

شناسایی ژن‌های مرتبط با خصوصیت نیمه‌سازگاری بین سویه‌های *Rhizobium leguminosarum* و *Lotus burtii* با روش GWAS

محمد ضرابیان^{1*}، غلامعلی رنجبر²، سیدکمال کاظمی تبار²، حمید نجفی‌زرینی²

1. دانشجوی دکتری رشته اصلاح‌نیاتات گرایش ژنتیک مولکولی دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
2. دانشیار، گروه اصلاح‌نیاتات و بیوتکنولوژی دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
(تاریخ دریافت: 1398/10/29 - تاریخ پذیرش: 1398/12/26)

Identification of genes related to the semi-compatibility characteristic between *Rhizobium leguminosarum* strains and *Lotus burtii* by GWAS method

Mohammad Zarrabian^{1*}, Gholam Ali Ranjbar², Seyed Kamal Kazemitabar², Hamid Najafi Zarrini²

1. Ph.D. Candidate in Molecular Genetics, Faculty of Crop Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.
2. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.

(Received: Jan. 18, 2020 - Accepted: Mar. 17, 2020)

Abstract

The co-existence of plant and bacteria with nodule formation and nitrogen fixation has a great effect on plant production, as well as plant protein content. In this study, 194 strains of semi-symbiotic *Rhizobium leguminosarum* were used to identify bacterial genes related to nodule formation on *Lotus burtii*. Nodule related traits (number of white nodes, number of pink nodes, and total number of nodes) were measured at 7, 14, 21 and 28 days after inoculation. Principal Component Analysis (PCA) showed complete separation between strains with genomes A, C and D. In addition, the results of genome-wide association study (GWAS) showed that operon with secretory factor activity is effective in inducing resistance to red node trait.

Keywords: Bacteria, Nitrogen fixation, Nodulation, Symbiosis.

چکیده

همزیستی بین گیاه و باکتری با تشکیل گره و تثبیت نیتروژن بر کمیت محصول و همچنین محتوای پروتئین گیاه دارای تأثیر بسیار زیادی است. در این پژوهش جهت شناسایی ژن‌های باکتریایی مرتبط با تولید گره، تعداد 194 سویه باکتری *Rhizobium leguminosarum* نیمه همزیست با گیاه *Lotus burtii* مورد مطالعه قرار گرفت. صفات مرتبط با گره‌زایی (تعداد گره سفید، تعداد گره قرمز و تعداد کل گره) در 7، 14، 21 و 28 روز بعد از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، حاکی از تفکیک کامل بین سویه‌ها با ژنوم‌های A، C و D بود. علاوه بر آن، نتایج مطالعه سرتاسری ژنوم (GWAS) نشان داد که اپرون با فعالیت فاکتور ترشحی در القای صفت گره قرمز مؤثر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری، تثبیت نیتروژن، گره‌زایی، همزیستی.

مقدمه

نیتروژن در کشاورزی به‌عنوان یک ماده بسیار با ارزش در افزایش کمیت و به‌دلیل وارد شدن در ساختار پروتئین‌ها در افزایش کیفیت محصولات دارای اهمیت می‌باشد (Bianco *et al.*, 2014). اگرچه از اتمسفر به‌عنوان یک منبع نامحدود نیتروژن (N_2) یاد می‌شود، اما گیاهان به‌طور مستقیم قابلیت جذب آن را نداشته، لذا استفاده از کودهای شیمیایی نظیر کودهای نیتروژنه در کشاورزی بسیار رایج می‌باشد. این کودها اثر کوتاه‌مدت مثبت بر افزایش محصول داشته، اما به مرور زمان بر ساختمان خاک اثر منفی گذاشته و مازاد آن توسط آب باران و یا آبیاری شسته می‌شود. یکی از روش‌های سودمند برای پیشگیری از خسارات کودهای شیمیایی استفاده از روش‌های تثبیت زیستی نیتروژن می‌باشد (Peoples *et al.*, 1995). توانایی تولید آمونیوم (NH_3) از نیتروژن (N_2) به‌صورت زیستی از طریق آنزیم نیتروژناز انجام می‌گیرد. این آنزیم در گروهی از باکتری‌های خاکزی (ریزوبیوم) با قابلیت همزیستی با گیاهان خانواده بقولات وجود دارند (Udvardi and Poole, 2013). توسعه یک همزیستی موفق به حضور پروتئین‌های خاص گیاهی مانند فاکتورهای گره‌زایی، پروتئین‌های کاست سیگنال‌دهی، لکتین‌ها و همچنین عوامل خاص باکتریایی مانند پلی‌ساکاریدهای خارجی (EPS)، لیپوپلیساکارید (LPS) و پلی‌ساکاریدهای کپسولی بستگی دارد (Rachwał *et al.*, 2016). آلودگی ریشه گیاهان جنس *Lotus* به باکتری ریزوبیوم از دو روش نفوذ از طریق ریشه‌های موئین و یا از ترک موجود روی ریشه‌های فرعی صورت می‌گیرد (Madsen *et al.*, 2010). با وارد شدن باکتری به درون ریشه، تولید گره با فعال شدن مسیرهای داخل سلولی، تمایز و تقسیم سلول‌های کورتکس ریشه انجام می‌گیرد (Udvardi and Poole, 2013). گاهی اوقات این برهم‌کنش منجر به تثبیت نیتروژن در گیاه نمی‌شود

و گره‌های تشکیل‌شده روی ریشه به رنگ سفید باقی می‌ماند، که حکایت از سازگاری ضعیف برخی از باکتری‌های ریزوبیوم با این گیاهان دارد (Liang *et al.*, 2014; Westhoek *et al.*, 2017). Gossmann و همکاران (2012) اظهار داشتند که باکتری‌های جداشده از ریشه گیاه *Lotus corniculatus* در نروژ روی تعدادی از سایر گونه‌های *Lotus* قادر به ایجاد گره فعال نبودند.

