

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^۱، حانیه اسعدی^۲، حمید رضا پردلی^۳، رضا نجف‌پور^۴،

سجاد یزدان ستاد^{۵*}

Mohammad Esmaeil Tajari¹, Hanieh Asaadi², Hamidreza Pordeli³,
Reza Najafpour⁴, Sajjad Yazdansetad^{5*}

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، ایران. ۲- کارشناس ارشد میکروب شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، ایران. ۳- استادیار قارچ شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، ایران. ۴- دانشجوی دکترای تخصصی میکروبیولوژی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، ایران. ۵- دکترای تخصصی میکروبیولوژی، گروه میکروب-شناسی، دانشکده 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: ۹۶/۶/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۲۴)

چکیده

واژه‌های کلیدی

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 ۵۰ نمونه گرهک جمع‌آوری و پس از شستشو در محیط کشت فاقد نیتروژن کشت داده شد. شناسایی میکروارگانیسم‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی انجام گرفت. همچنین تثبیت نیتروژن جدایه‌ها با استفاده از روش احیای استیلین با کروماتوگرافی گازی (GC) ارزیابی شد. اندوفیت‌های *Streptomyces badius* strain BL225، *Cladosporium cladosporioides* strain F1، *Cryptococcus victoriae* strain DSM 43461 و *Actinomadura citrae* strain p41A001 شناسایی شدند که از این بین *Cladosporium cladosporioides* strain F1 و *Cryptococcus victoriae* 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.

اندوفیت،

تثبیت نیتروژن،

کروماتوگرافی گازی،

توسکا،

سنجد،

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 به طور مستقیم برای رشد نمی‌باشد (Shridhar, 2012; Eleiwa et al. 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 به واسطه میکروارگانیسم‌های تثبیت‌کننده ازت به دست 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 به واسطه 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 ارائه مطلوب و پایدار نیتروژن به گیاهان، ضروری به نظر می‌رسد. تثبیت بیولوژیکی نیتروژن پتانسیل بسیار بالایی دارد و می‌تواند به عنوان 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 تثبیت‌کننده 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 رابطه همزیستی با این گیاهان برقرار می‌کنند. این نوع همزیستی باعث بهبود و افزایش ذخیره مواد غذایی در خاک می‌گردد. بر این اساس، جداسازی و مطالعه میکروارگانیسم‌هایی با توانایی تثبیت ازت و سایر قابلیت‌های بیولوژیک به منظور استفاده در کودهای بیولوژیک حائز اهمیت است. مطالعه 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

نمونه برداری

نمونه برداری به مدت ۶ ماه در دو فصل بهار و تابستان از گرهک‌های ریشه‌ای درخت توسکا در دو منطقه 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. نمونه برداری از گرهک‌های ریشه‌ای درختان سنجد نیز از شهرستان بسطام



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

MR-VP، مصرف سترات، 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 درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ 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 شونده داخلی (ITS) شناسایی گردید (Mahuku, 2004).

استخراج DNA جدایه‌ها و تکثیر قطعه 16S rDNA باکتری‌ها و قطعه 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 میسلیم قارچی در ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر لیز کننده (EDTA 10 mM, Tris 100 mM, 2% SDS، پروتئین کیناز K ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تنظیم شده در pH ۸) له شد. سپس انکوباسیون به مدت ۶۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. ۷۵ میکرولیتر از NaCl ۵ مولار و ۰/۱ حجم از CTAB ۱۰٪ اضافه شد. انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی-

استان سمنان با مختصات جغرافیایی مشروح در سیستم DMS (36° 29' 07" N 54° 59' 59" E) انجام گرفت. تعداد ۵۰ نمونه 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 جمع‌آوری 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 به مدت ۵ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد در داخل میکروتیوب ضد عفونی 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 به مدت 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 به مدت 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 H₂S، بررسی حرکت، تولید اندول از تریپتوفان،

گرمای انجام گرفت. به مقدار هم حجم محلول، کلروفرم اضافه شده و به خوبی مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ (در صفر درجه سانتی گراد) قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۱۲۰۰ g سانتریفیوژ شد و به مقدار ۰/۵ حجم محلول، استات سدیم ($C_2H_3NaO_2$) ۳ مولار اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. محلول در ۱۱۲۰۰ g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی در یک تیوب تمیز دیگر جمع آوری گردید. به مقدار ۰/۵ حجم محلول، ایزوپروپانول افزوده شد در ۱۱۲۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی بیرون ریخته شد و رسوب با ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شست و شو داده شده و در ۱۱۲۰۰ g به مدت 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 درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه گرمگذاری گردید (Mahuku, 2004).

