



شناسایی برخی از سیانوباکتری‌های هتروسیست دار مزارع برنج استان مازندران با تاکید بر رویکرد چندژنی

سارا کبیرنجاج^۱، قربانعلی نعمت زاده^۲، احمد فرهاد طالبی^{۳*}، میثم طباطبایی^۴، پراشانت سینگ^۵

^۱ دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان. استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان. استادیار، دانشگاه سمنان، گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده بیوفناوری. استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، گروه بیوتکنولوژی میکروبی. استادیار، دانشگاه هندوی بنارس، انستیتو علوم، گروه گیاه شناسی.

چکیده

سابقه و هدف: در گذشته طبقه‌بندی سیانوباکتری‌ها تنها بر اساس مورفولوژی انجام می‌گرفت. اما امروزه از شاخص‌های دقیق تر مولکولی استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه شناسایی تعدادی از سیانوباکتری‌های هتروسیست‌دار به واسطه تاکسونومی پلی‌فازیک و بررسی رویکرد چندژنی به منظور بالابردن صحت شناسایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پس از بررسی شاخص‌های ریخت‌شناختی و شناسایی اولیه، به منظور بررسی وضعیت تاکسونومی و یافتن روابط فیلوژنی از توالی ژن *16S rRNA* و ژن‌های کارکردی *rpoCI* و *psbA rbcL atfA* استفاده شد. بدین منظور پس از استخراج DNA، تکثیر قطعات ژنی و توالی‌یابی آنها، با رسم درخت‌های فیلوژنی از ژن‌های مربوطه به کمک نرم افزار MEGA، جایگاه دقیق نمونه‌ها مشخص شد.

یافته‌ها: در میان ژن‌های کارکردی مورد مطالعه، ژن *rpoCI* توانایی تفکیک بسیار خوبی در سطح جنس نشان داد، به طوری که نتایج فیلوژنی ژن *16S rRNA* را کاملاً تکمیل و تایید کرد و در نهایت بر اساس نتایج به دست آمده ۴ نمونه از جنس *Desmonostoc* و ۲ نمونه از جنس *Clotrichia* معرفی شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق قدرت ژن *rpoCI* در تفکیک درست جنس‌ها و تایید نتایج مورفولوژی و فیلوژنی ژن *16S rRNA* را نشان می‌دهد. مطالعه فیلوژنتیکی با استفاده مارکر ژنی *rpoCI* به شفاف‌سازی ارتباطات فیلوژنتیکی میان سیانوباکتری‌ها کمک می‌کند و علاوه بر آن شاهدی بر منشا کلروپلاستی و حضور مسیرهای تکاملی متفاوت میان آنها می‌باشد.

واژگان کلیدی: سیانوباکتری، هتروسیست، ژن *rpoCI* تاکسونومی، چندژنی.

پذیرش برای چاپ: شهریور ماه ۹۸

دریافت مقاله: مرداد ماه ۹۸

مقدمه

اکسیژن دارند. ساختار اولیه سیانوباکتری‌ها بیش از ۲/۵ میلیارد سال پیش شکل گرفته و تا به امروز تغییر اساسی و واضحی در مورفولوژی، فیزیولوژی پایه و اکولوژی آنها مشاهده نشده است. این امر بدین معنی است که در تمام طول تکامل شاهد

سیانوباکتری‌ها (Cyanobacteria) پروکاریوت‌های فتوسنتز کننده‌ای هستند که نقش مهمی در چرخه‌ی نیتروژن، کربن و

(* آدرس برای مکاتبه: سمنان، دانشگاه سمنان، دانشکده بیوفناوری، گروه زیست فناوری میکروبی

پست الکترونیک: aftalebi@semnan.ac.ir

تلفن: ۰۲۳۳۳۳۸۳۰۶



Nostocaceae) با داشتن نزدیک به ۳۰ جنس از بزرگ‌ترین و مهم‌ترین خانواده‌های سیانوباکتری‌ها محسوب می‌شود، اعضای آن همگی تثبیت کننده نیتروژن می‌باشند و نقش حیاتی در اکوسیستم ایفا می‌کنند. بسیاری از جنس‌های معرفی شده در این خانواده مانند *الینوستوک* (*Aliinostoc*) (۷)، *دسمونوستوک* (*Desmonostoc*) (۸) و *هالوتیا* (*Halotia*) (۹) در گذشته گونه‌هایی از جنس *نوستوک* (*Nostoc*) بودند که به مرور زمان و پیدایش روش‌های نوین، از جنس *نوستوک* تفکیک و به عنوان جنس جدید معرفی شدند. جنس *کلوتریکس* (*Calothrix*) نیز در سال ۱۸۸۶ از خانواده *ریولاریاسه* (*Rivulariaceae*) شناسایی و معرفی شد. طبق اطلاعات پایگاه CyanoDB، خانواده *ریولاریاسه* دارای حدود ۱۴ جنس می‌باشد. ویژگی‌های شاخص جنس‌های این خانواده غالباً شامل هتروسیست در انتهای تریکوم، انتهای باریک شده تریکوم و زائده‌های مو مانند در انتهای تریکوم می‌باشد. گزارش‌های متعددی نیز در رابطه با پلی‌فلیتیک بودن برخی از جنس‌های این خانواده ارائه شده است که مهم‌ترین آنها جنس *کلوتریکس* است (۱۰).

در مطالعه حاضر نمونه‌های سیانوباکتری تثبیت کننده ازت (هتروسیست‌دار) جداسازی شده از خاک شالیزارهای استان مازندران به روش پلی‌فازیک و با تاکید بر راهکار چندژنی، شناسایی و معرفی شده‌اند.

مواد و روش‌ها

الف) مشخصات جغرافیایی نمونه‌های جمع‌آوری شده: تمامی نمونه‌های سیانوباکتری بصورت مجموعه‌های خالص نشده از کلکسیون ژرم پلاست پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان تهیه شد. این نمونه‌ها از مناطق شالیزاری استان مازندران در سال ۱۳۹۱ جمع‌آوری شده بودند. مشخصات جغرافیایی و اسیدیته خاک ایستگاه‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

ب) شرایط کشت و نگهداری: نمونه‌های سیانوباکتری در محیط کشت BG-11₀ با pH تقریبی ۷/۲ کشت و در دمای ۲۷ درجه

تنوع بسیار گسترده‌ای از سیانوباکتری‌ها در یک ژنوم واحد بوده‌ایم. این ژنوم به حدی موفق بوده که آنها را قادر به زندگی در تمام کره زمین کرده است (۱).

جهش به همراه جابجایی ژنوم درون جمعیت سیانوباکتری‌ها و بین جمعیت‌های مشابه و مرتبط موجب جداسازی مورفولوژیکی و اکولوژیکی سیانوباکتری‌ها و افزایش احتمال سازگاری سریع آنها به شرایط محیطی مختلف شده است، در این راستا مسیرهای متابولیکی، مجدد تنظیم و/یا پروتئین‌های جدیدی برای سازگاری با شرایط جدید محیطی تولید شدند. این مراحل پیوسته، موجب پدیدار آمدن تعداد زیادی از انحرافات مورفولوژیکی، اکولوژیکی و اکوفیزیولوژیکی در جمعیت‌های طبیعی شده است (۲).

در گذشته طبقه‌بندی سیانوباکتری‌ها بر اساس مورفولوژی انجام می‌شد، اما امروزه از روش پیچیده‌ی دیگری به نام روش پلی‌فازیک استفاده می‌شود که تلفیقی از مورفولوژی، مولکولی، فیزیولوژی، بیوشیمی و اکولوژی سیانوباکتری‌ها می‌باشد (۳). در آنالیز مولکولی اطلاعات، اغلب به منظور دست یابی به وضوح تاکسونومی بالاتر، توالی ژن *16S rRNA* هم‌زمان با داده‌های توالی ITS (Internal transcribed spacer) و یا سایر ژن‌ها به کار می‌رود که به رویکرد چندژنی (Multi-genic approach) معروف است (۴).

اکولوژی سیانوباکتری نیز در میان داده‌های تاکسونومیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. سیانوباکتری‌ها می‌توانند ویژگی‌های اکولوژیک منحصر به فردی داشته باشند. به عنوان نمونه، برخی از آنها می‌توانند در مناطق قطبی (۵) و یا چشمه‌های آب گرم (۶) زندگی و رشد می‌کنند. بنابراین پراکندگی و توزیع سیانوباکتری‌ها با محیط و موقعیت جغرافیایی جداسازی نمونه‌ها مرتبط است. تاکنون محققین زیادی به اهمیت این میکروارگانیسم‌ها در تثبیت ازت خاک و افزایش حاصلخیزی آن پرداختند. گزارشات متعدد در رابطه با تنوع گونه‌ای بالا در سیانوباکتری‌های خاک‌زی در مزارع برنج نشان دهنده‌ی اهمیت و نقش آن‌ها را در تثبیت نیتروژن خاک جهت مصرف نهایی توسط برنج است. خانواده *نوستوکاسه*



شکل ۱: موقعیت پرایمرهای اصلی و داخلی در ژن *16S rRNA*.

