



جداسازی قارچ حل کننده فسفات از معدن فسفات و شناسائی مولکولی آن بر اساس توالی ژن کالمودولین

راحله جمشیدی^۱، * بهی جلیلی^۲، محمدعلی بهمنیار^۳ و سروش سالک گیلانی^۴

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، استادیار گروه علوم خاک،

^۲ دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،

^۳ مربی گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

^۴ تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۱۷

چکیده

سابقه و هدف: فسفر یکی از عناصر پرمصرف است و در بسیاری از فرآیندهای ضروری گیاه مانند تنفس، تقسیم سلولی، توسعه ریشه، فتوسنتز، تجزیه قند، نقل و انتقال مواد مغذی در داخل گیاه، انتقال خصوصیات ژنتیکی از یک نسل به نسل دیگر و تنظیم مسیرهای سوخت و ساز دخالت دارد. هنگامی که محتوای فسفر در خاک از ۰/۱٪ کم تر گردد، کمبود رخ می دهد. امروزه جهت دستیابی به توسعه پایدار، استفاده از منابع طبیعی ارزان قیمت مغذی گیاهی مثل سنگ فسفات ضرورت دارد. در سال های اخیر استفاده از میکروارگانیسم های حل کننده فسفات جهت انحلال سنگ فسفات مورد مطالعه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه، جداسازی قارچ های بومی دارای توانایی انحلال فسفات نامحلول و تعیین هویت مؤثرترین جدایه در سطح گونه بود.

مواد و روش ها: از خاک اطراف معدن فسفات دلیر واقع در چالوس، (مازندران) نمونه برداری انجام شد. پس از تهیه سری رقت ها از سوسپانسیون خاک و انجام کشت در محیط های NBRIP-BPB و PVK کلنی های قارچی حل کننده فسفات جداسازی شدند. توانایی انحلال فسفات قارچ های جدا شده در محیط کشت مایع NBRIP نیز بررسی گردید. فسفر آزاد شده در محیط مایع و pH نمونه ها با استفاده از دستگاه pH متر اندازه گیری شد. جدایه ای که pH محیط را به میزان زیادی کاهش داد، فسفر بیش تری آزاد کرد و دارای شاخص انحلال بزرگ تری بود، این جدایه به عنوان جدایه منتخب در ابتدا بر اساس توالی یابی ناحیه ITS مورد بررسی قرار گرفت و سپس شناسایی دقیق گونه با استفاده از تفاوت های مولکولی به دست آمده از توالی یابی ژن کالمودولین انجام شد.

یافته ها: نتایج بیانگر آن است که استفاده از محیط کشت NBRIP-BPB نسبت به محیط کشت PVK برای جداسازی قارچ حل کننده فسفات مناسب تر است. غربالگری در محیط جامد و مایع برای هر یک از جدایه ها انجام گردید و جدایه SANRU به عنوان مؤثرترین جدایه در انحلال فسفات نامحلول انتخاب شد. نتایج حاصل از مقایسه توالی ژن ITS با توالی های موجود در بانک ژن نشان داد، سویه SANRU ۱۰۰٪ با گونه های *A. niger* و *A. tubingensis* مشابهت دارد، به منظور غلبه بر این عدم اطمینان، بخشی از ژن کالمودولین تکثیر و توالی یابی گردید، تکثیر بخشی از توالی ژن کالمودولین نشان داد سویه SANRU متعلق به سکشن *tubingensis* است و نمونه تعیین توالی شده با شماره دسترسی KT222864 در بانک جهانی ژن ثبت گردید.

* مسئول مکاتبه: bahi_jalilis@yahoo.com

نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصل از این بررسی غربالگری هم‌زمان در محیط جامد و مایع برای تعیین توان انحلال فسفات، پیشنهاد می‌گردد. بنا به نتایج این مطالعه روش تعیین توالی ژن کالمودولین در مقایسه با ITS از دقت بسیار بالاتری برای تمایز گونه‌های آسپرژیلوس برخوردار است، بنابراین برای شناسایی دقیق آسپرژیلوس‌ها در حد گونه توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس توپینجنسیس، کالمودولین، محیط کشت NBRIP-BPB

مقدمه

فسفر یکی از عناصر پرمصرف برای گیاهان است و در جایگاه دوم بعد از نیتروژن قرار دارد (۲۵). نقش فسفر در گیاهان شامل فتوسنتز، تولید قند و انرژی و همچنین تقویت تثبیت نیتروژن توسط باکتری همزیست در گیاهان لگوم است (۱۱). این عنصر نقش بیولوژیکی مهمی در تنفس، تقسیم سلولی، بزرگ شدن سلول و چندین فرایند دیگر در گیاه زنده دارد. در خاک از فسفر کل (۰/۵٪)، فقط ۰/۱٪ آن برای گیاهان قابل دسترس است (۱۱). اکثر گیاهان زراعی برای رشد طبیعی به ۰/۲ تا ۰/۵٪ فسفر در ماده خشک بافت نیاز دارند و به احتمال زیاد با کاهش میزان فسفر به کم‌تر از ۰/۱٪ کمبود رخ می‌دهد (۷). مسأله کمبود فسفر از طریق کاربرد مکرر کود فسفردار تا حصول حداکثر بازده گیاه معمولاً برطرف می‌گردد، ولی استفاده بی‌رویه و نامعقول از کودهای شیمیایی فسفردار منجر به تقلیل حاصلخیزی خاک از طریق کاهش تنوع میکروبی شده و در نتیجه بازده محصولات زراعی را کاهش می‌دهد (۱۱). امروزه دستیابی به توسعه پایدار شامل استفاده از سازوکارهای جایگزین بر اساس استفاده از منابع طبیعی ارزان‌قیمت مغذی گیاهی مثل سنگ فسفات است. اثر مفید سنگ فسفات این ماده را به یکی از مؤلفه‌های مناسب برای مدیریت در بخش کشاورزی تبدیل کرده است (۲۲). متأسفانه، سنگ فسفات در خاک‌های با pH بیش‌تر از ۶-۵/۵ به‌راحتی برای گیاهان قابل استفاده نیست (۹).

