مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات حمایت و حفاظت جنگلها و مراتع ایران
جلد ۱۹ شماره ۲، صفحه ۲۷۸-۲۶۶ (۱۴۰۰)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJFRPR.2021.354653.1486
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350859.1400.19.2.5.4

ترکیب جمعیتی باکتری‌های اندوفیت بقولات وحشی به‌عنوان عوامل بالقوه کنترل زیستی بیماری‌های بقولات زراعی (مطالعه موردی: جنگل زاگرس کرمانشاه)

شریعه رستمی[۱]، نادر حسن‌زاده[۲*]، سعیده رجائی[۳]، علیرضا گل‌نراقی[۴] و رضا عزیزی‌نژاد[۵]

۱- دانش‌آموخته مقطع دکتری، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست‌الکترونیک: hasanzadehr@yahoo.com

۳- استادیار، پژوهشکده زیست‌فناوری صنعت و محیط‌زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

۴- محقق گروه تنوع زیستی، مؤسسه بوم زیستا، ونکوور، کانادا

۵- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذیی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۰

چکیده

اکوسیستم‌های جنگلی مخازن اصلی تنوع زیستی جهانی هستند. نقش میکروارگانیسم‌ها در چرخه‌های بیوشیمیایی این اکوسیستم‌ها حائز اهمیت است. امروزه به کمک روش‌های نوین شناسایی، شناخت دقیق از عملکرد میکروارگانیسم‌های اندوفیت میسر شده است. در این پژوهش، از یک روش غیروابسته به کشت، برای بررسی جامعه باکتریایی اندوفیتی برخی بقولات وحشی استفاده شده است. بدین‌منظور، از جنگل‌های زاگرس کرمانشاه بازدید و از دو گیاه *Astragalus ovinus* و *Vicia lutea* نمونه‌برداری شد. پس از استخراج DNA تام ریشه و برگ‌های گیاهان یادشده و تکثیر بخشی از ژن 16S rDNA باکتری‌ها، توالی‌یابی به کمک نسل جدید (NGS) و با استفاده از پلتفرم Illumina MiSeq انجام شد. آنالیز توالی‌ها نشان داد، براساس میزان فراوانی نسبی، اندوفیت‌های جداسازی‌شده متعلق به هفت راسته Rhizobiales، Xanthomonadales، Sphingomonadales، Pseudomonadales، Chitinophagales، Enterobacteriales و Betaproteobacteriales بودند که در مورد اخیر، این راسته به سه رده Gammaproteobacteria، Alphaproteobacteria و Bacteroidia و دو شاخه Proteobacteria و Bacteroidetes تعلق داشت. نتایج به‌دست آمده نشان داد، باکتری‌های شاخه Proteobacteria، جزو اندوفیت‌های باکتریایی غالب هستند و بیش از ۹۹ درصد کل جمعیت باکتری‌های اندوفیت را در گونه *V. lutea* و ۶۸ درصد را در گونه *A. ovinus* به خود اختصاص دادند. باکتری‌های یادشده با بیشترین درصد واحدهای تاکسونومیکی (OTUs) دارای بیشترین قابلیت استفاده در کنترل بیولوژیک بیماری‌های بقولات زراعی هستند. این مطالعه برای اولین بار، تصویر روشنی از جمعیت، چیرگی و تنوع اندوفیت‌های باکتریایی گیاهان بقولات وحشی در جنگل های زاگرس را با استفاده از آنالیز متاژنومی ارائه می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: توالی‌یابی نسل دوم، جوامع میکروبی، اندوفیت‌های گیاهی، کنترل بیولوژیک.

مقدمه

در سال‌های اخیر، استفاده از کنترل بیولوژیکی با استفاده از عوامل میکروبی به‌عنوان گزینه سازگار با محیط‌زیست و کشاورزی پایدار برای کنترل بیماری‌های گیاهان با هدف کاهش چشمگیر مصرف مواد شیمیایی توسعه یافته است (Cassan *et al*., 2020; Grady *et al*., 2016; Alori *et al*., 2017). اندوفیت‌ها گروهی از میکروارگانیسم‌ها هستند که به‌طور طبیعی بافت‌های داخلی گیاهان را کلونیزه می‌کنند، بدون آن که علائم ظاهری از آثار منفی روی گیاه میزبان ایجاد کنند (Kobayashi & Palumbo, 2000). یکی از مهمترین میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌ها هستند که قادر به افزایش عملکرد گیاه میزبان از طریق تثبیت ازت (Moyes *et al*., 2016)، محلول کردن فسفات نامحلول (Walia *et al*., 2017)، تولید سیدروفور (Maheshwari *et al*., 2019)، تولید هورمون‌های رشد (Hamzah *et al*., 2017)، توانایی کنترل زیستی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای گیاهی (Vega, 2018; Firdous *et al*., 2017) و افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی (Xu *et al*., 2019) هستند. ضمن اینکه در دستیابی به کشاورزی پایدار و جلوگیری از انقراض گونه‌های نادر گیاهی از توانایی بالایی برخوردارند (Ludueña *et al*., 2019). این دسته از میکروارگانیسم‌ها (اندوفیت‌ها) به‌عنوان عوامل کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی یا افزاینده‌های رشد گیاه میزبان، در ایران نیز گزارش شده‌اند (Arshadi *et al*., 2019; Rostami *et al*., 2020).

ازآنجایی‌که اندوفیت‌ها، علائم آشکاری از خود بروز نمی‌دهند، تخمین دقیق جمعیت آنها دشوار است. تنوع باکتری‌های اندوفیت نه تنها در بین گیاهان مختلف، بلکه در میان تاکسون‌های باکتریایی قابل توجه است، به‌طوری‌که از جنس‌ها و گونه‌های مختلف، باکتری‌های متفاوتی به‌عنوان اندوفیت معرفی شده‌اند (Celador *et al*., 2018). برای جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های باکتریایی، به‌طور معمول از روش‌های سنتی وابسته به کشت (culture-dependent technique) به کمک انواع محیط‌های کشت افتراقی استفاده می‌شود که تفاوت واکنش میکروارگانیسم‌ها در محیط، منجر به شناسایی آنها می‌شود. این در حالی است که تعداد زیادی از جوامع میکروبی موجود در طبیعت، به‌دلیل ناتوانی کشت روی محیط‌های اختصاصی، ناشناخته باقی مانده‌اند (Ryan *et al*., 2008; Hirsch, 2010).

در مقابل، در تکنیک غیروابسته به کشت (culture-independent technique) که براساس تکثیر و تعیین توالی بخشی از ژن 16S rDNA است، باکتری‌های کلونیزه کننده، همچنین آن دسته از باکتری‌هایی که دارای غلظت بسیار کمی هستند یا در محیط کشت رشد نمی‌کنند، شناسایی می‌شوند (Jackson *et al*., 2013). به‌طوری‌که به‌کارگیری این روش، امکان بررسی تنوع زیستی و تشخیص و شناسایی میکروارگانیسم‌های موجود در محیط را با سرعت بسیار بالاتری فراهم می‌کند (Peredeltchouk *et al*., 2011).

