تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال چهارم، شماره دهم، بهار ۱۳۹۱، صفحه ۱-۱۰
دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۸/۰۸ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۱۲/۰۳

شناسایی گونه‌های جدیدی از دی‌ازوتروف‌های اندوفیت همیار برنج و گندم با استفاده از آنالیز ژن 16S rDNA و FTIR

محمدجواد مهدی‌پور مقدم [1*]، گیتی امتیازی [2]، مجید بوذری [2] و زیور صالحی [1]
[1] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
[2] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

در این مطالعه شش جدایه اندوفیت، شامل سه جدایه از ریشه سه رقم برنج (جدایه‌های PxR_1، PxR_2 و StR_1) و سه جدایه از ریشه سه رقم گندم (جدایه‌های PxW_1، PxW_2 و PxW_3) جداسازی و با استفاده از آزمایش فنوتیپی، شامل طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) و همچنین، آنالیز ژنوتیپی نظیر PCR ژن 16S rDNA، تمام جدایه‌ها به غیر از جدایه *Pseudoxanthomonas* StR_1 شناسایی شدند. مقایسه روش‌های یاد شده نشان داد که دو جدایه برنج (PxR_1 و PxR_2) و همچنین دو جدایه گندم (PxW_1 و PxW_2) به یکدیگر شبیه و جزو یک گونه و آن هم گونه جدیدی از *Pseudoxanthomonas* محسوب می‌شوند، در حالی که به نظر می‌رسد جدایه PxW_3 جزو گونه‌ای دیگر از این جنس باشد. جدایه StR_1 نیز گونه جدیدی از *Stenotrophomonas* است. در ابتدا تصور بر این بود که جدایه‌های مزبور جزو جنس *Azospirillum* هستند، لذا دو سویه Sp7 *Azospirillum Brasilense* (S_1) و *Azospirillum lipoferum* (S_2) به عنوان سویه‌های استاندارد انتخاب و با جدایه‌های مورد مطالعه مقایسه شدند، اما آنالیزهای فنوتیپی و ژنوتیپی تأیید کرد که این باکتری‌ها *Azospirillum* نیستند. برای نخستین بار در این مطالعه نشان داده شد که *Pseudoxanthomonas* به صورت اندوفیت در ریشه برنج وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، برنج، گندم، *Azospirillum*، *Pseudoxanthomonas*، *Stenotrophomonas*

مقدمه

دو جنس *Pseudoxanthomonas* و *Stenotrophomonas* به خانواده Xanthomonadaceae تعلق دارند. اعضای جنس *Pseudoxanthomonas*، شامل باسیل‌های هوازی، گرم منفی، غیراسپوردار بوده، از لحاظ رده‌بندی بر اساس خصوصیات شیمیایی، دارای اسیدهای چرب غیراشباع و شاخه‌دار از نوع ایزو/آنتی و نیز اسیدهای چرب 3-OH هستند و همچنین، دارای یوبی‌کوئینون با ۸ واحد ایزوپرن (Q-8) هستند. اطلاعات اندکی در ارتباط با این جنس وجود دارد و تا سال ۲۰۱۱

* mj_mehdipour@guilan.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

اکثر مطالعات مربوط به گونه‌های این جنس در حیطه بررسی خصوصیات فنوتیپی و رده‌بندی بر اساس خصوصیات شیمیایی و همچنین فیلوژنتیکی (بر اساس آنالیز توالی 16S rRNA) است (Young *et al.*, 2007).

جنس *Stenotrophomonas* نیز نخستین بار همراه با *Pseudoxanthomonas maltophiila* در سال ۱۹۶۱ معرفی شده است. در مطالعه اخیر تمام *Pseudomonas*ها به ۵ گروه از لحاظ تشابه rRNA بر اساس هیبریداسیون DNA یا rRNA تقسیم‌بندی شده‌اند. تاکنون ۸ گونه *Stenotrophomonas* شناسایی شده است (Hayward *et al.*, 2009). این باکتری‌ها گرم‌منفی، میله‌ای‌شکل، با مقدار G+C بالا در DNA هستند. یوبی کوئینون‌ها با ۸ واحد ایزوپرنی در تمام گونه‌های این جنس وجود دارد (Hayward *et al.*, 2009).

