بررسی کارایی نرم افزارهای متاژنومیک در شناسایی تنوع گونه‌های میکروبی اندوفیت در گیاه سنجد

نادیا عزیزپور[۱]، سویل نعمت‌الهی[۱]، رضا خاکور*[۲]، منیژه جمشیدی[۱]، محمدحسین نوروزی بیرامی[۳]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۲*- گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۳- گروه مهندسی کامپیوتر، واحد اسکو، دانشگاه آزاد اسلامی، اسکو، ایران

* ایمیل نویسنده مسئول: nematollahi2001@yahoo.com و khakvar@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت : ۱۴۰۰/۰۹/۳۰ تاریخ پذیرش : ۱۴۰۰/۱۲/۰۲

چکیده

یکی از مهم‌ترین علل پایداری هر نوع اکوسیستمی، تنوع زیستی و گوناگونی طبیعی موجودات آن اکوسیستم می‌باشد. لذا شناخت تنوع گونه‌های داخل هر اکوسیستم به حفظ و نگهداری آن محیط کمک شایان می‌کند. از جمله ناشناخته‌ترین گونه‌ها در هر محیط اکوسیستمی، میکروارگانیسم‌های اندوفیت می‌باشند. این موجودات چون در داخل یک موجود زنده‌ی دیگر قرار دارند لذا از دید زیست شناسان معمولاً مغفول می‌مانند مگر آنکه بیماری یا عارضه خاصی در میزبان خود ایجاد کنند. از طرفی چون اکثر این میکروارگانیسم‌ها غیر قابل کشت هستند، لذا شناسایی آن‌ها از طریق روش‌های معمول غیر ممکن می‌باشد. با توسعه نسل جدید توالی‌یابی (Next Generation Sequence; NGS) این امکان فراهم شده تا با یکبار استخراج دی‌اِن‌اِی کل (Total DNA) از میزبان و توالی‌یابی همه‌ی محتوای ژنومی آن، بتوان بغیر از میزبان به توالی گونه‌های همراه یا اندوفیت آن نیز پی برد. برای بررسی کارایی این نوع توالی‌یابی در شناخت تنوع گونه‌ای بعنوان نمونه، دی‌اِن‌اِی کل درختان سنجد منطقه شهرستان تبریز استخراج و مورد توالی‌یابی NGS قرار گرفت. از نرم افزارهای CLC workbench، Metaphylan2 و Kraken برای آنالیز داده‌ها و بدست آورده ژنوم گونه‌های مختلف داخل درخت استفاده گردید. بر اساس نتایج بدست آمده، نرم‌افزار متافیلان نسبت به کراکن از کارایی بیشتری برخورد بود و گروه‌های ژنومی بیشتری را از هم تفکیک کرد. براساس نتایج متافیلان، بیش از چندین گونه از شاخه‌های مختلف باکتری، قارچ و ویروس در داخل نمونه‌ها یافت شد که باکتری‌های بیمارگر گیاهی از گروه شبه مایکوپلاسماها (Tenerictes) به طور قابل توجه‌ای غالب بودند. همچنین بطور غیر معمول ژنوم گونه‌های از پروتوزواهای بیمارگر پرندگان (Eimeria tenella) و مخمر بیمارگر گیاهی (Eremothecium sp.) در داخل نمونه‌ها یافت شد.

کلمات کلیدی

تنوع زیستی، متاژنومیک، NGS، Metaphylan2

۱- مقدمه

متاژنومیک شاخه‌ی جدید در علوم ژنتیک است که به مطالعه مواد ژنتیکی که مستقیما از طبیعت و محیط زیست بدست می‌آیند می‌پردازد (Grieb et al., 2020). در این تکنیک، همه‌ی محتوای ژنتیکی محیط مورد نظر، استخراج و همزمان مورد توالی یابی قرار می‌گیرد که این امر باعث می‌شود حضور موجودات و گونه‌های غیر قابل کشت و یا بسیار کم جمعیت نیز آشکار گردد. همچنین با مشخص شدن فراوان هر یک از گروه‌های زیستی در کل جمعیت، نمایی بهتری از تغییرات جمعتی داخل اکوسیستم مورد مطالعه بدست می‌آید. از متاژنومیک تاکنون برای مطالعه میکروبیوتای داخل روده انسان و محیط‌های دریایی یا خاک بسیار شور استفاده شده است (Jansson & Hofmockel, 2018; Maccaferri et al., 2011; Mootapally et al., 2020) ولی تعداد انگشت شماری گزارش مستند از کاربرد آن برای شناسایی باکتری‌های اندوفیت گیاهی در دسترس می‌باشد (Akinsanya et al., 2015). اخیراً در اکثر درختان سنجد (Elaeganus angustifolia L.) داخل و اطراف شهر تبریز علایم بسیار واضح ریزبرگی، کوتولگی و جارویی شدن مشاهده شده است (شکل ۱). علت این امر آلودگی با بیماری فیتوپلاسمایی گزارش شده است (Hajizadeh et al., 2017). لاکن نوع و شدت علایم حاکی از احتمال آلودگی همزمان با گونه‌های دیگری از سایر بیمارگرها دلالت داشت. لذا لازم بود بررسی دقیقی از عوامل بیماریزای داخل گیاه صورت گیرد. لذا تحقیق حاضر برای شناسایی محتوای ژنومی درختان سنجد آلوده با بیماری فیتوپلاسمایی با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف در منطقه تبریز انجام گردید.

