



## انگشت نگاری ژنومی گونه های مختلف آزوسپیریلوم جدا شده از مزارع گندم و ذرت با استفاده از روش Rep-PCR

محمود شهابی<sup>۱</sup>، ناصر پنجه که\*<sup>۲</sup>، هادی اسدی رحمانی<sup>۳</sup>، محمد سالاری<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری، رشته بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، <sup>۲</sup>دانشیار، بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، <sup>۳</sup>دانشیار، موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

### چکیده

**سابقه و هدف:** جنس آزوسپیریلوم شامل ریزوباکتری های آزادزی، تثبیت کننده نیتروژن و محرک رشد گیاه هستند که می توانند رشد و عملکرد بسیاری از محصولات زراعی مهم از جمله برنج و گندم را تحت تأثیر قرار دهند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی گونه های بومی مختلف آزوسپیریلوم و بررسی تنوع ژنتیکی آن ها به عنوان عوامل محرک رشد گیاه انجام شد.

**مواد و روش ها:** در این پژوهش نمونه های خاک و ریشه مزارع گندم و ذرت استان اصفهان جمع آوری و در لوله های محتوی محیط کشت نیمه جامد فاقد نیتروژن (NFB) کشت شد. سپس جدایه های آزوسپیریلوم براساس ویژگی های مورفولوژیکی بر روی محیط کشت های اختصاصی و نیمه اختصاصی مانند NFB جامد و RC (Rojo Congo) جداسازی و خالص سازی گردید. برای شناسایی و تشخیص جدایه های آزوسپیریلوم آزمایش های مولکولی شامل آزمون واکنش زنجیره ای پلی مراز، توالی یابی ژن *16S rRNA* و انگشت نگاری ژنومیکی توسط آزمون واکنش زنجیره ای پلی مراز (REP) انجام شد.

**یافته ها:** تکثیر قطعات ۶۴۶ و ۲۶۳ جفت بازی وجود باکتری های آزوسپیریلوم را تأیید نمود. در توالی یابی ژن *16S rRNA* نیز گونه های *A. brasilense*، *A. lipoferum* و *A. zeaе* مشخص گردید. انگشت نگاری ژنوم جدایه های باکتریایی نیز نقش های منحصر به فرد ژنتیکی را از طریق تکثیر عناصر تکراری (BOX-AIR) BOX، ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) و REP برای هر جدایه تولید نمود و وجود تنوع ژنتیکی زیاد بین جدایه ها را نشان داد.

**نتیجه گیری:** نتایج این پژوهش نشان داد که جدایه های آزوسپیریلوم مزارع گندم و ذرت استان اصفهان دارای گونه ها و تنوع ژنتیکی زیادی است و الگوهای باند تکثیر شده با آزمون rep-PCR می تواند برای تشخیص و طبقه بندی گونه های آزوسپیریلوم مفید باشد. **واژگان کلیدی:** آزوسپیریلوم، توالی یابی، روش rep-PCR، تنوع ژنتیکی.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: مهر ماه ۹۸

### مقدمه

آزادزی، تثبیت کننده نیتروژن، و محرک رشد گیاه می باشد که می تواند رشد و عملکرد بسیاری از محصولات زراعی مهم از جمله برنج و گندم را تحت تأثیر قرار دهد (۲). اعضای جنس آزوسپیریلوم توزیع اکولوژیکی گسترده ای را نشان می دهند و در بسیاری خاک ها در نواحی مختلف جغرافیایی یافت

گونه های مختلف جنس آزوسپیریلوم (*Azospirillum*) به عنوان ریزوباکتری های محرک رشد گیاه مهم، مورد توجه زیادی قرار گرفته اند (۱). این جنس شامل ریزوباکتری های

(\* آدرس برای مکاتبه: زابل، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه پزشکی

تلفن: ۰۵۴-۳۱۲۳۲۱۲۵ پست الکترونیک: naserpanjekeh@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (<http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/>) در

فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.



گردد (۱۱ و ۱۳).

این تکنیک یک روش مفید جهت تفکیک (تمایز) و طبقه بندی سویه های باکتریایی در سطح زیر گونه است (۱۴). ورسالوویچ (Versalovic) و همکاران (۱۵) گزارش کردند که انگشت نگاری ژنومی ژنوم های مختلف پروکاریوتی تولید شده به وسیله تکثیر براساس الیگونوکلئوتیدهای پیوسته ERIC و REP. نقوش DNA واضح ایجاد نمود و برای شناسایی سریع گونه ها و سویه های باکتریایی مفید خواهد بود.

آزمون rep-PCR براساس آغازگرهای DNA مطابق با عناصر تکراری موجود به صورت طبیعی در باکتری ها مانند عناصر REP، ERIC و BOX است (۱۶). در این روش، دانش قبلی از توالی DNA هدف لازم نیست (۱۷). آزمون rep-PCR قدرت تمایز بیشتری نسبت به روش PCR ژن *16S rRNA* و آزمون چندشکلی طول قطعه برشی (Restriction Fragment Length Polymorphism=RFLP) نشان داده است (۱۸ و ۱۹) و قدرت تمایز کنندگی مشابه با آزمون DNA چند شکلی تکثیرشده به صورت تصادفی (Randomly Amplified Polymorphic DNA=RAPD) را فراهم می کند (۲۰). علاوه بر این، روش rep ساده تر از سایر پروتکل های DNA ژنومی برای طبقه بندی بر اساس روش های مولکولی است (۲۱).

این تحقیق با هدف جداسازی و شناسایی برخی از گونه های بومی باکتری آزو اسپیریلوم از ریزوسفر غلات (گندم و ذرت) با استفاده از آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی و تجزیه و تحلیل ژن *16S rRNA* و همچنین بررسی تنوع ژنتیکی باکتری آزو اسپیریلوم به عنوان باکتری محرک رشد انجام شد.

### مواد و روش ها

**الف) جداسازی سویه های باکتریایی:** نمونه های خاک و ریشه از ریزوسفر گیاهان گندم و ذرت به عمق ۳۰-۵ سانتی متری به صورت تصادفی از مزارع شهر استان اصفهان برداشته شد و در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان جداسازی نگهداری گردید. جداسازی سویه های باکتری آزو اسپیریلوم از این نمونه ها با روش کانیموژی (Kanimozhi) و پانیرسلوام (Panneerselvam)

می شود. اگرچه در اکوسیستم های کشاورزی، جمعیت آزو اسپیریلوم در خاک غیرریزوسفری نیز وجود دارد اما در خاک (سیستم) های ریزوسفر خیلی فراوان تر می باشد (۳). فعالیت محرک رشد گیاه باکتری آزو اسپیریلوم عمدتاً به ترشح اکسین و تولید اکسید نیتروژن (NO) نسبت به توانایی تثبیت نیتروژن باکتری ها نسبت داده می شود. اکسین طویل شدن ریشه گیاه را افزایش می دهد، که منجر به جذب موثرتر مواد مغذی می گردد (۲ و ۴).

