

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ РОДА *Rhizobium*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛУБЕНЬКОВ *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed.\*

А.К. КИМЕКЛИС<sup>1</sup>, В.И. САФРОНОВА<sup>1</sup>, И.Г. КУЗНЕЦОВА<sup>1</sup>,  
А.Л. САЗАНОВА<sup>1</sup>, А.А. БЕЛИМОВ<sup>1</sup>, А.Г. ПИНАЕВ<sup>1</sup>, Е.П. ЧИЖЕВСКАЯ<sup>1</sup>,  
А.Р. ПУХАЕВ<sup>2</sup>, К.П. ПОПОВ<sup>3</sup>, Е.Е. АНДРОНОВ<sup>1</sup>, Н.А. ПРОВОРОВ<sup>1</sup>

Из пяти родов трибы *Fabeae* самым малоизученным остается *Vavilovia* Fed., содержащий единственный вид *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. Ареал вавиловии прекрасной расположен на высокогорье Центрального и Восточного Кавказа, известны всего несколько популяций на территориях Армении, Дагестана и Северной Осетии, Азербайджана, Ирана, Ирака, Сирии и Турции, а ее произрастание ограничено условиями среды обитания. Единственное филогенетическое исследование изолятов ризобий из клубеньков вавиловии Североосетинской популяции показало достаточно широкое видовое и генетическое разнообразие как быстрорастущих, так и медленно растущих микросимбионтов (V.I. Safronova с соавт., 2014). Было установлено, что все быстрорастущие изоляты, принадлежащие к виду *Rhizobium leguminosarum*, служат носителями гена *nodX*. Вавиловию прекрасную и ее микросимбионтов можно рассматривать как перспективные модельные объекты для исследования механизмов эволюции специфичности бобово-ризобиального симбиоза. В результате трех экспедиций в горные регионы Армении, Дагестана и Северной Осетии были найдены и собраны образцы эндемичного бобового растения *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. с клубеньками, из которых впоследствии получены изоляты клубеньковых бактерий (ризобий). Мы выбрали 19 штаммов быстрорастущих ризобий, выделенных из клубеньков 10 растений, чтобы определить их видовую принадлежность, выявить географическую изоляцию, а также охарактеризовать генетическую обособленность выделенных штаммов по отношению к ризобиям, имеющим других растений-хозяев из трибы *Fabeae*. Для этого были просеквенированы один из фрагментов ITS (internally transcribed spacer) длиной 1000-1300 п.н. и фрагмент гена *nodA* длиной 666 п.н., а также проведен скрининг штаммов на наличие гена *nodX*, контролирующего хозяйскую специфичность ризобий. На основании полученных последовательностей были рассчитаны генетические расстояния между группами ризобий: изолятами из разных регионов (Армения, Дагестан, Северная Осетия) и от разных растений-хозяев (вавилония, горох, клевер). Результаты секвенирования фрагмента ITS показали, что все изученные штаммы принадлежат к виду *Rhizobium leguminosarum* (биовар *viciae*). ITS-дендрограмма выявила относительно высокую гетерогенность внутри группы изолятов, однако на *nodA*-дендрограмме они, напротив, формировали очень компактную группу. Несовпадение этих дендрограмм позволяет предположить, что ген *nodA*, сцепленный с генами хозяйской специфичности у ризобий, может активно переноситься в популяциях *R. leguminosarum*, обеспечивая свободное комбинирование специфичности к вавиловии с различными вариантами бактериальной хромосомы. Сравнение генетических расстояний по ITS для изолятов из трех регионов указывает на дивергенцию микросимбионтов вавиловии, связанную с географической изоляцией. Данные по генетическим расстояниям для гена *nodA*, а также присутствие гена *nodX* у всех изученных штаммов *R. leguminosarum* указывают на наличие хозяйской обособленности изученных штаммов внутри биовара *viciae*. Полученные корреляции происхождения штаммов со структурой гена *nodA*, по всей видимости, отражают наличие высокоспецифичных взаимодействий каждой группы штаммов *R. leguminosarum* со своими растениями-хозяевами, тогда как корреляции со структурой локуса ITS свидетельствуют об адаптации ризобий к почвенной среде обитания.

Ключевые слова: *Vavilovia formosa*, *Rhizobium leguminosarum*, бобово-ризобиальный симбиоз.

Триба *Fabeae* (син. *Viciae*) — одна из наиболее представительных в семействе Бобовые (*Fabaceae* Endl.). Она состоит более чем из 300 видов, причем ее таксономическая структура до сих пор подвергается существенным изменениям. Многие виды этой трибы имеют важное сельскохозяйственное значение. В ее состав входят одни из самых древних культивируемых видов растений — горох посевной (*Pisum sativum* L.) и вика посев-

\* Работа поддержана грантом Российского научного фонда 14-26-00094. Исследования выполняли с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» (ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург—Пушкин).

ная (*Vicia sativa* L.) (1). Из пяти родов трибы *Fabeae* (*Lathyrus* L., *Vicia* L., *Lens* Mill., *Pisum* L. и *Vavilovia* Fed.) самым малоизученным остается последний, содержащий единственный вид *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. Апрель вавиловии расположен на высокогорье Центрального и Восточного Кавказа, известны всего несколько популяций на территориях Армении (2), Дагестана и Северной Осетии (3), Азербайджана (4), Ирана, Ирака, Сирии и Турции (5), а ее произрастание ограничено условиями среды обитания (6). Поэтому само растение и его микросимбионты до недавнего времени оставались неизученными.

