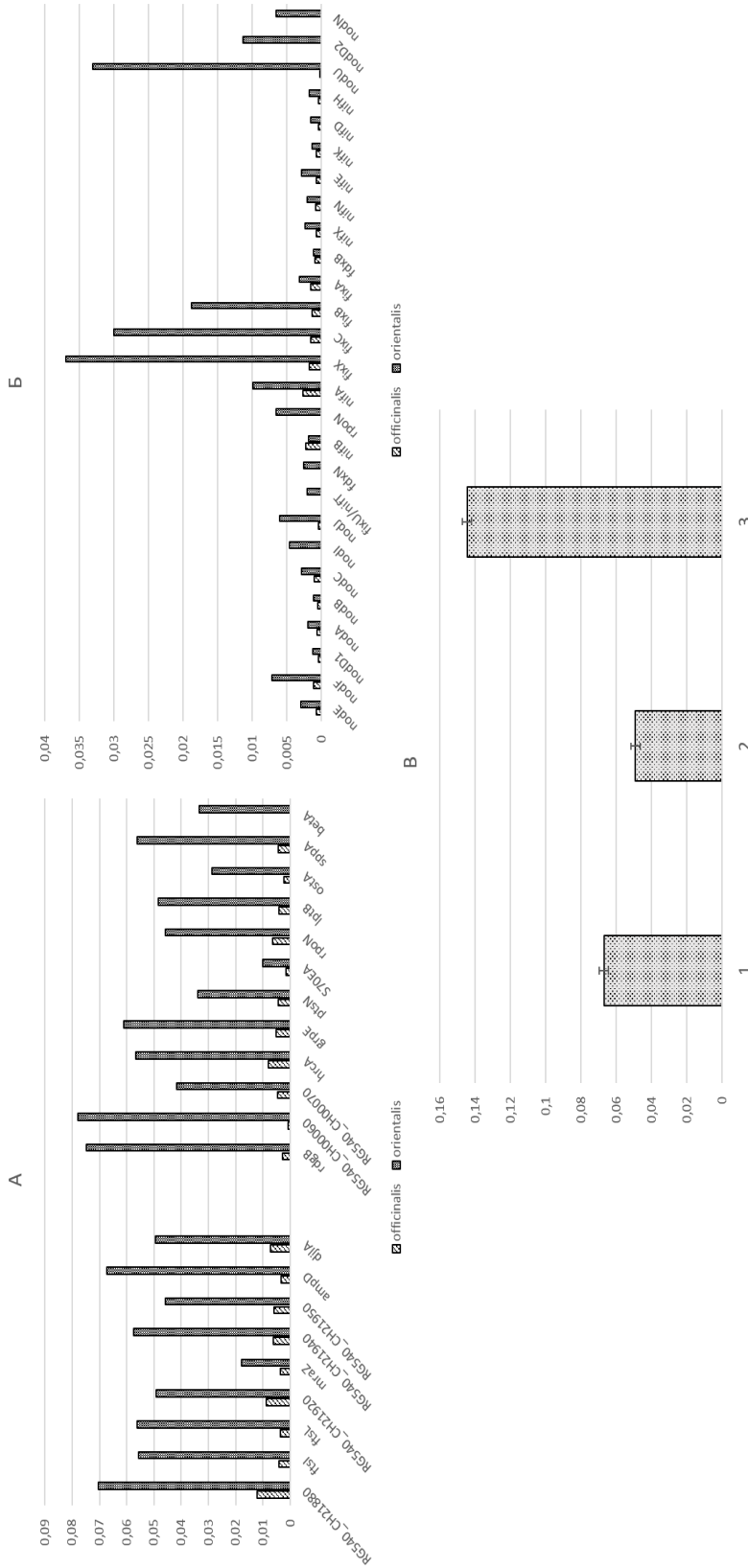


Рисунок 1. Сравнительный анализ нуклеотидного полиморфизма (p-distance) симбиотических и несимбиотических генов ризобий козлятника *Neorhizobium galegae*. А – несимбиотические (хромосомные) гены. Б – симбиотические (плазмидные) гены. В – дивергенция биотипов ризобий козлятника (bv. *orientalis* и bv. *officinalis*) по величине p-distance для разных групп генов (1 – несимбиотические, 2 – гены образования клубеньков, 3 – гены N<sub>2</sub>-фиксации).

Figure 1. The nucleotide polymorphism (p-distance) comparative analysis of symbiotic and non-symbiotic genes of goat's rhizobium *Neorhizobium galegae*. А - non-symbiotic (chromosomal) genes. В - symbiotic (plasmid) genes. С - the biotype divergence of goat's rhizobium (bv. *orientalis* and bv. *officinalis*) in p-distance for different groups of genes (1 - non-symbiotic, 2 - nodule formation genes, 3 - N<sub>2</sub>-fixation genes).

