

مطالعه اثر مراحل نمو در شکل دهی جمعیت های میکروبی در

ریشه گاه گندم

Effect of developmental stages on microbial community in wheat rhizosphere

ندا ملکی تبریزی^۱، علی اکبر شاهنجات بوشهری^{*۱}، قاسم حسینی سالکده^۲

۱- به ترتیب دانش آموخته دکتری، استاد، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی دانشگاه تهران، گروه زراعت و

اصلاح نباتات

۲- استاد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

Maleki Tabrizi N¹, Shahnejat Bushehri AA^{*1}, Hosseini Salekdeh Gh²

1- Graduated PhD Student, Professor, Department of Plant breeding and Agronomy, Faculty of Agricultural Science and Engineering, University of Tehran

2- Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ashah@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

همه گیاهان در انواع بافت هایشان تعداد زیادی ریزسازواره دارند که بروی بسیاری از اعمال میزبان خود موثر هستند. عمده ترین بخش حضور ریزسازواره ها منطقه ریشه گاه است که در مجاورت ریشه گیاهان قرار دارد. سازواره های همراه ریشه نقش مهمی در ارتقا رشد و سلامت میزبان دارند. شناسایی ترکیب جمعیتی این ژنوم مکمل، در علوم کشاورزی بسیار مهم است، چرا که می تواند وابستگی کشت و زرع را به استفاده از کودهای شیمیایی مضر کم تر کند. براساس روش های مرسوم آزمایشگاهی شناسایی بخش عمده ای از این جمعیت همچنان ناشناخته باقی مانده است زیرا کمتر از یک درصد جمعیت های باکتریایی محیط های خشکی امکان ایزوله شدن در محیط های کشت خالص را دارند. روش های توالی یابی نسل جدید امکان شناسایی جمعیت های میکروبی موجود در اکوسیستم های مختلف را به صورت مستقل از کشت و از طریق تکنیکی با نام متاژنومیکس فراهم می کنند. در این مقاله شناسایی باکتری ها منطقه ریشه گاه گندم در دو نقطه زمانی مرتبط با مراحل رشد رویشی و زایشی، در کشت دیم بدون تناوب، براساس توالی یابی ژن *16S rRNA* انجام گرفت. براساس نتایج به دست آمده، شاخه های باکتریایی پروتئوباکتری ها، باکترئیدت ها، اکتینوباکتری ها، سیانوباکتری ها و جنس های خاصی در این شاخه ها الگوی توزیع متفاوتی را در این دو مرحله نشان دادند. نتایج نشان داد که گیاه می تواند مجموعه خاصی از باکتری ها را متناسب با مرحله نمو خود برای انجام اعمال خاص مطلوب در آن مرحله، برگزیند که نقش مهمی در حفظ سلامت آن ها دارد. از آنجایی که، شناخت ساختار جمعیتی باکتری های همراه ریشه، پیش نیاز اصلی برای تعیین نقش تک تک افراد جمعیت است، متاژنومیکس می تواند پاسخ های مهمی را در ارتباط با این بخش بزرگ غیر قابل کشت فراهم کند.

واژه های کلیدی

ریزسازواره

ریشه گاه

توالی یابی نسل جدید

متاژنومیکس

مقدمه

جمعیت جهان در حال رشد است و در این میان کشاورزی نقش بسیار مهمی در تامین غذای انسان‌ها دارد. از زمان انقلاب سبز تا کنون، تولید محصولات زراعی در سرتاسر جهان متکی به استفاده از کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها بوده است (Raja et al. 2013). تاثیرات منفی این محصولات روی محیط زیست و سلامت انسان امروزه کاملا شناخته شده‌است (Conway and Pretty 2013; McGuinness 1993). از آنجایی که این ترکیبات شیمیایی در مقیاس انبوه به کار می‌روند و درعین حال کارایی اسیمپلاسیون آن‌ها در گیاه پایین است، منجر به آلودگی‌های گسترده در محیط زیست می‌شوند (Altieri and Nicholis 2005). بنابراین سیستم‌های کشاورزی نیازمند تغییرات قابل توجهی در کاهش استفاده از این ترکیبات در کنار دستیابی به عملکرد مطلوب گیاه است. در دهه‌های اخیر تولید کودهای زیستی بر پایه سویه‌های خاص باکتریایی با ویژگی ارتقا دهندگی رشد گیاه، به‌عنوان یک راه جایگزین برای کاهش استفاده از ترکیبات شیمیایی و بهبود استفاده گیاه از مواد مغذی، معرفی شده‌اند (Bhardwaj et al. 2014). این کودهای جدید، مزایایی مانند افزایش جذب مواد غذایی، جلوگیری از حمله پاتوژن و افزایش رشد گیاه تحت شرایط تنش را برای میزبان خود به‌همراه دارند (Sleator et al. 2010). آن‌ها پس از به‌کارگیری باید با میکروبیوم¹ (مجموع میکروب‌های یک منطقه در زمان مشخص) خاک ریشه‌گاه² (خاک کاملا چسبیده به ریشه) و میکروب‌های درون³ و روی سطح ریشه⁴ برای تشکیل کلون⁵ موفق و فراهم کردن مزایا برای گیاه واکنش دهند (Berendsen et al. 2012; Turner et al. 2013; Moe 2013; Laksmanan et al. 2014). به‌علاوه سویه‌های باکتریایی چنانچه در شرایطی مشابه با محیط زیست طبیعیشان