Недавно полученные данные по таксономическому положению вавиловии прекрасной, основанные на филогенетически значимых генах *matK*, *trnL-F* и *trnS-G*, а также фрагменте ITS (internally transcribed spacer), свидетельствуют, что она наиболее близка к родам *Pisum* и *Lathyrus*, однако формирует отдельный кластер внутри трибы *Fabeae* (7). Единственное филогенетическое исследование изолятов ризобий из клубеньков вавиловии североосетинской популяции показало достаточно широкое видовое и генетическое разнообразие как быстрорастущих, так и медленнорастущих микросимбионтов (8).

В той же работе было установлено, что все быстрорастущие изоляты, принадлежащие к виду *R. leguminosarum*, несут ген *nodX*, характерный для симбионтов *Pisum sativum* сорта Afghanistan (9). Все известные растения трибы *Fabeae* формируют группу перекрестной инокуляции и образуют клубеньки с бактериями этого же вида, причем для формирования симбиоза наличие гена *nodX* в большинстве случаев не обязательно. Однако в геноме *P. sativum* cv. *Afghanistan* (так называемого афганского гороха) присутствует аллель *sym2<sup>A</sup>*, кодирующий рецептор, который специфично связывается только с Nod-фактором, декорированным дополнительной ацетильной группой, присоединенной под контролем гена *nodX* (10).

В настоящее время направление по изучению роли гена *nodX* в обеспечении индивидуального взаимодействия между бобовым растением и ризобияльными бактериями развивается очень активно (11). Представленные выше данные позволяют считать вавиловию прекрасную и ее микросимбионтов перспективными модельными объектами для исследования механизмов эволюции специфичности в бобово-ризобияльном симбиозе.

Благодаря удачным экспедициям в различные регионы Кавказа, наша исследовательская группа располагает образцами растений вавиловии прекрасной и штаммов ризобий, выделенных из их клубеньков.

Целью настоящей работы было определение видовой принадлежности быстрорастущих изолятов ризобий из клубеньков вавиловии прекрасной на основании последовательностей фрагмента ITS, а также выявление особенностей хозяйской специфичности, которые могут быть оценены при помощи филогенетического анализа генов *nodA* и *nodX*. Мы также провели сравнение генетических расстояний, оцененных по последовательностям ITS и *nodA* в генотипе штаммов ризобий, выделенных из клубеньков разных растений-хозяев в различных географических регионах, для выявления экологически значимых показателей полиморфизма изучаемых изолятов.

**Методика.** Растения вавиловии прекрасной с клубеньками были собраны в 2012-2013 годах в Северо-Осетинском заповеднике (Северная Осетия, Алагирский р-н), Армении и Дагестане на высоте более 1500 м. В настоящей работе были изучены 19 штаммов ризобий из клубеньков 10 растений вавиловии, принадлежавших к трем разным популяциям.

Штаммы ризобий изолировали из клубеньков *V. formosa* с исполь-

зованием стандартной методики (12). Из каждого клубенька получали по одному штамму, который выращивали на питательной среде № 79 (13) при 28 °С. Все изоляты были депонированы в Ведомственную коллекцию полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) и хранятся на станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов при –80 °С («Liconic Instruments», Лихтенштейн) (14). Информация об этих штаммах доступна online в базе данных ВКСМ (<http://www.arriam.spb.ru>).

Для филогенетического анализа из штаммов ризобий выделяли геномную ДНК по стандартному протоколу (15) и амплифицировали фрагмент ITS (intergenic transcribed spacer) длиной 1000–1300 п.н. с помощью праймеров FGPS1490-72 5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3' и FGPL132'-38 5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3' (16, 17), а также фрагмент гена *nodA* длиной 666 п.н. с помощью праймеров *nodA*-1 5'-GCRGTGGAARNTRN-NCTGGGAAA-3' и *nodA*-2 5'-GGNCCGTCRTCRAASGTCARGTA-3' (18). ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем 150 мкМ смеси dNTPs («Helicon», Россия), 1 ед. Taq-полимеразы («Евроген», Россия), по 10 пМ каждого из праймеров, а также по 10–20 нг очищенной ДНК в качестве матрицы. Амплификацию осуществляли на автоматическом амплификаторе T100 («Bio-Rad», США) при следующем температурном режиме: стартовая денатурация — 2 мин при 95 °С; 35 циклов денатурации — 30 с при 94 °С, 30 с отжига при 50 °С (праймеры FGPS1490-72/FGPL132'-38) или 49 °С (праймеры *nodA*-1/*nodA*-2), 1 мин элонгации при 72 °С; финальная элонгация — 3 мин при 72 °С. Результаты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле («Amresco», США) в 0,5× TAE, маркер молекулярной массы — ДНК-маркер 100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb («Сибэнзим», Россия). Очистку ПЦР-продуктов проводили согласно стандартной методике (19). Последовательности ITS и гена *nodA* секвенировали на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xl («Applied Biosystems», США), для их первичной обработки применяли программу UGENE («Unipro», Россия) (20). Для полученных последовательностей были найдены схожие последовательности из баз данных GeneBank при помощи анализа BLAST (Basic logical alignment search tool) в NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). На основе этих данных с использованием метода ближайших соседей в программе MEGA v. 5.0 были сконструированы два филогенетических дерева (21). Для оценки эволюционных расстояний использовали метод p-distance, для статистической поддержки кластеров — метод bootstrap с 1 тыс. реплик.

