مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰

ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

توالی‌یابی نسل جدید و کاربرد آن در مطالعه میکروبیوم در خاک‌های مهارکننده بیماری‌های گیاهی

20.1001.1.27170632.1400.14.1.1.8

سکینه عباسی[۱]، ناصر صفایی[۲] و اکرم صادقی[*۳]

۱- دانش‌آموخته دکتری گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

aksadeghi@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۴، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۱

صفحه ۱۲-۱

چکیده

پیشرفت در تعیین توالی نسل جدید نقش به‌سزایی در مطالعات مربوط به اکولوژی جمعیت‌های میکروبی داشته است. این پیشرفت‌ها منجر به توسعه سریع در تحقیقات متاژنومیکس (تحلیل دی.ان.ای جمعیت‌های میکروبی بدون نیاز به کشت) شده است. بسیاری از ابزارهای آماری و محاسباتی و پایگاه‌های اطلاعاتی متاژنومیکس منجر به کشف حجم عظیمی از داده‌ها شده است. در این تحقیق علاوه‌بر مرور روش تعیین توالی نسل جدید، ابزارها و روش‌های بیوانفورماتیک مورد استفاده، موارد مطالعه شده درباره میکروبیوم خاک‌های بازدارنده و دست ورزی میکروبیوم جهت مقابله با بیماری‌های گیاهی ارائه و مورد بحث قرار می‌گیرند. خاک بازدارنده به خاکی گفته می‌شود که در آنها با وجود حضور عوامل بیمارگر شناخته‌شده، شیوع بیماری‌های گیاهی بسیار کمتر است. توجه به ساختار و شناسایی دقیق میکروبیوم این خاک‌ها بسیار مورد علاقه طرفداران کاهش مصرف سموم شیمیایی است.

واژه‌های کلیدی: متاژنوم، خاک‌های مهارکننده، ریزوسفر، میکروبیوم، NGS.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.1.8]

مقدمه

خاک یکی از پیچیده‌ترین و چالش برانگیزترین زیست‌محیط‌ها از نظر میکروبیولوژی است. این اکوسیستم حاوی متنوع‌ترین جمعیت‌های میکروبی روی کره زمین است و بیشتر این میکروب‌ها که منبع عظیمی از تنوع متابولیکی و ژنتیکی هستند، هنوز شناسایی نشده‌اند. این منابع می‌توانند برای اهدافی شامل شناسایی و دستیابی به آنزیم‌ها، متابولیت‌های ثانویه، تسریع‌کننده‌های رشد گیاه، عوامل بیوکنترل بیماری‌های گیاهی و تجزیه‌کننده آلاینده‌های زیستی مورد بهره‌برداری قرار گیرند (Liu et al. 2020). عملکرد جمعیت‌های میکروبی خاک می‌تواند در چند نقش کلیدی شامل بهبود جذب نیتروژن و رشد، حفظ رشد گیاه در تنش‌های زنده و غیر زنده، القای مقاومت در برابر بیمارگرها، برهمکنش با بیمارگرهای انسانی یا حشرات خلاصه شود (White et al. 2016).

از نقطه نظر تاریخی مطالعات انجام‌شده در زمینه برهمکنش میکروب-گیاه تاکنون به‌طور عمده روی برهمکنش‌های گیاه-بیمارگر، گیاه-قارچ میکوریز و یا عامل بیوکنترل-گیاه-قارچ بیمارگر متمرکز بوده است. اما شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد گروه‌های دیگری از ریزسازواره‌های (microorganisms) خاک نیز بر این برهمکنش تاثیر می‌گذارند. جمعیت اکولوژیکی ریزسازواره‌های یک محیط شناخته‌شده را میکروبیوم یا میکروبیوتا می‌نامند (Sebastien et al. 2015) که فراوانی آن در ریشه (ریزوسفر) بیشتر از قسمت‌های هوایی (فیلوسفر) است (10^7-10^6 سلول در سانتی‌متر مربع برگ و 10^9-10^6 سلول در گرم خاک) (Lindow and Brandl, 2003).

میکروبیوم ریزوسفر شامل جمعیت‌های باکتریایی یا قارچی است که ناحیه روپوست ریشه را احاطه کرده‌اند. برهمکنش گیاه-میکروبیوم ممکن است به نفع یک یا هر دو طرف باشد و یا برای هیچ یک از دو طرف سود یا ضرری نداشته باشد (Knief, 2014). برای روشن شدن بهتر این برهمکنش‌ها لازم است از روش‌هایی استفاده شود که به این سوالات پاسخ دهد:

چه جمعیتی در یک مکان وجود دارد؟ چه کاری انجام می‌دهند؟ در این شرایط چطور زندگی می‌کنند؟ چگونه به تغییرات محیطی پاسخ می‌دهند؟ چگونه با یکدیگر ارتباط برقرار می‌کنند؟ و چگونه بر سلامت و توسعه گیاه تاثیر می‌گذارند؟

