ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٧
صفحه ٤٧٧ - ٤٥٩

# مطالعه تنوع میکروبیوم چسبیده به ذرات کاه برنج در شکمبه گوسفند: آنالیز مقایسه‌ای بین دو روش تعیین توالی 16S rDNA و کل متاژنوم

# Study of rice straw-adherent sheep rumen microbiome diversity: a comparative 16S rDNA and whole metagenome analysis

سید محمدفرهاد وحیدی[1]، قاسم حسینی سالکده[2]، فضل‌اله افراز[3]، مهرداد بهمنش[*1]

١- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
٢- استاد، بخش زیست شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان آموزش، تحقیقات و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
٣- استادیار، بخش بیوتکنولوژی دام و طیور و آبزیان، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور، رشت، ایران

**Vahidi MF[1], Hosseini Salekdeh Gh[2], Afraz F[3], Behmanesh M[*1]**

1- PhD Student, Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education, and Extension Organization, Karaj, Iran
3- Assistant Professor, Department of Livestock and Aquaculture Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of North Region, Rasht, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Behmanesh@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ٩٧/٨/٦ - تاریخ پذیرش: ٩٧/١٢/١٥)

## چکیده

**شکمبه را به‌عنوان یکی از ظریف‌ترین و پیشرفته‌ترین سیستم‌های هضم سلولزی در طبیعت توصیف کرده‌اند. میکروبیوم موجود در شکمبه با اتصال و کلونیزه شدن روی مواد غذایی و ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده فیبر، ترکیبات لیگنوسلولزی را تجزیه و به ترکیبات قابل استفاده برای حیوان میزبان تبدیل می‌کنند. هدف از این تحقیق شناسایی و درک ارتباط بین مهم‌ترین باکتری‌هایی است که طی انکوباسیون کاه برنج در شکمبه آن را کلونیزه می‌کنند. هم‌چنین در این مطالعه اثر استفاده از دو نوع داده متفاوت حاصل از تعیین توالی مبتنی بر آمپلیکون (ناحیهٔ V3-V4 ژن *16S rRNA*) و مبتنی بر کل متاژنوم بر روی آنالیز اجتماعات میکروبی چسبیده به کاه برنج با یکدیگر مقایسه شدند. در این مطالعه از سه راس گوسفند نژاد شال فیستوله شده برای انکوبه کردن کاه برنج در دوره‌های زمانی ٢٤، ٤٨، ٧٢ و ٩٦ ساعت استفاده شد. پس از جداسازی باکتری‌ها و استخراج DNA، از دو روش Illumina Miseq 300PE و Hiseq4000, 100bp PE به‌ترتیب برای تعیین توالی ناحیهٔ V3-V4 ژن 16S rRNA و کل متاژنوم استفاده شد. پروفایل تاکسونومیکی و آنالیز تنوع و غنای میکروبی برای هر دو مجموعه داده، تهیه و با یکدیگر مقایسه شد. نتایج نشان داد که یک اثر هم‌افزایی و همپوشانی بین اعضای فیلوم‌های شناسایی شده وجود دارد و با در نظر گرفتن فراوانی نسبی به‌نظر می‌رسد که اعضای فیلوم‌های *Firmicutes*، *Fibrobacter* و *Spirochaetes* نقش حیاتی در این زمینه ایفا می‌کنند. یک همبستگی ضعیف بین دو روش تعیین توالی مورد استفاده مشاهده شد. شاخص‌ترین وجه تمایز بین دو روش تعیین توالی، شناسایی باکتری‌ها در سطح گونه بود که روش Hiseq به لحاظ پوشش ژنومی و نوع الگوریتم تشخیصی قدرتمندتر ظاهر شد. هم‌چنین مشاهده شد که نوع نرم‌افزارهای انتخابی برای طبقه‌بندی تاکسونومیکی می‌تواند نقش حیاتی و حتی قدرت تفکیک بیش‌تری نسبت به نوع تکنولوژی انتخابی برای تعیین توالی کل متاژنوم و هم‌چنین نوع ناحیه انتخاب شده برای تکثیر و توالی‌یابی ژن هدف داشته باشد.**

**واژه‌های کلیدی**
شکمبه
کاه برنج
متاژنوم
Illumina Hiseq
Illumina Miseq

[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

## مقدمه

با افزایش فراوانی و وفور نعمت در اقتصادهای نوظهور، انتظار می‌رود که تقاضای جهانی برای عرضه کافی و پایدار از گوشت و شیر تا سال ۲۰۵۰ دو برابر شود (چشم اندازه اقتصاد جهان در سال ۲۰۵۰- گزارش مجله اکونومیست، موسسه عالی آموزش و پژوهش مدیریت و برنامه‌ریزی، ریاست جمهوری، ۲۱ تیرماه ۱۳۹٤). با افزایش تقاضا برای محصولات حیوانی، کشاورزان با چالش‌های اجتماعی- اقتصادی و زیست محیطی متعدد مواجه هستند. در این راستا تولید پایدار و افزایش امنیت غذایی یک چالش بزرگ برای بشریت به حساب می‌آید. شیوه‌های تولید پایدار برای پرورش حیوانات به استفاده کارآمدتر از خوراک و معرفی گزینه‌های جدید خوراکی نیاز دارد (Wiebe et al. 2015). عمده محدودیت امروز در بخش حیوانات اهلی هزینه خوراک بالا و کیفیت پایین منابع خوراک موجود، خصوصاً در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. بهره‌برداری بی رویه از منابع پایه سبب محدودیت در توسعه تولیدات کشاورزی، تخریب مراتع و محدودیت منابع علوفه نسبت به نیازهای جمعیت دامی شده‌است. اما در عین حال، سالانه حجم عظیمی از بقایای کشاورزی حاصل می‌شود که می‌توان از آن‌ها در تغذیه دام استفاده نمود (Malik et al. 2015). یکی از این محصولات فرعی کاه برنج است که به‌دلیل ساختار فیبری بالا و هم‌چنین محتوای بالای لیگنین و سیلیس از قابلیت هضم پایین در شکمبه نشخوارکنندگان برخوردار بوده و رغبت چندانی برای استفاده از آن در تغذیه دام وجود ندارد. مطالعات زیادی در خصوص افزایش قابلیت هضم آن به روش‌های مختلف صورت گرفته که یکی از استراتژی‌های نوید بخش به کارگیری روش‌های بیولوژیکی و استفاده از آنزیم‌های هیدرولیز کننده، جهت تجزیه کارآمد دیواره فیبری کاه برنج و افزایش هضم پذیری آن است (Sheikh et al. 2018).

میکروبیوم شکمبه به عنوان کارآمدترین سیستم میکروبی در تجزیه زیست توده‌های لیگنوسلولزی در نظر گرفته می‌شود، حقیقتی که سبب شده تمایل زیادی در استخراج آنزیم‌هایی از این محیط برای استفاده در خوراک و صنعت مواد غذایی، سوخت‌های زیستی لیگنوسلولزی و دیگر فرآیندهای صنعتی ایجاد شود. ژنوم این میکروارگانیسم‌ها منبع غنی از آنزیم‌ها و قابلیت‌های متابولیکی است که می‌توان با استفاده از روش‌های ژنومیکس و متاژنومیکس به بررسی و شناسایی آن‌ها مبادرت ورزید (Schären et al. 2018). تاکنون دو روش اصلی برای تجزیه و تحلیل جوامع میکروبی از طریق تعیین توالی نسل بعدی (NGS)[1] وجود دارد که عبارتند از متاژنومیکس شات‌گان[2] و تعیین توالی 16S rDNA. متاژنومیکس شات‌گان شامل تعیین توالی DNA باکتریایی جدا شده از اجتماع میکروبی کل می‌باشد. خوانش‌های[3] به‌دست آمده از این طریق با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی ژنومیکسی، به عنوان یک مرجع، آنالیز شده و در نهایت به هر خوانش یک تاکسون خاص نسبت داده می‌شود (Truong et al. 2015). تعیین توالی 16S rDNA مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بوده که با استفاده از آغازگرهای هرز[4]، تکثیر rDNA از تعداد زیادی از گونه‌ها را امکان پذیر می‌سازد. تفاوت‌ها در نواحی کمتر حفاظت شده ژن 16S، شناسایی گروه‌های[5] خاص بر مبنای اطلاعات موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی توالی rDNA را ممکن می‌سازد (Albanese et al. 2015). به‌طور کلی عقیده بر این است که تعیین توالی 16S، یک روش قدرتمند و به خوبی توصیف شده‌است که قادر است با استفاده از تعداد نسبتاً کم از توالی‌ها (در حدود ۲۰۰ هزار) اطلاعات کافی در مورد ترکیب جوامع میکروبی ارائه دهد. با این‌حال محدودیت عمده این روش آن است که گروه‌ها بر اساس توالی تنها یک ناحیه منفرد از ژنوم باکتریایی نسبت داده می‌شوند. علاوه براین، در این روش انتخاب آغازگرهای به کار رفته برای تکثیر rDNA بسیار حیاتی است چرا که نتایج برخی مطالعات نشان داده که برخی از آغازگرها در مورد برخی از گروه‌های خاص دارای اریبی می‌باشند (Rintala et al. 2017). از طرفی دیگر متاژنومیکس شات‌گان به پوشش بالاتر (۱۰ تا ۳۰ میلیون خوانش) و پیچیدگی بیشتری در آنالیز داده‌های بدست آمده نیاز دارد. با این وجود، از طریق جمع‌آوری کردن اطلاعات توالی درباره سطح وسیعی از نواحی ژنومیکی، متاژنومیکس شات‌گان تعریف صحیح‌تری در سطح گونه را امکان پذیر نموده

[1] Next Generation Sequencing
[2] Shotgun metagenomics
[3] Reads
[4] Degenerated primers
[5] Taxa



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

و در نهایت توصیف جزئی‌تری از جوامع میکروبی را ارائه می‌نماید.

استفاده از تعیین توالی نسل بعدی برای تجزیه و تحلیل جوامع میکروبی پیچیده در سال‌های اخیر به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. دلایل این امر شامل کاهش مداوم هزینه‌ها و استقبال بیش‌تر از توانایی روش NGS برای تعریف جامع‌تر جوامع میکربی نسبت به روش‌های سنتی مبتنی بر کشت می‌باشد. این توسعه‌های تکنولوژیکی چشمگیر با رشد قابل ملاحظه‌ای در یکسری از متغییرهای مربوط به نحوه اجرا و آماده سازی همراه بوده که از آن جمله می‌توان به روش‌های نمونه‌برداری، ذخیره سازی، استخراج DNA، جفت آغازگرها، تکنولوژی تعیین توالی و مواد شیمیایی مورد استفاده، طول خوانش و اندازه قطعات[1] اشاره نمود. با در نظر گرفتن این تغییرات، در مطالعات میکروبیومی توافق و بالانس بین تکرارپذیری و قابل مقایسه بودن[2] نتایج به‌دست آمده با استفاده از روش‌های مختلف، برای دستیابی به یک صحت و دقت کافی امری ضروری است.