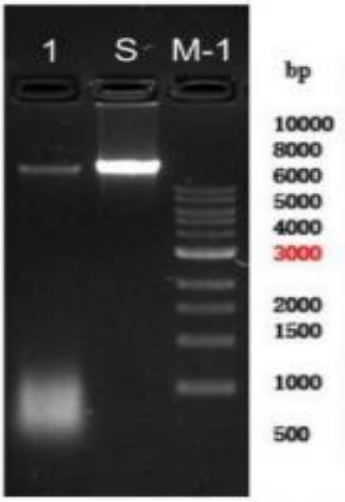
۲- روش انجام تحقیق

- **جمع‌آوری نمونه گیاهی و استخراج total DNA**

در طی اواخر تابستان و اوایل پاییز سال ۱۳۹۸ از درختان سنجد مشکوک به آلودگی به بیماری باکتریایی فیتوپلاسمایی در داخل و اطراف شهر تبریز نمونه برداری صورت گرفت. این درختان علایمی مانند ریزبرگی، جارویی شدن، کاهش شدید رشد و تشدید تشکیل پاجوش‌های فراوان در پای درخت را از خود نشان می‌دادند (شکل ۱). نمونه‌های گیاهی از برگ‌ها و ساقه‌های سبز درختان دارای علایم جمع‌آوری و در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل گردید. در کل سه نمونه DNA آماده گردید. هر نمونه شامل مخلوطی از DNA حداقل ۱۰ درخت بود. برای استخراج دی‌اِن‌اِی کل از روش Zirak et al.,2021) CTAB) استفاده گردید. برای اطمینان از حذف میکروارگانیسم‌های تصادفی یا آلودگی‌های سطحی، همه‌ی نمونه‌ها – قبل از استخراج دی‌ان‌ای – با آب مقطر استریل کاملاً شتشو و با الکل ضدعفونی سطحی گردیدند.

شکل ۱- علایم ریزبرگی و جارویی شدن شاخه و برگ درختان سنجد در داخل و اطراف شهر تبریز

برای آزمایشات متاژنومیک مقدار کمّی DNA لازم برای آزمایش بسیار بالاست، لذا DNA های بدست آمده با استفاده از سانتریفوژ تغلیظ و سپس با اسپکتروفتومتر (مدل Genway-6850) و الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ مورد ارزیابی قرار گرفت(شکل ۲). پس از اطمینان از کیفیت و کمیت بالای دی‌اِن‌اِی بدست امده، نمونه‌ها برای توالی یابی NGS به شرکت نوواژن چین (Novagen Co.) ارسال گردیدند. هر نمونه‌ی ارسالی در حدود ۱۰۰میکرولیتر با غلظت ۸۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود. نمونه‌ها توسط پلت فرم Illumina 1.9 Novaseq 6000 برای تولید کتابخانه انتهایی جفتی (Paired end) در شرکت نوواژن چین استفاده شد. حجم داده‌ی درخواستی ۱۲ گیگ بایت تعیین شد.



شکل ۲- بررسی کیفیت کمّی و کیفی total DNA استخراج شده از نمونه‌های گیاه سنجد؛ M-1 مارکر مولکولی؛ S نمونه استاندارد با غلظت ۵۰ نانوگرم و نمونه (۱) نمونه آماده ارسال که یک میکرولیتر آن همراه لودینق دای (Loading dye) به چاهک اضافه شده است

- **ارزیابی نتایج خوانش‌های NGS و تحلیل داده‌ها**

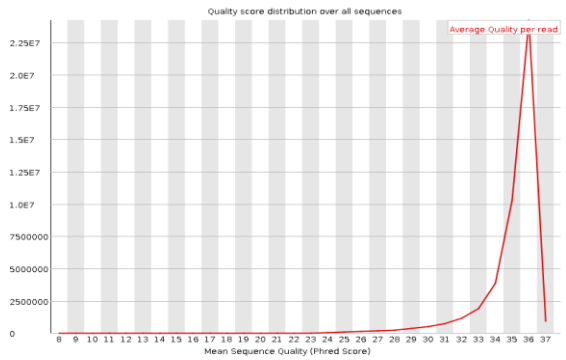
برای ارزیابی اولیه خوانش‌ها از نرم افزار CLC workbench و Fastqc استفاده گردید. کیفیت داده‌ها پس از آپلود در نرم‌افزار ابتدا بررسی و داده‌های تکراری و یا با کیفیت پایین و نیز آداپتورها حذف و داده‌ها تمیز وارد نرم افزار بعدی گردید. در مرحله بعد با استفاده از نرم‌افزارهای متافیلان (Metaphylan2) و کراکن (Kraken) فراوانی ژنوم هر یک از گروه‌های میکروبی (قارچی، باکتریایی و پروتوزوایی) در داخل داده‌ی مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت. سپس با استفاده از نرم افزار Bowti2 v2.4.2 همه قرائت ها (Reads) بدست آمده با توالی‌های مرجع موجود در بانک ژن (NCBI genbank) همتراز (align) شدند.