انحلال سنگ فسفات به‌وسیله میکروارگانیسم‌های تولیدکننده اسیدهای آلی رویکرد مؤثری است که به‌طور فعال در دهه گذشته مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۹). پس از کار اولیه جرستن (۱۹۴۸) (۵)، وجود میکروارگانیسم‌های خاکزی (عمدتاً باکتری‌ها و قارچ‌ها) با توانایی انحلال فسفات معدنی توسط بسیاری از پژوهشگران گزارش شده است (۱، ۲، ۳ و ۲۳). این میکروارگانیسم‌ها ترکیبات نامحلول فسفات موجود در خاک را به‌صورت محلول درآورده و آن را برای گیاهان قابل دسترس می‌کنند (۱۰).

انحلال فسفات به‌وسیله قارچ‌ها و باکتری‌های حل‌کننده فسفات از طریق مکانیسم‌های مختلف از جمله تولید اسیدهای آلی و کاهش pH صورت می‌گیرد (۲۶). در این میان قارچ‌های حل‌کننده فسفات به‌دلیل قدرت رقابتی ساپروفیتی و تحمل به فلزات سنگین، مواد شیمیایی، قارچ‌کش‌ها و دما، دارای اهمیت بیش‌تری هستند (۱۱). از جمله قارچ‌های حل‌کننده فسفات می‌توان به آسپرژیلوس‌های سیاه حل‌کننده فسفات از جمله آسپرژیلوس توپینجنسیس، آسپرژیلوس نابجر، آسپرژیلوس آواموری و آسپرژیلوس آکیولتوس اشاره داشت (۱). هدف از این مطالعه، جداسازی قارچ‌های بومی حل‌کننده فسفات از معدن فسفات دلیر چالوس و تعیین هویت مؤثرترین جدایه در سطح گونه بود.

مواد و روش‌ها

مکان نمونه‌برداری: نمونه‌های خاک و سنگ فسفات از لایه ۱۰-۰ سانتی‌متری سطح خاک برای جداسازی قارچ حل‌کننده فسفات از اطراف معدن فسفات دلیر واقع در دهکده دلیر چالوس مازندران جمع‌آوری شدند. بیش از ۲۵ نقطه انتخاب و نمونه‌ها با تکنیک‌های استریل جمع‌آوری گردید.

جداسازی قارچ‌های حل‌کننده فسفات: به‌منظور جداسازی قارچ‌های حل‌کننده فسفات، مقدار ۱۰ g از هر نمونه به ۹۵ mL آب مقطر افزوده شد و به‌وسیله شیکر (Edmund Buhler) در سرعت ۱۲۰ rpm تکان داده شدند. سپس سوسپانسیون حاصله به‌طور متوالی تا رقت 10^{-6} رقیق شده و هر پلیت حاوی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) به‌وسیله ۰/۱ mL از سوسپانسیون با رقت 10^{-6} تلقیح گردید. پلیت‌ها در انکوباتور در دمای $28 \pm 2^\circ\text{C}$ نگهداری شدند. پس از گذشت ۷ روز، قارچ‌های رشدیافته خالص‌سازی شدند، سپس به‌منظور بررسی توانایی‌شان در انحلال فسفات بروی پلیت‌های حاوی محیط‌های کشت اختصاصی منتقل و در دمای $28 \pm 2^\circ\text{C}$ انکوبه شدند. در این بررسی از دو محیط کشت (Pikoveskaya (PVK) (گلوکز 1 g L^{-1} ، $0.5\text{ g L}^{-1}\text{ Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ، $0.1\text{ g L}^{-1}\text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، $0.002\text{ g L}^{-1}\text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، $0.002\text{ g L}^{-1}\text{ (NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، $0.2\text{ g L}^{-1}\text{ KCl}$ ، $0.002\text{ g L}^{-1}\text{ NaCl}$ ، عصاره مخمر 0.5 g L^{-1} و آگار 15 g L^{-1}) (۲۱) و محیط کشت (NBRIP-BPB) National Botanical Research Institute's (گلوکز 1 g L^{-1} ، $10\text{ g L}^{-1}\text{ Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ، $5\text{ g L}^{-1}\text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، $0.25\text{ g L}^{-1}\text{ KCl}$ ، $5\text{ g L}^{-1}\text{ MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، $0.25\text{ g L}^{-1}\text{ (NH}_4)_2\text{SO}_4$ و آگار 15 g L^{-1}) (۱۸) استفاده شد.

خالص‌سازی قارچ‌ها: پس از گذشت سه روز از کشت بر روی محیط کشت PVK کلنی‌های متعددی روی پلیت‌ها رشد کردند ولی در طی ۱۴ روز نشانه‌ای از انحلال فسفات توسط کلنی‌ها مشاهده نشد، اما پس از سپری شدن سه روز روی پلیت‌های حاوی محیط کشت NBRIP-BPB، گونه‌های حل‌کننده فسفات با تغییر رنگ محیط کشت از آبی به زرد و همچنین ایجاد هاله روشن اطراف کلنی‌شان شناسایی شدند. کلنی‌هایی که هاله روشن واضحی ایجاد کرده بودند، جهت خالص‌سازی به‌طور مکرر بر روی PDA کشت داده و در دمای $28 \pm 2^\circ\text{C}$ نگهداری شدند.