از طرفی، نژادهای بومی در هر کشور به‌عنوان سرمایه ملی و محصولی استراتژیک در اقتصاد و رونق آن کشور محسوب می‌شوند. هم‌چنین به‌دلیل شدت انتخاب پایین، تعداد زیاد پرورش‌دهندگان و محدودیت استفاده از تلقیح مصنوعی در گوسفند و بز، معمولا از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردارند (Vajed Ebrahimi et al. 2016). از طرفی با گذشت زمان و کسب آگاهی بیش‌تر نسبت به اهمیت صفات مختلف، نیازهای جدیدی مطرح می‌شود که متخصصین اصلاح نژاد را بر آن می‌دارد که از ذخیره ژنی دام‌های بومی استفاده نمایند. این مسئله، به‌خصوص با افزایش تولید محصولات دامی و تولید محصولات پیش‌بینی نشده در آینده، لزوم حفظ تنوع ژنتیکی در دام‌های بومی را الزامی ساخته است (Vajed Ebrahimi et al. 2016) چرا که یک گونه بدون تنوع ژنتیکی کافی قادر به سازگاری با تغییرات محیطی و مبارزه با انگل‌ها نیست (Mohammadabadi et al. 2017). به‌طور کلی در بیش‌تر کشورهای جهان هدف از اصلاح نژاد گوسفند سودآوری از طریق بهبود یک یا چند صفت اقتصادی در جامعه است (Soufy et al. 2009). در ایران بیش از ۵۰ میلیون رأس گوسفند، شامل ۲۶ نژاد گوسفند در ایران وجود دارد که با مناطق مختلف سازگار شده‌اند (Khodabakhshzadeh et al. 2016; Zamani et al. 2015; Mohammadabadi and Sattai Mokhtari 2013) و یکی از منابع اصلی تامین پروتئین در کشور می‌باشند. لذا، هدف از مطالعه حاضر، شناسایی مهم‌ترین باکتری‌هایی است که طی انکوباسیون کاه برنج در شکمبه آن را کلونیزه می‌کنند. از آنجائی‌که اجتماع باکتریایی شکمبه نقش محوری در دسترس قرار دادن مواد مغذی به نشخوارکنندگان را به‌عهده دارند، بررسی ارتباط بین ترکیب و محتوای باکتری‌های چسبیده به ذرات خوراک و تجزیه دیواره سلول گیاهی برای بهبود و افزایش کارآیی مصرف مواد مغذی در نشخوارکنندگان بسیار ضروری به نظر می‌رسد. گوسفندان بومی ایران که عمدتاً و در بیش‌تر مناطق بر روی باقی مانده‌های پس از برداشت مزارع چرانده می‌شوند، می‌توانند کاندیداهای خوبی برای شناسایی الگوی منحصر به فرد کلونیزه شدن کاه برنج توسط جمعیت باکتریایی شکمبه باشند. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند اطلاعات مفید اولیه برای بررسی‌های بعدی در خصوص شناسایی ژن‌های کدکنندهٔ آنزیم‌های درگیر در هضم دیواره فیبری کاه برنج در ژنوم میکروب‌های همزیست در شکمبهٔ گوسفند در اختیار محققین قرار دهد. همچنین در این مطالعه اثر استفاده از دو نوع داده متفاوت حاصل از تعیین توالی داده‌های حاصل از تکثیر (ناحیهٔ V3-V4 ژن *16S rRNA*) و توالی به‌دست آمده از تعیین توالی کل ژنوم بر روی آنالیز اجتماعات میکروبی چسبیده به کاه برنج با یکدیگر مقایسه خواهند شد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه به‌منظور انجام عمل انکوباسیون از روش کیسه‌های نایلونی متحرک[3] و از سه راس گوسفند بومی نژاد شال که دارای فیستولای شکمبه‌ای در کیسه‌ی پشتی شکمبه بودند، استفاده گردید. هر سه این حیوانات بالغ و نر و تقریباً همسن بوده و از وزن متوسط ۵±۶۵ کیلوگرم برخوردار بودند. هر یک از گوسفندان به‌صورت انفرادی در داخل باکس‌های ویژه نگهداری و

[1] Insert size
[2] Comparability
[3] In sacco



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

در طول مدت آزمایش با جیره‌ای حاوی علوفه (۷۰ درصد کاه گندم) و کنسانتره (۳۰ درصد مبتنی بر جو) و به‌صورت کاملا مخلوط و روزانه دو وعده تغذیه شدند. آب به میزان کافی و بدون محدودیت در اختیار حیوانات قرار گرفت.

نمونه‌های کاه برنج خرد شده، در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ٤٨ ساعت در آون خشک شدند. سپس نمونه‌های خشک شده، با آسیاب دارای توری ۲ میلی‌متری آسیاب شده و به میزان ۵ گرم داخل کیسه‌های به ابعاد ۵×۱۰سانتی‌متر مربع ریخته شدند. پس از آن درب کیسه‌ها محکم مسدود شده و در منافذی که بر روی یک شیلنگ تعبیه شده بود، وارد و با نخ محکم بسته شدند. در نهایت شیلنگ حاوی کیسه‌ها در مدت کوتاهی بعد از اولین وعده غذایی در صبح به درون شکمبه گوسفند فرستاده شد و بعد از گذشت ٢٤، ٤٨، ٧٢ و ٩٦ ساعت انکوباسیون، کیسه‌ها از شکمبه خارج شدند. کیسه‌ها پس از خارج شدن از محیط شکمبه با آب دوبار تقطیر شسته و به آهستگی فشرده شدند تا میکروارگانیسم‌های نچسبیده و یا سست چسبیده به نمونه انکوبه شده از محیط خارج شوند. شستشو تا زمانی ادامه پیدا کرد که آب خارج شده از نمونه شفاف بود. سپس نمونه‌ها از کیسه خارج و به داخل فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و بلافاصله به درون ظرف حاوی ازت مایع انداخته شدند و به آزمایشگاه بخش زیست سامانه پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج منتقل شدند و تا آغاز مراحل بعدی آزمایش در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای جداسازی و جمع‌آوری میکروب‌های متصل به کاه برنج انکوبه شده، ۳ گرم از نمونه در ٤٠-٢٠ میلی‌لیتر بافر تفکیک حل شدند (0.1% Tween 80, 1% methanol and 1% tertiary butanol vol/vol, PH2) (Pope et al. 2010). مخلوط به‌دست آمده به مدت ۳-۱ دقیقه ورتکس شدید و سپس به مدت ۵ دقیقه در شتاب گرانش ۵۰۰ در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد و فاز مایع حاوی سلول‌های جدا شده در فالکون استریل جمع آوری شد. این مرحله سه بار تکرار شد و هر بار فاز مایع حاوی سلول‌های میکروبی جمع‌آوری شد. در نهایت سلول‌های میکروبی بازیافت شده در فاز مایع به وسیله یک مرحله سانتریفیوژ در شتاب گرانش ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند.

رسوب سلولی سپس در ١/٤ میلی‌لیتر بافرASL مربوط به کیت استخراج QIAamp® DNA Stool mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) حل شد. استخراج DNA میکروبی با استفاده از کیت مذکور و براساس پروتکل استخراج DNA از مدفوع برای تشخیص پاتوژن‌ها صورت گرفت. کیفیت و کمیت DNA متاژنومی استخراج شده سپس براساس میزان جذب نور UV در طول موج‌های ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ[1] Thermo Scientific, Wilmington, (DE) ارزیابی و برآورد شد.

برای تکثیر ژن *16S rRNA* و آماده کردن آن برای تعیین توالی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در دو مرحله انجام گرفت. ابتدا برای تکثیر یک قطعه ٤٦٠ جفت‌بازی متناظر به ناحیه V3-V4 از ژن *16S rRNA* از جفت آغازگر (5′- Bact-0341F (CCTACGGGNGGCWGCAG و Bact- (5′- 0785R (GACTACHVGGGTATCTAATCC استفاده شد. در مرحله دوم از واکنش PCR، به‌منظور تهیه کتابخانه برای انجام تعیین توالی به روش Illumina Miseq 300PE، بارکدهای اختصاصی و آداپتورهای مربوط به تعیین توالی به انتهای 5′ جفت آغازگرها اضافه شد.

هر ۵۰ میکرولیتر از واکنش PCR حاوی ۵۰ نانوگرم DNA (۲ میکرولیتر)، ۲۵ میکرولیتر PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific Fermentas) ، ۲۱ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز[2]، یک میکرولیتر (۵۰ پیکومول) آغازگر رو به جلو و یک میکرولیتر (۵۰ پیکومول) آغازگر رو به عقب بود. واکنش PCR مرحله اول براساس۳۰ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و در نهایت با یک مرحله گسترش نهایی[3] ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه اجرا شد. مرحله دوم، یک واکنش PCR براساس ۱۵ سیکل و با یک دمای اتصال[4] ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای بارکد دارکردن آمپلیکون‌های تکثیر شده با استفاده

[1] NanoDrop
[2] Nuclease-free water
[3] Final extension
[4] Annealing temperature



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

از توالی‌های آداپتور آویزان[1] مربوط به شرکت Illumina استفاده شد.

به‌منظور خالص‌سازی، محصولات حاصل از تکثیر از روی ژل آگارز دو درصد بریده شده و توسط کیت QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) خالص شدند. مقدار ۵۰ میکرولیتر از محصولات تخلیص شده به‌صورت جفتی[2] و به روش Illumina Miseq 300PE توسط شرکت ماکروژن ((Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) تعیین توالی شد.

برای حذف قسمتی از DNA متاژنومی که احتمالاً حین استخراج دچار شکستگی شده بودند، نمونه‌ها از روی ژل آگارز یک درصد بریده و توسط کیت QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) تخلیص شدند. سپس هر یک از ۱۲ نمونه تعیین غلظت و به نسبت یکسان (۵۰ نانوگرم) رقیق شدند. سه تکرار بیولوژیک مربوط به هر یک از زمان‌های انکوباسیون مورد مطالعه در حجم‌های مساوی با یکدیگر ادغام[3] و در نهایت تعداد چهار نمونه برای تعیین توالی به صورت جفتی ( Paired end) و به روش Hiseq4000, 100bp PE برای شرکت ماکروژن ((Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) ارسال شد.

عمل demultiplexing داده‌های خام به‌دست آمده از تعیین توالی 16S rRNA با نرم‌افزار QIIME و توسط اسکریپت split_libraries_fastq.py انجام شد (Caporaso et al. 2010). برای یکی کردن خوانش‌های جفتی (Paired-end) از نرم‌افزار FLASH استفاده شد و خوانش‌هایی که اسمبل نشدند حذف شدند (Magoč and Salzberg 2011). سپس خوانش‌ها توسط نرم‌افزار UCLUST درون واحدهای تاکسونومی عملکردی[4] (OTUs) با میزان تشابه ۹۷ درصد خوشه‌بندی شدند ( Edgar 2010). توالی‌های کایمریک توسط برنامه ChimeraSlayer حذف شد (Haas et al. 2011). فراوان‌ترین توالی متعلق به هر OUT به‌عنوان نماینده در نظر گرفته شده و در برابر مجموعه هسته پایگاه Greengenes (DeSantis et al. 2006) با استفاده از نرم‌افزار PyNAST هم‌ردیف شدند (Caporaso et al. 2010). از نرم‌افزار برخط MicrobiomeAnalyst برای مطالعه تنوع میکروبیوم چسبیده به کاه برنج با استفاده از جدول OTU نهایی به‌دست آمده از مرحله قبل استفاده شد (Dhariwal et al. 2017). غربالگری جدول فراوانی OTU اولیه برای تعداد کم[5] و واریانس کم[6] به‌ترتیب بر اساس درصد شیوع[7] (حداقل تعداد چهار و حداقل میزان شیوع ۲۰ درصد) و شاخص دامنه بین چارکی[8] ۱۰ درصد توسط نرم‌افزار MicrobiomeAnalyst انجام شد (Dhariwal et al. 2017).

برای آنالیز انتساب تاکسونومیکی و برآورد فراوانی نسبی ارگانیسمی داده‌های حاصل از تعیین توالی کل ژنوم، از نرم‌افزار MetaPhlAn v2.0 استفاده شد (Segata et al. 2012). محاسبه تنوع و بررسی چگونگی توزیع[9] و غنای[10] گروه به ازای هر روش به‌کار رفته برای تعیین توالی و همچنین آشکارسازی به‌ترتیب از معیارهای Chao1 و ChaoShannon و با استفاده از بسته نرم‌افزاری R، iNEXT انجام گرفت (Hsieh et al. 2016). همبستگی بین میکروبیوم شناسایی شده در سطح خانواده به ازای هر روش تعیین توالی مورد مطالعه، بر اساس ضریب همبستگی اسپیرمن[11] محاسبه و توسط یک همبستگی نگار[12] رسم شده از طریق بسته نرم‌افزاری R، corrplot آشکارسازی شد (Wei 2012).