تا به امروز، حداقل ۱۸ گونه از جنس آزو اسپیریلوم شرح داده شده است. با این حال، توجه بیشتر به تحقیق در مورد آزو اسپیریلوم برزیلنس (*A. brasilense*) و آزو اسپیریلوم لیپوفروم (*A. lipoferum*) شده است (۵-۷). توالی های ژنوم کامل چهار عضو از گونه های آزو اسپیریلوم شامل، سویه Sp245 از آزو اسپیریلوم برزیلنس (*brasilense* Sp245)، سویه 4B آزو اسپیریلوم لیپوفروم (*A. lipoferum* 4B)، سویه B510 (*Azospirillum sp.* B510) و گونه آزو اسپیریلوم آمازوننس (*Azospirillum amazonense*) تاکنون در پایگاه های داده NCBI (National Center for Biotechnology Information) موجود می باشد (۸-۱۰).

ظهور تکنیک های ژنتیک مولکولی و کاربرد آنها در اکولوژی میکروبی نشان داده است که تنها بخش کوچکی از تنوع میکروبی طبیعی کشف شده است. اطلاعات دقیق در مورد ژنتیک مولکولی میکروارگانیسم های قبلاً توصیف (مشخص) نشده ممکن است اطلاعات بیشتری در تکامل عملکرد باکتری ها از یک گونه معین در زیستگاه خود یا در یک محیط خارجی ارائه نماید (۱۱). روش های انگشت نگاری ژنومی بر اساس واکنش زنجیره ای پلی مرز برای شناسایی و طبقه بندی باکتری های وابسته به گیاه به سطح زیر گونه استفاده شده است (۱۲). در میان انواع مختلف روش های ژنتیکی موجود، آزمون rep-PCR (واکنش زنجیره ای پلی مرز براساس عناصر پالیندرومی خارج ژنی تکراری) یک ابزار متمایزکننده قوی برای اهداف تاکسونومی فراهم می کند و ممکن است برای تعیین تنوع و تکامل بین ژنوم های مختلف میکروبی استفاده

A25r, 5'-CTTGTCACC و ATACGAAGGGGGCK-3' (Azo494-F/Azo756-R و GGCAGTTCACCAG-3') و (Azo494-F, 5'-GGCCYGWYAGTCAGRAGTG-3' Azo756-R, 5'-AAGTGCATGCACCCRRCGTCTAG C-3') برای تشخیص ۷ باکتری جدا شده از ریزوسفر گیاهان گندم و ذرت به همراه یک سویه از باکتری ریزوبیوم (*Rhizobium*) به عنوان کنترل منفی انجام شد.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x PCR، دو میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۰/۴ میلی مولار dNTPs، ۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرها، ۱/۵ واحد از آنزیم پلی مرز DNA (*Tag* (۵ واحد در میکرولیتر) به اضافه یک میکرولیتر از DNA استخراج شده بود. چرخه حرارتی برای آغازگرهای Az16S-A با واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه آغاز و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی DNA در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۶۳ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و در نهایت یک سیکل گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ده دقیقه و برای آغازگرهای Azo494-F/Azo756-R با واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه آغاز و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی DNA در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت نیم دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۶۴ درجه سلسیوس به مدت ۱/۵ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و در نهایت یک سیکل گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد.

به منظور بررسی قطعات تکثیر شده، ژل آگارز (مرک، آلمان) ۱/۲ درصد تهیه و محصولات PCR به همراه مارکر ۱۰۰ جفت بازی (تهیه شده از شرکت سیناکلون، ایران) در چاهک های آن بارگذاری و به مدت ۹۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد. پس از آن با استفاده از رنگ اسید نوکلئیک SimplySafe (شرکت EURx) رنگ آمیزی صورت گرفت (به میزان پنج میکرولیتر در ۱۰۰ سی سی محلول آگاروز) و با استفاده از

و ردیف و حسن (Radif & Hassan) با استفاده از محیط کشت نیمه جامد NFB (محتوی DL-malic acid، ۵ گرم  $K_2HPO_4$ ، ۰/۵ گرم KOH، ۴ گرم  $MgSO_4 \times 7H_2O$ ، ۰/۱ گرم NaCl، ۰/۲ گرم  $CaCl_2$ ، ۰/۱ گرم  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۰۵ گرم  $Na_2MoO_4$ ، ۰/۰۲ گرم  $MnSO_4 \times 4H_2O$ ، ۰/۰۱ محلول ۰/۵ درصد برم تیمول بلو در اتانول ۲ ml، ۷ pH و آگار ۱/۸ گرم در لیتر)، NFB جامد (محتوی ۱۸ گرم آگار در لیتر) و RC (محتوی DL-malic acid، ۵ گرم  $K_2HPO_4$ ، ۰/۵ گرم KOH، ۴/۵ گرم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۲ گرم NaCl، ۰/۱ گرم  $FeCl_3 \times 6H_2O$ ، ۰/۱۵ گرم عصاره مخمر ۰/۵ گرم محلول آبی ۰/۲۵ درصد کنگو رد ۱۵ ml با ۷ pH و آگار ۱۸ گرم در لیتر) انجام شد (۲۲ و ۲۳). در نهایت این جدایه ها بر روی محیط کشت RC خالص سازی شدند.

ب) جداسازی DNA ژنومی: برای استخراج DNA ژنومی، جدایه های آزو اسپریلوم در محیط کشت Tryptic Soy Broth رشد داده شدند و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت در یک چرخاننده دوار در ۹۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. برای استخراج ماده ژنتیکی (DNA) از کیت استخراج ژنوم باکتری های گرم منفی (سیناپیور، سیناژن، ایران) استفاده و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج انجام شد. غلظت DNA با مقایسه شدت فلورسنت بعد از رنگ آمیزی با استفاده از رنگ اسیدنوکلئیک SimplySafe (شرکت EURx، لهستان) بر روی یک ژل آگاروز ۱٪ تحت اشعه ماورای بنفش با غلظت DNA معلوم تعیین گردید. میکروتیوب های محتوی DNAهای استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به منظور آزمون های بعدی نگهداری شدند.