همانند سایر یوکاریوت‌ها، گیاه و میکروبیوم آن همراه هم می‌توانند به‌عنوان یک موجودات برتر

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.1.8]

(superorganisms) در نظر گرفته شوند زیرا گیاه برای برخی از فعالیت‌های خاص خود به این میکروب‌ها وابسته است. در عوض گیاهان بیش از ۲۱ درصد از کربنی را که در طی فتوسنتز کسب کرده‌اند، به‌واسطه ریشه در اختیار میکروبیوم قرار می‌دهند. جمعیت میکروبی از ترشحات ریشه استفاده می‌کند که بر تنوع و فعالیت آن‌ها تاثیر می گذارد. علاوه‌براین، ژنوتیپ گیاه و مرحله فیزیولوژیکی میزبان نیز بر جمعیت میکروبی تاثیرگذار است. حتی فرض‌شده است که گیاهان به‌صورت فعالانه، ریزسازواره‌های مفید خاک را در جهت مقابله با حمله بیمارگر به طرف خود جذب می‌کنند (Bulgarelli et al. 2013). در این زمینه، وجود خاک‌های مهارکننده بیماری یکی از پدیده‌های به خوبی شناخته‌شده است. این خصوصیت یک اثر القاشده توسط میکروبیوم ساکن خاک است که مکانیسم عملکرد آن هنوز به خوبی شناسایی نشده است.

جداسازی و مطالعه بر روی ٪۹۹ از پروکاریوت‌ها سخت است. زیرا بسیاری از آنها برای فرآیندهای زیستی وابسته به سایر موجودات بوده و از نظر رشد درون شیشه‌ای ناموفق هستند (Whitman et al. 1998). تمرکز روی مولکول دی.ان.اِ که یک مولکول بسیار پایداراست و می‌توان آنرا از سلول‌های زنده و غیر زنده جداسازی کرد باعث شده است که این موانع برطرف شوند. دی.ان.ای استخراج‌شده از یک نمونه از میکروبیوم متاژنوم نامیده می‌شود. آنالیزهای ژنومی سویه‌های میکروبی یا مطالعات متاژنومیکس (تحلیل ژنتیکی مستقیم موجود در یک نمونه محیطی بدون نیاز به کشت) کل جمعیت‌های میکروبی دیدگاه‌هایی را در مورد ترکیب، ساختار و پتانسیل فیزیولوژیکی ریزسازواره‌های همراه گیاه فراهم می‌کند. مطالعه ریزسازواره‌ها و استفاده صنعتی از آن‌ها به دلیل عدم قابلیت کشت بخش قابل توجهی از جمعیت‌های متنوع میکروبی محدود شده است. به‌تازگی متاژنومیکس به‌عنوان ابزار قدرتمندی برای بررسی تنوع جمعیت‌های میکروبی پیچیده معرفی شده و دسترسی به شماری از گونه‌های جدید، ژن‌های جدید یا آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مرتبط با کاربردهای بیوتکنولوژی و کشاورزی را فراهم کرده است (Mocali and Benedetti, 2010).

در این مطالعه علاوه‌بر معرفی متاژنومیکس و ابزارهای مورد استفاده در آن، داده‌های توالی‌یابی نسل جدید (next generation sequencing) به دست آمده از مطالعات تنوع میکروبی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.1.8]

مهارکننده‌های بیماری مورد بحث قرار می‌گیرد. از آنجایی‌که کلونینگ و تعیین توالی که به‌صورت معمول برای حجم عظیمی از نمونه‌ها استفاده می‌شوند، روش‌های پرزحمت و زمان‌بری هستند. توسعه روش‌های انگشت‌نگاری مولکولی برای تحلیل محصول PCR، ابزار قدرتمند و سریعی را برای درک تغییرات و تنوع جمعیت‌های میکروبی ارائه می‌کند. محدودیت روش‌های موجود به‌طور عمده به ژن هدف و کارایی تکثیر PCR که دانش محدودی از قسمت محدودی از جمعیت‌های میکروبی را ارائه می‌دهد، مربوط می‌شود (Fakruddin et al. 2013; Escalona et al. 2016).