به کار گرفته شوند به‌صورت موثرتری می‌توانند پیرامون یا درون ریشه جایابی کرده و برروی رشد گیاه تاثیر بگذارند. بنابراین ضروریست هم‌زمان با توسعه روش‌های به‌کارگیری باکتری‌ها، درک مناسبی از تنوع میکروبیوم مرتبط با ریشه انواع گیاهان در محیط‌های مختلف به‌وجود آید و شناسایی گونه‌های بومی ریشه برای گیاهان مختلف صورت بگیرد. برای دستیابی به این مهم، نخست نیازمند کسب دانش در ارتباط با پیچیدگی و تنوع جمعیت‌های میکروبی بومی منطقه ریشه‌گاه و درون ریشه گیاهان زراعی هستیم.

(Tkacz and Poole 2015; De-la-Pena and Loyola-Varga 201) از آنجایی که بخش بسیار کمی از ریزسازواره‌ها براساس روش‌های آزمایشگاهی قابل کشت می‌باشند، بنابراین تجزیه و تحلیل میکروبیوم‌های پیچیده همراه گیاه، به‌صورت تکنیکی دارای محدودیت‌هایی است. با استفاده از روش‌های توالی‌یابی با کارایی بالا در حال حاضر این امکان وجود دارد که جوامع میکروبی همراه گیاه، به شکلی دقیق و مطالعه شوند. براین اساس اخیرا میکروبیوم خاک ریشه‌گاه و درون و روی ریشه در گیاهانی نظیر آرابیدوپسیس⁶ و جو زراعی⁷ مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Lundberg et al. 2012; Bulgarelli et al. 2012; Schlaeppli et al. 2015; Bulgarelli et al. 2014). هم‌چنین در مطالعاتی میکروبیوتای⁸ (ژن‌های باکتریایی) ریشه گاه سویا⁹ در مزارع آمازون و ذرت¹⁰ در مزارع آمریکا نیز مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Aira et al. 2010; Mendes et al. 2014). با این وجود در حال حاضر دانش مطلوب در ارتباط با میکروبیوم مستقر در ریشه بسیار محدود است و مطالعات بیش‌تر بر روی ریشه و میکروبیوم ریشه‌گاه محصولات زراعی تجاری و گیاهان غیر مدل، بسیار

⁵ Colonization⁶ *Arabidopsis thaliana*⁷ *Hordeum vulgare*⁸ Microbiota⁹ *Glycine max*¹⁰ *Zea mays*¹ Microbiome² Rhizosphere³ Endophytes⁴ Rhizoplane

فاصله ۳۰-۰ سانتی‌متری از سطح خاک، برای ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی برداشته شد (جدول ۱).
 جداسازی خاک ریشه‌گاه مطابق روش لاندبرگ و همکاران انجام شد (Lunberg et al. 2012). خاک‌های ۵ گیاه همسایه در هر کرت، با یکدیگر ترکیب و به‌عنوان یک نمونه در نظر گرفته شد. ۰/۲۵ گرم از خاک جدا شده، برای استخراج DNA با استفاده از دستورالعمل کیت (Omega Bio-tek Inc, Norcross, GA, USA) E.Z.N.A® soil DNA kit (USA) مورد استفاده قرار گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به‌ترتیب با استفاده از ژل آگارز و دستگاه نانودراپ مدل (NP80, Implen Inc, Germany) مورد ارزیابی قرار گرفت.
 ناحیه V3-V4 از ژن باکتریایی *16srRNA* تکثیر شد. PCR در دو مرحله بر روی کلیه نمونه‌ها انجام شد.

