

**БИОМЕХАНИКА И БИОИНЖЕНЕРИЯ/BIOMECHANICS AND BIOENGINEERING**DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2026.31.4>

EDN: FWVRUY

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭВОЛЮЦИИ СИМБИОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ СОИ НА ОСНОВЕ МУЛЬТИЛОКУСНОГО АНАЛИЗА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Научная статья

Ореховская А.^{1*}, Клёсов Д.²¹ORCID : 0000-0001-8149-7191;²ORCID : 0000-0003-4556-6246;¹ Белгородский государственный аграрный университет, Майский, Российская Федерация² МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (i[at]aorehovskaja.ru)

Аннотация

В работе представлен биоинформатический анализ эволюции симбиотических генов клубеньковых бактерий сои (*Glycine max* L.) на основе мультилокусного анализа последовательностей (MLSA). Исследование выполнено на штаммах ризобий родов *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*, выделенных из ризосферы сои в условиях Белгородской области. Для хромосомных маркеров (16S *rPHK*, *rpoB*, *ITS*) и симбиотических генов (*nodC*, *nodD*, *nifH*) проведены выравнивание последовательностей, расчёт показателей нуклеотидного разнообразия и реконструкция филогенетических деревьев. Показано, что симбиотические гены характеризуются существенно более высоким уровнем нуклеотидного полиморфизма по сравнению с хромосомными маркерами. Филогенетический анализ выявил устойчивую кластеризацию штаммов по хромосомным генам и повышенную вариабельность симбиотических детерминант, что указывает на их особую роль в адаптации микросимбионтов к растению-хозяину. Полученные результаты подтверждают эффективность MLSA-подхода для биоинформатического изучения эволюции симбиотических признаков ризобий сои.

Ключевые слова: MLSA, симбиотические гены, *Bradyrhizobium*, нуклеотидный полиморфизм, эволюция, соя.**BIOINFORMATIC ANALYSIS OF THE EVOLUTION OF SYMBIOTIC GENES IN SOYBEAN NODULE BACTERIA BASED ON MULTI-LOCUS SEQUENCE ANALYSIS**

Research article

Orehovskaya A.^{1*}, Klyosov D.²¹ORCID : 0000-0001-8149-7191;²ORCID : 0000-0003-4556-6246;¹Belgorod State Agricultural University, Maysky, Russian Federation²MIREA – Russian Technological University, Moscow, Russian Federation

* Corresponding author (i[at]aorehovskaja.ru)

Abstract

The work presents a bioinformatic analysis of the evolution of symbiotic genes in soybean (*Glycine max* L.) nodule bacteria based on multilocus sequence analysis (MLSA). The study was conducted on strains of rhizobia of the genera *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*, isolated from the rhizosphere of soybeans in Belgorod Oblast. For chromosomal markers (16S *rRNA*, *rpoB*, *ITS*) and symbiotic genes (*nodC*, *nodD*, *nifH*), sequence alignment, calculation of nucleotide diversity indices and reconstruction of phylogenetic trees were carried out. It was shown that symbiotic genes are characterised by a significantly higher level of nucleotide polymorphism compared to chromosomal markers. Phylogenetic analysis identified stable clustering of strains based on chromosomal genes and increased variability of symbiotic determinants, indicating their special role in the adaptation of microsymbionts to the host plant. The obtained results confirm the effectiveness of the MLSA approach for the bioinformatic study of the evolution of symbiotic traits in soybean rhizobia.

Keywords: MLSA, symbiotic genes, *Bradyrhizobium*, nucleotide polymorphism, evolution, soybean.**Введение**

Симбиотическая фиксация атмосферного азота бобовыми растениями является одним из ключевых биологических процессов, обеспечивающих устойчивость агроэкосистем и снижение зависимости от минеральных удобрений [1], [2]. Соя (*Glycine max* L.) формирует специализированный симбиоз с клубеньковыми бактериями, преимущественно относящимися к родам *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*, геномы которых содержат гены, ответственные за нодуляцию и фиксацию азота [3]. Традиционно для таксономической идентификации ризобий используется анализ гена 16S *rPHK*, однако многочисленные исследования показали его ограниченную разрешающую способность на видовом и внутривидовом уровнях [4]. В отличие от него, белок-кодирующие хромосомные гены, такие как *rpoB*, а также межгенные регионы, демонстрируют более высокий уровень изменчивости и позволяют более точно разграничивать близкородственные таксоны [5].