## نتایج

در این روش، به‌منظور تهیه کتابخانه برای توالی‌یابی، از یک جفت آغازگر برای تکثیر ناحیه V3-V4 ژن *16S rRNA* (به‌همراه بارکدهای اختصاصی و آداپتورهای مربوط به پلاتفرم توالی‌یابی) در دو مرحله PCR استفاده شد که تصویری از محصولات حاصل از تکثیر در شکل ۱ نشان داده شده‌است.

[1] Overhang adapter sequences
[2] Paired end
[3] Pooled
[4] Operational Taxonomic Unit

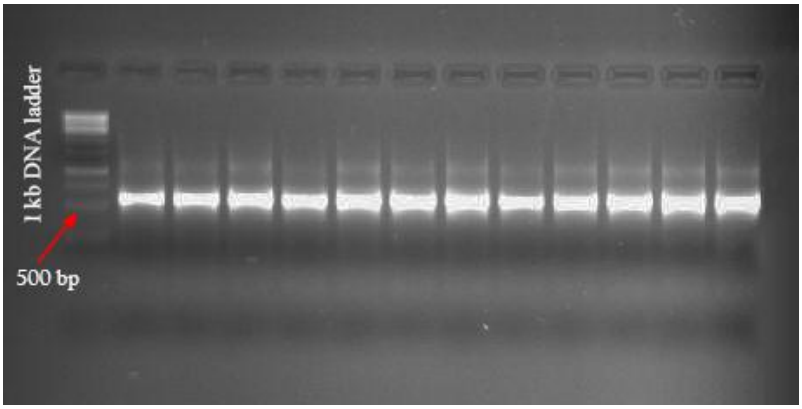
[5] Low count filter
[6] Low variance filter
[7] Prevalence in samples (%)
[8] Inter-quantile range
[9] Eveness
[10] Richness
[11] Spearman
[12] Correlogram



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

یکی شدن قطعات جفتی حاصل از تعیین توالی ژن *16S rDNA*، منجر به تولید ۳۹٤۷۰۰ کانتیگ شد که جزئیات به تفکیک هر نمونه در جدول شماره ۱ آورده شده‌است. بعد از مرحله شناسایی OTUها و تفسیر[1] آن‌ها، تعداد ۷۳۲٤ OTU (تعداد کل ۲۸۱٦۱٤ خوانش با تعداد متوسط ۲۳٤٦۷ خوانش به ازای هر نمونه) شناسایی شد که اطلاعات تفکیکی برای هر نمونه در شکل ۲ آورده شده‌است. بعد از غربالگری اولیه که منجر به حذف به‌ترتیب ۲۱۰٤ OTU و ۵۳ OTU به‌دلیل فراوانی و واریانس کمتر از حد آستانه شد، بقیه OTUها برای آنالیزهای پایین دستی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین آمار توالی‌های خام به‌دست آمده از روش Illumina Hiseq، به تفکیک برای هر نمونه در جدول ۲ آورده شده‌است.

[1] OUT annotation




شکل ۱- تصویر محصولات حاصل از تکثیر ناحیه V3-V4 ژن *16S rDNA* در روش Miseq

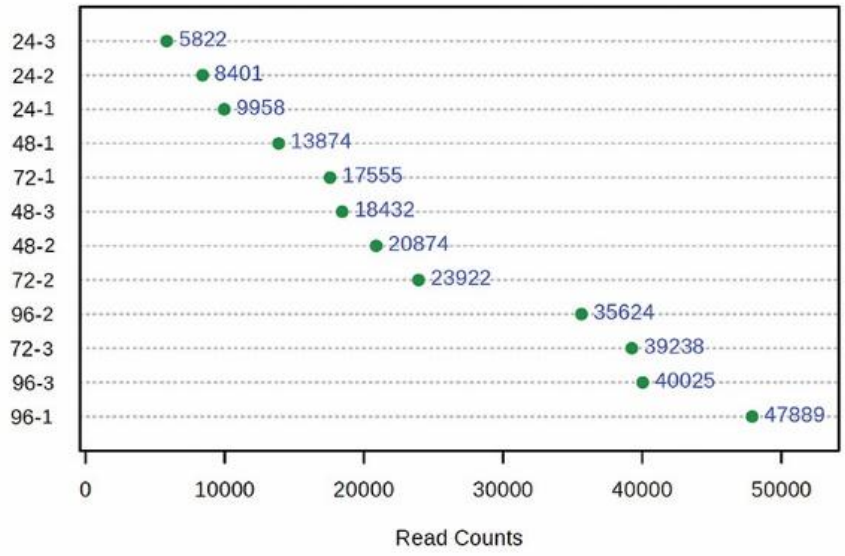
جدول۱- آماره‌های مربوط به داده‌های به‌دست آمده از تعیین توالی ژن *16S rDNA* به روش Miseq

| شماره نمونه | تعداد کانتیگ | طول کل کانتیگ (جفت باز) | میانگین اندازه کانتیگ |
|---|---|---|---|
| ۱-۲٤ | ۱٤٤۱۱ | ٦۵۹٦٤۷۷ | ٤۵۷/۷٤ |
| ۲-۲٤ | ۱۲۳۲٤ | ۵٦۳۹۳٦٤ | ٤۵۷/۵۹ |
| ۳-۲٤ | ۷۰٤۷ | ۳۲۳۵٤۲۲ | ٤۵۹/۱۲ |
| ۱-٤۸ | ۱۷۹۸۰ | ۸۱۸۵٤٤٤ | ٤۵۵/۲۵ |
| ۲-٤۸ | ۳۰۹۱٦ | ۱٤۱۲۳۱۰۰ | ٤۵٦/۸۲ |
| ۳-٤۸ | ۲۵۷۲۳ | ۱۱۸۱۹٦۹۲ | ٤۵۹/۵۰ |
| ۱-۷۲ | ۲۵۰۹۲ | ۱۱۳۳۸۲٦۲ | ٤۵۱/۸۷ |
| ۲-۷۲ | ۳۱۱۹۲ | ۱٤۲۹۳۳٦٦ | ٤۵۸/۲٤ |
| ۳-۷۲ | ۵۰۹٤۸ | ۲۳۲٤۸۷۳۸ | ٤۵٦/۳۲ |
| ۱-۹٦ | ٦٤٦٤۰ | ۲۹۵٦٦۹۳۱ | ٤۵۷/٤۱ |
| ۲-۹٦ | ۵۵۵۳۹ | ۲۵۲۲۰۲۱٤ | ٤۵٤/۱۰ |
| ۳-۹٦ | ۵۸۸۸۸ | ۲٦۹۱٤۱۱۹ | ٤۵۷/۰٤ |



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]




شکل ۲- تعداد خوانش‌های به‌کار رفته برای شناسایی OTUها، به ازای هر نمونه در روش Miseq

جدول۲- آماره‌های مربوط به داده‌های خام به‌دست آمده از تعیین توالی کل ژنوم به روش Illumina Hiseq

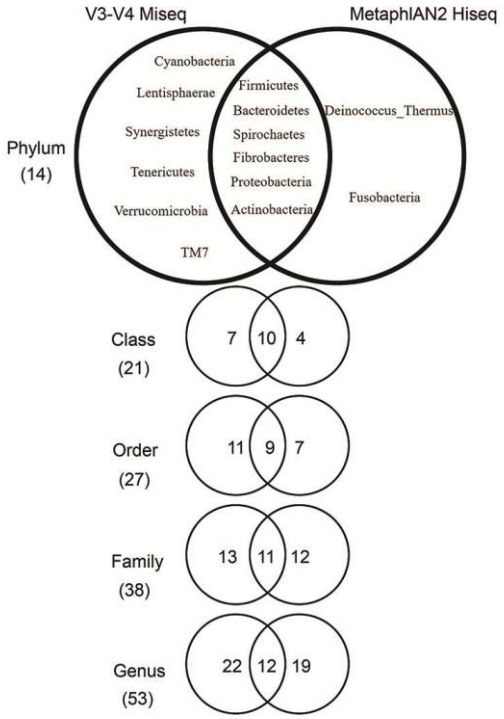
| شماره نمونه | طول خوانش | تعداد کل خوانش | تعداد کل باز (جفت باز) | GC درصد محتوای |
|---|---|---|---|---|
| RS-24 | ۱۰۱ | ۱۱۱۲۵٦۳۰۸ | ۱۱۲۳٦۸۸۷۱۰۸ | ٤۷/۲۵ |
| RS-48 | ۱۰۱ | ۱۵۵۹۲۷۷۷٤ | ۱۵۷٤۸۷۰۵۱۷٤ | ٤۷/۵۸ |
| RS-72 | ۱۰۱ | ۱۵۲۹۱۸۹۵۲ | ۱۵٤٤٤۸۱٤۱۵۲ | ٤۷/۹۱ |
| RS-96 | ۱۰۱ | ۲۰۹۸٦٦۳۷۲ | ۲۱۱۹٦۵۰۳۵۷۲ | ٤٦/۱٦ |

به‌منظور ارزیابی اثر دو نوع استراتژی تعیین توالی بر روی استنباط‌های متاژنومیکی، دو مجموعه داده موجود با چند روش مقایسه استاندارد با تمرکز بر روی غنای تاکسونومیکی، فراوانی تاکسونومیکی و ترکیب اجتماع میکروبی مورد مطالعه قرار گرفت. در کل ١٤ فیلوم توسط هر دو روش تعیین توالی قطعات حاصل از تکثیر (آمپلیکون) و روش متاژنومیکس شات‌گان شناسایی گردید که از این میان شش فیلوم (٤٣ درصد) فقط توسط روش Miseq، دو فیلوم (١٦ درصد) فقط توسط روش Hiseq و شش فیلوم (٤٣ درصد) توسط هر دو روش تحت پوشش قرار گرفت. تعداد گروهی متفاوت و مشابه شناسایی شده از طریق هر یک از دو روش تعیین توالی مورد مطالعه و به ازای سطوح تاکسونومیکی مختلف در شکل ۳ نمایش داده شده‌است. در سطوح پایین‌تر از فیلوم (به‌جز سطح گونه) کمترین هم‌پوشانی در سطح جنس (۲۲ درصد) و خانواده (۲۹ درصد) مشاهده شد. نسبت‌های مقایسه‌ای فیلوم‌های شناسایی شده به ازای هر نمونه در شکل٤ نشان داده شده‌است. همانگونه که در این شکل مشاهده می‌شود درصد بیشتری از Firmicutesها در روش Hiseq نسبت به‌روش Miseq شناسایی شد. اما نسبت فیلوم‌های Bacteriodetes و Proteobacteria شناسایی شده از طریق روش Miseq بیشتر از روش Hiseq می‌باشد. در هر دو روش فیلوم‌های Furmicutes و Bacteriodetes غالب بودند و به‌دنبال آن Spirochaetes در روش Hiseq و Proteobacteria در روش Miseq بیش‌ترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. فراوانی نسبی باکتری‌های شناسایی شده در هر روش تعیین توالی در سطح خانواده در شکل۵ نشان داده شده‌است. در روش Miseq خانواده‌های (۳۵

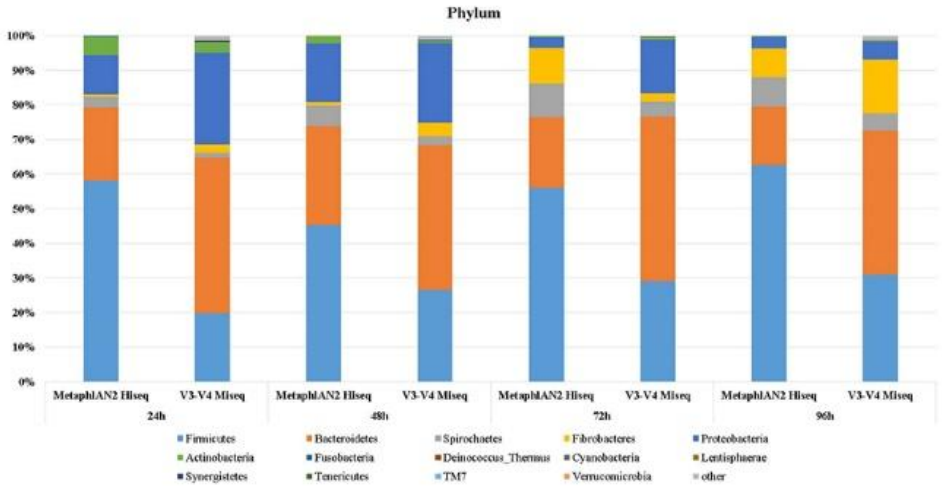


[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

درصد) Prevotellaceae، (۲۰ درصد) Succinivibrionaceae، (۱۲ درصد) Lachnospiraceae، (۷ درصد) Fibrobacteraceae، (٦ درصد) Veillonellaceae و (۵ درصد) Ruminococcaceae حدود ۸۵ درصد گروه‌های شناسایی شده را به خود اختصاص دادند، در حالی‌که این نسبت در روش Hiseq به خانواده‌های (۳۲ درصد) Lachnospiraceae، (۲۲ درصد) Prevotellaceae، (١٦ درصد) Veillonellaceae، (۸ درصد) Succinivibrionaceae و (۷ درصد) Spirochaetaceae تعلق گرفت.