ج) تشخیص باکتری های آزو اسپریلوم توسط آغازگرهای اختصاصی: در زمینه میکروبی، آزمون PCR به طور گسترده ای جهت تکثیر، شناسایی و اندازه گیری قطعات DNA هدف از زمان اختراع آن مورد استفاده قرار گرفته است (۲۴ و ۲۵).

این آزمون مطابق با روش شیم-هاتوری (Shime-Hattori) و همکاران (۲۶) و لین (Lin) و همکاران (۵) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Az16S-A(A2324f, 5'-GCG GTA

Eric2: 5'-AAG و TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3' (REP 1R/REP و TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3' REP و 2I (REP 1R, 5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3' (2I, 5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3') نقوش ژنتیکی گونه ها و جدایه های مختلف آروسپیریلوم بر اساس دستورالعمل پیشنهادی ماماریل (Mamaril) و ترینیداد (Trinidad) برای مطالعه همبستگی سویه ها انجام شد (۱۸ و ۳۰)

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x PCR، دو میلی مولار MgCl<sub>2</sub>، ۰/۵ میلی مولار dNTPs، ۱۵ پیکومول از هر یک از آغازگرها، ۱/۵ واحد از آنزیم پلی مراز Tag DNA (۵ واحد در میکرولیتر، سیناکلون، ایران) به اضافه ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده بود. چرخه حرارتی با واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۶ دقیقه آغاز و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی DNA در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۲، ۵۳ و ۴۴ درجه سلسیوس (به ترتیب برای آغازگرهای BOX، ERIC و REP) به مدت یک دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و در نهایت یک چرخه گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. این دستورالعمل برای هر یک از آغازگرها با استفاده از DNA الگوی گونه های مختلف آروسپیریلوم انجام گرفت. قطعات DNA تکثیر شده، بر روی ژل آگاروز ۲/۵ درصد رنگ آمیزی شده با SimplySafe™ در ۹۰ ولت به مدت ۳/۵ ساعت الکتروفورز و سپس تصویر برداری از ژل آگاروز توسط دستگاه ژل داک Vilber Lourmat (E-BOX-France) انجام شد.

(ز) آنالیز داده های ژنوتیپی: در این مطالعه فاصله ژنتیکی جدایه ها با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc 2.02 (Numerical Taxonomy & Multivariate Analysis System) کشیده شد (۳۱). فاصله یا شباهت ژنتیکی بین افراد مبتنی بر نشانگرهای مولکولی با استفاده از حضور یا عدم وجود باند (ها) در ژل تعیین شد. خصوصیات ژنوتیپ به عنوان کد ۱

دستگاه Uvitec Transilluminator (تولیدی کمبریج، انگلستان) از آن عکس برداری شد. سپس وزن مولکولی قطعات تکثیر شده به صورت چشمی با استفاده از مارکر اندازه گیری و با قطعات تکثیر شده جدایه های شاهد مثبت استاندارد مقایسه گردید.

(د) شناسایی مولکولی جدایه های آروسپیریلوم با استفاده از توالی یابی ژن *I6S rRNA*: آزمون PCR برای تکثیر ژن *I6S rRNA* با استفاده از آغازگرهای F27 (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3') و R1492 (5'-GGT TAC CTT و TCA TGG CTC AG-3') (GTT ACG ACT T-3') انجام شد (۲۷). شرایط انجام PCR و کلونینگ قطعات بر اساس روش مزینانی و اصغرزاده (Mazinani & Asgharzadeh) با دمای اتصال در ۵۷ درجه سلسیوس و حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد (۳۰). برای اطمینان از تکثیر باندهای مورد نظر، محصولات واکنش با ژل آگاروز ۱/۲ درصد پس از رنگ آمیزی با SimplySafe™ الکتروفورز گردید. قطعات تکثیر شده به منظور توالی یابی به شرکت بایونیر کره جنوبی ارسال شد. پس از توالی یابی نمونه ها، توالی های رفت و برگشت به دست آمده توسط نرم افزار Vector NTI Advance™ 10 (۲۹) اصلاح و توالی های کانتیگ (Contig) ایجاد شد. در نهایت توالی های کانتیگ با سایر توالی های موجود در سایت NCBI به آدرس (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) مقایسه و بلاست گردید. در این مقایسه، نزدیک ترین توالی های مرتبط با سویه های تیپ مشابه با توالی های جدایه ها مورد جستجو قرار گرفتند.

(ه) شماره های دسترسی توالی های نوکلئوتیدی: توالی های نوکلئوتیدی مشخص شده در این مطالعه در پایگاه داده GenBank تحت شماره های دسترسی MH130054 تا MH130060 ثبت گردید.

(و) انگشت نگارهای ژنومی گونه های مختلف آروسپیریلوم: انگشت نگاری DNA توسط rep-PCR با استفاده از آغازگرها شامل BOX AIR (BOX, 5'-CTA CGG CAA GGC GAC ERIC 1R/ERIC 2 (Eric1R, 5'-ATG.GCT GAC G-3')

تأیید و تشخیص جدایه های آزوسپیریلیوم توسط آزمایش های مولکولی با استفاده از آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی، توالی یابی ژن *16S rRNA* و تولید انگشت نگاری ژنومیکی توسط rep-PCR انجام شد.

ج) تشخیص باکتری های آزوسپیریلیوم توسط آغازگرهای اختصاصی: در آزمایش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Az16S-A و Azo494-F/Azo756-R، جدایه های آزوسپیریلیوم به ترتیب قطعات ۶۴۶ و ۲۶۳ جفت بازی تولید کردند، در حالی که جدایه *Rhizobium sp.* به عنوان کنترل منفی هیچ بانندی تولید نکرد (شکل ۱).

