مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ٦، شماره ٢، پاییز و زمستان ٩٦
صفحه ٢١٢-٢٠٥

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 6, Number 2

بررسی توان تثبیت نیتروژن در اندوفیت‌های باکتریایی و قارچی جدا شده از گرهک‌های ریشه درختان توسکا و سنجد

A survey of nitrogen fixation on bacterial and fungal endophytes isolated from root nodules of alder (*Alnus subcordata*) and Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*)

محمد اسماعیل تجری[١]، حانیه اسعدی[٢]، حمید رضا پردلی[٣]، رضا نجف‌پور[٤]، سجاد یزدان ستاد*[٥]

Mohammad Esmaeil Tajari[1], Hanieh Asaadi[2], Hamidreza Pordeli[3], Reza Najafpour[4], Sajjad Yazdansetad*[5]

١- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، ایران. ٢- کارشناس ارشد میکروب شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی و انگل شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، ایران. ٣- استادیار قارچ شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، ایران. ٤- دانشجوی دکترای تخصصی میکروبیولوژی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، ایران. ٥- دکترای تخصصی میکروبیولوژی، گروه میکروب-شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

1- M.Sc. Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Iran.
2- M.Sc. Medical Microbiology, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Iran.
3- Assistant Professor of Mycology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.
4- Ph.D. student in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Iran.
5- Ph.D. Microbiology, Department of Microbiology, School of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sajjad.yazdansetad@gmail.com

(تاریخ دریافت: ٩٦/٦/٢٢ - تاریخ پذیرش: ٩٦/١١/٢٤)

چکیده

نیتروژن یکی از مهمترین عناصر مورد نیاز گیاهان می‌باشد، اما گیاهان قادر به احیای نیتروژن اتمسفر به آمونیاک و استفاده از آن به طور مستقیم برای رشد نیستند. میکروارگانیسم‌های تثبیت کننده نیتروژن با فرآیند تثبیت نیتروژن، نیتروژن مورد نیاز را به صورت قابل مصرف در اختیار گیاه قرار می‌دهند و نقش مهمی در حاصلخیزی خاک دارند. هدف از این مطالعه بررسی تثبیت نیتروژن در میکروارگانیسم‌های اندوفیت جدا شده از گرهک‌های ریشه درختان توسکا (*Alnus subcordata*) و سنجد (*Elaeagnus angustifolia*) در استان گلستان بود. تعداد ٥٠ نمونه گرهک جمع‌آوری و پس از شستشو در محیط کشت فاقد نیتروژن کشت داده شد. شناسایی میکروارگانیسم‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمایی و مولکولی انجام گرفت. همچنین تثبیت نیتروژن جدایه‌ها با استفاده از روش احیای استیلن با کروماتوگرافی گازی (GC) ارزیابی شد. اندوفیت‌های *Streptomyces badius* strain BL225، *Cladosporium cladosporioides* strain F1، *Actinomadura citrae* strain DSM 43461 و *Cryptococcus victoriae* strain p41A001 شناسایی شدند که از این بین *Cladosporium cladosporioides* strain F1 و *Cryptococcus victoria* strain p41A001 قابلیت تثبیت نیتروژن را داشتند. گرهک‌های ریشه درختان توسکا و سنجد دارای اندوفیت‌هایی هستند که نیتروژن را تثبیت می‌کنند؛ این میکروارگانیسم‌ها کاندیدهای مناسبی به عنوان عوامل بیوکنترل در کشاورزی هستند.

واژه‌های کلیدی

اندوفیت،
تثبیت نیتروژن،
کروماتوگرافی گازی،
توسکا،
سنجد،

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.9.3]