Наличие гена *nodX* в изолятах проверяли с помощью ПЦР с праймерами oMP199-F 5'-CCATGGGACCCATCCAATGAAC-3' и oMP196-R 5'-TTAAGCGACGGAAAGCCTTC-3' (22). Состав реакционной смеси и температурный режим были аналогичны описанному выше, за исключением температуры отжига, равной 53 °С. В качестве положительного контроля использовали штамм *R. leguminosarum* bv. *viciae* A1 (22), обладающий способностью формировать клубеньки на афганских формах гороха.

Для последовательностей фрагментов ITS и гена *nodA* вычислили генетические расстояния как внутри разных таксономических и географических групп ризобий, так и между ними. Сравнение генетических расстояний для последовательностей ITS и *nodA* проводили между двумя разными наборами групп микроорганизмов. Это корреляция штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* (ризобии из гороха), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (ризобии из клевера) и исследуемых штаммов с растением-хозяином, а также корреляция изолятов из вавиловии с их географическим происхождением.

Были проведены как внутри-, так и межгрупповые сравнения генетических расстояний. Генетические расстояния оценивали по параметру p-distance в программном пакете MEGA v. 5.0 (21).

**Результаты.** Фрагменты ITS удалось амплифицировать и секвенировать полностью или частично для всех изученных штаммов, при этом у изолятов из Дагестана в геноме оказалось как минимум две разные копии рибосомального оперона, содержащие фрагменты ITS разного размера. На дендрограмме, построенной на основе секвенирования ITS (рис. 1), эти последовательности помечены литерами l (long) и s (short).

В таблице 1 указаны длины полученных фрагментов и их сходство с ITS трех типовых штаммов внутри вида *R. leguminosarum*, один из которых (штамм TOM) содержит ген *nodX*. Геномы этих штаммов секвенированы и доступны online в базе данных NCBI. Примечательно, что по ITS основная часть штаммов, выделенных из вавиловии, обладает большим сходством с биоваром *viciae*, чем с биоваром *trifolii*: средние коэффициенты сходства с последовательностями типовых штаммов составляли  $83 \pm 0,9$  % для штамма 3841,  $89 \pm 0,8$  % — для TOM и лишь  $80 \pm 1,0$  % — для WSM2304.

### 1. Происхождение изолятов из клубеньков вавиловии прекрасной *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. и сходство последовательностей их ITS-фрагментов с последовательностями референтных штаммов из баз данных GenBank

Штамм	№ растения	Длина фрагмента ITS, п.н.	Сходство с последовательностями типовых штаммов, %		
			<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> TOM	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM2304
Северная Осетия					
Vaf-01	1	565	96	86	90
Vaf-09		613	75	90	75
Vaf-10	3	1206	83	95	81
Vaf-12		1184	85	89	88
Vaf-23	4	565	99	88	100
Vaf-25		649	80	99	72
Vaf-26	5	1113	91	94	91
Армения					
Vaf-45	7	1199	82	93	80
		1010	78	90	79
Vaf-72		1199	82	93	80
		1010	78	90	79
Vaf-46	8	1199	82	93	80
		1010	78	90	79
Vaf-51		1199	82	93	80
		1010	78	90	79
Дагестан					
VD1/1k	1D	1105	92	86	87
VD1/9m		1287	86	94	75
VD3/2(1)	3D	1032	82	83	77
VD3/7k		1032	82	83	77
VD6/12k	6D	1032	82	83	77
VD6/13m		1032	82	83	77
VD7/1	7D	1032	82	83	77
VD7/20m		1032	82	83	77

ITS-дендрограмма показывает, что все исследуемые штаммы относились к семейству *Rhizobiaceae* и попадали в две группы бактериальных видов, несущие разные типы рибосомального оперона (кластеры I и II). Причем принадлежность к одной или другой группе не зависела от вида штамма или географического распространения. Виды *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. etli* присутствовали в обеих группах, как и разные изоляты из вавиловии прекрасной армянского и дагестанского происхождения. Возможно, такое деление было обусловлено наличием лишь нескольких типов хромосом, обеспечивающих адаптацию к среде и жизнеспособность бактерий.