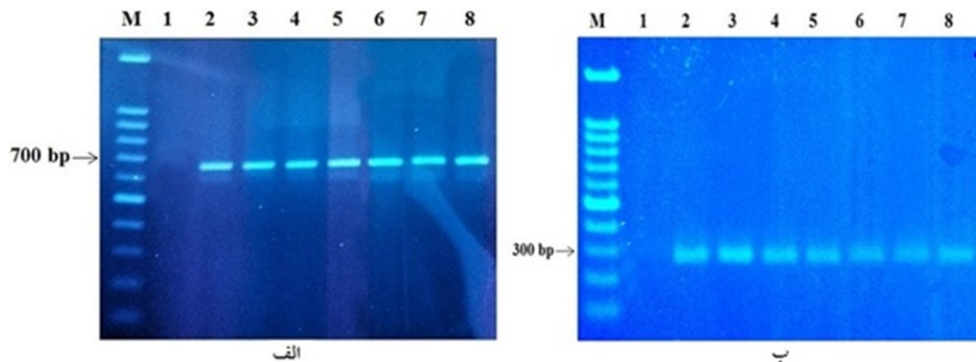
د) شناسایی مولکولی جدایه های آزوسپیریلیوم با استفاده از توالی یابی ژن *16S rRNA*: در توالی یابی با استفاده از تکثیر ژن *16S rRNA* قطعاتی با طول تقریباً ۱۵۰۰ جفت باز، توسط پرایمرهای R1492/F27 تکثیر شد (شکل ۲). پس از توالی یابی و ایجاد توالی های کانتیگ، تطابق توالی *16S rRNA* جدایه های مورد نظر با سایر توالی های *16S rRNA* موجود در بانک ژنی NCBI، شباهت توالی ۹۹ درصدی Azo1 را با باکتری *A. lipoferum* سویه ۵ نشان داد. توالی های هر دو جدایه Azo3 و Azo7 همبستگی ۹۹ درصدی با باکتری *A. brasilense* سویه NF11 داشت. توالی جدایه Azo2 نیز با توالی باکتری *A. brasilense* سویه Az72 و جدایه Azo4 با توالی باکتری *A. lipoferum* سویه B2، ۹۹٪ شباهت داشتند. همچنین جدایه های Azo5 و Azo6 به ترتیب با ۹۷ و ۹۹٪ به

(حضور باند) و کد ۰ (نبود باند) در نرم افزار تعریف شد. این نرم افزار توانایی تجزیه و تحلیل داده ها و رسم دندروگرام را دارد. بر اساس ویژگی های ژنوتیپی، دندروگرام ۷ جدایه با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc 2.02 ایجاد و درصد تشابه بین جدایه ها در گروه ها محاسبه گردید. در این نرم افزار تجزیه گروهی (خوشه ای) بر اساس روش سلسله مراتبی (Hierarchical Technique) انجام و برای بررسی فاصله واقعی میان گروه ها از روش UPGMA (Unweighted Pair-Group method using Arithmetic Average) و ضریب تشابه جاکارد (J) استفاده شد. این روش بیشتر از روش های دیگر استفاده می شود زیرا ویژگی های همه اعضای دو خوشه را پوشش می دهد.

#### یافته ها

الف) جداسازی سویه های باکتریایی: از نمونه های ریزوسفری خاک و ریشه گیاهان، هفت جدایه آزوسپیریلیوم (چهار جدایه از گندم و سه جدایه ذرت) براساس ویژگی های مورفولوژیکی در محیط های NFB و RC (کلنی های سفید و سفید، اغلب چروکیده) جداسازی و خالص سازی گردید.

ب) جداسازی DNA ژنومی: پس از استخراج ماده ژنتیکی جدایه های آزوسپیریلیوم با استفاده از کیت مخصوص باکتری های گرم منفی، الکتروفورز محصول استخراج در ژل آگاروز ۱ درصد موفقیت استخراج ژنوم جدایه ها را تایید نمود.

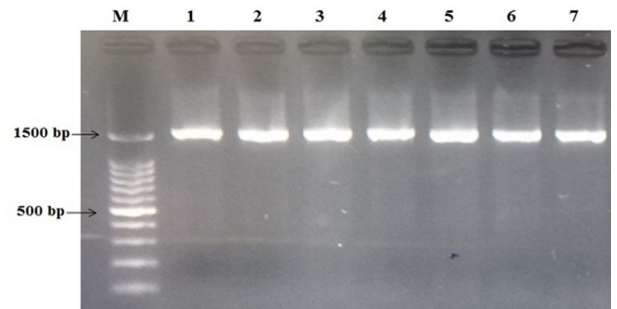


شکل ۱: محصولات PCR تکثیر شده توسط آغازگرهای Az16S-A (الف: ۶۴۶ جفت باز) و Azo494-F/Azo756-R (ب: ۲۶۳ جفت باز) حاصل از گونه های آزوسپیریلیوم. (M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ردیف ۱، باکتری *Rhizobium sp.* (کنترل منفی)، ردیف های ۲ تا ۸ سویه های آزوسپیریلیوم جدا شده از گندم و ذرت



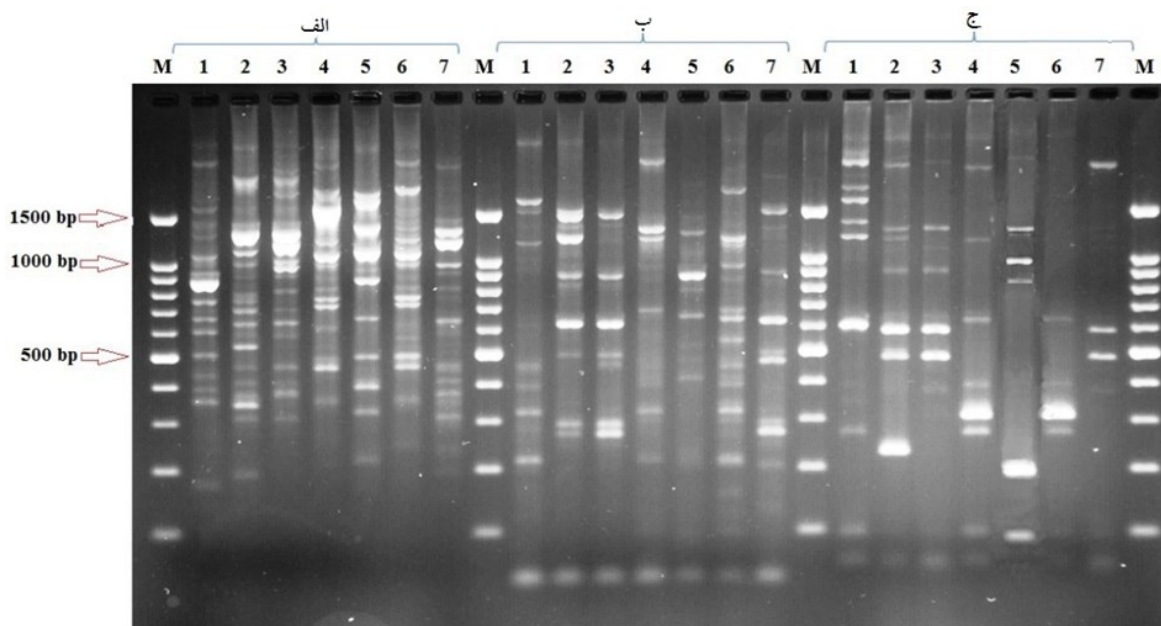
واضح و نامعلوم متعددی حاصل گردید. بر اساس آغازگر BOX AIR، چندین باند در اندازه های حدود ۱۷۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز تکثیر گردید و جدایه ها الگوهای انگشت نگاری را از نه (Azo4) تا ۱۸ (Azo2) باند نشان دادند (شکل ۳ قسمت الف). تجزیه و تحلیل داده های نقوش انگشت نگاری بدست آمده از واکنش rep-PCR با آغازگر BOX AIR، دو گروه اصلی با ۱۴٪ شباهت را ایجاد نمود. گروه یک (I) شامل جدایه های Azo1 و Azo5 با تشابه ۲۳٪ بود. گروه دو (II) نیز به دو زیرگروه تقسیم شد و سویه های دیگر با ۲۱٪ شباهت را دربرداشت و حداکثر شباهت در جدایه های Azo2 و Azo3 با ۶۲٪ دیده شد (شکل ۴).