کاهش مستمر در هزینه‌های تعیین‌توالی با بازده بالا، تعیین توالی حجم بالایی از دی.ان.ای جمعیت‌های متنوع میکروبی را ممکن ساخته و اطلاعات مفصلی از کل اکوسیستم را ارائه می‌کند که قبلا تصور می‌شد قابل دستیابی نیستند. بنابراین با بررسی سیستمیک، کل مواد ژنتیکی جداشده از نمونه‌های محیطی را می‌توان دسته‌بندی و دستکاری کرد. دانستن ساختار، عملکرد، فعالیت و تغییرات جمعیت‌های میکروبی در محیط‌های طبیعی یکی از چالش‌های علمی است. پیش از این، روش‌هایی شامل T-RFLP، DGGE، ARDRA، PLFA، SSCP و دی.ان.ای میکروواری برای تعیین خصوصیت ساختار میکروبی خاک استفاده می‌شد (Oulas et al. 2015) که از جامعیت کمتری نسبت به روش‌های جایگزین نوین برخوردار هستند.

اکثر گروه‌های تحقیقاتی تلاش‌هایی برای توسعه عوامل جایگزین تعیین‌توالی دی.ان.ای انجام داده‌اند. تکثیر متاژنومی براساس تکثیر برخی ژن‌های خاص و حفاظت‌شده مانند *16S rRNA* به‌عنوان ژن نشانگر که به‌تازگی به‌صورت وسیع انجام شده است، روش سریعی برای به‌دست آوردن پروفایل پراکنش جمعیت/تاکسونومی یا انگشت‌نگاری است. در این روش برای توالی‌یابی از سیستم Illumina MiSeq استفاده می‌شود (White et al. 2016). این سیستم در سال ۲۰۱۱ راه‌اندازی شده و یک سیستم تعیین‌توالی ساده، با کارایی بالا و قابل مقایسه برای بررسی ساختار و ترکیب جمعیت‌های محیطی و کلینیکی است (Frey-Klett et al. 2011). توالی‌های خوانده‌شده با طول بلند و تعداد کمتر می‌تواند برای برخی پروژه‌ها مزیت داشته باشند (Fadrosh et al. 2014).

قطعه‌های دسته‌بندی‌شده می‌توانند از هر دو انتها (paired-end)، قطعه‌ای با طول ۶۰۰ جفت‌باز ایجاد کنند که برای مونتاژ یک مزیت محسوب می‌شود. بازده این سیستم عامل، ۱۵GB و ۲۵

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.1.8]

میلیون توالی خوانده‌شده با طول ۳۰۰ جفت‌باز است. این سیستم برای پروژه‌های متاژنومیکس در مقیاس کوچکتر یا بررسی اولیه نمونه قبل از تعیین توالی عمیق با HiSeq مناسب‌تر است. تعیین توالی شامل چهار مرحله به شرح زیر است:

آماده‌سازی کتابخانه

در این مرحله کتابخانه‌ها با قطعه‌قطعه شدن مواد ژنومی و افزودن آداپتورها آماده می‌شوند. آداپتورها در تعیین‌توالی و تکثیر قطعه‌ها نقش دارند. تهیه کتابخانه ژنومی برای متاژنومیکس با استفاده از ژن نشانگر به دو روش انجام می‌شود.

در روش اول، دو مرحله PCR با جفت آغازگرهای مختلف انجام می‌شود. در PCR نخست، از دو آغازگر شامل آغازگر اختصاصی ژن (۲۰ نوکلئوتید) و آغازگر تعیین توالی Illumina (هفت نوکلئوتید) استفاده می‌شود (Tag1, Tag2). در PCR دوم نیز از دو آغازگر به این شرح استفاده می‌شود که، آغازگر تعیین توالی Illumina (هفت نوکلئوتید)، مولکول شناسایی‌کننده یا بارکد MID1–MID2 (۸–۱۲ نوکلئوتید) و آداپتور Illumina (P7, P5) ۲۹ نوکلئوتید است. بارکد یک توالی دی.ان.ای کوتاه است که در طی تکثیر به هر توالی خوانده‌شده اضافه می‌شود و برای هر نمونه اختصاصی است (شکل ۱). این کار باعث می‌شود که نمونه‌ها برای کاهش هزینه توالی‌یابی با هم مخلوط شوند (multiplexed). در انتها در مرحله تجزیه و تحلیل توالی‌ها نمونه‌ها de-multiplexed یا از هم جدا می‌شوند.

روش دوم فقط یک مرحله PCR و یک جفت آغازگر دارد: ۲۹ نوکلئوتید آداپتور Illumina، هشت نوکلئوتید مولکول شناسایی کننده یا بارکد MID1–MID2 (فقط برای آغازگر پس رو)، ۱۰ نوکلئوتید pad برای جلوگیری از تشکیل ساختار سنجاق سر (hairpin)، دو نوکلئوتید که مکمل ژن *16S rRNA* نباشد و ۲۰ نوکلئوتید آغازگر اختصاصی ژن (Fadrosh et al. 2014).

تکثیر دسته‌ای

کتابخانه‌ها روی سطح صفحه بارگذاری می‌شوند. قطعه‌های ژنومی روی سطح آن هیبرید می‌شوند. هر قطعه متصل‌شده با تکثیر کانالی (bridge amplification) به‌صورت خوشه انبوه تکثیر می‌شود.