شکل ۳- نمودار ون کمیت باکتری‌های شناسایی شده در سطوح تاکسونومیکی مختلف به‌روش Miseq و Hiseq

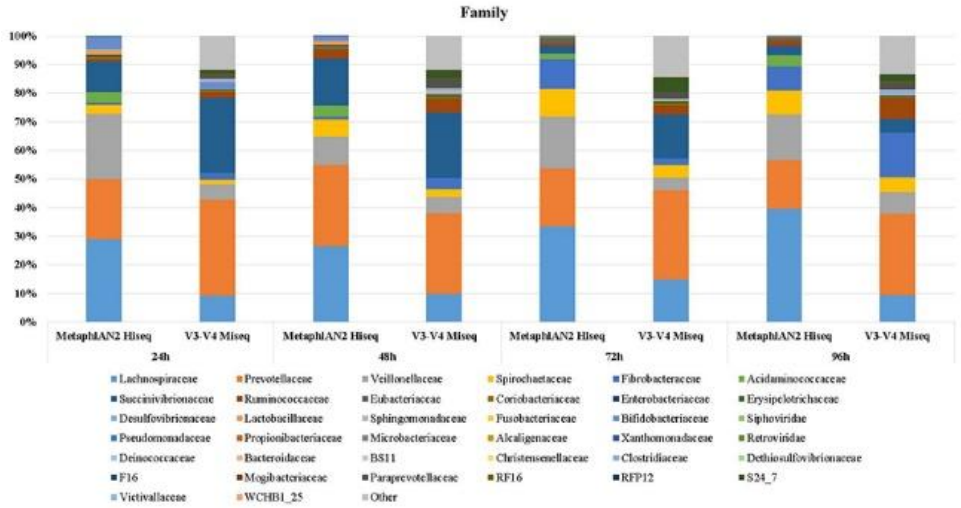



شکل ٤- نمودار میله‌ای نشان‌دهنده نسبت تجمعی خوانش‌ها در سطح فیلوم برای دو روش تعیین توالی Hiseq و Miseq

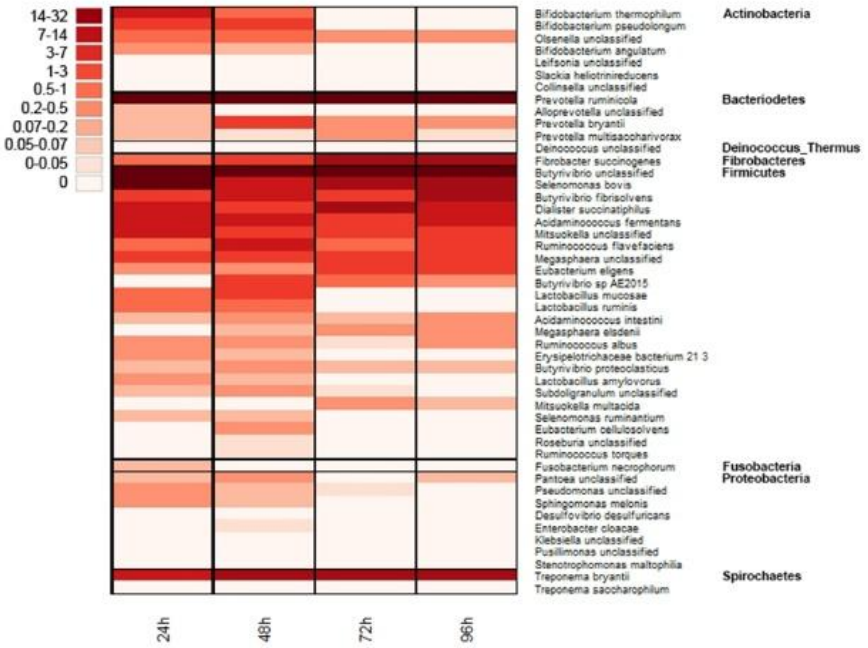


[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]




شکل ۵- نمودار میله‌ای نشان‌دهنده نسبت تجمعی خوانش‌ها در سطح خانواده برای دو روش تعیین توالی Hiseq و Miseq




شکل ٦- نقشه رنگی (Heatmap) فراوانی نسبی اجتماع باکتریایی شناسایی شده به‌روش Miseq در سطح گونه

در سطح گونه تنها چهار گونه از طریق روش Miseq (*Fibrobacter succinogenes*، *Ruminococcus flavefaciens*، *Selenomonas ruminantium* و *Roseburia faecis*) و تعداد ٤٨ گونه (١٤ تا از ٤٨ گونه طبقه‌بندی نشده (Unclassified) بودند) توسط روش Hiseq شناسایی شد. فراوانی گونه‌های شناسایی شده در روش Hiseq به تفکیک هر زمان انکوباسیون در شکل ٦ آورده شده‌است. در کل گونه‌های *Butyrivibrio unclassified* (٢٩ درصد)، *Prevotella ruminicola* (٢٣ درصد)، *Selenomonas bovis* (٩ درصد)، *Treponema bryantii* (٧ درصد)، *Butyrivibrio fibrisolvens* (٦ درصد)، *Fibrobacter succinogenes* (٥ درصد) و *Dialister succinatiphilus* (٥ درصد) در حدود ٨٤ درصد از فراوانی کل گونه‌های شناسایی شده را به‌خود اختصاص دادند.



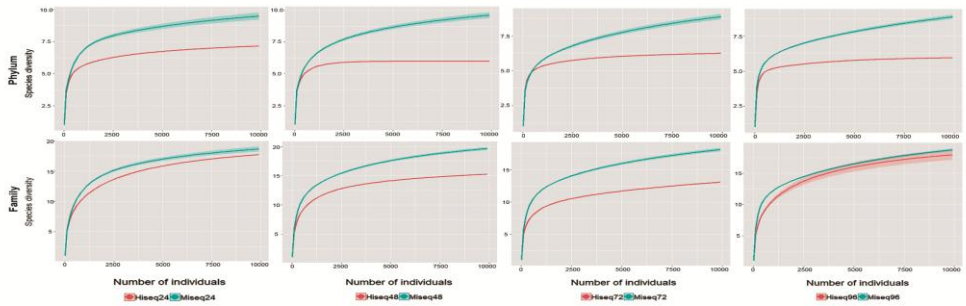
[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

آنالیز غنای گونه‌ای (تعداد گونه‌های موجود در یک جامعه میکروبی) بر مبنای شاخص Chao1، برای مقایسه بین زمان‌های انکوباسیون در سطوح فیلوم و خانواده و به ازاء هر یک از دو روش تعیین توالی در شکل ۷ نشان داده شده‌است. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود در تمام موارد غنای گونه‌ای در روش Miseq نسبت به Hiseq بالاتر است. در سطح فیلوم نمودار Hiseq به سطح ناهمساو[1] رسیده است که نشان می‌دهد تعداد گونه‌های باکتریایی شناسایی شده در این سطح تکمیل شده‌است. ولی چنین وضعیتی در سطح خانواده دیده نمی‌شود. در روش Miseq در هر دو سطح فیلوم و خانواده، نمودارها به‌طور کامل به سطح نرسیده‌اند. آنالیز تنوع گونه‌ای بر اساس شاخص ChaoShannon به ازای هر یک از دو روش تعیین توالی و برای سطوح فیلوم و خانواده به‌صورت نمودار جعبه‌ای[2] در شکل ۸ نمایش داده شده‌است. همانطور که در شکل نشان داده شده‌است تنوع گونه‌ای در روش Miseq در هر دو سطح فیلوم و خانواده از روش Hiseq بالاتر است.

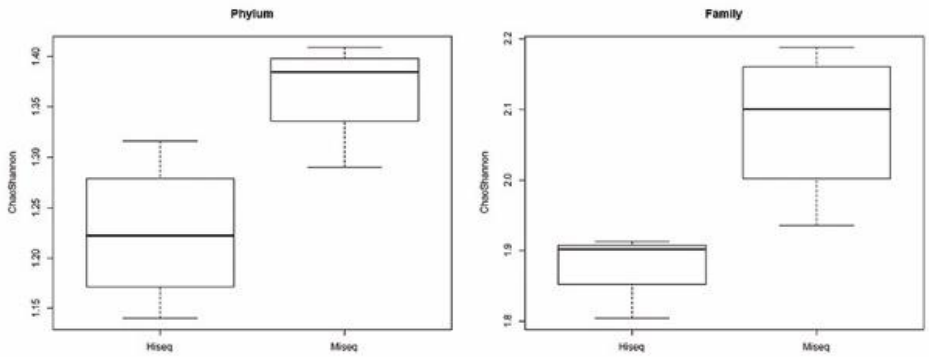
در شکل ۹ نتایج حاصل از آنالیز همبستگی بین خانواده‌ای را در هر دو روش Miseq و Hiseq نشان داده شده‌است. آنالیز بین خانواده‌ای در روش Miseq نشان داد که همبستگی مثبتی بین خانواده Coriobacteriaceae با خانواده‌های Dethiosulfovibrionaceae، Succinivibrionace و WCHB1_25 دارد و از طرفی همبستگی منفی زیاد با برخی از خانواده‌های مهم تجزیه‌کننده ترکیبات لینگوسلولزی مانند Fibrobacteriaceae، Ruminicoccaceae و Clostridiaceae نشان می‌دهد.

