***Vavilovia formosa* rhizobia symbionts belong to *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* species, but form a separate group within it**

Kimeklis A.K.¹, Aksenova T.S.¹, Gladkov G.V.¹, Kuznetsova I.G.¹, Sazanova A.L.¹, Safronova V.I.¹, Belimov A.A.¹,
Onishchuk O.P.¹, Kurchak O.N.¹, Pinaev A.G.¹, Andronov E.E.^{1,2,3}, Provorov N.A.¹

¹ARRIAM, Pushkin, Russia; ²SPbSU, Saint-Petersburg, Russia; ³V.V. Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, Russia
E-mail: kimeklis@gmail.com

Key message. Ecological isolation, group separation of *hkg* and *sym* genes, along with the results of the sterile tube test demonstrate that symbionts of *V. formosa* belong to *R. leguminosarum* bv. *viciae* species, but form a separate group within it.

Keywords: *Vavilovia formosa*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, group separation, house-keeping genes, symbiotic genes, *nodX*

Vavilovia formosa is considered to be closest to its last common ancestor (LCA) of *Fabeae* tribe. Apart from *Vavilovia*, this tribe consists of four other plant genera, which are *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*, and *Lens*. These genera are cross-inoculated by rhizobia belonging to *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (*Rlv*). In contrast to biovar *viciae*, bacteria from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* (*Rlt*) inoculate plants from the *Trifolieae* tribe. The aim of this work was to determine the position of *vavilovia* symbionts within *R. leguminosarum*. Twenty-two rhizobia strains were isolated from *vavilovia* plants from three distinct populations (North Ossetia, Dagestan, and Armenia). Set of house-keeping (*hkg*: 16S rRNA, *glnII*, *gltA*, and *dnaK*) and symbiotic (*sym*: *nodA*, *nodC*, *nodD*, and *nifH*) genes from these strains, along with *Rlv* and *Rlt* strains from GeneBank were used for this study. Nucleotide distances were aligned and used to construct phylogenies and to calculate group separation between rhizobia groups. Comparison of *hkg* and *sym* genes of the symbionts of *V. formosa* with those of other *Rlv* and *Rlt* strains reveals a significant group separation, which was most pronounced for *sym* genes. A remarkable feature of the strains isolated from *V. formosa* was the presence of the *nodX* gene, which was commonly found in *Rlv* strains isolated from Afghanistan pea genotypes. Tube testing of different strains on nine plant species, including all genera from the *Fabeae* tribe, demonstrated that the strains from *V. formosa* nodulated the same cross inoculation group as the other *Rlv* strains. Comparison of nucleotide similarity in *sym* genes suggested that their diversification within *sym*-biotypes of *Rlv* was elicited by host plants. Contrariwise, diversification of *hkg* genes could be caused by either local adaptation to soil niches or by genetic drift. Long-term ecological isolation, genetic separation, and the ancestral position of *V. formosa* suggested that symbionts of *V. formosa* could be responsible for preserving ancestral genotypes of the *Rlv* biovar. This work is supported by RSF grant 19-16-00081.

Ризобияльные симбионты *Vavilovia formosa* принадлежат к виду *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, но образуют внутри него обособленную группу

Кимеклис А.К.¹, Аксёнова Т.С.¹, Гладков Г.В.¹, Кузнецова И.Г.¹, Сазанова А.Л.¹, Сафронова В.И.¹, Белимов А.А.¹,
Онищук О.П.¹, Курчак О.Н.¹, Пинаев А.Г.¹, Андронов Е.Е.^{1,2,3}, Проворов Н.А.¹

¹ФГБНУ ВНИИСХМ, Пушкин, Россия; ²СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия; ³Почвенный институт им. В.В. Докучаева РАН, Москва, Россия

Аннотация. Экологическая изоляция, групповое обособление по нуклеотидным расстояниям и результат микровегетационного опыта указывают на то, что симбионты *V. formosa* принадлежат к виду *Rlv*, но образуют обособленную группу внутри него.

Ключевые слова: *Vavilovia formosa*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, обособление групп, гены домашнего хозяйства, симбиотические гены, *nodX*

Vavilovia formosa считается ближайшим родственником к последнему общему предку трибы *Fabeae*. Помимо *Vavilovia*, к этой трибе относятся четыре других рода растений: *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* и *Lens*. Эти роды образуют группу перекрестной инокуляции с ризобиями, принадлежащими к виду *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (*Rlv*). В отличие от *Rlv*, бактерии из *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (*Rlt*) инокулируют растения из трибы *Trifolieae*. Целью данной работы было определение таксономического положения симбионтов *vavilovia* внутри вида *R. leguminosarum*. Всего было изучено 22 штамма ризобии из растений *vavilovia* из трех различных популяций (Северная Осетия, Дагестан и Армения). Для этого исследования использовали набор генов домашнего хозяйства (*hkg*: 16S рРНК, *glnII*, *gltA* и *dnaK*) и симбиотических генов (*sym*: *nodA*, *nodC*, *nodD* и *nifH*) из этих штаммов, а также *Rlv* и *Rlt* штаммов из GeneBank. Нуклеотидные последовательности были выровнены и использованы для построения филогений и для расчета группового обособления между изучаемыми группами ризобий. Сравнение генов *hkg* и *sym* симбионтов *V. formosa* с генами других штаммов *Rlv* и *Rlt* выявило значительное обособление групп, которое было наиболее выражено для *sym* генов. Примечательной особенностью штаммов, выделенных из *V. formosa*, было наличие гена *nodX*, который характерен для симбионтов «афганского» гороха. Микровегетационный опыт с использованием симбионтов *vavilovia* и 9 различных видов растений из трибы *Fabeae* продемонстрировал, что штаммы из *V. formosa* принадлежат к группе перекрестной инокуляции *Rlv*. Сравнительный анализ нуклеотидного разнообразия сим-генов показал, что их разнообразие в пределах *Rlv* могло быть вызвано растениями-хозяевами, независимо от места изоляции. Напротив, диверсификация *hkg* могла быть вызвана либо локальной адаптацией к нишам почвы, либо генетическим дрейфом. Долгосрочная экологическая изоляция, нуклеотидное обособление групп ризобий, а также анцестральный статус хозяина позволяют предположить, что симбионты *V. formosa* могут выступать в качестве хранилища анцестральных черт генотипов вида *Rlv*.

Данная работа была выполнена при поддержке грантом РФФИ 19-16-00081.