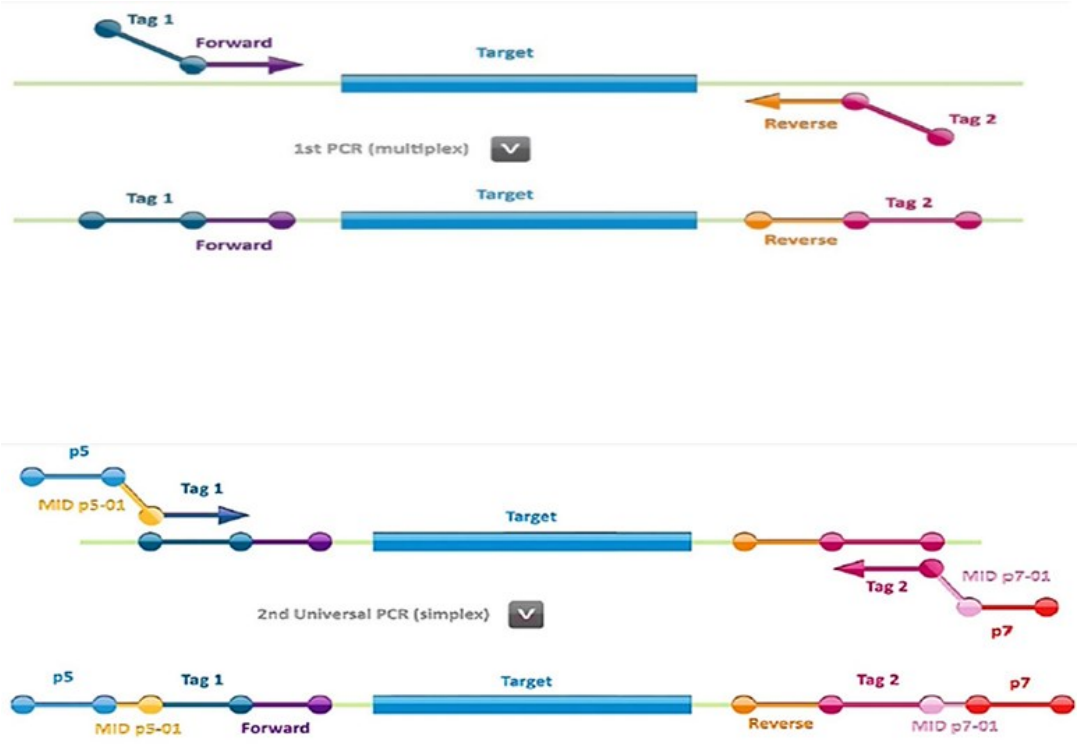
تعیین‌توالی

معرف‌های تعیین توالی شامل نوکلئوتیدهای نشان‌دارشده با فلورسانس است که به اولین باز اتصال‌یافته، اضافه می‌شود. سطح تکثیر تصویربرداری شده و تشعشع هر خوشه ثبت می‌شود. طول موج تشعشع و شدت آن برای

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.1.8]

شناسایی باز استفاده می‌شود. این چرخه n بار تکرار می‌شود تا توالی به طول قطعه را ایجاد کند.



شکل ۱- نحوه اتصال آغازگرهای مورد استفاده برای تهیه کتابخانه در روش دو مرحله‌ای

هم‌ردیف‌سازی و تحلیل داده‌ها

توالی‌های خوانده‌شده توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک با توجه به توالی رفرنس هم ردیف می‌شوند. بعد از هم ردیف‌سازی تفاوت‌های بین ژنوم رفرنس و توالی‌های جدید شناسایی می‌شود (www.Illumina.com).

متاژنومیکس براساس ژن نشانگر

ابتدا نواحی ژنومی حفاظت‌شده اما متغیر (به‌طور معمول نواحی خیلی متغیر ژن *16S rRNA*) تکثیر و تعیین توالی می‌شوند. سپس این توالی‌ها (آمپلیکون) به‌صورت operational taxonomic units (OTUs) دسته‌بندی می‌شوند. آمپلیکون قطعه‌ای از دی.ان.اِ مانند یک یا چند ناحیه متغیر از *16S rRNA* یا دیگر ژن‌های نشانگر است که با PCR تکثیر می‌شود. اغلب پژوهشگران از آغازگرهای استاندارد PCR استفاده می‌کنند. OTU جداکننده گونه‌هاست که به‌صورت تیپیک با استفاده از rRNA و درصد شباهت دسته‌بندی می‌شود. این روش اغلب برای شناسایی اعضای جمعیت‌های میکروبی یا برای مقایسه ترکیب این

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.1.8]

جمعیت‌ها در نمونه‌های مختلف به کار می‌رود. این روش دانش وسیعی به سمت الگوهای تکاملی، اکولوژیکی و عملکردی ژن‌های مهم شناسایی‌شده در ریزسازواره‌های اکوسیستم‌های مختلف ارائه می‌کند. مطالعات متعددی براساس ژن‌های *16S rRNA* به عنون نشانگر برای باکتری‌ها و آرکئی‌ها و *18S rRNA* یا ITS به‌عنوان نشانگرهای قارچی انجام شده است (Fadrosh et al. 2014).