بررسی انحلال فسفات توسط قارچ در محیط کشت جامد: جهت بررسی انحلال فسفات، قارچ‌های جدا شده روی محیط کشت NBRIP-BPB کشت شده و پس از گذشت هفت روز شاخص انحلال (Solubilization index) توسط رابطه زیر محاسبه گردید (۱۳):

$$\text{شاخص انحلال} = \frac{\text{قطر هاله روشن}}{\text{قطر کلنی}}$$

بررسی انحلال فسفات توسط قارچ در محیط کشت مایع: به‌منظور بررسی توانایی انحلال فسفات قارچ‌های منتخب در محیط کشت مایع، پس از گذشت یک هفته از کشت در محیط Potato Dextrose Broth (PDB) اسپورهای قارچی توسط محلول استریل Tween ۸۰ (w/v) ۰/۲٪ برداشت و به ظرف شیشه‌ای استریل حاوی آب مقطر استریل منتقل گردیدند. سوسپانسیون سلولی قارچ ایزوله شده به‌وسیله لام هموسیتومتر (Hemocytometer) توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ شمارش گردید. آزمایش‌های انحلال سنگ فسفات در ارلن‌مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ mL محیط کشت مایع NBRIP (بدون آگار) و ۲٪ سنگ فسفات عبور داده

شده از الکترون میکرومتری، به عنوان تنها منبع فسفات در سه تکرار انجام گرفت. میزان 10^7 سلول از هر ایزوله به ارلن مایرها اضافه گردید و به مدت شش روز در دمای اتاق به وسیله شیکر با سرعت ۱۲۰ rpm تکان داده شدند. جدایه‌ای که pH را به میزان زیادی پایین آورده، فسفر بیش‌تری آزاد کرده و دارای شاخص انحلال بزرگ‌تری بود برای مطالعات بیش‌تر انتخاب شد.

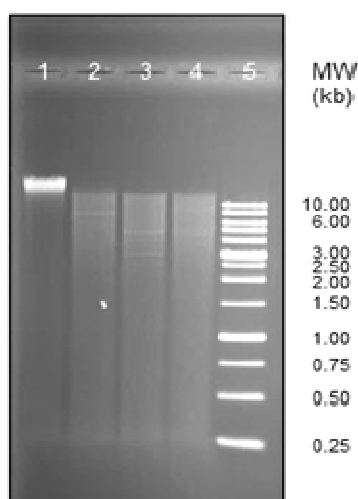
اندازه‌گیری فسفر موجود در محیط مایع: فسفر آزاد شده به روش مورفی و رایلی (۱۷) توسط اسپکتوفتومتر (PG instruments, T90+ UV/VIS spectrophotometer) اندازه‌گیری شد.

pH: pH نمونه‌ها با استفاده از دستگاه pH متر (Jenway, 3520) اندازه‌گیری شد، دستگاه pH متر به صورت دوره‌ای توسط محلول‌های بافر با pH ۴/۰۱ و ۷/۰۰ کالیبره شد.

خصوصیات سنگ فسفات: سنگ فسفات استفاده شده در این آزمایش با عیار ۹/۱۳٪ P_2O_5 ، از مجتمع صنعتی و معدنی فسفات اسفوردی واقع در ۳۵ کیلومتری شمال شرق شهرستان بافق در استان یزد تهیه گردید.

شناسایی مولکولی جدایه قارچی: جدایه قارچی بر روی محیط کشت PDA تلقیح و به مدت یک هفته در دمای 28 ± 2 °C نگه‌داری شد. بخشی از کلنی به ارلن مایر حاوی ۱۰۰ mL محیط کشت PDB منتقل و به مدت یک هفته با سرعت ۲۵۰ rpm در دمای 28 ± 2 °C تکان داده شد. سپس میسلیموم توسط سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه جداسازی شد. پس از فیلتراسیون با کاغذ صافی واتمن، میسلیموم‌ها برداشت و با آب مقطر اتوکلاو شده شسته و در نیتروژن مایع فریز گردید. میسلیموم یخ‌زده

با استفاده از یک هاون در نیتروژن مایع به پودر تبدیل شد. بلافاصله، DNA با استفاده از کیت DNeasy Plant Mini (69104; QIAGEN) با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده استخراج گردید. به‌طور خلاصه، ۱۰۰ mg از میسلیموم پودر شده در ۴۵ μ L بافر لیزکننده (AP1) و RNase A به صورت تعلیق درآمده و هضم شد. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در 65 °C انکوبه و سپس ۱۳۰ μ L بافر AP2 به آن افزوده و مخلوط شد و به مدت پنج دقیقه بر روی یخ انکوبه گردید. محصولات لیز سلولی به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm جدا شده و سپس به ستون QIAshredder Mini Spin اضافه شده و به مدت دو دقیقه در همان سرعت سانتریفیوژ شد. پس از آن با حجم ۱/۵ بافر AP3 مخلوط شده، به ستون DNeasy Mini Spin وارد و به مدت یک دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. ستون DNeasy Mini Spin با ۵۰۰ μ L بافر AW شسته شد و به مدت دو دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. DNA ژنومی با اضافه کردن مستقیم ۱۰۰ μ L از بافر AE بر روی ممبرن DNeasy جدا شد. به منظور هضم gDNA با آنزیم‌های محدودکننده، ۵۰۰ ng از gDNA، ۱ μ L از آنزیم‌های محدودکننده (BamHI, EcoRI, or HindIII; life technologies) و ۱ μ L از بافر FastDigest Green در حجم کل ۱۰ μ L به همراه آنزیم فرآوری شده و در دمای 37 °C به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس DNA هضم‌شده به ژل آگارز ۱٪ w/v حاوی بافر TBE تزریق و DNA به مدت یک ساعت در ولتاژ ۲۰۰ الکتروفورز شد. گروه‌های بانندی تشکیل شده در ژل با اتیدیوم برومید رنگ‌آمیزی شدند (شکل ۱).