از گذشت زمان مقرر ۲ میکرولیتر از محیط مایع بر روی محیط جامد nutrient agar کشت شدند. پلیت‌ها در دمای °C ۲۶-۳۰ و در شرایط تاریکی به مدت یک هفته نگهداری شدند و در نهایت نمونه‌های آلوده شناسایی و از نمونه‌های خالص حذف شدند (۲).

ه) شناسایی مورفولوژیک سیانوباکتری‌ها: به منظور دست یابی به دید کلی در مورد میکروفلور منطقه، تمامی نمونه‌ها به کمک میکروسکوپ نوری بررسی شدند. برای شناسایی دقیق‌تر، جزئیات بیش‌تر مانند سایز و شکل سلول‌ها، محل قرارگیری سلول‌های مختلف مانند اکینت و هتروسیست و نوع شاخه‌زایی و نحوه توسعه آنها، ابتدا از نمونه‌ها به کمک آب استریل و گلیسرول اسلاید تهیه گردید و سپس با کمک میکروسکوپ Nikon مدل YS100 بررسی و عکسبرداری شدند. عکس‌ها با دوربین Olympus مدل BX53 با دو بزرگ‌نمایی ۴۰ و ۱۰۰ برابر ثبت شدند. شناسایی اولیه و مورفولوژی نمونه‌ها ابتدا با کلید شناسایی دسیکاجاری (Desikachary) و سپس با کلید شناسایی گمارک (Komarek) انجام شد (۱۴ و ۱۵).

و) شناسایی مولکولی سیانوباکتری‌ها: به منظور استخراج DNA نمونه‌ها ۱۰-۸ روز بعد از کشت و در مرحله فاز رشدی لگاریتمی برداشت شدند. استخراج DNA از نمونه‌ها به کمک کیت Himedia Ultrasensitive Purification (شماره کاتالوگ: MB505) ساخت کشور هند، براساس دستورالعمل سازنده با اعمال تغییرات جزئی صورت گرفت؛ بدین صورت که مدت زمان گرماگذاری برای دو بافر AL و CI به ترتیب به ۴۵ و ۲۰ دقیقه افزایش یافت (۷). نمونه‌های DNA پس از استخراج به کمک ژل آگارز و دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین کیفیت و کمیت شدند. برای تکثیر و توالی‌یابی کامل ژن *16S rRNA* و همچنین منطقه ITS از یک جفت پرایمر اصلی و ۵ پرایمر داخلی استفاده گردید. بدین ترتیب که از دو پرایمر

جدول ۱: موقعیت جغرافیایی و اسیدپته مکان‌های نمونه‌برداری شده جدایه‌های شرق استان مازندران (۱۱ و ۱۲).

کد نمونه	ایستگاه	شهر	مکان	طول و عرض جغرافیایی	اسیدپته خاک
SA47	۱	نکا	کمربندی شهر	N36°38.364 E053°18.299	۷/۴۵
SA25	۲	ساری	گوهرباران	N36°48.905 E053°11.042	۷/۹۹
SA4-SA14	۳	آمل	لامیزده	N36°32.153 E052°19.284	۸/۶
SA5	۴	تنکابن	دوهزار	N36°44.521 E050°50.426	۷/۹۳
SA49	۵	گلوگاه	خورشیدکلا	N36°43.759 E053°46.561	۷/۹۳

سلسیوس و شرایط نوری $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ و ۱۴ ساعت روشنایی به مدت سه هفته نگهداری شدند (۱۳).

ج) خالص سازی نمونه‌ها: به منظور خالص سازی نمونه‌های سیانوباکتری، از روش رقیق سازی پشت سرهم (سریالی) استفاده شد. بدین ترتیب که پس از گذشت سه هفته از زمان کشت، نمونه‌ها از کشت‌های مایع با رقت‌های یک دهم، یک صدم، یک هزارم به وسیله آب استریل رقیق شده و به مقدار ۵۰ μL بر روی محیط جامد BG-11۰ به صورت چمنی کشت داده شدند. پس از یک هفته، کلنی‌های مجزا بر روی محیط کشت رشد کردند. از هر کدام از نمونه‌ها چندین کلونی بر اساس ویژگی‌های ظاهری انتخاب و در محیط جامد واکشت داده شدند. این عمل تا رسیدن به خلوص کامل تکرار گردید. برای اطمینان از خلوص، در هر مرحله از نمونه‌ها اسلاید تهیه شد و با کمک میکروسکوپ بررسی شدند (۷).

د) حذف آلودگی قارچی و باکتریایی از نمونه‌های سیانوباکتری: به منظور حذف آلودگی قارچی از قارچ کش بنومیل استفاده شد. به منظور انتخاب بهترین غلظت محیط کشت BG-11۰ با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از بنومیل تهیه و نمونه‌های قارچی روی آن کشت شدند. به منظور حذف آلودگی‌های باکتریایی مجدداً از روش رقیق سازی پشت سرهم استفاده گردید. پس از انجام رقیق سازی و ظهور کلنی‌ها بر سطح محیط کشت، از هر نمونه ۲ کلنی مجزا انتخاب و در محیط BG11 مایع حاوی ۰/۲٪ گلوکز و ۰/۰۲٪ کاز آمینو اسید به مدت ۱۰ روز در دمای °C ۲۶ و سرعت ۱۸۰ rpm و در شرایط تاریکی (برای رشد باکتری‌های احتمالی) گرماگذاری شدند. پس

بررسی و دو انتهای توالی‌ها در صورت خوانش نامناسب حذف شدند. توالی‌های ژن *16S rRNA* با توالی‌های معتبر موجود در پایگاه داده EzBiocloud (<https://www.ezbiocloud.net>) و همچنین در پایگاه NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) بلاست و در نهایت توالی‌هایی با بالاترین میزان هم‌ردیفی برای رسم درخت و در نهایت شناسایی انتخاب شدند. ژن‌های کارکردی نیز ابتدا با استفاده از ابزار ORF Finder موجود در پایگاه NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/>) مورد بررسی قرار گرفت و سپس به منظور بدست آوردن توالی‌هایی با بالاترین میزان شباهت، در پایگاه NCBI بلاست شدند و از نتایج بدست آمده برای شناسایی دقیق‌تر سیانوباکتری‌ها استفاده گردید. در نهایت تمامی توالی‌ها در پایگاه داده NCBI ثبت شدند.

ط) آنالیز فیلوژنتیک: تمامی آنالیزهای فیلوژنتیک سیانوباکتری‌ها با استفاده نسخه ۵ نرم‌افزار MEGA صورت گرفت. به منظور آنالیز ژن *16S rRNA*، از توالی‌های بدست آمده از پایگاه EzBiocloud و همچنین توالی‌های مناسب NCBI به طور هم‌زمان استفاده شد. ابتدا بهترین مدل برای رسم درخت در نرم افزار به کمک امتیاز Bayesian Information Criterion (BIC) انتخاب شد (کمترین امتیاز BIC نشان دهنده بهترین مدل است) سپس با بکارگیری بهترین مدل پیشنهادی نرم‌افزار، درخت فیلوژنتیک رسم شد. درخت‌ها با سه روش مختلف NJ (Neighbor-Joining)، ML (Maximum likelihood) و MP (Maximum Parsimony) رسم شدند و در نهایت برای بررسی راحت‌تر، همه‌ی درخت‌ها به صورت یکپارچه در یک درخت گنجانده شدند. تمام امتیازات bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار در نظر گرفته شدند. ژن‌های کارکردی نیز با توجه به میزان غنی

جدول ۴: برنامه دمایی مورد استفاده به منظور تکثیر ژن *16S rRNA*.

فاز	تعداد سیکل	زمان	دما (°C)
واشرشت سازی اولیه	۱	۵ دقیقه	۹۴
واشرشت سازی		۳۰ ثانیه	۹۴
اتصال آغازگر	۳۵	۴۵ ثانیه	۵۰
گسترش		۱ دقیقه	۷۲
گسترش نهایی	۱	۱۰ دقیقه	۷۲

جدول ۲: پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن *16S rRNA*.

نام پرایمر	توالی (5-3)	جایگاه (باز)	منبع
<i>PA (F)</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	۸-۲۸	۱۶
<i>B23S (R)</i>	CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT	۱۵۰۰-۲۰۰۰	۱۷
<i>pC</i>	CTACGGGAGGCAGCAGTGGG	۳۴۱-۳۶۱	
<i>pE</i>	AAACTCAAAGGAATTGACGG	۹۰۸-۹۲۸	
<i>pDr</i>	GTATTACCGCGTCTGTG	۵۳۶-۵۱۸	۱۶
<i>pFr</i>	ACGAGCTGACGACGCCATG	۱۰۷۳-۱۰۵۳	
<i>pHr</i>	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	۱۵۴۲-۱۵۲۲	

اصلی *pA* و *B23S* برای تکثیر ژن و از پرایمرهای *pC*، *pE*، *pDr*، *pFr* و *pHr* به همراه دو پرایمر اصلی در توالی‌یابی استفاده شد (شکل ۱، جدول ۲).