بررسی مطالعه هم‌خوانی سرتاسر ژنوم (GWAS) ابزاری قدرتمند برای شناسایی پایه ژنتیکی صفات و ارتباط آن با واریانس ژنتیکی در سرتاسر ژنوم می‌باشد. در سال‌های اخیر GWAS به‌صورت گسترده‌ای در گیاهان، جانوران مدل و به‌خصوص باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. اساس GWAS ساده و مجموعه‌ای از آزمون‌های آماری برای ارتباط بین نشانگرهای ژنتیکی (که به‌طور معمول چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) هستند) با فنوتیپ مورد علاقه می‌باشد (Talas *et al.*, 2009). GWAS در شناسایی ژن‌های جدید و تأیید ژن‌هایی با کارکرد مشخص، بسیار کار آمد بوده و می‌توان در این زمینه به شناسایی ژن‌های گره‌زایی در *Medicago truncatula* اشاره داشت (Stanton-Geddes *et al.*, 2013). محدودیت اصلی این روش را می‌توان به‌دقت و تکرارپذیری صفات مورد مطالعه نسبت داد. معمولاً برای افزایش دقت شناسایی، بررسی‌ها روی تعداد کمی از تیمارها (درخصوص سوبه‌های باکتری) انجام و جهت ارتقای تکرارپذیری از شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی استفاده به‌عمل می‌آید. از طرفی در شرایط مزرعه گیاه با تعداد زیادی از عوامل بیمارگر، غیر بیمارگر و همچنین استرس‌های محیطی مواجه می‌شود؛ در نتیجه ژن‌های شناسایی شده در شرایط آزمایشگاهی ممکن است با صفت مورد مطالعه در شرایط مزرعه‌ای همبستگی بالایی نداشته باشند (Xiao *et al.*, 2009; Barrett and Hoekstra, 2011).

متیسیلین نشان دادند که بیش از 100 پلی‌مورفیسم مرتبط باقابلیت هضم‌کردن سلول‌های انسان در باکتری‌های این گونه وجود دارد (Laabei *et al.*, 2014).

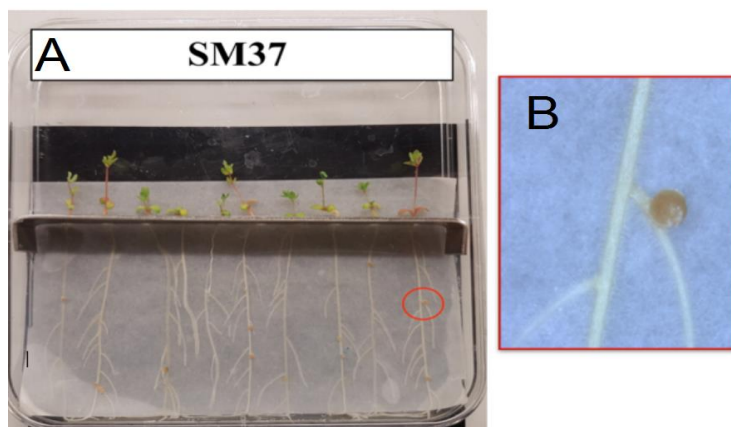
هدف اصلی این پژوهش شناسایی عوامل مرتبط با گره‌زایی و تعیین خصوصیات آن‌ها در بررسی همزیستی گیاه-باکتری است. لذا در این آزمایش جهت شناسایی ژن‌های باکتریایی مرتبط با تولید گره در همزیستی بین باکتری‌های گونه *R. leguminosarum* با گیاه *L. Burttii* از روش GWAS استفاده شد.

مواد و روش‌ها

بذور گونه وحشی *Lotus burttii* پس از خراش سطحی توسط محلول هیپوکلرید سدیم 5 درصد، ضدعفونی شد. بذره‌های جوانه‌زده با طول ریشه 3 الی 4 سانتی‌متر انتخاب و در پتری‌های مربعی شکل (شکل 1) حاوی محیط کشت B&D 1/4 (Broughton and Dilworth, 1971) بدون نیتروژن در چهار تکرار قرار داده شدند.

در مطالعه حاضر تعداد 194 سویه خالص باکتری *R. leguminosarum* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف اروپا مورد استفاده قرار گرفت (جدول 1).