شکل ۱- الگوی هضم DNA فارچی تهیه شده از میسلیم. ستون ۱ gDNA بریده نشده و ستون‌های ۲، ۳، و ۴ به ترتیب gDNA بریده شده با BamHI، EcoRI و HindIII را نشان می‌دهد. نشانگر وزن مولکولی در ستون ۵ نشان داده شده است.

Figure 1. Restriction digestion pattern of fungal DNA prepared from mycelium. Lane 1 shows uncut gDNA and lanes 2, 3, and 4 were cut with BamHI, EcoRI and HindIII, respectively. Molecular weight marker is shown in lane 5.

زنجیره‌ای پلی‌مراس با استفاده از کیت استخراج QIAquick gel مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده استخراج و DNA خالص‌سازی شده با استفاده از پرایمرهای ITS1، ITS2، ITS3 و ITS4 در مرکز ژنومیک کاربردی (TCAG¹) کانادا توالی‌یابی شد.

به‌منظور شناسایی جدایه مورد مطالعه در سطح گونه واکنش زنجیره‌ای پلیمراس با استفاده از ۱۰۰ ng از DNA ژنومی، ۰/۵ μM از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت (جدول ۲) و ۲۰ μL بافر 1X Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix انجام گرفته و چرخه‌های حرارتی اعمال شده شامل یک واکنش واسرشت‌سازی اولیه در ۹۸ °C به مدت ۲ دقیقه، چرخه تکثیر شامل (۹۸ °C به مدت ۱۰ ثانیه، ۴۷ °C، ۵۵، یا ۶۰ به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۲۵ ثانیه) و بالاخره یک چرخه گسترش نهایی در ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه بود.

مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراس شامل ۲۵۰ ng از DNA ژنومی، ۰/۵ μM از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت (جدول ۱) و ۲۰ μL بافر 1X Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix بود و حجم نهایی با بافر (HF M0531; NEB) به ۵۰ μL رسانده شد. واکنش با استفاده از ترمو سایکلر T100 (Bio-Rad) انجام گرفته و چرخه‌های حرارتی اعمال شده شامل یک واکنش واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۸ °C به مدت دو دقیقه، چرخه تکثیر شامل (۹۸ °C به مدت ۱۰ ثانیه، ۴۷ °C، ۵۵، یا ۶۰ به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۲۵ ثانیه) و بالاخره یک چرخه گسترش نهایی در ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه بود. به‌منظور یافتن بهترین باند چرخه گسترش نهایی در دماهای ۵۵ و ۶۰ درجه سلسیوس نیز تکرار شد، که البته دما تأثیری در نتایج PCR نداشت. محصولات واکنش روی ژل آگاروز یک درصد حاوی μg/mg ۰/۱ اتیدیوم بروماید در بافر TAE توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل تحت نور ماورای بنفش (طول موج ۳۱۲ nm) بررسی شدند. محصول واکنش

1- The Centre for Applied Genomics

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه.

Table 1. Primers used in this study.

توالی (۵'→۳')	نام	ناحیه
Sequence (5'→3')	Name	Region
TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(Forward) (رفت) ITS1	SSU
GCTGCGTTCTTCATCGATGC	(Reverse) (برگشت) ITS2	5.8S
GCATCGATGAAGAACGCAGC	(Forward) (رفت) ITS3	5.8S
TCCTCCGCTTATTGATATGC	(Reverse) (برگشت) ITS4	LSU

جدول ۲- پرایمرهای PCR مختص به گونه برای تکثیر بخشی از توالی ژن کالمودولین در *A. Niger* یا *A. Tubingensis*.

Table 2. Species-specific PCR primers for amplification of partial sequence of the calmodulin gene in *A. niger* or *A. tubingensis*.

توالی (۵'→۳')	نام	ناحیه
Sequence (5'→3')	Name	Region
TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(Forward) (رفت) NIG1	کالمودولین Calmodulin
GCTGCGTTCTTCATCGATGC	(Reverse) (برگشت) NIG2	کالمودولین Calmodulin
GCATCGATGAAGAACGCAGC	(Forward) (رفت) TUB1	کالمودولین Calmodulin
TCCTCCGCTTATTGATATGC	(Reverse) (برگشت) TUB2	کالمودولین Calmodulin

مشکل آزمایش بر روی محیط کشت NBRIP-BPB تکرار شد. نوتیال (۱۹۹۹) دریافت که استفاده از عصاره مخمر در محیط کشت PVK مانع رشد میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات می‌شود (۱۸). نتایج این آزمایش نشان داد که قارچ‌های حل‌کننده فسفات روی محیط کشت NBRIP-BPB نسبت به محیط کشت PVK هاله روشن واضح‌تری تشکیل می‌دهند که با نتایج موه و همکاران (۲۰۱۳) (۱۶) تطابق دارد. این خاصیت می‌تواند در شناسایی قارچ‌های با توانایی انحلال فسفات نامحلول مفید باشد و یکی از برتری‌های محیط کشت NBRIP-BPB نسبت به محیط کشت PVK است.