Особый интерес в последние годы вызывает изучение симбиотических генов (*nod*, *nif*), поскольку именно они определяют эффективность взаимодействия бактерии с растением-хозяином. Эти гены часто локализованы на

симбиотических плазидах или островках генома и подвержены горизонтальному переносу, что приводит к несоответствию между эволюцией хромосомного генома и симбиотических признаков [6], [7], [8].

С точки зрения биоинформатики это формирует важную научную задачу — сравнительный анализ эволюционных траекторий хромосомных и симбиотических генов. Мультилокусный анализ последовательностей (MLSA) позволяет интегрировать данные по маркерам различной степени консервативности и выявлять различия в уровне нуклеотидной изменчивости, отражающие как таксономические, так и адаптивные процессы. Применение MLSA-подхода открывает возможности для более глубокого понимания эволюции симбиотических признаков клубеньковых бактерий и оценки их роли в формировании эффективного симбиоза с соей [9], [10].

Целью настоящей работы являлся биоинформатический анализ эволюции симбиотических генов клубеньковых бактерий сои на основе мультилокусного анализа хромосомных и симбиотических маркеров.

Методы и принципы исследования

2.1. Биологический материал

Объектом исследования служили штаммы клубеньковых бактерий, выделенные из корневых клубеньков сои (*Glycine max* L.), выращенной на опытных участках Белгородского ГАУ. Чистые культуры получали на среде Виноградского и использовали для последующего молекулярно-генетического анализа.

2.2. Получение и обработка нуклеотидных последовательностей

Из полученных штаммов были амплифицированы и секвенированы фрагменты хромосомных генов 16S *rPHK*, *rpoB*, межгенного региона *ITS* (16S–23S *rPHK*), а также симбиотических генов *nodC*, *nodD* и *nifH*. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в агарозном геле (рис. 1).

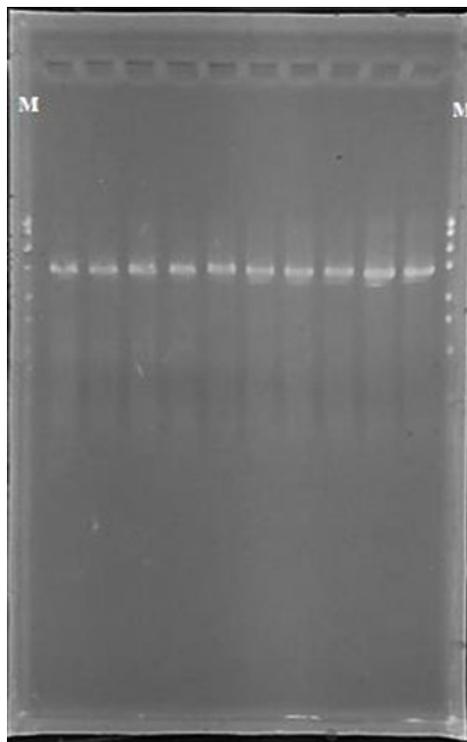


Рисунок 1 - Электроферограмма продуктов амплификации генов 16S *rPHK*, *rpoB*, *nodC*:
 М – маркеры молекулярной массы; дорожки 1-8 – амплифицированные образцы штаммов *Bradyrhizobium* sp. из клубеньков сои

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2026.31.4.1>

На электроферограмме отчётливо видны восемь дорожек с чёткими однотипными полосами без смазывания, что свидетельствует о высокой специфичности амплификации и отсутствии деградации ДНК. Полосы соответствуют ожидаемой длине амплифицированных фрагментов (около 900 п.о. для *rpoB*).

2.3. Биоинформатический анализ

Редактирование и формирование консенсусных нуклеотидных последовательностей выполняли в программе *BioEdit* v7.2.5. Множественное выравнивание последовательностей проводили с использованием алгоритма *ClustalW* в программной среде *MEGA X*. Показатели нуклеотидного разнообразия (Pi) и количество полиморфных сайтов (S) рассчитывали с помощью программы *DnaSP* v5.10. Филогенетические деревья реконструировали методом *neighbor-joining* с использованием модели эволюционных расстояний *Kimura 2-parameter* и bootstrap-анализа (1000 реплик).