بنابراین، به‌جای استفاده از تنوع مصنوعی (از طریق موتاسیون و یا انتخاب مصنوعی) در جمعیت بیمارگر یا باکتری‌های مفید، از تنوع ژنتیکی طبیعی جهت افزایش تطابق‌پذیری نتایج حاصل از آزمایشگاه و مزرعه استفاده می‌شود. همچنین، استفاده از داده‌های فنوتیپی در آزمایش‌های تکراردار، راه دیگری برای افزایش این تطابق‌پذیری محسوب می‌شود (Talas *et al.*, 2009). یکی از محدودیت‌های روش GWAS تأثیر ژن‌های نادر یا ژن‌هایی با اثرات بسیار کم، به‌دلیل عدم وجود روش‌های مناسب در مدل آماری می‌باشد. قدرت روش‌های آماری در آنالیزهای GWAS به‌وسیله عوامل مختلفی مثل اثرات ژن، فراوانی آلل، حجم نمونه و تراکم مارکری تعیین می‌شود (Ioannidis, 2005; Moonesinghe *et al.*, 2007). اولین مطالعه موفقیت‌آمیز GWAS در زمینه باکتریایی روی داده‌های توالی‌یابی شده 192 سویه از گونه‌های باکتریایی *Campylobacter jejuni* و *Campylobacter coli* بوده است (Sheppard, 2013). باکتری‌های این گونه‌ها از نوع باکتری‌های موجود در شکمبه نشخوارکنندگان هستند که باعث ایجاد مسمومیت غذایی در انسان می‌شود. هفت ژن مرتبط با مسمومیت در انسان توسط آنها شناسایی شد. در مطالعه دیگر روی 90 سویه *Staphylococcus aureus* مقاوم به



شکل 1. تعداد گره مورد بررسی در گیاه *L. burttii* پس از مایه‌زنی با باکتری *R. leguminosarum* سویه SM37. (A) نشان دهنده

شکل کلی شرایط آزمایشی به همراه فقر نیتروژن در گیاهان تحت آزمایش؛ (B) گره قرمز با بزرگنمایی بیشتر.

جدول 1. سویه، ژنوم و منشأ باکتری *R. leguminosarum* جهت گره‌زایی روی ریشه *L. burtii*

ردیف	سویه	ژنوم	منشأ	ردیف	سویه	ژنوم	منشأ	ردیف	سویه	ژنوم	منشأ
1	SM3	B	UK	47	SM98	C	F	93	SM85	C	F
2	SM4	B	UK	48	SM99B	C	F	94	SM86	C	F
3	SM5	B	UK	49	SM100	C	F	95	SM87	C	F
4	SM6	B	UK	50	SM101	C	F	96	SM88	C	F
5	SM7	B	UK	51	SM102	C	F	97	SM89	C	F
6	SM9	B	UK	52	SM103	C	F	98	SM90	C	F
7	SM10	B	UK	53	SM104	C	F	99	SM91	C	F
8	SM11	B	UK	54	SM105	C	F	100	SM92	C	F
9	SM12	B	UK	55	SM106	C	F	101	SM93	C	F
10	SM13	B	UK	56	SM107	C	F	102	SM115	C	F
11	SM14	B	UK	57	SM108	C	F	103	SM116	C	F
12	SM15	B	UK	58	SM109	C	F	104	SM117	C	F
13	SM16	B	UK	59	SM110	C	F	105	SM118	C	F
14	SM17	B	UK	60	SM111	C	F	106	SM119	C	F
15	SM18	B	UK	61	SM112	C	F	107	SM120	C	F
16	SM19	B	UK	62	SM113	C	F	108	SM121A	C	DK
17	SM20	B	UK	63	SM114	C	F	109	SM121B	C	DK
18	SM21	B	UK	64	SM27	B	UK	110	SM122A	C	DK
19	SM22	B	UK	65	SM30	B	UK	111	SM122B	C	DK
20	SM24	B	UK	66	SM31	B	UK	112	SM123	A	DK
21	SM25	B	UK	67	SM32	B	UK	113	SM125	C	DK
22	SM49	C	DK	68	SM34	B	UK	114	SM126A	E	DK
23	SM50	C	DK	69	SM35	B	UK	115	SM126B	C	DK
24	SM51	D	DK	70	SM36	B	UK	116	SM127	C	DK
25	SM52	E	DK	71	SM37	B	UK	117	SM128A	A	DK
26	SM53	C	DK	72	SM38	B	UK	118	SM128B	A	DK
27	SM54	C	DK	73	SM39	B	UK	119	SM129	C	DK
28	SM55	C	DK	74	SM40	B	UK	120	SM130A	A	DK
29	SM56	C	DK	75	SM41	C	DK	121	SM130B	A	DK
30	SM57	C	DK	76	SM42	C	DK	122	SM131	A	DK
31	SM58	C	DK	77	SM43	C	DK	123	SM132	C	DK
32	SM59	C	DK	78	SM44	C	DK	124	SM133B	C	DK
33	SM60	C	DK	79	SM45	E	DK	125	SM134A	C	DK
34	SM61	C	DK	80	SM46	C	DK	126	SM134B	C	DK
35	SM63	B	DK	81	SM47	C	DK	127	SM135A	E	DK
36	SM66	C	DK	82	SM48	C	DK	128	SM135B	E	DK
37	SM67	C	DK	83	SM74	C	DK	129	SM136A	A	DK
38	SM68	C	DK	84	SM76	C	DK	130	SM137A	C	DK
39	SM69	C	DK	85	SM77	C	DK	131	SM137B	A	DK
40	SM70	C	DK	86	SM78	D	DK	132	SM138A	A	DK
41	SM71	C	DK	87	SM79	D	DK	133	SM138B	A	DK
42	SM72	D	DK	88	SM80	C	DK	134	SM140A	A	DK
43	SM94	C	F	89	SM81	C	F	135	SM140B	A	DK
44	SM95	C	F	90	SM82	C	F	136	SM141A	C	DK
45	SM96	C	F	91	SM83	C	F	137	SM141B	E	DK
46	SM97	C	F	92	SM84	C	F	138	SM143	C	DK