طول قطعه تکثیر شده با توجه به جنس و گونه مورد بررسی، متغیر و ۱۵۰۰-۲۰۰۰ bp محاسبه شد. تکثیر ژن یادشده براساس ترکیبات و مقادیر یادشده در جدول (۳)، برنامه‌ی دمایی واقع در جدول (۴) و در دستگاه PCR کمپانی BioRad انجام شد (۱۶). ز) تکثیر ژن‌های کارکردی: به منظور شناسایی مولکولی دقیق‌تر سویه‌های سیانوباکتری، به طور هم‌زمان از ژن‌های کارکردی *psbA*، *tufA*، *rpoC1*، *rbcl* نیز استفاده گردید (جدول ۵). ژن‌های یادشده بر اساس اطلاعات جدول (۳) و برنامه‌ی دمایی قید شده در جدول (۶) تکثیر و سپس خالص‌سازی شدند. تمامی قطعات به روش سانگر و در مرکز ملی منابع میکروبی (NCMR) واقع در شهر پونا (کشور هند) و به کمک دستگاه (Applied BioSystems) 3730xl automated sequencer توالی‌یابی شدند.

ح) آنالیز مولکولی: توالی‌های حاصل از توالی‌یابی به کمک نرم افزار Chromas Pro سرهم شدند، دقت و صحت توالی‌یابی

جدول ۳: پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن *16S rRNA*.

مقدار (μl)	ترکیبات
۲/۵	بافر PCR (10x)
۰/۵	دزوکسی نوکلئوتیدتری فسفات (10mM از هر یک)
۱	کلرید منیزیم (50mM)
۱	آغازگر (10pmol/μl)
۰/۲	DNA پلی مراز (5u/μl)
۱۹/۸	آب

جدول ۵: پرایمرهای ژن‌های کارکردی و توالی آن‌ها.

نام پرایمر	توالی (3-5)	طول (bp)	دمای انیلینگ	منبع
<i>tufA</i>	CACGTDGAYTYGCCNGGNACAGCTG	۸۳۰	۵۰	۱۸
	ATNCGRTCNCDDGGCATAAACCATTTC			
<i>rpoC1</i>	CCCGCNAARGAYTGGGAATG	۷۲۹	۵۳	۱۹
	GCTTCYTGCAACATCCGYTTYTC			
<i>rbcL</i>	GACTTCACCAAAGAYGACGAAAACAT	۷۰۰	۵۵	۲۰
	GAACCTCGAACTTRATYTCITTTCCA			
<i>psbA</i>	TTTATGTGGGTTGGTTCGG	۹۲۸	۵۶	۲۱
	TGAGCATTACGCTCGTGC			

بودن پایگاه‌های داده و توانایی ژن‌ها در تفکیک جنس‌ها و

گونه‌ها، به منظور رسم درخت تبارزایی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

الف) خالص‌سازی سیانوباکتری‌ها و تکثیر قطعات ژنی: خالص‌سازی نمونه‌های سیانوباکتری و جداسازی نمونه‌های آلوده، به روش رقیق‌سازی با موفقیت انجام گردید. نمونه‌ها با توجه به میزان آلودگی بعد از چندین بار رقیق‌سازی و واکشت از یکدیگر جدا شدند و به آنها کدهای مستقل داده شد. از میان غلظت‌های بکار رفته برای کنترل آلودگی قارچی، نهایتاً غلظت ۲۰ mg/L از بنومیل به عنوان مناسب‌ترین غلظت به منظور کنترل آلودگی قارچی انتخاب شد. به کمک این قارچ‌کش تمامی آلودگی‌های قارچی کنترل و حذف شدند. در نهایت از هر نمونه حداقل یک تکرار سالم نگهداری شد.

استخراج DNA از نمونه‌های سیانوباکتری خالص شده و در پی آن تکثیر توالی‌ها بواسطه ی PCR به خوبی انجام گردید (شکل ۲). نتیجه توالی‌یابی برای اکثر نمونه‌ها قابل قبول بود و نمونه‌هایی که خوانش نشدند پس از ارسال مجدد، توالی آن‌ها

جدول ۶: برنامه دمایی مورد استفاده به منظور تکثیر ژن‌های کارکردی.

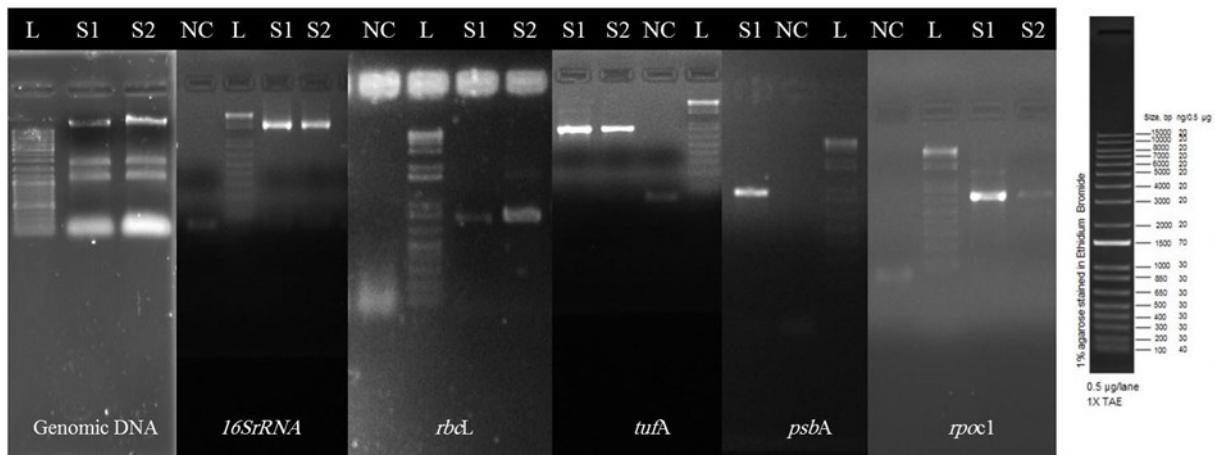
دما (°C)	زمان	تعداد سیکل	فاز
۹۴	۳ دقیقه	۱	واسرشت سازی اولیه
۹۴	۳۰ ثانیه		واسرشت سازی
بر اساس جدول ۴	۳۰ ثانیه	۳۰	اتصال آغازگر
۷۲	۱ دقیقه		گسترش
۷۲	۷ دقیقه	۱	گسترش نهایی

مورد خوانش قرار گرفت.

ب) نتایج مطالعات مورفولوژیک جنس دسمونوستوک: بررسی مورفولوژی نمونه‌های SA5، SA14، SA25 و SA49 نشان داد که این سویه‌ها همگی متعلق به خانواده نوستوکاسه و جنسی نزدیک به نوستوک هستند. تمامی نمونه‌ها ویژگی‌هایی مشابه با جنس کلیدی نوستوک نشان دادند. ویژگی‌های مورفولوژیکی مانند فیلامنت‌های ایزوپولار، تک ردیفه و غیرشاخه‌زا، حضور اکینت و هتروسیست‌های میانی و انتهایی و احاطه بودن در لایه موسیلاژی در اسلایدهای میکروسکوپی قابل تشخیص بود (شکل ۳). اگرچه متاسفانه چنین ویژگی‌هایی در بسیاری از گونه‌ها و سویه‌ها حتی با فاصله ژنتیکی زیاد نیز مشاهده می‌شود.

ج) نتایج مطالعات مولکولی و فیلوژنی جنس دسمونوستوک: نتایج بلاست نشان داد که ژن *16S rRNA* در نمونه‌های SA5، SA14 و SA25 به ترتیب ۹۷/۴٪، ۹۸/۵۷٪ و ۹۸/۳٪ با نمونه دسمونوستوک دانکسیانسه (*Desmonostoc danxiaense*) و نمونه SA49 ۹۷/۴۷٪ با نمونه سیلیندرسپرموم استگناله (*Cylindrospermum stagnale*) تشابه دارند. ژن *psbA* نیز در نمونه‌های SA5، SA14، SA25 و SA49 با نمونه نوستوک پانکتیفرمه (*Nostoc punctiforme*) به ترتیب ۹۲/۲۴٪، ۹۱/۳۶٪، ۹۴/۱۷٪ و ۹۴/۵۸٪ تشابه داشتند، این مقادیر برای تشابه ژن *rpoC1* برابر با ۹۱/۵۴٪، ۹۱/۵٪، ۹۱/۵۲٪ و ۹۳/۲۸٪ به ترتیب برای نمونه‌های SA5، SA14، SA25 و SA49 بود (جدول ۷). ژن *rbcL* در دو نمونه SA25 و SA49 به ترتیب ۹۲/۳۱٪ و ۹۵/۳۴٪ با نمونه نوستوک پانکتیفرمه و نمونه SA5 و SA14 به