[1] Asymptote

[2] Box and whisker plot




شکل ۷- تغییرات شاخص غنای Chao1 اجتماع باکتریایی شناسایی شده به ازای هریک از دو روش تعیین توالی Hiseq و Miseq




شکل ۸- تغییرات شاخص تنوع ChaoShannon اجتماع باکتریایی شناسایی شده به ازای هریک از دو روش تعیین توالی Hiseq و Miseq

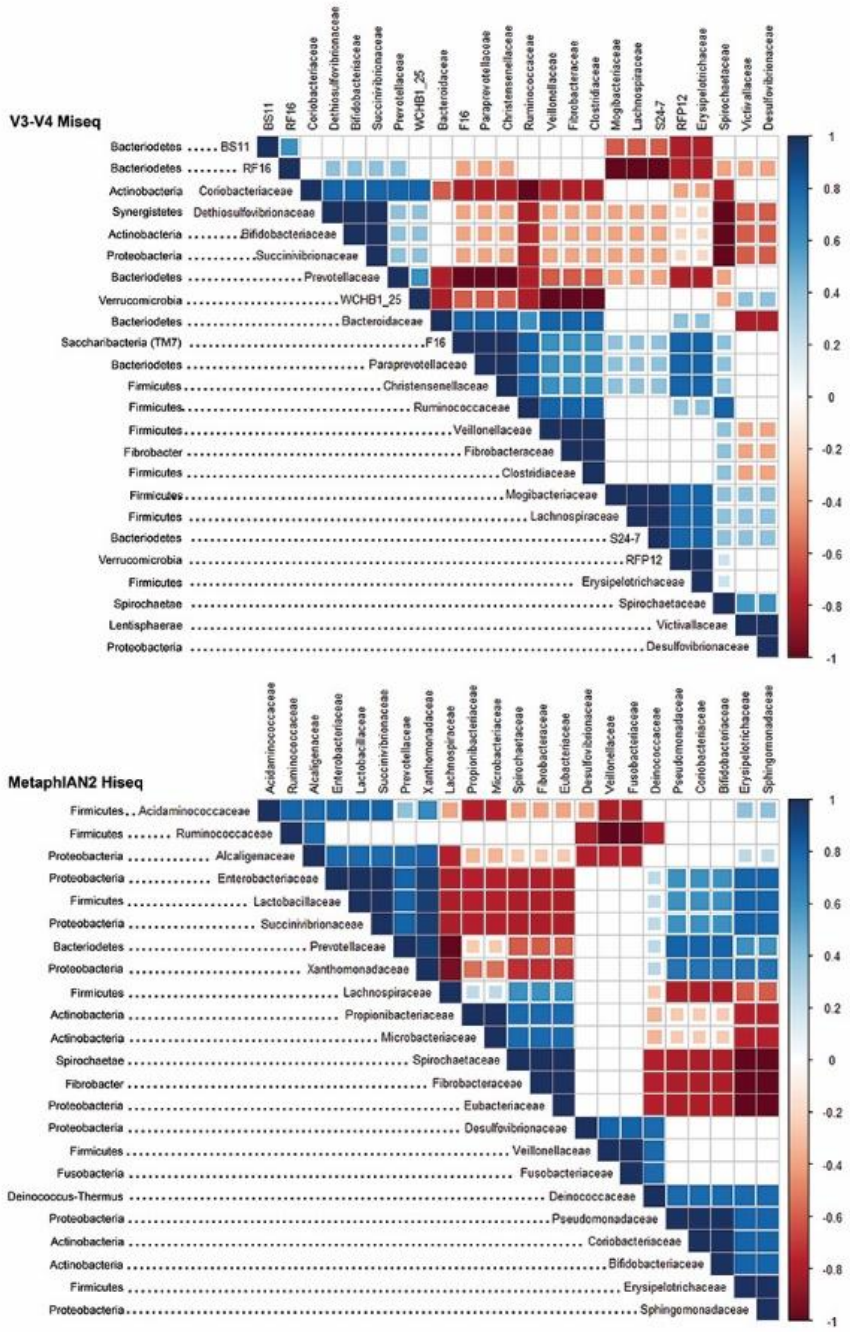


[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

همبستگی مثبت بالایی بین Dethiosulfovibrionaceae با Bifidobacteriaceae و Succinivibrionaceae و همبستگی منفی بالایی را با Spirochaetaceae نشان می‌دهد. خانواده Spirochaetaceae با دو خانواده Bifidobacteriaceae و Succinivibrionaceae نیز همبستگی منفی بالایی را نشان می‌دهد.

نقش متفاوت این خانواده‌ها در شکمبه همبستگی مثبت یا منفی بین آن‌ها را توجیه می‌کند. در مطالعه حاضر همبستگی مثبت بالایی بین خانواده‌های Veillonellaceae، Fibrobacteraceae، Clostridiaceae و Ruminococcaceae مشاهده می‌شود.




شکل ۹- آنالیز بین خانواده‌ای مبتنی بر همبستگی اسپیرمن. همبستگی مثبت به رنگ آبی و همبستگی منفی به رنگ قرمز نمایش داده شده‌است. شدت رنگ و اندازه مربع متناسب با ضریب همبستگی Rho اسپیرمن می‌باشد. همبستگی‌های معنی‌دار با سطح اطمینان ۹۵ درصد نمایش داده شده‌اند ($P<$ ۰/۰۵).



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

نقش همه این خانواده‌ها به‌عنوان تجزیه کننده فیبر در مطالعات قبلی گزارش شده‌است ( Cheng et al. 2017; Liu et al. 2016; Piao et al. 2014). خانواده Prevotellaceae همبستگی منفی با باکتری‌هایی با نقش آشکار در تجزیه خوراک فیبری هم‌چون Ruminococcaceae، Clostridiaceae ، Christensenellaceae و F16 نشان داد.

در آنالیز همبستگی بین خانواده‌ای، خانواده WCHB1_25 (متعلق به فیلوم Verrucomicrobia) با خانواده‌های شناخته شده در تجزیه خوراک فیبری مانند Fibrobacteraceae و Clostridiaceae همبستگی منفی بالایی را نشان می‌دهد. ولی RFP12 با خانواده‌هایی همچون F16، Christensenellaceae و Ruminococcaceae که نقش مهمی در تجزیه خوراک فیبری دارند همبستگی مثبت نشان می‌دهد. در آنالیز همبستگی بین جمعیتی داده‌های حاصل از Miseq، خانواده Bifidobacteriaceae همبستگی مثبت بالایی را با Succinivibrionaceae و همبستگی منفی بالایی را با Spirochaetaceae و Ruminococcaceae نشان دادند.

خانواده R16 (شناخته شده از طریق روش Miseq) متعلق به فیلوم Saccharibacteria (TM7) می‌باشد که همبستگی مثبتی را با باکتری‌های شناخته شده در تجزیه خوراک فیبر هم‌چون Ruminococcaceae، Fibrobacteraceae، Christensenellaceae و هم‌چنین Paraprevotellaceae نشان می‌دهد. از طرفی یک همبستگی منفی بین این باکتری با خانواده‌های Coriobacteriaceae و Prevotellaceae مشاهده می‌شود.

در آنالیز همبستگی بین خانوادگی انجام شده با داده‌های حاصل از روش Hiseq نیز همبستگی مثبت بالایی بین خانواده‌های Fibrobacteraceae، Clostridiaceae و Ruminococcaceae مشاهده می‌شود. همچنین باکتری Fusobacterium همبستگی منفی بالایی را با Ruminococcaceae، Acidaminococcaceae وAlcaligenaceae نشان می‌دهد. از طرفی در آنالیز بین خانواده‌ای همبستگی مثبت بالایی بین Spirochaetaceae با Fibrobacteraceae (در روش Hiseq) و Ruminococcaceae (در روش Miseq) مشاهده شد. باکتری F16 همبستگی مثبتی را با Ruminococcaceae، Fibrobacteraceae، Clostridiaceae و Christensenellaceae و همبستگی منفی با خانواده‌های Coriobacteriaceae و Prevotellaceae نشان داد.

## بحث

در مطالعه حاضر، اثر بخشی دو راهبرد تعیین توالی نسل بعد (آمپلیکون در مقابل شات‌گان)، به‌کار رفته برای مطالعات eDNA[1] بر روی یک مجموعه داده به‌دست آمده از جمعیت میکروبی کلونیزه کننده کاه برنج در شکمبه گوسفند بومی، مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. مطالعات قبلی صورت گرفته در این خصوص نتایج متفاوتی را در برداشته است.

در یک مطالعه صورت گرفته برای توصیف میکروبیوم دستگاه گوارش انسان دو روش متاژنومیکس شات گان و تعیین توالی محصولات حاصل از تکثیر ژن *16S rDNA* بر روی نمونه‌های یکسان و به‌صورت کمی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که روش متاژنومیکس شات‌گان، توصیف خیلی عمیق‌تری از پیچیدگی میکروبیوم و شناسایی تعداد بیش‌تری از گونه‌ها برای هر نمونه، نسبت به روش تعیین توالی محصولات حاصل از تکثیر ژن *16S rDNA* را باعث شده‌اند ( Laudadio et al. 2018). در یک مطالعه دیگر با آنالیز میکروبیوم یک نمونه مدفوع انسان، روش‌های تعیین توالی شات‌گان کل ژنوم (WGS) و محصولات حاصل از تکثیر ژن 16S مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفتند. در این تحقیق چهار مقوله روش WGS با 16S rDNA amplicon، پلاتفورم Illumina Hiseq با Miseq، خوانش‌ها با کانتیگ‌های سرهم شده[2] و خوانش‌های کوتاه و بلند با همدیگر مقایسه شدند. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که روش متاژنومیکس شات‌گان دارای مزایای متعددی از جمله افزایش تشخیص گونه‌های باکتریایی، افزایش تشخیص تنوع و افزایش پیش بینی ژن‌ها، در مقایسه با روش تعیین توالی محصولات حاصل از تکثیر 16S می‌باشد. همچنین نشان داده شد که با افزایش طول خوانش، یا از طریق تولید خوانش‌های بلندتر و یا از سرهم کردن کانتیگ‌ها، می‌تواند صحت تشخیص گونه‌ها را

[1] Environmental DNA
[2] Assembled contigs



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

بهبود بخشید (Ranjan et al. 2016). در یک مطالعه صورت گرفته به‌منظور شناسایی جامعه میکروبی موجود در نمونه‌های آب به‌دست آمده از چهار دشت سیلابی در کشور برزیل، دو تکنیک تعیین توالی نسل بعدی شات‌گان و محصولات حاصل از تکثیر را مورد مقایسه قرار گرفت. کمتر از ۵۰ درصد فیلوم‌های شناسایی شده از طریق تعیین توالی محصولات حاصل از تکثیر، از طریق تعیین توالی به روش شات‌گان پوشش داده شد. هم‌چنین روش مبتنی بر محصولات حاصل از تکثیر، ۲۷ درصد خانواده‌های بیشتری را شناسایی کردند. به‌طور کلی در این مطالعه گزارش شد که توالی‌های به‌دست آمده از محصولات تکثیر در هر دو جنبه تنوع زیستی و آنالیز اکولوژیکی جامعه‌های میکروبی در مقیاس‌های تاکسونومیکی مختلف قدرتمندتر بودند (Tessler et al. 2017).

مطالعه حاضر نشان داد که همبستگی ضعیف میان دو روش وجود دارد که دلالت بر آن دارد که در حالی که همپوشانی تاکسونومی در هر دو سطوح فیلوم و خانواده وجود دارد، روش‌ها اساسا متفاوت هستند. به جز دو فیلوم (Deinococcus_Thermus و Fusobacteria) بقیه فیلوم‌های شناسایی شده توسط روش Hiseq توسط روش Miseq هم شناسایی شد. تفاوت اصلی بین نتایج به‌دست آمده از روش Hiseq و Miseq در این مطالعه، چه به‌صورت در نظر گرفتن کلی نتایج و چه به‌صورت موردی، به‌دلیل گستردگی[1] و فراوانی طبقه‌بندی می‌باشد. تعداد تاکسون کمتر مشاهده شده در روش Hiseq به‌نظر می‌رسد به‌دلیل خصوصیات ذاتی روش شات‌گان و هم‌چنین اندازه پایگاه داده به کار رفته برای طبقه‌بندی تاکسونومیکی باشد. پایگاه داده‌های ژنومی به‌طور مستمر در حال بروز شدن و افزایش اطلاعات بوده و البته این مشکل روز به روز کم اهمیت‌تر می‌شود. بدیهی است که رویکردهای جدید آنزیمی و مکانیکی در روش شات‌گان و هم‌چنین تکنیک‌های استخراج می‌تواند در این مورد کمک‌کننده باشد (MetaSUB International Consortium).