Штаммы ризобий, выделенные из клубеньков вавиловии, не фор-

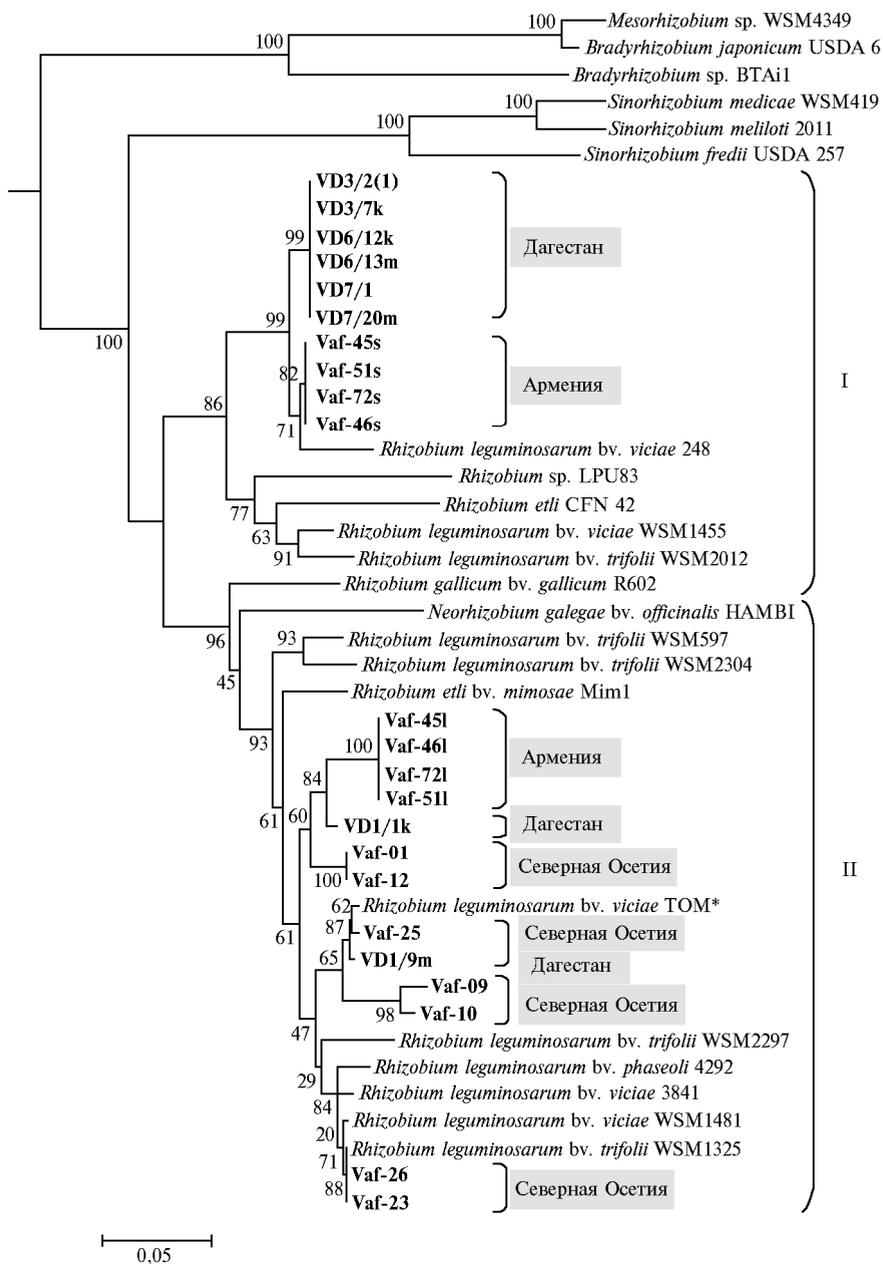
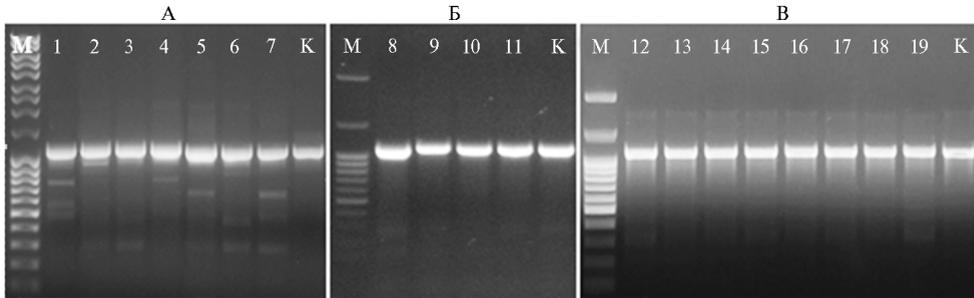


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное с использованием метода ближайших соседей на основе фрагмента последовательности ITS (758 п.н.) и отражающее таксономическое положение исследованных штаммов ризобий из клубеньков вавиловии прекрасной (*Vavilovia formosa* (Stev.) Fed.) разного географического происхождения. На ветвях указаны значения bootstrap > 45 (1000 реплик). I, II — статистически достоверные кластеры. Звездочкой помечен штамм-носитель гена *nodX*; s (short) и l (long) — штаммы из Армении, несущие две разные копии фрагмента ITS. Жирным шрифтом выделены изученные штаммы.