باکتری‌های جنس *Azospirillum* نیز متعلق به خانواده Spirillaceae، زیرده آلفاپروتئوباکتری‌ها هستند. گونه‌های *Azospirillum*، باکتری‌های هتروتروف هوازی (حدود یک درصد از هتروتروف‌های هوازی خاک)، گرم‌منفی تا گرم‌متغیر، کوتاه، میله‌ای و کمی خمیده بوده که تحت شرایط میکروآئروفیلیک، ازت مولکولی را تثبیت می‌کنند. مطالعات فیلوژنتیک مولکولی 16S rDNA نشان داده است که تاکنون ۱۱ گونه از این جنس وجود دارد (Young *et al.*, 2008).

در طیف‌سنجی مادون قرمز، طول موج و شدت جذب نور مادون قرمز توسط نمونه اندازه‌گیری می‌شود. فرکانس تشعشع الکترومغناطیس در ناحیه مادون قرمز مطابق با فرکانس ارتعاش طبیعی اتم‌های یک پیوند است و پس از جذب امواج مادون قرمز در یک مولکول، باعث ایجاد یک سری حرکات ارتعاشی در آن می‌شود که اساس و مبنای طیف‌سنجی مادون قرمز را تشکیل می‌دهد. نخستین بار Naumann و همکاران (۱۹۹۴) از روش طیف‌سنجی مادون قرمز برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها استفاده نمودند. از این روش برای شناسایی بسیاری از باکتری‌ها در سطح جنس نظیر *Listeria* و *Staphylococcus* و همچنین، در سطح گونه برای باکتری‌هایی نظیر *Pseudomonas* و *Bacillus* و همچنین، برای شناسایی مخمرها و قارچ‌ها نیز استفاده شده است. همچنین، از این روش برای شناسایی باکتری‌ها در سطح سویه نیز استفاده شده است (Goodacre *et al.*, 1998; Kummerle *et al.*, 1998; Tindall *et al.*, 2000).

هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی باکتری‌های دی‌ازوتروف (باکتری‌های تثبیت‌کننده ازت) اندوفیت بومی از دو گیاه برنج و گندم و شناسایی آنها با استفاده از روش‌های فنوتیپی مثل طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه و روش‌های ژنوتیپی مثل PCR ژن 16S rDNA بوده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی اندوفیت‌های بومی از ریشه‌های برنج و گندم

نمونه‌های ریشه تازه از سه رقم گندم (گلستان، شیرازی و سفیدمحلی) و سه رقم برنج (طارم، خزر و هاشمی) در استان گیلان فراهم شدند. نمونه‌های ریشه (تارهای کشنده) به منظور جداکردن ذرات خاک متصل به سطح ریشه به مدت ۲۰ دقیقه با آب شیر شستشو شدند. ریشه‌های شسته شده با محلول

Archive of SID

www.SID.ir

هیپوکلریت‌سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه استریل سطحی شدند. ریشه‌ها حداقل ۳ بار با آب مقطر استریل آبکشی و سپس به قطعات ۵ تا ۸ میلی‌متری بریده شدند. قطعات پس از فشرده‌شدن با پنس استریل، به لوله‌های حاوی محیط نیمه‌جامد فاقد ازت انتقال و در درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار داده شدند. اجزای این محیط عبارتند از: مالیک اسید ۵ گرم، فسفات هیدروژن دی پتاسیم ۰/۵ گرم، سولفات منیزیم ۰/۲ گرم، کلرید سدیم ۰/۱ گرم، کلرید کلسیم ۰/۰۲ گرم، محلول عناصر کمیاب ۲ میلی‌لیتر، محلول الکلی بروموتیمول‌بلو ۲ میلی‌لیتر (۵ درصد)، اتیلن دی آمین تترا استات ۴ میلی‌لیتر، محلول ویتامین ۱ میلی‌لیتر، هیدروکسید پتاسیم ۴ گرم، آگار ۱/۷۵ گرم و آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر (محلول سود برای تنظیم اسیدیته تا ۶/۸). اجزای محلول عناصر کمیاب عبارتند از: مولیبدات سدیم ۰/۲ گرم، سولفات منگنز ۰/۲۳۵ گرم، بوریک اسید ۰/۲۸ گرم، سولفات مس ۰/۰۰۸ گرم، سولفات روی ۰/۰۲۴ گرم و آب مقطر ۲۰۰ میلی‌لیتر.

