

Эволюция симбиоза

УДК 631.461.52:575.22:575.85

doi: 10.15389/agrobiologia.2020.3.489rus

**ВЫЯВЛЕНИЕ АНЦЕСТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ГЕНОМА  
У *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*\*****Т.С. АКСЕНОВА<sup>1</sup>, Е.Р. ЧИРАК<sup>1</sup>, О.П. ОНИЩУК<sup>1</sup>, О.Н. КУРЧАК<sup>1</sup>,  
А.М. АФОНИН<sup>1</sup>, А.Г. ПИНАЕВ<sup>1</sup>, Е.Е. АНДРОНОВ<sup>1, 2, 3</sup>, Н.А. ПРОВОРОВ<sup>1</sup>**

Клубеньковые бактерии вида *Rhizobium leguminosarum* — симбиотические азотфиксаторы, разделяющиеся на два биотипа: *viciae* и *trifolii* (D.C. Jordan с соавт., 1984). За функцию симбиотической азотофиксации отвечают симбиотические гены, эволюция которых зависит от растений-хозяев (J.P.W. Young с соавт., 1989). Недавно было показано, что по типу организации симбиотических регионов геномов ризобии, выделенные из вавилонии красивой *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed., возможно, близки к протосимбионту трибы *Fabeae* *R. leguminosarum* bv. *viciae* (E.R. Chirak с соавт., 2019; А.К. Kimeklis с соавт., 2019). Однако в эволюции *R. leguminosarum* имела место еще одна более ранняя дивергенция между биотипами *viciae* и *trifolii*, отправной точкой которой был протосимбионт всего вида *R. leguminosarum*, существовавший до его разделения на биовары. В своей работе мы представляем результаты секвенирования группы геномов *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и сопоставления структуры их симбиотических регионов с соответствующими участками геномов *R. leguminosarum* bv. *viciae*, относящихся к анцестральным и «продвинутым» типам. Для этого мы сравнили полные геномы штаммов *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (методика секвенирования Oxford Nanopore) и референсных штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae*, относящихся к анцестральным и «продвинутым» типам. Было показано, что в геномах штаммов симбионтов клевера находятся четыре из пяти анцестральных признаков: увеличенный размер межгенных областей в симбиотическом регионе, наличие в *nod*-опероне гена *nodX*, отсутствие гена *nodT* в *sym*-регионе и только одна копия оперона *fixNOPQ*, располагающаяся на плазмиде pSym. Исходя из полученных результатов, мы предполагаем, что протосимбионт *R. leguminosarum* мог быть также близок к ризобиям клевера, как и к ризобиям вавилонии.

**Ключевые слова:** *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, эволюция симбиоза, симбиотические гены, протосимбионт, полногеномное секвенирование.

Клубеньковые бактерии вида *Rhizobium leguminosarum* — наиболее широко распространенные в умеренных широтах симбиотические азотфиксаторы, которые разделяются на два контрастно различающихся по хозяйской специфичности биотипа: bv. *viciae* (симбионты вики, гороха, чины, чечевицы и вавилонии) и bv. *trifolii* (симбионты клевера) (1). За функцию симбиотической азотофиксации отвечают симбиотические гены (*sym*-гены), эволюция которых во многом определяется растениями-хозяевами (2).

У ризобий выделяют три основные группы *sym*-генов: *nod* (синтез липохитоолигосахаридных сигнальных Nod-факторов, индуцирующих развитие клубеньков) (3-5), *nif* (синтез нитрогеназы) (5) и *fix* (поставка энергии для нитрогеназы и регуляции *nif*-генов) (5, 6). Эволюция симбиотического комплекса сначала происходила с помощью сборки групп генов, которые кодируют различные сигнальные и метаболические свойства, обеспечивающие функционирование симбиоза, у первичных ризобий, происходящих из несимбиотических диазотрофов, с последующим переносом собранных симбиотических конструкций в так называемые вторичные (производные) виды (7). Первичные ризобии — родственники современного рода *Bradyrhizobium* были близки к свободноживущему фототрофу *Rhodospseudomonas* и приобрели способность к фиксации азота посредством рекрутирования некоторых генов, контролирующих фотосинтез, в систему *fix* (8). Эта реорганизация привела к появлению фотосинтетически активных *Bradyrhizobium* spp., нодулирующих стебли тропических бобовых без

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00839 (сбор клубеньков и выделение штаммов) и РНФ № 19-16-00081 (секвенирование геномов и биоинформатический анализ данных).

использования *nod*-генов. Возможность синтезировать Nod-факторы, за которые отвечают *nod*-гены, вероятно, впервые приобрели бактерии рода *Bradyrhizobium*, у которых фототрофность была замещена способностью использовать продукты фотосинтеза растений. У этих гетеротрофных ризобий обычно сохраняется экспрессия *nif*-генов *ex planta*, но они не способны к диазотрофному росту из-за низкой активности нитрогеназы (9). Наиболее изученные вторичные ризобии представлены родами *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium* и *Neorhizobium*. Эти бактерии лишены систем фотосинтеза и не могут экспрессировать гены нитрогеназы *ex planta*, их появление было результатом горизонтального переноса *sym*-генов из первичных ризобий в различные почвенные гетеротрофные бактерии (10).