بیش از ۳۰۰ هزار گونه گیاهی مختلف به‌عنوان میزبان احتمالی یک یا چند اندوفیت شناخته شده‌اند که تاکنون تعداد اندکی از آنها بررسی و مطالعه شده‌اند (Ryan *et al*., 2008). بقولات به‌عنوان مهمترین منابع گیاهی غنی مواد مغذی و پروتئینی، ازجمله گیاهان زراعی تثبیت‌کننده نیتروژن هستند که در تقویت و حاصلخیزی خاک نقش مؤثری دارند (Schulze, 2004). در این میان، بقولات وحشی، به‌عنوان یک میزبان میکروب‌های اندوفیت، از گیاهان مهم علوفه‌ای و مرتعی به‌شمار می‌روند که در روند اکولوژیکی و احیای محیط‌زیست نقش اساسی دارند (Dekak *et al*., 2020). از سایر گونه‌های گیاهی، یونجه (López *et al*., 2018)، شیرین‌بیان (Mohamad *et al*., 2018)، سویا، درخت وحشی بیابانی نیل (Khan *et al*., 2020) و نخود (Saini *et al*., 2015) در جهان باکتری‌های اندوفیت از گره ریشه آنها جداسازی شده‌اند که برای ارتقای رشد ریشه‌ای مؤثر بوده‌اند.

جنس‌های مختلف باکتری، ریزوبیوم هوازی هستند و

توانایی استفاده از منابع قندی میزبان، تبدیل آمونیوم و نیترات به نیتروژن و نیز قابلیت تشکیل گره را در میزبان دارند (Cao *et al*., 2017). جنس *Sphingomonas* با پراکنش در زیستگاه‌های متنوع می‌تواند در غلظت کم مواد مغذی ماندگار شده و طیف گسترده‌ای از منابع کربن را متابولیزه و حتی از آلاینده‌ها تغذیه کند، ازاین‌رو، قابلیت‌های بالای تجزیه‌کنندگی و بیوسنتزی دارد. از دیگر جنس‌های مهم شناخته‌شده در طبیعت، *Pseudomonas* و *Bacillus* با خاصیت مطلوب آنتاگونیستی ریزوسفری و فیلوسفری هستند که توان بالای رقابتی را نسبت به سایر میکروارگانیسم‌ها داشته و سبب افزایش بهبود صفات رشدی گیاه نیز می‌شوند (Liu *et al*., 2007; Vyas *et al*., 2009; Liu *et al*., 2020).

با وجود اهمیت جنگل‌های ایران از نظر حفاظت خاک، نفوذ آب، قدمت جنگل‌ها، تنوع گونه‌های فراوان و تأثیر بر پایداری ساختار اکوسیستم و اهمیت غنای زیستی جوامع میکروبی، گزارش‌های اندکی در مورد تنوع بالای میکروب‌های اندوفیت گیاهان وحشی در این جنگل‌ها، ازجمله جنگل‌های زاگرس وجود دارد (Rostami *et al*., 2020; Yazdani-Khameneh *et al*., 2019) و درباره جوامع باکتریایی اندوفیتی گیاهی این جنگل‌ها نیز مطالعات محدودی انجام شده است. بنابراین، بررسی و پژوهش در این زمینه از اهمیت بالایی برخوردار است. چنین پژوهش‌هایی می‌تواند درک ما را از ماهیت و نقش جوامع میکروبی اندوفیتی افزایش داده و منجر به شناسایی توانایی‌های کاربردی آنها در اکوسیستم‌های زراعی شود. نتایج پژوهش‌های اولیه روی اندوفیت‌های باکتریایی برخی بقولات وحشی در جنگل‌های زاگرس با استفاده از روش وابسته به کشت، حکایت از تنوع زیاد این اندوفیت‌ها از نظر مرفولوژیکی و بیوشیمیایی داشت. به‌علاوه، این پژوهش‌ها حکایت از قابلیت بالای برخی از آنها در بهبود رشد و حفاظت گیاهان در برابر عامل بیماری‌زا داشته است. نتایج به‌دست آمده در تحقیقات قبلی، نشان‌دهنده توانایی بالا و قابل مقایسه برخی از این باکتری‌ها با سموم شیمیایی در کنترل بیماری مهم باکتریایی بلایت معمولی لوبیاست (Rostami *et al*., 2020). با توجه به دلایل اشاره شده در این پژوهش، جوامع باکتریایی اندوفیتی مرتبط با ریشه برخی بقولات وحشی ازجمله دو گونه مورد مطالعه *Astragalus ovinus* و *Vicia lutea* در نقاطی از جنگل زاگرس واقع در استان کرمانشاه به روش غیروابسته به کشت و توالی‌یابی با بازدهی بالا (High-throughput sequencing) بررسی و تنوع و فراوانی نسبی آنها با هدف توصیف و تعیین ترکیب جوامع باکتریایی اندوفیتی و نیز شناسایی باکتری‌های دارای قابلیت کنترل زیستی یا بهبود رشد گیاه بررسی و تجزیه‌وتحلیل شد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه و نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۶، در جنگل زاگرس استان کرمانشاه در محدوده ۳۲ درجه و ۳۶ دقیقه تا ۳۵ درجه و ۱۵ دقیقه عرض شمالی و ۴۵ درجه و ۲۴ دقیقه تا ۴۸ درجه و ۳۰ دقیقه طول شرقی در فاصله بین شهرستان‌های پاوه- جوانرود در ارتفاع متوسط ۱۶۸۸ متر از سطح دریا با آب‌وهوای نیمه‌مرطوب با میانگین بارش ۵۵۰ میلی‌متر و متوسط دمای ۱۵ درجه سانتی گراد انجام شد. دو گونه گیاه کامل بقولات وحشی (بدون علائم آشکار بیماری) شامل *Astragalus ovinus* و *Vicia lutea* با سه تکرار به‌طور کاملاً تصادفی جمع‌آوری شدند. نمونه‌های گیاهی با درج مشخصات و به‌همراه خاک طبیعی میزبان در کیسه‌های تمیز و مجزا قرار گرفتند و برای انجام مراحل بعدی، به آزمایشگاه منتقل شدند. گیاهان در شرایط دمایی ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد با رطوبت تقریبی ۳۳ درصد در آزمایشگاه نگه‌داری شدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده، به قطعات کوچک‌تر تقسیم شده و بعد با آب‌مقطر استریل شسته شدند. نمونه‌ها ابتدا با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و اتانول ۷۵ درصد

ضدعفونی و در چند نوبت با آب‌مقطر استریل شسته شدند. اندام‌های مختلف گیاه (برگ و ریشه) در قطعات کوچک روی محیط نوترینت آگار (Nutrient agar) به‌صورت خطی کشت و به‌مدت دو هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگه‌داری گردیدند (Phetcharat & Duangpaeng, 2012). برای اطمینـــان از مؤثر بودن روش ضدعفونی استفاده شده، قطعات مورد نظر نمونه‌ها در پنج میلی‌لیتر آب‌مقطر استریل شست‌وشو داده شده و بعد از سه دقیقه، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آنها روی محیط نوترینت آگار کشت و بعد در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (Suryanto *et al*., 2016).

