

## 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<sup>۱</sup>، علی اکبر شاهنجات بوشهری<sup>۱\*</sup>، قاسم حسینی سالکده<sup>۲</sup>

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 N<sup>1</sup>, Shahnejat Bushehri AA<sup>\*1</sup>, Hosseini Salekdeh Gh<sup>2</sup>

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 بر روی 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 غیرقابل 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 کاملاً شناخته شده‌است (Conway and Pretty 2013; McGuinness 1993). از آنجایی که این ترکیبات شیمیایی در مقیاس انبوه به کار می‌روند و درعین حال کارایی اسیمیلایون 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 دهنده گیاه، به عنوان 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 به همراه دارند (Sleator et al. 2010). آن‌ها پس از به کارگیری باید با میکروبیوم<sup>۱</sup> (مجموع میکروب‌های یک منطقه در زمان مشخص) خاک ریشه‌گاه<sup>۲</sup> (خاک کاملاً چسبیده به ریشه) و میکروب‌های درون<sup>۳</sup> و روی سطح ریشه<sup>۴</sup> برای تشکیل کلون<sup>۵</sup> موفق و فراهم کردن مزایا برای گیاه واکنش دهند (Berendsen et al. 2012; Turner et al. 2013; Moe 2013; Laksmanan et al. 2014). به علاوه سویه‌های باکتریایی چنانچه در شرایطی مشابه با محیط زیست طبیعیشان

به کار گرفته شوند به صورت موثرتری می‌توانند پیرامون یا درون ریشه جایابی کرده و بر روی رشد گیاه تاثیر بگذارند. بنابراین ضروریست هم‌زمان با توسعه روش‌های به کارگیری باکتری‌ها، درک مناسبی از تنوع میکروبیوم مرتبط با ریشه انواع گیاهان در محیط‌های مختلف به وجود 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، به صورت 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 اخیراً میکروبیوم خاک ریشه‌گاه و درون و روی ریشه در گیاهانی نظیر آرابیدوپسیس<sup>۶</sup> و جو زراعی<sup>۷</sup> مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Lundberg et al. 2012; Bulgarelli et al. 2012; Schlaeppi et al. 2015; Bulgarelli et al. 2014). هم‌چنین در مطالعاتی میکروبیوتای<sup>۸</sup> (ژن‌های باکتریایی) ریشه گاه سویا<sup>۹</sup> در مزارع آمازون و ذرت<sup>۱۰</sup> 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

<sup>۵</sup> Colonization<sup>۶</sup> *Arabidopsis thaliana*<sup>۷</sup> *Hordeum vulgare*<sup>۸</sup> Microbiota<sup>۹</sup> *Glycine max*<sup>۱۰</sup> *Zea mays*<sup>۱</sup> Microbiome<sup>۲</sup> Rhizosphere<sup>۳</sup> Endophytes<sup>۴</sup> Rhizoplane

فاصله ۳۰-۰ سانتی متری از سطح خاک، برای ارزیابی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی برداشته شد (جدول ۱).

جداسازی خاک ریشه گاه مطابق روش لاندبرگ و همکاران انجام شد (Lunberg et al. 2012). خاک های ۵ گیاه همسایه در هر کرت، با یکدیگر ترکیب و به عنوان یک نمونه در نظر گرفته شد. 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 به ترتیب 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 نمونه ها انجام شد.

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

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

مورد نیاز است (De-la-Pena and Loyola-Vargas 2014; Blee et al. 2013). گندم نان<sup>۱</sup> به عنوان چهارمین محصول زراعی مهم در جهان است که میزان تولید آن در جهان از مرز ۷۵۰ میلیون تن گذشته است (FAO 2017). بر روی میکروب های مرتبط با ریشه گندم مطالعات محدودی انجام شده است که در جامع ترین آن ها از ۱۱ مزرعه در آرژانتین نمونه برداری شد که در آن با استفاده از مطالعات متاژنومی نشان داده شد که pH و محتوای نیتروژن با تنوع باکتریایی تحت شرایط مزرعه ای متنوع مرتبط است (Rascovan et al. 2016).

در این مطالعه سعی شده است 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 میکروب های همراه گندم، به منظور بهبود رشد و سلامت گیاه در آینده نزدیک در کشور فراهم نماید.