۳- نتایج

براساس خروجی نرم‌افزار CLC workbench و Fastqc کیفیت داده‌های دریافتی از شرکت نوواژن مناسب و قابل قبول بود. آنالیز داده‌ها نشان داد که در کل ۴۵ میلیون خوانش (READ) در داخل فایل ارسالی وجود دارد، طول قطعات خوانش ۱۵۰ و درصد گوانین-سیتوزین کل خوانش‌ها در سه نمونه‌ای ارسالی بین ۳۱-۳۹ درصد بود (جدول ۱). شاخص فِرِد (Phred Score) برای مجموعه‌ی خوانش‌ها در حدود عدد ۳۶ برای کل داده ها تعیین گردید (شکل ۲)، که نشان دهنده‌ی کیفیت خوب خوانش‌ها می‌باشد (بالای ۲۰ قابل قبول محسوب می‌شود)(Liao et al., 2015). سطح تکرار توالی‌ها نیز بسیار پایین بدست آمد (شکل ۳) که حاکی از متناسب بودن خوانش‌ها و قابل اطمینان بودن داده‌ها می‌باشد.

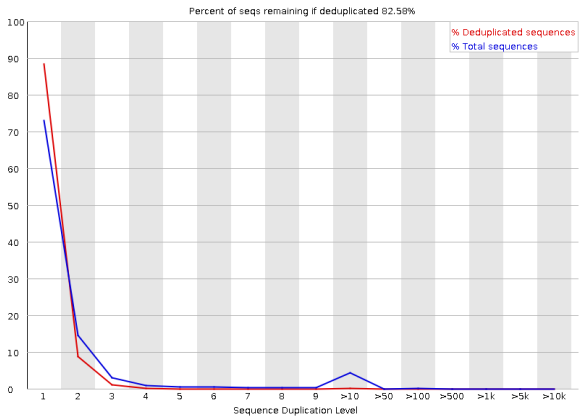
جدول ۱- نتیجه بررسی کیفیت خوانش‌های سه نمونه‌ی ارسالی برای NGS بدست آمده از نرم افزار CLC workbench و Fastqc

ردیف	ویژگی	نتیجه
۱	تعداد خوانش	۴۵۰۱۱۳۸۸-۴۱۱۵۷۶۴۷
۲	تعداد خوانش‌های غیر قابل خواندن	# 0%
۳	طول خوانش‌ها	۱۵۰ نوکلوتید
۴	درصد GC	٪۳۹-۳۱
۵	درصد عدم خوانش (n)	٪۱-۰
۶	درصد خوانش با توالی‌های تکراری یا مشابه (هم‌پوشانی)	٪۸۴-۸۲



شکل ۲- میانگین شاخص فرد (Phred Score) برای ۴۵ میلیون خوانش بدست آمده از نتایج NGS نمونه‌های سنجد

نتایج بدست آمده از دو نرم‌افزار Metaphylan2 و Kraken نشان داد که داخل گیاه سنجد، غنی از محتوای ژنومی انواع گونه‌های قارچی باکتریایی و .. می‌باشد. از ۴۵ میلیون خوانش، در حدود نیم میلیون خوانش (۱/۱۲ ٪ کل) در گروه‌های مختلف میکروبی دسته‌بندی شدند و مابقی ۹۸/۸۸ ٪ مربوط به ژنوم میزبان (سنجد) تعیین گردید. نتایج بررسی و مقایسه این نیم میلیون خوانش ۱۵۰ نوکلوتیدی در جداول ۲، ۳ و ۴ خلاصه گردیده است. در جداول تهیه شده فقط گونه‌های لیست شده است که در هر سه نمونه‌ی ارسال یافت شده بودند.



شکل ۳- درصد توالی های تکرار شده در داخل ۴۵ میلیون خوانش بدست آمده از نتایج NGS نمونه ی سنجد

همان طور که در جدول شماره دو مشاهده می‌شود ژنوم بیش از نه نوع پروکاریوت در داخل گیاه سنجد شناسایی و تایید هویت شده است. به جزء یک گونه از آرکی‌باکترها، مابقی عمدتاً متعلق به باکتری‌های گرم منفی گروه Proteobacteria بودند. عمده‌ی ژنوم باکتریایی شناسایی شده در داخل سنجد متعلق به رده مالیکوت و گونه‌های فیتوپلاسما بودند که بر خلاف تصور تنها شامل یک گونه نبوده و ژنوم چهار گونه‌ی مختلف فیتوپلاسما در داخل نمونه‌ها مشاهده گردید (جدول ۲). در آنالیز ژنوم‌های ویروسی، حضور ژنوم سه نوع ویروس و یک نوع ویروس ماهواره‌ای (Satellite virus) در داخل گیاهان سنجد مورد آزمایش تایید گردید. به جزء یکی از ویروس‌ها که متعلق به ویروس‌های بیمارگر حشرات تشخیص داده شده بود، مابقی متعلق به ویروس‌ها انگل گیاهی بودند (جدول ۳). ویروس Bombyx mori nucleopolyhedrovirus که مقداری زیاد از ژنوم ویروسی متعلق به آن بود یک بیمارگر عمده‌ی حشرات بوده و در کنترل بیولوژیک چندین گونه از حشرات تاکنون استفاده شده است (Shi et al., 2021). درمقایسه نتایج دو نرم‌افزار متافیلان و کراکن نتایج از برتری نرم‌افزار متافیلان بود؛ بطوری که ۳۰٪ بیشتر از نرم افزار کراکن گروه‌های مختلفی ژنومی را مشخص و تفکیک نمود.