در ERIC-PCR، هشت تا ۱۷ باند با اندازه حدود ۱۵۰ تا ۳۲۰۰ جفت باز تکثیر شد (شکل ۳ قسمت ب) و جدایه Azo6 بیشترین تعداد قطعات را (۱۷ عدد) و جدایه Azo5 کمترین تعداد باند (۸ عدد) را نشان داد. دندروگرام به دست آمده از تجزیه و تحلیل داده های ERIC-PCR در شکل ۵ نشان داده شده است. براساس دندروگرام ERIC-PCR جدایه ها دو گروه اصلی با ۸٪ شباهت تشکیل دادند، که شباهت انگشت نگاری

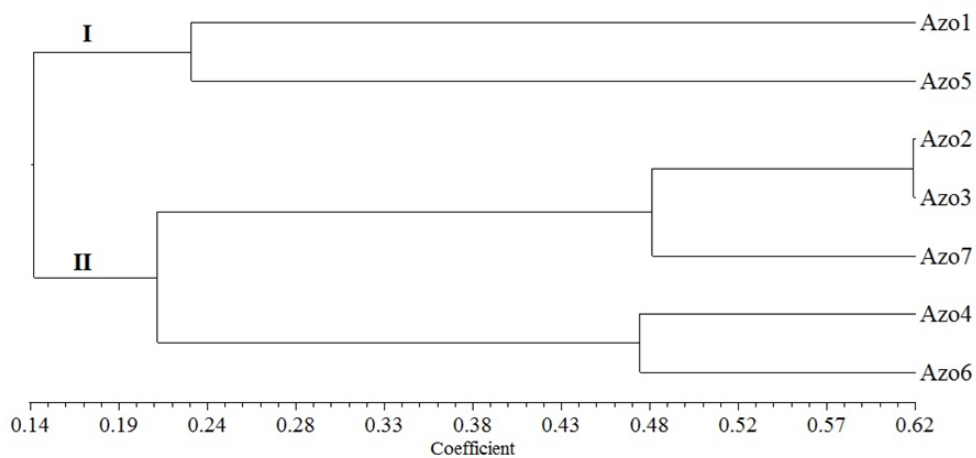


شکل ۲: محصولات PCR ژن 16S rRNA جدایه های آروسپیریلوم تکثیر شده توسط آغازگرهای F27 و R1492. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ردیف ۱ تا ۷: سویه های آروسپیریلوم جدا شده از گندم و ذرت

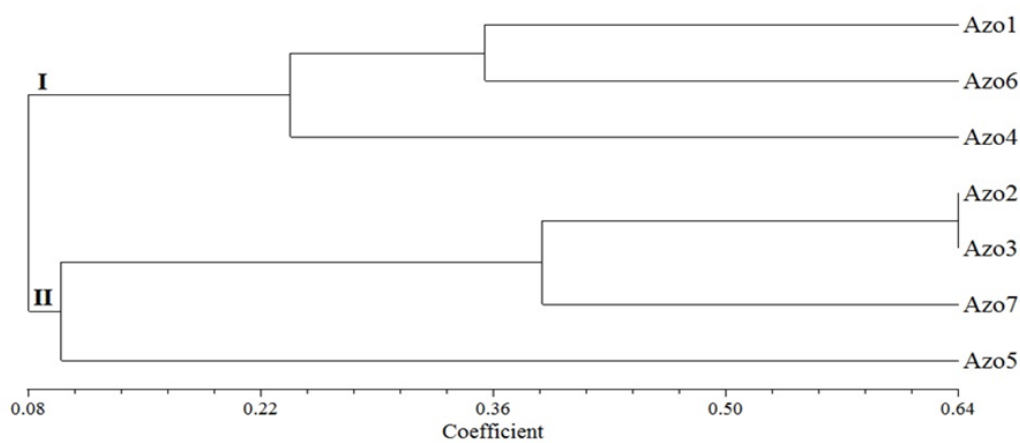
توالی باکتری *A. zeae* سویه Gr2 شبیه بودند. در نهایت توالی های ژن 16S rRNA تازه به دست آمده در بانک ژن با شماره دسترسی های MH130054 تا MH130060 ثبت گردید. (ه) ایجاد انگشت نگارهای ژنومی گونه های مختلف آروسپیریلوم و آنالیز داده های ژنوتیپی: در مطالعه تعیین شباهت ژنتیکی بین جدایه های آروسپیریلوم، این جدایه ها تنوع زیادی را در آزمون rep-PCR نشان داده و نقوش منحصر به فرد ژنتیکی تولید نمودند. با استفاده از واکنش rep-PCR باندهای