استخراج DNA تام

برای این منظور، DNA ریشه و برگ ۲۴ نمونه گیاه بدون علائم آشکار بیماری به‌صورت جداگانه استخراج شد (Rajaei *et al.*, 2017). به‌طور خلاصه، دو گرم بافت تازه از هر نمونه گیاهی در ازت مایع آسیاب شد. بافر استخراج شامل ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl (pH 8.5-9)، ۲۵ میلی‌مولار sodium EDTA (pH 8.5)، ۲ درصد SDS و ۵۰ میلی‌مولار $AlNH4(SO_4)2.12H_2O$ بود. تیمارها برای مدت دو ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در این حالت، نمونه‌ها هر ۱۵ دقیقه یکبار ورتکس شده و بعد در ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. دو میلی‌لیتر تری‌متیل‌آمونیوم برومید به قسمت رویی نمونه‌ها اضافه و پس از انکوبه شدن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، ورتکس گردیدند. برای حذف پروتئین‌های موجود در محلول، نمونه‌ها در دو مرحله با حجم برابر کلروفرم–ایزوآمیل مخلوط و با سرعت ۲۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز رویی برداشته شده و با ایزوپروپانول به حجم ۶/. میلی‌لیتر رسانده و بعد در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت انکوبه شد. در مرحله بعد، DNA محلول در سرعت ۲۶۰۰۰ rpm برای مدت ۱۵ دقیقه در چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و رسوب داده شد. رسوب (DNA) با محلول شست‌وشو حاوی یک میلی‌لیتر آمونیوم‌استات سه مولار، دو میلی‌لیتر آب‌مقطر دیونیزه شده و هفت میلی‌لیتر اتانول مطلق مخلوط و برای مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۶۰۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب DNA در آب‌مقطر دیونیزه استریل حل و بعد در ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شد. پس از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با GelRed، باندهای حاوی DNA با وزن مولکولی بیشتر جدا شده و به لوله استریل حاوی بافر حل‌کننده آگارز اضافه شد. آگارز ذوب‌شده با بافر مخلوط و شسته شد. پس از سانتریفوژ با دور ۱۶۰۰۰ به مدت ۳۰ ثانیه، DNA رسوب یافته در آب‌مقطر استریل حل شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به کمک دستگاه نانودراپ (Bio Rad) اندازه‌گیری گردید. همچنین، میزان خلوص DNA نیز به کمک همین وسیله، با به‌دست آوردن نسبت جذب نوری نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر و ۲۶۰/۲۳۰ اندازه‌گیری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

برای تکثیر قسمتی از ژن 16S rDNA باکتریایی، از جفت آغازگر OI1 (5’-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3’) و OI2c (5’-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3’) استفاده شد (Saberi *et al.*, 2017). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتری شامل آب‌مقطر (۱۸ میکرولیتر)، بافر PCR(10X) (۲/۵ میکرولیتر)، $MgCl_2$ (50 mM) (یک میکرولیتر)، dNTP (10 mM) (۰/۷ میکرولیتر)، هر یک از پرایمرها (10 µM) (۰/۷ میکرولیتر)، *Taq* DNA polymerase (5 u/µl) (۰/۴ میکرولیتر) و DNA الگو (یک میکرولیتر) انجام شد. شرایط دمایی شامل یک مرحله واسرشتی اولیه (Denaturation) به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد بود که با ۳۰ چرخه شامل ۴۵ ثانیه واسرشتی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه اتصال (Annealing) در ۵۶ درجه سانتی‌گراد و ۶۰ ثانیه طویل شدن (Extension)

در ۷۲ درجه سانتی‌گراد ادامه پیدا می‌کرد. واکنش PCR با یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه پایان یافت.

توالی‌یابی به کمک پلتفرم Illumina MiSeq

برای توالی‌یابی محصولات PCR، از آغازگرهای اختصاصی ناحیه V3 مربوط به ژن 16S rDNA باکتریایی شامل 515F (5’-GMGCCAGCMGCCGCGGMAA-3’) و 806R (5’-GGACTACHVGGGMWTCTAAT-3’) و پلتفرم Illumina MiSeq استفاده شد. محصولات PCR با استفاده از کیت SequalPrep Normalization (Life Technologies، Carlsbad، CA، USA) نرمالیزه و برای کاهش هزینه‌ها، نمونه‌های هر گونه گیاهی به‌طور مشابه و یکسان با هم مخلوط و با کدهای A/B/C/D/E/F/G/H نام‌گذاری شدند. توالی‌های مخلوط‌شده با مهره‌های AMPure XT (Beckman CoulterGenomics، Danvers، MA، USA) برای توالی‌یابی آماده شدند و اندازه و کمیت آنها به‌ترتیب با LabChip GX (Perkin Elmer، Waltham، MA، USA) و کیت کمیت کتابخانه Illumina (KapaBiosciences، Woburn، MA، USA) ارزیابی شد. محصول PCR با استفاده از آداپتورهای توالی‌یابی، برچسب گذاری و مولکول‌های DNA به قطعات با طول کمتر از ۸۰۰ جفت باز شکسته شدند. اتصال به آداپتورها، تولید خوشه با آغازگرهای اختصاصی، انجام تعیین توالی به کمک پلتفرم Illimina Miseq و حذف توالی‌های آداپتوری توسط کمپانی میکروسینس سوئیس انجام شد و درنهایت نمونه‌ها در مرحله بعد آنالیز شدند. تمامی نمونه‌های کد شده که با تکرار بیولوژیک با یکدیگر مخلوط شدند با کدهای A تا H (هشت نمونه مخلوط) مشخص شدند. پس از ارزیابی دوباره، سه نمونه ارسالی شامل A، E و G به‌دلیل عدم تأیید کیفیت و کمیت DNA استخراج شده توسط شرکت توالی‌یاب حذف شدند.