В ходе анализа было показано, что нуклеотидный полиморфизм как симбиотических, так и несимбиотических генов у *bv. orientalis* выше, чем у *bv. officinalis* (табл. 1; рис. 1А, 1Б). На филогенетических деревьях эти биотипы образуют два кластера (данные не приводятся). Таким образом наиболее разнообразному растению-хозяину соответствует наиболее разнообразный симбионт, что согласуется с ранее полученными результатами анализа геномных AFLP-фингерпринтов [Andronov et al., 2003; Osterman et al., 2011].

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 минимальные (рис. 1В). Эти данные согласуются с фенотипическими различиями биотипов, выявляемыми при перекрестной инокуляции, указывая на ключевую роль хозяин-специфичной азотфиксации в дивергентной эволюции вида *N. galegae*. Ранее было показано, что для биотипов вида *Rhizobium leguminosarum* характерна глубокая 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 [Андронов и др. (Andronov et al.), 2015]. Четких различий этих биотипов по генам коровой части генома выявлено не было [Kumar et al., 2015]. Можно предположить, что генетические механизмы дивергентной эволюции у видов *R. leguminosarum* и *N. galegae* существенно различаются.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-26-00094П и проводилась с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Геномное секвенирование было выполнено в ЦКП "Геномика" СО РАН (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

#### Литература

1. Андронов Е.Е., Иголкина А.А., Кимеклис А.К., Воробьев Н.И., Проворов Н.А. Характеристика естественного отбора в популяциях клубеньковых бактерий (*Rhizobium leguminosarum*), взаимодействующих с различными видами растений-хозяев. *Генетика*. 2015. Т. 51(10). С.1108–1116. doi: 10.7868/S0016675815100021
2. Проворов Н., Тихонович И., Андронов Е.Е. и др. Генетические основы эволюции бактерий – симбионтов растений. СПб: изд-во Информ-Навигатор, 2016.
3. Andronov E.E., Terefework Z., Roumiantseva M.L., Dzyubenko N.I., Onichtchouk O.P., Kurchak O.N., Dresler-Nurmi A., Young J.P.W., Simarov B.V., Lindström K. Symbiotic and genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolates collected from the *Galega orientalis* gene center in the Caucasus. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. V. 69, P. 1067-1074. doi: 10.1128/AEM.69.2.1067-1074.2003
4. Kumar N., Lad G., Giuntini E., Kaye M.E., Udomwong P., Shamsani N.J., Young J.P.W., Bailly X. Bacterial genospecies that are not ecologically coherent: population genomics of *Rhizobium leguminosarum*. *Open Biol.* 2015.V. 5:140133. doi: 10.1098/rsob.140133
5. Osterman J., Chizhevskaya E.P., Andronov E.E., Fewer D.P., Terefework Z., Roumiantseva M.L., Onichtchouk O.P., Dresler-Nurmi A., Simarov B.V., Dzyubenko N.I., Lindström K. *Galega orientalis* is more diverse than *Galega officinalis* in Caucasus—whole-genome AFLP analysis and phylogenetics of symbiosis-related genes. *Molecular Ecology*. 2011. V.20. P. 4808-4821. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05291.x

#### References

1. Andronov E.E., Igoalkina A.A., Kimeklis A.K., Vorobyov N.I., Provorov N.A. Kharakteristika estestvennogo otbora v populyaciyah kluben'kovykh bakterij (*Rhizobium leguminosarum*), vzaimodeystvuyushchikh s razlichnymi vidami rasteniy-hozyaev." *Genetics*. 2015. P. 51, No. 10, p. 1108-1116 (in Russian) [Characteristic of natural selection in populations of nodule bacteria (*Rhizobium leguminosarum*) interacting with different species of host plants]
2. Andronov E.E., Terefework Z., Roumiantseva M.L., Dzyubenko N.I., Onichtchouk O.P., Kurchak O.N., Dresler-Nurmi A., Young J.P.W., Simarov B.V., Lindström K. Symbiotic and genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolates collected from the *Galega orientalis* gene center in the Caucasus. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. V. 69, P. 1067-1074. doi: 10.1128/AEM.69.2.1067-1074.2003
3. Kumar N., Lad G., Giuntini E., Kaye M.E., Udomwong P., Shamsani N.J., Young J.P.W., Bailly X. Bacterial genospecies that are not ecologically coherent: population genomics of *Rhizobium leguminosarum*. *Open Biol.* 2015.V. 5:140133. doi: 10.1098/rsob.140133
4. Osterman J., Chizhevskaya E.P., Andronov E.E., Fewer D.P., Terefework Z., Roumiantseva M.L., Onichtchouk O.P., Dresler-Nurmi A., Simarov B.V., Dzyubenko N.I., Lindström K. *Galega orientalis* is more diverse than *Galega officinalis* in Caucasus—whole-genome AFLP analysis and phylogenetics of symbiosis-related

genes. *Molecular Ecology*. 2011. V.20. P. 4808-4821.  
doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05291.x

5. Provorov N.A., Tikhonovich I., Andronov E. et al.  
Geneticheskie osnovy evolutsii bakteriy – simbiiontov

rasteniy. SPb: izd-vo Inform-Navigator, 2016. (in  
Russian) [Genetic bases of the evolution of bacteria -  
plant symbionts]