جدول ۱- مشخصات ژئوگرافیک، متوسط دما و بارش سالانه و ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی منطقه مطالعه

عرض جغرافیایی (Latitude)	۳۴°۱۲'۱۹"		
طول جغرافیایی (Longitude)	۴۷°۱۶'۴۸"		
ارتفاع (Altitude) (m)	۱۳۵۱		
متوسط دمای سالانه (C°) Annual mean temp	۱۳/۳		
متوسط بارندگی سالانه (mm) Annual mean precipitation	۴۳۷		
pH	۷/۱		
بافت خاک Soil texture	لومی -رسی Loam-clay	Sand شن	% ۹
		Silt سبیل	% ۴۷
		Clay رس	% ۴۴
ویژگی‌های شیمیایی properties	کربن آلی	۰/۹	
	فسفر قابل جذب (ppm)	۸-۱۵	
	پتاسیم قابل جذب (ppm)	۴۲۰	
	نیترات (ppm)	۲۳	
	آمونیم (ppm)	۲۰	

مورد نیاز است (De-la-Pena and Loyola-Vargas 2014; Blee et al. 2013). گندم نان^۱ به‌عنوان چهارمین محصول زراعی مهم در جهان است که میزان تولید آن در جهان از مرز ۷۵۰ میلیون تن گذشته است (FAO 2017). بر روی میکروب‌های مرتبط با ریشه گندم مطالعات محدودی انجام شده‌است که در جامع‌ترین آن‌ها از ۱۱ مزرعه در آرژانتین نمونه‌برداری شد که در آن با استفاده از مطالعات متاژنومی نشان داده شد که pH و محتوای نیتروژن با تنوع باکتریایی تحت شرایط مزرعه‌ای متنوع مرتبط است (Rascovan et al. 2016).

در این مطالعه سعی شده‌است که برای نخستین بار، میکروبیوم مرتبط با ریشه گیاه گندم در یک رقم ایرانی و شرایط کشت دیم و تک کشتی (چندین ساله) در دو مرحله زایشی و رویشی بررسی شود تا راهی را برای مطالعات جامع در استفاده بهتر از کودهای بیولوژیک و همچنین امکان تغییر در ترکیب جمعیتی میکروب‌های همراه گندم، به‌منظور بهبود رشد و سلامت گیاه در آینده نزدیک در کشور فراهم نماید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها از مزرعه تحقیقاتی ایستگاه سرارود استان کرمانشاه در مرحله رشد رویشی و زایشی بین ماه‌های آبان و فروردین در سال ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ جمع‌آوری شدند. میانگین دمای سالانه در منطقه مورد نظر برابر با ۱۳/۳ درجه سانتی‌گراد و متوسط بارندگی سالانه ۴۳۷ میلی‌متر بود. گندم کشت شده در ایستگاه تحقیقاتی رقم آذر ۲ و کشت به‌صورت دیم و تک کشتی چندین ساله بود. در هر دو مرحله، از ۳ کرت^۲ (۵*۵ مترمربع) نمونه‌برداری انجام شد که در هر کرت ۵ گیاه به‌دقت از خاک خارج شده و همراه با یخ به آزمایشگاه منتقل شد. از هر کرت مقداری از خاک بدون گیاه در

¹ *Triticum aestivum*

² Plot

می‌آورند و توالی‌هایی که شباهت آن‌ها کمتر از ۹۷ درصد باشد در کلاسترهای جداگانه قرار می‌گیرند. از نرم‌افزار Uclust برای کلاستر کردن توالی‌ها استفاده شد. پس از کلاستر کردن، معمولاً توالی که در هر کلاستر OTU بیش‌ترین فراوانی را دارد به‌عنوان توالی نماینده^۷ آن OTU انتخاب شد. برای هم‌ردیف کردن^۸ توالی‌های نماینده با توالی‌های الگو موجود در پایگاه داده Greengenes از الگوریتم نرم‌افزار PyNAST استفاده شد.

تمام مراحل شناسایی و طبقه‌بندی OTUها، هم‌ردیف کردن OTUها با توالی‌های مرجع 16S rRNA موجود در بانک اطلاعاتی، به‌وسیله دستور کلی pick_de_novo_otus.py انجام گرفت. در نهایت تمام OTUهای شناسایی شده به‌همراه فراوانی توالی‌های کلاستر شده در هر OTU برای هر نمونه و اطلاعات تاکسونومی متناسب به هر OTU به‌صورت یک جدول استخراج شد. برای این منظور از دستور make_otu_table.py استفاده شد.