آنالیز توالی و تجزیه آماری

برای بررسی کیفیت توالی‌های به‌دست آمده مربوط به این نمونه‌ها، از نرم‌افزار FastQC (Babraham Bioinformatics، Cambridge، UK) استفاده شد. ابتدا توالی‌های آداپتوری حذف شده و پس از سرهم کردن توالی‌ها براساس خوانش‌های جفت‌شده همپوشان (overlapping paired reads؛ mismatch cost = 2، minimum score = 8، gap cost = 3، و maximum unaligned end mismatches = 0) دوباره کیفیت توالی‌ها بررسی شد. تعیین واحدهای تاکسونومی (OUT: Operational taxonomic unit) براساس تاکسونومی طبقه بندی شده در پایگاه داده Silva با ارزش اطمینان ۸۰ درصد توسط نرم‌افزار Seed2 (www.biomed.cas.cz) انجام شد. شاخص‌های متنوع مورد ارزیابی، شامل شاخص تنوع Shannon، Simpsons، همچنین تعداد OTUهای مشاهده شده، شاخص چیرگی و یکنواختی با نرم‌افزار seed2انجام شد. برای بررسی تفاوت فراوانی جنس‌های مختلف باکتریایی در دو نمونه گیاهی، تجزیه‌وتحلیل واریانس و اختلاف میانگین در سطح اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شد.

نتایج

کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Nano Drop تعیین شد و عملکرد DNA خالص استخراج‌شده با حذف ترکیبات پلی‌فنلی اشاره‌شده منجر به موفقیت استخراج DNA از نمونه‌ها و سبب ایجاد باندهای شارپ شد. عملکرد DNA خالص استخراج‌شده با استفاده از شیوه‌نامه مورد استفاده در جذب‌های نوری با نسبت ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ تأیید شد (جدول ۱). تعداد خوانش‌های مربوط به دو گیاه *V lutea*. و *A. ovinus* به‌ترتیب ۵۴ درصد و ۴۶ درصد بود.

جدول ۱- کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از ریشه و برگ گیاهان میزبان با استفاده از Nanodrop

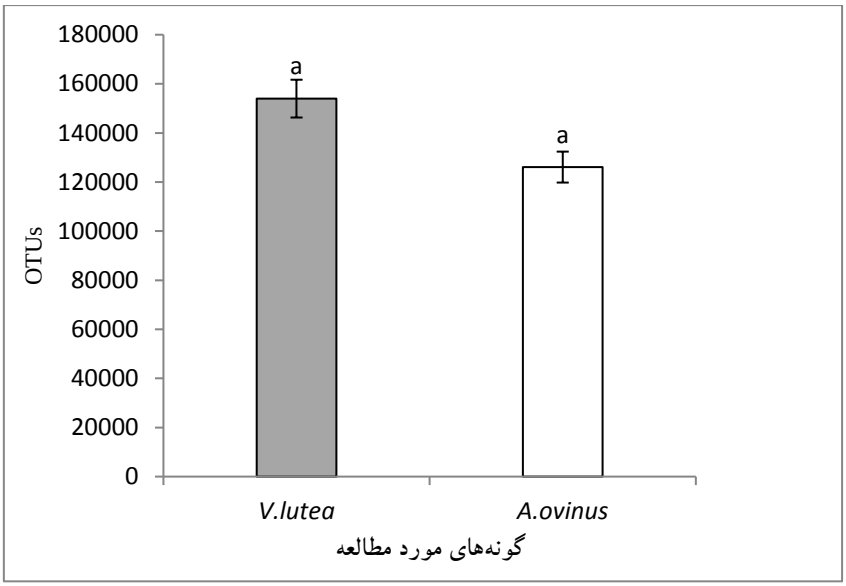
کد نمونه	غلظت(ng/µl)	۲۶۰/۲۸۰A	۲۳۰/۲۶۰A
B	۱۱۷۹	۲	۲/۱
	۲۵۸	۱/۸	۱/۲
	۴۶۲	۱/۹۵	۱/۶
C	۲۶۳	۱/۷۸	۱/۴
	۹۳۶/۲	۱/۸۲	۲/۱
	۱۰۲۴	۱/۸۷	۱/۹۵
D	۲۶۰	۱/۷۶	۱/۳
	۵۸۰	۱/۹۲	۱/۳
	۵۵۲	۱/۸۶	۱/۵
F	۲۰۰	۱/۸	۱/۵
	۱۷۲	۱/۸	۱/۳
	۶۷	۱/۷	۱/۳
H	۷۵	۱/۶۳	۱/۱
	۵۰	۱/۶	۱/۱
	۶۰	۱/۷	۱/۲

نتایج بررسی واریانس OTUs در منطقه مورد بررسی در دو گیاه مختلف در سطح احتمال خطای ۵ درصد معنی‌دار نبود (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر اختلاف نمونه‌برداری دو گونه گیاهی نشان داد، میزان OTU متعلق به *V. lutea* بیشتر از *A. ovinus* است اما این اختلاف معنی‌دار نبود (شکل ۱). خوشه‌بندی OTU با استفاده از روش NGS، ترکیب تاکسونومیکی فراوانی نسبی هفت راسته غالب Rhizobiales، Xanthomonadales، Sphingomonadales، Pseudomonadales، Chitinophagales، Enterobacteriales و Betaproteobacteriales نماینده سه رده غالب گرم منفی Gammaproteobacteria، Alphaproteobacteria و Bacteroidia از دو شاخه Proteobacteria و Bacteroidetes تعیین شد. درصد فراوانی نسبی مربوط به گروه‌های باکتریایی شناسایی‌شده در این پژوهش، در شکل ۲ نمایش داده می‌شود.

جدول ۲- بررسی واریانس داده‌های OTUs

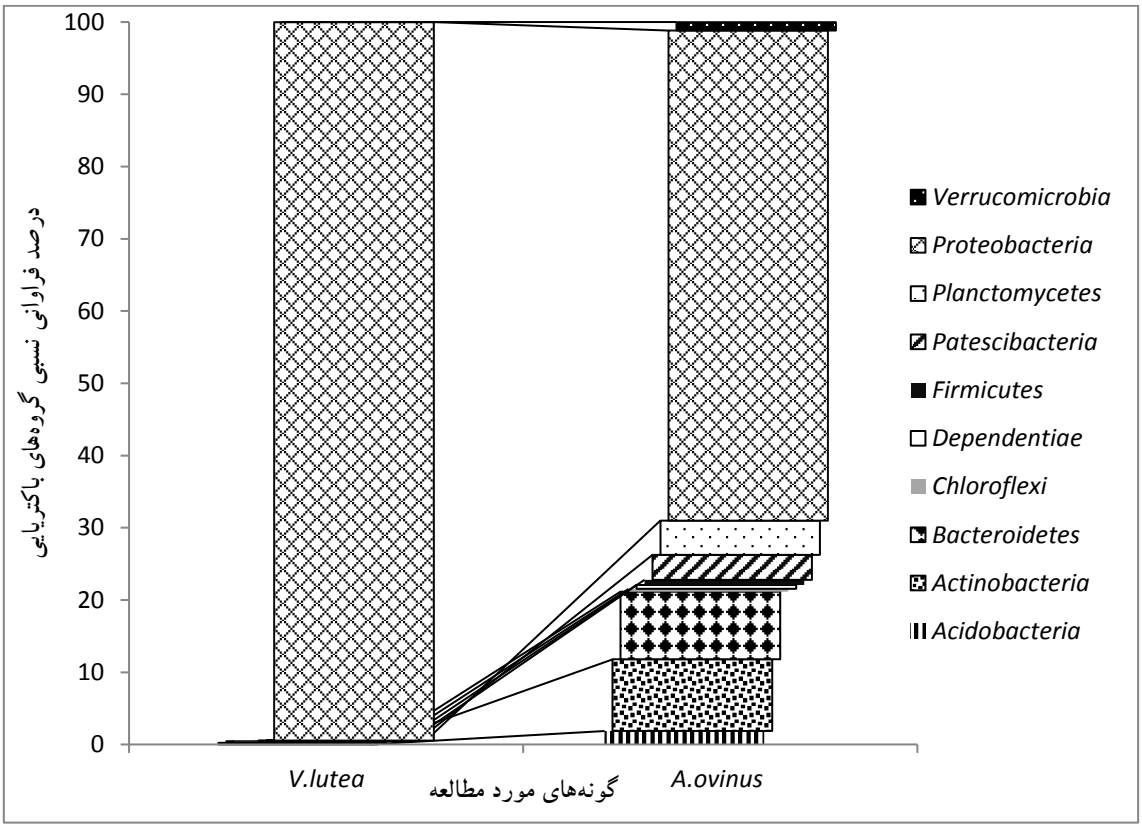
تیمار	درجه آزادی	مجموع مربعات	آمارهF	معنی‌داری
گونه گیاهی	۱	$۲/۷۸\times۱۰^{۱۱}$	۰/۴۸۵	۰/۸۲۷۴
کل	۲۶	$۱/۴۹\times۱۰^{۱۴}$		

معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد



شکل ۱- مقایسه میانگین OTUs در دو گونه مورد مطالعه *Astragalus ovinus* و *Vicia lutea*

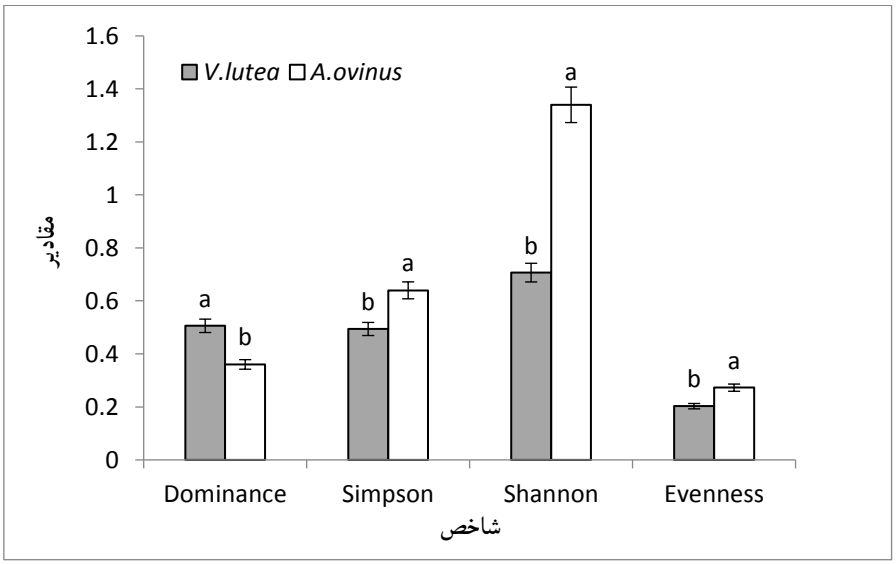
حروف انگلیسی متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۲- فراوانی نسبی گروه‌های باکتریایی اندوفیت به روش غیروابسته به کشت NGS با تعیین توالی ژن 16S rDNA در گیاهان میزبان *Vicia lutea* و *Astragalus ovinus*

نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده وقوع باکتری‌های متعددی از OTUsهای نادر بود و جوامع باکتریایی موجود در نمونه ها به‌طور گسترده در ده گروه تقسیم‌بندی شدند. در این دسته‌بندی، شاخه Proteobacteria شامل باکتری‌های گرم منفی با بیشترین درصد فراوانی، اندوفیت‌های باکتریایی غالب بوده و بیش از ۹۹ درصد کل جمعیت باکتری‌های اندوفیت در گونه *V.lutea* و ۶۸ درصد در *A.ovinus* را به خود اختصاص داده بود (شکل ۲). سپس شاخه Actinobacteria (باکتری‌های گرم مثبت) و شاخه Bacterioidetes شامل باکتری‌های بی‌هوازی اجباری گرم منفی و Planctomycete بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. شاخه‌های دیگر شامل Patescibacteria، Acidobacteria، Firmicutes و Dependentiae دارای توزیع یکسان بودند. طبقه دیگر، دو شاخه Chlamydiae و Verrucomicrobia دارای کمترین فراوانی بودند.

بررسی واریانس داده‌ها نشان داد که شاخص‌های چیرگی، یکنواختی و تنوع شانون و سیمپسون در میانگین‌های جمعیت‌های شناسایی‌شده باکتری‌ها در سطح خطای پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار است (شکل۳). گیاه *V. lutea* به‌طور معنی‌داری دارای تنوع و یکنواختی کمتر و چیرگی بیشتر جمعیت باکتریایی نسبت به *A. ovinus* بود (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه میانگین شاخص‌های تنوع، چیرگی و یکنواختی در دو گونه مورد مطالعه *Astragalus ovinus* و *Vicia lutea*

حروف انگلیسی متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

بحث

مطالعه ما برای اولین بار براساس آنالیز متاژنوم منجر به ارزیابی باکتری‌های اندوفیت موجود در میکروبیوم دو میزبان از خانواده بقولات وحشی جنگلی شد. آنالیز متاژنومی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی میکروبی در محیط‌های مختلف بوده است (Ryan *et al.*, 2008; Miché *et al.*, 2001). بررسی تنوع میکروبی موجود با تعیین توالی بخشی از ژن 16S rDNA در روش NGS نشان‌دهنده مؤثر بودن این روش برای مطالعه غنای کلی و تنوع جوامع میکروبی در بافت‌های گیاهان (شامل باکتری‌های اندوفیت قابل کشت و غیرقابل کشت در محیط‌های مصنوعی) بود. در این پژوهش، نتایج آنالیز متاژنومی نوع و توزیع فراوانی جوامع میکروبی باکتری‌های اندوفیت متعلق به شاخه‌های مختلف، ازجمله Proteobacteria را در بافت‌های ریشه و برگ گیاهان نشان

داد که مطابق با نتایج گزارش‌های پیشین است (Yu *et al*., 2015; Ryan *et al*., 2008; Akinsanya *et al*., 2015).