انتخاب و غربالگری قارچ حل‌کننده فسفات در محیط کشت جامد و اندازه‌گیری شاخص انحلال: تولید هاله در اطراف کلنی میکروارگانیسم نشانه‌ای از

جدول ۲ پرایمرهای PCR مختص به گونه برای تکثیر بخشی از توالی ژن کالمودولین در گونه‌های *A. niger* و *A. tubingensis* را نشان می‌دهد. پرایمرهای NIG1/NIG2 منحصراً برای تکثیر DNA سویه‌های *A. niger* و پرایمرهای TUB1/TUB2 برای تکثیر DNA سویه‌های *A. tubingensis* استفاده می‌شوند.

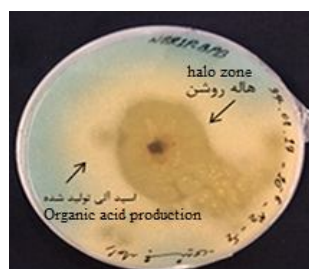
آنالیز آماری: آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار Statistix 8.0 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Tukey در سطح ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

محیط کشت مناسب: هاله روشن تشکیل شده اطراف کلنی بر روی محیط کشت PVK بسیار کوچک بود، به طوری که تشخیص آن سخت بود. برای رفع این

روشن و واضح‌تری را در مقایسه با محیط کشت PVK ممکن ساخت. نتایج حاصل از آزمون شاخص انحلال، جدایه ۱ را به‌عنوان مؤثرترین جدایه در انحلال فسفات معرفی نمود، زیرا دارای بیش‌ترین شاخص انحلال بود. پس از آن جدایه‌های ۵، ۲، ۴ و ۳ به‌ترتیب روند کاهشی را نشان دادند (جدول ۳).

حضور میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات است (شکل ۲). در این مطالعه برای اندازه‌گیری شاخص انحلال جدایه‌های قارچی از محیط کشت جامد NBRIP-BPB استفاده شد، حضور BPB در محیط کشت به آن رنگ آبی می‌بخشد که با افت pH محیط کشت به زرد روشن تغییر رنگ می‌دهد. استفاده از محیط کشت جامد NBRIP-BPB، مشاهده هاله



شکل ۲- تشکیل هاله روشن به‌وسیله کلنی قارچی در محیط کشت NBRIP-BPB.

Figure 2. Halo zone formation by colony in NBRIP-BPB culture medium.

جدول ۳- تخمین شاخص انحلال به‌وسیله جدایه‌های قارچی بر روی محیط کشت NBRIP-BPB.

Table 3. Estimation of solubilization index by fungal isolates on NBRIP-BPB medium.

شاخص انحلال Solubilization index	هاله روشن (cm) Halo zone	قطر کلنی (cm) Colony diameter	جدایه قارچی Fungal isolate
1.46 ± 0.14 ^a	0.7 ± 0.1	1.5 ± 0.3	جدایه ۱ (isolate 1)
1.14 ± 0.11 ^b	0.5 ± 0.2	3.5 ± 1.1	جدایه ۲ (isolate 2)
1.08 ± 0.07 ^b	0.2 ± 0.1	2.3 ± 0.2	جدایه ۳ (isolate 3)
1.13 ± 0.11 ^b	0.3 ± 0.2	2.3 ± 0.1	جدایه ۴ (isolate 4)
1.25 ± 0.16 ^b	0.7 ± 0.3	2.8 ± 0.7	جدایه ۵ (isolate 5)

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بر اساس آزمون توکی هستند. نتایج، میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد می‌باشند.

Averages with at least one letter have no significant difference at the 5% level based on the Tukey test. Results are means of three repetitions ± standard errors.

انتخاب میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات است. بنابراین هم‌چنان آزمون انحلال فسفات در محیط کشت مایع مورد نیاز است، چرا که در محیط کشت جامد قدرت انحلال فسفات به‌صورت کمی منعکس نشده است (۴ و ۶).

بررسی قارچ حل‌کننده فسفات روی محیط کشت جامد و اندازه‌گیری شاخص انحلال نشان‌دهنده توانایی آن در انحلال فسفات نیست زیرا همیشه با آزمون کمی در محیط کشت مایع همسو نیست. بررسی شاخص انحلال روشی کیفی و آغازین برای

در این بررسی از محیط کشت مایع NBRIP که به جای فسفات کلسیم حاوی ۲٪ سنگ فسفات بود، استفاده شد. تغییرات pH و میزان فسفر انحلال یافته به وسیله جدایه های قارچی پس از گذشت ۶ روز در جدول ۴ آمده است.

انتخاب و غربالگری قارچ حل کننده فسفات در محیط کشت مایع: هاله روشن اطراف کلنی معمولاً به عنوان مشخصه ای برای انحلال فسفات در محیط کشت مایع در نظر گرفته می شود (۱۵). پژوهشگران مختلف از محیط های کشت مختلفی برای بررسی انحلال فسفات در محیط کشت مایع استفاده کرده اند.

جدول ۴- انحلال فسفات به وسیله جدایه های قارچی و تغییرات pH در محیط کشت مایع حاوی ۲٪ وزنی سنگ فسفات در طی ۶ روز انکوباسیون.

Table 4. Phosphate solubilization by fungal isolates and pH changes in culture medium containing 2% (w/v) of rock phosphate during 6 days of incubation.