مقدمه

نیتروژن یک عنصر ضروری در طبیعت برای سنتز پروتئین، اسیدنوکلئیک و سایر ترکیبات نیتروژنی است. گیاهان قادر به احیای نیتروژن اتمسفر به آمونیاک و استفاده از آن به‌طور مستقیم برای رشد نمی‌باشد (Eleiwa *et al*. 2012; Shridhar, 2012). تثبیت نیتروژن فرآیندی کلیدی در احیای نیتروژن مولکولی به شکل آمونیاک است که شکل قابل استفاده نیتروژن برای سنتز بسیاری از ترکیبات زیستی توسط موجودات زنده می‌باشد (Cheng, 2008). گیاهان نیتروژن مورد نیاز خود را از تجزیه مواد آلی، کودهای شیمیایی و یا کودهای بیولوژیکی به‌واسطهٔ میکروارگانیسم‌های تثبیت‌کنندهٔ ازت به‌دست می‌آورند (Santi *et al*. 2013). استفاده بیش از حد و مداوم از کودهای شیمیایی برای بهبود عملکرد محصولات زراعتی، تاثیر منفی بر باروری خاک داشته و باعث خسارات جبران‌ناپذیر زیست محیطی، بهداشتی و اقتصادی می‌گردد. کودهای شیمیایی ازت‌دار به‌واسطه برجای ماندن آن‌ها در طبیعت باعث آلودگی آب و خاک شده و از این طریق باعث بیماری در انسان می‌شود. بنابراین، یافتن راه حل مناسب و جایگزین جهت ارائهٔ مطلوب و پایدار نیتروژن به گیاهان، ضروری به نظر می‌رسد. تثبیت بیولوژیکی نیتروژن پتانسیل بسیار بالایی دارد و می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای کود شیمیایی استفاده شود (Gupta, 2012). گزارش‌هایی از تثبیت نیتروژن بیولوژیکی توسط میکروارگانیسم‌ها از جمله گونه‌های *Arthrobacter, Azoarcus, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Burkholderia, Enterobacter, Klebsiella, Pseudomonas, Serratia* و *rhizobia* وجود دارد (Cocking, 2003; Mus *et al*. 2016). با توجه به سازگاری میکروارگانیسم‌ها با شرایط مختلف محیطی و اقلیمی، استفاده از آن‌ها جهت تولید کودهای بیولوژیک از ارزش خاصی برخوردار است. کودهای بیولوژیک علاوه بر صرفه اقتصادی باعث پایداری منابع خاک، حفظ توان تولید در دراز مدت، جلوگیری از آلودگی زیست‌محیطی و تولید محصولات غذایی با کیفیت می‌گردند (Shridhar, 2012). گونه‌های توسکای قشلاقی و سنجد، از گونه‌های گیاهی تثبیت کننده ازت با رشد سریع هستند. ریشه این درختان حاوی برجستگی‌های صورتی تا قرمز رنگی است که محل اجتماع و اتصال اندوفیت‌ها است که با تولید غده‌های ریشه-ای و تثبیت نیتروژن اتمسفری رابطهٔ همزیستی با این گیاهان برقرار می‌کنند. این نوع همزیستی باعث بهبود و افزایش ذخیره مواد غذایی در خاک می‌گردد. بر این اساس، جداسازی و مطالعهٔ میکروارگانیسم‌هایی با توانایی تثبیت ازت و سایر قابلیت‌های بیولوژیک به‌منظور استفاده در کودهای بیولوژیک حائز اهمیت است. مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی تثبیت نیتروژن در اندوفیت‌های باکتریایی و قارچی جدا شده از گرهک‌های ریشه درختان توسکا و سنجد در استان گلستان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری به‌مدت ٦ ماه در دو فصل بهار و تابستان از گرهک‌های ریشه‌ای درخت توسکا در دو منطقهٔ جنگلی استان گلستان (روستای توسکستان و قرق) با بیشترین اجتماع درختان توسکا انجام گرفت. روستای توسکستان از توابع بخش مرکزی شهرستان گرگان با مختصات جغرافیایی مشروح در سیستم DMS (36° 46′ 52″ N, 54° 35′ 1″ E) و روستای قرق از توابع بخش بهاران دهستان قرق شهرستان گرگان با مختصات جغرافیایی مشروح در سیستم DMS (36° 50′ 25″ N, 54° 41′ 16″ E) است. نمونه‌برداری از گرهک‌های ریشه‌ای درختان سنجد نیز از شهرستان بسطام

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.9.3]

شکل ۱- سمت راست: گرهک ریشه‌ای درخت سنجد، سمت چپ: گرهک ریشه‌ای درخت توسکا
Figure 1. Right: Root nodules of Russian olive, Left: Root nodules of alder

استان سمنان با مختصات جغرافیایی مشروح در سیستم DMS (36° 29′ 07″ N 54° 59′ 59″ E) انجام گرفت. تعداد ۵۰ نمونهٔ جمع‌آوری شده گرهک در ظرف سترون به آزمایشگاه منتقل شد. تصویر گرهک جدا شده از ریشه درختان توسکا و سنجد در شکل ۱ نشان داده شده است. نمونه‌های گرهک پس از جمع آوری به منظور زدوده شدن خاک متصل به آن، چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد. لوب‌های گرهک با تیغ جراحی استریل جدا شد و تعداد ۱۰ لوب گرهک به‌مدت ۵ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد در داخل میکروتیوب ضدعفونی و سپس با آب مقطر استریل شستشو داده شد. گرهک‌ها به داخل هاون چینی استریل حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل انتقال یافت و با کمک دسته هاون استریل کنار شعله جهت حصول محلول یکنواخت بخوبی له شد. محلول حاصل در ۲۸۰۰ g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت حاصل در محیط کشت مانیتول آگار فاقد منبع ازت با روش کشت آمیخته (Pour Plate) کشت داده شد. پلیت‌ها در ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد.