محلول ویتامین شامل: بیوتین ۰/۰۱ گرم، پیرودوکسین ۰/۰۲ گرم و آب مقطر ۱۰۰ میلی‌لیتر است. پس از گذشت ۳ تا ۵ روز که دیسک رشد (پلیکل) نزدیک به سطح محیط کشت تشکیل شد، این باکتری‌ها به محیط جامد NFb منتقل شدند. هنگامی که برخی باکتری‌های اندوفیت تثبیت‌کننده ازت در محیط نیمه‌جامد تکثیر شوند، یک دیسک رشدی تشکیل می‌گردد که با گذشت زمان ممکن است تا نزدیک سطح محیط مهاجرت نماید و در اصطلاح به آن « دیسک رشد » گفته می‌شود. پس از رشد در سطح محیط جامد NFb، باکتری‌ها دوباره به محیط نیمه‌جامد NFb منتقل شده، در صورت تشکیل مجدد دیسک رشد، این نتیجه حاصل می‌شود که باکتری‌های جداسازی شده تثبیت‌کننده ازت هستند (Martin-Didonet *et al*., 2000).

تکثیر ژن 16S rDNA با استفاده از PCR

پس از جداسازی باکتری‌ها، به منظور شناسایی و تأیید نهایی جدایه‌ها، روش PCR ژن 16S rDNA به کار گرفته شد. استخراج DNA در جدایه‌های *Pseudoxanthomonas*، *Stenotrophomonas* و *Azospirillum* به روش استات سدیم انجام شد. در این روش سلول باکتری با استفاده از بافر لیز کننده (شامل EDTA، لیزوزیم، SDS، پروتئیناز K) شکسته شده و پروتئین‌های آن تغییر ماهیت داده، سپس با استفاده از فنل و کلروفرم تمام اجزا به غیر از اسیدهای نوکلئیک رسوب داده می‌شود و در پایان، با استفاده از استات سدیم و اتانول، DNA موجود در محلول را رسوب می‌دهند (Maciel *et al*., 2009).

به منظور تکثیر ژن 16S rDNA با استفاده از PCR، از پرایمر رفت (نوکلئوتید ۳۷ تا ۶۴ از 16S rDNA *Azospirillum*) و پرایمر برگشت (نوکلئوتید ۴۰۷ تا ۴۳۶ از 16S rDNA *Azospirillum*) با توالی زیر استفاده شد:

PFAZO: 5'-AGA GGG GCC CGC GTC CGA TTA GGT AGT T-3'

PRAZO: 5'-CCC GAC AGT ATC AAA TGC AGT TCC CAG GTT-3'

طراحی پرایمرها برای منطقه 16S rDNA با استفاده از ژن بانک http://www.ncbi.nem.nih.gov انجام شد. طول محصول PCR ۴۰۰ جفت باز بود.

همچنین برای یکی از جدایه‌ها (StR_1) نیز از

Archive of SID

www.SID.ir

پرایمرهای عمومی 16S rDNA به نام‌های 27F و 1492R استفاده شد. طول محصول PCR ۱۵۰۰ جفت باز است و به عبارتی، با استفاده از این پرایمرها کل طول 16S rRNA طی PCR سنتز می‌شود. توالی آنها عبارتند از:

PF (27F):
5´-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3´
PR (1492R):
5´-GGCTTACCTTGTTACGACTT-3´

هر ۲۵ میکرولیتر محلول واکنش PCR شامل پرایمرها هر کدام ۲ میکرولیتر (۱۰ میکرومولار)، DNA الگو ۲ میکرولیتر، dNTPs (dATP، dCTP، dGTP و dTTP) ۰/۵ میکرولیتر (۱۰ میلی‌مولار)، Taq DNA Pol ۰/۵ میکرولیتر (۰/۲۵ واحد) (از ژن فن‌آوران، ایران)، بافر PCR 10X ۲/۵ میکرولیتر، کلرید منیزیم ۰/۵ میکرولیتر (۵۰ میلی‌مولار) و آب مقطر استریل ۱۵ میکرولیتر بود. مراحل PCR با استفاده از پرایمرهای *Azospirillum* 16S rDNA در دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad, USA) انجام شد. برنامه شامل واسرشت شدن اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل نهایی سنتز ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه بود. مراحل PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی 16S rDNA شامل واسرشت شدن اولیه در ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱/۵ دقیقه و یک سیکل نهایی سنتز شامل ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه بود.

