Archive of SID

بررسی خصوصیات فیلوژنتیکی باکتری اندوفیت سودوموناس پروتجنس با توانایی تولید ترکیبات آنتاگونیستی جدا شده از گیاه برگ نو

فایقه اطمینانی[1*]، ادیبه اطمینانی[1]

۱) باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۱۱

چکیده

مقدمه: باکتری های اندوفیت با توانائی تولید ترکیبات آنتاگونیست، قادر به کنترل بیمارگرهای گیاهی هستند. این مطالعه به منظور بررسی توانایی تولید ترکیبات آنتاگونیستی در باکتری های اندوفیت برگ نو انجام پذیرفته است.

مواد و روش ها: در این پژوهش باکتری های اندوفیت از برگ و شاخه برگ نو، جداسازی گردید، پس از استخراج DNA ژنومی، از روش PCR به منظور تکثیر ژن 16S rDNA استفاده گردید. به منظور شناسایی دقیق باکتری جداسازی شده، محصول PCR، تعیین توالی و ترادف بازی BLAST 16S rDNA گردید. جدایه ها از نظر تولید سیدروفور، هیدروژن سیانید و آنزیم پروتئاز مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته های پژوهش: تمام باکتری های جداسازی شده در این پژوهش قادر به تولید آنزیم پروتئاز بودند. تنها یک سویه قادر به تولید هیدروژن سیانید بود(BN3). نتایج آزمون سیدروفور برای یک سویه مثبت بود(BN2). نتایج تعیین توالی نشان داد که باکتری های جداسازی شده متعلق به سودوموناس پروتوجنس Pseudomonas protegens است که با سویه تیپ شباهت ۱۰۰ درصدی دارد.

بحث و نتیجه گیری: سویه های جدا شده در این پژوهش، می توانند در افزایش رشد گیاه به‌کار روند. از آن جا که کشاورزی پایدار به توانائی حفظ تولید، همراه با استمرار نگه داشت منابع و حفظ محیط زیست تاکید دارد، لذا کاربرد باکتری های اندوفیت در راستای اهداف کشاورزی پایدار است و بی شک با شناخت و کشف مکانیزم های دخیل می توان به این مهم دست یافت.

واژه های کلیدی: اندوفیت، باکتری، برگ نو، سیدروفور

* نویسنده مسئول: باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، سنندج، ایران

Email: agriculture. student@yahoo.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 15:20 IRST on Tuesday February 12th 2019

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 15:20 IRST on Tuesday February 12th 2019

مقدمه

برگ نو با نام علمی Ligustrum vulgare متعلق به خانواده OLeaceae است که بومی مناطق آسیا، اروپا، آفریقا و استرالیا می باشد. بوته های آن به صورت خزان پذیر و همیشه سبز ملاحظه شده است. این گروه از گیاهان، معمولاً در خاک های مختلف قادر به بقای خود هستند و به سادگی از طریق گل های سفید رنگ قابل شناسایی اند. معمولاً برگ نو در اطراف باغات برای تزئین و زیبایی کشت داده می شوند. در مواردی هم از آن برای مصارف دارویی بهره می گیرند. جوشانده برگ و یا پوست آن به عنوان دارویی موثر در درمان اسهال، زخم معده، دردهـــای مزمن روده ای، ترک پوست، دردهای دهان و گلو، و یا رفع مشکلات پوستی به کار گرفته می شود. در مواردی هم از آن برای بهبود اشتهای بیماران استفاده می نمایند(۱). بیش از ۳۰۰ هزار گونه گیاهی روی زمین وجود دارد. محققان برآورد کرده اند که هر گیاه حداقل میزبان یک یا چند اندوفیت است. باکتری های اندوفیت ممکن است دارای هزاران گیاه میزبان باشند و یا احتمال دارد که دامنه میزبانی آن ها محدود به خانواده گیاهی مشخصی باشد. باکتری های اندوفیت به باکتری هایی گفته می شوند که در داخل بافت گیاه سالم، بدون ایجاد علائم و آسیب حضور دارند و از آن جا که علائم آشکاری بروز نمی دهند تخمین صحیـح از جمعیت آن ها مشکل است. باکتری های اندوفیت از ریشه، برگ، ساقه، بذر، غده، گل آذین و میوه های گیاهان مختلف جدا شده اند. تنوع باکتری های اندوفیت نه تنها در بین گیـــاهان مخـــتلف، بلکه حتـــی در میان تاکسون های باکتریایی قابل ملاحظه است، به طوری که از جنس ها و گونه های مختلف، باکتری های مختلفی به عنوان اندوفیت معـــرفی گـــردیده اند. باکتری های اندوفیت شامل باکتری های گرم مثبت و گرم منفی هستند. اگر چه تحقیقات حاکی از آن است که سهم وسیعی از باکتری های اندوفیت متعلق به باکتری های گـــرم منفـــی می باشـــد(۲). کاربرد باکتری های اندوفیت به عـــنوان کودزیستی پتانسیل مفیدی جهت دست یابی به کشاورزی پایدار و جلوگیری از انقراض گونه های نادر است. این دسته از ریزموجودات قادر به افـــزایش عملکرد گیاه میزبان از راه های مختلف هم چون تثبیت ازت(۳)، حل فسفات(۴)، تولید سیدروفور(۵)، تولید هورمون های رشد اکسین و جیبرلین(۶)، توانائی کنترل زیستی ریز موجودات بیمـــارگر و افزایش مـــقاومت گیاهان به تنش های غیرزیستی و زیستی می باشند. به دلیل مصارف کاربردی در شناسایی و تنوع باکتری های اندوفیت در ارتباط با محصولات کشاورزی و باغبانی مطالعات مختلفی انجام شده است(۷). این پژوهش به منظور شناسایی مولکولی باکتری های اندوفیت با توانایی تولید ترکیبات محرک رشد در برگ نو انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