جدول ۲: لیست از گروه‌های مختلف باکتریایی که ژنوم آن‌ها در داخل نمونه‌های سنجد شناسایی شده

گروه	سلسله و شاخه (Kingdome & Phylum)	خانواده و رده (Class & Family)	نام گونه (Species Name)
Prokaryotes	Archaea, Euryarchaeota	Methanobacteria; Methanobacteriaceae	Methanobrevibacter sp.
	Eubacteria; Bacteroidetes	Flavobacteriia; Flavobactericeae	Candidatus Sulcia muelleri
	Eubacteria; Proteobacteria	Alfaproteobacteria; Caulobacteraceae	Brevundimonas sp.
	Eubacteria; Proteobacteria	Betaproteobacteria; Oxalobacteraceae	Candidatus Zinderia insecticola
	Eubacteria; Proteobacteria	Gammaproteobacteria; Enterobacteriaceae	Candidatus Regiella insecticola
	Eubacteria; Proteobacteria	Gammaproteobacteria; Enterobacteriaceae	Buchnera aphidicola
	Eubacteria; Proteobacteria	Gammaproteobacteria; Idiomarinaceae	Idiomarina loihiensis
	Eubacteria; Proteobacteria	Gammaproteobacteria; Halomonadaceae	Candidatus Carsonella ruddii
	Eubacteria; Proteobacteria	Gammaproteobacteria; Vibronaceae	Salinivibrio costicola
	Eubacteria, Tenericutes	Mollicutes; Acholeplasmataceae	Candidatus Phytoplasma asteris
			Onion yellows phytoplasma
			Candidatus Phytoplasma australiense
			Candidatus Phytoplasma unclassified

جدول۳: لیست از گروه‌های مختلف ویروسی که ژنوم آن‌ها در داخل نمونه‌های سنجد شناسایی شده

گروه	سلسله و شاخه (Kingdome & Phylum)	خانواده و رده (Class & Family)	نام گونه (Species Name)
Viruses	Orthornavirae; Pisuviricota	Durnavirales; Partitiviridae	Vicia cryptic virus
	Riboviria; Pisuviricota	Stelpaviricetes; Potyviridae	Dasheen mosaic virus
	Naldaviricetes	Baculoviridae; Alphabaculovirus	Bombyx mori nucleopolyhedrovirus
	---	Tolecusatellitidae; Deltasatellite	Malvastrum leaf curl Philippines betasatellite

در مطالعه ژنوم‌های یوکاریوتیک، حضور ژنوم قارچ‌های مخمری از رده ساکارومیست و پروتوزواهای از گروه هاگ‌داران و آمیب‌ها در داخل نمونه‌ها تایید گردید (جدول ۴). یکی از قارچ‌های شناسایی شده (Eremothecium sp.) متعلق به جنسی است که عمدتاً بیمارگر گیاهی بوده و برخی گونه‌های آن در گیاهانی مثل لوبیا و پنبه ایجاد خسارت اقتصادی می‌کند (Karimzadeh & Fotouhifar, 2020) و گونه‌ی دیگر (Schizosaccharomyces sp.) یک مخمر آزادزی بود که در محیط‌های مختلف تاکنون یافت شده است. یکی پروتوزواهای شناسایی شده (Eimeria tenella) بیمارگر پرندگان گزارش شده است و گونه دیگر متعلق به جنس (Dictyostelium) بوده و یک نوع آمیب می‌باشد که قبلاً گونه‌های از آن در بقایای گیاهی در کشورهای مختلف شناسایی شده است (Pears & Gross, 2021).

جدول ٤: لیست از گروه‌های مختلف یوکاریوتیک که ژنوم آن‌ها در داخل نمونه‌های سنجد شناسایی شده

گروه	سلسله و شاخه (Kingdome & Phylum)	خانواده و رده (Class & Family)	نام گونه (Species Name)
Eukaryote	Fungi; Ascomycota	Saccharomycetes;Saccharomycetaceae	Eremothecium sp.
	Fungi; Ascomycota	Saccharomycetes;Saccharomycetaceae	Schizosaccharomyces sp.
	Alveolata; Apicomplexa	Aconoidasida; Plasmodiidae	Plasmodium yoelii
	Alveolata; Apicomplexa;	Conoidasida; Eimeriidae	Eimeria_tenella
	Alveolata;Amoebozoa	Eumycetozoa; Dictyosteliaceae	Dictyostelium sp.