به طور معمول ابزارهایی که برای تحلیل اطلاعات *16S rRNA* به کار می‌رود شامل QIIME، Mothur، SILVAngs و MEGAN است. اگرچه دسترسی وسیعی به الگوریتم‌ها و نرم‌افزارها برای تحلیل اطلاعات متاژنومیکس 16S وجود دارد به نظر می‌رسد QIIME به‌عنوان "استاندارد طلایی" ایجاد شده است (Fadrosh et al. 2014). تجزیه و تحلیل‌ها به‌طور معمول نیاز به یک پایگاه اطلاعاتی مرجع دارند که برای یافتن نزدیکترین تطابق با OTU از یک خط نسلی تاکسونومیک جست‌وجو شوند. Greengenes (16S)، Ribosomal Database Project (16S)، Silva (16S+18S) و Unite (ITS) برخی از این پایگاه‌های اطلاعاتی هستند. این پایگاه‌ها برای گروه‌های خاصی از ریزسازواره‌ها مانند پروتیستا و ویروس‌ها که متنوع هستند و اطلاعات کمتری از توالی آن‌ها در دسترس است، مناسب نیستند.

تعیین تاکسونومی OTU با استفاده از الگوریتم‌های مختلف انجام می‌شود. نرم‌افزار QIIME از الگوریتم‌های مختلف مثل BLAST، RDP، RTAX، Mothure classifier و uclust جهت جستجو برای نزدیکترین هم‌خوانی با OTU از یک خط نسلی تاکسونومیکی استنباط‌شده، پشتیبانی می‌کند. از الگوریتم‌های دسته‌بندی می‌توان به uclust و cd hit اشاره کرد. که اولی بر دومی برتری دارد زیرا روش سریعی است، به‌صورت معنادار از حافظه کمتری استفاده می‌کند، خیلی حساس است و در شباهت‌های کمتری دسته‌بندی را انجام می‌دهد. cd hit اغلب در شناسایی دسته‌هایی با شباهت کمتر ناموفق است اما uclust به ندرت یک هم‌خوانی را از دست می‌دهد و بیشترین حالت‌های با امکان هم خوانی را پیدا می‌کند. هم‌چنین قادر به دسته‌بندی تعداد بیشتری از توالی‌ها است.

آنالیزهای آماری و نمایش نتایج

QIIME شامل نمایشی از درخت تاکسونومیکی در فرمت newick و یک فایل Biom (biological observation matrix) که جدول OTU را نشان می‌دهد، است. به‌علاوه، تنوع آلفا

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.1.8]

(تنوع در یک نمونه مثل تنوع فیلوژنتیکی) و تنوع بتا (تنوع مابین نمونه‌ها مثل PCoA) به همراه ترکیب تاکسونومی و تحلیل‌های فیلوژنتیک از طریق QIIME پشتیبانی می‌شوند. به‌تازگی زبان برنامه‌نویسی R برای تحلیل‌های چندمتغیره استفاده می‌شود. در نهایت مدیریت داده‌ها، ذخیره و به اشتراک‌گذاری آنها انجام می‌شود. تفسیر متاژنوم تاییدکننده تحلیل‌های فیلوژنتیک، شناسایی تاکسون‌ها، شناسایی و فراوانی جمعیت میکروبی، مقایسه جمعیت‌ها، تحلیل جمعیت غالب و تحلیل مقایسه‌ای جمعیت‌های میکروبی مختلف (اگر بیش از دو نمونه باشد) است (Fadrosh et al. 2014).

نمونه‌های مورد مطالعه دربررسی‌های مربوط به بیوکنترل بیماری‌های گیاهی

میکروبیوم رایزوسفر کلید تعیین‌کننده سلامتی گیاه و حاصلخیزی خاک است که در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Hassani et al. 2016; Bulgarelli et al. 2013). جمعیت‌های میکروبی از طریق تعامل با میزبان، بیمارگر و دیگر عوامل بیوکنترل روی کنترل بیماری تاثیر می‌گذارند (Abbasi et al. 2014; Abbasi et al. 2015; Abbasi et al. 2016; Abbasi et al. 2019). فهم بهتر این تعامل‌ها فرصت‌هایی برای توسعه روش‌های جدید بیوکنترل بیماری‌های گیاهی را فراهم خواهد کرد (Abbasi et al. 2020a; Abbasi et al. 2020c). برای مثال بقای فرمولاسیون یا زمان به کارگیری عوامل بیوکنترل می‌تواند بهبود داده شود و سویه‌های میکروبی helper را می‌توان انتخاب کرد (Jijakli et al. 2015).