تعیین توالی محصول PCR ژن 16S rDNA و ترسیم درخت فیلوژنتیک

با توجه به الگوی کل پروتئین سلول جدایه‌ها و مشابهت برخی جدایه‌ها با یکدیگر، توالی‌های bp ۴۰۰ مربوط به جدایه‌های PxR_1، StR_1، PxW_2 و PxW_3 برای توالی‌یابی انتخاب شدند. همچنین، باند bp ۱۵۰۰ مربوط به 16S rRNA جدایه StR_1 نیز انتخاب شد. توالی‌ها با استفاده از یک DNA sequencer (Sanger *et al.*, 1977) به صورت خودکار (SEQLAB, Germany) و بر اساس روش اتمام زنجیره (روش Sanger) و به سفارش شرکت فزاپژوه (Faza Biotech) تعیین توالی شدند. برای ترسیم درخت فیلوژنتیک بر اساس توالی 16S rRNA از روش اتصال مجاور (neighbour-joining) (Saitou and Nei, 1987) و نرم‌افزار MEGA نسخه ۴ استفاده شد.

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

برای انجام آزمایش، جدایه‌ها ابتدا در سطح محیط نوترینت آگار کشت داده شدند و سپس کلونی‌ها از سطح محیط با آب مقطر استریل شستشو و سپس در rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی جدا و رسوب باکتری ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. مقدار بسیار کم در حد ۲۰ میلی‌گرم از رسوب باکتری برداشته و روی دیسک کریستالی سلنید روی (Spectra-Tech ARK ATR cell) قرار داده شد و دیسک‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد خشک شدند و در نهایت، دیسک‌ها به دستگاه انتقال یافتند (Nicolet 6700 FT-IR Spectrometer) و پس از مدت کوتاهی طیف حاصل از پیوندهای شیمیایی موجود در سطوح باکتری اسکن و طیف حاصله روی

Archive of SID

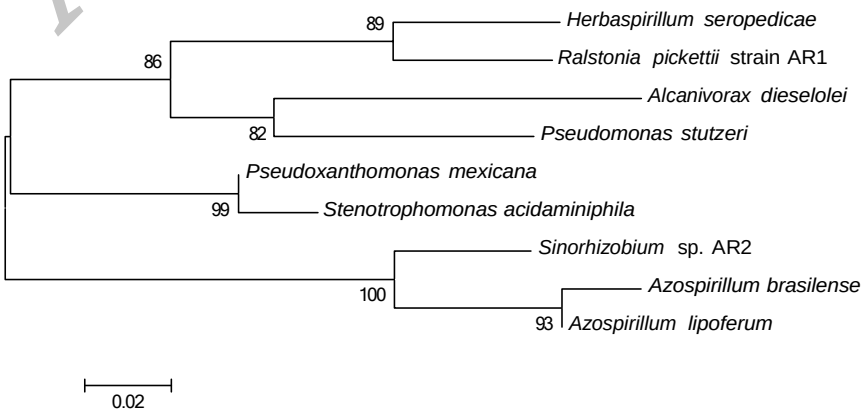
www.SID.ir

مانیتور رایانه آشکار شده، با مقایسه با جدول استاندارد مربوط به انواع پیوندها و گروه‌های عاملی، تشابه و تفاوت بین طیف‌ها در بین باکتری‌ها تفسیر شد. در ضمن، با مقایسه طیف باکتری‌های مجهول نسبت به سویه‌های استاندارد، سویه‌های جداسازی شده شناسایی شدند (Erukhimovitch *et al.*, 2005). در این مطالعه، برای نخستین بار در ایران از این روش برای شناسایی باکتری‌ها استفاده شده است.