نمونه برداری: در بـــهار ســـال ۱۳۹۳، از برگ و شاخه های ســـالم گیاه برگ نو(Ligustrum vulgare .L) از شهرستان سنندج، نمونه برداری به عمل آمد. نمونه ها در کیسه های تمیز و مجزا که حاوی مشخصـــات کد نمـــونه، محل نمونه برداری و تاریخ نمونه برداری بودند، قرار داده شد و سپس به آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه کردستان منتقل و تا زمان استفاده در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

جداسازی باکتری های اندوفیت از بافت گیاهی: بـه منظور جداسازی باکتری های اندوفیت قطعات مختلفی از برگ و شاخه گیاهان نمونه برداری شده با آب مقطـر سترون شسته شدند. پـس از خشـک کـردن بـا کاغـذ صافی، نمونه های مورد نظر به قطعات کوچک تر خـرد گردیدند. سپس توسط هیپوکلریت سـدیم ۱ درصـد بـه مدت ۴ دقیقه شستشو داده شدند و بـرای حـذف مـاده ضد عفونی کننده، مجدداً توسط آب مقطر سترون ۴ تـا ۵ بار شستشو گردیدند. برای جداسازی باکتری اندوفیت نمونه های گیاهی سترون شده، در هاون سترون حاوی ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون کاملاً له شدند. بعـد از ۳۰ دقیقـه از سوسپانسـیون حاصـل، بـه مقـدار ۵۰ میکرولیتر روی دو محیط کشت مختلف NA و KB به کمک لوپ شیشـه ای در تمـام سـطح پخـش گردیـد. پتری ها بـه مـــدت ۱۴ روز در دمـــای ۲۸ درجـه سانتی گراد انکوبه(مدل JS Research Inc) شدند. هر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 15:20 IRST on Tuesday February 12th 2019

روز از کلنی های جدید انتخاب و به عنوان جدایه هـای پایه برای آزمایش های بعدی در نظر گرفته شد(۸).

ارزیابی روش ضد عفونی سطح بافت گیاهی: به منظور اطمینان از سترون شدن، قطعاتی از بافت گیاهی که به روش مذکور ضدعفـــونی شـــده بودند در ۵ میلی لیتر آب مقطر سترون شستشو داده شدند و بعد از گذشت چند دقیقه، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون، روی هر چهار محیط کشت NA+S، NA، LB و KB به کمک لوپ شیشه ای در تمام سطح پخش گردید و در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد(۸).

شناسائی باکتری های اندوفیت

تعیین خصوصیات بیوشیمیایی جدایه ها: به منظور بررسی آزمون های کاتالاز، اکسیداز، گرم و تولید رنگدانه فلورسنت از روش متداول در باکتری شناسی گیاهی استفاده شد.

آزمون تولید پروتئاز: این آزمون، به منظور بررسی توانایی باکتری های اندوفیت در کنترل زیستی سایر میکروارگانیسم های مضر مورد بررسی قرار می گیرد، بدین منظور از محیط کشت اسکیم میلک به همراه ۱۵ گرم آگار به ازای هر لیتر محیط کشت، استفاده شد. محیط اسکیم میلک آگار، به روش تندال، ضدعفونی گردید. جدایه های باکتـــری بعد از کشت به صورت نقطه ای، در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. تشکیل هاله بی رنگ در اطراف کلنی باکتری، نشان از توانائی جدایه ها در تولید آنزیم پروتئاز بود(۹).