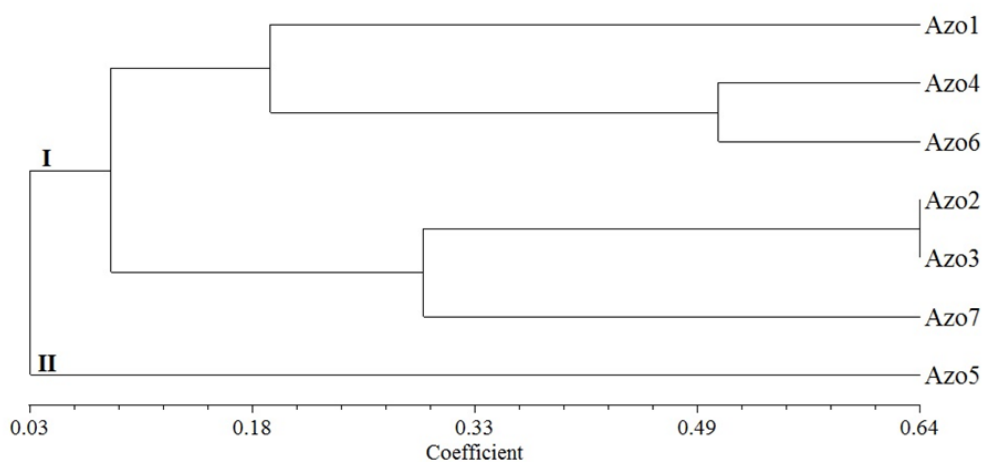
شکل ۳: نقوش الکتروفورزی محصول PCR در جدایه های آروسپیریلوم با استفاده از آغازگرهای BOX AIR (قسمت الف)، ERIC IR/ERIC 2 (قسمت ب) و REP IR/REP 2 (قسمت ج). M- مارکر 100 bp تهیه شده از شرکت سیناکلون، ردیف ۱ تا ۷، سویه های آروسپیریلوم جدا شده از گندم و ذرت (اعداد سمت چپ اندازه های جرم مولکولی برخی از باندهای مارکر رانشان می دهد).



شکل ۴: دندروگرام جدیدی های آزوسپیریلیوم بر اساس آغازگر BOX AIR



شکل ۵: دندروگرام جدیدی های آزوسپیریلیوم بر اساس آغازگرهای ERIC IR/ERIC 2



شکل ۶: دندروگرام جدیدی های آزوسپیریلیوم بر اساس آغازگرهای REP IR/REP 2

آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی، توالی یابی ژن *16S rRNA* و تولید انگشت نگاری ژنومیککی توسط rep-PCR به منظور تأیید و تشخیص جدایه های آزو اسپریلوم انجام گرفت.

در آزمایش PCR با آغازگرهای Az16S-A و Azo494-F/ Azo756-R، تمامی جدایه ها قطعات مورد نظر را تکثیر نمودند. شیم-هاتوری (Shime-Hattori) و همکاران (۲۶) و لین (Lin) و همکاران (۵) آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی فوق را جهت شناسایی گونه های آزو اسپریلوم از باکتری های دیگر با توانایی تثبیت نیتروژن مانند ریزوبیوم استفاده نمودند و بطور کلی نشان دادند که اختصاصیت و حساسیت این آغازگرها برای تشخیص باکتری جنس آزو اسپریلوم بسیار مفید می باشد.

استفاده از PCR یک روش آسان، سریع و کم هزینه بوده و می تواند به عنوان یک ابزار سودمند برای تشخیص گونه های آزو اسپریلوم به منظور یافتن گونه های جدید مورد استفاده قرار گیرد (۱). همچون مطالعات پیشین استفاده از آغازگرهای اختصاصی Az16S-A و Azo756-R/Azo494-F، تشخیص و شناسایی جدایه های آزو اسپریلوم در میان جمعیت های باکتریایی ریزوسفر را تسریع نمود و می تواند برای مطالعات بیشتر مورد استفاده قرار گیرد.

شناسایی بیشتر این جدایه ها توسط تجزیه و تحلیل توالی *16S rRNA*، حضور گونه های *A. lipoferum*، *A. brasilense* و *A. zea* را در ریزوسفر گیاهان گندم و ذرت در اصفهان نشان داد. بر اساس مطالعات پیشین باشان (Bashan) و همکاران (۳۲)، آیاز (Ayyaz) و همکاران (۳۳)، ایلایس (Ilyas) و همکاران (۳۴) و ترند (Tarrand) و همکاران (۳۵) گونه های *A. lipoferum*، *A. brasilense* و *A. zea* در ریزوسفر گیاهان گندم و ذرت موجود بوده و توالی یابی ژن *16S rRNA* نیز حضور این گونه ها را در ریزوسفر گیاهان گندم و ذرت در اصفهان تأیید نمود. این تحقیق اولین گزارش از حضور باکتری *A. zea* در ریزوسفر گیاه ذرت در اصفهان و احتمالاً در ایران می باشد با وجود اینکه این گونه قبلاً از ریشه های ذرت در برخی از نقاط جهان جداسازی شده بود

ژنومی آن ها به ترتیب در حدود ۲۴ و ۱۰ درصد در گروه I و II بود. گروه های I و II نیز به دو زیرگروه تقسیم شدند. اولین زیرگروه از گروه I شامل جدایه های Azo1 و Azo6 با ۳۶٪ شباهت و دومین زیرگروه محتوی جدایه Azo4 بود. در زیرگروه اول گروه II جدایه های Azo2، Azo3 و Azo7 نیز با ۳۹٪ شباهت قرار داشتند و جدایه Azo5 در زیرگروه دوم بود. شایان یادآوری است که جدایه های Azo2 و Azo3 در دندروگرام بیشترین شباهت (۶۴٪) را با هم داشتند.

چندین باند بین تقریباً ۹۰ تا ۳۵۰۰ جفت باز توسط Rep-PCR با استفاده از آغازگر REP 1R/REP 2 تکثیر گردید و تعداد باندها بین جدایه های مختلف متفاوت و از چهار عدد (جدایه های Azo6 و Azo7) تا ۱۲ عدد (جدایه Azo1) متغیر بود. تعداد قطعات تکثیر شده توسط Rep-PCR کمتر از الگوهای تولید شده توسط Box-PCR و ERIC-PCR (شکل ۳ قسمت ج) بود. براساس دندروگرام REP-PCR، جدایه های آزو اسپریلوم به دو گروه اصلی تقسیم شدند. گروه I به دو زیرگروه تقسیم شد و شامل جدایه های Azo1، Azo2، Azo3، Azo4، Azo6 و Azo7 را با تقریباً ۹٪ شباهت بود. براساس تجزیه و تحلیل داده های REP-PCR، جدایه های Azo4 و Azo6 با حدود ۵۰٪ شباهت در زیر گروه اول و جدایه های Azo2 و Azo3 با ۶۴٪ شباهت در زیرگروه دوم بیشترین شباهت را در بین جدایه ها داشتند. گروه دوم فقط جدایه Azo5 را شامل می شد (شکل ۶).

## بحث

باکتری آزو اسپریلوم به عنوان یکی از مهمترین باکتری های PGPR محسوب می شود (۱). گونه های این جنس گرم منفی، هوازی، میله ای شکل و متعلق به زیررده آلفا پروتئوباکتیریا می باشند. این باکتری بیشتر از خاک های ریزوسفری و ریشه های گیاهان مختلف جداسازی شده است (۲۶). در این تحقیق جدایه های باکتری آزو اسپریلوم از نمونه های ریزوسفری گیاهان گندم و ذرت جداسازی و خالص سازی شد. پس از استخراج DNA، آزمایش های مولکولی با استفاده از



(۳۲ و ۳۶).