نتایج

این مطالعه نخستین گزارش از تشکیل دیسک رشد در محیط NFb به وسیله *Pseudoxanthomonas* و *Stenotrophomonas* است. این باکتری‌ها دیسک رشد نزدیک به سطح تا عمقی تشکیل می‌دهند. توانایی رشد و تشکیل دیسک رشد توسط این باکتری‌ها دال بر توانایی تثبیت ازت، آن هم در شرایط میکروآئروفیلیک یا بی‌هوازی است. سویه‌های استاندارد *Azospirillum* نیز تقریباً دارای الگوی دیسک رشدی مشابه هستند. این باکتری‌ها مشابه *Azospirillum*ها در محیط NFb جامد، کلونی‌های قطره آبی تشکیل می‌دهند.

با توجه به مشابهت جدایه‌های PxR_2 و StR_1 به یکدیگر و همچنین، جدایه‌های PxW_1 و PxW_2 با هم (بر اساس آزمون نیم‌رخ کل پروتئین‌های داخل سلول که داده‌ها نشان داده نشده) و با توجه به مشخص بودن جدایه‌های S_1 و S_2، محصول PCR ژن 16S rDNA مربوط به جدایه‌های PxR_1، StR_1، PxW_2 و PxW_3 جهت توالی‌یابی به شرکت فزاپژوه ارسال شدند. وقتی خود پرایمرهای اختصاصی *Azospirillum* با استفاده از سایت ncbi تطبیق و بلاست می‌شود، فقط با توالی 16S rRNA جنس *Azospirillum* و به ویژه گونه *Brasilense* مشابهت داشته، جنس‌های باکتریایی دیگر را شناسایی نمی‌کند، اما وقتی توالی‌های ۴۰۰ bp مربوط به چهار جدایه که با پرایمرهای ذکر شده PCR شده، تطبیق و بلاست می‌شوند، هر چهار جدایه گونه جدیدی از جنس باکتریایی *Pseudoxanthomonas* و با حداکثر تشابه ۹۵ درصد را نشان می‌دهند. وقتی توالی 16S rRNA یکی از آن چهار جدایه به نام جدایه StR_1 که با پرایمر عمومی PCR شده، بلاست می‌شود، مشابهت ۹۵ درصدی این باکتری را با جنس *Stenotrophomonas* نشان می‌دهد (شکل ۱). توجه به این نکته، ضروری است که دو جنس *Pseudoxanthomonas* و *Stenotrophomonas* جزو یک خانواده بوده، به خانواده Xanthomonadaceae تعلق دارند.