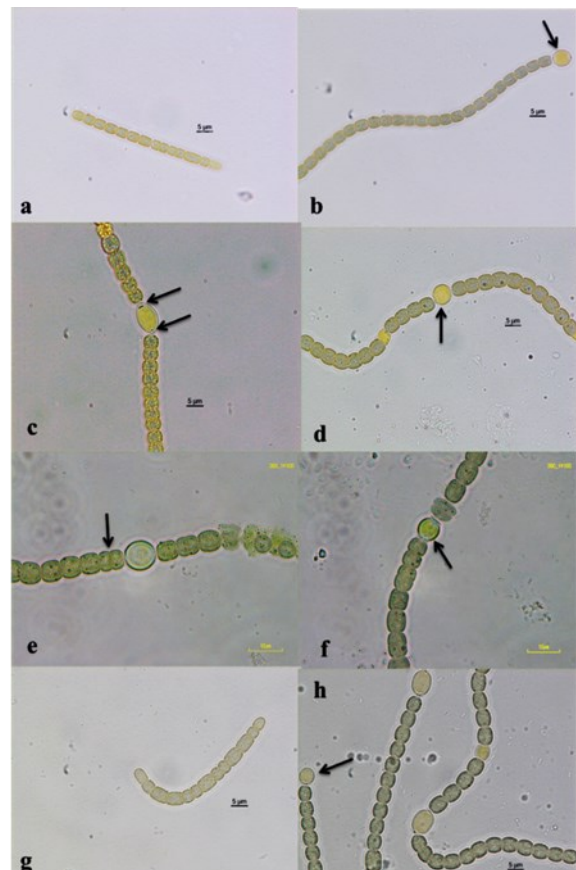
دنیای میکروب‌ها، سال دوازدهم شماره سوم پاییز ۱۳۹۸. شناسایی برخی از سیانوباکتری‌های هتروسیت دار مزارع برنج استان مازندران با تاکید بر رویکرد چندژنی. سارا کبیر نتاج و همکاران



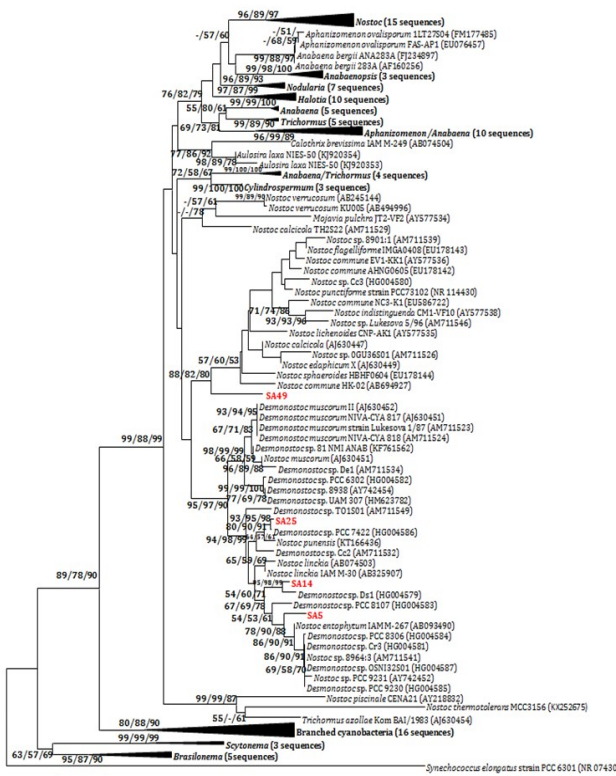
شکل ۲: تصاویر DNA استخراج شده و ژن‌های تکثیر شده به وسیله PCR قبل از خلص سازی. (L: سایز مارکر، S1 و S2: دو سویه متفاوت، NC: کنترل منفی).

ترتیب دارای ۰.۲٪/۸۶ و ۰.۹٪/۸۵ تشابه با نمونه سیلیندروسپرموم استگنیل و نمونه SA14 و SA25 نیز به ترتیب ۰.۵٪/۸۵ و ۰.۵۶٪/۸۵ تشابه با آنابنا سیلیندریکا (Anabaena cylindrica) نشان دادند (جدول ۷).

ترتیب ۰.۷۹٪/۹۰ و ۰.۱۵٪/۹۱ با نمونه سیلیندروسپرموم استگنیل تشابه داشتند. ژن tufA نیز در نمونه‌های SA5 و SA49 نیز به



شکل ۳: سویه‌های شناسایی شده از جنس دسمونوستوک. (a) هورموگونیا در نمونه SA25، (b) هتروسیت انتهایی در نمونه SA25، (c) گره‌های قطبی در هتروسیت میانی در نمونه SA5، (d) هتروسیت میانی در نمونه SA5، (e) سلول‌های رویشی در حال تقسیم در نمونه SA49، (f) هتروسیت میانی در نمونه SA49، (g) هورموگونیا در نمونه SA14، (h) هتروسیت انتهایی در نمونه SA14.



شکل ۴: درخت فیلوژنی نمونه‌های جنس دسمونوستوک. مقادیر bootstrap بر اساس ۱۰۰۰ رونوشت و به ترتیب از چپ به راست NJ، ML و MP هستند. بوت استرپ‌های بالاتر از ۵۰٪ در شکل نشان داده شده اند. سیانوباکتری سینه کوکوکوس الانگاتس (Synechococcus elongates) به عنوان گروه خارجی (outgroup) در نظر گرفته شده است.

جدول ۷: مشخصات ژن‌های جداشده از نمونه‌های سیانوباکتری جنس دسمونوستوک.

کد سویه	نام ژن	کد دسترسی	طول قطعه (bp)	میزان هم پوشانی (%)	میزان شباهت (%)	نزدیک ترین سویه در پایگاه داده NCBI
	<i>16SrRNA-ITS</i>	MF770266	۱۳۸۶	۱۰۰	۹۷/۴	<i>Desmonostoc danxiaense</i> MH291267.1
	<i>psbA</i>	MF631197	۸۳۳	۱۰۰	۹۲/۲۴	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 CP001037.1
SA5	<i>rpoC1</i>	MF631199	۶۱۶	۹۹	۹۱/۵۴	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 CP001037.1
	<i>rbcL</i>	MF631198	۷۶۹	۱۰۰	۹۱/۱۵	<i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417 CP003642.1
	<i>Tufa</i>	MF631200	۸۰۱	۱۰۰	۸۶/۰۲	<i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417 CP003642.1
	<i>16SrRNA-ITS</i>	MF642332	۱۵۴۶	۹۴	۹۸/۵۷	<i>Desmonostoc danxiaense</i> MH291267.1
	<i>psbA</i>	MF631194	۴۶۲	۱۰۰	۹۱/۳۶	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 CP001037.1
SA14	<i>rpoC1</i>	MF631195	۶۴۷	۱۰۰	۹۱/۵	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 CP001037.1
	<i>rbcL</i>	MF678820	۷۱۵	۱۰۰	۹۰/۷۹	<i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417 CP003642.1
	<i>Tufa</i>	MF631196	۷۹۸	۹۷	۸۵	<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122 CP003659.1
	<i>16SrRNA-ITS</i>	MF642333	۱۵۴۸	۹۴	۹۸/۳	<i>Desmonostoc danxiaense</i> MH291267.1
	<i>psbA</i>	MF662821	۳۰۹	۱۰۰	۹۴/۱۷	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 CP001037.1
SA25	<i>rpoC1</i>	MF662822	۶۱۳	۱۰۰	۹۱/۵۲	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 CP001037.1
	<i>rbcL</i>	MF662823	۷۸۰	۱۰۰	۹۲/۳۱	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 CP001037.1
	<i>Tufa</i>	MF662824	۷۵۵	۱۰۰	۸۵/۵۶	<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122 CP003659.1
	<i>16SrRNA-ITS</i>	MF642338	۱۳۴۰	۱۰۰	۹۷/۴۷	<i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417 CP003642.1
	<i>PsbA</i>	MF662825	۵۵۳	۱۰۰	۹۴/۵۸	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 CP001037.1
SA49	<i>rpoC1</i>	MF662827	۶۲۵	۱۰۰	۹۳/۲۸	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 CP001037.1
	<i>rbcL</i>	MF662826	۷۷۲	۱۰۰	۹۵/۳۴	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 CP001037.1
	<i>Tufa</i>	MF668212	۷۴۱	۹۹	۸۵/۰۹	<i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417 CP003642.1

هر دو نمونه دارای فیلامنت‌هایی با دو انتهای نامتقارن (Heteropolar) هستند، بطوری که تریکوم در ابتدای فیلامنت پهن‌ترند و در انتهاها باریک‌تر می‌شوند. رنگ ماکروسکوپی این سویه‌ها قهوه‌ایی و به صورت لایه ضخیم و پارچه‌مانندی روی محیط کشت را می‌پوشانند. در ابعاد میکروسکوپی هتروسیست‌ها سبز مایل به زرد (a-0) و فیلامنت‌ها قهوه‌ایی هستند (شکل c-0). غلاف‌ها همیشه حضور داشته و گاهی اوقات از تریکوم‌ها بیرون زده و زائده دم‌مانندی تشکیل می‌دادند (شکل c-0).