داده شد و گروه بندی جدایه ها براساس خصوصیات ژنوتیپی تا حدودی مشابه با شناسایی توسط تجزیه و تحلیل توالی یابی ژن *16S rRNA* بود.

### نتیجه گیری

نتایج مطالعه نشان داد که حداقل سه گونه *A. brasiliense*، *A. lipoferum* و *A. zeae* از باکتری آزوسپیریلیوم در مزارع گندم و ذرت استان اصفهان وجود داشته و حضور *A. zeae* اولین گزارش در ایران می باشد. استفاده از rep-PCR نیز نشان داد که گونه های مختلف آزوسپیریلیوم جدا شده دارای تنوع ژنتیکی بالا بوده و این آزمون می تواند تا حدودی گونه های آزوسپیریلیوم را از یکدیگر تفکیک و جدایه های *A. brasiliense* را به راحتی از سلول های *A. lipoferum* و *A. zeae* تشخیص دهد.

### ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاران موسسه تحقیقات خاک و آب کشور به دلیل همکاری در انجام این پژوهش کمال امتنان و سپاس گزاری را دارند.

### تعارض در منافع

وجود ندارد.

rep-PCR یک روش مناسب، سریع، موثر و کم هزینه جهت متمایز نمودن سویه های باکتریایی است (۱۸)، و انجام آن به دانش فنی زیادی احتیاج ندارد (۳۷). در این مطالعه جدایه های آزوسپیریلیوم تنوع زیادی را در آزمون rep-PCR نشان داده و نقوش منحصر بفرد ژنتیکی تولید نمودند. الگوهای انگشت نگاری با استفاده از یک روش سلسله مراتبی (UPGMA، (Hierarchical Technique) و ضریب تشابه جاکارد مقایسه و گروه بندی شدند.

در این آزمون شباهت (ژنتیکی) پایین بین جدایه ها اشاره بر آن داشت که نمونه برداری خاک از مناطق و گیاهان مختلف انجام شده و جدایه ها می توانند به عنوان سویه های مختلف در نظر گرفته شوند. نتایج ما با نتایج مطالعات ایشی (Ishii) و همکاران (۳۸)، ماماریل و ترینیداد (Mamaril & Trinidad) (۳۰) و تِجرا (Tejera) و همکاران (۳۹) مطابقت داشته و نشان داد که rep-PCR الگوهای ژنومی یکسان برای هر جدایه آزوسپیریلیوم تولید می کند. تمایز بین جدایه های آزوسپیریلیوم در سطح سویه بود.

در این مطالعه الگوهای باندهای تکثیر شده توسط rep-PCR برای هر جدایه آزوسپیریلیوم منحصر به فرد بوده و می توانند به عنوان یک ابزار برای تشخیص و طبقه بندی جدایه های آزوسپیریلیوم در سطح سویه استفاده شوند. تجزیه و تحلیل الگوهای انگشت نگاری و گروه بندی (clustering) نشان داد که rep-PCR تا حدودی می تواند بین گونه های آزوسپیریلیوم تمایز ایجاد کند و جدایه های *A. brasiliense* به راحتی از گونه های *A. lipoferum* و *A. zeae* با استفاده از ERIC، BOX و REP PCR تشخیص

## References

1. Mahbouba B, Nadir B, Nadia Y, Abdelhamid D. Phenotypic and molecular characterization of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from the rhizosphere of wheat (*Triticum durum* Desf.) in Algeria. *Afr J Microbiol Res.* 2013; 7(23): 2893-2904.
2. Bashan Y, De-Bashan LE. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant

- growth—a critical assessment. In *Adv Agron*. 2010; 108: 77-136. Academic Press.
- Eleni V, Anastasia V, Maria D, Iordanis C, Anastasia T, Katinakis P. Phylogenetic analysis of *Azospirillum* species isolated from the rhizosphere of field-grown wheat based on genetic and phenotypic features. *Mol Microbial Ecol Rhizosphere*. 2013; 1: 203- 210.
  - Saikia SP, Bora D, Goswami A, Mudoj KD, Gogoi A. A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non leguminous crops. *Afr J Microbiol Res*. 2012; 6(6): 1085-1102.
  - Lin SY, Shen FT, Young CC. Rapid detection and identification of the free-living nitrogen fixing genus *Azospirillum* by *16S rRNA*-gene-targeted genus-specific primers. *Antonie Leeuwenhoek*. 2011; 99(4): 837-844.
  - Lin SY, Liu YC, Hameed A, Hsu YH, Lai WA, Shen FT, Young CC. *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013; 63(10): 3762-3768.
  - Zhou S, Han L, Wang Y, Yang G, Zhuang L, Hu P. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013; 63(7): 2618-2624.
  - Wisniewski-Dye F, Borziak K, Khalsa-Moyers G, Alexandre G, Sukharnikov LO, Wuichet K, Hurst GB, McDonald WH, Robertson JS, Barbe V, Calteau A. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. *PLoS Genet*. 2011; 7(12): e1002430.
  - Kaneko T, Minamisawa K, Isawa T, Nakatsukasa H, Mitsui H, Kawaharada Y, Nakamura Y, Watanabe A, Kawashima K, Ono A, Shimizu Y. Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. *DNA Res*. 2010; 17(1): 37-50.
  - Sant'Anna FH, Almeida LG, Cecagno R, Reolon LA, Siqueira FM, Machado MR, Vasconcelos AT, Schrank IS. Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. *BMC genomics*. 2011; 12(1): 409.
  - dos Anjos Borges LG, Dalla Vechia V, Corção G. Characterisation and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. *FEMS Microbiol Ecol*. 2003; 45(2): 173-180.
  - Najafi Pour G, Taghavi SM. Comparison of *P. syringae* pv. *syringae* from different hosts based on pathogenicity and BOX-PCR in Iran. *J Agr Ssi Tech-Iran*. 2011; 13(3): 431-442.
  - Vicente JG, Roberts SJ. Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR. *Eur J Plant Pathol*. 2007; 117(4): 383-392.
  - Adiguzel G, Atasever M. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Turkish dry fermented sausage. *Rom Biotechnol Lett*. 2009; 14(1): 4130-4138.
  - Versalovic J, Koeuth T, Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19(24): 6823-6831.
  - Rebecca LH, Zothansanga Singh BP, Gurusubramanian G, Senthil NK. DNA finger printing of