мировали отдельного кластера, но распались на группы. По составу этих групп можно было судить о тенденции изучаемых изолятов к географической изоляции. Все штаммы из Армении, а также 6 из 8 штаммов из Дагестана образовывали кластеры с высокой статистической поддержкой (> 82 %) и входили в I группу. Фрагменты ITS штаммов вавиловии из Северной Осетии встречались только во II группе, и эти штаммы объединялись со штаммами из своего региона (Vaf-01 и Vaf-12, Vaf-09 и

Vaf-10, Vaf-23 и Vaf-26). Исключением стал штамм Vaf-25, который образовывал одну группу со штаммами VD1/9m из Дагестана и *R. leguminosarum* bv. *viciae* ТОМ (носителем гена *nodX*) при уровне поддержки 87 %. Подобная кластеризация была показана ранее только для изолятов из Северной Осетии (8). В связи с этим мы проверили изоляты из регионов Дагестана и Армении на наличие гена *nodX* (рис. 2). Все они оказались носителями этого гена.



**Рис. 2.** Результат ПЦР анализа североосетинских (А), армянских (Б) и дагестанских (В) изолятов ризобий из клубеньков вавиловии прекрасной *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. с праймерами omP196/omP199: 1 — Vaf-01, 2 — Vaf-09, 3 — Vaf-10, 4 — Vaf-12, 5 — Vaf-23, 6 — Vaf-25, 7 — Vaf-26, 8 — Vaf-45, 9 — Vaf-72, 10 — Vaf-46, 11 — Vaf-51, 12 — VD1/1k, 13 — VD1/9m, 14 — VD3/2(1), 15 — VD3/7k, 16 — VD6/12k, 17 — VD6/13m, 18 — VD7/1, 19 — VD7/20m. Контроль (К) — ДНК штамма *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* A1. Маркеры молекулярной массы (М) — MassRuler (Thermo Scientific, США) (А) и 100 bp + 1,5 Kb + 3Kb («Сибэнзим», Россия) (Б, В).

Важно отметить, что последовательность ITS, которая представляет коровую часть генома, дает нам понимание только таксономической принадлежности изучаемых штаммов. Вопрос о хозяйской специфичности ризобий можно решить, изучая гены, вовлеченные в образование бобово-ризобиального симбиоза. К ним относятся гены из *nod* оперонов (23). В нашем исследовании мы рассматриваем ген *nodA*, который, хоть и не участвует в непосредственном контроле специфичности симбиоза, сцеплен с генами, кодирующими эти факторы специфичности. Преимущество использования именно этого гена заключается в том, что в геномах ризобий он представлен только одной копией (18).

Дендрограммы, построенные на основе последовательностей ITS-региона и гена *nodA*, существенно различались между собой (рис. 1, 3). На *nodA*-дендрограмме все исследуемые изоляты формировали единый кластер при уровне поддержки 100 % со штаммами, принадлежащими *R. leguminosarum* bv. *viciae*, что позволяет отнести их к группе перекрестной инокуляции гороха. На основании анализа гена *nodA* внутри этого кластера изоляты были разделены на три группы, не соответствующие ITS-группам. Так, изоляты из Северной Осетии и Дагестана совместно сформировали группы I и III, а Армянские изоляты вошли только в группу II (см. рис. 3). Стоит отметить, что на *nodA*-дендрограмме штамм *R. leguminosarum* bv. *viciae* ТОМ оказался наиболее близкородственным по отношению к изучаемым изолятам. Еще одна немаловажная особенность, позволяющая судить об обособленности изучаемой группы штаммов, состоит в том, что во всех трех кластерах, содержащих изоляты из вавиловии, отсутствовали штаммы из других таксономических групп.

По данным сравнения фрагментов ITS, связь с хозяйской специфичностью у разных групп ризобий не прослеживалась, поскольку значения внутригрупповых и межгрупповых генетических расстояний достоверно не различались (табл. 2). Напротив, можно делать выводы о тенденции

к географической изоляции изучаемых микросимбионтов вавиловии.