٤- نتیجه‌گیری

درخت سنجد در بیشتر مناطق خاورمیانه از جمله ایران به صورت خودروی یا وحشی می‌روید. این درخت بشدت مقاوم به خشکی بود و در زمین‌های که دچار خشکسالی یا کم آبی هستند به فراوانی استفاده می‌شود. اخیراً درختان سنجد با علائم جاروی جادوگر (witches broom) در شمال‌غرب ایران با شیوع زیادی دیده می‌شوند، ولی چون این درختان ارزش اقتصادی پایینی دارند، چندان مورد توجه گیاه‌پزشکان قرار نگرفته‌اند؛ بنابراین، حدس زده می‌شود درختان سنجد می‌توانند به عنوان منبع انواع مختلفی از بیماری‌ها برای سایر گیاهان عمل کنند. اخیراً گزارش شده است که بیماری فیتوپلاسمای Candidatus Phytoplasma asteris به طور گسترده به درختان بادام در منطقه‌ی شمال‌غرب ایران منتقل شده است (Zirak et al., 2021). قبلاً در ایران گیاهان علفی متعددی با طیف وسیعی از علائم آلودگی به Candidatus Phytoplasma asteris گزارش شده است (Vali et al. 2014 a&b; Vali et al. 2011; Hosseini et al. 2010) با این حال، تعداد انگشت شماری از گیاهان درختی آلوده به این فیتوپلاسما گزارش شده است (Zirak et al., 202). بیماری جاروی جادوگر سنجد در شمال‌غرب ایران تنها بیماری درختی هست که با گونه‌ی Candidatus Phytoplasma asteris مرتبط تشخیص داده شده است (Rashidi et al, 2010; Hajizadeh et al., 2017). بر اساس این گزارش‌ها، شکی وجود نداشت که درختان سنجد ایران یکی از میزبان‌های اصلی اما نادیده گرفته شده برای این فیتوپلاسما و برخی بیماری‌های دیگر هستند. لذا شناسایی میکروبیوم داخلی درختان سنجد منطقه امری جالب و ضروری به نظر می رسید. شناسایی تک تک آلودگی داخل یک درخت یا هر محیط دیگر، امری بسیار زمان‌بَر پرهزینه و بعضاً غیر ممکن است زیرا هیچ ذهنیتی از تعداد و نوع میکروارگانیسم‌های داخل آن وجود ندارد. اخیراً با توسعه و تکمیل آزمایشات متاژنومیک بر پایه NGS این امکان فراهم شده بتوان بدون صرف وقت و هزینه زیاد یک نمای کلی از موجودات احتمالی داخل یک اکوسیستم بدست آورد. بر این اساس آزمایش حاضر انجام گردید. نتایج این تحقیق که برای اولین بار در دنیا روی درخت سنجد و برای اولین در درختان میوه‌ی ایران انجام گردید، نشان داد که اکوسیستم داخل سنجد بسیار غنی و مَملو از انواع مختلف اندوفیت‌ها می‌باشد. چون نمونه‌ها قبل از استخراج دی‌اِن‌اِی کاملاً استریل و ضدعفونی سطحی شده بودند و فقط گونه‌های که در هر سه نمونه ارسالی بودند لیست شده‌اند؛ لذا اندوفیت بودن همه‌ی این گونه‌ها در داخل سنجدهای منطقه تبریز امری محرز و ثابت شده است. با توجه به اثبات آلودگی سنجدهای مورد آزمایش به بیماری فیتوپلاسمایی، نگارندگان انتظار وجود درصد بالای از ژنوم فیتوپلاسمای Candidatus Phytoplasma asteris در داخل ژنوم‌های ارسال را داشتند ولی برخلاف انتظار به جای یک فیتوپلاسما، ژنوم چهار نوع فیتوپلاسما بدست آمد (جدول۲). قبلاً آلودگی همزمان گیاهان مختلف از جمله گوجه فرنگی، توتون و ... به دو نوع فیتوپلاسما گزارش شده است (Ramachandran et al., 2020). گونه‌ی یک از چهار فیتوپلاسما مشخص نگردید؛ ولی برای دو گونه‌ی دیگر یعنی Onion yellows phytoplasma و Candidatus Phytoplasma australiense این اولین گزارش از آلودگی درخت سنجد به این دو فیتوپلاسما در دنیا و ایران می‌باشد. تشخیص الودگی همزمان درختان سنجد به چند نوع فیتوپلاسما نشان دهنده پتانسیل خطرناک این درخت برای ایفای نقش بسیار مهم‌تر به عنوان میزبان نانوشته برای فیتوپلاسماهای مختلف است. در کنار این فیتوپلاسماها، عمده‌ی باکتری‌های شناسایی شده متعلق به باکتری‌های همزیست داخلی حشرات بخصوص حشرات مکنده نظیر شته‌ها و پسیل‌ها بودند که برخی از این باکتری‌ها به ترتیب Candidatus Sulcia muelleri، Candidatus Zinderia insecticola، Candidatus Regiella insecticola، Buchnera aphidicola و Candidatus Carsonella ruddii شناسایی گردیدند. اینکه این حجم از تنوع باکتری‌های همزیست حشرات بیرون از بدن حشرات شناسایی گردد هر چند غیر معمول ولی امکان‌پذیر است. قبلاً گزارشات متعددی از وجود باکتری‌های همزیست حشرات در داخل

