

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

محمد ضرابیان<sup>1\*</sup>، غلامعلی رنجبر<sup>2</sup>، سیدکمال کاظمی تبار<sup>2</sup>، حمید نجفی‌زرینی<sup>2</sup>

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<sup>1\*</sup>, Gholam Ali Ranjbar<sup>2</sup>, Seyed Kamal Kazemitabar<sup>2</sup>, Hamid Najafi Zarrini<sup>2</sup>

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<sub>2</sub>) 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<sub>3</sub>) از نیتروژن (N<sub>2</sub>) 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).

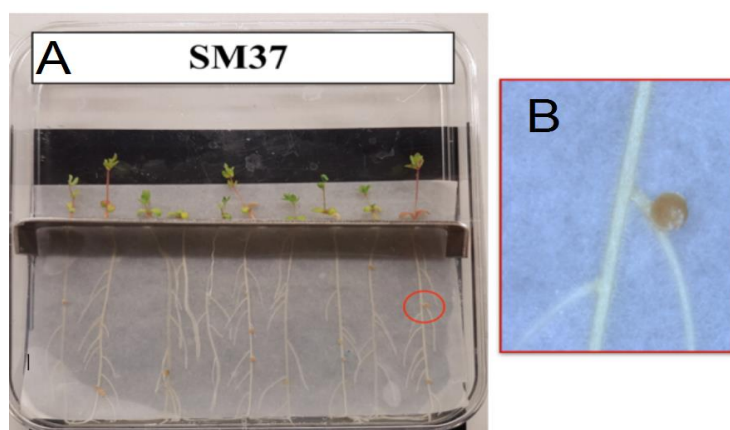
هدف اصلی این پژوهش شناسایی عوامل مرتبط با گره‌زایی و تعیین خصوصیات آن‌ها در بررسی همزیستی گیاه-باکتری است. لذا در این آزمایش جهت شناسایی ژن‌های باکتریایی مرتبط با تولید گره در همزیستی بین باکتری‌های گونه *R. leguminosarum* با گیاه *L. Burttii* از روش GWAS استفاده شد.

### 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 سوبیه 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، به دلیل عدم وجود روش‌های مناسب در مدل آماری می‌باشد. قدرت روش‌های آماری در آنالیزهای GWAS به وسیله 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 سوبیه 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 سوبیه *Staphylococcus aureus* مقاوم به



شکل 1. تعداد گره مورد بررسی در گیاه *L. burttii* پس از مایه‌زنی با باکتری *R. leguminosarum* سوبیه 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*

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

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	C	SM161	177	DK	C	SM151C	158	DK	A	SM144A	139
DK	A	SM163A	178	DK	A	SM152A	159	DK	A	SM144B	140
DK	A	SM163B	179	DK	A	SM152B	160	DK	A	SM145A	141
DK	C	SM164A	180	DK	A	SM152C	161	DK	A	SM145B	142
DK	D	SM164B	181	DK	C	SM153A	162	DK	A	SM145C	143
DK	C	SM164C	182	DK	C	SM153C	163	DK	A	SM146A	144
DK	C	SM165A	183	DK	C	SM153D	164	DK	A	SM146B	145
DK	C	SM165B	184	DK	A	SM154A	165	DK	C	SM147A	146
DK	C	SM166A	185	DK	A	SM154B	166	DK	C	SM147B	147
DK	C	SM166B	186	DK	A	SM154C	167	DK	C	SM147C	148
DK	C	SM167	187	DK	A	SM155A	168	DK	C	SM148A	149
DK	E	SM168A	188	DK	A	SM155B	169	DK	C	SM148B	150
DK	E	SM168B	189	DK	A	SM155C	170	DK	C	SM148C	151
DK	C	SM168C	190	DK	C	SM157A	171	DK	E	SM149A	152
DK	C	SM169	191	DK	C	SM157B	172	DK	C	SM149B	153
DK	C	SM170A	192	DK	C	SM157C	173	DK	C	SM149C	154
DK	C	SM170B	193	DK	C	SM158	174	DK	C	SM150	155
DK	C	SM170C	194	DK	E	SM159	175	DK	A	SM151A	156
				DK	E	SM160	176	DK	A	SM151B	157

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 مایه‌زنی 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