براساس ارزیابی الگوی کلونیزاسیون میکروبیومی و تنوع میکروبی، جنس مهم اندوفیتی *Rhizobium* از شاخه Proteobacteria معمول‌ترین جنس‌های باکتریایی شناسایی شده بود که در گزارش‌های پیشین نیز به این مطلب اشاره شده است (Jackson *et al*., 2013). طبق نتایج Balázs (۲۰۲۱)، گیاه آهوماش ظریف (*Lotus tenuis*) از خانواده بقولات، با دارا بودن باکتری‌های اندوفیت از جنس *Allorhizobium*، *Neorhizobium*، *Pararhizobium* و *Rhizobium* کارایی بالایی در تثبیت نیتروژن گیاه داشته و این باکتری‌ها سبب افزایش رشد گیاه به کمک راهکارهای زیست‌پالایی شده‌اند. در تحقیق مشابه دیگر، سه جنس غالب باکتری شامل زیرمجموعه *Firmicutes*، *Actinobacteria* و *Bacteriodetes* به روش نوین توالی‌یابی بخشی از ژن 16S rDNA در گیاه آلوئه‌ورا شناسایی شدند که با نتایج این پژوهش مشابه بوده و هم‌خوانی داشت (Akinsanya *et al*., 2015). همچنین در این زمینه مطالعات نشان داده که ساختار جامعه و قابلیت فیزیولوژیک باکتری‌های اندوفیت، مرتبط با گیاهان میزبانشان هستند و این جوامع میکروبی در افزایش رشد و عملکرد گیاه، مقابله با عوامل بیماری‌های گیاهی و تشکیل گره مؤثر بوده‌اند (Yang *et al*., 2017). گیاهان مورد بررسی در این پژوهش، از خانواده بقولات وحشی جنگلی هستند که ریشه آنها دارای گره بوده و این عامل در یک منطقه، دلیل بر وجود جنس ریزوبیوم مبتنی بر تثبیت نیتروژن است (Rat *et al*., 2021).

نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده قابلیت بسیار زیاد نمونه‌های گیاهی موجود در بیوم طبیعی جنگل بوده که از نظر انواع قابلیت‌ها و جنبه‌های زیست مولکولی و فرایندهای متابولیک باید بیشتر مورد توجه قرار بگیرند. استفاده از داده های مربوط به ژن 16S rDNA حاصل از فناوری ایلومینا، نشان‌دهنده تنوع و فراوانی باکتری‌های مختلف اندوفیت بود. ابتدا برای مشخص شدن روابط تاکسونومی باکتری‌ها از دنباله‌های موجود در هر OTU در پایگاه داده استفاده شد. باکتری‌های متعددی از OTUsهای نادر بودند و در این نمونه‌ها با وجود تنوع فراوان باکتری‌های مشاهده شده، همچنان برخی از باکتری‌ها ممکن است ناشناخته باقی بمانند. در نمونه‌های مورد آزمایش این پژوهش در دو گیاه بقولات وحشی جنگلی شامل *A. ovinus* و *V. Lutea* باکتری‌های متعلق به شاخه Gammaproteobacteria به عنوان جامعه باکتریایی اندوفیتی آنها شناسایی شد. در بررسی مشابه در منطقه بنگال غربی نیز بررسی تنوع باکتری های اندوفیت ریشه گیاه برنج با استفاده از پلتفرم ایلومینا نشان‌دهنده بیشترین فراوانی در شاخه Gammaproteobacteria و راسته‌های Pseudomonadales، Enterobacteriales و Xanthomonadales بود (Kunda *et al*., 2018). همچنین، در تعیین توالی16S rDNA در ۸۸ نمونه در میزبان‌های اسفناج و کاهو، وجود باکتری‌های اندوفیت متعلق به شاخه‌های Proteobacteria، Firmicutes، Bacteroidetes و Actinobacteria را تأیید کرد (Rastogi *et al*., 2012) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

شایان ذکر است در این پژوهش، برای نخستین بار از روش مدرن تعیین توالی نسل دوم برای جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت بقولات وحشی در جنگل زاگرس استفاده شد که استفاده از این روش می‌تواند در شناسایی و انتخاب اندوفیت‌های مؤثر در بیوم طبیعی جنگلی بسیار مؤثر باشد و برای بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعه جمعیت آنها برای مقابله با بیمارگرهای گیاهی، همچنین افزایش رشد گیاهان میزبان استفاده شود. همچنین مطابق با نوع ترکیب جمعیتی باکتری‌های اندوفیت این بررسی، فراوانی اندوفیت‌های *Mesorhizobium* و *Rhizobium* شناسایی شده در تحقیق‌های پیشین که حکایت از توان بیوکنترلی افزایش رشد گیاه و تثبیت نیتروژن در میزبان‌های بقولات زراعی نخود، سویا، یونجه و نخود فرنگی و لوبیا بوده نیز گزارش شده است (Ghorbani & Harighi, 2018; Willems, 2006; Saini *et al*., 2015).

جداسازی و شناسایی در مقیاس بزرگ‌تر در این بررسی که شامل باکتری‌های غیرقابل کشت نیز می‌شود، علاوه‌بر مطابقت با سایر گزارش‌ها، این موضوع را به اثبات می‌رساند که روش‌های معمول وابسته به کشت نمی‌توانند تمام ظرفیت میکروارگانیسم‌ها را فعال کنند، ازاین‌رو تعداد قابل‌توجهی از میکروب‌های جوامع میکروبی ناشناخته خواهند ماند. بدین‌منظور تغییر راهکارهای محدودکننده و استفاده از روش‌های نوین توالی‌یابی سبب شناسایی تنوع گسترده‌تر میکروارگانیسم‌ها خواهد شد. حتی به‌طور امیدوارنه می‌توان گفت با بررسی‌های بیشتر، کشت جوامع میکروبی تاکنون شناسایی نشده روی محیط‌های کشت مصنوعی امکان‌پذیر خواهد شد (Acuña *et al.*, 2020)، ازاین‌رو می‌توان از آنها در آینده نزدیک، به‌طور مؤثری بهره جست. نتایج این پژوهش تا حدودی نشان‌دهنده آن است که جامعه باکتریایی اندوفیت قابل کشت در بقولات وحشی جنگل زاگرس (Rostami *et al.*, 2020) به‌عنوان زیرمجموعه‌ای از تنوع زیستی کل اندوفیتی آنها است که مطابق گزارش‌های قبلی است (Ryan *et al*., 2008).