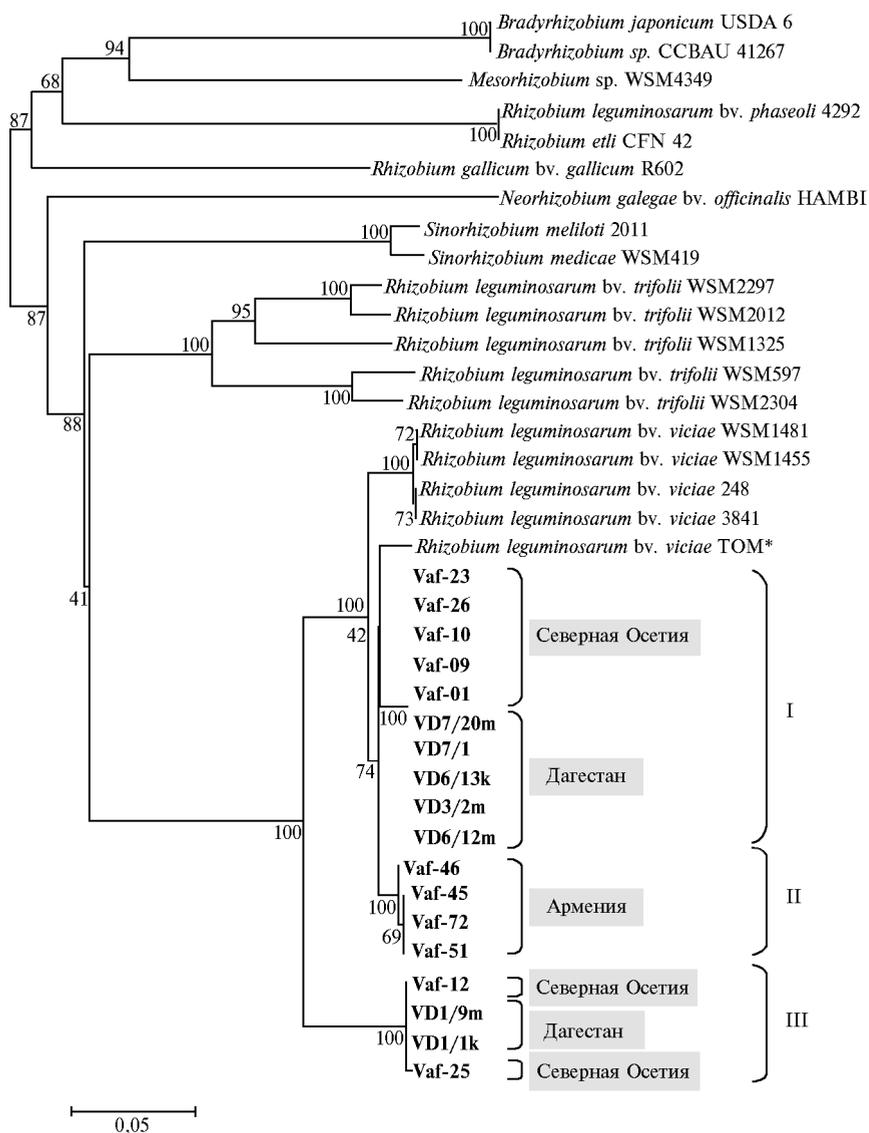


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное с использованием метода ближайших соседей на основе частичной последовательности гена *nodA* (531 п.н.) и отражающее таксономическое положение исследованных штаммов ризобий из клубеньков вавиловии прекрасной *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. разного географического происхождения. На ветвях указаны значения bootstrap > 45 (1000 реплик). I, II, III — статистически достоверные кластеры. Звездочкой помечен штамм-носитель гена *nodX*. Жирным шрифтом выделены изученные штаммы.

## 2. Генетические расстояния по последовательностям ITS и *nodA* у ризобий, выделенных от разных растений-хозяев в различных географических регионах

Штаммы, происхождение	Генетические расстояния	
	ITS	<i>nodA</i>
Корреляция последовательностей ДНК с растением-хозяином		
Сравнения внутри групп:		
из вавиловии ( <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> )	0,082±0,008	0,036±0,005
из гороха ( <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> )	0,115±0,010	0,016±0,003
из клевера ( <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> )	0,089±0,008	0,119±0,010
Межгрупповые сравнения:		
вавилония—горох	0,096±0,008	0,045±0,006
вавилония—клевер	0,099±0,008	0,252±0,015
горох—клевер	0,100±0,008	0,254±0,016

## Корреляция последовательностей ДНК с географическим происхождением

Сравнение внутри групп:		
Армения	0,000±0,000	0,001±0,001
Дагестан	0,054±0,007	0,040±0,005
Северная Осетия	0,050±0,006	0,040±0,005
Межгрупповые сравнения:		
Армения—Дагестан	0,116±0,012	0,039±0,006
Армения—Северная Осетия	0,060±0,007	0,039±0,006
Дагестан—Северная Осетия	0,111±0,011	0,034±0,005

В то же время при сравнении генетических расстояний по гену *nodA* выявлялись четкие корреляции с хозяйской специфичностью, однако связь с географическим происхождением изолятов вавиловии отсутствовала. Поскольку ген *nodA* не участвует в контроле хозяйской специфичности (он кодирует общий для всех ризобий этап синтеза Nod-фактора — присоединение жирнокислотного остатка к олигохитиновой цепи), данная корреляция может быть обусловлена сцеплением *nodA* с генами хозяйской специфичности (эти гены образуют на *Sym*-плазидах *R. leguminosarum* компактные кластеры размером около 20 т.п.н.). Полученные корреляции, по всей видимости, отражают наличие высокоспецифичных взаимодействий каждой группы штаммов *R. leguminosarum* со своими растениями-хозяевами.

Несовпадение дендрограмм, построенных по *nodA* и ITS, позволяет предположить, что находящиеся на плазидах *nod*-гены могут активно переноситься в популяциях *R. leguminosarum*, обеспечивая свободное комбинирование бактериальных генов специфичности к вавиловии и различных вариантов хромосом у штаммов биовара *viciae*, а в некоторых случаях и биовара *trifolii* (последнее подтверждается 100 % сходством ITS-локуса одного из изолятов вавиловии с типовым штаммом WSM2304 и соответствует ранее опубликованным данным о возможности активного переноса *Sym*-плазмид между этими биоварами в природных популяциях).

Таким образом, на основании данных по последовательности ITS показано, что все изученные штаммы ризобий, выделенные из клубеньков вавиловии прекрасной, принадлежат к виду *Rhizobium leguminosarum*. Принимая во внимание результаты филогенетического анализа локуса ITS, а также гена *nodA*, можно утверждать, что эти штаммы относятся к биовару *viciae*. Согласно представленным генетическим расстояниям, все они образуют статистически обособленную группу, внутри которой прослеживается тенденция к географической изоляции и узкой хозяйской специфичности. Формирование обособленных от других штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae* кластеров, а также наличие гена нодуляции афганского гороха *nodX* у всех изолятов, выделенных из *Vavilovia formosa*, могут послужить основой для дальнейшего изучения этой группы клубеньковых бактерий и ее возможного выделения в обособленную таксономическую группу внутри вида *R. leguminosarum*.