Основные результаты

3.1. Нуклеотидное разнообразие хромосомных и симбиотических маркеров

Хромосомные маркеры характеризовались низким уровнем нуклеотидной изменчивости. Ген *16S рРНК* демонстрировал минимальные значения P_i , что отражает его высокую консервативность. Ген *rpoB* обладал более высоким уровнем полиморфизма и обеспечивал лучшую дифференциацию штаммов.

Симбиотические гены (*nodC*, *nodD*, *nifH*) отличались существенно более высоким нуклеотидным разнообразием (табл. 1), что указывает на интенсивные эволюционные процессы и возможную адаптацию к растению-хозяину.

Таблица 1 - Нуклеотидное разнообразие маркеров ризобий-симбионтов сои

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2026.31.4.2>

Род бактерий	Маркер	Длина, п.о.	P_i	S	Характеристика
<i>Rhizobium</i>	<i>16S рРНК</i>	1317	0,0123	120	Консервативный
<i>Rhizobium</i>	<i>rpoB</i>	934	0,0629	312	Дифференцирующий
<i>Rhizobium</i>	<i>nodC</i>	804	0,1356	364	Высокополиморфный
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>16S рРНК</i>	1444	0,0051	48	Консервативный
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>rpoB</i>	940	0,0377	131	Среднеполиморфный
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>nodC</i>	780	0,0382	287	Симбиотический

3.2. Филогенетический анализ

Филогенетический анализ показал четкое разделение исследованных штаммов на три устойчивых кластера, соответствующих видам *B. japonicum*, *B. diazoefficiens* и *B. ottawaense* (рис. 2). Доминирующим видом оказался *B. japonicum*, представленный большинством изолятов, что указывает на его экологическую адаптацию к почвенно-климатическим условиям Белгородской области. Кластер *B. diazoefficiens* характеризовался высокой внутригрупповой однородностью, тогда как представители *B. ottawaense* демонстрировали повышенную вариабельность симбиотических генов, что может отражать адаптивные процессы и эволюционную пластичность данных штаммов.

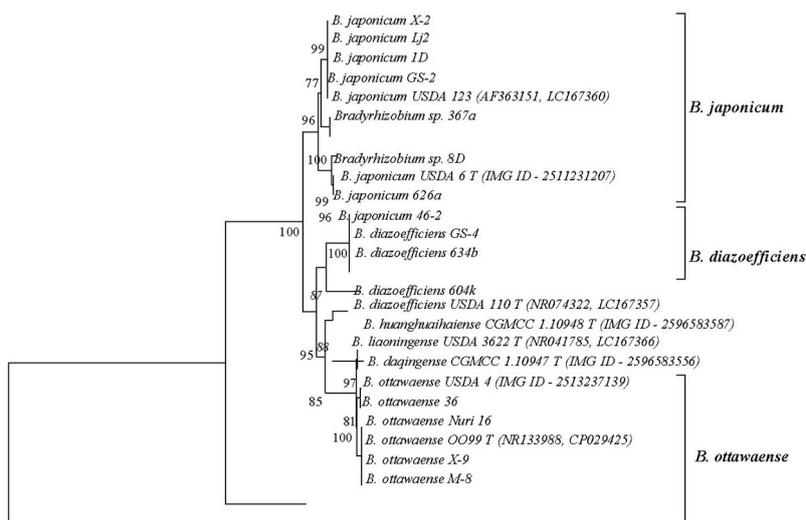


Рисунок 2 - Филогенетическое дерево клубеньковых бактерий сои, построенное на основе мультилокусного анализа хромосомных генов

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2026.31.4.3>

Обсуждение

Выбор генетических маркеров для изучения клубеньковых бактерий является критически важным аспектом исследований. Традиционно используемый ген *16S рРНК*, несмотря на свою универсальность, часто оказывается недостаточно информативным для видовой дифференциации из-за своей высокой консервативности. В то же время



белок-кодирующие гены, такие как *groB* и *gyrB*, а также межгенный регион *ITS*, демонстрируют более высокий уровень полиморфизма, что делает их предпочтительными для филогенетических исследований.