نتایج آنالیز مولکولی و فیلوژنی جنس کلوتریکس: نتایج بلاست ژن *16S rRNA* دو نمونه SA47 و SA49 نشان داد که

با وجود شباهت ویژگی‌های مورفولوژی نمونه‌های یادشده با جنس نوستوک، اما همان‌طور که در درخت فیلوژنی مشخص است (شکل ۴)، نمونه‌های SA25، SA5 و SA14 در گروه دسمونوستوک و جدا از جنس نوستوک قرار گرفته‌اند. نمونه‌ی SA49 با کمی فاصله خارج از کلاد نوستوک و همچنین دسمونوستوک قرار دارد و از این رو بایستی بررسی بیشتری بر روی آن انجام شود.

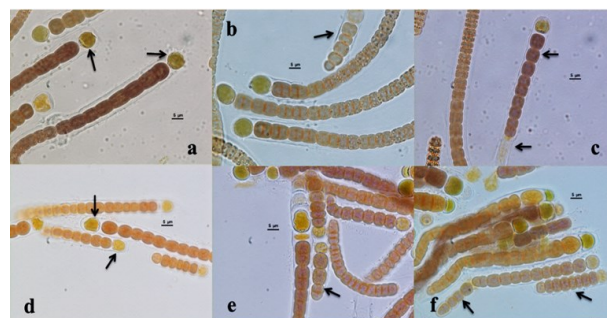
نتایج مطالعات مورفولوژیک جنس کلوتریکس: اسلایدهای میکروسکوپی نشان دادند که نمونه‌های SA47 و SA49 هر دو با ویژگی‌های مورفولوژیکی خاص و مشابه، نزدیک به جنس کلوتریکس هستند. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌گردد،

مشخص است این جنس سه گروه مجزا تشکیل داده است که نشان دهنده پلی‌فیلیتیک بودن این جنس است. احتمالاً در سال‌های پیش رو جنس‌های متعددی از کلوتریکس جدا شده و به عنوان جنس جدید معرفی خواهند شد.

و) آنالیز فیلوژنی سویه‌های معرفی شده به کمک ژن کارکردی *rpoC1* از میان ژن‌های کارکردی بررسی شده، ژن *rpoC1* علاوه بر اینکه در تمامی سویه‌ها تکثیر و توالی‌یابی شد، نتایج آنالیز فیلوژنی آن نیز نتایج مورفولوژیکی نمونه‌ها و همچنین نتایج فیلوژنی ژن *16S rRNA* را تایید کرد (شکل ۷).

همانطور که در شکل زیر مشخص است نمونه‌های SA5، SA14 و SA25 بیشترین نزدیکی را به جنس *Nostoc entophyllum* نشان دادند، شایان یادآوری است که این جنس در مطالعات بعدی در دسته جنس *Desmonostoc* قرار گرفته است. نمونه SA49 نیز با وجودی که ویژگی‌های مورفولوژیک مشابه با *Desmonostoc* دارد همان گونه که در درخت رسم شده با ژن *16S rRNA* نیز مشخص است (شکل ۴)، در خارج از دسته *Nostoc* و *Desmonostoc* قرار گرفته است و بنابراین نیاز به تحقیقات و بررسی‌های دقیق‌تری خواهد داشت.

نمونه‌های SA4 و SA47 نیز بیشترین نزدیکی را با جنس کلوتریکس نشان داده اند و بنابراین نتایج مورفولوژی و فیلوژنی پیشین را تایید می‌کنند.



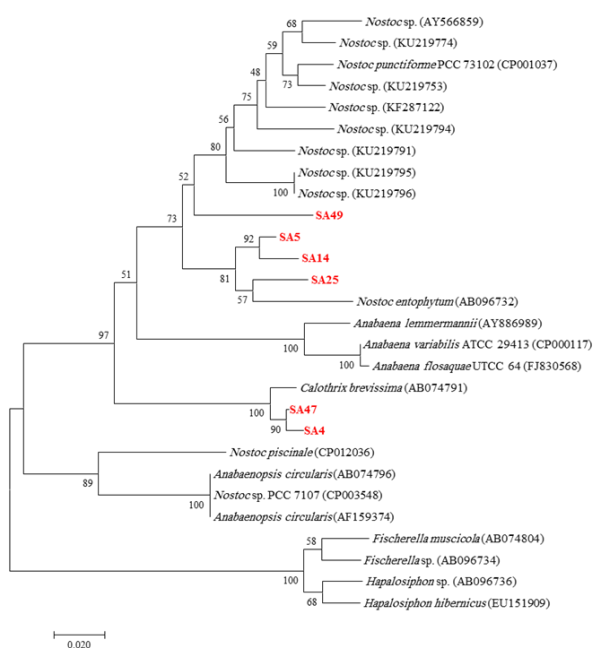
شکل ۵: مشخصات مورفولوژیکی نمونه‌های SA4 و SA47 مربوط به جنس کلوتریکس. (a) هتروسیست‌ها در ابتدای فیلامنت، کروی و سبز رنگ در سویه SA4 (b) هورموگونیا در سویه SA4 (c) غلاف ژلاتینی اطراف تریکوم قهوه‌ای رنگ و ادامه‌ی غلاف که مانند دم شده است در سویه SA4 (d) هتروسیست در سویه SA47 (e, f) هورموگونیا در سویه SA47.

این سویه‌ها بیشترین تشابه را به ترتیب با جنس‌های *Desmonostoc* و *Anabaena* با ۹۵/۱۲٪ و ۹۵/۳۷٪ میزان تشابه داشتند. اگرچه این جنس‌ها از لحاظ مورفولوژیکی از هم خیلی فاصله دارند ولی ممکن است در درخت تبارزایی به دلیل شناسایی‌های اشتباه پیشین، در کنار هم قرار بگیرند. در دو نمونه SA4 و SA47 ژن *ropC1* به ترتیب ۸۹/۲٪ و ۸۹/۲۶٪ با *Roholtiella mojaviensis* و ژن *rbcl* به ترتیب ۹۱/۴۴٪ و ۹۱/۲۲٪ با *Nostoc punctiforme* تشابه نشان دادند (جدول ۸).

جنس کلوتریکس هم از جمله جنس‌هایی هستند که نیاز به بازبینی دارد همان طور که در درخت فیلوژنی (شکل ۶)

جدول ۸: مشخصات ژن‌های ایزوله شده از نمونه‌های سیانوباکتری جنس کلوتریکس.

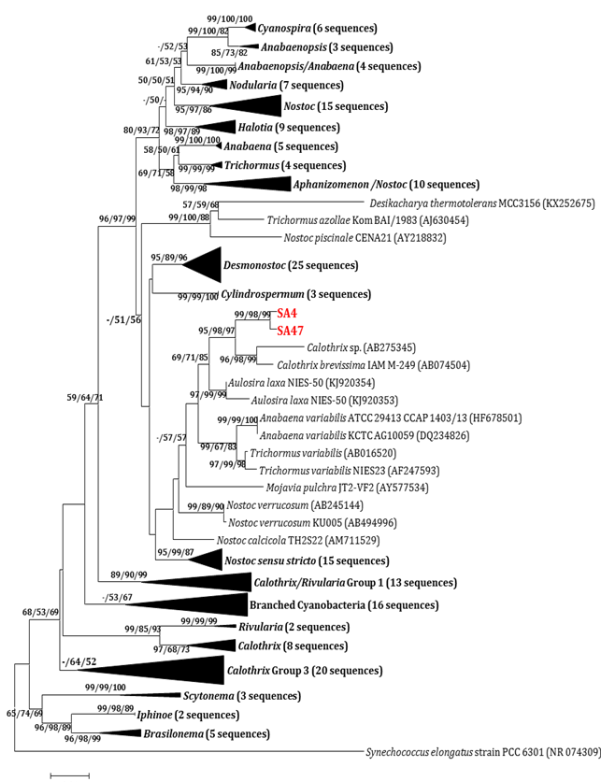
کد سویه	نام ژن	کد دسترسی	طول قطعه (bp)	میزان هم پوشانی (%)	میزان شباهت (%)	نزدیک ترین سویه در پایگاه داده NCBI
SA4	<i>16SrRNA-ITS</i>	MK956202	۱۴۱۴	۱۰۰	۹۵/۱۲	<i>Desmonostoc danxiaense</i> MH291267.1
	<i>rpoC1</i>	MK995232	۶۲۴	۱۰۰	۸۹/۲۶	<i>Roholtiella mojaviensis</i> KY423331.1
	<i>rbcl</i>	MK967405	۷۱۲	۱۰۰	۹۱/۴۴	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 CP001037.1
SA47	<i>Tufa</i>	MK995244	۵۶۱	۱۰۰	۹۲/۲۷	<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122 CP003659.1
	<i>16SrRNA-ITS</i>	MK956208	۱۴۱۰	۹۹	۹۵/۳۷	<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122 NR_102457.1
	<i>PsbA</i>	MK995230	۷۷۹	۱۰۰	۹۱/۲۷	<i>Aliinostoc morphoplasticum</i> KY401609.1
	<i>rpoC1</i>	MK995242	۶۱۱	۱۰۰	۸۹/۲	<i>Roholtiella mojaviensis</i> KY423331.1
	<i>rbcl</i>	MK967417	۶۹۴	۱۰۰	۹۱/۲۲	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102, CP001037.1



شکل ۷: درخت فیلوژنی ژن *rpoCI* به روش NJ مربوط به تمامی نمونه‌های مورد بررسی. مقادیر bootstrap بر اساس ۱۰۰۰ رونوشت می‌باشد.