بافت‌های گیاهی منتشر شده است (Caspi-Fluger & Zchori-Fein, 2010; Gupta & Nair, 2020; Itoh et al., 2019). یکی دیگر از دلایلی که وجود این حجم از باکتری‌های همزیست حشرات در داخل نمونه های گیاه سنجد توجیه می‌کند، احتمال آلودگی‌های داخلی یا زیر سطحی نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده به تخم یا لارو حشرات مکنده بودند که بعلت درونی بودن در زمان انتقال به آزمایشگاه مشاهده نشده‌اند و این تخم‌ها و لاروها با شستشوی اولیه پاک نشده و این بقایای حشرات وارد مرحله استخراج دی‌اِن‌ای و از این طریق این حجم از ژنوم باکتری‌های همزیست حشرات در داخل نمونه‌ها ظاهر شده است. از طرفی برخی از این باکتری‌ها توان کنترل زیستی حشرات را دارند (Chuche et al., 2017)، لذا وجود این باکتری‌ها مفید در داخل سنجد، نوید بخش این موضوع می‌باشد که می‌توان با جداسازی و خالص‌سازی این باکتری‌ها از بافت‌های گیاه سنجد از آن‌ها برای کنترل یا مدیریت حشرات استفاده کرد. شاید یکی از دلایل مقاومت طبیعی درخت سنجد به آفات مختلف وجود همین باکتری‌های همزیست در داخل آن‌ها می‌باشد که در درختان میوه تجاری مثل سیب، گلابی و مرکبات بعلت دست‌کاری‌ها و سمپاشی‌های انجام شده در طول زمان، آن‌ها این میکروبیوم طبیعی و مفید خود را از دست داده‌اند. در کنار باکتریهای حقیقی، گونه‌ی از آرکی‌باکترها (Methanobrevibacter sp.) نیزیافت شد. قبلاً از این جنس گونه‌های به حالت همزیست با حشرات از نقاط دیگر دنیا گزارش شده است (Guindo et al. 2021) لذا این نیز می‌تواند مربوط به آلودگی داخلی نمونه‌ها به تخم حشرات باشد. از سوی دیگر، نتایج NGS نشان می‌دهد که محتوای ژنومی نمونه‌های گیاه سنجد آزمایش شده، غنی از ژنوم‌های ویروسی می‌باشد که فراوان‌ترین آنها مربوط به ویروس Vicia cryptic virus بود. این تحقیق می‌تواند اولین گزارش از آلودگی درختان سنجد به این نوع ویروس در دنیا باشد ولی تایید آن نیازمند آزمایشات تکمیلی و گلخانه‌ای است. از طرفی وجود ویروس بیمارگر حشرات Bombyx mori nucleopolyhedrovirus که یک عامل بیوکنترل برای بسیاری از حشرات است، نشان از غِنای گونه سنجد از میکروب‌های مفید می‌باشد. شناسایی تک تک گونه‌های یک اکوسیستم و بدست آورده اطلاعات ژنومی از هر یک آنها کاری بسیار طولانی و پرهزینه است که تصور انجام آن چند سال غیر ممکن بود. با این حال، تحقیق حاضر بعنوان نمونه، نشان می‌دهد تکنیک NGS به راحتی و با کمترین هزینه و صرف وقت می‌تواند اطلاعات ذی قیمتی از درون اکوسیستم‌های ناشناخته بدست دهد که قبلاً دست‌یابی به آنها محال و یا بسیار سخت بود. طی این تحقیق نه تنها اثبات گردید درختان سنجد منطقه شمال‌غرب ایران به بیش از یک فیتوپلاسما آلوده هستند بلکه وجود انواع مختلفی از میکروب‌های مفید یا مضر دیگر نیز در داخل آنها برای اولین بار اثبات گردید. اطلاع از آلودگی درختان سنجد به چند بیمارگر می‌تواند به مسئولین و کارشناسان بهداشتی و حفظ نباتات کمک کند تا در برنامه‌های مدیریتی آینده در مورد توسعه یا حذف این درختان در منطقه بهتر تصمیم گیری کنند.