Симбиотические гены, такие как *nodC* и *nifH*, играют ключевую роль в формировании клубеньков и фиксации азота, но их использование для таксономии ограничено из-за частого горизонтального переноса между различными штаммами. Тем не менее, эти гены представляют большой интерес для изучения эволюции симбиоза и адаптации бактерий к конкретным растениям-хозяевам.

Практическое значение данного исследования заключается в возможности использования полученных данных для подбора эффективных штаммов-инокулянтов, способных повысить урожайность сои. Кроме того, понимание генетического разнообразия клубеньковых бактерий может способствовать разработке новых биотехнологических подходов в сельском хозяйстве.

Заключение

В ходе исследования проведён биоинформатический мультилокусный анализ эволюции симбиотических генов клубеньковых бактерий сои. Показано, что симбиотические гены (*nodC*, *nodD*, *nifH*) характеризуются существенно более высоким уровнем нуклеотидного полиморфизма по сравнению с хромосомными маркерами, что отражает их важную роль в адаптации микросимбионтов к растению-хозяину.

Филогенетический анализ подтвердил эффективность MLSA-подхода для разграничения близкородственных видов рода *Bradyrhizobium* и выявления внутривидового разнообразия. Полученные результаты подчёркивают значимость биоинформатических методов для изучения эволюции симбиотических признаков и могут быть использованы при отборе перспективных штаммов-инокулянтов для агробиотехнологических применений.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Макаров М.И. Симбиотическая азотфиксация бобовыми растениями альпийских экосистем: вегетационный эксперимент / М.И. Макаров, В.Г. Онипченко, Т.И. Малышева [и др.] // Экология. — 2021. — № 1. — С. 12–20. — DOI: 10.31857/S0367059721010091.
2. Князева Д.Б. Продуктивность сои в зависимости от степени развития корневой системы / Д.Б. Князева, Б.М. Князев // Труды Кубанского государственного аграрного университета. — 2021. — № 96. — С. 114–117. — DOI: 10.21515/1999-1703-96-114-117.
3. Проворов Н.А. Геномная эволюция α -протеобактерий в системе симбиоза / Н.А. Проворов, Е.Е. Андронов // Микробиология. — 2024. — № 93 (6). — С. 678–689. — DOI: 10.31857/S0026365624060018.
4. Chirak E.R. Search for ancestral features in genomes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* strains isolated from the relict legume *Vavilovia formosa* / E.R. Chirak, A.K. Kimeklis, E.S. Karasev [et al.] // Genes. — 2019. — Т. 10. — № 12. — 990 p. — DOI: 10.3390/genes10120990.
5. Смирнова И.Э. Выделение и идентификация ризобий, перспективных для создания биоудобрения для культуры сои (*Glucine max* (L.) Merr.) / И.Э. Смирнова, Г.Б. Баймаханова, Э.Р. Файзулина и др. // Научное обозрение. Биологические науки. — 2022. — № 1. — С. 38–43.
6. Волкова О.С. Изучение множественного встраивания модифицированных нуклеотидов в растущую цепь ДНК / О.С. Волкова, А.В. Чудинов, С.А. Лапа // Тонкие химические технологии. — 2021. — № 16 (2). — С. 148–155. — DOI: 10.32362/2410-6593-2021-16-2-148-155.
7. Дмитриев А.А. Секвенирование геномов растений: современные технологии и новые возможности для селекции / А.А. Дмитриев, Е.Н. Пушкова, Н.В. Мельникова // Молекулярная биология. — 2022. — № 56 (4). — С. 531–545. — DOI: 10.31857/S0026898422040048.
8. Tsyganov V.E. Symbiotic regulatory genes controlling nodule development in *pisum sativum* L. / V.E. Tsyganov, A.V. Tsyganova // Plants. — 2020. — № 9 (12). — P. 1–29. — DOI: 10.3390/plants9121741.
9. Пензин А.А. In silico дизайн праймеров для профилирования запасных белков сои / А.А. Пензин, П.Д. Тимкин // Journal of Bioinformatics and Genomics. — 2023. — № 3 (21). — DOI: 10.18454/jbg.2023.21.4.
10. Проворов Н.А. Сельскохозяйственная микробиология и симбиогенетика: синтез классических идей и конструирование высокопродуктивных агроценозов (обзор) / Н.А. Проворов, И.А. Тихонович // Сельскохозяйственная биология. — 2022. — № 57 (5). — С. 821–831. — DOI: 10.15389/agrobiology.2022.5.821rus.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Makarov M.I. Simbioticheskaya azotfiksatsiya bobovimi rasteniyami alpiiskikh ekosistem: vegetatsionnii eksperiment [Symbiotic nitrogen fixation by leguminous plants of Alpine ecosystems: a vegetation experiment] / M.I. Makarov, V.G. Onipchenko, T.I. Malisheva [et al.] // Ekologiya [Ecology]. — 2021. — № 1. — P. 12–20. — DOI: 10.31857/S0367059721010091. [in Russian]