تمامی آنالیزهای بررسی تنوع بر روی جدول OTU به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار تحت وب www.microbiomeanalyst.ca و بخش Marker Data Profiling (MDP) استفاده شد (Dhariwal et al. 2017). این نرم‌افزار تمامی محاسبات را براساس پکیج‌های آنالیز میکروبی موجود در نرم‌افزار R مانند Biocductor، Vegan، Phyloseq و سایر پکیج‌ها انجام می‌دهد. به‌منظور افزایش دقت در نشان دادن تفاوت‌های موجود بین نمونه‌ها در ابتدا آنالیز تبدیل تصادفی نمونه به نمونه‌های کوچک‌تر^۹ انجام شد و تعداد ۲۰۰۰ خوانش به ازای هر زیر مجموعه از نمونه‌ها در نظر گرفته شد. تنوع آلفا^{۱۰} با استفاده از شاخص Shannon محاسبه شد. برای محاسبه تنوع بتا^{۱۱} یا فاصله بین نمونه درجه تشابه هر جفت از نمونه‌ها از طریق آنالیزهای تشابه دوه‌دو با استفاده از ماتریس‌های فاصله فیلوژنیک و غیرفیلوژنیک محاسبه شد. برای ارزیابی تفاوت‌های جمعیت میکروبی که به‌تنهایی از حضور یا عدم حضور OTUها به‌وجود آمده بودند، عدم تشابه دوه‌دو با استفاده از ماتریس Unweighted-UniFrac فیلوژنتیک محاسبه شد.

در ابتدا، ۳۰ نانوگرم از DNA با استفاده از جفت پرایمر هرز^۱ (5'CCTACGGGNGGCWGCAG3') 0341F و (5'GACTACHVGGGTATCTAATCC3') 0785R در دو تکرار برای هر نمونه و حجم ۵۰ میکرولیتر، تکثیر شد.

سپس محصول PCR با استفاده از ستون (Pure-Link PCR purification kit, Termo Fisher Scientific) خالص‌سازی شده و در مرحله دوم، با استفاده از پرایمرهای بارکد شده که دارای ایندکس‌های معین قابل خوانش در پلت فرم MiSeq بودند، مجدداً تکثیر شد. در این مرحله از ۶ پرایمر پیشرو در ترکیب با یک پرایمر پسرو استفاده شد که از روی ژل مطابق دستورالعمل کیت (GeneJET gel extraction kit, Termo Fisher Scientific) خالص‌سازی شدند. قطعات تکثیر شده در مرحله نهایی (طول ۵۴۰ جفت‌باز) برای توالی‌یابی pair-ends *۲۵۰ جفت‌باز به شرکت ماکروژن کره‌جنوبی ارسال شدند.

آنالیز توالی‌های تکثیر شده ژن باکتریایی 16srRNA به‌منظور کیفیت سنجی و آنالیز فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار تحت پایتون^۲ (version 1.9.1) QIIME نسخه ۱,۹,۱ انجام شد. اولین مرحله آنالیز، کنترل کیفیت توالی‌ها با استفاده از دستور، split_libraries.py که عبارت بودند از حذف توالی‌هایی که طولی بیش‌تر از ۱۰۰۰ و یا کم‌تر از ۲۰۰ نوکلئوتید داشتند، حذف توالی‌هایی با تعداد بازهای نامشخص^۳ بیش‌تر از ۶ نوکلئوتید، حذف توالی با حداقل qual score کمتر از ۲۵، حذف توالی‌های هوموپلیمری طولی‌تر از ۶ نوکلئوتید و حذف توالی‌های دارای جفت‌شدگی اشتباه^۴. در مرحله بعد توالی‌هایی که کنترل کیفیت شدند برای شناسایی OTUها^۵ مورد آنالیز قرار گرفتند. در این مرحله OTUها بر پایه کلاستر کردن توالی‌های مشابه در سطح ۹۷٪ و به روش de novo شناسایی شدند (de novo approach). این سطح از شباهت توالی امکان شناسایی باکتری تا سطح گونه^۶ را فراهم می‌کند. توالی‌هایی که میزان شباهت آن‌ها بیش‌تر از ۹۷ درصد باشد با هم کلاستر می‌شوند و یک OTU را به وجود

⁷ Representative sequence

⁸ Alignment

⁹ Rarefy

¹⁰ Alpha diversity

¹¹ Beta diversity

¹ Degenerate

² Python

³ Ambiguous

⁴ Mismatch

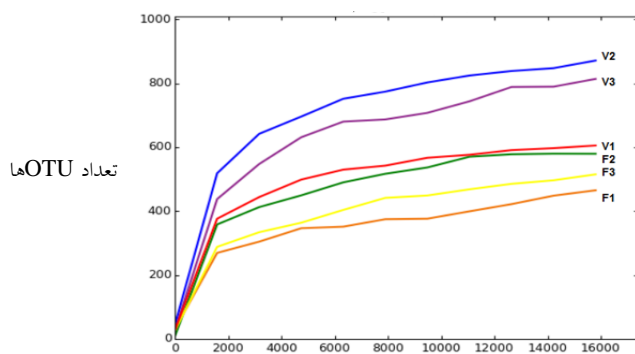
⁵ Operational Taxonomic Unit

⁶ Species

انتخاب پرایمرهای اصلی به گونه ای صورت گرفت تا بهترین ترکیب را برای پوشش کامل فرمانرو^۲ پروکاریوت‌ها فراهم کند و هم‌چنین دارای دقت بالایی در تشخیص تنوع در سطح جنس^۳ باشد (Klindworth et al. 2013).