F: فنلاند، DK: دانمارک و E: انگلستان

ادامه جدول 1. سویه، ژنوم و منشأ باکتری *R. leguminosarum* جهت گره‌زایی روی ریشه *L. burtii*

رديف	سويه	ژنوم	منشأ	رديف	سويه	ژنوم	منشأ	رديف	سويه	ژنوم	منشأ
DK	SM144A	A	DK	SM151C	C	DK	SM161	177	DK	C	SM163A
DK	SM144B	A	DK	SM152A	A	DK	SM163B	178	DK	A	SM163B
DK	SM145A	A	DK	SM152B	A	DK	SM164A	179	DK	A	SM164A
DK	SM145B	A	DK	SM152C	A	DK	SM164B	180	DK	A	SM164B
DK	SM145C	A	DK	SM153A	C	DK	SM164C	181	DK	C	SM164C
DK	SM146A	A	DK	SM153C	C	DK	SM165A	182	DK	C	SM165A
DK	SM146B	A	DK	SM153D	C	DK	SM165B	183	DK	C	SM165B
DK	SM147A	C	DK	SM154A	A	DK	SM166A	184	DK	C	SM166A
DK	SM147B	C	DK	SM154B	A	DK	SM166B	185	DK	C	SM166B
DK	SM147C	C	DK	SM154C	A	DK	SM167	186	DK	C	SM167
DK	SM148A	C	DK	SM155A	A	DK	SM168A	187	DK	A	SM168A
DK	SM148B	C	DK	SM155B	A	DK	SM168B	188	DK	A	SM168B
DK	SM148C	C	DK	SM155C	A	DK	SM168C	189	DK	A	SM168C
DK	SM149A	E	DK	SM157A	C	DK	SM169	190	DK	C	SM169
DK	SM149B	C	DK	SM157B	C	DK	SM170A	191	DK	C	SM170A
DK	SM149C	C	DK	SM157C	C	DK	SM170B	192	DK	C	SM170B
DK	SM150	C	DK	SM158	C	DK	SM170C	193	DK	C	SM170C
DK	SM151A	A	DK	SM159	E	DK		194	DK	E	SM160
DK	SM151B	A	DK	SM160	E	DK			DK	E	SM160

F: فنلاند، DK: دانمارک و E: انگلستان

مختلف *R. leguminosarum* به صورت تصادفی انتخاب و پس از تهیه برش عرضی از آنها وجود یا عدم وجود باکتری به کمک میکروسکوپ نوری بررسی شد (Haojie, 2014).

در این پژوهش از داده‌های ژنتیکی حاصل از توالی‌یابی کل ژنوم 194 سویه خالص باکتری *R. leguminosarum* به روش Illumina HiSeq 2500 معمول در آزمایشگاه دانشگاه آرهوس دانمارک جهت تشکیل ماتریکس حضور و عدم حضور ژن‌ها از طریق هم ترازوی ژنوم این سویه‌ها استفاده شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های فنوتیپی حاصل از سه صفت یاد شده (تعداد گره سفید، قرمز و کل) از نرم‌افزار SAS (v. 9.2) در قالب طرح کاملاً تصادفی با 4 تکرار استفاده شد و مقایسه میانگین، با کمک آزمون LSD انجام شد. شناسایی ژن‌های مرتبط با گره‌زایی در جمعیت باکتریایی *R. Leguminosarum* توسط نرم‌افزارهای R، EMMAX و PLINK و بررسی ساختار جمعیت (PCA) از نرم‌افزار R استفاده شد.

پس از رشد دادن باکتری‌ها در محیط TY در دمای 28 درجه سانتی‌گراد و دو روز بعد انتقال گیاهچه‌ها به محیط کشت فوق‌الذکر (بعد از تعیین غلظت باکتری‌ها با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 600 نانومتر) نسبت به مایه‌زنی گیاهان اقدام شد. برای مایه‌زنی، مقدار 50 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری روی ریشه هر گیاه مورد استفاده قرار گرفت (Haojie, 2014). سپس پتری‌ها به اتاقک رشد با شرایط 16 ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی با دمای 21 درجه سانتی‌گراد و رطوبت بین 70 الی 80 درصد انتقال داده شدند. اندازه‌گیری صفات مرتبط با گره‌زایی (تعداد گره سفید، تعداد گره قرمز و تعداد کل گره) در 194 سویه باکتری *R. leguminosarum* در روزهای 7، 14، 21 و 28 پس از مایه زنی انجام گرفت. از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی و مایه‌زنی با باکتری *Mesorhizobium loti* (R7A) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای تأیید وجود باکتری در گره‌های تشکیل شده از میکروسکوپ نوری استفاده شد. به این منظور تعداد 17 گیاه آلوده به سویه‌های

نتایج و بحث

نداشته‌اند، ولی بیشترین تعداد گره با مایه‌زنی توسط سویه SM155B به‌دست آمد (جدول 2). برای تأیید وجود باکتری درگره‌ها برش عرضی از گره‌های ایجادشده توسط 17 سویه مختلف *R. leguminosarum* تهیه شد. این بررسی نشان داد که تمام 17 سویه به‌صورت موفقیت‌آمیزی قادر به آلوده کردن ریشه‌های *L. burttii* بوده و تشکیل باکتریوئید دادند (شکل 2).