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی اندوفیت‌ها

جدایه‌های اندوفیتی باکتری از نظر مورفولوژیکی و واکنش گرم بررسی و با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی اکسیداز، کاتالاز، تولید H_2S، بررسی حرکت، تولید اندول از تریپتوفان، MR-VP، مصرف سیترات، تجزیه نشاسته، تجزیه ژلاتین، تجزیه کازیین، اکسیداسیون یا تخمیر قندها (OF)، مصرف اوره و احیای نیترات شناسایی شدند (Faghanizadeh *et al.* 2016). جدایه‌های قارچی نیز در محیط سابورد دکستروز آگار کشت داده شد و در ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ٤٨ ساعت گرماگذاری شد. قارچ‌های رشد یافته با لاکتوفنل کاتن بلو رنگ‌آمیزی و در زیر میکروسکوپ از نظر مورفولوژیکی بررسی و در نهایت با روش مولکولی و تکثیر توالی فاصله اندازهای رونویسی شوندهٔ داخلی (ITS) شناسایی گردید (Mahuku, 2004).

استخراج DNA جدایه‌ها و تکثیر قطعهٔ 16S rDNA باکتری‌ها و قطعهٔ 5S rDNA قارچ‌ها با PCR

استخراج DNA باکتری‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA سیناژن (شماره کاتالوگ DN 8115C) انجام گرفت. استخراج DNA قارچ‌ها بر اساس روش استاندارد با تغییرات بهینه شده در این مطالعه انجام گرفت. مقداری میسلیوم قارچی در ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر لیز کننده (Tris 100 mM، EDTA 10 mM، ٪2 SDS، ۲-مرکاپتواتانول ٪1، پروتئین کیناز K ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تنظیم شده در pH ۸) له شد. سپس انکوباسیون به‌مدت ٦٠ دقیقه در ٦٠ درجهٔ سانتی‌گراد انجام گرفت. ۷۵ میکرولیتر از NaCl ۵ مولار و ۰/۱ حجم از CTAB ٪۱۰ اضافه شد. انکوباسیون به‌مدت ۱۰ دقیقه در ٦٥ درجهٔ سانتی-

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.9.3]

گراد انجام گرفت. به مقدار هم حجم محلول، کلروفرم اضافه شده و به‌خوبی مخلوط گردید و به‌مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ (در صفر درجهٔ سانتی‌گراد) قرار داده شد. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۱۲۰۰ سانتریفیوژ شد و به مقدار ۰/۵ حجم محلول، استات سدیم ($C_2H_3NaO_2$) ۳ مولار اضافه و به‌مدت ٦۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. محلول در g ۱۱۲۰۰ و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی در یک تیوب تمیز دیگر جمع‌آوری گردید. به مقدار ۰/۵ حجم محلول، ایزوپروپانول افزوده شد در g ۱۱۲۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی بیرون ریخته شد و رسوب با ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ٪۷۰ شست‌وشو داده شده و در g ۱۱۲۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. اتانول موجود بیرون ریخته شد و رسوب در دمای اتاق خشک و نهایتاً در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید. مقدار ۰/۵ میکرولیتر RNase اضافه شد و در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه گرماگذاری گردید (Mahuku, 2004).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA الگو، ۰/٤ میکرومولار از هر پرایمر فوروارد و ریورس، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۲ میلی‌مولار MgCl2، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۱ واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase انجام گردید. واکنش PCR قطعهٔ 16S rDNA جدایه‌های باکتری با روش استاندارد (Faghanizadeh *et al.* 2016) و با استفاده از پرایمرهای عمومی (جدول ۱) در دستگاه ترمال سایکلر بایورد (Bio-Rad, USA) تحت شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ٤۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. واکنش PCR قطعهٔ 5S rDNA جدایه‌های قارچی نیز با روش استاندارد و با استفاده از پرایمرهای ITS (جدول ۱) در دستگاه ترمال سایکلر بایورد (Bio-Rad, USA) تحت شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٦۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. در نهایت، قطعات تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید.

بررسی تثبیت نیتروژن

بررسی تثبیت نیتروژن و سنجش میزان فعالیت آنزیم نیترژناز جدایه‌ها توسط دستگاه کروموتوگرافی گازی GC-GM 816 (GOW-MAC, Taiwan) و با روش احیا استیلن به اتیلن انجام گرفت.