P (mg L ⁻¹)	pH	جدایه قارچی Fungal isolate
112.2± 4.4 ^a	3.23± 0.44 ^b	جدایه SANRU (SANRU isolate)
27.2± 1.6 ^b	4.24± 0.17 ^a	جدایه ۲ (isolate 2)
29.9± 2.0 ^b	4.44± 0.05 ^a	جدایه ۳ (isolate 3)
24.6± 3.7 ^b	4.33± 0.14 ^a	جدایه ۴ (isolate 4)
41.6± 2.20 ^b	4.83± 0.24 ^a	جدایه ۵ (isolate 5)

میانگین های دارای حداقل یک حرف مشابه فاقد اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ بر اساس آزمون توکی هستند. نتایج میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد می باشند.

Averages with at least one letter have no significant difference at the 5% level based on the Tukey test. Results are means of three repetitions ± standard errors.

است (۱۲). ملا و همکاران (۱۹۸۴) در بررسی های خود به این نتیجه رسیدند که میزان فسفات آزاد شده توسط حل کننده های فسفات میان جدایه های مختلف، متفاوت است و علت این پدیده می تواند تغییرات به وجود آمده در pH محیط کشت مایع و همچنین سایر مکانیسم های انحلال فسفات باشد (۱۵).

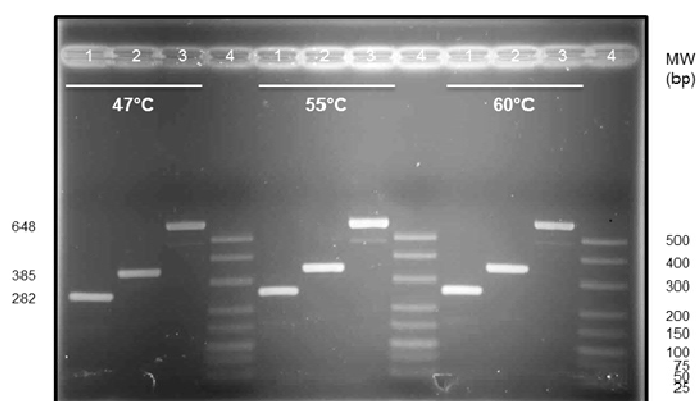
با این حال، در مطالعه حاضر، با توجه به جدول های ۳ و ۴ جدایه های ۳، ۴ و ۵ رفتار غیرعادی را نشان دادند، که در آن نتایج حاصل از روش کیفی با روش های کمی مطابقت نداشت. دلایل احتمالی برای این اختلال می تواند اختلاف در دسترس بودن عرضه آب و مواد مغذی باشد. در مقایسه با محیط

انحلال فسفات با کاهش pH در محیط های کشت هر پنج نمونه همراه بود. جدایه ۱ که بیشترین شاخص انحلال را دارا بود، بیشترین انحلال سنگ فسفات و بیشترین کاهش در pH را نیز نشان داد و جدایه SANRU نامیده شد. در جدایه SANRU همبستگی مثبتی بین سنجش کمی و کیفی انحلال فسفات وجود داشت. مهتا و نوتیال (۲۰۰۱) در حالی که روشی کارآمد برای غربالگری کیفی باکتری های حل کننده فسفات را بررسی می کردند، یافته های مشابهی را گزارش کردند (۱۴). به هر جهت، در برخی موارد، نتایج ضد و نقیضی بین هاله روشن و انحلال فسفات در محیط کشت مایع گزارش شده

A. tubingensis دارد، دو گونه‌ای که از نظر مورفولوژیک شدیداً مشابه هستند. توالی‌ها با شماره دسترسی KT222864 در بانک جهانی ژن ثبت گردید. به‌منظور غلبه بر این عدم اطمینان، بخشی از ژن کالمودلین تکثیر و توالی‌یابی گردید، زیرا قبلاً ثابت شده بود به بهترین شکل قادر به تمایز دو گونه است و شامل برخی رفتارهای تشخیصی مختص به گونه است (۲۴). پس از تکثیر بخشی از توالی ژن کالمودولین با کمک پرایمرهای فوق‌الذکر، جفت پرایمر TUB1/TUB2 یک بخش ۵۰۵ bp را تکثیر نمود، در حالی‌که N1G1/N1G2 هیچ ناحیه‌ای را تکثیر ننمود (شکل ۳)، که قویاً بیان می‌کند سویه SANRU متعلق به سکشن *tubingensis* است. مطابق با مطالعات قبلی (۲۰ و ۲۴) روش PCR بر اساس کالمودولین درجه بالایی از اختصاصیت برای تعیین هویت اسپرژیلوس در سطح گونه دارد. در مقابل، نواحی ITS درجه پایینی از اختصاصیت شامل تغییر سه نوکلئوتید مختلف بین این گونه‌ها را نشان می‌دهد.

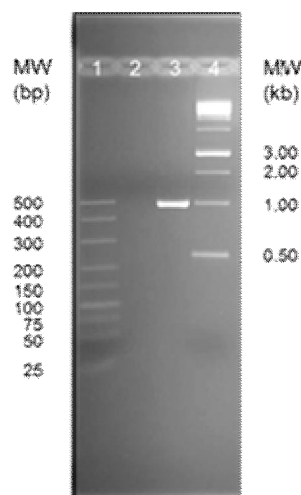
کشت مایع، مواد مغذی در محیط کشت‌های جامد به‌دلیل حلالیت و دسترسی کمتر محدود هستند. میزان نفوذ و انتشار متفاوت اسیدهای آلی مختلف ترشح شده توسط یک ارگانسیم می‌تواند دلیل دیگری برای فعالیت کم انحلال باشد (۸). بنابراین، ایزوله‌های رشد کرده در محیط کشت‌های جامد ممکن است از مسیر متابولیکی متفاوتی نسبت به زمانی که در محیط کشت مایع رشد کرده‌اند، استفاده کنند، اگرچه قابلیت انحلال فسفات در تمام ایزوله‌ها در کشت‌های بعدی ثابت باقی ماند.