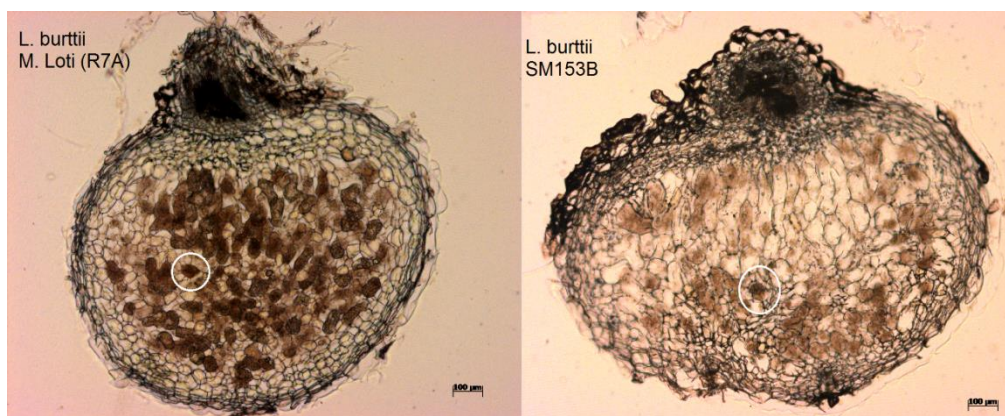
برای مطالعه ساختار جمعیتی سویه‌های مذکور، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) روی داده‌های حضور و عدم حضور ژن‌ها انجام گرفت. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که چهار مؤلفه اول در مجموع حدود 57 درصد از کل تغییرات را توجیه نمودند. به‌طوری که سهم مؤلفه‌های اول الی چهارم به‌ترتیب 31/4، 12/5، 7/8 و 6/1 درصد بود (شکل 3). نحوه پراکنش سویه‌ها در نمودار حاصل از مقادیر مؤلفه اول و دوم (43/9 درصد) حاکی از تفکیک کامل بین دو ژنوم A و C به‌ترتیب در گروه‌های 1 و 2 بود. گروه سوم شامل ترکیبی از سویه‌ها با ژنوم‌های E، B و D بود. لازم به ذکر می‌باشد که در گروه سوم ژنوم D تا حدودی توسط مؤلفه دوم از دو ژنوم دیگر تفکیک شد. گروه چهارم شامل ترکیبی از سویه‌ها با ژنوم B و E بود.

صفات تعداد گره سفید، تعداد گره قرمز و تعداد کل گره در روزهای 7، 14، 21 و 28 روز بعد از مایه‌زنی با سویه‌های باکتری *R. leguminosarum* در گیاه *L. burttii* بررسی و تنها داده‌های روز 28ام به‌دلیل اطمینان از حصول بیشترین تعداد گره قرمز تشکیل‌شده در یک دوره رشدی استفاده شد. نتایج نشان داد که تعداد گره‌های قرمز و سفید تشکیل‌شده در هر گیاهچه به‌ترتیب از صفر تا 3/9 (میانگین 0/56 و خطای استاندارد 0/6) و از صفر تا 3/7 (میانگین 0/54 و خطای استاندارد 0/59) متغیر بود. در این مطالعه از 194 سویه باکتری *R. leguminosarum* پنج سویه قادر به ایجاد گره روی ریشه‌های *L. burttii* نبودند. عدم تشکیل گره قرمز بعد از 28 روز از مایه‌زنی روی ریشه، نشان از سازگاری ضعیف در برقراری ارتباط بین باکتری و گیاه *L. burttii* بود. تعداد 166 سویه باکتری تشکیل‌گره‌های قرمز روی ریشه را تحریک کردند. آزمون مقایسه میانگین سویه‌های مختلف نشان داد که بیشترین تعداد گره سفید و قرمز به‌ترتیب متعلق به سویه‌های SM155B و SM36 بود (جدول 2). برای صفت تعداد کل گره، اگرچه 10 سویه دارای بیشترین تعداد گره از نظر آماری تفاوت معنی‌داری برای این صفت

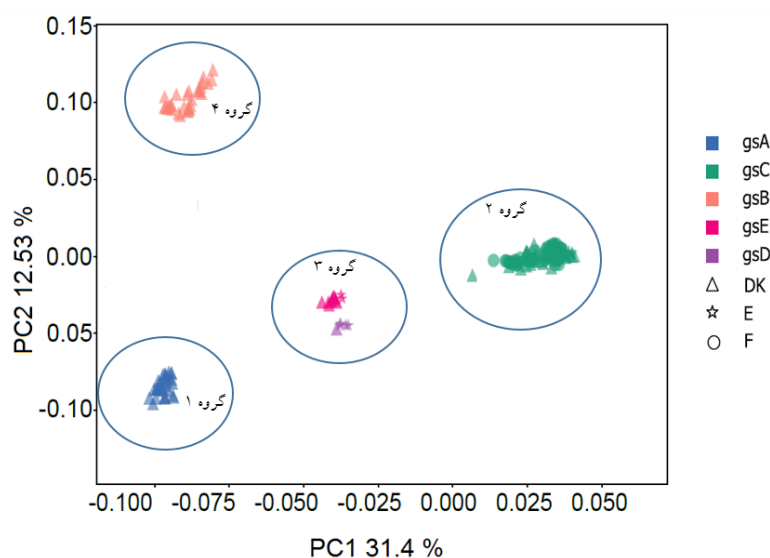
جدول 2. مقایسه میانگین صفات تعداد گره سفید، تعداد گره قرمز و تعداد کل گره‌ها برای ده سویه برتر