Организация *sym*-генов подробно изучена у вида *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, штаммы которого существенно варьируют по специфичности, проявляемой в отношении разных форм растений-хозяев. Недавно было показано, что по типу организации симбиотических регионов (*sym*-регионы) геномов ризобии *R. leguminosarum* bv. *viciae* можно разделить на две группы (10). Первая группа, выделенная из вавиловии красивой *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. (растения, предположительно близкого к последнему общему предку всей трибы *Fabeae*) (11) и обладающая комплексом анцестральных черт генома, характеризуется расширенным *sym*-регионом, иногда разделенным между двумя симбиотическими плазмидами (pSym), наличием генов *nodX* и *fixW* в плазмидных *sym*-оперонах, отсутствием хромосомных копий *fixNOPQ* и расположением *nodT* вне оперонов *nod*-генов. Во второй, производной (или эволюционно «продвинутой») группе *sym*-регион более компактен, есть хромосомные копии *fixNOPQ*, *nodT* интегрирован в *nod*-оперон между *nodN* и *nodO*, а гены *nodX* и *fixW* утрачиваются. Переход из анцестральной формы в «продвинутой» связан с общей (структурной и функциональной) компактизацией генома, увеличением интенсивности азотофиксации и сужением хозяйской специфичности. Таким образом, показано, что ризобии, выделенные из вавиловии красивой, близки к протосимбионту трибы *Fabeae* *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Однако в эволюции ризобий этой группы имела место еще одна более ранняя дивергенция между *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, отправной точкой которой был протосимбионт всего вида *R. leguminosarum*, существовавший до его разделения с образованием биоваров *viciae* и *trifolii*. И хотя на сегодняшний день ничего не известно ни о растении-хозяине этого протосимбионта, ни тем более об организации его генома, очевидно, что для понимания эволюционных процессов конструирования этого протосимбионта очень полезным станет сопоставление симбиотических оперонов анцестральных вариантов *R. leguminosarum* bv. *viciae* и соответствующих участков в геномах *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

В представляемой работе мы приводим первые результаты секвенирования группы геномов *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Rlt) и сопоставления структуры их симбиотических регионов с соответствующими участками геномов *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Rlv), относящихся к анцестральному и продвинутому типам.

Целью исследования был поиск анцестральных симбиотических признаков в геноме *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

**Методика.** Клубеньковые бактерии выделяли из 50 образцов ризосферной почвы у трех видов клевера (*Trifolium pratense* L., *T. repens* L., *T. hybridum* L.), собранных в пгт. Вырица (Ленинградская обл., Гатчинский р-н). Для сбора образцов выбирали участки компактного произраста-

ния цветущих растений (не дальше 0,2-0,3 м друг от друга), расстояния между участками отбора составляли не менее 5 м.

Из каждого образца готовили почвенные суспензии, которыми инокулировали стерильные проростки клевера двух видов — лугового (*T. pratense*) и ползучего (*T. repens*).

Растения выращивали в условиях гнотобиотического микроvegetационного опыта на безазотной среде Красильникова-Кореняко. С каждого зеленого растения отбирали по одному клубеньку, который стерилизовали в 96 % спирте и дважды промывали стерильной водой. Клубеньки разрушали стеклянной палочкой в эппендорфе; 0,1 мл водной суспензии высевали на агаризованную среду 79 (12). На 3-и сут роста отдельные колонии пересеивали в пробирки с бобовым агаром для хранения (12). Было получено 37 изолятов ризобий клевера, из которых отобрали пять и выращивали их в 5 мл жидкой среды 79 в течение 1 сут при температуре 28 °С. Культуры использовали для выделения геномной ДНК по стандартной методике (13).

Для полногеномного секвенирования подготовку библиотек проводили по рекомендованному производителем протоколу 1D native bar-coding genomic DNA с использованием наборов EXP-NBD104, EXP-NBD114 и SQK-LSK109 («Oxford Nanopore», Великобритания). Библиотеки секвенировали на приборе MinION («Oxford Nanopore», Великобритания) в соответствии с инструкцией производителя на ячейке R9.4. Бейсколлинг raw-файлов fast5, полученных в результате секвенирования, проводили в программе Albacore v. 2.3.1 (<https://rubygems.org/gems/albacore/versions/2.3.1>). Для демультимплексирования ридов использовали приложение Deepbinner v. 0.2.0 (14), для очистки — программу Porechop v. 0.2.3 (<https://github.com/rrwick/Porechop>). Сборку ридов осуществляли в Flye v. 2.6 (<https://github.com/fenderglass/Flye>). Полученные сборки корректировали в пакете Racon v. 1.3.2 (<https://github.com/lbcb-sci/racon>), используя параметры -m 8 -x -6 -g -8 -w 500, а также в программе Medaka v. 0.10.0 (<https://github.com/nanoporetech/medaka>). Аннотирование геномов проводили в программе Prokka (15). Геномы были депонированы в GenBank в биопроекте PRJNA611463 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA611463>).