شکل ۶: درخت فیلوژنی نمونه‌های SA47 و SA4. مقادیر bootstrap بر اساس ۱۰۰۰ رونوشت و به ترتیب از چپ به راست NJ، ML و MP هستند. بوت استرپ‌های بالاتر از ۵۰٪ در شکل نشان داده شده‌اند. سیانوباکتری سینه کورکوکوس/لانگاتس به عنوان گروه خارجی (outgroup) در نظر گرفته شده است.

رویکرد پلی‌فازیک معرفی شد. اگرچه بسیاری از مشخصات مورفولوژیک این جنس مشابه با نوستوک است، اما وجود ویژگی‌های شاخصی چون فیلامنت‌های بلند، اکینت‌های زنجیروار و نبود لایه‌های موسیلاژی ضخیم و تریکوم‌های فشرده به هم پیچ خورده، شناسایی مورفولوژیکی این جنس را آسان‌تر می‌کند. همچنین با پیدایش روش‌های نوین شناسایی و اضافه شدن سایر پارامترها در امر شناسایی مانند روش‌های مولکولی و در نظر گرفتن ویژگی‌های اکولوژیک، تفاوت‌های بیشتری میان گونه‌های جنس نوستوک مشخص شده است که در نهایت منجر به تفکیک این جنس به جنس‌های مختلف اما با ویژگی‌های مشابه بیشتری شد. علاوه بر این، جنس دسمونوستوک در درخت تبارزایی نیز خارج از کلاد جنس نوستوک قرار می‌گیرد (۲۳). جنس کلوتریکس نیز اولین بار در سال ۱۸۸۶ معرفی شد. این جنس عمدتاً شامل گونه‌های اپیفیتیک (محل زندگی: پوسته‌ی درختان و درختچه‌های در حال رشد) و اپیلتیک (محل زندگی: صخره‌ها) است به طوری که حدود ۶۰ گونه از این دست شناسایی شده‌اند و گونه‌های محدودی نیز در مناطق ساحلی گزارش شده‌اند (۲۴).



شکل ۶: درخت فیلوژنی نمونه‌های SA47 و SA4. مقادیر bootstrap بر اساس ۱۰۰۰ رونوشت و به ترتیب از چپ به راست NJ، ML و MP هستند. بوت استرپ‌های بالاتر از ۵۰٪ در شکل نشان داده شده‌اند. سیانوباکتری سینه کورکوکوس/لانگاتس به عنوان گروه خارجی (outgroup) در نظر گرفته شده است.

بحث

تنوع زیستی موضوعی است که از دهه ۱۹۹۰ مورد توجه محققین قرار گرفته است، این مطالعات با اهداف متفاوتی چون بررسی تنوع ژنتیکی، شناسایی گونه‌ها و یا اکوسیستم صورت گرفته است. بر طبق اطلاعات موجود در پایگاه داده CyanoDB تا سال ۲۰۱۳ تعداد ۲۶۹۸ گونه سیانوباکتری از مجموع ۳۲۳ جنس معرفی شده است و تخمین زده می‌شود این گروه از میکروارگانیسم‌ها حدود ۶۲۸۰ گونه داشته باشند (۲۲). مطالعات گسترده‌ی مورفولوژیکی نشان داد که جنس نوستوک جنسی پلی‌فلیتیک است (۸) و نیاز به اصلاحات تاکسونومیک دارد. در سال‌های اخیر جنس‌های مختلفی از جنس نوستوک تفکیک شده‌اند. دسمونوستوک موسکوروم (*D. muscorum*) که در مطالعات قبلی با نام نوستوک موسکوروم (*N. muscorum*) گزارش شده بود، به دلیل مطالعات و بازبینی‌های متعدد با

یک ارگانسیم با یک ژن کار ساده‌ایی نیست. در واقع با وجود اینکه شناسایی با یک ژن سرعت بالایی دارد ولیکن قدرت کافی در نشان دادن تفاوت‌ها ندارد. از این رو امروزه برای شناسایی دقیق‌تر، از توالی‌های متعدد به صورت هم زمان استفاده می‌شود که به رویکرد چندژنی معروف است (۴). در دو دهه‌ی اخیر گزارش‌های متعددی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های *rbcL* *rpoD1* *rpoC1*، *gyrB* پروتئین مانند *psba* و *tufA* را در کنار *16S rRNA* در راستای این رویکرد و برای شناسایی دقیق‌تر سیانوباکترها به کار برده‌اند (۲۱).

ژن *rpoC1* در مقالات متعدد به عنوان مارکر مناسب‌تری نسبت به ژن *16S rRNA* در تفکیک جنس و گونه‌ها معرفی شده است. چرا که نواحی متفاوت در میان گونه‌های نزدیک بهم در ژن *rpoC1* بسیار بیشتر از ژن *16S rRNA* می‌باشد. با این وجود توالی ژن‌های کارکردی اگرچه می‌توانند به شناسایی دقیق‌تر کمک نمایند، اما به دلیل غنی نبودن پایگاه‌های داده در مورد این ژن‌ها، نتایج بدست آمده اغلب چندان دقیق نیستند و از نمونه‌ی مورد بررسی فاصله‌ی زیادی دارد. در این تحقیق از ژن‌های کارکردی *rbcL* *tufA* *rpoC1* و *psba* به منظور شناسایی دقیق‌تر نمونه‌ها استفاده شد. از این میان دو ژن *rbcL* و *rpoC1* در تمامی نمونه‌ها تکثیر و توالی‌یابی شدند و برای رسم درخت استفاده شدند. اما ژن *rpoC1* دقت بالاتری در تفکیک نمونه‌ها نشان داد. به طوری که نتایج فیلوژنی ژن *16S rRNA* را کاملاً تکمیل و تایید کرد. ژن *rpoC1* کدکننده زیر واحد گاما (۷) از آنزیم RNA پلیمراز است. زیر واحد گاما از دو بخش تشکیل شده است که بواسطه‌ی ژن‌های *rpoC1* و *rpoC2* کد می‌شود. تلدو و پالینیک (Toledo & Palenik) در سال ۱۹۹۷ ژن *rpoC1* را به عنوان ابزار مفیدی به منظور کمک به ژن *16S rRNA* در راستای شفافیت بیشتر در ارتباطات فیلوژنیک عنوان کردند. نتایج تحقیق حاضر نیز قدرت ژن *rpoC1* در تفکیک درست جنس‌ها را نشان می‌دهد و نتایج مورفولوژی و فیلوژنی ژن *16S rRNA* را تایید می‌کند.

مطالعه فیلوژنتیکی با استفاده از این مارکر به شفاف‌سازی ارتباطات فیلوژنتیکی میان سیانوباکتری‌ها و ساختار و تفاوت

مناطق نمونه‌برداری شده در این تحقیق همگی شالیزارهای استان مازندران بوده‌اند که در فصل کشت غرقاب می‌شوند. این مناطق با رطوبت بالا شرایط مساعدی برای رشد سیانوباکتری‌ها فراهم می‌کنند، همچنین این میکروارگانسیم‌ها با تثبیت نیتروژن به رشد گیاه برنج یاری می‌رسانند. طبق نتایج بدست آمده نمونه‌های سیانوباکتری در این مطالعه به خوبی در محیط کشت BG-11₀ رشد کرده و سلول‌های تمایز یافته هتروسپیست در فقدان نیتروژن کاملاً ظاهر شدند و مراحل شناسایی مورفولوژیک را تسهیل کردند. آلودگی سیانوباکتری‌ها به