<sup>1</sup>ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,

196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,

e-mail: kimeklis@gmail.com;

<sup>2</sup>Горский аграрный университет,

362040 Россия, Республика Северная Осетия-Алания,

г. Владикавказ, ул. Кирова, 37;

<sup>3</sup>ФГБУ Северо-Осетинский государственный природный заповедник,

363240 Россия, Республика Северная Осетия-Алания, г. Алагир,

ул. Ч. Басиевой, 1

Поступила в редакцию

7 июля 2015 года

## PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *Rhizobium* STRAINS, ISOLATED FROM NODULES OF *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed.

A.K. Kimeklis<sup>1</sup>, V.I. Safronova<sup>1</sup>, I.G. Kuznetsova<sup>1</sup>, A.L. Sazanova<sup>1</sup>, A.A. Belimov<sup>1</sup>,  
A.G. Pinaev<sup>1</sup>, E.P. Chizhevskaya<sup>1</sup>, A.R. Pukhaev<sup>2</sup>, K.P. Popov<sup>3</sup>, E.E. Andronov<sup>1</sup>,  
N.A. Provorov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail kimeklis@gmail.com;

<sup>2</sup>Gorsky State Agrarian University, 37, ul. Kirova, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia-Alania, 362040 Russia;

<sup>3</sup>North-Ossetian Nature Reserve, 1, ul. Ch. Basievoi, Alagir, Republic of North Ossetia-Alania, 363240 Russia

Acknowledgements:

Supported by Russian Science Foundation (grant 14-26-00094). The equipment of ARRIAM Center for Genome Technologies, Proteomics and Cell Biology (St. Petersburg) was used

Received July 7, 2015

doi: 10.15389/agrobiology.2015.5.655eng

### Abstract

Among the 5 genera of tribe *Fabeae* the least studied is *Vavilovia* Fed., consisting of the only species *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. *Vavilovia*'s area of growth is limited by the highlands of Central and Eastern Caucasus, with only several known populations on the territories of Armenia, Dagestan, North Ossetia, Azerbaijan, Iran, Iraq, Siria, Turkey, and by the environmental conditions. The only phylogenetic research of rhizobia isolated from the nodules of *vavilovia* from the North Ossetian population demonstrated significance of both slow-growing and fast-growing microsymbionts' specific and genetic diversity. It was shown that all of the fast-growing isolates, belonging to *Rhizobium leguminosarum* species, carry *nodX* gene in their genomes. Three expeditions to the regions of Armenia, Dagestan and North Ossetia succeeded in finding and collecting plants of *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. with its nodules, from which later rhizobia isolates were obtained. We have chosen nineteen fast-growing isolates, derived from ten plants' nodules, to identify their species affiliation, to trace geographical isolation and also to try to track down its genetic differences from rhizobia, which nodulate other plants of tribe *Fabeae*. To make this we sequenced ITS (internally transcribed spacer) fragment and *nodA* gene, and made screening of the isolates for the presence of *nodX* gene, which controls rhizobia host specificity. Obtained sequences were used to calculate genetic distances between groups of rhizobia, i.e. different regions isolates (Armenia, Dagestan, North Ossetia) and isolates from different plant hosts (*vavilovia*, pea, clover). Results of ITS sequencing showed that all strains involved in the analysis belong to *R. leguminosarum* (bv. *viciae*) species. ITS-dendrogram shows relatively high heterogeneity of isolates, but on *nodA*-dendrogram they form a very compact group. Difference in the structure of these dendrograms allows to assume that *nodA* gene, chained with the genes of host specificity, can be easily transferred within the populations of *R. leguminosarum*, providing unlimited combinations of specificity to *vavilovia* with different variants of bacterial chromosome. Comparison of genetic distances based on ITS-sequences for the isolates in this study shows tendency to geographic isolation between them. Data on *nodA*-based genetic distances along with the presence of *nodX* gene in the genomes of all *R. leguminosarum* strains in this study point out the presence of its host specificity within biovar *viciae*. It seems that correlation between strain origin and the genetic structure of *nodA* reflects presence of highly specific interactions among each group of *R. leguminosarum* strains with their plant-hosts, whereas correlations with the structure of ITS-loci reflect rhizobia adaptation to soil environment.

Keywords: *Vavilovia formosa*, *Rhizobium leguminosarum*, legume-rhizobia symbiosis.