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده برای rDNA-PCR

Table 1. Primers for rDNA-PCR amplification

نوع پرایمر	توالی پرایمر (5'–3')	اندازه قطعه	منبع
باکتریایی	F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG R: GAC GGG CGG TGT GTA CAA	۱٤۰۰ bp	(Zheng *et al.* 1996)
قارچی (ITS)	F: TCC GTA GGT GAA CCT GCG G R: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	۵۵۰ bp	(White *et al.* 1990)

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.9.3]

ابتـدا میکروارگانیسـم‌ها در محـیط مـانیتول بـراث در لولـهٔ آزمایش کشت داده شد و در ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٨ ساعت گرماگـذاری شـد. سـپس درب پنبـه‌ای لولـه بـا درب پلاستیکی استریل در کنار شعله و با احتیاط تعویض شـد. ۳۰ درصد حجم باقی مانده لوله و به مقـدار ۱ میلـی‌لیتـر توسـط سرنگ خارج شد و با همان مقدار از گـاز اسـتیلن جـایگزین گردید و مجدداً در ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مـدت ٢٤ سـاعت گرماگذاری شد. سپس، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هوای داخـل لولـه توسـط سـرنگ همیلتـون خـارج شـد و بـه دسـتگاه کروماتوگرافی تزریق گردید. اتیلن تولید شده توسط جدایه‌هـا با گاز اتیلن خالص تهیه شده در غلظـت‌هـای ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦، ۰/۸ و ۱ میکروگرم مقایسه گردید (Muangthong, 2015).

نتایج و بحث

شناسایی اندوفیت‌ها

پـس از کشـت و بررسـی میکروارگانیسـم‌هـا بـا اسـتفاده از مشخصات کلنی و تست‌های بیوشیمیایی ۲ گونه باکتریـایی و ۲ گونه قارچی شناسایی شد (جـدول ۲). تکثیـر قطعـه 16S rDNA با استفاده از واکنش PCR، برای باکتری‌های اندوفیت باند مناسب را در اندازه ۱٤۰۰ جفت بـاز و بـرای قـارچ‌هـای اندوفیت اندازه ۵۵۰ جفت باز را نشان داد (شکل ۲). پـس از تعیین توالی آن‌ها و ردیف‌سازی با نرم افزار بلاسـت در وب-سایت www.ncbi.nlm.nih.gov، درصد و شباهت جدایـه‌هـا مقایسه شد (جدول ۳).

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های اندوفیت

Table 2. Characterization of endophytic isolates

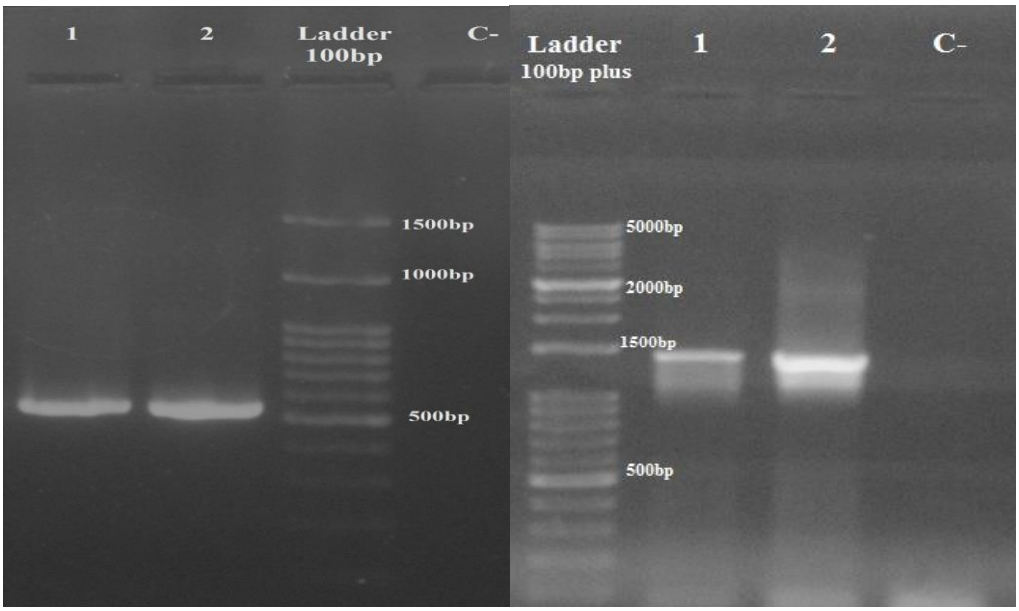
شماره جدایه	محل نمونه برداری	درخت	شکل میکروسکوپی	واکنش گرم	شکل کلنی
E1	جنگل توسکستان	گرهک توسکا	رشته ای	+	سفید رنگ، خشک، زیر اگار و روی آگار
E2	جنگل جعفر آباد	گرهک توسکا	رشته ای	+	سبز رنگ، زیر آگار
E3	بسطام	گرهک سنجد	رشته ای	+	پهن سفید رنگ، خشک، روی آگار
E4	بسطام	گرهک سنجد	گرد	+	ریز سفید رنگ، زیر آگار