## مواد و روش ها

نمونه ها از مزرعه تحقیقاتی ایستگاه سرارود استان کرمانشاه در مرحله رشد رویشی و زایشی بین ماه های آبان و فرودین در سال ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ جمع آوری شدند. میانگین دمای سالانه در منطقه مورد نظر برابر با ۱۳/۳ درجه سانتی گراد و متوسط بارندگی سالانه ۴۳۷ میلی متر بود. گندم کشت شده در ایستگاه تحقیقاتی رقم آذر ۲ و کشت به صورت دیم و تک کشتی چندین ساله بود. در هر دو مرحله، از ۳ کرت<sup>۲</sup> (۵\*۵ متر مربع) نمونه برداری انجام شد که در هر کرت ۵ گیاه به دقت از خاک خارج شده و همراه با یخ به آزمایشگاه منتقل شد. از هر کرت مقداری از خاک بدون گیاه در

<sup>1</sup> *Triticum aestivum*

<sup>2</sup> Plot

در ابتدا، ۳۰ نانوگرم از DNA با استفاده از جفت پرایمر هرز<sup>۱</sup> (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, Thermo 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, Thermo Fisher Scientific) خالص‌سازی شدند. قطعات تکثیر شده در مرحله نهایی (طول ۵۴۰ جفت‌باز) برای توالی‌یابی pair-ends ۲\*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<sup>۲</sup> (QIIME (version 1.9.1) 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<sup>۳</sup> 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<sup>۴</sup>. در مرحله بعد توالی‌هایی که کنترل کیفیت شدند برای شناسایی OTU‌ها<sup>۵</sup> 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<sup>۶</sup> را فراهم می‌کند. توالی‌هایی که میزان شباهت آن‌ها بیش‌تر از ۹۷ درصد باشد با هم کلاستر می‌شوند و یک OTU را به وجود

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<sup>۷</sup> آن OTU انتخاب شد. برای هم‌ردیف کردن<sup>۸</sup> 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 Biocunductor، 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<sup>۹</sup> انجام شد و تعداد ۲۰۰۰ خوانش به ازای هر زیر مجموعه از نمونه‌ها در نظر گرفته شد. تنوع آلفا<sup>۱۰</sup> با استفاده از شاخص Shannon محاسبه شد. برای محاسبه تنوع بتا<sup>۱۱</sup> یا فاصله بین نمونه درجه تشابه هر جفت از نمونه‌ها از طریق آنالیزهای تشابه دوه‌دو با استفاده از ماتریس‌های فاصله فیلوژنتیک و غیرفیلوژنتیک 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.

<sup>7</sup> Representative sequence

<sup>8</sup> Alignment

<sup>9</sup> Rarefy

<sup>10</sup> Alpha diversity

<sup>11</sup> Beta diversity

<sup>1</sup> Degenerate

<sup>2</sup> Python

<sup>3</sup> Ambiguous

<sup>4</sup> Mismatch

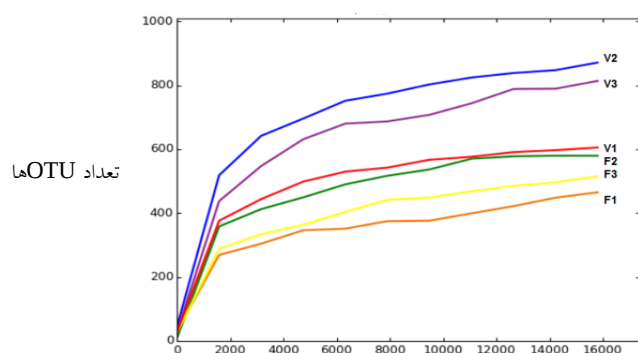
<sup>5</sup> Operational Taxonomic Unit

<sup>6</sup> Species

انتخاب پرایمرهای اصلی به گونه ای صورت گرفت تا بهترین ترکیب را برای پوشش کامل فرمانرو<sup>۲</sup> پروکاریوت ها فراهم کند و هم چنین دارای دقت بالایی در تشخیص تنوع در سطح جنس<sup>۳</sup> باشد (Klindworth et al. 2013).

براساس نتایج در مجموع ۱۳۴۱۴۵ خوانش برای ۶ نمونه (۳ تکرار در هر مرحله رشدی) به دست آمد. میانگین خوانش ها به ازای هر نمونه برابر با ۲۲۳۵۷ بود. این تعداد خوانش در کل به ۱۲۷۸ OTU مرتبط می شد، که پس از حذف OTU های 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 توالی یابی در همه نمونه ها توانسته است کلیه OTU ها درون نمونه را در برگیرد، آنالیز rarefaction انجام شد (شکل ۱). نمودارهای به دست آمده از این بررسی نشان دادند که عمق توالی یابی برای دام انداختن همه گونه های موجود در منطقه ریشه گاه، کاملاً مناسب است و همه منحنی ها به شکل مسطح<sup>۴</sup> درآمدند (Colwell et al. 2012).