در مطالعه‌ای که توسط هونگ و همکاران (۲۰۱۷) انجام شد از دو عامل بیوکنترل *B. subtilus* SQR-N1 و *T. harzianum* SQRT37 ترکیب‌شده با ماده آلی برای کنترل بیماری گیاهچه میری خیار با عامل بیمارگر *Rhizoctonia solani* استفاده شد. ارزیابی تغییرات جمعیت میکروبی با استفاده از Miseq pyrosequencing در طول آزمایش انجام شد. نتایج نشان داد که به کارگیری مواد آلی با عوامل بیوکنترل به‌صورت معناداری جمعیت *R. solani* و وقوع بیماری در خیار را کاهش و فعالیت و جمعیت میکروبی خاک را افزایش داد (Huang et al. 2017). خاک‌های بازدارنده از بیماری در اکوسیستم‌هایی وجود دارند که گیاهان آسیب کمتری از بیمارگرهای خاک‌زی متحمل می‌شوند. مندس و همکاران (۲۰۱۱) با تلفیق مطالعه میکروبیوم ریزوسفر با روش‌های مبتنی‌بر کشت، تاکسون‌های کلیدی و

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.1.8]

ژن‌های درگیر در مهار بیمارگر قارچی ریشه را شناسایی کردند. بیشتر از ۳۳ هزار گونه باکتری و آرکئی شامل Proteobacteria، Firmicutes (Lactobacillaceae) و Actinobacteria تشخیص داده شد که مرتبط با مهار بیماری بودند. اعضای گاما پروتئوباکتریا با تولید پپتیدسنتتازهای غیرریبوزومی فعالیت بازدارندگی از بیماری را نشان دادند. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تغییر فراوانی چندین تاکسون باکتریایی مهم ترین عامل مهار بیماری است و تاثیر بیشتری نسبت به حضور تاکسون‌های خاص باکتریایی دارد (Mendes et al. 2011). نتایج ارزیابی مزرعه‌ای جمعیت‌های میکروبی خاک‌های بازدارنده از بیماری و خاک‌هایی که بیماری اسکب سیب زمینی در آن شیوع داشت نشان داد که توالی‌هایی از *Lysobacter* و *Bacillus* در خاک‌های بازدارنده از بیماری بیشترین فراوانی را دارند (Rosenzweig et al. 2012).

در مطالعه‌ای که توسط توسط یانشا و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد، میزان فراوانی چند جنس از باکتری‌های مفید ریزوسفر در سه رقم با درجه‌های مقاومت متفاوت به بیماری سیاهک ارزن *Ustilago crameri* بررسی شد. نتایج نشان داد که ارقام مختلف، جمعیت‌های باکتریایی مختلف *Bradyrhizobium* و *Streptomyces* را در ریزوسفر جذب می‌کنند که با مهار بیماری سیاهک مرتبط است. این جنس‌های باکتریایی را می توان به‌عنوان باکتری‌های بالقوه علیه بیماری سیاهک معرفی و استفاده کرد (Yansha et al. 2016).

چاپل و همکاران (۲۰۱۶) دی.ان.اِ و آر.ان.اِی میکروبیوم ریزوسفر گیاهچه‌های چغندرقند رشدیافته در خاک‌های بازدارنده *Rhizoctonia solani* را مطالعه کردند. نتایج متاژنومیکس نشان داد، جمعیت‌های Oxalobacteraceae، Burkholderiaceae، Sphingobacteriaceae و Sphingomonadaceae به‌صورت معناداری در ریزوسفری که مورد تهاجم قارچ قرار گرفته است، افزایش یافته بودند. نتایج متاترانسکریپتومیکس نیز نشان داد فراوانی ژن‌های مرتبط با تنش (متابولیسم ppGpp و تنش اکسیداسیون) در این تیمارها افزایش پیدا کرده است. در مجموع می‌توان گفت حمله قارچ بیمارگر به‌صورت مستقیم و یا از طریق ایجاد واکنش‌های مربوط به تنش در گیاه منجر به تغییر در ترکیب میکروبیوم شد و جمعیت رایزوباکتری‌های آنتاگونیستی که حمله عامل بیمارگر را محدود می‌کنند را زیاد کرده بود. *R. solani* در طی رشد هیفی به سمت گیاه اکسالیک اسید و فنیل استیک اسید تولید می‌کند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.1.8]