سیانوباکتری و باکتری به کمک رقیق سازی سریالی کاملاً حذف گشته و آلودگی قارچی نیز به کمک افزودن ۲۰ mg/L از قارچ کش سیستمیک بنومیل به محیط جامد کنترل گردید، اگرچه در مطالعات مختلف جهت کنترل آلودگی قارچی از ترکیبات دیگری مانند سیکلوهاگزامید هم استفاده می‌شود (۲۵). باوجود این که شکل فیلامنت، موقعیت و شکل هتروسپیست‌ها، حضور و نبود اکینت و همچنین لایه‌ی موسیلاژی اطراف تریکوم‌ها از نشانه‌های آشکار و مهمی در شناسایی مورفولوژی سیانوباکتری‌ها است، اما نتایج مورفولوژیک بدست آمده می‌بایست با نتایج مولکولی و فیلوژنتیکی تکمیل شود. چرا که مورفولوژی سیانوباکتری‌ها در تاثیر شرایط محیطی است و ممکن است در محیط کشت‌های مختلف ظاهری متفاوتی داشته باشد (۲۶). در مطالعه حاضر، پس از شناسایی مورفولوژی، توالی ژن *16S rRNA* به کمک ۵ پرایمر داخلی توالی‌یابی شد که نتیجه آن خوانش کامل‌تر و دقیق‌تر توالی‌ها و در نتیجه صحت بالای شناسایی نمونه‌های سیانوباکتری بوده است. ژن‌هایی که به عنوان مارکرهای مولکولی در آنالیز فیلوژنی به کار می‌روند می‌بایست عمومی باشند، به صورت افقی انتقال پیدا نکنند و همچنین فاقد موتاسیون در مناطق خاصی باشند. اگرچه توالی نوکلئوتیدی زیر واحد کوچک rRNA (*16S rRNA*) بیشترین کاربرد را در شناسایی پروکاریوت‌ها دارد و ابزار قدرتمندی در آنالیز فیلوژنتیکی است ولیکن به دلیل سرعت آهسته در تکامل و انتقال افقی آن، اغلب برای شناسایی در سطح گونه مناسب نیستند و علاوه بر این، انعکاس تکامل

نمونه تنها با کمک ویژگی‌های مورفولوژیک شناسایی شده‌اند که همگی مربوط به چهار جنس مطرح نوستوک، کلوتریکس، سیلیندروسپرم و *آنابنا* بوده‌اند (۳۲) و همچنین در مطالعه‌ای که بر روی سیانوباکتری‌های تثبیت کننده ازت در مزارع برنج کشور هند صورت گرفت ۲۲ گونه از ۷ جنس شناسایی شدند. در این میان *آنابنا* با ۱۲ گونه بیشترین سهم را در میان جنس‌ها دارا بود و *آنابنوپسیس* (*Anabaenopsis*) و *الوسیرا* (*Aulosira*) هر کدام ۳ گونه، سیلیندروسپرم ۴ گونه، نوستوک ۸ گونه و در نهایت *آفانیزومنون* (*Aphanizomenon*) و *نودولاریا* (*Nodularia*) هر کدام ۱ گونه داشتند (۳۳).

سیانوباکتری‌های هتروسیست‌دار به دلیل تثبیت کربن بر اساس فرایندهای فتوسنتزی و تثبیت نیتروژن، یکی از مهمترین تامین کننده‌های منابع آلی خاک و حاصلخیزی آن به شمار می‌آیند و در نهایت موجب افزایش محصولات می‌شوند (۳۴). علاوه بر این سیانوباکتری‌ها، قادرند با اتصال به ذرات خاک، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک زراعی را نیز بهبود بخشند و شدت فرسایش خاک را کاهش دهند و همچنین موجب بهبود هدایت هیدرولیکی و افزایش قابلیت نفوذ خاک شوند. از دیگر فواید حضور سیانوباکتری‌ها در خاک می‌توان به ترشح هورمون‌های تنظیم کننده رشد گیاهی اشاره نمود (۳۵). اکسین متداول‌ترین فیتوهورمون ترشح شده بواسطه‌ی سیانوباکتری‌ها می‌باشد که تولید آن در جنس‌های گوناگون سیانوباکتری‌ها از جمله نوستوک و کلوتریکس گزارش شده است (۳۶). بنابراین حضور سیانوباکتری‌ها در مزارع، ضمن افزایش عملکرد محصول و بهبود شرایط خاک، از ضررهای ناشی از کودهای شیمیایی نیز می‌کاهد (۳۷).

نتیجه گیری

نتایج نشان داد مطالعات فیلوژنتیکی سیانوباکتری‌ها با استفاده مارکر ژنی *rpoCl* به شفاف‌سازی ارتباطات فیلوژنتیکی میان آنها و ساختار و تفاوت درون گونه‌ای جمعیت‌های سیانوباکتری کمک می‌کند و علاوه بر آن شاهدی بر منشا کلروپلاستی سیانوباکتری‌ها و حضور مسیرهای تکاملی متفاوت

درون گونه‌ای جمعیت‌های سیانوباکتری کمک می‌کند و علاوه بر آن شاهدی بر منشا کلروپلاستی سیانوباکتری‌ها و حضور مسیرهای تکاملی متفاوت میان باکتری‌ها می‌باشد (۲۷).

مطالعات نشان می‌دهد پراکندگی سیانوباکتری‌ها در اکوسیستم‌های مختلف متفاوت است، بر اساس برخی گزارشات این پراکندگی به فاکتورهایی چون ضریب هدایت الکتریکی، سدیم قابل تبادل و از همه مهم‌تر pH خاک بستگی دارد (۱۱). برخی محققین نیز گزارش کرده‌اند که عوامل فیزیکوشیمیایی مانند pH، هدایت الکتریکی، محتوی نیتروژن، فسفر و کربن آلی تأثیری بر تنوع و پراکندگی سیانوباکتری‌ها در مزارع برنج ندارد. بطور کلی pH بهینه برای رشد سیانوباکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی ۷/۵-۱۰ می‌باشد اگرچه توانایی بالا در تحمل گسترده‌ی بزرگی از pH موجب گردیده قادر به زندگی در مناطق وسیع اکولوژیکی شوند، ولیکن تمایل آنها به زندگی در شرایط قلیایی بیشتر و بالاتر از محیط‌های اسیدی است (۲۸). pH خاک‌های نمونه برداری شده نزدیک به قلیایی و در بازه ۷/۴۵-۸/۶ گزارش شده است. در این مطالعه بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و نتایج مولکولی و فیلوژنی، ۴ نمونه از جنس *دسمونوستوک* و ۲ نمونه از جنس *کلوتریکس* معرفی شدند. جنس *دسمونوستوک* از خانواده *نوستوکاسه* می‌باشد بنابراین این خانواده، خانواده‌ی غالب در این بررسی را تشکیل می‌دهد و خانواده‌ی *ریبولاریاسه* با دو نمونه از یک جنس سهم کم‌تری در این مطالعه داشته است. طبق گزارش‌های پیشین نیز *نوستوکاسه* خانواده غالب در مطالعات بر روی سیانوباکتری‌های مزارع برنج می‌باشد (۲۸ و ۲۹).

جنس *کلوتریکس* نیز از جنس‌های مهم مزارع برنج است چرا که نقش مهمی در تثبیت ازت دارد (۳۰). بررسی‌ها نشان می‌دهد این جنس ۶/۳۰-۶/۸ کیلوگرم نیتروژن در هر هکتار در سال تثبیت می‌کند. این جنس در گزارش‌های متعددی به عنوان سویه تثبیت کننده مزارع برنج معرفی شده است (۳۰ و ۳۱). بنابراین تنوع و گستردگی سیانوباکتری‌ها با توجه به شرایط و ویژگی‌های مناطق مختلف، متفاوت می‌باشد برای مثال در بررسی سیانوباکتری‌های هتروسیست‌دار کلات نادری حدود ۳۰

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مرکز ملی منابع میکروبی (National Center for Microbial Resources) واقع در شهر پونا، کشور هند و همچنین پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، به دلیل همراهی و فراهم آوردن امکانات لازم این پژوهش، کمال امتنان را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

میان باکتری‌ها می‌باشد. نتایج این تحقیق نیز قدرت ژن *rpoC1* در تفکیک درست جنس‌ها و تایید نتایج مورفولوژی و فیلوژنی ژن *16S rRNA* در سیانوباکتری‌های تثبیت کننده ازت را نشان می‌دهد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

References

1. Komarek J. Modern classification of cyanobacteria. In: Sharma NK, Rai AK, Sta LJ editors. Cyanobacteria: An Economic Perspective. 1st ed. UK. John Wiley & Sons press; 2014: 21-39.
2. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J Gen Microbiol. 1979; 111(1): 1-61.
3. Johansen JR, Casamatta DA. Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm. Algol Stud. 2005; 117(1): 71-93.
4. Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kämpfer P, Maiden MC, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52(3): 1043-1047.
5. Jungblut AD, Lovejoy C, Vincent WF. Global distribution of cyanobacterial ecotypes in the cold biosphere. The ISME J. 2010; 4(2): 191-202.
6. Kastovsky J, Johansen JR. *Mastigocladus laminosus* (Stigonematales, Cyanobacteria): Phylogenetic relationship to the soil-inhabiting genera of the order and taxonomic implications for the genus. Phycologia. 2008; 47(3): 307-320.
7. Bagchi SN, Dubey N, Singh P. Phylogenetically distant clade of *Nostoc*-like taxa with the description of *Aliinostoc* gen. nov. and *Aliinostoc morphoplasticum* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2017; 67(9): 3329-3338.
8. Hrouzek P, Lukesova A, Mares J, Ventura S. Description of the cyanobacterial genus *Desmonostoc* gen. nov. including *D. muscorum* comb. nov. as a distinct, phylogenetically coherent taxon related to the genus *Nostoc*. Fottea, Olomouc. 2013; 13(2): 201-213.