Извлечение последовательностей, конкатенацию и другие манипуляции с геномами в процессе информатической обработки проводили в пакете CLC Genomics Workbench v. 7.5.1 (<https://secure.clcbio.com/helpspot/index.php?pg=kb.printer.friendly&id=15>). Последовательности выравнивали, используя программу Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) X (<https://www.megasoftware.net>) (18). Построение филогенетических деревьев методом максимального правдоподобия с bootstrap (1000 повторов) проводили в программе PhyML v. 3.3 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) (19). Выбор модели распределения определялся программой автоматически методом наименьшего ВИС (Bayesian information criterion) (20). Полученные дендрограммы визуализировались в online приложении iTOL (<https://itol.embl.de>) (21).

**Результаты.** Анализ геномов выполнили у пяти местных изолятов (3В, 9В, 22В, 23В и 31В) и пяти штаммов *R. leguminosarum* (табл. 1).

### 1. Штаммы *Rhizobium leguminosarum*, использованные в работе

Штамм	Регион	Растение-хозяин	Номер в базе GenBank	Ссылка
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (Rlt)				
3В	пгт. Вырица, Ленинградская обл., Россия	<i>Trifolium repens</i> L.	PRJNA611463	Эта работа
9В	пгт. Вырица, Ленинградская обл., Россия	<i>Trifolium pratense</i> L.	PRJNA611463	Эта работа

22В	пгт. Вырица, Ленинградская обл., Россия	<i>Trifolium pratense</i> L.	PRJNA611463	Эта работа
23В	пгт. Вырица, Ленинградская обл., Россия	<i>Trifolium pratense</i> L.	PRJNA611463	Эта работа
31В	пгт. Вырица, Ленинградская обл., Россия	<i>Trifolium pratense</i> L.	PRJNA611463	Эта работа
WSM1689	Греция	<i>Trifolium uniflorum</i> L.	CP007045-CP007050	(17)
		<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (Rlv)		
Vaf10	Северная Осетия, Россия	<i>Vavilovia formosa</i> (Stev.) Fed.	CP016286-CP016293	(10)
Vaf108	Дагестан, Россия	<i>Vavilovia formosa</i> (Stev.) Fed.	CP018228-CP018236	(10)
ТОМ	Турция	<i>Pisum sativum</i> L.	AQUC01000001-AQUC01000006	(16)
248	Англия	<i>Vicia faba</i> L.	ARRT01000001-ARRT01000007	(16)

Мы проанализировали геномы у пяти полученных изолятов Rlt (3В, 9В, 22В, 23В, 31В) и сравнили их с геномами штаммов Rlv (см. табл. 1). Для сравнения были выбраны штаммы Vaf108 и Vaf10 — симбионты вавиловии красивой (*Vavilovia formosa*) (22), которая, вероятно, является ближайшим живым родственником общего предка трибы *Fabeae* (23), ТОМ — симбионт афганских культиваров гороха (*Pisum sativum* L.) (24), 248 — симбионт *Vicia faba* L. и WSM1689 — симбионт *T. uniflorum* (см. табл. 1). Так как дивергенция биоваров *R. leguminosarum* определяется симбиотическими генами, в то время как хромосомный фон у этих биоваров общий (25), мы сосредоточили внимание на симбиотических регионах геномов.

Состав *sym*-оперонов. При сравнении *sym*-регионов полученных геномных последовательностей у изолятов Rlt 3В, 9В, 22В, 23В и 31В с *sym*-регионами штаммов Rlt WSM1689 и Rlv Vaf10, Vaf108, ТОМ и 248 были найдены различия в составе и расположении *sym*-генов между Rlt и Rlv (рис. 1). У штаммов 3В, 9В, 22В и 23В *sym*-гены организованы в *sym*-опероны, расположенные на pSym. Несколько отличается штамм 31В, у которого оперон *fixNOQPGHIS* расположен на хромосоме (рис. 2) и содержит два дополнительных гена (*fixLK*), не выявленных в других штаммах (см. рис. 2).

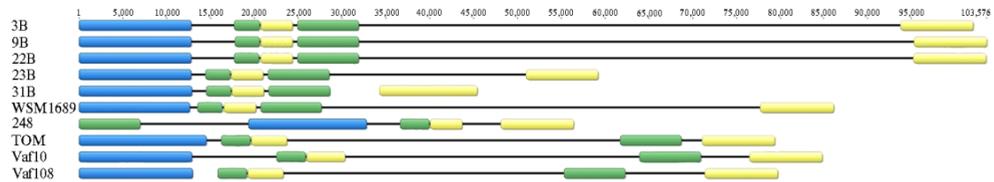


Рис. 1. Различия в структурной организации *sym*-оперонов в геномах изолятов *Rhizobium leguminosarum*. Штаммы 3В, 9В, 22В, 23В, 31В и WSM1689 — *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Rlt), Vaf10, Vaf108, ТОМ и 248 — *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Rlv). Синим цветом обозначены *nod*-опероны, зеленым — *nif* и желтым — *fix*. Шкала сверху — длина *sym*-регионов, п.н.