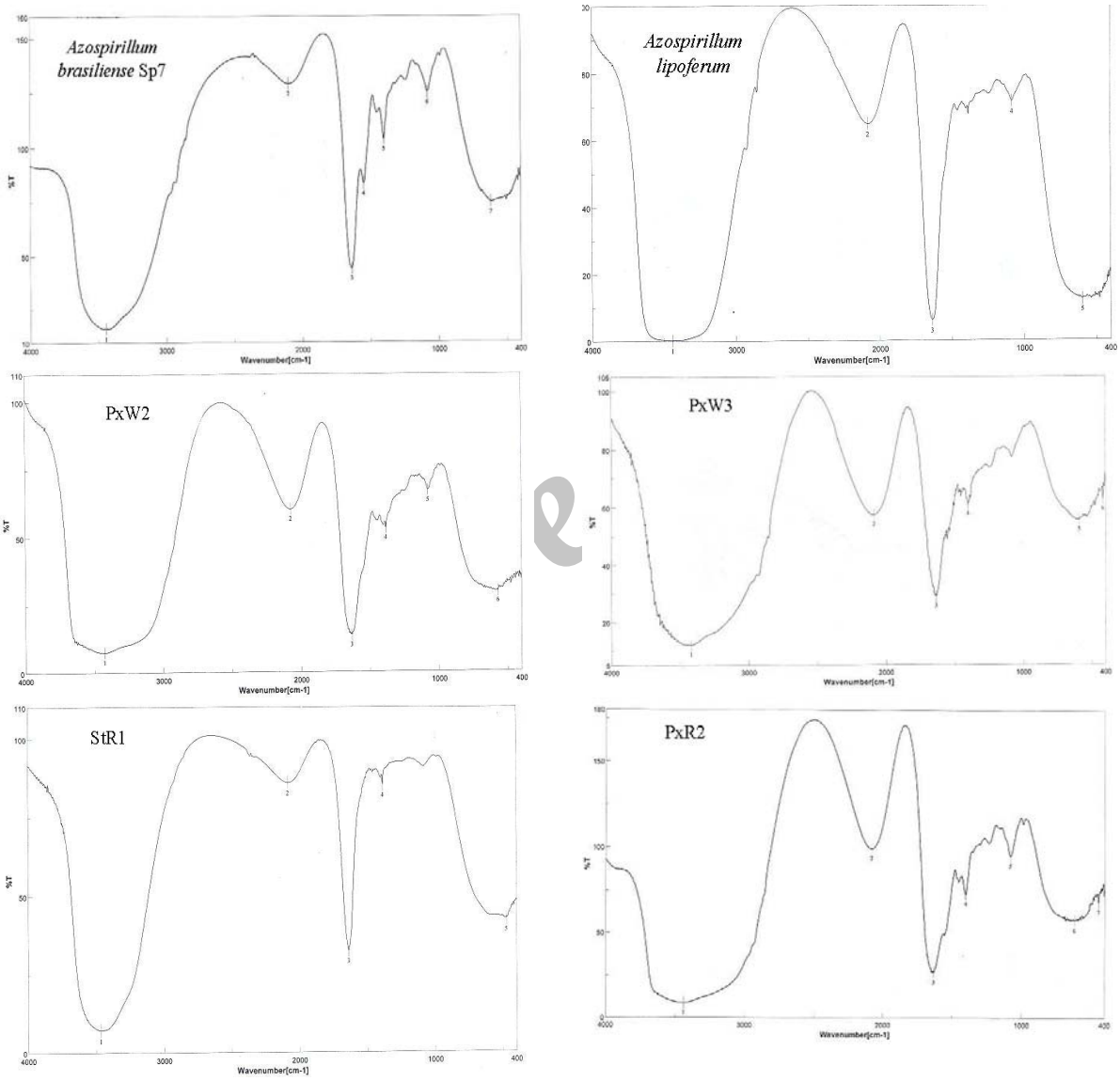


شکل ۱- درخت فیلوژنتیک بر اساس توالی 16S rRNA بین جنس *Pseudoxanthomonas* و برخی از جنس‌های دیگر

Archive of SID

www.SID.ir

در ارتباط با FTIR جدایه‌ها (شکل ۲)، در تمام سویه‌ها و جدایه‌ها پیوند N-H که به گروه‌های آمین و آمید موجود در پروتئین‌ها مربوط است، وجود دارد. همچنین، باند جذبی مربوط به هالوژن‌ها در جدایه‌های S_2، PxW_1، PxW_2 و سویه‌های استاندارد *Azospirillum* نیز متفاوت از یکدیگر و همچنین، با سایر جدایه‌ها متفاوتند. هر چند جدایه StR_1 در برخی پیک‌ها، به ویژه پیک‌های جذبی بالا مشابه جدایه‌های PxR_2، PxW_2 و PxW_3 است، اما شدت جذب و به عبارتی، مقدار غلظت باند در جدایه StR_1 بیشتر است.



شکل ۲- طیف‌های FTIR در نواحی cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰ از سویه‌های استاندارد *Azospirillum* و جدایه‌های اندوفیت برنج (PxR_2 و StR_1) و گندم (PxW_2 و PxW_3)

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

بسیاری از گونه‌های جنس *Pseudoxanthomonas* از فیلترهای زیستی و لجن، از هضم‌کننده‌های بی‌هوازی، خاک‌های هوادهی شده، خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای یا روغن‌ها و همچنین از چشمه‌های آب داغ جداسازی می‌شوند (Young *et al.*, 2007) Manter و همکاران (۲۰۱۰) توانستند *Pseudoxanthomonas* را به صورت اندوفیت از گیاه سیب‌زمینی جداسازی کنند.