واکنش زنجیره ای پلیمرز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر فوروارد و ریورس، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۲ میلی-مولار $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase انجام گردید. واکنش PCR قطعه 16S rDNA جدایه های 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 ۹۴ درجه سانتی-گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. واکنش PCR قطعه 5S rDNA جدایه های 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 سانتی-گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت 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 نیتروژناز جدایه ها توسط دستگاه کروماتوگرافی 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

منبع	اندازه قطعه	توالی پرایمر (5'-3')	نوع پرایمر
(Zheng et al. 1996)	۱۴۰۰ bp	F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG R: GAC GGG CGG TGT GTA CAA	باکتریایی
(White et al. 1990)	۵۵۰ bp	F: TCC GTA GGT GAA CCT GCG G R: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	ITS) قارچی

نتایج و بحث

شناسایی اندوفیت‌ها

پس از کشت و بررسی میکروارگانیسم‌ها با استفاده از مشخصات کلنی و تست‌های بیوشیمیایی ۲ گونه باکتریایی و ۲ گونه قارچی شناسایی شد (جدول ۲). تکثیر قطعه 16S rDNA با استفاده از واکنش PCR، برای باکتری‌های اندوفیت باند مناسب را در اندازه ۱۴۰۰ جفت باز و برای قارچ‌های اندوفیت اندازه ۵۵۰ جفت باز را نشان داد (شکل ۲). پس از تعیین توالی آن‌ها و ردیف‌سازی با نرم افزار بلاست در وب-سایت www.ncbi.nlm.nih.gov، درصد و شباهت جدایه‌ها مقایسه شد (جدول ۳).

ابتدا میکروارگانیسم‌ها در محیط مانیتول برات در لوله آزمایش کشت داده شد و در ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. سپس درب پنبه‌ای لوله با درب پلاستیکی استریل در کنار شعله و با احتیاط تعویض شد. ۳۰ درصد حجم باقی مانده لوله و به مقدار ۱ میلی‌لیتر توسط سرنگ خارج شد و با همان مقدار از گاز استیلن جایگزین گردید و مجدداً در ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. سپس، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هوای داخل لوله توسط سرنگ همیلتون خارج شد و به دستگاه کروماتوگرافی تزریق گردید. اتیلن تولید شده توسط جدایه‌ها با گاز اتیلن خالص تهیه شده در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میکروگرم مقایسه گردید (Muangthong, 2015).

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های اندوفیت

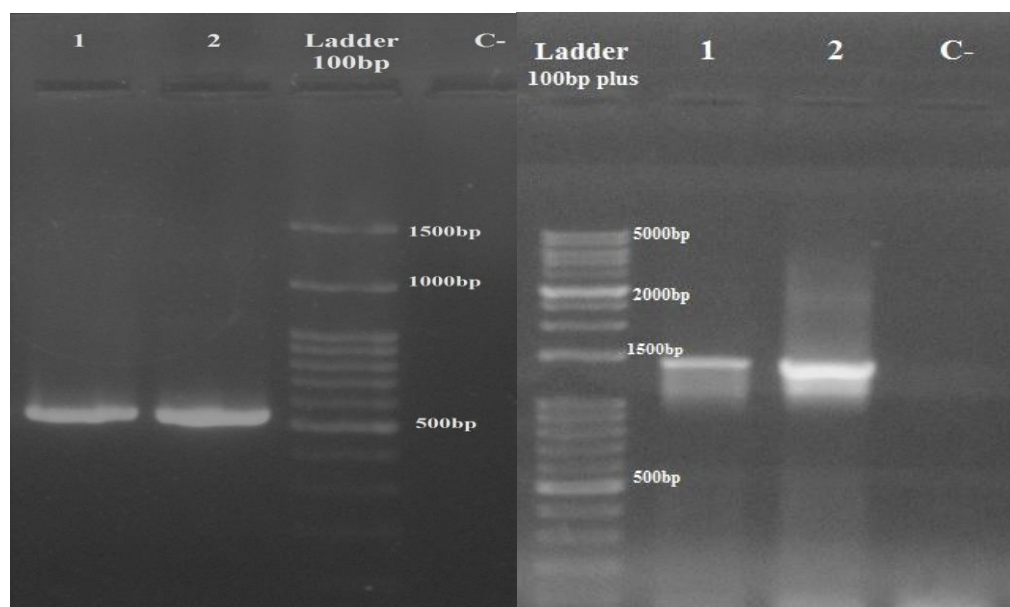
Table 2. Characterization of endophytic isolates

شماره جدایه	محل نمونه برداری	درخت	شکل میکروسکوپی	واکنش گرم	شکل کلنی
E1	جنگل توسکستان	گرهک توسکا	رشته ای	+	سفید رنگ، خشک، زیر آگار 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. Deposited isolates to NCBI