ردیف	سویه	میانگین تعداد کل گره	ردیف	سویه	میانگین تعداد گره سفید	ردیف	سویه	میانگین تعداد گره قرمز
1	SM155B	2/9 ^{a*}	1	SM155B	3/7 ^a	1	SM36	3/9 ^a
2	SM168B	2/3 ^{ab}	2	SM159	3/4 ^a	2	SM45	2/7 ^b
3	SM5	2/2 ^{abc}	3	SM168B	3/3 ^a	3	SM87A	2/6 ^b
4	SM157B	2/2 ^{abc}	4	SM5	3/1 ^{ab}	4	SM157B	2/2 ^b
5	SM159	2/1 ^{a-d}	5	SM168A	2/6 ^{bc}	5	SM155B	2/2 ^b
6	SM168A	2/1 ^{a-d}	6	SM130B	2/6 ^{bc}	6	SM154B	2/2 ^b
7	SM36	2 ^{a-e}	7	SM160	2/4 ^{bcd}	7	SM163A	2/1 ^{bc}
8	SM160	2 ^{a-e}	8	SM13	2/3 ^{cde}	8	SM170C	2 ^{bcd}
9	SM13	1/9 ^{a-g}	9	SM92	2/3 ^{cde}	9	SM146A	1/7 ^{bcd}
10	SM130B	1/9 ^{a-g}	10	SM157B	2/3 ^{cdef}	10	SM34	1/6 ^{cdef}

* میانگین‌ها با حروف مشابه تفاوت آماری معنی‌داری ندارند.



شکل 2. بررسی وجود باکتری در گره‌ها، برش عرضی (راست) برش عرضی گره مایه‌زنی شده توسط باکتری *R. leguminosarum* سویه SM153B؛ چپ) برش عرضی گره مایه‌زنی شده با باکتری *M. loti* (R7A). دایره سفید نشان دهنده باکتری می‌باشد.



شکل 3. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس داده‌های حضور و عدم حضور ژن‌ها در ژنوم 194 سویه باکتری *R. leguminosarum* ژنوم های A, B, C, D و E به ترتیب با رنگ های آبی، نارنجی، سبز، بنفش و قرمز نشان داده شده است. علامت های مثلث، ستاره و دایره به ترتیب دانمارک، انگلستان و فنلاند نشان می‌دهد.

تعداد 7094 ژن در باکتری *R. leguminosarum* برای بررسی ارتباط با صفت تشکیل گره قرمز در گیاه *L. burttii* مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از GWAS به منظور شناسایی ژن‌های مرتبط، توسط نرم‌افزارهای مختلف *R*، *EMMAX* و *PLINK* بر پایه ارزش *P* از بیشترین به کمترین برای 100 ژن اول مرتب شدند. در این مطالعه جهت شناسایی اپرون‌های مرتبط با صفت گره‌زایی قرمز دو مسئله مورد توجه قرار گرفت.

نرم‌افزار *EMMAX* مقدار واریانس ژنتیکی برای صفت تعداد گره قرمز را برابر با $0/423$ ($0/423 = \sigma^2_g$) و مقدار واریانس باقی‌مانده برابر با $0/254$ ($0/254 = \sigma^2_e$) برآورد کرده است. همچنین این نرم‌افزار مقدار وارث پذیری کاذب را برای صفت گره قرمز برابر با $0/31$ محاسبه کرد که از طریق برنامه *GAPIT* برابر با $0/26$ برآورد شده است. بنابراین مقدار واریانس فنوتیپی کل (مجموع واریانس ژنتیکی و باقی‌مانده) برابر با $0/67$ بود.

واگرایی تقریباً زیاد بین گروه‌های ژنتیکی سویه‌های *R. leguminosarum* نشان از تمایز طولانی مدت آنها در این گونه را دارد و این تمایز از جد مشترکی خاصی سرچشمه نگرفته است. گرچه تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به خوبی قادر به تفکیک سویه‌ها را از نظر ژنتیکی بود، ولی این تنوع نمی‌تواند برای جداسازی سویه‌ها براساس مناطق جمع‌آوری مفید باشد (شکل 3).

نتایج حاصل از GWAS به منظور شناسایی ژن‌های مرتبط، توسط نرم‌افزارهای مختلف R، EMMAX و PLINK حاکی از وجود یک اپرون مؤثر بر صفت گره‌زایی قرمز در 100 ژن اول بود. این اپرون شامل دو گروه ژنی با کدهای 6041 و 6042 بود. به نظر می‌رسد، گروه ژنی 6041 دمین غنی از تکراری‌های سیستمین باشد. Mesarich و همکاران (2015) اظهار داشتند که این دمین‌ها در ترشح موادی از باکتری جهت آلودگی ریشه‌ها مؤثر هستند. Saunders و همکاران (2012) عقیده داشتند که پسماندهای سیستمین (متشکل از پروتئین‌های کوچک حاوی سیستمین) موجب پایداری ساختمان چهارمین پروتئین-های ترش‌حی برای حفظ کارکرد آنها در فضای آپوپلاست می‌شوند. گروه ژنی دوم در این اپرون (گروه ژنی 6042) به‌عنوان دمین‌های پروتئین $OmpA$ / $MotB$ شناسایی شدند. این دو پروتئین هسته‌های اصلی پروتئین‌های ترش‌حی نوع T6SS را تشکیل می‌دهند که دارای نقش‌های بسیار زیاد در باکتری‌ها از جمله تطابق‌پذیری با محیط، حالت ته‌اجمی، همزیستی، تعامل بین باکتریایی و خاصیت ضد بیماری‌گری هستند (Mougouset *al.*, 2006; Nelson and Sadowsky, 2015). Roest و همکاران (1997) با شناسایی باکتری *R. leguminosarum* bv. *Trifolii* به این نتیجه