براساس شاخص انحلال و نتایج کمی اندازه‌گیری شده، جدایه SANRU جهت شناسایی مولکولی انتخاب شد. شناسایی مولکولی جدایه منتخب: مشخصات مورفولوژی جدایه SANRU را در سکشن اسپرژیلوس نایجری قرار داد، از این رو به‌دلیل شباهت مورفولوژیک گونه‌های موجود در این سکشن، لازم بود تا از داده‌های مولکولی برای شناسایی آن کمک گرفته شود. نتایج حاصل از مقایسه توالی ژن ITS با توالی‌های موجود در بانک ژن نشان داد، جدایه SANRU مشابهت ۱۰۰٪ با گونه‌های *A. niger* و



شکل ۳- نتایج حاصل از PCR ناحیه ITS. ژنوم DNA به‌دست آمده از میسلیوم برای تکثیر در (۱) ناحیه ITS1 (ITS1-ITS2) (۲) ناحیه ITS2 (ITS3-ITS4) و (۳) کل ناحیه ITS (ITS1-ITS4) قرار گرفت و در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد. مارکر وزن مولکولی در خط ۴ نشان داده شده است.

Figure 3. PCR amplification of the ITS regions. Genomic DNA obtained from mycelium was subjected to amplification of the (1) ITS1 region (ITS1-ITS2), (2) ITS2 region (ITS3-ITS4), and (3) the entire ITS region (ITS1-ITS4) and was electrophoresed on a 2.0% agarose gel. Molecular weight marker is shown in lane 4.



شکل ۴- محصول PCR مختص به گونه حاصل از تکثیر DNA آسپرژیلوس نایجر در ستون ۲، DNA ژنومی حاصل از میسلیوم در معرض تکثیر PCR بخشی از توالی ژن کالمودولین با استفاده از پرایمرهای NIG1 و NIG2، ستون ۲ یا TUB1 و TUB3، ستون ۳ و بر روی ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز شدند. وزن مولکولی مارکرها در ستون‌های ۱ و ۴ نشان داده شده‌اند.

Figure 4. Species-specific PCR product obtained amplifying *A. niger* DNA (245 bp) in lane 2. Genomic DNA obtained from mycelium was subjected to PCR amplification of a partial sequence of calmodulin gene using NIG1 and NIG2, lane 2, or TUB1 and TUB2, lane 3, primers and was electrophoresed on a 2.0% agarose gel. Molecular weight markers are shown in lanes 1 and 4.

فسفات در محیط مایع نشان دادند. از این رو غربالگری هم‌زمان در محیط جامد و مایع پیشنهاد می‌گردد. بنا به نتایج این بررسی، تعیین توالی ناحیه کالمودولین در مقایسه با ITS از دقت بسیار بالاتری برای تمایز گونه‌های آسپرژیلوس برخوردار است، بنابراین برای شناسایی دقیق آسپرژیلوس‌ها در حد گونه توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از محیط کشت NBRIP-BPB نسبت به PVK برای جداسازی قارچ‌های حل‌کننده فسفات مناسب‌تر بود. اگرچه جدایه SANRU همبستگی مثبتی بین غربالگری در محیط جامد و مایع از نظر انحلال فسفات نشان داد، اما برخی از جدایه‌ها نتایج ضد و نقیضی بین هاله روشن در محیط جامد و انحلال

منابع

1. Achal, V., Savant, V.V., and Sudhakara Reddy, M. 2007. Phosphate solubilization by wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. Soil Biol. Biochem. 39: 2. 695-699.
2. Babu, V.S., Triveni I, S., Subhash Reddy, R., and Sathyanarayana, J. 2017. Isolation and characterization of phosphate solubilizing microorganisms from Maize rhizospheric soils. BEPLS. 6: 1. 194-200.
3. Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A., and Young, C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Appl. Soil Ecol. 34: 1. 33-41.
4. El-Azeem, S.A.M.A., Mehana, T.A., and Shabayek, A.A. 2007. Some plant growth promoting traits of rhizobacteria isolated from Suez Canal region, Egypt. P 1517-1525, 8th African Crop Science Society Conference. El-Minia, Egypt.