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



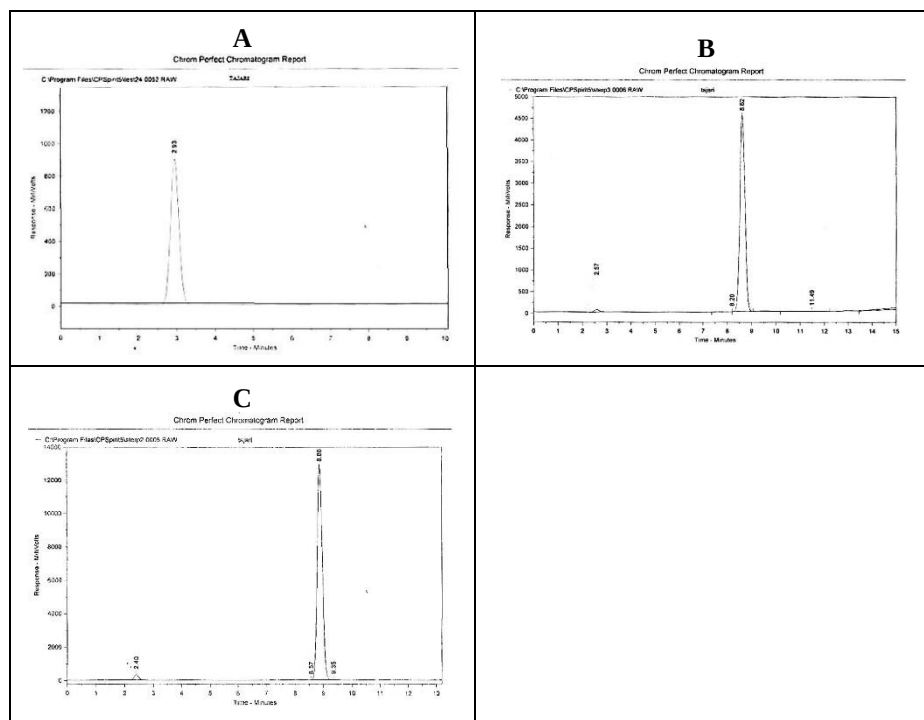
شکل ۲- سمت چپ: تکثیر قطعه 16S rDNA باکتری‌ها در سائز تقریبی ۱۴۰۰ bp (۱) تکثیر قطعه 16S rDNA در *Streptomyces badius* (۲) تکثیر قطعه 16S rDNA در *Actinomadura citrae* سمت راست: تکثیر قطعه 5S rDNA قارچ‌ها در سائز ۵۵۰ bp (۱) تکثیر قطعه 5S rDNA در *Cladosporium cladosporioides* (۲) تکثیر قطعه 5S rDNA در *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

احیای استیلن به اتیلن توسط جدایه *Cryptococcus victoria* strain p41A001 در زمان بازداری (Retention Time) ۸/۶۲ دقیقه معادل ۴۶۵۰ میلی‌ولت و توسط جدایه *Cladosporium cladosporioides* strain F1 (Retention Time) ۸/۹۶ دقیقه معادل ۱۳۰۰ میلی‌ولت بود. متوسط زمان رؤیت پیک اتیلن پس از تزریق گاز استیلن برای جدایه‌ها، ۲ تا ۳ دقیقه بود (شکل ۳).

مقدار اتیلن تولید شده متعاقب تزریق گاز استیلن و انکوباسیون به مدت ۲۴ 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



شکل ۳= بررسی احیای استیلین در دستگاه GC GM816، مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر گاز استیلین به هر نمونه بعد از ۲۴ ساعت تزریق شده است. A) پیک استاندارد اتیلن در زمان بازدازی ۲/۹۳ دقیقه معادل ۹۰۰ میلی ولت، B) پیک اتیلن ناشی از احیای استیلین توسط *Cryptococcus victoria*، C) پیک اتیلن ناشی از احیای استیلین توسط *Cladosporium cladosporioides*

Figure 3. Acetylene reduction assay by GC GM816, 100 μ l of acetylene was injected into each sample after 24h.

A) Standard curve of ethylene (Retention 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*

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 به عنوان تثبیت کننده نیتروژن در ایران وجود ندارد. Muangthong و همکاران (۲۰۱۵) مطالعه مشابهی را برای بررسی باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن با روش احیای استیلین 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 (۲۰۱۴) چهار باکتری *Bacillus*، *Microbacterium*، *Penibacillus* و *Klebsiella* به عنوان 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

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 میکروارگانیسم‌ها در بسیاری از گونه‌های گیاهی یافت شده و به عنوان 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 استیلین به

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 مطالعه 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 فیزیوشیمیایی 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 تجارتي آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. با این حال، تحقیقات در ارتباط با استفاده بهینه از باکتری‌های اندوفیت برای افزایش رشد گیاه ادامه دارد.

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 شاهی غیرمستقیم بر فعالیت نیتروژناز در باکتری‌ها می‌باشد (Ji et al. 2014; Turk et al. 2011; Coelho et al. 2009). مطالعاتی که توسط Luuml و همکاران (۲۰۱۰) برای جداسازی /زوتوباکتر 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 لیگنوسولوز و نشاسته در خاک را تجزیه و از آنها به عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند (Giroux et al. 1988).

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.

- 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. 15:1201.
- 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.

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 Tajari¹, Hanieh Asaadi², Hamidreza Pordeli³, Reza Najafpour⁴, 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 victoriae* 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