منابع

- Akinsanya, M. A., Goh, J. K., Lim, S. P., & Ting, A. S. Y. 2015. Metagenomics study of endophytic bacteria in Aloe vera using next-generation technology. Genomics data, 6, 159-163.
- Caspi-Fluger, A., & Zchori-Fein, E. 2010. Do plants and insects share the same symbionts?. Israel Journal of Plant Sciences, 58(2), 113-119.
- Chuche, J., Auricau-Bouvery, N., Danet, J. L., & Thiéry, D. 2017. Use the insiders: could insect facultative symbionts control vector-borne plant diseases?. Journal of Pest Science, 90(1), 51-68.
- Grieb, A., Bowers, R. M., Oggerin, M., Goudeau, D., Lee, J., Malmstrom, R. R., & Fuchs, B. M. 2020. A pipeline for targeted metagenomics of environmental bacteria. Microbiome, 8(1), 1-17.
- Guindo, C. O., Davoust, B., Drancourt, M., & Grine, G. 2021. Diversity of Methanogens in Animals' Gut. Microorganisms, 9(1), 13-23.
- Gupta, A., & Nair, S. 2020. Dynamics of insect–microbiome interaction influence host and microbial symbiont. Frontiers in microbiology, 11, 1357.
- Hajizadeh A, Khakvar R, Sokhandan Bashir N, & Zirak L. 2017. Detection of Russian olive witches'-broom disease and its insect vector in Northwestern Iran. Journal of Plant Protection Research, 57, 309-313.
- Itoh, H., Jang, S., Takeshita, K., Ohbayashi, T., Ohnishi, N., Meng, X. Y., & Kikuchi, Y. 2019. Host–symbiont specificity determined by microbe–microbe competition in an insect gut. Proceedings of the National Academy of Sciences, 116(45), 22673-22682.
- Jansson, J. K., & Hofmockel, K. S. 2018. The soil microbiome—from metagenomics to metaphenomics. Current opinion in microbiology, 43, 162-168.
- Karimzadeh, S., & Fotouhifar, K. B. 2020. Report of some fungi associated with of leaf spot symptoms of self-growing plants in Chaharmahal and Bakhtiari province (Iran). Rostaniha, 21(1), 121-140.
- Liao, P., Satten, G. A., & Hu, Y. J. 2017. PhredEM: a phred-score-informed genotype-calling approach for next-generation sequencing studies. Genetic epidemiology, 41(5), 375-387.
- Maccaferri, S., Biagi, E., & Brigidi, P. 2011. Metagenomics: key to human gut microbiota. Digestive diseases, 29(6), 525-530.

- Mootapally, C., Nathani, N. M., Solomon, S., Subramanian, B., & Gadhvi, I. R. 2020. Role of Metagenomics in Exploring Marine Microbiomes: Current Status and Implications. Encyclopedia of Marine Biotechnology, 3, 1891-1907.
- Pears, C. J., & Gross, J. D. 2021. Microbe Profile: Dictyostelium discoideum: model system for development, chemotaxis and biomedical research. Microbiology, 167(3), 001040.
- Ramachandran, S., Kirdat, K., Mondal, S., Reddy, M. K., Thorat, V., Raja, R., & Yadav, A. 2020. A threat to sandalwood cultivation in the naturalised Marayoors andalwood reserve (Kerala, India) through single and mixed phytoplasma infections. Phytopathogenic Mollicutes, 10(1), 89-95.
- Rashidi, M., Ghosta, Y., & Bahar, M. 2010. Molecular identification of a phytoplasma associated with Russian olive witches' broom in Iran. European Journal of Plant Pathology, 127, 157–159.
- Shi, X., Zhang, Y., Zhu, T., Li, N., Sun, S., Zhu, M., & Gong, C. 2021. Response to Bombyx mori nucleopolyhedrovirus infection in silkworm: Gut metabolites and microbiota. Developmental & Comparative Immunology, 125, 104227.
- Vali, S.F., Bahar, M., & Zirak, L. 2014a. Characterization of phytoplasmas related to aster yellows group infecting annual plants in Iran based on the studies of 16S rRNA and rp genes. Journal of Plant Protection Research, 54,1–8.
- Vali, S.F., Bahar, M., & Zirak, L. 2014b. Characterization of phytoplasmas related to 'Candidatus Phytoplasma asteris' subgroup rpI-L in Iran. Journal of Plant Protection Research, 54,199–203.
- Zirak, L, Khakvar, R, Zarrini, G., & Hasanpour, K. 2021. Detection and molecular characterization of phytoplasmas associated with stone fruit trees in northwest of Iran. Crop Protection. 142: 105526.

Efficiency of Metagenomics Software in Identification of Diversity of Microbial Species inside Russian Olive trees

Nadia Azizpour[a], Sevil Nematollahi[a], Reza Khakvar[b*], Manizheh Jamshidi[a], Mohammad Hossein Norouzi Beirami[c]

a- Plant Protection Dept., Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[*]b- Plant Protection Dept., Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
c-Computer Engineering Dept., Osku Branch, Islamic Azad University, Osku, Iran
[*]Email Address : nematollahi2001@yahoo.com; khakvar@tabrizu.ac.ir

Abstract

Introduction

One of the most important factors for the sustainability of any type of ecosystem is the biodiversity and natural diversity of the organisms of that ecosystem. Therefore, recognizing the species' diversity within each ecosystem helps preserve that environment. Endophytic microorganisms are the most unknown species in any ecosystem because these microorganisms are inside other living species, so they are usually overlooked by biologists unless they cause a specific disease or disorder in their host. On the other hand, because most of these microorganisms are uncultivable, it is impossible to identify them through conventional methods. With the development of the next generation of sequencing (NGS), extracting total DNA from the host is only done once without further repetition of the process in order to sequence all its genomic content, so the sequence of associated species or its endophytes are also found. Metagenomics has been used for microbiota analysis within different ecosystems. However, few reports for its use to identify plant endophytic bacteria are available. Recently, in most Russian Olive trees (Elaeganus angustifolia L.) in and around the city of Tabriz, there have been very clear signs of the leaflet, dwarfing, and rosseting. The cause of this infection has been associated with phytoplasma disease. However, the type and severity of the symptoms indicated the possibility of co-infection with other phytoplasma or other plant pathogens, necessitating a careful study the pathogens in the plant. Therefore, the present study was conducted to identify the genomic content of Russian olive trees infected with phytoplasma disease in the Tabriz region.