هر اپرون از تعدادی ژن در کنار یکدیگر (جدا یا دارای همپوشانی با ORF‌های دیگر) تشکیل می‌شود، یا دارای فواصل بین ژنی درون اپرونی بین 20- تا 100bp می‌باشند (Moreno-Hagelsieb and Collado-Vides, 2002). بنابراین، در این تحقیق تنها ژن‌هایی که بسیار نزدیک به یکدیگر بودند (با فاصله کمتر از 100bp) به‌عنوان یک اپرون در نظر گرفته شد. در نتیجه امکان جداسازی یک اپرون احتمالی در 100 ژن اول وجود دارد. این اپرون شامل دو گروه ژنی با کدهای 6041 و 6042 بود. گروه‌های ژنی این اپرون دارای فراوانی آلی حداقلی 0/25 بود که نشان از عدم حضور این اپرون در 25 درصد از سویه‌ها را داشت؛ علاوه بر آن ORF این دو گروه ژنی دارای همپوشانی نسبی بوده که تقریباً 1/5kb از ناحیه ژنومی را فرا گرفته بودند. در این مطالعه از 194 سویه باکتری *R. leguminosarum*، تعداد 166 سویه تشکیل گره‌های قرمز روی ریشه *L. burtii* را تحریک کردند. تمامی گیاهان آلوده شده با این سویه‌ها (166 سویه) علائم کمبود نیتروژن (رنگ زرد و قرمز در برگ و ساقه) را داشته که حاکی از عدم تثبیت نیتروژن توسط این سویه‌ها بود (شکل 1). وجود باکتری در گره‌ها پس از تهیه برش عرضی از گره‌ها و مشاهده باکتروئید تأیید شد؛ ولی گره‌های ناشی از آلودگی توسط *R. leguminosarum* در مقایسه با گره‌های ناشی از آلودگی توسط *M. loti* سویه R7A دارای تعداد باکتروئیدهای کمتری بودند (شکل 2). نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی روی داده‌های حضور و عدم حضور ژن‌ها نشان داد که دو مؤلفه اول 43/9 درصد از کل تغییرات را توجیه نمودند. نحوه پراکنش سویه‌ها در نمودار حاصل از مقادیر مؤلفه اول و دوم حاکی از تفکیک سویه‌ها بر اساس ژنوم آنها بود (شکل 3). این نتایج تا حدودی با مطالعات قبلی مطابقت داشت (Kumar *et al.*, 2015). Kumar و همکاران (2015) بیان نمودند که

1. Outer-membrane protein
2. Flagellar torque-generating protein

فاکتور ترش‌چی در رابطه با گره‌زایی در ریشه گیاه *L. burtii* وابسته به شریک همزیست است (Lin et al., 2018).

نتایج این آزمایش نشان داد که حضور ژن مرتبط با فاکتور ترش‌چی T6SS با اثر منفی بر تعداد گره‌های قرمز مرتبط بود به گونه‌ای که تشکیل گره قرمز در برخی از گونه‌ها به دلیل عدم حضور این اپرون بود (Bladergroen et al., 2003). به نظر می‌رسد، بررسی‌های ثانویه جهت تهیه موتانت تعدادی از سویه‌های این باکتری، جهت صحت کارکرد اپرون ضروری می‌باشد. علاوه بر آن تمامی سویه‌های مورد مطالعه کمبود نیتروژن را با خصوصیت برگی زرد و قرمز نشان دادند که بررسی‌های بیشتر در مطالعات آینده به خصوص در مورد فعالیت آنزیم نیتروژناز می‌تواند مفید باشد.

رسیدند که این باکتری از قدرت ایجاد گره‌های فعال روی *Pisum sativum* را ندارد. به دنبال آن Bladergroen و همکاران (2003) سویه موتاسیون یافته‌ای از باکتری گونه *R. Leguminosarum* را از طریق ترانسپوزن در خانواده ژنی به نام *imp* ایجاد کردند. این محققان با اضافه کردن ترانسپوزن *tn5* در ناحیه ژنی *impJ* (بعدها به نام *tssk* شناخته شد) موفق به حذف حداقل چهار پروتئین از واحدهای کانال ترش‌چی T6SS شدند. این موتانت موفق به ایجاد گره فعال در گیاه *Pisum sativum* شده است. Basler و همکاران (2013) بیان نمودند که اعضای خانواده پروتئین‌های ترش‌چی نوع T6SS قابلیت انتقال مواد پروتئینی به سیتوسل سلول‌های یوکاریوتی را دارا هستند. بنابراین، اختصاصی بودن میزبان باکتری‌ها، شاید به دلیل فعالیت فاکتور ترش‌چی T6SS بوده و احتمالاً فعالیت این