جدول ۳- باکتری مرجع موجود در NCBI

Table 3. Deposed isolates to NCBI

جدایه اندوفیت	باکتری مرجع در بانک ژنی (NCBI)	درصد شباهت	شماره دسترسی در بانک ژنی
E1	*Streptomyces badius* strain BL225	۱۰۰	KF146316.1
E2	*Cladosporium cladosporioides* strain F1	۹۹	KF278646.1
E3	*Actinomadura citrae* strain DSM 43461	۹۹	NR_042116.1
E4	*Cryptococcus victoria* strain p41A001	۹۹	JX188144.1

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.9.3]



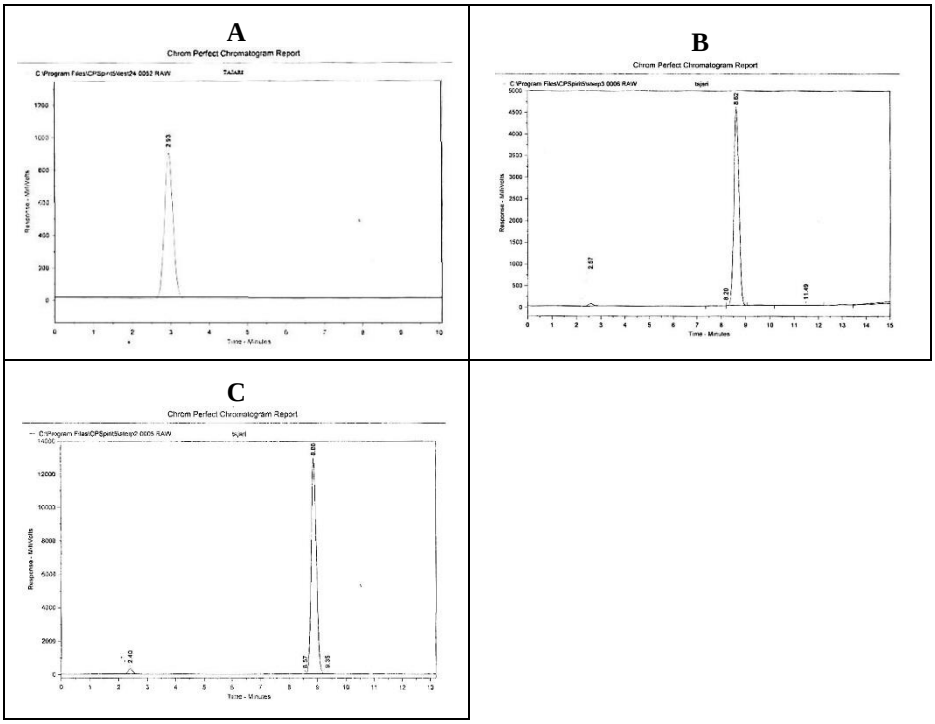
شکل ۲- سمت چپ: تکثیر قطعه 16S rDNA باکتری‌ها در سایز تقریبی bp ۱٤۰۰، ۱) تکثیر قطعه 16S rDNA در *Streptomyces badius* ۲) تکثیر قطعه 16S rDNA در *Actinomadura citrae*. سمت راست: تکثیرقطعه 5S rDNA قارچ‌ها در سایز bp ۵۵۰: ۱) تکثیرقطعهٔ 5S rDNA در *Cladosporium cladosporioides* ۲) تکثیرقطعهٔ 5S rDNA در *Cryptococcus victoria* -C: در هر دو تصویر، کنترل منفی می‌باشد.