این پژوهش، اولین قدم در رسیدن به اطلاعات جوامع میکروبی مهم گیاهان جنگل‌های زاگرس است و گام‌های زیادی برای شناسایی کامل و نیز درک نقش احتمالی آنها در تکامل گیاهان جنگلی باقی مانده است. پاندمی کووید-۱۹ و دوره کروناسه (Coronaceous Period) توجه انسان را بیش‌ازپیش به اهمیت جنگل و تنوع زیستی و حفظ آنها جلب کرده است (Tollefson, 2020; Nazari *et al.*, 2021). تنوع میکروبی ازجمله مهمترین ارکان حفظ تعادل در اکوسیستم جنگل محسوب می‌شود. بااین‌حال، جوامع میکروبی جنگلی، محیط‌های کمتر شناخته‌شده‌ای هستند که نیازمند مطالعات بیشتر هستند و جداسازی و شناسایی برخی از باکتری‌های اندوفیت به روش مدرن دریچه‌ای جدید در توسعه، کشف و استفاده بهینه از این میکروارگانیسم‌ها در مقیاس بزرگ‌تر را فراهم می‌آورد و از این گنجینه‌های بسیار ریز و نامرئی جنگل‌ها می‌توان برای بهبود جنبه‌های مختلف زندگی انسان، ازجمله کشاورزی پایدار و به‌کارگیری آنها به‌عنوان عوامل بهبوددهنده رشد گیاهان در برابر عوامل زنده و غیرزنده و نیز با چشم‌اندازی وسیع در سطح تجاری بهره برد.

منابع مورد استفاده

-Acuña, J.J., Marileo, L.G., Araya, M.A., Rilling, J.I., Larama, G.A., Mora, M.L., Epstein, S. and Jorquera, M.A., 2020. In situ cultivation approach to increase the culturable bacterial diversity in the rhizobiome of plants. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 24: 1-6.

-Akinsanya, M., Goh, A., Lim, J.K. and Ting, A.S., 2015. Metagenomics study of endophytic bacteria in *Aloe vera* using next-generation technology. Genomics data, 6: 159-163.

-Alori, E.T., Dare, M.O. and Babalola, O.O., 2017. Microbial inoculants for soil quality and plant health. In Sustainable Agriculture Reviews, Springer Cham, pp. 281-307.

-Arshadi, N., Sedaghatfar, E., Golnaraghi, A. and Glare, T., 2019. Endophytic characteristic of entomopathogenic fungi *Beauveria* on bean plant. Bioagrica, 1: 1-9.

-Balázs, H.E., Schmid, C.A., Cruzeiro, C., Podar, D., Szatmari, P.M., Buegger, F., Hufnagel, G., Radl, V. and Schröder, P., 2021. Post-reclamation microbial diversity and functions in hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soil in relation to spontaneous HCH tolerant vegetation. Science of the Total Environment, 1(767): 144653.

-Cao, Y. Halane, M.K., Gassmann, W. and Stacey, G., 2017. The role of plant innate immunity in the legume–rhizobium symbiosis. Annual Review of Plant Biology, 68: 535-561.

-Cassan, F., Coniglio, A., López, G., Molina, R., Nievas, S., de Carlan, C.L., Donadio, F., Torres, D., Rosas, S., Pedrosa, F.O. and de Souza, E., 2020. Everything you must know about Azospirillum and its impact on agriculture and beyond. Biology and Fertility of Soils, 56: 461-79.

-Celador-Lera, L., Jiménez-Gómez, A., Menéndez, E. and Rivas, R., 2018. Biofertilizers based on bacterial endophytes isolated from cereals: potential solution to enhance these crops. In Role of Rhizospheric Microbes in Soil, pp. 175-203.

-Dekak, A., Menasria, T., Benhizia, Y. and Chenchouni, H., 2020. Endophytic passenger bacteria associated with Genista cinerea nodules growing in North African drylands. Rhizosphere, 1(14): 100205.

-Firdous, J. and Bhore Subhash, J., 2017. Screening of cultivable endophytic bacterial isolates for their

peanut and maize. Genomics, 111(4): 913-920.
-Maheshwari, R., Bhutani, N. and Suneja, P., 2019. Screening and characterization of siderophore producing endophytic bacteria from *Cicer arietinum* and *Pisum sativum* plants. Journal of Applied Biology and Biotechnology, 7: 7-14.
-Miché, L. and Balandreau, J., 2001. Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. Applied and Environmental Microbiology, 67(7): 3046-52.
-Mohamad, O.A., Li, L., Ma, J.B., Hatab, S., Xu, L., Guo, J.W., Rasulov, B.A., Liu, Y.H., Hedlund, B.P. and Li, W.J., 2018. Evaluation of the antimicrobial activity of endophytic bacterial populations from Chinese traditional medicinal plant licorice and characterization of the bioactive secondary metabolites produced by *Bacillus atrophaeus* against *Verticillium dahliae*. Frontiers in Microbiology, 9(9): 924.
-Moyes, A.B., Kueppers, L.M., Pett-Ridge, J., Carper, D.L., Vandehey, N., O'Neil, J. and Frank, A.C., 2016. Evidence for foliar endophytic nitrogen fixation in a widely distributed subalpine conifer. New Phytologist, 210(2): 657-668.
-Nazari, K., Sheykhrezaee, Z. and Golnaraghi, A., 2021. Man in the Coronaceous period (1): how long will Corona vaccination last in the world?. Iranian Students's News Agency, Report No. 1400020503193.
-Peredeltchouk, M., Wilson David, S.A., Bhattacharya, B., Volokhov, D.V. and Chizhikov, V., 2011. Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription-PCR assays. Journal of Applied Microbiology, 110(1): 54-60.
-Phetcharat, P. and Duangpaeng, A., 2012. Screening of endophytic bacteria from organic rice tissue for indole acetic acid production. Procedia Engineering, 32: 177-183.
-Rajaei, S., Farshi, R.S., Jazi, M.M., and Seyedi, S.M., 2017. Efficient strategies for elimination of phenolic compounds during DNA extraction from roots of *Pistacia vera* L. AGRIVITA. Journal of Agricultural Science, 39(3): 279-287.
-Rat, A., Naranjo, H.D., Krigas, N., Grigoriadou, K., Maloupa, E., Alonso, A.V., Schneider, C., Papageorgiou, V.P., Assimopoulou, A.N., Tsafantakis, N. and Fokialakis, N., 2021. Endophytic bacteria from the roots of the medicinal plant *Alkanna tinctoria* Tausch (Boraginaceae): Exploration of plant growth promoting properties and potential role in the production of plant secondary metabolites. Frontiers in Microbiology, 3(12): 113.
-Rastogi, G., Sbodio, A., Tech, J.J., Suslow, T.V., Coaker, G.L. and Leveau, J.H.J., 2012. Leaf microbiota in an agroecosystem: Spatiotemporal plant growth promoting activity in rice. Indian Agricultural Research, 51(5): 413-418.
-Ghorbani, S. and Harighi, B., 2018. Characterization of endophytic bacteria with plant growth promotion and biological control potential isolated from walnut trees. Forest Pathology, 48(2): e12403.
-Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A. and Yuan, Z.C., 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. Microbial Cell Factories, 15(1): 1-8.
-Hamzah, A., Zubir, I., Ross, E.E.R. and Aqma, W.S., 2017. Antagonistic effect and plant growth hormone produced by endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* LKM-UL isolated from cocoa plant. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 7: 169-176.
-Hirsch, A.M., 2010. How rhizobia survive in the absence of a legume host, a stressful world indeed. In Symbioses and Stress Springer, pp. 375-391.
-Jackson, C.R., Randolph, K.C., Osborn, S.L. and Tyler, H.L., 2013. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. BMC Microbiology, 13(1): 1-2.
-Khan, S.S., Verma, V. and Rasool, S., 2020. Diversity and the role of endophytic bacteria: a review. Botanica Serbica, 44(2): 103-20.
-Kobayashi, D.Y. and Palumbo, J.D., 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. Microbial Endophytes, 19: 199-233.
-Kunda, P., Dha, P.K. and Mukherjee, A., 2018. Endophytic bacterial community of rice (*Oryza sativa* L.) from coastal saline zone of West Bengal: 16S rRNA gene based metagenomics approach. Meta Gene, 18: 79-86.
-Liu, C.H., Chen, X., Liu, T.T., Lian, B., Gu, Y., Caer, V., Xue, Y.R. and Wang, B.T., 2007. Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* LCH001 in vitro and identification of its antifungal components. Applied Microbiology and Biotechnology, 76(2): 459-66.
-Liu, Y., Teng, K., Wang, T., Dong, E., Zhang, M., Tao, Y. and Zhong, J., 2020. Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. Journal of Applied Microbiology, 128(1): 242-254.
-López, J.L., Alvarez, F., Príncipe, A., Salas, M.E., Lozano, M.J., Draghi, W.O., Jofré, E. and Lagares, A., 2018. Isolation, taxonomic analysis, and phenotypic characterization of bacterial endophytes present in alfalfa (*Medicago sativa*) seeds. Journal of Biotechnology, 10(267): 55-62.
-Ludueña, L.M., Anzuay, M.S., Angelini, J.G., McIntosh, M., Becker, A., Rupp, O. and Taurian, T., 2019. Genome sequence of the endophytic strain *Enterobacter* sp. J49, a potential biofertilizer for