### REFERENCES

1. Ljuština M., Miki A. Archaeological evidence for the domestication of lentil (*Lens culinaris*) and its distribution in Europe. *J. Lentil Res.*, 2010, 4: 26–29.
2. Gabrielyan E.T. Rod *Vavilovia* Fed. V knige: *Flora Armenii. Tom 4* /Pod redaktsiei A.L. Takhtadzhyan [Flora of Armenia. V. 4. A.L. Takhtadzhyan (ed.)]. AN SSR Armeniya, Erevan, 1962.
3. Dzyubenko N.I., Dzyubenko E.A. *Vavilovia formosa* (Stev.) An. Fed. *Agroekologicheskii atlas Rossii i soprodel'nykh stran: ekonomicheski znachimye rasteniya, ikh vrediteli, bolezni i sornye rasteniya* / Pod redaktsiei A.N. Afonina, S.L. Grina, N.I. Dzyubenko, A.N. Frolova. [Online Agroecological atlas of Russia and neighbouring countries: economic plants, and their pests, weeds and diseases. A.N. Afonin, S.L. Grin, N.I. Dzyubenko, A.N. Frolov (eds.)] 2008 (online [http://www.agroatlas.ru/ru/content/related/Vavilovia\\_formosa/](http://www.agroatlas.ru/ru/content/related/Vavilovia_formosa/)).
4. Karyagin I.I. Flora Azerbaidzhana. Tom 5 [Flora of Azerbaijan. V. 5]. Baku, 1954.
5. Maxted N., Ambrose M. Peas (*Pisum L.*). In: *Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean* /N. Maxted, S.J. Bennett (eds.). Kluwer, Dordrecht, 2001.

6. Makasheva R.K., Drozd A.M., Adamova O.P., Golubev A.A. Perennial pea. *Bull. Appl. Bot. Gen. Plant Breed.*, 1973, 51: 44-56.
7. Kenicer G., Smýkal P., Vishyakova M., Mikić A. *Vavilovia formosa*, an intriguing *Pisum* relative. *Grain Legumes*, 2009, 51: 8-12.
8. 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. *Antonië van Leeuwenhoek*, 2014, 105: 389-399 (doi: 10.1007/s10482-013-0089-9).
9. 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56: 2206-2212.
10. Kozik A., Heidstra R., Horvath B., Kulikova O., Tikhonovich I., Ellis T.H.N., van Kammen A., Lie T.A., Bisseling T. Pea lines carrying *sym1* or *sym2* can be nodulated by *Rhizobium* strains containing *nodX*; *sym1* and *sym2* are allelic. *Plant Sci.*, 1995, 108: 41-49 (doi: 10.1016/0168-9452(95)04123-C).
11. Zhukov V., Radutoiu S., Madsen L.H., Rychagova T., Ovchinnikova E., Borisov A., Tikhonovich I., Stougaard J. The pea *Sym37* receptor kinase gene controls infection-thread initiation and nodule development. *MPMI*, 2008, 21(12): 1600-1608 (doi: 10.1094/MPMI-21-12-1600).
12. Novikova N., Safronova V. Transconjugants of *Agrobacterium radiobacter* harbouring *sym* genes of *Rhizobium galegae* can form an effective symbiosis with *Medicago sativa*. *FEMS Microbiol Lett.*, 1992, 93: 261-268 (doi: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05107.x).
13. Allen O.N. *Experiments in soil bacteriology*. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 3<sup>d</sup> ed., 1959: 117.
14. Safronova V.I., Tikhonovich I.A. Automated cryobank of microorganisms: Unique possibilities for long-term authorized depositing of commercial microbial strains. In: *Microbes in applied research: current advances and challenges* /A. Mendez-Vilas (ed.). World Scientific Publishing Co., 2012: 331-334 (doi: 10.1142/9789814405041\_0066).
15. Rumyantseva M.L., Simarov B.V., Onishchuk O.P., Andronov E.E., Chizhevskaya E.P., Belova V.S., Kurchak O.N. *Biologicheskoe raznoobrazie kluben'kovykh bakterii v ekosistemakh i agrotsenozakh: teoreticheskie osnovy i metody* [Biodiversity of rhizobia in ecosystems and agrocenoses: theoretical bases and methods]. St. Petersburg—Pushkin, 2011.
16. Normand P., Ponsonnet C., Nesme X., Neyra M., Simonet P. ITS analysis of prokaryotes. In: *Molecular microbial ecology manual* /A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1996: 1-12.
17. Ponsonnet C., Nesme X. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Arch. Microbiol.*, 1994, 161: 300-309 (doi: 10.1007/BF00303584).
18. Haukka K., Lindstrom K., Young J.P. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 419-426.
19. Andronov E.E., Pinaev A.G., Pershina E.V., Chizhevskaya E.P. *Nauchno-metodicheskie rekomendatsii po vydeleniyu vysokoochishchennykh preparatov DNK iz ob'ektov okruzhayushchei sredy* [Recommendations on highly purified DNAs isolation from environmental objects]. St. Petersburg, 2011.
20. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 2012, 28: 1166-1167 (doi: 10.1093/bioinformatics/bts091).
21. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, 28: 2731-2739 (doi: 10.1093/molbev/msr121).
22. Ovtyna A.O., Rademaker G.-J., Esser E., Weinman J., Rolfe B.G., Tikhonovich I.A., Lugtenberg B.J.J., Thomas-Oates J.E., Spaink H.P. Comparison of characteristics of the *nodX* genes from various *Rhizobium leguminosarum* strains. *MPMI*, 1999, 12: 252-258 (doi: 10.1094/MPMI.1999.12.3.252).
23. Laguerre G., Nour S.M., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P., Amarger N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, 2001, 147: 981-993 (doi: 10.1099/00221287-147-4-981).