Stenotrophomonas نیز در ریزوسفر بسیاری از گیاهان وجود دارد (Hayward *et al.*, 2009). اعضای جنس *Stenotrophomonas* اهمیت اکولوژیک در خور توجهی در چرخه‌های ازت و گوگرد دارند و چندین گونه از این جنس، مانند *Stenotrophomonas malthophilia* و *S. rhizophilia* می‌توانند در برهمکنش مفید با گیاهان نقش داشته باشند (Ryan *et al.*, 2009). گونه‌های *Stenotrophomonas maltophilia* و *Stenotrophomonas rhizophila* اغلب در ارتباط با گیاهان یافت می‌شوند. این باکتری‌ها می‌توانند از ریزوسفر و یا از بافت‌های داخلی گیاه، به ویژه از بافت‌های آوندی ریشه و ساقه جداسازی شوند. سویه‌های اندوفیت *Stenotrophomonas maltophilia* از ریشه بسیاری از گونه‌های گیاهی شامل برنج و سایر گیاهان جدا شده‌اند (Ryan *et al.*, 2009).

در مطالعه Sun و همکاران (۲۰۰۸)، تنوع باکتری‌های اندوفیت برنج با استفاده از روش‌هایی نظیر آنالیز 16S rRNA به کمک پرایمرهای عمومی 16S rRNA باکتری‌ها به نام 799F و 1492R بررسی و ۱۹۲ جدایه شناسایی شدند که شامل تمام زیرردههای آلفا، بتا، گاما، دلتا و اپسیلون پروتئوباکتری‌ها بودند. گروه غالب بتا پروتئوباکتری‌ها (۲۷/۸ درصد از کل کلون‌ها) بوده، فراوان‌ترین جنس نیز از *Stenotrophomonas* (گونه *malthophilia*) بود.

باکتری‌های جنس *Azospirillum* نیز متعلق به خانواده Spirillaceae، زیررده آلفاپروتئوباکتری‌ها هستند. آنها به صورت آزاد در خاک و یا متصل به ریشه‌ها، ساقه‌ها، برگ‌ها و بذور به ویژه در غلات و گیاهان علفی یافت می‌شوند، هر چند در گیاهانی نظیر نارگیل، سبزیجات، میوه‌ها، لگوم و گیاهان غده‌ای نیز یافت شده‌اند. اگرچه آنها حالت اپی‌فیت داشته، در نزدیکی یا سطح ریشه وجود دارند، ولی می‌توانند به درون ریشه به حالت اندوفیت نیز نفوذ کنند. بسیاری از *Azospirillum*ها دارای میزبان اختصاصی از گیاهان علفی و غلات هستند (Doebereiner *et al.*, 1995).

در این مطالعه باکتری‌هایی که به صورت اندوفیت از ریشه‌های برنج و گندم جداسازی شده‌اند متعلق به جنس‌های *Pseudoxanthomonas* و *Stenotrophomonas* بودند. در آزمون‌های قبلی به نظر رسید که از سه جدایه برنج دو جدایه PxR_2، StR_1 شبیه هم هستند. همان‌طور که در مقدمه توضیح داده شد، از روش FTIR برای شناسایی باکتری‌ها در حد جنس و گونه استفاده شده و در ایران نیز برای نخستین بار از این روش استفاده شده است. آنالیز FTIR، شباهت کاملی را بین جدایه‌های برنج و گندم و با *Azospirillum* تأیید نکرد. با مقایسه کلیه روش‌های فوق تأیید می‌شود که جدایه‌های گندم به یکدیگر شبیه هستند. توالی‌یابی توالی bp ۴۰۰ حاصل از پرایمرهای عمومی، باکتری StR_1 را با شباهت ۹۵ درصد گونه جدید از *Stenotrophomonas* معرفی کرد. برای نخستین بار در این مطالعه نشان داده شد که *Pseudoxanthomonas* به صورت اندوفیت در ریشه برنج وجود دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

Doebereiner, J., Baldani, V. and Reis, V. M. (1995) Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms (eds. Del Gallo, M., Vanderleyden, J. and De Zamaroczy, M). 3-14. Springer Verlag, Berlin.

Erukhimovitch, V., Pavlov, V., Talyshinsky, M., Souprun, Y. and Huleihel, M. (2005) FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37: 1105-1108.

Goodacre, R., Timmins, E. M., Burton, R., Kaderbhai, N., Woodward, A. M., Kell, D. B. and Rooney, P. J. (1998) Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks. Microbiology 144: 1157-1170.