در مطالعه حاضر مسئله اساسی با تکنیک Hiseq در این است که غنای گونه‌ای در سطح فیلوم به ازای هر زمان انکوباسیون مورد مطالعه در سطحی پایین‌تر از روش Miseq به سطح ناهمساو رسیده است. در سطح خانواده با اینکه غنای گونه‌ای در Miseq در سطح بالاتری نسبت به Hiseq قرار دارد ولی هر دو روش به‌طور کامل به سطح ناهمساو نرسیده‌اند. به‌نظر می‌رسد تعیین توالی بیشتر در هر دو سطح فیلوم و خانواده در روش Miseq منجر به شناسایی گروهی بیشتری شد. ولی این حالت برای روش Hiseq فقط در سطح خانواده، حداقل با استفاده از نرم‌افزار MetaPhlAn2، می‌تواند صادق باشد. در مقابل، برخی مطالعات نشان داده‌اند که عمق توالی بیشتر[2] می‌تواند برای تشخیص گونه‌های نادر مفید باشد. متأسفانه، این عمل معمولاً به تولید خوانش‌های کوتاه‌تر ختم شده و در اغلب موارد به‌صورت اشتباه هم‌ردیف‌یابی[3] می‌شوند، فرآیندی که منجر به افزایش کاذب (Inflation) در تعداد گونه و برآوردهای تنوع می‌شود (Clooney et al. 2016; Schulze-Schweifing et al. 2014; Caporaso et al. 2012).

در این مطالعه برای آنالیز توالی‌های حاصل از Miseq از نرم‌افزارهای متداول QIIME و MicrobiomeAnalyst استفاده شد که برای آنالیز آمپلیکون‌ها مناسب و دقیق گزارش شده‌است. برای آنالیز داده‌های حاصل از Hiseq از نرم‌افزارMetaphlAn استفاده شد. این نرم‌افزار یکی از محبوب‌ترین نرم‌افزارهای به‌کار رفته برای طبقه‌بندی تاکسونومیکی است. به‌عنوان مثال، از آن در پروژه میکروبیوم انسانی[4] مورد استفاده قرار گرفت. مهم‌تر اینکه این نرم‌افزار متکی بر ژن‌های شاخص خاص کلادیستیک[5] می‌باشد که برای شناسایی دقیق در مطالعات تنوع زیستی باکتریایی بسیار حیاتی بوده و یک روش الگوریتمی متداول می‌باشد (Segata et al. 2012).

یکی از دلایل اصلی تفاوت در خروجی دو روش مورد مطالعه تفاوت در روش طبقه‌بندی و ماهیت الگوریتم‌های تشخیصی مورد استفاده است. هر دو نرم‌افزار QIIME و MetaPhlAn برای تهیه پروفایل تاکسونومیکی مبتنی بر استفاده از ژن‌های نشانگر[6] هستند. در هر دو روش خوانش‌های کوتاه علیه ژن‌های نماینده حاوی اطلاعات تاکسونومیکی نقشه‌یابی می‌شوند. نرم‌افزار QIIME از

[1] Breadth

[2] Deep sequencing
[3] Misaligned
[4] The Human Microbiome Project Consortium
[5] Clade-specific markers
[6] Marker-based approach



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

*16S rRNA* و نرم‌افزار MetaPhlAn از نشانگرهای خاص کلادیستیک[1] (زیست دسته) به‌عنوان ژن نشانگر برای طبقه‌بندی تاکسونومیکی بهره می‌برند (Segata et al. 2012). ژن 6S rRNA، در زیرواحد کوچک DNA ریبوزومی قرار داشته و حاوی ۹ ناحیه متغییر (V1-V9) هستند که هر یک از این نواحی به صورت تکی و یا ترکیبی به‌عنوان ژن نشانگر هدف برای مطالعه باکتری‌ها و آرکائی‌ها ترجیح داده می‌شوند. ژن‌های نشانگر خاص Clade ژن‌هایی هستند که به‌طور واضح یک کلاد تاکسونومیکی را توصیف می‌کند، زیرا آن‌ها همیشه در جدایه‌های توالی شده از آن کلاد وجود دارند و هرگز در هیچ ارگانیسم توالی‌یابی شده دیگری مشاهده نمی‌شوند. MetaPhlAn فراوانی نسبی سلول‌های میکروبی را از طریق نقشه‌یابی علیه یک مجموعه کاهش یافته از توالیهای نشانگر خاص کلاد، که از توالی‌های کدکننده پیش انتخاب شده‌اند، را برآورد نموده و توانایی آن را دارد که به‌طور واضح میکروبیوم را در سطح گونه و یا سطوح تاکسونومیکی بالاتر شناسایی نماید (Segata et al. 2012).

با توجه به همجوشی[2]، انتقال ژن افقی در باکتری‌ها شایع است. ثابت شده‌است که یک مجموعه ژن مرکزی تحت عنوان " Core genes" در بین باکتری‌ها وجود دارند که بسیار محافظت شده هستند و به ندرت انتقال می‌یابند. این حالت به‌طور کلی به‌عنوان ژنوم هسته مرکزی "Core genome" شناخته می‌شود ( Vernikos et al. 2015). در حالی‌که آنالیز داده‌های حاصل از توالی‌یابی محصولات حاصل از تکثیر (آمپلیکون)، از تک ژن (به‌عنوان مثال 16S) در ژنوم هسته مرکزی سود می‌برد، روش شات‌گان مبتنی بر چند ژن در کل طول ژنوم می‌باشد. از اینرو آنالیز داده‌های حاصل از شات‌گان به ناچار به‌شناسایی اشتباه غیر قابل اجتناب منجر خواهد شد، اگر مبتنی بر ژن‌هایی باشند که در ژنوم هسته مرکزی یافت نمی‌شوند. بنابراین بهتر است روش‌های آنالیتیکی به‌کار رفته برای آنالیز داده‌های حاصل از شات‌گان از شناسایی تاکسونومیکی محدود شده به توالی‌هایی از ژنوم هسته مرکزی و یا ژن‌های شاخص خاص کلادیستیک، مانند آنچه که در نرم‌افزار MetaphlAn اتفاق می‌افتد، بهره ببرند ( Truong et al. 2015; Segata et al. 2012)

همانگونه که نتایج این مطالعه نشان داد تشخیص باکتری‌ها در سطح گونه با استفاده از روش V3-V4 Miseq امکان‌پذیر نبود. محدودیت عمده روش تعیین توالی آمپلیکون ژن Illumina Miseq 16S rDNA این است که نمی‌تواند OTU های باکتریایی را در سطح گونه تشخیص دهد، به‌دلیل اینکه حداکثر طول خواندن آن کمتر از ۵۵۰ جفت‌باز است. از طرفی دو گونه ممکن است تنها در چند نوکلئوتید در تمام طول 16S آن‌ها متفاوت باشند و با تعیین توالی فقط بخشی از ژن (مناطق V3–V4 در این مطالعه) تمایز آن‌ها از یکدیگر در سطح گونه بسیار دشوار است (Johnston et al. 2017).

در سطح گونه تنها چهارگونه از طریق روش Miseq (*Fibrobacter succinogenes*، *Ruminococcus flavefaciens*، *Selenomonas ruminantium* و *Roseburia faecis* شناسایی شد. از طرفی گونه‌های *Butyrivibrio unclassified* (۲۹٪)، *Prevotella ruminicola* (۲۳٪)، *Selenomonas bovis* (۹٪)، *Treponema bryantii* (۷٪)، *Butyrivibrio fibrisolvens* (۶٪)، *Fibrobacter succinogenes* (۵٪) عمده گونه‌های شناسایی شده در روش Hiseq بودند. باکتری *Butyrivibrio fibrisolvens* دامنه وسیعی از سوبسترا از جمله نشاسته، سلولز و زایلان را برای تولید بوتیرات که در حدود ۱۶ درصد اسیدهای چرب فرار شکمبه را به خود اختصاص می‌دهد، هضم می‌کنند (Stewart et al. 1997). گونه‌های *Fibrobacter succinogenes*، *Ruminococcus flavefaciens* باکتری‌های کلیدی در تجزیه سلولز هستند (Singh et al. 2014). گونه *Selenomonas ruminantium* در تجزیه نشاسته نقش دارند ( Morgavi et al. 2013). باکتری *Treponema bryantii* تخمیر کننده قند بوده و همچنین در تجزیه پکتین نقش دارند (Stewart et al. 1997).

آنالیز همبستگی در سطح خانواده، روابطی را بین باکتری‌ها نشان داد که بر اساس بررسی عملکرد آن‌ها در شکمبه قابل توجیه می‌باشد. باکتری Coriobacteriaceae با خانواده‌های Dethiosulfovibrionaceae، Succinivibrionace همبستگی مثبت و با برخی از خانواده‌های تجزیه‌کننده ترکیبات لینگوسلولزی مانند

[1] Clade specific marker genes
[2] Conjugation



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

Fibrobacteriaceae، Ruminicoccaceae و Clostridiaceae همبستگی منفی نشان داد. جنس غالب خانواده Coriobacteriaceae در این مطالعه Olsenella می‌باشد که اولین بار از شکمبه گوسفند جدا شده و یک باکتری اسید لاکتیکی است. با افزایش فرآیند تخمیر توسط باکتری‌های تجزیه‌کننده کربوهیدرات‌ها، میزان تولید اسید لاکتیک به‌عنوان محصول نهایی افزایش یافته که احتمالاً باکتری‌های اسید لاکتیکی به‌منظور افزایش راندمان تخمیر با مصرف اسید لاکتیک از تجمع آن در محیط شکمبه کاسته و محیط شکمبه را برای فعالیت تخمیری آماده‌تر می‌کند. (Petri et al. 2013; Kraatz et al. 2011).

دو خانواده WCHB1_25 و RFP12 متعلق به فیلوم Verrucomicrobia در این مطالعه از طریق روش Miseq شناسایی شده‌اند. حضور آن‌ها در دستگاه گوارش گوسفند در مطالعات قبلی گزارش شده‌است ولی اطلاعات دقیقی از نحوه عملکرد آن‌ها در دسترس نیست (Wang et al. 2017). خانواده Prevotellaceae هبستگی منفی با باکتری‌هایی با نقش آشکار در تجزیه خوراک فیبری همچون Ruminococcaceae، Clostridiaceae، Christensenellaceae و F16 نشان داد. مطالعات قبلی نشان می‌دهند که Prevotellaceae عمدتا حاوی ژن‌های کدکننده آنزیم‌های الیگوساکارید هیدرولازها، آنزیم‌های تجزیه کننده نشاسته و همی سلولازها، اما نه سلولازها می‌باشند (McCann et al. 2014).

در آنالیز همبستگی بین جمعیتی داده‌های حاصل از Miseq، خانواده Bifidobacteriaceae همبستگی مثبت بالایی را با Succinivibrionaceae و همبستگی منفی بالایی را با Spirochaetaceae و Ruminococcaceae نشان دادند. خانواده Succinivibrionaceae عمدتاً مسئول تولید پروپیونات در حیوانات دریافت کننده رژیم غذایی غنی از کنسانتره می‌باشند. این باکتری‌ها به‌عنوان تجزیه کننده خوراک فیبری شناخته شده نیستند. فراوانی بالای این باکتری در تعداد زیادی از حیوانات تغذیه شده با رژیم غذایی با نشاسته بالا و یا خوراک‌های حاوی مقدار زیادی از کربوهیدرات‌های سریع التخمیر گزارش شده‌اند (Rosenberg et al. 2014). هم‌چنین فراوانی بالای Bifidobacteriaceae در روده حیوانات تغذیه شده با رژیم غذایی با نشاسته بالا مشاهده شده‌است که این دلالت بر نقش آن‌ها در هیدرولیز کربوهیدرات‌ها دارد (Zened et al. 2013). نقش Spirochaetaceae در ارتباط با باکتری‌های سلولولیتیک قبلاً نشان داده شده‌است (Deusch et al. 2017).

سهم فراوان پروتئین‌های سلولاز و همی سلولاز کدگذاری شده توسط Clostridiales، آن‌ها را به‌عنوان یکی از گروه‌های باکتریایی کلیدی تجزیه‌کننده فیبر در شکمبه تبدیل کرده است (Ben et al. 2015). همچنین مشارکت خانواده‌های Ruminococcaceae و Lachnospiraceae درتجزیه فیبر در گزارشات متعدد آورده شده‌است (Saro et al. 2012; Mosoni et al. 2007; Koike et al. 2003). فیلوم Fibrobacter یکی از شایع‌ترین و مؤثرین باکتری سلولولیتیک در شکمبه می‌باشد. این باکتری برای رشد نیاز به والرات و ایزوبوتیرات دارد و سلولز را برای تولید استات و سوکسینات مصرف می‌کند (Puniya et al. 2015; Piao et al. 2014).