Figure 2. Left: Amplification of 16S rDNA fragment in size of 1400 bp, 1) Amplification of *Streptomyces badius* 16S rDNA, 2) Amplification of *Actinomadura citrae* 16S rDNA, Right: Amplification of 5S rDNA fragment of fungi in size of 550 bp, 1) Amplification of 5S rDNA fragment of *Cladosporium cladosporioides*, 2) Amplification of 5S rDNA fragment of *Cryptococcus victoria*, C-: Negative control in both figures

ارزیابی میزان تثبیت نیتروژن توسط میکروارگانیسم‌های اندوفیت

مقدار اتیلن تولید شده متعاقب تزریق گاز استیلن و انکوباسیون به‌مدت ٢٤ ساعت برای جدایه‌ها اندازه‌گیری شد. بیشترین پتانسیل احیای استیلن به اتیلن و قدرت تثبیت نیتروژن در جدایه‌های *Cladosporium cladosporioides* strain F1 و *Cryptococcus victoria* strain p41A001 مشاهده گردید. پاسخ آشکارساز کروماتوگراف گازی ناشی از احیای استیلن به اتیلن توسط جدایهٔ *Cryptococcus victoria* strain p41A001 در زمان بازداری (Retention Time) ۸/٦۲ دقیقه معادل ٤٦٥٠ میلی‌ولت و توسط جدایهٔ *Cladosporium cladosporioides* strain F1 در زمان بازداری (Retention Time) ۸/۹٦ دقیقه معادل ۱۳۰۰ میلی‌ولت بود. متوسط زمان رؤیت پیک اتیلن پس از تزریق گاز استیلن برای جدایه‌ها، ۲ تا ۳ دقیقه بود (شکل ۳).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.9.3]



شکل ۳= بررسی احیای استیلن در دستگاه GC GM816 ، مقدار۱۰۰ میکرو لیتر گاز استیلن به هر نمونه بعد از ۲٤ساعت تزریق شده است. A) پیک استاندارد اتیلن در زمان بازدازی ۲/۹۳ دقیقه معادل ۹۰۰ میلی‌ولت، B) پیک اتیلن ناشی از احیای استیلن توسط *Cryptococcus victoria*، C) پیک اتیلن ناشی از احیای استیلن توسط *Cladosporium cladosporioides*.

Figure 3. Acetylene reduction assay by GC GM816, 100 µl of acetylene was injected into each sample after 24h.
A) Standard curve of ethylene (Retenion Time: 2.93 min, Signal at 900 mVolts), B) Ethylene peak resulted from acetylene reduction by *Cryptococcus victoria*, C) Ethylene peak resulted from acetylene reduction by *Cladosporium cladosporioides*

اندوفیت‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که بدون آسیب رساندن و اثرات منفی بر میزبانشان درون بافت‌های آنها زندگی می‌کنند. آنها نقش مهمی در فعالیت فیزیولوژیکی گیاهان میزبان از جمله استرس‌های محیطی، حشرات و مقاومت گیاهان در برابر بیماری‌ها دارند. اندوفیت‌ها همچنین یک منبع با ارزش متابولیت‌های ثانویه زیست محیطی هستند. همچنین می‌توانند رشد گیاهان و توانایی تثبیت نیتروژن گیاهان میزبان را تسریع بخشند. این میکروارگانیسم-ها در بسیاری از گونه‌های گیاهی یافت شده و به‌عنوان یک منبع بالقوه برای ترکیبات طبیعی بیواکتیو جهت استفاده در پزشکی، کشاورزی و صنعت شناخته شده‌اند (Faghanizadeh *et al*. 2016; Naik *et al.* 2009; Song *et al.* 2017). در این تحقیق میکروارگانیسم‌های تثبیت کننده نیتروژن از گرهک‌های ریشه درختان توسکا و سنجد جداسازی و با روش مولکولی شناسایی شد. با بررسی فعالیت نیتروژناز جدایه‌ها با روش احیای استیلن به اتیلن دو میکروارگانیسم *Cladosporium cladosporioides* strain F1 و *Cryptococcus victoria* strain p41A001 با توانایی تثبیت ازت جداسازی و شناسایی شد. بر اساس مطالعات انجام شده، تا کنون گزارشی مبنی بر جداسازی این دو سویه به‌عنوان تثبیت کننده نیتروژن در ایران وجود ندارد. Muangthong و همکاران (۲۰۱۵) مطالعه مشابهی را برای بررسی باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن با روش احیای استیلن در نیشکر انجام دادند که آنالیز ژن 16S rRNA باکتری‌های جدا شده در این مطالعه *Ancylobacter*، *Ochrobactrum* و *Novosphingobium* را شناسایی کرد (Muangthong *et al.* 2015). در مطالعه Ji و همکاران (۲۰۱٤) چهار باکتری *Penibacillus*، *Microbacterium*، *Bacillus*، *Klebsiella* به‌عنوان تثبیت کننده نیتروژن شناسایی شدند. در این مطالعه برای جداسازی باکتری‌ها از ریشه، ساقه و برگ برنج از محیط TSA و محیط نیمه جامد فاقد نیتروژن استفاده شد. جهت