این مواد خانواده‌های ریزوباکتریایی خاصی را در میکروبیوم ریزوسفر فعال می‌کند و به‌صورت مستقیم یا غیر مستقیم تنش اکسیداسیون را در گیاه القا می‌کند. این تنش، واکنشی را در خانواده‌های باکتریایی ذکرشده از طریق مسیر سیگنال‌دهی ppGpp آغاز می‌کند که منجر به فعال‌سازی سازوکارهای بقا مانند تحرک، تشکیل بیوفیلم و تولید متابولیت‌های ثانویه این باکتری‌ها می‌شود. این تغییرات در مجموع مقاومت گیاهی را القا کرده و همزمان ریزسازواره‌های دیگر ریزوسفر را نیز فعال می‌کند تا حمله قارچی را مهار کنند (Chapelle et al. 2016). اکتینوباکترها فراوان‌ترین و متغیرترین تاکسون موجود در خاک‌های بازدارنده از بیماری هستند. این باکتری‌ها ممکن است نقش مفیدی برای گیاهان از جمله تأمین مواد مغذی، ایجاد تحمل در برابر تنش‌های غیر زیستی (Abbasi et al. 2020b) و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی و اوومیستی داشته باشند (Abbasi et al. 2020a; Abbasi et al. 2021a). همزمانی حضور میکروب‌ها ممکن است به دلیل روابط متقابل تغذیه‌ای باشد. در این شرایط، متابولیت‌های یک میکروب ممکن است توسط جمعیت‌های دیگر استفاده شده و باعث افزایش گونه‌های میکروبی پاسخ‌دهنده به عامل بیماری ایجاد شده توسط عامل بیمارگر شود (Abbasi et al. 2021b).

نتیجه‌گیری

بررسی جمعیت‌های میکروبی با استفاده از مطالعات متاژنومیکسی و توالی‌یابی نسل جدید در ریزوسفر خاک، می‌تواند فرصت‌های جدیدی را به سمت شناسایی جامع عوامل آنتاگونیست مرتبط با مبحث مهار بیماری در خاک‌ها ایجاد کند. مکانیسم‌های درگیر در بیشتر خاک‌های بازدارنده از بیماری، هنوز ناشناخته هستند و بهره‌برداری از روش‌های مولکولی نوین به ویژه توالی‌یابی نسل جدید می‌تواند افق تازه‌ای را در این زمینه به روی دانشمندان باز کند. مکانیسم مهارکنندگی می‌تواند حضور جنس‌ها و سویه‌های جدید و مفید مانند *Amycolatopsis*، *Bradyrhizobium* و *Bacillus* باشد. توسعه کاربرد این عوامل که در ریزوسفر غالب شده و بهینه‌سازی ترکیب آنها جهت تغییر در جمعیت میکروبی باعث کاهش کلنیزاسیون‌های بیمارگر شده و می‌تواند نقش مهمی در مدیریت بیماری‌ها ایفا کند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.1.8]

فهرست منابع

References

Abbasi S, Sadeghi A, Omidvari M, Tahan V. 2021a. The stimulators and responsive genes to induce systemi resistance against pathogens: an exclusive focus on tomato as a model plant. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 101993.

Abbasi S, Sadeghi A, Safaie N. 2020b. *Streptomyces* alleviate drought stress in tomato plants and modulate the expression of transcription factors *ERF1* and *WRKY70* genes. Scientia Horticulturae. 265: 109206.

Abbasi S, Sadeghi A, Safaie N. 2020c. Biological control of cucumber seedling blight by Siderophore and cellulase producing *Streptomyces* strains in extreme conditions. Biological Journal of Microorganism. 9(33): 1-13.

Abbasi S, Safaie N, Sadeghi A, Shams-bakhsh M. 2020a. Tissue-specific synergistic bio-priming of pepper by two *Streptomyces* species against *Phytophthora capsici*. PLoS ONE. 15(3): e0230531.

Abbasi S, Safaie N, Sadeghi A, Shams-bakhsh M. 2019. *Streptomyces* strains induce resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in tomato through different molecular mechanisms. Frontiers in Microbiology. 01505.

Abbasi S, Safaie N, Shamsbakhsh M, Shahbazi S. 2015. Evaluation of antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* mutants against some plant pathogenic fungi in vitro. Plant Protection (scientific journal of agriculture). 37: 91-102.

Abbasi S, Safaie N, Shams-bakhsh M, Shahbazi S. 2016. Biocontrol activities of gamma induced mutants of *Trichoderma harzianum* against some soilborne fungal pathogens and their DNA fingerprinting. Iranian Journal of Biotechnology. 14: 260–269.

Abbasi S, Safaie N, Shams-bakhsh M. 2014. Evaluation of gamma-induced mutants of *Trichoderma harzianum* for biological control of charcoal rot of melon (*Macrophomina phaseolina*) in laboratory and greenhouse conditions. Journal of Crop Protection. 3(4): 509-521.