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 به دلیل اطمینان از حصول بیشترین تعداد گره قرمز تشکیل شده در یک دوره رشدی استفاده شد. نتایج نشان داد که تعداد گره‌های قرمز و سفید تشکیل شده در هر گیاهچه به ترتیب 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 تشکیل گره‌های قرمز روی ریشه را تحریک کردند. آزمون مقایسه میانگین سویه‌های مختلف نشان داد که بیشترین تعداد گره سفید و قرمز به ترتیب 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

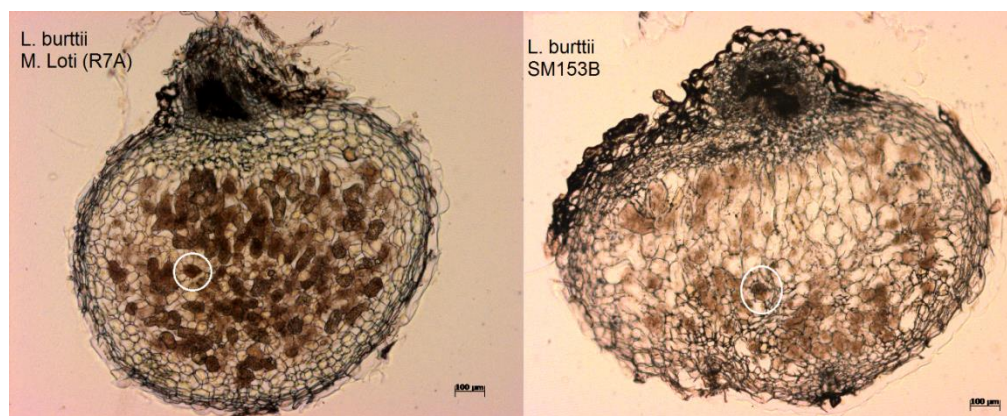
نداشته‌اند، ولی بیشترین تعداد گره با مایه‌زنی توسط سویه SM155B به دست آمد (جدول 2). برای تأیید وجود باکتری در گره‌ها برش عرضی از گره‌های ایجاد شده توسط 17 سویه مختلف *R. leguminosarum* تهیه شد. این بررسی نشان داد که تمام 17 سویه به صورت موفقیت‌آمیزی قادر به آلوده کردن ریشه‌های *L. burttii* بوده و تشکیل 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. به طوری که سهم مؤلفه‌های اول الی چهارم به ترتیب 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 به ترتیب 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.

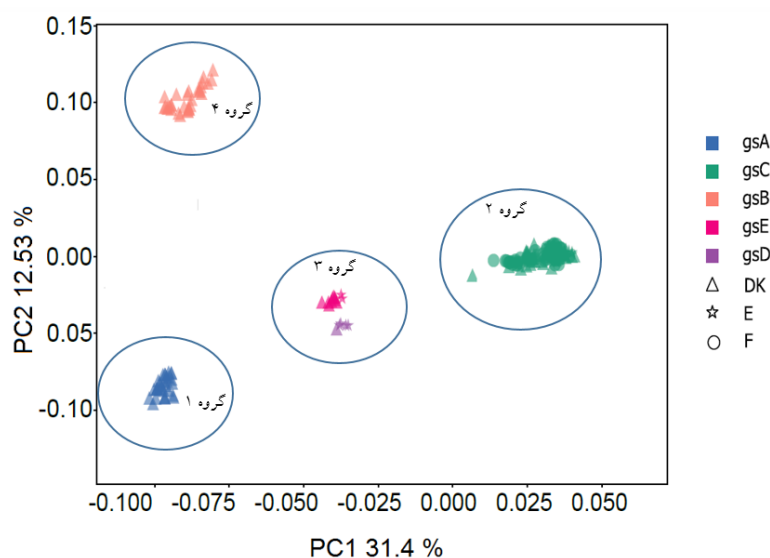
جدول 2. مقایسه میانگین صفات تعداد گره سفید، تعداد گره قرمز و تعداد کل گره‌ها برای ده سویه برتر

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

\* میانگین‌ها با حروف مشابه تفاوت آماری معنی‌داری ندارند.



شکل 2. بررسی وجود باکتری در گره‌ها. 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 باکترئوئید می‌باشد.



شکل 3. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس داده‌های حضور و عدم حضور ژن‌ها در ژنوم 194 سویه باکتری *R. leguminosarum*. ژنوم‌های A, B, C, D و E به ترتیب با رنگ‌های آبی، نارنجی، سبز، بنفش و قرمز نشان داده شده است. علامت‌های 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  $OmpA^1/MotB^2$  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. burttii* 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, Spink 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 N<sub>2</sub> 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.