5. Gerretsen, F.C. 1948. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. *Plant Soil*. 1: 1. 51-81.
6. Gupta, R., Rekha, S., Aparna, S., and Kuhad, R.C. 1994. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40: 3. 255-260.
7. Hue, N.V., and Fox, R.L. 2010. Predicting plant phosphorus requirements for Hawaii soils using a combination of phosphorus sorption isotherms and chemical extraction methods. *Commun Soil Sci. Plant Anal.* 41: 2. 133-143.
8. Jain, R., Saxena, J., and Sharma, V. 2014. Differential effects of immobilized and free forms of phosphate-solubilizing fungal strains on the growth and phosphorus uptake of mung bean plants. *Ann. Microbiol.* 64: 4. 1523-1534.
9. Kaur, G., and Reddy, M.S. 2015. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. *Pedosphere*. 25: 3. 428-437.
10. Khan, M.S., Ziadi, A., and Wani, P.A. 2007. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. *Agron. Sustain. Dev.* 27: 1. 29-43.
11. Khan, M.S., Ziadi, A., Ahemad, M., Oves, M., and Wani, P.A. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi- current perspective. *Arch. Agron. Soil Sci.* 56: 1. 73-98.
12. Liu, Z., Li, Y.C., Zhang, S., Fu, Y., Fan, X., Patel, J.S., and Zhang, M. 2015. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Appl. Soil Ecol.* 96: 217-224.
13. Malviya, J., Singh, K., and Joshi, V. 2011. Effect of phosphate solubilizing fungi on growth and nutrient uptake of ground nut (*Arachis hypogaea*) Plants. *Adv. Biores.* 2: 2. 110-113.
14. Mehta, S., and Nautiyal, C.S. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate solubilizing bacteria. *Curr. Microbiol.* 43: 1. 51-56.
15. Molla, M.A.Z., Chowdhury, A.A., Islam, A., and Hoque, S. 1984. Microbial mineralization of organic phosphate in soil. *Plant Soil*. 78: 3. 393-399.
16. Muh, J., Baharuddin, and Bachrul, I. 2013. In vitro selection of rock phosphate solubility by microorganism from Ultisols in South Sulawesi, Indonesia. *AJAF*. 1: 4. 68-73.
17. Murphy, J., and Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta.* 27: 31-36.
18. Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 1. 265-270.
19. Oviasogie, P.O., and Uzoekwe, S.A. 2011. Concentration of available phosphorus in soil amended with rock phosphate and palm oil mill effluent. *EJESM*. 4: 1. 64-67.
20. Parenicova, L., Skouboe, P., Samson, R.A., Rossen, L., and Visser, J. 2000. Molecular tools for the classification of black *Aspergilli*. P 413-424, In: Samson, R.A., and J.I. Pitt (eds.), *Integration of Modern Taxonomic Methods of Penicillium and Aspergillus Classification*. Harwood academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
21. Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity by some microbial species. *Microbiology*. 17: 362-370.
22. Rajan, S.S.S., Watkinson, J.H., and Sinclair, A.G. 1996. Phosphate rocks for direct application to soils. *Adv. Agron.* 57: 77-159.
23. Sharma, S., Kumar, V., and Tripathi, R.B. 2011. Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* 1: 2. 90-95.
24. Susca, A., Stea, S., Mule, G., and Perrone, G. 2007. Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. *Food Addit Contam.* 24: 10. 1154-1160.
25. Vassilev, N., Vassileva, M., Fenice, M., and Federici, F. 2001. Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. *Bioresour. Technol.* 79: 3. 263-271.
26. Whitelaw, M.A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv. Agron.* 69: 99-151.



Isolation of phosphate solubilizing fungus from phosphate mine and its molecular identification based on calmodulin gene sequencing

R. Jamshidi¹, *B. Jalili², M.A. Bahmanyar³ and S. Salek-Gilani⁴

¹M.Sc. Graduate, Dept. of Soil Science, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources,

²Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources,

³Professor, Dept. of Soil Science, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources,

⁴Instructor, Dept. of Soil Science, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received: 10.23.2017; Accepted: 05.07.2018

Abstract

Background and Objectives: Phosphate is one of the macronutrients and involved in many essential plant processes such as respiration, cell division, root development, photosynthesis, sugar decomposition, nutrient transfer inside the plant, the transfer of genetic characteristics from one generation to the next and the regulation of metabolic pathways. Deficiency occurs when phosphorus content in the soil reaches less than 0.1%. Today, in order to achieve sustainable development, the use of low-cost natural nutrients such as rock phosphate is necessary. In recent years, the use of phosphate solubilizing microorganisms has been studied for dissolution of rock phosphate. The aim of this study was to isolate indigenous phosphate solubilizing fungi and identify the most effective isolate at the species level.

Materials and Methods: Samples were taken from the soil around the Dalir phosphate mine located in Chalous, (Mazandaran). After preparation of the dilution series from soil suspension and culture in NBRIP-BPB and PVK, phosphate-solubilizing fungal colonies were isolated. The ability of phosphate solubilization of fungal isolates was also studied in NBRIP liquid medium. The phosphate solubilized was measured in the liquid medium and the pH of the samples was measured using pH meter. An isolate (named by SANRU) that significantly reduced the pH of the environment, released more phosphorus and had a higher solubility index, was selected. The selected isolate was identified by ITS polymerase chain reaction and then calmodulin-based PCR methods.

Results: The results indicate that the use of the NBRIP-BPB medium is more efficient than PVK medium for P solubilizing fungi isolation. Screening was carried out in solid and liquid media for each isolate and SANRU isolate was more prominent phosphate solubilizers compare to the other isolates. The results of comparing the sequence of the ITS gene with the sequences in the gene bank showed that SANRU strain had a similarity of 100% with *A. niger* and *A. tubingensis* species. In order to overcome this uncertainty, a calmodulin-based PCR method was carried out. The replication of a part of the Calmodulin gene sequence revealed that the SANRU strain belongs to the *tubingensis* section and the sequencing sample was registered with the access number KT222864 at the World Gene Bank.

Conclusion: According to the results of this study, simultaneous screening in solid and liquid medium is recommended to determine phosphate solubilizing ability. According to the results of this study, the method of sequencing of calmodulin in comparison with ITS has a much higher accuracy for differentiation of *Aspergillus* species, therefore, it is recommended for accurate identification of *Aspergillus* species.

Keywords: *Aspergillus tubingensis*, Calmodulin, NBRIP-BPB medium

* Corresponding Author; Email: bahi_jalilis@yahoo.com