Abbasi S, Spor A, Sadeghi A, Safaie N. 2021b. Streptomyces strains modulate dynamics of soil bacterial communities and their efficacy in disease suppression caused by *Phytophthora capsici*. Scientific Reports In press.

Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Munch PC, Weiman A, Droge J, Pan Y, Schulze-Lefert P. 2015. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. Cell host and Microbe. 17(3): 392-403.

Chapelle E, Mendes R, Bakker PA, Raaijmakers JM. 2016. Fungal invasion of the rhizosphere microbiome. The ISME Journal. 10: 265–268.

Escalona M, Rocha S, Posada D. 2016. A comparison of tools for the simulation of genomic next-generation sequencing data. Nature Reviews. 17: 459.

Fadrosh DW, Ma B, Gajer P, Sengamalay N, Ott S, Brotman RM, Ravel J. 2014. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. Microbiome. 2: 6.

Fakruddin R, Mazumdar M, Chowdhury A, Hossain N, Mahajan S, Islam S. 2013. Pyrosequencing-a next generation sequencing technology. World Applied Sciences. 24 (12): 1558-1571.

Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, Sarniguet A. 2011. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. Microbiology and Molecular Biology Review. 75: 583–609.

Hassani MA, Duran P, Hacquard, S. 2018. Microbial interactions within the plant holobiont. Microbiome. 6: 58.

Huang X, Huiling C, Yang L, Tao L, Zhang J, Zucong C. 2017. The microbial changes during the biological control of cucumber damping-off disease using biocontrol agents and reductive soil disinfestation. BioControl. 62:97–109.

Jijakli H, Margarita M-M, Sebastien M. 2015. Biological control in the microbiome era: challenges and opportunities. Biological control 89: 98-108.

Knief C. 2014. Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. Frontiers in Plant Science. 5: 216.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.1.8]

Lindow SE, Brandl MT. 2003. Microbiology of the phyllosphere. Applied Environmental Microbiology 69: 1875–1883.
Liu H, Brettell LE, Qiu Z, Singh BK. 2020. Microbiome-mediated stress resistance in plants. Trends in Plant Science 25: 8.
Mendes R, Kruijt M, Bruijn I, Dekkers E, Voort M. 2011. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. Science. 332: 1097-1100.
Mocali S, Benedetti A. 2010. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. Research in Microbiology. 161: 497–505.
Oulas A, Pavloudi C, Polymenakou P, Pavlopoulos GA, Papanikolaou N, Kotoulas G, Arvanitidis, C, Iliopoulos I. 2015. Metagenomics: Tools and insights for analyzing data derived from biodiversity studies next-generation sequencing. Bioinformatics and Biology insights. 9.
Rosenzweig N, Tiedje JM, Quensen JF, Meng QX, Hao JJJ. 2012. Microbial communities associated with potato common scab-suppressive soil determined by pyrosequencing analyses. Plant Disease. 96: 718–725.
Sebastien M, Margarita MM, Haissam JM. 2015. Biological control in the microbiome era: Challenges and opportunities. Biological Control. 89: 98–108.
White RA, Callister SJ, Moore RJ, Baker ES, Jansson JK. 2016. The past, present and future of microbiome analyses. Nature protocol. 11: 11 (2049-2054).
Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. PNAS. 95: 6578–6583.
Xue C, Ryan Penton C, Shen Z, Zhang R, Huang Q, Li R, Ruan Y, Shen Q. 2015. Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. Scientific Reports. 11124.
Yansha H, Lixia X, Liu L, Yi M, Guo E, Zhang A, Yi H. 2016. Illumina sequencing reveals a rhizosphere bacterial community associated with foxtail millet smut disease suppression. Plant and Soil. 41: 411-421.

Next Generation Sequencing and its Application in the Study of Microbiome in Plant Diseases Suppressive Soils

Sakineh Abbasi[1], Naser Safaie[1], Akram Sadeghi[2*]

1- Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2- Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
aksadeghi@abrii.ac.ir

Abstract

Progress in next-generation sequencing has played a significant role in ecological studies of microbial populations. These advances have led to a rapid evaluation in metagenomics studies (analysis of DNA of microbial communities without the need to culture). Many statistical and computational tools and metagenomics databases have led to the discovery of huge amounts of data. In this research, in addition to a review of the new generation sequencing method, tools and bioinformatics methods used, the case studies about the microbiome of suppressive soils and manipulation of the microbiome to fight off plant diseases are presented and discussed. Suppressive soil is a soil in which the plant diseases incidence occurs at a low rate despite the presence of known pathogens. Attention to the structure and accurate identification of the microbiome of these soils is very interesting to devotees of reducing the use of chemical pesticides.

Keywords: Metagenome, Biocontrol, Rhizosphere, Microbiome, NGS.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-20]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.1.8]