فیلوم Verrucomicrobia دارای توزیع گسترده و شناخته شده‌ای است که یکی از رایج‌ترین و متنوع‌ترین فیلوم‌ها در خاک، زیستگاه‌های آبزی و در روده یوکاریوت‌ها می‌باشد (Lee et al. 2009; Kielak et al. 2010). با این حال، از آنجا که اعضای این فیلوم به سختی قابل کشت می‌باشند، مطالعات درک نقش آن محدود شده‌است. گزارش شده که برخی از اعضای فیلوم Verrucomicrobia متان را به‌عنوان یک منبع کربن و انرژی اکسیده می‌کنند که همین عامل باعث شده که به‌عنوان تنها متانوتروف‌های هوازی و تنها متانوتروف‌های اسیدوفیلیک شدید شناخته شوند (Kielak et al. 2010).

نقش باکتری Fusobacterium در تخمیر شکمبه‌ای متابولیز اسید لاکتیک و تجزیه خوراک و پروتئین‌های اپیتلیال است. این باکتری جزو باکتری‌های تخمیر کننده اسید هستند که برای به تعادل رساندن محیط تخمیری شکمبه از اسیدهای آلی تولید شده در مسیرهای تخمیری سایر باکتری‌ها استفاده می‌کنند. اسیدهای چرب فرار استیک، پروپیونیک و بوتیریک به‌سرعت جذب میزبان می‌شود و کمتر توسط میکروب‌های شکمبه استفاده می‌شود. اما به‌دلیل تاثیرات منفی اسیدهای چرب لاکتات و سوکسینات باکتری‌ها آن‌ها را سریع‌تر مصرف می‌کنند تا از محیط خارج



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

شوند. همچنین گزارش شده که غلظت شکمبه‌ای آن در گاوی که با خوراک های مبتنی بر غلات تعلیف شده‌اند، بیشتر از زمانی است که خوراک‌های مبتنی بر علوفه مصرف شده باشد (Tadepalli et al. 2009).

در این مطالعه Treponema جنس غالب شناسایی شده در خانواده Spirochaetaceae می‌باشد. اگرچه Treponema نمیتواند سلولز را تجزیه کند ولی نزدیکی فیزیکی[1] و عکس‌العمل آن با باکتری‌های سلولولیتیک، نشان‌دهنده ارتباط متقابل آن با تجزیه کننده‌های سلولز می‌باشد (Kudo et al. 1987). در یک مطالعه در سال ۲۰۱۱ شواهدی ارائه شد که نشان می‌داد Treponema spp در تجزیه فیبرهای محلول نقش دارند (Bekle et al. 2011). باکتریهای متعلق به این جنس می‌توانند متابولیزه کننده و تخمیرکننده اگزوپلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط باکتری‌های سلولولیتیک باشند (Warnecke et al. 2007). نقش باکتری‌های این جنس در تجزیه پکتین نیز در مطالعات قبلی گزارش شده‌است (Liu et al. 2015). هم‌چنین مشاهده شده که با مصرف کاه برنج، جمعیت این جنس در شکمبه گاو افزایش پیدا کرده است (Liu et al. 2016).

باکتری‌های Fusobacteria، Actinobacteria و Synergistetes دامنه وسیعی از ظرفیت‌های تخمیری را دارا می‌باشند. آن‌ها ممکن است باکتری‌های مصرف کننده دیواره سلول گیاهی را از طریق تخمیر فعال ترکیبات نیتروژنی حمایت نمایند (Ziemer et al. 2014). باکتری F16 (متعلق به فیلوم (Saccharibacteria (TM7) همبستگی مثبتی را با Ruminococcaceae، Fibrobacteraceae، Clostridiaceae و Christensenellaceae و همبستگی منفی با خانواده‌های Coriobacteriaceae و Prevotellaceae نشان داد. اخیراً در یک مطالعه بر روی شکمبه گاو گوشتی این باکتری به‌عنوان مصرف کننده سلولز معرفی شده‌است (Opdahl et al. 2018).

باکتری Cyanobacteria، فیلوم شناسایی شده در روش Miseq، تا سطح خانواده طبقه‌بندی نشد و نماینده‌ای در آنالیز همبستگی بین خانواده نداشت. این باکتری‌ها جزو باکتری‌های فتوتروفیک می‌باشند که قبلاً حضور آن‌ها در فراوانی کم در شکمبه گاو شیری (Scharen et al. 2017)، گاو گوشتی (Li and Guan 2017) و شتر (Gharechahi et al. 2015) گزارش شده‌است. این‌ها باکتری‌های هوازی هستند که می‌توانند تخمیر کربوهیدرات را در یک غلظت کم $N_2$ و یا در ترکیب کمبود $N_2$ و شرایط بی‌هوازی[2] انجام دهند. اگر چه شکمبه به‌عنوان یک مخزن بی‌هوازی شناخته می‌شود ولی غلظت‌های قابل توجهی از $O_2$ را می‌توان در شکمبه تشخیص داد (Newbold et al. 1996) که ممکن است خود دلیلی بر وجود Cyanobacteria در شکمبه برای تخلیه $O_2$ و تخمیر کربوهیدرات تحت شرایط هوازی محدود شده باشد. لازم به ذکر است اگر چه Cyanobacteria در محیط‌های آبی و خاکی به‌طور گسترده‌ای شناسایی شده‌اند (Cruz-Martinez et al. 2009; Williams et al. 2004) ولی وجود این باکتری‌ها در دستگاه گوارش پستانداران و نقش آن‌ها در محیط‌های بی‌هوازی هنوز تحت سوال است (Soo et al. 2014). تحقیقات اخیر نشان داده که Cyanobacteria به شدت حفاظت‌شده هستند ولی درخت فیلوژنتیکی حاصل از ژن 16S rRNA آن‌ها چیزی متفاوت از Cyanobacteria فتوسنتتیک می‌باشد که همین امر منجر به معرفی کلاس کاندیدای جدید به‌نام Melainabacteria شده‌است که اعضای آن‌ها قادر به تبدیل طیف وسیعی از قندها (گلوکز، فروکتوز و سوربیتول) به استات و بوتیرات در دستگاه گوارش هستند (Di Rienzi et al. 2013). در هیچ یک از دو روش تعیین توالی مورد مطالعه در تحقیق حاضر، این کلاس از باکتری‌ها تشخیص داده نشدند. برای بررسی نقش دقیق تر این باکتری‌های هوازی در شکمبه نیاز به تحقیقات بیشتری است.

## نتیجه‌گیری کلی

تحقیق حاضر نشان داد که در کلونیزه کردن کاه برنج در شکمبه گوسفند اثر هم‌افزایی و همپوشانی بین اعضای فیلوم‌های شناسایی شده وجود دارد و با در نظر گرفتن فراوانی نسبی به‌نظر می‌رسد که اعضای فیلوم‌های Firmicutes ، Fibrobacter و Spirochaetes نقش حیاتی در این زمینه ایفا می‌کنند. نتایج نشان می‌دهد که عامل اصلی برای بیش‌ترین واریانس در ترکیب میکروبیوم شناسایی شده در یک محیط بیشتر تحت تاثیر روش مطالعه و تکنولوژی انتخابی بوده تا واریانس واقعی بین فردی، جمعیتی و یا مکانی.

[1] Physical proximity

[2] non-heterocystous



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

هم‌چنین نوع نرم‌افزارهای انتخابی برای طبقه‌بندی تاکسونومیکی می‌تواند نقش حیاتی و حتی قدرت تفکیک بیشتری نسبت به نوع تکنولوژی انتخابی برای تعیین توالی و هم‌چنین انتخاب آمپلیکون داشته باشد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد در صورت سر و کار داشتن با مجموعه داده‌های بزرگ و حساسیت بالای کار، برای افزایش صحت و دقت نتایج کار، باید یک مقایسه در مقیاس کوچک بین تکنیک‌های موجود برای انتخاب بهترین استراتژی انجام شود.

**سپاسگزاری**

مؤلفین بر خود لازم می‌دانند بدین‌وسیله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی برای تامین مالی این پروژه (شماره پروژه مصوب: ۹۵۰۰۴-۰۰۵-۰۵-۰۵-۰۱) و هم‌چنین از همکاران محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری گیلان برای تسهیل کار و در اختیار قرار دادن تجهیزات مورد نیاز، مراتب قدردانی خود را به‌عمل آورند.

## منابع

Albanese D, Fontana P, Filippo CD, Cavalieri D, Donati C (2015) MICCA: a complete and accurate software for taxonomic profiling of metagenomic data. Scientific Reports 5: 9743.

Bekele AZ, Koike S, Kobayashi Y (2011) Phylogenetic diversity and dietary association of rumen Treponema revealed using group-specific *16S rRNA* gene-based analysis. FEMS Microbiology Ecology 316: 51-60.

Ben David Y, Dassa B, Borovok I, Lamed R, Koropatkin NM, Martens EC, White BA, Bernalier-Donadille A, Duncan SH, Flint HJ, Bayer EA, Moraïs S (2015) Ruminococcal cellulosome systems from rumen to human. Environmental Microbiology 17: 3407-3426.

Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R (2010) PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. Bioinformatics 26: 266-267.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. The ISME Journal 6: 1621-1624.

Cheng Y, Wang Y, Li Y, Zhang Y, Liu T, Wang Y, Sharpton TJ, Zhu W (2017) Progressive Colonization of Bacteria and Degradation of Rice Straw in the Rumen by Illumina Sequencing. Frontiers in Microbiology 8:2165.

Clooney AG, Fouhy F, Sleator RD, O' Driscoll A, Stanton C, Cotter PD, Claesson MJ ( 2016) Comparing apples and oranges?: Next generation sequencing and its impact on microbiome analysis. PLoS One 11: e0148028.

Cruz-Martinez K, Suttle KB, Brodie EL, Power ME, Andersen GL, Banfield J F (2009) Despite strong seasonal responses, soil microbial consortia are more resilient to long-term changes in rainfall than overlying grassland. The ISME Journal 3:738-744.

DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL (2006) Greengenes, a chimera-checked *16S rRNA* gene database and workbench compatible with ARB. Applied and Environmental Microbiology 72: 5069-5072.

Deusch S, Camarinha-Silva A, Conrad J, Beifuss U, Rodehutscord M, Seifert J (2017) A Structural and Functional Elucidation of the Rumen Microbiome Influenced by Various Diets and Microenvironments. Frontiers in Microbiology 8: 1605.

Dhariwal A, Chong J, Habib S, King I, Agellon LB, Xia J (2017) MicrobiomeAnalyst - a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. Nucleic Acids Research 45:180-188.

Di Rienzi SC, Sharon I, Wrighton KC, Koren O, Hug LA, Thomas BC, Goodrich JK, Bell JT, Spector TD, Banfield JF, Ley RE (2013) The human gut and groundwater harbor non-photosynthetic bacteria belonging to a new candidate phylum sibling to Cyanobacteria. Elife 2: e01102.

Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26: 2460-2461.

Gharechahi J, Zahiri HS, Noghabi KA, Salekdeh GH (2015) In-depth diversity analysis of the bacterial community resident in the camel rumen. Systematic and Applied Microbiology 38:67–76.

Haas BJ, Gevers D, Earl AM, Feldgarden M, Ward DV, Giannoukos G, Ciulla D, Tabbaa D, Highlander SK, Sodergren E, Methe B, DeSantis TZ, Human Microbiome C, Petrosino JF, Knight R, Birren BW (2011) Chimeric *16S rRNA* sequence formation and detection in Sanger and 454- pyrosequenced PCR amplicons. Genome Research 21:494-504.

Hsieh TC, Ma KH, Chao A (2016) iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). Methods in Ecology and Evolution 7: 451-1456.