2. Knyazeva D.B. Produktivnost soi v zavisimosti ot stepeni razvitiya kornevoi sistemi [Soybean productivity depends on the degree of root system development] / D.B. Knyazeva, B.M. Knyazev // Trudi Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta [Proceedings of the Kuban State Agrarian University]. — 2021. — № 96. — P. 114–117. — DOI: 10.21515/1999-1703-96-114-117. [in Russian]
3. Provorov N.A. Genomnaya evolyutsiya a-proteobakterii v sisteme simbioza [Genomic evolution of a-proteobacteria in the symbiosis system] / N.A. Provorov, E.E. Andronov // Mikrobiologiya [Microbiology]. — 2024. — № 93 (6). — P. 678–689. — DOI: 10.31857/S0026365624060018. [in Russian]
4. Chirak E.R. Search for ancestral features in genomes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* strains isolated from the relict legume *Vavilovia formosa* / E.R. Chirak, A.K. Kimeklis, E.S. Karasev [et al.] // Genes. — 2019. — T. 10. — № 12. — 990 p. — DOI: 10.3390/genes10120990.
5. Smirnova I.E'. Vy'delenie i identifikatsiya rizobij, perspektivny'x dlya sozdaniya bioudobreniya dlya kul'tury' soi (*Glycine max* (L.) Merr.) [Isolation and identification of rhizobia promising for the creation of biofertilizer for soybean culture (*Glycine max* (L.) Merr.)] / I.E'. Smirnova, G.B. Bajmaxanova, E'.R. Fajzulina et al. // Scientific review. Biological Sciences. — 2022. — № 1. — P. 38–43. [in Russian]
6. Volkova O.S. Izuchenie mnozhestvennogo vstraivaniya modifitsirovannikh nukleotidov v rastushchuyu tsep DNK [Study of multiple incorporation of modified nucleotides into a growing DNA chain] / O.S. Volkova, A.V. Chudinov, S.A. Lapa // Tonkie khimicheskie tekhnologii [Fine chemical technologies]. — 2021. — № 16 (2). — P. 148–155. — DOI: 10.32362/2410-6593-2021-16-2-148-155. [in Russian]
7. Dmitriev A.A. Секвенирование геномов растений: современные технологии и новые возможности для селекции [Sequencing of plant genomes: modern technologies and new opportunities for breeding] / A.A. Dmitriev, E.N. Pushkova, N.V. Melnikova // Молекулярная биология [Molecular Biology]. — 2022. — № 56 (4). — P. 531–545. — DOI: 10.31857/S0026898422040048. [in Russian]
8. Tsyganov V.E. Symbiotic regulatory genes controlling nodule development in *pisum sativum* L. / V.E. Tsyganov, A.V. Tsyganova // Plants. — 2020. — № 9 (12). — P. 1–29. — DOI: 10.3390/plants9121741.
9. Penzin A.A. In silico dizain praimerov dlya profilirovaniya zapasnikh belkov soi [In silico design of primers for profiling of soy reserve proteins] / A.A. Penzin, P.D. Timkin // Journal of Bioinformatics and Genomics [Journal of Bioinformatics and Genomics]. — 2023. — № 3 (21). — DOI: 10.18454/jbg.2023.21.4. [in Russian]
10. Provorov N.A. Selskokhozyaistvennaya mikrobiologiya i simbiogenetika: sintez klassicheskikh idei i konstruirovaniye visokoproduktivnykh agrotsenozov (obzor) [Agricultural microbiology and symbiogenetics: synthesis of classical ideas and construction of highly productive agrocenoses (review)] / N.A. Provorov, I.A. Tikhonovich // Selskokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]. — 2022. — № 57 (5). — P. 821–831. — DOI: 10.15389/agrobiology.2022.5.821rus. [in Russian]