Hayward, A. C., Fegan, N., Fegan, M. and Stirling, G. R. (2009) *Stenotrophomonas* and *Lysobacter*: ubiquitous plant-associated gamma-proteobacteria of developing significance in applied microbiology. Journal of Applied Microbiology 108: 756-770.

Kummerle, M., Scherer, S. and Seiler, H. (1998) Rapid and reliable identification of fermentative yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. Applied and Environmental Microbiology 64: 2207-2214.

Maciel, B. M., Santos, A. C. F., Dias, J. C. T., Vidal, R. O., Dias, R. G. C., Gross, E., Cascardo, J. C. M. and Rezende, R. P. (2009) Simple DNA extraction protocol for a 16S rDNA study of bacterial diversity in tropical landfarm soil used for bioremediation of oil waste. Genetic and Molecular Research 8: 375-388.

Manter, D. K., Delgado, G. A., Holm, D. G. and Stong, R. A. (2010) Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. Microbial Ecology 60: 157-166.

Martin-Didonet, C. C. G., Chubatsu, L. S., Souza, E. M., Kleina, M., Rego, F. G. M., Rigo, L. U., Yates, M. G. and Pedrosa, F. O. (2000) Genome structure of the genus *Azospirillum.* Journal of Bacteriology 182: 4113-4116.

Naumann, D., Helm, D. and Schultz, C. (1994) Characterization and identification of microorganisms by FT-IR spectroscopy and FT-IR microscopy. In: Bacterial diversity and systematics (eds. Priest, F. G., Ramos Cormenzana, A. and Tindall, B. J.) 67-85. Springer, New York.

Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Berg, G., Lelie, D. and Dow, J. M. (2009) The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas.* Nature Review 7: 514-525.

Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74: 5463-5467.

Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X. and Song, W. (2008) Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. Microbial Ecology 55: 415-424.

Tindall, B. J., Brambilla, E., Steffen, M., Neumann, R., Pukall, R., Kroppenstedt, R. M. and Stackebrandt, E. (2000) Cultivatable microbial diversity: gnawing at the Gordian knot. Environmental Microbiology 2: 310-318.

Young, C. C., Ho, M. J., Arun, A. B., Chen, W. M., Lai, W. A., Shen, F. T., Rekha, P. D. and Yassin, A. F. (2007) *Pseudoxanthomonas spadix* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. International

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 1823-1827.

Young, C. C., Hupfer, H., Siering, C., Ho, M. J., Arun, A. B., Lai, W. A., Rekha, P. D., Shen, F. T., Hung, M. H., Chen, W. M. and Yassin, A. F. (2008) *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 959-963.

Archive of SID

www.SID.ir

Identification of novel spp. of rice and wheat endophytic diazotrophs by 16S rDNA gene and FTIR analysis

Mohammad Javad Mehdipour Moghaddam [1]*, Giti Emtiazi [2], Majid Bouzari [2] and Zivar Salehi [1]

[1] Deparment of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[2] Deparment of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Archive of SID

Abstract

In this research, six isolates, including three from three rice roots (PxR_1, PxR_2 and StR_1) and three from three wheat roots (PxW_1, PxW_2 and PxW_3) were isolated as endophytic bacteria and except for StR_1, all the isolates were identified as *Pseudoxanthomonas* based on phenotypic analysis including FTIR and PCR amplification of 16S rDNA. The results showed that PxR_1, PxR_2, PxW_1 and PxW_2 were all similar and belonged to a novel species of *Pseudoxanthomonas*, but PxW_3 was from different species. StR_1 belonged to a novel species of *Stenotrophomonas*. Two strains including *Azospirillum brasiliense* Sp7 (S_1) and *Azospirillum lipoferum* (S_2) were selected as standard strains and compared with those isolates; however, phenotypic and genotypic analysis verified that those isolates were not *Azospirillum*. For the first time, it was indicated that *Pseudoxanthomonas* existed as an endophytic bacterium in rice root.

Key words: Endophyte, Rice, Wheat, *Azospirillum*, *Pseudoxanthomonas*, *Stenotrophomonas*

*Corresponding Author: mj_mehdipour@guilan.ac.ir

www.SID.ir