براساس نتایج در مجموع ۱۳۴۱۴۵ خوانش برای ۶ نمونه (۳ تکرار در هر مرحله رشدی) به دست آمد. میانگین خوانش‌ها به ازای هر نمونه برابر با ۲۲۳۵۷ بود. این تعداد خوانش در کل به ۱۲۷۸ OTU مرتبط می‌شد، که پس از حذف OTUهای با فراوانی کم (کمتر از ۵ خوانش)، ۶۹۱ OTU برای آنالیزها مورد استفاده قرار گرفت (Coleman-Derr et al. 2016). به منظور ارزیابی این که آیا عمق توالی‌یابی در همه نمونه‌ها توانسته است کلیه OTUها درون نمونه را در برگیرد، آنالیز rarefaction انجام شد (شکل ۱). نمودارهای به دست آمده از این بررسی نشان دادند که عمق توالی‌یابی برای دام انداختن همه گونه‌های موجود در منطقه ریشه‌گاه، کاملاً مناسب است و همه منحنی‌ها به شکل مسطح^۴ درآمدند (Colwell et al. 2012).

- ² Domain
³ Genus
⁴ Plato

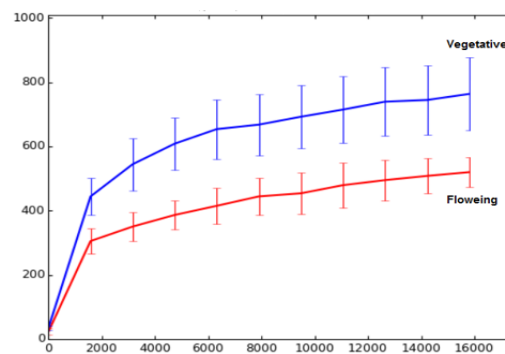


به علاوه Bray-Curtis و Weighted-UniFrac به ترتیب به عنوان ماتریس‌های غیر فیلوژنتیک و فیلوژنتیک، برای اندازه‌گیری درجه تشابه نمونه‌ها بر اساس فراوانی نسبی تاکساها مورد استفاده قرار گرفتند. ماتریس‌های فیلوژنتیک، عدم تشابه دوبه‌دو نمونه‌ها را از طریق طول شاخه فیلوژنتیک منحصر به فرد درون هر جمعیت در مقایسه با سایرین اندازه می‌گیرد (Lozopone and Night 2005; Navas et al. 2013). آنالیز^۱ PERMONOVA برای اندازه‌گیری تفاوت‌های معنادار آماری بین نمونه‌ها در نرم‌افزار مذکور انجام شد.

نتایج و بحث

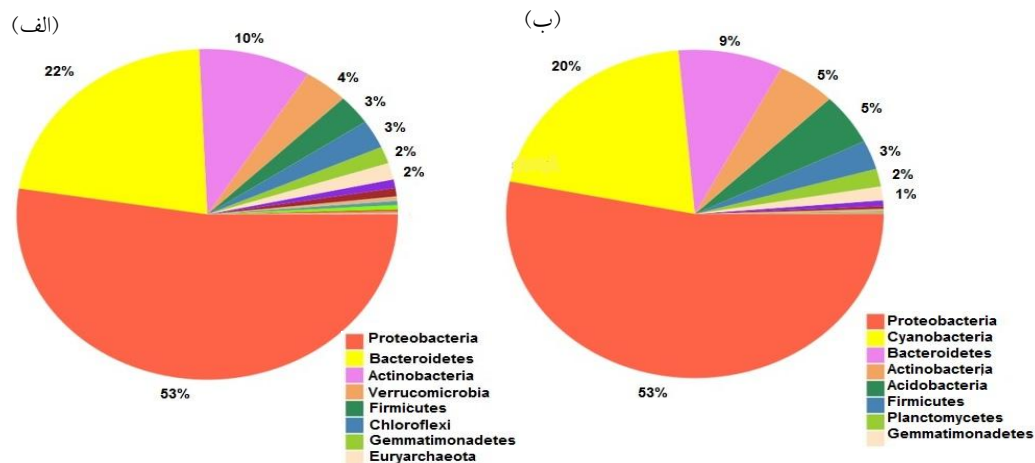
از آنجایی که مرحله رشدی یک عامل بسیار مهم در شکل دهی میکروبیوم گیاه است (Edwards et al. 2015; Dombrowski et al. 2017)، این مطالعه، به هدف بررسی تنوع جمعیت‌های باکتریایی ساکن در ریشه‌گاه یکی از ارقام ایرانی گندم براساس تعداد تاکسون‌های حاضر، برای ارزیابی تفاوت‌ها در دو مرحله رویشی و زایشی و شناسایی اعضای باکتریایی در این دو مرحله انجام شد. برای تکثیر ژن 16srRNA (دارای طول مناسب) برای توالی‌یابی از طریق سیستم ایلومینا MiSeq (Ram et al. 2011)