<sup>2</sup> Domain  
<sup>3</sup> Genus  
<sup>4</sup> Plato



تعداد خوانش ها به ازای هر نمونه

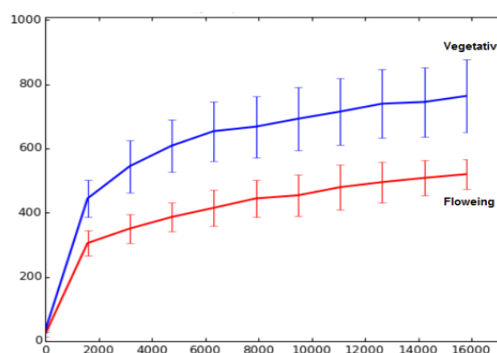
شکل ۱- نمودار Rarefaction تعداد OTU های شناسایی شده براساس تعداد خوانش های موجود در ریشه گاه گندم. الف) نمودار تعداد OTU های شناسایی شده را با افزایش تعداد خوانش ها برای هر نمونه نشان می دهد. ب) نمودار تعداد OTU ها را با افزایش تعداد خوانش به صورت مجزا در دو مرحله رویشی (vegetative) و زایشی (flowering) نشان می دهد.

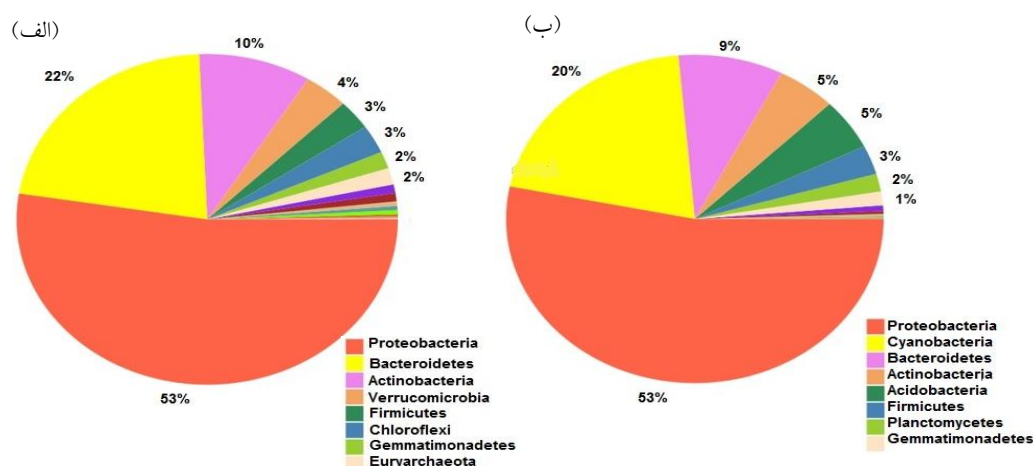
به علاوه Bray-Curtis و Weighted-UniFrac به ترتیب به عنوان ماتریس های غیر فیلوژنتیک و فیلوژنتیک، برای اندازه گیری درجه تشابه نمونه ها بر اساس فراوانی نسبی تاکساها مورد استفاده قرار گرفتند. ماتریس های فیلوژنتیک، عدم تشابه دویه دو نمونه ها را از طریق طول شاخه فیلوژنتیک منحصربه فرد درون هر جمعیت در مقایسه با سایرین اندازه می گیرد (Lozopone and Night 2005; Navas 2005). آنالیز<sup>۱</sup> (PERMANOVA) (Molina et al. 2013). برای اندازه گیری تفاوت های معنادار آماری بین نمونه ها در نرم افزار مذکور انجام شد.