Johnston D, Earley B, Cormican P, Murray G, Kenny DA, Waters SM, McGee M, Kelly AK, McCabe MS ( 2017) Illumina MiSeq 16S amplicon sequence analysis of bovine respiratory disease associated bacteria in lung and mediastinal lymph node tissue. BMC Veterinary Research 3: 118.

Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh Koshkoieh A, Moradi-Shahrebabak H, Bordbar F, Ansari Namin S (2016) Identification of point mutations in exon 2 of *GDF9* gene in Kermani sheep. Polish Journal of Veterinary Sciences 19: 281-289.

Kielak A, Rodrigues JL, Kuramae EE, Chain PS, van Veen JA, Kowalchuk GA (2010) Phylogenetic and metagenomic analysis of Verrucomicrobia in former agricultural grassland soil. FEMS Microbiology Ecology 71: 23-33.



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

Kim M, Morrison M, Yu ZT (2011) Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. FEMS Microbiology Ecology 76: 49-63.

Koike S, Yoshitani S, Kobayashi Y, Tanaka K (2003) Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. FEMS Microbiology Letters 229: 23-30.

Kraatz M, Wallace RJ, Svensson L (2011) *Olsenella umbonata* sp. nov., a Microaerotolerant Anaerobic Lactic Acid Bacterium from the Sheep Rumen and Pig Jejunum, and Emended Descriptions of Olsenella, Olsenella uli, and Olesenella profusa. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61: 795-803.

Kudo H, Cheng KJ, Costerton JW (1987) Interactions between *Treponema bryantii* and cellulolytic bacteria in the in vitro degradation of straw cellulose. Canadian Journal of Microbiology 33: 244-248.

Laudadio I, Fulci V, Palone F, Stronati L, Cucchiara S, Carissimi C (2018) Quantitative Assessment of Shotgun Metagenomics and *16S rDNA* Amplicon Sequencing in the Study of Human Gut Microbiome. OMICS A Journal of Integrative Biology 22: 248-254.

Lee KC, Webb RI, Janssen PH, Sangwan P, Romeo T, Staley JT, Fuerst JA (2009) Phylum Verrucomicrobia representatives share a compartmentalized cell plan with members of bacterial phylum Planctomycetes. BMC Microbiology 9:5.

Li F, Guan LL (2017) Metatranscriptomic profiling reveals linkages between the active rumen microbiome and feed efficiency in beef cattle. Applied and Environmental Microbiology 83:e00061-17.

Liu J, Pu YY, Xie Q, Wang JK, Liu JX (2015) Pectin induces an in vitro rumen microbial population shift attributed to the pectinolytic *Treponema* group. Current Microbiology 70: 67-74.

Liu J, Zhang M, Xue C, Zhu W, Mao S (2016) Characterization and comparison of the temporal dynamics of ruminal bacterial microbiota colonizing rice straw and alfalfa hay within ruminants. Journal of Dairy Science 99: 9668-9681.

Magoč T, Salzberg SL (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. Bioinformatics 27: 2957-2963.

Malik K, Tokkas J, Anand RC, Kumar N (2015) Pretreated rice straw as an improved fodder for ruminants–an overview. Journal of Applied and Natural Science 7: 514-520.

McCann JC, Wiley LM, Forbes TD, Rouquette FM Jr, Tedeschi LO (2014) Relationship between the Rumen Microbiome and Residual Feed Intake-Efficiency of Brahman Bulls Stocked on Bermudagrass Pastures. PLoS ONE 9: e91864.

MetaSUB International Consortium (2016) The Metagenomics and Metadesign of the Subways and Urban Biomes (MetaSUB) International Consortium inaugural meeting report. Microbiome 4:24.

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. Journal of Research and Development 5: 154-157.

Mohammadabadi MR, Sattayimokhtari R (2013) Estimation of (co) variance components of ewe productivity traits in Kermani sheep. Journal of Animal Science 46: 45-51.

Morgavi DP, Kelly WJ, Janssen PH, Attwood GT (2013) Rumen microbial (meta) genomics and its application to ruminant production. Animal 7: 184-201.

Mosoni P, Chaucheyras-Durand F, Béra-Maillet C, Forano E (2007) Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. Journal of Applied Microbiology 103: 2676-2685.

Newbold CJ, Wallace RJ, McIntosh FM (1996) Mode of action of the yeast Saccharomyces cerevisiae as a feed additive for ruminants. British Journal of Nutrition 76:249-261.

Opdahl LJ, Gonda MG, St-Pierre B (2018) Identification of Uncultured Bacterial Species from Firmicutes, Bacteroidetes and CANDIDATUS Saccharibacteria as Candidate Cellulose Utilizers from the Rumen of Beef Cows. Microorganisms 24: 6.

Petri RM, Schwaiger T, Penner GB, Beauchemin KA, Forster RJ, McKinnon JJ, McAllister TA (2013) Changes in the Rumen Epimural Bacterial Diversity of Beef Cattle as Affected by Diet and Induced Ruminal Acidosis. Applied and Environmental Microbiology 79: 3744-55.

Piao H, Lachman M, Malfatti S, Sczyrba A, Knierim B, Auer M, Tringe SG, Mackie RI, Yeoman CJ, Hess M (2014) Temporal dynamics of fibrolytic and methanogenic rumen microorganisms during in situ incubation of switchgrass determined by *16S rRNA* gene profiling. Frontiers in Microbiology 5: 307.

Puniya AK, Salem AZ, Kumar S, Dagar SS, Griffith GW, Puniya M, Ravella RS, Kumar N, Dhewa T, Kumar R (2015) Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant productivity: a review. Journal of Integrative Agriculture 14: 550-560.

Ranjan R, Rani A, Metwally A, McGee HS, Perkins DL (2016) Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. Biochemical and Biophysical Research Communications 469: 967-77.

Rintala A, Pietilä S, Munukka E, Eerola E, Pursiheimo JP, Laiho A, Pekkala S, Huovinen P (2017) Gut Microbiota Analysis Results Are Highly Dependent on the *16S rRNA* Gene Target Region, Whereas the Impact of DNA Extraction Is Minor. Journal of Biomolecular Techniques 28: 19-30.

Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (2014) The Prokaryotes. Springer Berlin Heidelberg. pp 639-648.

Saro C, Ranilla MJ, Carro M (2012) Postprandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by real-time PCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis. Journal of Animal Science 90: 4487-4494.

Schären M, Drong C, Kiri K, Riede S, Gardener M, Meyer U, Hummel J, Urich T, Breves G, Dänicke S (2017) Differential effects of monensin and a blend of essential



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]

oils on rumen microbiota composition of transition dairy cows. Journal of Dairy Science 100:2765-2783.

Schären M, Frahm J, Kersten S, Meyer U, Hummel J, Breves G, Dänicke S (2018) Interrelations between the rumen microbiota and production, behavioral, rumen fermentation, metabolic, and immunological attributes of dairy cows. Journal of Dairy Science. 101: 4615-4637.

Schulze-Schweifing K, Banerjee A, Wade WG (2014) Comparison of bacterial culture and *16S rRNA* community profiling by clonal analysis and pyrosequencing for the characterization of the dentine caries-associated microbiome. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 4: 164.

Segata N, Waldron L, Ballarini A, Narasimhan V, Jousson O, Huttenhower C (2012) Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. Nature Methods 9: 811-814.

Sheikh GG, Ganai AM, Reshi PA, Bilal S, Mir S, Masood D (2018) Improved paddy straw as ruminant feed: A review. Agricultural Reviews 39: 137-143.

Singh KM, Pandya PR, Tripathi AK, Patel GR, Parnerkar S, Kothari RK, Joshi CG (2014) Study of Rumen Metagenome Community Using qPCR under Different Diets. Meta Gene 2: 191-199.

Soo RM, Skennerton CT, Sekiguchi Y, Imelfort M, Paech SJ, Dennis PG, Steen JA, Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P (2014) An expanded genomic representation of the phylum cyanobacteria. Genome Biology and Evolution 6:1031-1045.

Soufy B, Mohammadabadi MR, Shojaeyan K, Baghizadeh A, Ferasaty S, Askari N, Dayani O (2009) Evaluation of Myostatin gene polymorphism in Sanjabi sheep by PCR-RFLP method. Animal Science Reserches 19: 81-89 (In Farsi).

Stewart CS, Flynt HJ, Bryant MP (1997) The Rumen Bacteria, P.N. Hobson and C.S. Stewart (Ed.), The Rumen Microbial Ecosystem. Blackie Academic and Professional, New York, NY.

Tadepalli S, Narayanan SK, Stewart GC, Chengappa MM, Nagaraja TG (2009) Fusobacterium necrophorum: a ruminal bacterium that invades liver to cause abscesses in cattle. Anaerobe 15: 36-43.

Tessler M, Neumann JS, Afshinnekoo E, Pineda M, Hersch R, Velho LFM, Segovia BT, Lansac-Toha FA, Lemke M, DeSalle R, Mason CE, Brugler MR (2017) Large-scale differences in microbial biodiversity discovery between 16S amplicon and shotgun sequencing. Scientific Reports 7: 6589.

The Human Microbiome Project Consortium (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature 486: 207-214.

Truong DT, Franzosa EA, Tickle TL, Scholz M, Weingart G, Pasolli E, Tett A, Huttenhower C, Segata N (2015) MetaPhlAn2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. Nature Methods 12: 902-903.

Vajed Ebrahimi MT, Mohammad Abadi MR, Esmailizadeh AK (2016) Analysis of genetic diversity in five Iranian sheep population using microsatellites markers. Journal of Agricultural Biotechnology 7: 143-158.

Vajed Ebrahimi MT, Mohammad Abadi MR, Esmailizadeh AK (2017) Using microsatellite markers to analyze genetic diversity in 14 sheep types in Iran. Archiv fuer Tierzucht Archives Animal Breeding 60: 183-189.

Vernikos G, Medini D, Riley DR and Tettelin H (2015) Ten years of pan-genome analyses. Current Opinion in Microbiology 23: 148-154.

Wang J, Fan H, Han Y, Zhao J, Zhou Z (2017) Characterization of the microbial communities along the gastrointestinal tract of sheep by 454 pyrosequencing analysis. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 30: 100-110.

Warnecke F, Luginbühl P, Ivanova N, Ghassemian M, Richardson TH, Stege JT, Cayouette M, McHardy AC, Djordjevic G, Aboushadi N, Sorek R, Tringe SG, Podar M, Martin HG, Kunin V, Dalevi D, Madejska J, Kirton E, Platt D, Szeto E, Salamov A, Barry K, Mikhailova N, Kyrpides NC, Matson EG, Ottesen EA, Zhang X, Hernández M, Murillo C, Acosta LG, Rigoutsos I, Tamayo G, Green BD, Chang C, Rubin EM, Mathur EJ, Robertson, DE, Hugenholtz P, Leadbetter JR (2007) Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. Nature 450: 560-565.

Wei T (2012) Package 'corrplot' – Visualization of a correlation matrix v0.60. cran.r-project.org. Available: http://cran.r-project.org/web/packages/corrplot/corrplot.pdf.

Wiebe K, Lotze-Campen H, Sands R, Tabeau A, van der Mensbrugghe D, Biewald A, Bodirsky B, Islam S, Kavallari A, Mason-D'Croz D, Müller C, Popp A, Robertson R, Robinson S, Meijl HV, Dirk Willenbockel D (2015) Climate change impacts on agriculture in 2050 under a range of plausible socioeconomic and emissions scenarios. Environmental Research Letters 10: 85010.

Williams MM, Domingo JWS, Meckes MC, Kelty CA, Rochon HS (2004) Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. Journal of Applied Microbiology 96:954-964.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015) Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. Small Ruminant Research 132: 123-127.

Zened A, Combes S, Cauquil L, Mariette J, Klopp C, Bouchez O, Troegeler-Meynadier A, Enjalbert F (2013) Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. FEMS Microbiology Ecology 83: 504-514.

Ziemer CJ (2014) Newly cultured bacteria with broad diversity isolated from eight-week continuous culture enrichments of cow feces on complex polysaccharides. Applied and Environmental Microbiology 80: 574-585.



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-26 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.2.5 ]