¹ Permutational MANOVA

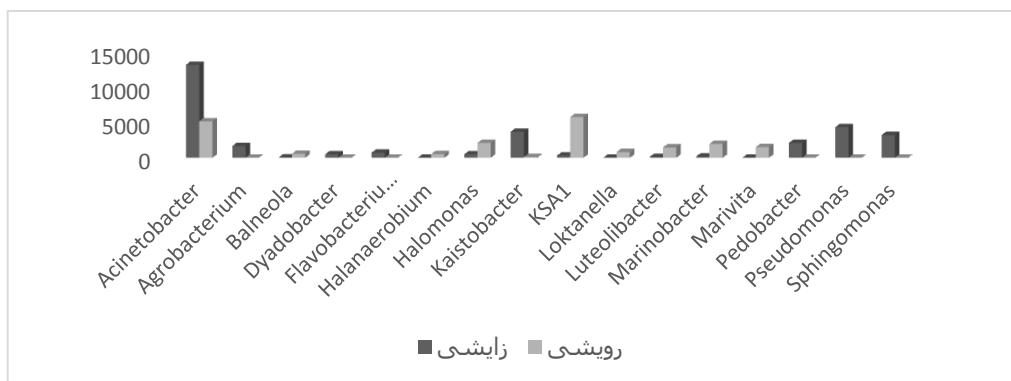


تعداد خوانش‌ها به ازای هر نمونه

شکل ۱- نمودار Rarefaction تعداد OTUهای شناسایی شده براساس تعداد خوانش‌های موجود در ریشه‌گاه گندم. الف) نمودار تعداد OTUهای شناسایی شده را با افزایش تعداد خوانش‌ها برای هر نمونه نشان می‌دهد. ب) نمودار تعداد OTUها را با افزایش تعداد خوانش به صورت مجزا در دو مرحله رویشی (vegetative) و زایشی (flowering) نشان می‌دهد.



شکل ۲- درصد و ترتیب فراوانی شاخه‌های باکتریایی در دو مرحله رویشی (الف) و زایشی (ب) در ریشه‌گاه گندم



شکل ۳- فراوانی مطلق جنس‌های باکتریایی غالب موجود در دو مرحله رویشی و زایشی

کلروفلکسی مربوط بودند و این درحالیست که در مرحله رشد زایشی اعضای شاخه‌های پروتئوباکتری‌ها، سیانوباکتری‌ها، باکترئوئیدت‌ها، اکتینوباکتری‌ها، اسیدوباکتری‌ها و فرمیکوت‌ها به ترتیب بیش‌ترین فراوانی را به خود اختصاص داده بودند (شکل ۲). شاخه پروتئوباکتری‌ها، در هر دو مرحله رویشی و زایشی بیش از ۵۰ درصد فراوانی‌ها را به خود اختصاص داده بود. این شاخه، در سطوح رده^۳ (با ۸۵ درصد تشابه توالی) و جنس (با ۹۵ درصد تشابه توالی) نیز مورد بررسی قرارگرفت. فراوانی رده گاماپروتئوباکتری‌ها در مراحل رویشی و زایشی به ترتیب ۴۲ درصد و ۳۵ درصد بود، درحالی‌که در این دو مرحله ۲۳ درصد و ۲۵ درصد از OTU ها مربوط به رده آلفاپروتئوباکتری‌ها و ۱۰ درصد و پنج درصد آن‌ها دلتاپروتئوباکتری‌ها را در دو مرحله رویشی

میانگین good coverage نمونه‌ها، به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی پوشش تمامی شاخه‌های باکتریایی^۱ موجود در نمونه‌ها استفاده شد و برابر با ۹۹ درصد بود. تفاوت قابل توجهی بین نمونه‌ها در تعداد OTUهای شناسایی شده براساس شاخص تنوع Shannon (۰/۹±۶۳/۶۳) مشاهده نشد. در کل ۲۱ شاخه باکتریایی و یک شاخه آرکی شناسایی شدند. ۱۰۰۲ خوانش (مربوط به ۲۱ OTU) به هیچ‌یک از شاخه‌های شناخته شده پروکاریوتی مرتبط نشدند. در کل ۲۰۲۳ خوانش (مربوط به ۳۸ OTU) مربوط به آرکی‌ها و شاخه یوری آرکی‌ها^۲ بودند. در مرحله رشد رویشی ۹۵ درصد از توالی‌ها به ترتیب به اعضای شاخه‌های پروتئوباکتری‌ها، باکترئوئیدت‌ها، اکتینوباکتری‌ها، وروکومیکروب‌ها، فرمیکوت‌ها و