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.9.3]

شناسایی سویه‌های تثبیت کننده نیتروژن ژن *nifH* ردیابی شد که از این نظر با مطالعه ما تفاوت دارد (Ji *et al*. 2014). ژن *nifH* کد کننده پروتئین آهن نیتروژناز است و وجود این ژن در سویه‌ها می‌تواند شاهدی غیرمستقیم بر فعالیت نیتروژناز در باکتری‌ها می‌باشد (Ji *et al*. 2014; Turk *et al*. 2011; Coelho *et al*. 2009). در مطالعاتی که توسط Luuml و همکاران (۲۰۱۰) برای جداسازی *ازوتوباکتر* انجام شد، در بررسی آن‌ها از محیط بدون ازت حاوی منبع کربن مانیتول استفاده شده که تحقیق حاضر مطابقت داشت (Luuml and Huang 2010). در مطالعه بیگلریان و همکاران نیز جهت جداسازی باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن گیاه مارچوبه از محیط مانیتول آگار فاقد منبع ازت استفاده کردند که با این مطالعه مطابقت دارد (dadok *et al*. 2013).

در مطالعه ما از بین چهار سویه جدا شده دو سویه *Streptomyces badius* BL225 و *Actinomadura citrae* strain DSM 43461 توانایی تثبیت نیتروژن نداشتند و حضور این دو اندوفیت در گرهک‌ها احتمالاً به علت تجزیه لیگنین می‌باشد که نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. اکتینومایست‌ها به ویژه استرپتومایست‌ها به عنوان باکتری‌های ساپروفیتیک هستند که مواد آلی مثل لیگنوسلولز و نشاسته در خاک را تجزیه و از آنها به عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند (Giroux *et al*. 1988).

مطالعه ما بر روی میکروارگانیسم‌های اندوفیت جداسازی شده از گرهک‌های ریشه درختان توسکای ییلاقی (*Alnus subcordata*) به عنوان گونه غالب توسکا در استان گلستان نشان داد که بیشترین اندوفیت‌های موجود در گرهک‌های توسکای ییلاقی، باکتری *Streptomyces badius* و قارچ *Cladosporium cladosporioides* می‌باشد. بیشترین اندوفیت‌های جدا شده از گرهک‌های ریشه‌ای درخت سنجد (*Elaeagnus angustifolia*) نیز در مطالعهٔ ما، قارچ *Cryptococcus victoria* بود.

هنوز دانش بشر در ارتباط با اکولوژی اندوفیت‌های تثبیت‌کننده نیتروژن محدود است. فهم درستی از اکولوژی و بر همکنش‌های متفاوت بین باکتری‌های اندوفیت با دیگر میکروارگانیسم‌ها و گیاهان، کاربرد موفقیت آمیز این دسته از میکروارگانیسم‌ها را در بیوکنترل بیماری‌های گیاهی و بهبود رشد گیاه فراهم می‌سازد. فاکتورهایی مانند شرایط اقلیمی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک، میکروفلور خاک، آب و تنش ناشی از عوامل بیماریزای گیاهی از جمله فاکتورهای مهم و موثر در عملکرد این گروه از میکروارگانیسم‌ها می‌باشند که کاربرد تجارتی آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. با این حال، تحقیقات در ارتباط با استفاده بهینه از باکتری‌های اندوفیت برای افزایش رشد گیاه ادامه دارد.

منابع

Cheng Q. 2008. Perspectives in biological nitrogen fixation research. Journal of Integrative Plant Biology. 50:786-98.

Cocking EC. 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. Plant and Soil. 252:169-75.

Coelho M, Carneiro N, Marriel I, Seldin L. 2009. Molecular detection of nifH gene containing *Paenibacillus* in the rhizosphere of sorghum (Sorghum bicolor) sown in Cerrado soil. Letters in Applied Microbiology. 48:611-7.

Dadok M, Beglarian M, Mehrabian S, Zamanian Azodi M, Salehi M, Maleki M. 2013. Phylogenetic identification of nitrogen-fixing bacteria isolated from the rhizosphere of asparagus plants using 16s rRNA and the effect of zinc on isolated strains. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 20:112-20. (In Farsi with English abstract).

Eleiwa ME, Hamed ER, Shehata HS. 2012. The role of biofertilizers and/or some micronutrients on wheat plant (*Triticum aestivum* L.) growth in newly reclaimed soil. Journal of Medicinal Plants Research. 6:3359-69.