as endophytes in biological control: a review. Mycologia, 110(1): 4-30.
-Vyas, P., Rahi, P. and Gulati, A., 2009. Stress tolerance and genetic variability of phosphate-solubilizing *Fuorescent Pseudomonas* from the cold deserts of the trans-Himalayas. Microbial ecology, 58(2): 425-434.
-Walia, A., Guleria, S., Chauhan, A. and Mehta, P., 2017. Endophytic bacteria: role in phosphate solubilization. Endophytes: Crop Productivity and Protection, pp. 61-93.
-Willems, A., 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. Plant and Soil, 287(1): 3-14.
-Xu, W., Wang, F., Zhang, M., Ou, T., Wang, R., Strobel, G. and Xie, J., 2019. Diversity of cultivable endophytic bacteria in mulberry and their potential for antimicrobial and plant growth-promoting activities. Microbiological research, 1(229): 126328.
-Yang, R., Liu, P. and Ye, W., 2017. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity of tree peony (*Paeonia* Sect. Moutan) roots and leaves. Brazilian Journal of Microbiology, 48(4): 695-705.
-Yazdani-Khameneh, S., Golnaraghi, A. and Wylie, S.J., 2019. Diverse endophytic fungi colonize indigenous grasses in the Hyrcanian forest of Iran. The 18th Congress of European Mycologists, September 2019, pp. 16-21.
-Yu, X., Yang, J., Wang, E., Li, B. and Yuan, H., 2015. Effects of growth stage and fulvic acid on the diversity and dynamics of endophytic bacterial community in *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. Frontiers in microbiology, 25(6): 867.
variation in bacterialcommunity composition on field-grown lettuce. The ISME Journal, 6(10): 1812-1822.
-Rostami, S.H., Hasanzadeh, N., Rajaei, S., Golnaraghi, A. and Azizinezhad, R., 2021. A study on endophytic bacteria isolated from wild legumes against *Xanthomonas phaseoli*. Applied Entomology and Phytopathology. 89(1): 1-16.
-Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J. and Dowling, D.N., 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiology Letters, 278(1): 1-9.
-Saberi, E., Alavi, S.M., Safaie, N., Moslemkhany, C. and Azadvar, M., 2017. Bacterial pathogens associated with citrus huanglongbing-like symptoms in southern Iran. Journal of Crop Protection, 6(1): 99-113.
-Saini, R., Kumar, V., Dudeja, S.S. and Pathak, D.V., 2015. Beneficial effects of inoculation of endophytic bacterial isolates from roots and nodules in chickpea. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4(10): 207-221.
-Schulze, J., 2004. How are nitrogen fixation rates regulated in legumes?. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 167(2): 125-137.
-Suryanto, D., Yeldi, N. and Munir, E., 2016. Antifungal activity of endophyte bacterial isolates from torch ginger (*Etlingera elicitor* (Jack.) RM Smith)) root to some pathogenic fungal isolates. International Journal of PharmTech Research, 9: 340-7.
-Tollefson, J., 2020. Why deforestation and extinctions make pandemics more likely. Nature, 584: 175-176.
-Vega, F.E., 2018. The use of fungal entomopathogens

Composition of endophytic bacterial communities of wild legumes as potential biological control agents of crop legumes diseases (Case study: Kermanshah Zagros forest)

Sh. Rostami[1], N. Hasanzadeh[2*], S. Rajaei[3], A. Golnaraghi[4] and R. Azizinezhad[5]

1- Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, E-mail: hasanzadehr@yahoo.com
3- Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
4- Department of Biodiversity, BoomZista Institute, Vancouver, British Columbia, Canada
5- Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 20.05.2021 Accepted: 11.07.2021

Abstract

Forest ecosystems are the main reservoirs of global biodiversity. Microorganisms play a key role in the biochemical cycles of these ecosystems and are used to protect plants and stimulate their growth. Due to the limitations in the application of classic methods to isolate and identify the endophytic microorganisms, their potentials and functions have yet to be properly understood. In this study, a culture-independent method was used to study the endophytic bacterial communities of some wild legumes. To this end, Zagros forests of Kermanshah were surveyed and two varieties of *Astragalus ovinus* and *Vicia lutea* were sampled. Total DNAs from different parts of the sampled plants were extracted and the bacterial 16S rDNA genes were subsequently amplified. Sequencing analysis using the Illumina MiSeq platform showed the most abundant endophytic bacteria belonged to seven orders of Rhizobiales, Xanthomonadales, Sphingomonadales, Pseudomonadales, Chitinophagales, Enterobacteriales and Betaproteobacteriales. The latter were comprised to three classes of Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Bacteroidia, and two phyla of Proteobacteri and Bacteroidetes. Our findings showed that members of Proteobacteria were the dominant bacterial endophytes and accounted for more than 99% and 68% of the total population of endophytic bacteria in *V. lutea* and *A. ovinus*, respectively. These bacteria, with the highest percentage of taxonomic units (OTUs), have the highest potential to use as biological control agents of crop legumes diseases. This study provides a clear picture of the population, dominance and diversity of bacterial endophytes of wild legumes in the Zagros forests using metagenomic analysis.

Key words: Second generation sequencing, microbial communities, plant endophytes, biological control.