¹ Phylum

² Euryarchaeota

³ Class

که به ترتیب براساس ماتریس‌های Berry-Curtis، Unweighted- و Weighted UniFrac و به صورت میانگین ۸۰، ۵۰ و ۶۰ درصد تشابه بین نمونه‌ها وجود داشت. آنالیز PERMANOVA نشان داد تفاوت معناداری بین دو مرحله رشدی براساس همه OTUهای موجود در ریشه‌گاه گندم مشاهده نشد ($R^2=0.42$ ، $P=0.1$). در این تحقیق به صورت کلی مشخص شد که در ارتباط با ارقام ایرانی گندم، جنس‌های اسیتوباکتر و KSA1 هم‌زیستی بسیار مناسبی با ریشه گندم دارند و فراوانی بالای این جنس‌ها با صفات متعدّد ارتقادهنده رشد در گندم، در اهمیت استفاده از آنها به‌عنوان کودهای زیستی برای بهبود رشد و سلامت گندم تأکید میکند. از آنجایی که براساس مطالعات نشان داده شده‌است که جمعیت باکتریایی به‌ویژه در سطح گونه، از هر ژنوتیپ به ژنوتیپ دیگر تغییر می‌کند (Alekklett et al. 2014; Brusetti et al. 2005)، این یافته‌ها قطعا برای تعیین دقیق میکروبیوم نموی ریشه‌گاه گندم کافی نبوده و نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه وجود دارد. این نتایج می‌تواند به‌عنوان اولین مطالعه متاژنوم پیشگام مطالعات شناسایی میکروبیوم گیاهان زراعی ایران باشد تا پنجره‌ای را برای تلاش‌های بیشتر در جهت توسعه عملیات کشاورزی از طریق دستورزی میکروبیوم در محیط زیست محصولات زراعی ایجاد کند.

منابع

Aira M, Gómez-Brandón M, Lazcano C, Bååth E, Domínguez J (2010) Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 42:2276-2281.

Alekklett K, Hart M, Shade A (2014) The microbial ecology of flowers: an emerging frontier in phyllosphere research. *Botany* 92:253-266.

Altieri MA, Nicholls CI (2005) Agroecology and the search for a truly sustainable agriculture. United Nations Environmental Programme, Environmental Training Network for Latin America and the Caribbean.

Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* 17:478-486.

Bhardwaj D, Ansari MW, Sahoo RK, Tuteja N (2014) Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories* 13:66.

و زایشی دربر می‌گرفتند. در مقایسه تاکسونومی جنس‌ها در مراحل زایشی و رویشی 101 شناسایی شدند که ۷۴ جنس به صورت مشترک و بدون وابستگی به مرحله رشدی در ریشه‌گاه حاضر بودند.

در مقایسات بین ۷۴ جنس مشترک، تفاوت‌های قابل توجهی در میزان حضور چندین جنس وجود داشت (شکل ۳). براین اساس، جنس اسیتوباکتر^۱ دارای فراوانی بسیار بالاتری در مرحله زایشی نسبت به رویشی بود. اعضای این جنس به دلیل ویژگی متعددی نظیر تولید ACC و سیدروفور و یا رشد بر روی محیط‌های فاقد نیتروژن (Huddedar et al. 2002)، به‌عنوان باکتری‌های ارتقادهنده رشد در گیاهان^۲ (PGPR) محسوب می‌شود. در مطالعات گذشته که بر روی ریشه‌گاه گندم انجام شده بود مشخص شده بود که گونه‌های موجود در این جنس در مراحل رشد رویشی و زایشی به میزان فراوانی حضور دارند (Sachdev et al. 2010). در جنس در ارتباط با جنس‌های کائیتوباکتر^۳، سودوموناس^۴ و اسفنگوموناس^۵ نیز چنین تفاوتی دیده می‌شود و این در حالی است که جنس KSA1 فراوان‌ترین جنس در مرحله رشد رویشی است.

¹ *Acinetobacter*

² Plant Growth Promoting Bacteria

³ *Kaistobacter*

⁴ *Psuedomonas*

⁵ *Sphingomonas*

Bhardwaj D, Ansari M, Sahoo R and Tuteja N (2014) Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories* 13:66.