9. Genuario DB, Vaz MGMV, Hentschke GS, Santanna CL, Fiore MF. *Halotia* gen. nov., a phylogenetically and physiologically coherent cyanobacterial genus isolated from marine coastal environments. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015; 65(2): 663-675.
10. Esther B, Elvira P, Pilar M. Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008; 58(2): 447-460.
11. Shams A. 2017. Collection and Molecular identification of Cyanobacteria from eastern part of Mazandaran Province through *16SrRNA* and analysis of some secondary metabolites. Ph.D. Sari Agricultural and Natural Resources University. [In Persian]
12. Koliai AA. 2017. Collection and Molecular identification of Cyanobacteria from western part of Mazandaran Province through *16SrRNA* and analysis of some secondary metabolites. Ph.D. Sari Agricultural and Natural Resources University. [In Persian]
13. Allen MM, Stanier RY. Growth and division of some unicellular blue-green algae. *J Gen Microbiol*. 1968; 51: 199-202.
14. Desikachary TV. Cyanophyta. New Delhi. Indian Council of Agricultural Research; 1959.
15. Komarek J, Sant-Anna CL, Bohunicka M, Mares J, Hentschke GS, Rigonato J, Fiore MF. Phenotype diversity and phylogeny of selected *Scytonema*-species (Cyanoprokaryota) from SE Brazil. *Fottea*. 2013; 13(2): 173-200.
16. Edwards U, Rogall T, Blockerl H, Emde M, Bottger E. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*. 1989; 17(19): 7843-7853.
17. Lepere C, Wilmotte A, Meyer B. Molecular diversity of *Microcystis* strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on *16SrRNA* sequences. *Syst Geogr Plants*. 2000; 70(2): 275-283.
18. Fewer DP, Rouhiainen L, Jokela J, Wahlsten M, Laakso K, Wang H, Sivonen K. Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. *BMC Evol Biol*. 2007; 7: 183-194.
19. Głowacka J, Szeffel-Markowska Z, Waleron M, Łojkowska E, Waleron K. Detection and identification of potentially toxic cyanobacteria in Polish water bodies. *Acta Biochim Pol*. 2011; 58(3): 321-333.
20. Tiwari B, Singh S, Chakraborty S, Verma E, Mishra AK. Sequential role of biosorption and biodegradation in rapid removal degradation and utilization of methyl parathion as a phosphate source by a new cyanobacterial isolate *Scytonema* sp. BHUS-5. *Int J Phytoremediation*. 2017;

19(10): 884-893.

21. Singh P, Singh SS, Aboal M, Mishra AK. Decoding cyanobacterial phylogeny and molecular evolution using an evonumeric approach. *Protoplasma*. 2015; 252(2): 519-535.
22. Nabout JC, Rocha BS, Carneiro FM, Sant'Anna. CL. How many species of Cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number. *Biodivers Conserv*. 2013; 22(12): 2907-2918.
23. Cai F, Yang Y, Wen Q, Li R. *Desmonostoc danxiaense* sp. nov. (Nostocales, Cyanobacteria) from Danxia mountain in China based on polyphasic approach. *Phytotaxa*. 2018; 367 (3): 233-244.
24. Komarek J, Johanes J. Filamentous cyanobacteria. In: Wehr J, Sheath R, Kociolek JP. *Freshwater Algae of North water*. 1st ed. USA. Academic Press. 2015; 135-235.
25. Noroozi M, Amozegar MA, Rahimi R, Shahzadeh Fazeli SA, Bakhshi Khaniki GH. The isolation and preliminary characterization of native cyanobacterial and microalgal strains from lagoons contaminated with petroleum oil in Khark Island. *Biological J Microorganism*. 2017; 5(20): 33-41.
26. Deilami E, Negadsattari T, Ghasemi Y, Shokravi S. The analysis of morphological acclimation of cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. Isc25 to monochromatic red, green and blue light rays. *J Microb World*. 2014; 7(2): 170-179. [In Persian]
27. Toledo G, Palenik B. *Synechococcus* diversity in the California current as seen by RNA polymerase (*rpoC1*) gene sequences of isolated strains. *Appl Environ Microbiol*. 1997; 63(11): 4298-4303.
28. Shariatmadari Z, Riahi H, Seyed Hashtroudi M, Ghassempour AR, Aghashariatmadary Z. Plant growth promoting cyanobacteria and their distribution in terrestrial habitats of Iran. *J Soil Sci Plant Nutr*. 2013; 59(4): 535-547.
29. Siahbalei R, Afsharzade S, Shokravi S. New records of nostoclean cyanobacteria from rice fields in the Golestan Province in North-East of Iran. *PBioSci*. 2011; 1(2): 50-55.
30. Gupta K, Baruah PP. Isolation, identification and characterization of rice field *Calothrix* spp. of Assam. *J Algal Biomass Utln*. 2017; 8(4): 77-81.
31. Thajamanbi M, Rout J, Thajuddin N. Isolation and characterization of two cyanobacterial strains *Calothrix* sp. and *Microchaete* sp. from rice fields of Karimganj District, Assam, North East India. *Curr World Environ*. 2016; 11(2): 399-405.
32. Aslani E, Riahi H, Shariatmadari Z, Bazzi F. The study of heterocystous cyanobacteria from

- paddy fields in Kalat Naderi district in North-East of Iran. *Iran J Bot.* 2014; 20(2): 257-264.
33. Choudhary K, Bimal R. Distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria (Nostocaceae) during rice cultivation in fertilized and unfertilized paddy fields. *Nord J Bot.* 2010; 28(1): 100-103.
34. Adel-Raouf N, Al-Homaidan A, Ibraheem IBM. Agricultural importance of algae. *Afr J Biotechnol.* 2012; 11(54): 11648-11658.
35. Imani B, Shokravi S. 2014. Investigating the behavior of cyanobacterium *Anabaena* sp. FS76 in a culture medium outside the lab as a candidate for use in agricultural biotechnology in Golestan province. First new findings in environment and agricultural ecosystems congress. 22nd of Nov. Tehran. [In Persian]
36. Yadav S, Sinha RP, Tyagi MB, Kumar A. Cyanobacterial secondary metabolites. *Int J Pharma Bio Sci.* 2011; 2(2): 144-167.
37. Amirlatifi H, Shokravi S. Investigation of ecological responses of *Anabaena* sp. Fs76 collected from rice fields of Golestan province dissolved carbon dioxide concentration and pH in extreme intensity of light. *Plant science research.* 2014; 10(37): 62-71. [In Persian]



Identification of some heterocystous cyanobacteria isolated from rice fields of Mazandaran province with emphasis on multi-genic approach

Sara Kabirnataj¹, Ghorban Ali Nematzadeh², Ahmad Farhad Talebi³, Meisam Tabatabai⁴, Prashant Singh⁵

¹PhD candidate, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. ²Professor, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. ³Assistant Professor, Faculty of Biotechnology, Semnan University, Semnan, Iran.

⁴Assistant Professor, Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran.

⁵Assistant Professor, Department of Botany, Institute of Science, Banaras Hindu University, Varanasi, India.

Abstract

Background & Objectives: In the past, the classification of cyanobacteria was only based on the morphological characteristics; however other markers such as accurate molecular methods have been recently used. This study aimed to identify several heterocystous cyanobacteria by polyphasic taxonomy and to investigate the multigenic approach in enhancing the accuracy of cyanobacterial identification.

Materials & Methods: After analyzing the morphological features and initial identification, the *16SrRNA* gene along with *tufA*, *rbcL*, *psbA*, and *rpoCI* functional genes were used to evaluate the taxonomic status and phylogenetic relationships. For this purpose, after DNA extraction, amplification and sequencing of gene fragments, the exact position of the strains was determined by making phylogenetic trees, based on the corresponding genes using MEGA software.

Results: Among the functional genes studied, the *rpoCI* gene was able to discriminate genera very well, a result that completely confirmed *16SrRNA* phylogenetic results. Finally based on the results, 4 samples from the *Desmonostoc* genus and 2 samples from the *Calothrix* genus were introduced.

Conclusion: The results of this study demonstrate the ability of the *rpoCI* gene to discriminate genera correctly and confirm the morphological and phylogenetic results of *16SrRNA* gene analysis. A phylogenetic study using the *rpoCI* gene marker helps to clarify phylogenetic relationships among cyanobacteria. Moreover, it provides further evidence of their chloroplast origin and the presence of different evolutionary pathways among them.

Keywords: Cyanobacteria, Heterocyst, *rpoCI* gene, Taxonomy, Multi-genic.

Correspondence to: Ahmad Farhad Talebi

Tel: +98 2331533506

E-mail: aftalebi@semnan.ac.ir

Journal of Microbial World 2019, 12(3): 213-228.



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.