- Bacillus thuringiensis* based on repetitive DNA sequences using ERIC-PCR. *Sci Vis*. 2011; 11(3): 147-154.
17. Louws FJ, Rademaker JL, De Bruijn FJ. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Annu Rev Phytopathol*. 1999; 37(1): 81-125.
  18. Ishii S, Sadowsky MJ. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environ Microbiol*. 2009; 11(4): 733-740.
  19. Yadegar A, Alebouyeh M, Lawson AJ, Mirzaei T, Mojarad EN, Zali MR. Differentiation of non-pylori *Helicobacter* species based on PCR–restriction fragment length polymorphism of the 23S *rRNA* gene. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014; 30(6): 1909-1917.
  20. Patton TG, Katz S, Sobieski RJ, Crupper SS. Genotyping of clinical *Serratia marcescens* isolates: a comparison of PCR-based methods. *FEMS Microbiol Lett*. 2001; 194(1): 19-25.
  21. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, Van Dijl JM, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW, ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill*. 2013; 18(4): 20380.
  22. Kanimozhi K, Panneerselvam A. Studies on isolation and nitrogen fixation ability of *Azospirillum* spp. isolated from Thanjavur district. *Der Chemica Sinica*. 2010; 1(3): 138-145.
  23. Radif HM, Hassan SS. Detection of hydrolytic enzymes produced by *Azospirillum brasiliense* isolated from root soil. *World J Exp Biosci*. 2014; 2: 36-40.
  24. Garibyan L, Avashia N. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *J Invest Dermatol*. 2013; 133(3): e6.
  25. Mao DP, Zhou Q, Chen CY, Quan ZX. Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets. *BMC Microbiol*. 2012; 12(1): 66.
  26. Shime–Hattori A, Kobayashi S, Ikeda S, Asano R, Shime H, Shinano T. A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria. *J Appl Microbiol*. 2011; 111(4): 915-924.
  27. Senthilraj R, Prasad GS, Janakiraman K. Sequence-based identification of microbial contaminants in non-parenteral products. *Braz J Pharm Sci*. 2016; 52(2): 329-336.
  28. Mazinani Z, Asgharzadeh A. Genetic diversity of *Azotobacter* strains isolated from soils by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Cytol Genet*. 2014; 48(5): 293-301.
  29. Lu G, Moriyama EN. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief Bioinform*. 2004; 5(4): 378-388.
  30. Mamaril JC, Trinidad LC. Use of rep-PCR to fingerprint the genome of *Azospirillum* spp. In *Molecular Microbial Ecology of the Soil*. Springer, Dordrecht. 1998; pp. 155-160.
  31. Rohlf JF. NTSYSpc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1 (© 2002 by Applied Biostatistics, Inc). Exeter Software. New York: Setauket. 2000.

32. Ayyaz K, Zaheer A, Rasul G, Mirza MS. Isolation and identification by *16S rRNA* sequence analysis of plant growth-promoting azospirilla from the rhizosphere of wheat. *Braz J Microbiol.* 2016; 47(3): 542-550.
33. Bashan Y, Holguin G, De-Bashan LE. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol.* 2004; 50(8): 521-577.
34. Ilyas N, Bano A. *Azospirillum* strains isolated from roots and rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under different soil moisture conditions. *Biol Fertil Soils.* 2010; 46(4): 393-406.
35. Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J. A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can J Microbiol.* 1978; 24(8): 967-980.
36. Mehnaz S, Weselowski B, Lazarovits G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007; 57(12): 2805-2809.
37. Doleans-Jordheim A, Cournoyer B, Bergeron E, Croize J, Salord H, Andre J, Mazoyer MA, Renaud FN, Freney J. Reliability of *Pseudomonas aeruginosa* semi-automated rep-PCR genotyping in various epidemiological situations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009; 28(9): 1105-1111.
38. Ishii S, Ohno H, Tsuboi M, Otsuka S, Senoo K. Identification and isolation of active N<sub>2</sub>O reducers in rice paddy soil. *ISME J.* 2011; 5(12): 1936.
39. Tejera NL, Lluch C, Martinez-Toledo MV, Gonzalez-Lopez J. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant Soil.* 2005; 270(1): 223-232.



## Genomic fingerprinting of some isolated *Azospirillum* spp. of wheat and maize fields by using rep-PCR.

Mahmood Shahabi<sup>1</sup>, Naser Panjekeh<sup>2</sup>, Hadi Asadi Rahmani<sup>3</sup>, Mohammad Salari<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ph. D. Student, Department of Plant Protection, University of Zabol, Zabol, Iran. <sup>2</sup>Associate Professor, Department of Plant Protection, University of Zabol, Zabol, Iran. <sup>3</sup>Assistant professor, Soil and Water Research Institute of Iran, Karaj, Iran.

### Abstract

**Background & Objectives:** *Azospirillum* comprises rhizobacteria that live freely in the soil where they change gaseous nitrogen to nitrite and nitrate and as a result promote growth and yield of some economically important plants. This study aimed to isolate and identify different native species of *Azospirillum* and to investigate their genetic diversity as plant growth-promoting factors.

**Materials & Methods:** In this research, some soil and root samples from wheat and maize fields of Isfahan province were collected and cultured in the tubes containing nitrogen-free bromothymol blue (NFB) semisolid media. The *Azospirillum* isolates were chosen based on morphological properties on NFB and RC (Rojo Congo) media and then were purified. The detection and identification of *Azospirillum* isolates was done by molecular tests using PCR (Polymerase Chain Reaction), *16S rRNA* gene sequencing, and genomic fingerprinting with rep-PCR (repetitive extragenic palindromic elements-polymerase chain reaction).

**Results:** The replication of 646 and 263 bp fragments by specific primers, confirmed the presence of *Azospirillum* bacteria. *Azospirillum* species were also identified as *A. brasilense*, *A. lipoferum*, and *A. zea* using replication and sequencing of the *16S rRNA* gene. The genomic profiling of different *Azospirillum* isolates produced unique band patterns through application of repetitive element BOX (BOX-AIR), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), and REP and showed high genetic diversity between the isolates.

**Conclusion:** According to this study, the *Azospirillum* isolates of wheat and maize fields of Isfahan province have different species and genetic diversity and band patterns amplified using rep-PCR can be useful for diagnosis and classification of *Azospirillum* species.

**Keywords:** *Azospirillum*, Sequencing, Rep-PCR, Genetic diversity.

---

Correspondence to: Naser Panjekeh

Tel: +98 5431232125

E-mail: [naserpanjekeh@gmail.com](mailto:naserpanjekeh@gmail.com)

Journal of Microbial World 2020, 12(4): 364-376.



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.