## نتایج و بحث

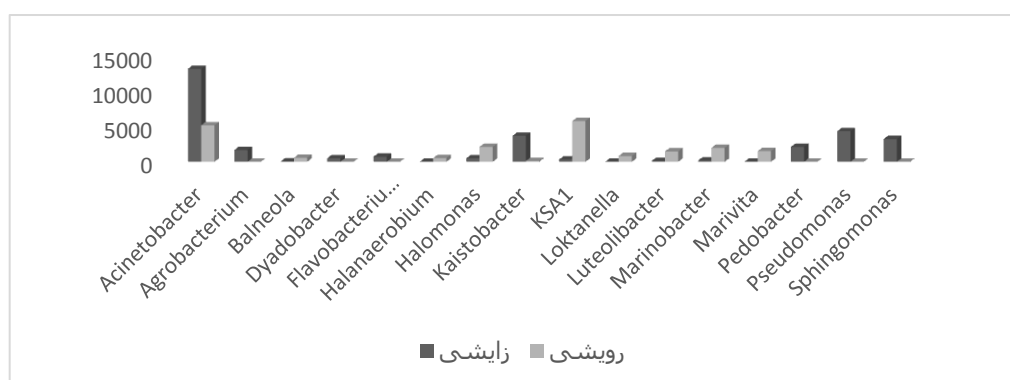
از آنجایی که مرحله رشدی یک عامل بسیار مهم در شکل دهی میکروبیوم گیاه است (Edwards et al. 2015; Dombrowski et al. 2017) این مطالعه، به هدف بررسی تنوع جمعیت های باکتریایی ساکن در ریشه گاه یکی از ارقام ایرانی گندم براساس تعداد تاکسون های حاضر، برای ارزیابی تفاوت ها در دو مرحله رویشی و زایشی و شناسایی اعضای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

### <sup>1</sup> Permutational MANOVA





شکل ۲- درصد و ترتیب فراوانی شاخه‌های باکتریایی در دو مرحله رویشی (الف) و زایشی (ب) در ریشه 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، باکترئیدت‌ها، 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<sup>۳</sup> (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

<sup>3</sup> Class

میانگین good coverage نمونه‌ها، به عنوان شاخصی برای ارزیابی پوشش تمامی شاخه‌های باکتریایی<sup>۱</sup> 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 آرکئی شناسایی شدند. ۱۰۰۲ خوانش (مربوط به ۲۱ OTU) به هیچ یک از شاخه‌های شناخته شده پروکاریوتی مرتبط نشدند. در کل ۲۰۲۳ خوانش (مربوط به ۳۸ OTU) مربوط به آرکئی‌ها و شاخه یوری آرکی‌ها<sup>۲</sup> بودند. در مرحله رشد رویشی ۹۵ درصد از توالی‌ها به ترتیب به اعضای شاخه‌های پروتئوباکتری‌ها، باکترئیدت‌ها، اکتینوباکتری‌ها، وروکومیکروب‌ها، فرمیکوت‌ها و

<sup>1</sup> Phylum

<sup>2</sup> Euryarchaeota

که به‌ترتیب براساس ماتریس‌های Unweighted-Berry-Curtis، UniFrac و Weighted UniFrac به‌صورت 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 به‌صورت 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 (Bruseti et al. 2005; Aleklett et al. 2014)، این یافته‌ها قطعاً برای تعیین دقیق میکروبیوم نمو ریشه‌گاه گندم کافی نبوده و نیاز به مطالعات پیش‌تر 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 پیش‌تر در جهت توسعه عملیات کشاورزی از طریق دست‌ورزی میکروبیوم در محیط زیست محصولات زراعی ایجاد کند.

و زایشی دربر می‌گرفتند. در مقایسه تاکسونومی جنس‌ها در مراحل زایشی و رویشی 101 شناسایی شدند که ۷۴ جنس به‌صورت 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<sup>۱</sup> دارای فراوانی بسیار بالاتری در مرحله زایشی نسبت به رویشی بود. اعضای این جنس به‌دلیل ویژگی متعدّدی نظیر تولید ACC و سیدروفور و یا رشد بر روی محیط‌های فاقد نیتروژن (Huddedar et al. 2002)، به‌عنوان باکتری‌های ارتقادهنده رشد در گیاهان<sup>۲</sup> (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<sup>۳</sup>، سودوموناس<sup>۴</sup> و اسفنگوموناس<sup>۵</sup> نیز چنین تفاوتی دیده می‌شود و این در حالی‌ست که جنس KSA1 فراوان‌ترین جنس در مرحله رشد رویشی است.

<sup>1</sup> *Acinetobacter*

<sup>2</sup> Plant Growth Promoting Bacteria

<sup>3</sup> *Kaeistobacter*

<sup>4</sup> *Psuedomonas*

<sup>5</sup> *Sphingomonas*

## 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.
- Aleklett 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.

- 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.
- Bruseti 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, Desgarennnes 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, Podishetty 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.