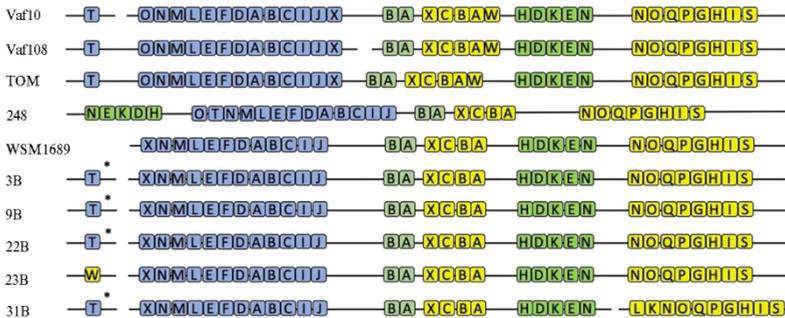


Рис. 2. Схематическая структура *sym*-оперонов у изолятов *Rhizobium leguminosarum*. Штаммы 3В, 9В, 22В, 23В, 31В и WSM1689 — *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Rlt), Vaf10, Vaf108, ТОМ и 248 — *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Rlv). Синим цветом обозначены *nod*-опероны, зеленым — *nif* и желтым — *fix*. Звездочкой (\*) отмечен ген, расположенный в хромосоме.

На хромосомах штаммов Rlt 3В, 9В, 22В и 31В также найден ген *nodT*, но нет гена *fixW*. У штамма 23В ген *nodT* не выявлен, но из всех изученных штаммов Rlt только у него есть ген *fixW*, расположенный на отдельной плазмиде. В *nod*-операх всех Rlt штаммов обнаружен ген *nodX*, но отсутствует ген *nodO*.

Распределение *sym*-регионов в геноме. У штаммов Rlt структура *sym*-регионов оказалась разнообразной (см. рис. 1). У 31В в отличие от остальных рассматриваемых штаммов оперон *fixNOQPGHIS* расположен на хромосоме. У штаммов 3В, 9В и 22В сильно увеличено расстояние между оперонами *nifHDKE* и *fixNOQPGHIS*, а у штамма 23В оно заметно меньше (рис. 3).

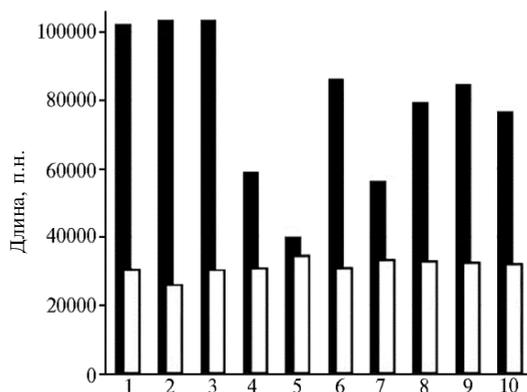


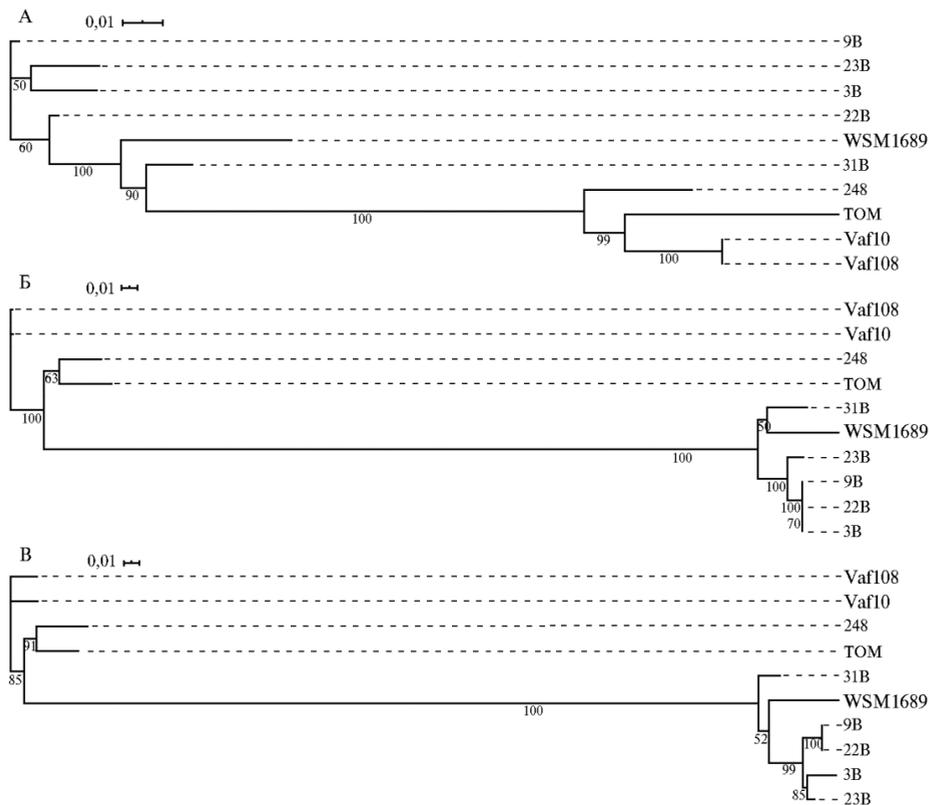
Рис. 3. Соотношение размеров *sym*-регионов (черные столбики) и *sym*-генов (белые столбики) в геномах изолятов *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Rlt) (1 — 3В, 2 — 9В, 3 — 22В, 4 — 23В, 5 — 31В, 6 — WSM1689) и *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Rlv) (7 — 248, 8 — TOM, 9 — Vaf10, 10 — Vaf108).