Blee K, Hein J, Wolfe GV (2013) *Arabidopsis thaliana*: a useful but limited model to investigate stress impacts on rhizosphere community composition and function. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* 1:265-270.

Brusetti L, Francia P, Bertolini C, Pagliuca A, Borin S, Sorlini C, Giuntini E (2005) Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non transgenic counterpart. *Plant and Soil* 266:11-21.

Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch PC, Weiman A, Dröge J, Pan Y, Schulze-Lefert P (2015) Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host and Microbe* 17:392-403.

Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, van Themaat EVL, Ahmadinejad N, Assenza F, Peplies J (2012) Revealing

- structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488:91.
- Coleman-Derr D, Desgarenes D, Fonseca-Garcia C, Gross S, Clingenpeel S, Woyke T, Tringe SG (2016) Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist* 209:798-811.
- Colwell RK, Chao A, Gotelli NJ, Lin SY, Mao CX, Chazdon RL, Longino JT (2012) Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation and comparison of assemblages. *Journal of Plant Ecology* 5:3-21.
- Conway GR, Pretty JN (2013) *Unwelcome harvest: agriculture and pollution*. Routledge.
- De-la-Peña C, Loyola-Vargas VM (2014) Biotic interactions in the rhizosphere: a diverse cooperative enterprise for plant productivity. *Plant physiology* 701-719.
- Dhariwal A, Chong J, Habib S, King IL, Agellon LB, Xia J (2017) *MicrobiomeAnalyst*: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Research* 45:180-188.
- Dombrowski N, Schlaeppi K, Agler MT, Hacquard S, Kemen E, Garrido-Oter R, Schulze-Lefert P (2017) Root microbiota dynamics of perennial *Arabidopsis alpina* are dependent on soil residence time but independent of flowering time. *The ISME Journal* 11:43.
- Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podshetty NK, Bhatnagar S, Sundaresan V (2015) Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:E911-E920.
- FAO (2017) *FAOSTAT. Food and agricultural commodities production*. Available at <http://faostat.fao.org/site/756/default.aspx>. FAO, Rome, Italy.
- Huddedar SB, Shete AM, Tilekar JN, Gore SD, Dhavale DD, Chopade BA (2002) Isolation, characterization, and plasmid pUPI126-mediated indole-3-acetic acid production in *Acinetobacter* strains from rhizosphere of wheat. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102:21-39.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41:100-113.
- Laksmanan V, Selvaraj G, Bais H (2014) Functional soil microbiome: belowground solutions to an aboveground problem. *Plant Physiology* 132:125-138.
- Lundberg DS (2012) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488:86-90.
- Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:8228-8235.
- McGuinness H (1993) *Living Soils: Sustainable Alternatives to Chemical Fertilizers for Developing Countries* (Consumer Policy Institute, Consumers Union).
- Mendes LW, Kuramae EE, Navarrete AA, van Veen JA and Tsai SM (2014) Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *ISME Journal* 8:1577-1587.
- Moe LA (2013) Amino acids in the rhizosphere: From plants to microbes. *American Journal of Botany* 100:1692-1705.
- Navas-Molina JA, Peralta-Sánchez JM, González A, McMurdie PJ, Vázquez-Baeza Y, Xu Z, Huntley J (2013) Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. In *Methods in enzymology* 531:371-444. Academic Press.
- Raja N (2013) Biopesticides and biofertilizers: ecofriendly sources for sustainable agriculture. *Journal of Agricultural Science and Food Research* 42:17-27.
- Ram JL, Karim AS, Sandler ED, Kato I (2011) Strategy for microbiome analysis using 16S rRNA gene sequence analysis on the Illumina sequencing platform. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 57:117-118.
- Rascovan N, Carbonetto B, Perrig D, Díaz M, Canciani W, Abalo M, Alloati J, Gonzalez-Anta G, Vazquez MP (2016) Integrated analysis of root microbiomes of soybean and wheat from agricultural fields. *Scientific Reports* 6:28084.
- Sachdev D, Nema P, Dhakephalkar P, Zinjarde S, Chopade B (2010) Assessment of 16S rRNA gene-based phylogenetic diversity and promising plant growth-promoting traits of *Acinetobacter* community from the rhizosphere of wheat. *Microbiological Research* 165:627-638.
- Schlaeppi K, Dombrowski N, Oter RG, Ver Loren van Themaat E and Schulze-Lefert P (2014) Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:585-592.
- Sleator RD, Shortall C, Hill C (2008) *Metagenomics*. *Letters in Applied Microbiology* 47:361-6.
- Tkacz A and Poole P (2015) Role of root microbiota in plant productivity. *Journal of Experimental Botany* 66:2167-2175.
- Turner T, James E and Poole P (2013) The plant microbiome. *Genome Biology* 21:1-10.