Faghanizadeh V, Arzanesh MH, Yazdansetad S, Nezamzadeh R. 2016. Isolation and molecular characterization of endophytic bacteria from peppermint, chamomile, asparagus and antagonistic effect of isolates on fungal plant pathogens. Biological Journal of Microorganism. 5:171-82. (In Farsi with English abstract).

Giroux H, Vidal P, Bouchard J, Lamy F. 1988. Degradation of Kraft indulin lignin by *Streptomyces viridosporus* and *Streptomyces badius*. Applied and Environmental Microbiology. 54:3064-70.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.9.3]

Gupta G, Panwar J, Akhtar MS, Jha PN. 2012. Endophytic nitrogen-fixing bacteria as biofertilizer. Sustainable agriculture reviews: Springer. 183-221.

Ji SH, Gururani MA, Chun S-C. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. Microbiological Research. 169:83-98.

Luuml C, Huang B. 2010. Isolation and characterization of Azotobacteria from pine rhizosphere. African Journal of Microbiology Research. 4:1299-306.

Mahuku GS. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. Plant Molecular Biology Reporter. 22:71-81.

Muangthong A, Youpensuk S, Rerkasem B. 2015. Isolation and characterisation of endophytic nitrogen fixing bacteria in sugarcane. Tropical Life Sciences Research. 26:41.

Mus F, Crook MB, Garcia K, Costas AG, Geddes BA, Kouri ED, et al. 2016. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. Applied and Environmental Microbiology. 82:3698-710.

Naik BS, Shashikala J, Krishnamurthy Y. 2009. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities in vitro. Microbiology Research. 164:290-6.

Santi C, Bogusz D, Franche C. 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. Annals of Botany. 111:743-67.

Shridhar BS. 2012. Nitrogen fixing microorganisms. International Journal of Microbiology Research. 3:46-52.

Song Y, Wu P, Li Y, Tong X, Zheng Y, Chen Z, et al. 2017. Effect of endophytic fungi on the host plant growth, expression of expansin gene and flavonoid content in *Tetrastigma hemsleyanum* Diels & Gilg ex Diels. Plant and Soil. 417:393-402.

Turk KA, Rees AP, Zehr JP, Pereira N, Swift P, Shelley R, et al. 2011. Nitrogen fixation and nitrogenase (*nifH*) expression in tropical waters of the eastern North Atlantic. The ISME Journal. l5:1201.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. 315-22.

Zheng D, Alm EW, Stahl DA, Raskin L. 1996. Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. Applied and Environmental Microbiology. 62:4504-13.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.9.3]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 6, Number 2

A survey of nitrogen fixation on bacterial and fungal endophytes isolated from root nodules of alder (*Alnus subcordata*) and Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*)

Mohammad Esmaei Tajari[1], Hanieh Asaadi[2], Hamidreza Pordeli[3], Reza Najafpour[4], Sajjad Yazdansetad*[5]

1- M.Sc. Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Iran.
2- M.Sc. Medical Microbiology, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Iran.
3- Assistant Professor of Mycology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.
4- Ph.D. student in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Iran.
5- Ph.D. Microbiology, Department of Microbiology, School of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.
*Email corresponding author: sajjad.yazdansetad@gmail.com

Abstract

Nitrogen is one of the most important elements needed by plants, but plants are unable to reduce atmospheric nitrogen into ammonia and use it directly for its growth. Nitrogen fixing microorganisms, with the process of nitrogen fixation, provide the nitrogen required for plant utilization and play an important role in soil fertilization. The aim of this study was to evaluate nitrogen fixation in endophytic microorganisms isolated from root nodules of alder (*Alnus subcordata*) and Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*) in Golestan province. A total of 50 nodule specimens were collected and cultured on nitrogen-free medium. Microorganisms were identified using biochemical and molecular tests. Nitrogen fixation of isolates was also evaluated using acetylene reduction and gas chromatography (GC). The two genera of *Streptomyces badius* strain BL225 and *Actinomadura citrae* strain DSM 43461 were identified as endophytic actinobacteria, *Cladosporium cladosporioides* strain F1 and *Cryptococcus victoriae* strain p41A001 were found as Ascomycota and Basidiomycota phyla of fungal endophytes, respectively. *Cladosporium cladosporioides* strain F1 and *Cryptococcus victoria* strain p41A001 had a high ability in nitrogen fixation. The root nodules of alder (*A. subcordata*) and Russian olive (*E. angustifolia*) carry the endophytic microorganisms with nitrogen fixation ability, therefore, the endophytes can be used as biocontrol agents in agriculture.

Keywords: endophyte, nitrogen fixation, gas chromatography, alder, Russian olive

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.9.3]