Кроме того, организация *sym*-региона у штамма 23В наиболее компактная и сравнимая по размерам с таковой у штамма 248 (симбионт *V. faba*). Размеры *sym*-региона у штаммов 23В и 31В соответствуют характерным для эволюционно продвинутой группы, для которой типично компактное расположение *sym*-генов, тогда как штаммы 3В, 9В и 22В, у которых *sym*-регион расширен, можно отнести к предковой эволюционной группе.

Филогенетический анализ *sym*-генов. У штаммов Rlt и Rlv, помимо выявленных структурных особенностей симбиотического региона, мы проанализировали нуклеотидный полиморфизм трех групп генов — *fix*, *nif* и *nod*. Филогении соответствующих конкатенатов представлены на рисунке 4. Обособление симбионтов клевера в относительно компактном кластере показано для двух групп генов (*nif* и *nod*), в то время как штаммы Rlv образуют компактный кластер только по генам *fix*. Заслуживает внимание и тот факт, что в филогении по генам *nif* и *nod* продвинутые симбионты Rlv (248 и TOM) оказываются с достоверной статистической поддержкой в одном кластере с ризобиями клевера, в то время как в филогении по *fix* генам два штамма Rlt (WSM1689 и 31В) попадают в относительно компактный кластер с группой Rlv, включающей как продвинутые, так и анцестральные штаммы Rlv.

Биовары *R. leguminosarum* представлены симбионтами двух сильно различающихся триб бобовых. Разделение *R. leguminosarum* на биовары *viciae* и *trifolii* имеет давнюю эволюционную историю, и штаммы этих биоваров не образуют клубеньков при перекрестной инокуляции бобовых из триб *Trifolieae* и *Fabeae*. В биоваре *viciae* выделяются симбионты вавилонии красивой, обладающие рядом анцестральных признаков, и предполагается, что они наиболее близки к протосимбионту трибы *Fabeae* — общему предку биовара *R. leguminosarum* bv. *viciae* (10). В представленном исследовании при сопоставлении геномов ризобий вавилонии, секвенирование которых было выполнено ранее, и геномов ризобий клевера, изученных в этой работе, нами получены данные, имеющие отношение к

общему для всего вида *R. leguminosarum* протосимбионту, который существовал на эволюционно более раннем этапе — до разделения на биовары *viciae* и *trifolii*.



**Рис. 4.** Дендрограмма, построенная на основании конкатенированных последовательностей генов *fixABCGHINOPQ* (А), *nifABDEHKLN* (Б) и *nodABCDEFGHIJLMN* (Б) из геномов *Rhizobium leguminosarum*. Штаммы 3В, 9В, 22В, 23В, 31В и WSM1689 — *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Rlt), Vaf10, Vaf108, ТОМ и 248 — *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Rlv).

Один из анцестральных признаков — существенно больший размер межгенных областей в симбиотическом регионе из-за первичной «грубой» сборки на ранних этапах эволюции. Позднее происходит компактизация этих регионов (10). Важный результат выполненных нами исследований заключается в выявлении у изученных штаммов Rlt 3В, 9В и 22В *sym*-региона, размер которого намного больше, чем у симбионтов вавиловии (см. рис. 1, табл. 2).

Для всех штаммов Rlt характерно наличие в *nod*-опероне гена *nodX*, что у штаммов Rlv также служит признаком, маркирующим анцестральные генотипы (25). Значимость гена *nodX* для симбиоза с клевером не изучена, а его утрата у продвинутых штаммов Rlv связана с сужением хозяйской специфичности и повышением активности азотофиксация (26).

Еще один анцестральный признак — отсутствие гена *nodT*, кодирующего *efflux*-систему, которая обеспечивает эффективное высвобождение *nod*-фактора из клетки ризобий (27). Как было показано у штаммов Rlv, вероятный эволюционный сценарий связан с рекрутированием этого гена из хромосомы в симбиотический кластер посредством дупликации, неофункционализации и переноса. У штаммов Rlt ген *nodT* присутствует в одной копии только на хромосоме (исключение — изолят 31В, у которого *nodT* вообще не выявлен). Таким образом, по этому признаку геномы ри-

зобий клевера демонстрируют соответствие еще более ранним этапам эволюции симбиотического кластера.

У штаммов Rlv к анцестральным признакам, связанным с функциональной избыточностью анцестральных генотипов, относится также наличие гена *fixW*. У изученных симбионтов клевера ген *fixW* найден только у штамма 31В, но не в *fix*-опероне на pSym, как у Rlv, а в отдельном несимбиотическом контиге. Функция *fixW*, как предполагалось ранее, может быть связана с глубокой дифференциацией бактериоидов, характерной для ризобий. Проявление *fixW* и его значение для симбиоза подробно не изучены, но, скорее всего, *fixW* не влияет на хозяйскую специфичность (28).