REFERENCES

- Barrett RDH, Hoekstra HE (2011) Molecular spandrels: Tests of adaptation at the genetic level. *Nature Reviews Genetics*. 12:767-780.
- Basler M, Ho BT, Mekalanos JJ (2013) Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell*. 152(4): 884-894.
- Bianco C, Senatore B, Arbucci S, Pieraccini G, Defeza R (2014) Modulation of endogenous Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in Bacteroids within *Medicago sativa* Nodules. *Applied and Environmental Microbiology*. 8: 4286-4293
- Bladergroen MR, Badelt K, Spaink HP (2003) Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16: 53-64.
- Broughton WJ, Dilworth MJ (1971) Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemical Journal*. 125(4): 1075-1080.
- Gossmann JA, Markmann K, Brachmann A, Rose LE, Parniske M (2012) Polymorphic infection and organogenesis patterns induced by a *Rhizobium leguminosarum* isolate from Lotus root nodules are determined by the host genotype. *New Phytologist*. 196(2): 561-73.
- Haojie J (2014) Illumina re-sequencing; a method to pinpoint symbiotic QTLs in Lotus, Dissertation, University of Aarhus.
- Ioannidis JPA (2005) Why most published research findings are false, *Plos Medicine*. 2: 696-701.
- Kumar N, Lad G, Giuntini E, Kaye ME, Udomwong P, Shamsani NJ, Young JPW, Bailly X (2015) Bacterial genospecies that are not ecologically coherent: population genomics of *rhizobium leguminosarum*. *Open*

- biology. 5: 140133.
- Laabei M, Recker M, Rudkin JK, Aldeljawi M, Gulay Z, Sloan TJ, Williams P, Endres JL, Bayles KW, Fey PD, Yajjala VK, Widhelm T, Hawkins E, Lewis K, Parfett S, Scowen L, Peacock SJ, Holden M, Wilson D, Read TD, van-den-Elsen J, Priest NK, Feil EJ, Hurst LD, Josefsson E, Massey RC (2014) Predicting the virulence of MRSA from its genome sequence. *Genome Research* 24: 839-849.
- Liang J, Hoffrichter A, Brachmann A, Marín M (2018) Complete genome of *Rhizobium leguminosarum* Norway, an ineffective *Lotus* micro-symbiont. *Standards in Genomic Sciences* 13: 36.
- Lin HH, Huang HM, Yu M, Lai EM, Chien HL, Liu CT (2018) Functional exploration of the bacterial type VI secretion system in mutualism: *Azorhizobium caulinodans* ORS571–*Sesbania rostrata* as a research model. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 31(8): 856-867.
- Madsen LH, Tirichine L, Jurkiewicz A, Sullivan JT, Heckmann AB, Bek AS, Ronson CW, James EK, Stougaard J (2010) The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nature Communications*. 1: 10.
- Mesarich CH, Bowen JK, Hamiaux C, Templeton MD (2015) Repeat-containing protein effectors of plant-associated organisms. *Frontiers in Plant Science*. 6: 872.
- Moonesinghe R, Khoury MJ, Janssens AC (2007) Most published research findings are false-but a little replication goes a long way. *PLOS Medicine*. 4: e28.
- Moreno-Hagelsieb G, Collado-Vides J (2002) A powerful non-homology method for the prediction of operons in prokaryotes. *Bioinformatics*. 18(1): 329-336.
- Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL, Joachimiak G, Ordonez CL, Lory S, Walz T, Joachimiak A, Mekalanos JJ (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312: 1526-1530.
- Nelson MS, Sadowsky MJ (2015) Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Frontiers in Plant Science* 6: 491.
- Peoples MB, Ladha JK, Herridge DF (1995) Enhancing legume N₂ fixation through plant and soil management. *Plant Soil* 174: 83-101.
- Rachwał K, Boguszewska A, Kopcinska J, Kara K, Tchorzewski M, Janczarek M (2016) The regulatory protein RosR affects *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii protein profiles, cell surface properties, and symbiosis with clover. *Front. Microbiology* 7: 1302.
- Roest HP, Mulders IH, Spaink HP, Wijffelman CA, Lugtenberg BJ (1997) A *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii locus not localized on the sym plasmid hinders effective nodulation on plants of the pea cross-inoculation group. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10: 938-941.
- Saunders D, Win J, Cano LM, Szabo LJ, Kamoun S (2012) Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi. *PLoS One* 7(1): e29847.
- Sheppard SK, Didelot X, Méric G, Torralbo A, Jolley KA, Kelly DJ, Bentley SD, Maiden MCJ, Parkhill J, Falush D (2013) Genome-wide association study identifies vitamin B5 biosynthesis as a host specificity factor in *Campylobacter*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 10: 11923-11927.
- Stanton-Geddes J, Paape T, Epstein B, Briskine R, Yoder J, Mudge J, Tiffin P (2013) Candidate genes and genetic

- architecture of symbiotic and agronomic traits revealed by whole-genome, sequence-based association genetics in *Medicago truncatula*. PLOS one. 8(5): e65688.
- Talas F, Kalih R, Miedaner T, McDonald BA (2009) Genome-Wide Association Study Identifies Novel Candidate Genes for Aggressiveness, Deoxynivalenol Production, and Azole Sensitivity in Natural Field Populations of *Fusarium graminearum*. Molecular Plant-Microbe Interactions 29(5): 417-430.
- Udvardi M, Poole PS (2013) Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. Annual Review of Plant Biology. 64: 781-805.
- Westhoek A, Field E, Rehling F, Mulley G, Webb I, Poole PS, Turnbull LA (2017) Policing the legume-Rhizobium symbiosis: a critical test of partner choice. Scientific Reports 7(1): 1419.
- Xiao BZ, Chen X, Xiang CB, Tang N, Zhang QF, Xiong LZ (2009) Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under field conditions. Molecular Plant 2: 73-83.