Methodology

To evaluate the efficiency of NGS (Next Generation Sequence) for species diversity, the total-DNA of selected Russian olive trees in Tabriz city was extracted and extracted DNAs were stored at -20°C for further use after dissolving in distilled sterile water. Three different DNA samples were prepared for NGS analysis. Each sample consisted of DNA of about 15 different trees. To ensure the removal of accidental microorganisms or surface contaminants, all samples were thoroughly rinsed with sterile distilled water and surface disinfected with alcohol before DNA extraction. The quantity and quality of obtained DNA, with spectrophotometer (Genway-6850 model) and electrophoresis in 1% agarose gel were evaluated. Samples were then sent to Novagen Co. for NGS sequencing. Each sample sent was about 100µL with a concentration of 80 ng/µL. The samples were used by the Illumina 1.9 Novaseq 6000 platform to produce paired-end reads. The requested data volume was set to 12 GB. After receiving NGS data, CLC workbench and Fastqc software were used for the initial evaluation of readings. In the next step, using Metaphylan2 and Kraken software, the genome abundance of each microbial phylum (fungal, bacterial and protozoan) in the data was evaluated. Then, using Bowti2 v2.4.2 software, all readings obtained were aligned with the reference sequences in the NCBI genebank.

Results

Based on the output of CLC workbench and Fastqc software, the quality of data received from Novagen Company was appropriate and acceptable. Data analysis showed that there were a total of 45 million READs inside the submitted file, the reading fragment length was 150bp and the GC% of the total readings in the three submitted samples was between 31-39%. The Phred Score for the readings was about 36 for the whole data, which indicates the good quality of the reads (above 20 is considered acceptable). Sequence Duplication Levels were also obtained very low, which indicates that the reads are appropriate and the data is reliable.The results obtained from Metaphylan2 and Kraken software showed that the inside of the Russian Olive plant is rich in the genomic content of various bacterial, fungal, and protozoan species and so on. Out of 45 million readings, about half a million reads (1.12% of the total) were classified into different microbial phyla and the remaining 98.88% belonged to the

host genome (Russian Olive). Only the species that were found in all three submitted samples are listed. The genomes of more than nine prokaryotes within the Russian Olive trees have been identified. With the exception of one species of archaea, the rest belonged mainly to gram-negative bacteria of the Proteobacteria group. Most of the bacterial genomes identified inside Russian Olive belonged to Mollicutes and Phytoplasma species, which, contrary to expectations, did not include only one species, and the genomes of four different species of Phytoplasma were observed inside the samples.In the analysis of viral genomes, the presence of the genomes of three types of viruses and one type of satellite virus inside the examined samples was confirmed. With the exception of one virus that was identified as an entomopathogen, the rest were plant pathogens. Bombyx mori nucleopolyhedrovirus, which consisted of a large part of the viral genome, is a major pathogen of insects and has been used in the biological control of several species of insects to date.In the study of eukaryotic genomes, the presence of the genomes of yeast fungi of the saccharomycete class and protozoa from the group of Apicomplexa and Amoebae in the samples was confirmed. One of the identified fungi (Eremothecium sp.) belonged to a genus that mainly plant pathogenic and some of its species cause economic damage to plants such as beans and cotton, and other species (Schizosaccharomyces sp.) was a Yeast which has been found in various environments so far. One of the identified protozoa (Eimeria tenella) has been reported to be a pathogen of birds and the other species belonged to the genus (Dictyostelium sp.) which is a type of amoeba whose species have already been identified in plant debris in different countries. According to these reports, there was no doubt that Iranian Russian Olive trees are one of the main but overlooked hosts for phytoplasma diseases and some other diseases. Therefore, identifying the internal microbiome of Russian olive trees in the region seemed interesting and necessary. Identifying every single infection inside a tree or any other environment is very time-consuming and sometimes impossible because there is no mindset about the number and type of microorganisms inside it. Recently, with the development and completion of NGS-based metagenomic experiments, it has become possible to obtain an overview of potential organisms within an ecosystem without spending much time and money.

Conclusion

Identifying each species in an ecosystem and obtaining genomic information from each is a very long and costly task that was impossible to imagine for several years. However, the present study, as an example, shows that the NGS technique can easily and with the least cost and time can obtain valuable information from unknown ecosystems that were previously impossible or very difficult to obtain. This study not only proved that Russian Olive trees in northwestern Iran are infected with more than one phytoplasma, but also the existence of various types of other beneficial or harmful microbes in them was proved for the first time. Knowing about the infection of Russian Olive trees to several pathogens can help plant protection officials and other experts to make better decisions about future development or removal of these trees in the area in future management plants.

Keywords

Biodiversity, Metagenomics, NGS, Metaphylan2