Наконец, штаммы Rlt 3В, 9В, 22В и 23В, как и штаммы Rlv Vaf10 и Vaf108, обладают только одной копией генов *fixNOPQ* на pSym (в хромосоме этот оперон отсутствует) в отличие от остальных представителей Rlv, у которых в геноме две копии *fixNOPQ* — на pSym и в хромосоме. В случае штамма 31В выявлена одна копия *fixNOPQ*, но в хромосоме. Гены *fixNOQP* и их гомологи у грамотрицательных не фиксирующих азот бактерий кодируют высокоаффинную терминальную цитохромоксидазу типа *cbb3*, которая обеспечивает дыхание в микроаэрофильных условиях (29), например дыхание в клубеньках в условиях симбиоза. Скорее всего, дупликация кластера *fixNOQP* и его перенос в хромосому происходит на поздних стадиях эволюции *R. leguminosarum* (30). Предполагаемые эволюционные предшественники *R. leguminosarum*, имевшие близких общих предков с родом *Agrobacterium* (31), не имеют *fix*-генов или их гомологов, что указывает на то, что хромосомные копии *fix*-генов представляют собой поздние приобретения в эволюционной истории генома *R. leguminosarum* (10).

Выявленные нами различия в топологии филогений конкатенатов *fixABCGHINOPQ*, *nifABDEHKN* и *nodABCDEFGHIJLMN* свидетельствуют о независимой эволюции групп генов, контролирующих различные функции. Полученные данные позволяют распространить предположения, высказанные ранее о независимой эволюции этих групп генов внутри биовара *viciae* (10), на весь вид *R. leguminosarum*.

## 2. Анцестральные признаки генома у биотипов *Rhizobium leguminosarum*, найденные в совокупности (по результатам полногеномного секвенирования 10 штаммов)

Биотип <i>Rhizobium</i>	Расширенный <i>sym</i> -регион	В <i>nod</i> -опероне нет гена <i>nodT</i>	Наличие <i>nodX</i>	Наличие <i>fixW</i>	Нет хромосомной копии <i>fixNOPQ</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	+	+	+	–	+
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	+	+	+	+	+

Примечание. «+» или «–» — соответственно наличие или отсутствие признака. Изученные штаммы: 3В, 9В, 22В, 23В, 31В и WSM1689 — *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Rlt), Vaf10, Vaf108, TOM и 248 — *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Rlv).

Итак, анализ результатов полногеномного секвенирования показал, что из рассматриваемых штаммов *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* как минимум три (3В, 9В и 22В) обладают большей частью анцестральных признаков (расширенный *sym*-регион, отсутствие хромосомной копии *fixNOPQ* и гена *nodT* в *nod*-опероне, наличие *nodX*), выявленных у ризобий вавилонии красивой *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. Однако эволюционная интерпретация полученных данных осложняется тем, что механизмы эволюции ризобий *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, несомненно, определяются не только особенностями растений-хозяев и их филогенеза, но и историей продвижения этих растений в раз-

личные эколого-географические зоны. Не исключено, что признаки, идентифицированные в одной группе ризобий как анцестральные, в другой группе могут иметь иной эволюционный смысл. Несмотря на эти затруднения один из интересных результатов выполненного исследования, по нашему мнению, состоит в предположении, что ризобии клевера вместе с ризобиями вавиловии могут быть близки к протосимбионту *R. leguminosarum*. Такое допущение мы рассматриваем как одну из рабочих гипотез для дальнейших исследований.

<sup>1</sup>ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,  
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,  
e-mail: tsaksenova@mail.ru, chirak.elizaveta@gmail.com, olony@yandex.ru,  
okurchak@yahoo.com, aafonin@arriam.ru, agpinaev@gmail.com,  
eeandr@gmail.com ✉, provorovnik@ya.ru;

<sup>2</sup>ФГБНУ Почвенный институт им. В.В. Докучаева,  
119017 Россия, г. Москва, Пыжевский пер., 7, стр. 2;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет,

199034 Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

Поступила в редакцию  
12 марта 2020 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2020, V. 55, № 3, pp. 489–498

## IDENTIFICATION OF THE ANCESTRAL CHARACTERISTICS IN THE GENOME OF *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

T.S. Aksenova<sup>1</sup>, E.R. Chirak<sup>1</sup>, O.P. Onishchuk<sup>1</sup>, O.N. Kurchak<sup>1</sup>, A.M. Afonin<sup>1</sup>,  
A.G. Pinaev<sup>1</sup>, E.E. Andronov<sup>1, 2, 3</sup>, N.A. Provorov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail tsaksenova@mail.ru, chirak.elizaveta@gmail.com, olony@yandex.ru, okurchak@yahoo.com, aafonin@arriam.ru, agpinaev@gmail.com, eeandr@gmail.com (✉ corresponding author), provorovnik@ya.ru;

<sup>2</sup>Dokuchaev Soil Science Institute, 7/str. 2, Pyzhyovskii per., Moscow, 119017 Russia;

<sup>3</sup>Saint-Petersburg State University, 7-9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034 Russia

ORCID:

Aksenova T.S. orcid.org/0000-0002-7294-8410

Chirak E.R. orcid.org/0000-0002-1610-8935

Onishchuk O.P. orcid.org/0000-0002-5378-7826

Kurchak O.N. orcid.org/0000-0003-3555-7426

Afonin A.M. orcid.org/0000-0002-8530-0226

Pinaev A.G. orcid.org/0000-0001-8272-9679

Andronov E.E. orcid.org/0000-0002-5204-262X

Provorov N.A. orcid.org/0000-0001-9091-9384

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by Russian Foundation for Basic Research, the project No. 18-34-00839 (collection of nodules and isolation of strains), and Russian Science Foundation, the project No. 19-16-00081 (genome sequencing and bioinformatics data analysis)

Received March 12, 2020

doi: 10.15389/agrobiol.2020.3.489eng

### Abstract

Nodule bacteria of the species *Rhizobium leguminosarum* are symbiotic N<sub>2</sub>-fixers that divide into two biotypes: *viciae* and *trifolii* (D.C Jordan. et al., 1984). Symbiotic genes, the evolution of which depends on host plants, are responsible for the function of symbiotic nitrogen fixation (J.P.W. Young et al., 1989). Recently it was shown that according to the type of organization of the symbiotic regions of the genomes, rhizobia isolated from the *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. are close to the protosymbiont of the tribe *Fabeae* *R. leguminosarum* bv. *viciae* (E.R. Chirak et al., 2019). However, in the evolution of *R. leguminosarum*, there was another earlier divergence between the biotypes *viciae* and *trifolii*, the starting point of which was the protosymbiont of the entire species *R. leguminosarum*, which existed before its separation into biovars. In this work we present the results of genomes sequencing of a group of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and comparisons of the structure of their symbiotic regions with the corresponding regions of the genomes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, related to the ancestral and “advanced” types. In the program CLC Genomics Workbench 7.5.1, we compared the obtained genome-wide sequences of the strains *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Oxford Nanopore sequencing technique) with reference strains of *R. leguminosarum* bv. *viciae*, related to ancestral and “advanced” types. It was shown that in the genomes of strains of clover symbionts, four of five ancestral characters are found: an increased size of intergenic regions in the symbiotic region, the presence of the *nodX* gene in the

nod-operon, the absence of the *nodT* gene in the *sym*-region, and only one copy of the *fixNOPQ* operon located on the pSym. Based on the results obtained, we suggest that the protosymbiont *R. leguminosarum* could be close to clover rhizobia.

Keywords: *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, symbiosis evolution, symbiotic genes, protosymbiont, genome-wide sequences.

## REFERENCES

1. Jordan D.C. Family III. *Rhizobiaceae*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. N.R. Krieg, J.G. Holt (eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, 1984: 234-242.
2. Young J.P.W., Johnston A.W.B. The evolution of specificity in the legume-rhizobium symbiosis. *Trends in Ecology & Evolution*, 1989, 4(11): 341-349 (doi: 10.1016/0169-5347(89)90089-X).
3. Göttfert M. Regulation and function of rhizobial nodulation genes. *FEMS Microbiology Reviews*, 1993, 10(1-2): 39-63 (doi: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb05863.x).
4. Debelle F., Moulin L., Mangin B., Dénarié J., Boivin C. Nod genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica*, 2001, 48(2): 359-365. (doi: 10.18388/abp.2001\_3921).
5. Shamseldin A. The role of different genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 2013, 8(4): 84-94 (doi: 10.5829/idosi.gjbb.2013.8.4.82103).
6. Fischer H.M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiological Reviews*, 1994, 58(3): 352-386.
7. Provorov N.A., Andronov E.E. Evolution of root nodule bacteria: reconstruction of the speciation processes resulting from genomic rearrangements in a symbiotic system. *Microbiology*, 2016, 85: 131-139 (doi: 10.1134/S0026261716020156).
8. Rey F.E., Harwood C.S. FixK, a global regulator of microaerobic growth, controls photosynthesis in *Rhodospseudomonas palustris*. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(4): 1007-1020 (doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.07037.x).
9. Wongdee J., Boonkerd N., Teamroong N., Tittabutr P., Giraud E. Regulation of nitrogen fixation in *Bradyrhizobium* sp. strain DOA9 involves two distinct NifA regulatory proteins that are functionally redundant during symbiosis but not during free-living growth. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1644 (doi: 10.3389/fmicb.2018.01644).
10. Chirak E.R., Kimeklis A.K., Karasev E.S., Kopat V.V., Safronova V.I., Belimov A.A., Aksenova T.S., Kabilov M.R., Provorov N.A., Andronov E.E. Search for ancestral features in genomes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* strains isolated from the relict legume *Vavilovia formosa*. *Genes*, 2019, 10(12): 990 (doi: 10.3390/genes10120990).
11. Mikič A., Smýkal P., Kenicer G., Vishnyakova M., Sarukhanyan N., Akopian J., Vanyan A., Gabrielyan I., Smýkalová I., Sherbakova E., Zorič L., Atlagič J., Zeremski-škorič T., Čupina B., Krstić P., Jajić I., Antanasović S., Porđević V., Mihailović V., Ivanov A., Ochatt S., Ambrose M. 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 (doi: 10.1111/boj.12060).
12. *Biologicheskoe raznoobrazie kluben'kovykh bakterii v ekosistemakh i agrosenozakh. Teoreticheskie osnovy i metody (monografiya) /Pod redaktsiei M.L. Rumyantsevoi, B.V. Simarova [The biological diversity of nodule bacteria in ecosystems and agrocenoses. Theoretical foundations and methods (a monograph). M.L. Rumyantseva, B.V. Simarova (eds.)]. St. Petersburg, 2011 (in Russ.)*.
13. Somasegaran P., Hoben H.J. Isolating and purifying genomic DNA of *Rhizobia* using a large-scale method. In: *Handbook for Rhizobia: methods in legume-rhizobium technology*. Springer, New York, 1994: 279-283 (doi: 10.1007/978-1-4613-8375-8\_31).
14. Wick R.R., Judd L.M., Holt K.E. Deepbinner: Demultiplexing barcoded Oxford Nanopore reads with deep convolutional neural networks. *PLoS Computational Biology*, 2018, 14(11): e1006583 (doi: 10.1371/journal.pcbi.1006583)
15. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068-2069 (doi: 10.1093/bioinformatics/btu153).
16. Reeve W., Ardley J., Tian R., Eshragi L., Yoon J.W., Ngamwisetkun P., Seshadri R., Ivanova N.N., Kyrpidis N.C. A genomic encyclopedia of the root nodule bacteria: assessing genetic diversity through a systematic biogeographic survey. *Standards in Genomic Sciences*, 2015, 10: 14 (doi: 10.1186/1944-3277-10-14).
17. Terpolilli J., Rui T., Yates R., Howieson J., Poole P., Munk C., Tapia R., Han C., Markowitz V., Tatiparthi R., Mavrommatis K., Ivanova N., Pati A., Goodwin L., Woyke T., Kyrpidis N., Reeve W. Genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM1689, the microsymbiont of the one flowered clover *Trifolium uniflorum*. *Standards in Genomic Sciences*, 2013, 9: 527-539 (doi: 10.4056/sigs.4988693).

18. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549 (doi: 10.1093/molbev/msy096).
19. Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 2010, 59(3): 307-321 (doi: 10.1093/sysbio/syq010).
20. Schwarz G. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics*, 1978, 6(2): 461-464 (doi: 10.1214/aos/1176344136).
21. Letunic I., Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W242-W245 (doi: 10.1093/nar/gkw290).
22. Safronova V.I., Kimeklis A.K., Chizhevskaya E.P., Belimov A.A., Andronov E.E., Pinaev A.G., Pukhaev A.R., Popov K.P., Tikhonovich I.A. Genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the relic species *Vavilovia formosa* (Stev.). *Fed. Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, 105: 389-399 (doi: 10.1007/s10482-013-0089-9).
23. Makasheva R.Kh., Drozd A.M., Adamova O.P., Golubev A.A. *Sbornik trudov po prikladnoi botanike, genetike i selektsii*, 1973, 51(1): 44 (in Russ.).
24. Ma S.W., Iyer V.N. New field isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *Viciae* that nodulate the primitive pea cultivar Afghanistan in addition to modern cultivars. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(7): 2206-2212.
25. Kimeklis A.K., Chirak E.R., Kuznetsova I.G., Sazanova A.L., Safronova V.I., Belimov A.A., Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Aksenova T.S., Pinaev A.G., Andronov E.E., Provorov N.A. Rhizobia isolated from the relict legume *Vavilovia Formosa* represent a genetically specific group within *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Genes*, 2019, 10(12): 991 (doi: 10.3390/genes10120991).
26. Provorov N., Tikhonovich I. Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-rhizobia symbiosis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2003, 50: 89-99 (doi: 10.1023/A:1022957429160).
27. Alvarez-Ortega C., Olivares J., Martínez J.L. RND multidrug efflux pumps: What are they good for? *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 7 (doi: 10.3389/fmicb.2013.00007).
28. Hontelez J.G., Lankhorst R.K., Katinakis P., van den Bos R.C., van Kammen A. Characterization and nucleotide sequence of a novel gene *fixW* upstream of the *fixABC* operon in *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Gen. Genet.*, 1989, 218: 536-544 (doi: 10.1007/BF00332421).
29. Talbi C., Sanchez C., Hidalgo-Garcia A., González E.M., Arrese-Igor C., Girard L., Bedmar E.J., Delgado M.J. Enhanced expression of *Rhizobium etli* cbb3 oxidase improves drought tolerance of common bean symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(14): 5035-5043 (doi: 10.1093/jxb/ers101).
30. Kopat V.V., Chirak E.R., Kimeklis A.K., Safronova V.I., Belimov A.A., Kabilov M.R., Andronov E.E., Provorov N.A. Evolution of *fixNOQP* genes encoding cytochrome oxidase with high affinity to oxygen in Rhizobia and related bacteria. *Russ. J. Genet.*, 2017, 53: 766-774 (doi: 10.1134/S1022795417070067).
31. Berrada H., Fikri-Benbrahim K. Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. *British Microbiology Research Journal*, 2014, 4(6): 616-639 (doi: 10.9734/BMRJ/2014/5635).