آزمون تولید سیدروفور: برای بررسی تولید سیدروفور از محیط(CAS) استفاده گردید که از ترکیب چهار محلول زیر به دست می آید:

محلول اول: این محلول از اختلاط ۱۰ میلی لیتر $FeCl_3.6H_2O$ ۱ مـــیلی مـــولار(در محلول ۱۰ میلی مولار اسید کلریدریک) با ۵۰ میلی لیتر محلول شامل ۶۰ میلی گرم CAS تهیه شد. این محلول ارغوانی تیره به آرامی و همراه با تکان های پیوسته به ۴۰ میلی لیتر محلول آب مقطر شامل ۷۳ میلی گرم HDTMA اضافه شد. محلول به دست آمده جداگانه اتوکلاو و تا ۵۰ درجه سانتی گراد سرد شد.

محلول دوم: ۳۰/۲۴ گرم پیپرازین بیس اتان سولفونیک اسید(Pipes) در ۷۵۰ میلی لیتر محلول نمک حل شد. محلول نمکی شامل ۰/۳ گرم KH_2PO_4، ۰/۵ گرم NaCl و ۱ گرم NH_4Cl است. PH محلول به ۶/۸ تنظیم شد. مخلوط به دست آمده پس از افزودن ۱۵ گرم آگار اتوکلاو گردید سپس تا ۵۰ درجه سانتی گراد سرد شد.

محلول سوم: شامل ۲ گرم گلوکز، ۲ گرم مانیتول، ۴۹۳ میلی گرم $MgSo_4.7H_2O$، ۱۱ میلی گرم $CaCl_2.7H_2O$، ۱/۱۷ میلی گرم $MnSo_4.7\ H_2O$، ۱/۴ میـــلی گـــرم H_3BO_3، ۰/۰۴ میـــــلی گرم $CuSO_4.5H_2O$، ۱/۲ میلی‌گرم $ZnSo_4.7\ H_2O$ و ۱ میلی‌گرم $Na_2MoO_4.7\ H_2O$ در ۷۰ میلی لیتر آب مقطر است. این محلول نیز پس از اتوکلاو تا دمای ۵۰ درجه سرد گردید.

محلول چهارم: ۳ گرم کازآمیـــنواســـید در ۲۷ میلی لیتر آب مقطر حل شد و به وسیله فیلتر سترون گردید.

پس از آماده شدن ۴ محلول بالا محلول دوم به محلول سوم و چهارم اضافه سپس با هم زدن آرام و بدون ایجاد حباب، محلول اول نیز به آن اضافه گردید و در پلیت ریخته شدند. سپس جدایه ها به صورت نقطه ای روی محیط کشت داده شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. در صورت مشاهده هاله نارنجی رنگ در اطراف کلنی باکتری آزمون تولید سیدروفور برای جدایه ها مثبت تلقی شد(۵).

آزمون تولید سیانید هیدروژن: جهت بررسی توانایی تولید سیانید هیدروژن جدایه های باکتری جداگانه بر روی محیط NA کشت گردید. در داخل هر پتری ۱۰۰ میکرولیتراز سوسپانسون باکتری پخش گردید. سپس کاغذ صافی آغشته به معرف(شامل ۲ درصد کربنات سدیم و ۵ درصد اسید پیکریک) در قسمت درب پتری قرار داده شد و درب پتری با نوار پارافیلم بسته شد تا از خروج هر گونه متابولیت فرار و گازی از جمله HCN جلوگیری شود. پتری ها به صورت وارونه در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در انکوباتور به مدت یک هفته قرار داده شد. در صورت تولید HCN توسط باکـــتری رشد

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 15:20 IRST on Tuesday February 12th 2019

یافته روی سطح محیط کشت، تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به محلول معـــرف از رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه ای روشن، قهوه ای تیره تا آجـــری رنگ دیده می شود که نشانه تفاوت در میزان تولید HCN توسط باکتری می باشد(۱۰).

بررسی مولکولی جدایه

جداسازی DNA کروموزومی باکتری ها: باکتری در محیط‌کشت مایع نوترینت براث کشت داده شد و بعد از رشد به میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری منتقل و با سرعت ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱/۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده پس از نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد، در ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید. نمونه ها پس از اضافه نمودن ۸ میکرولیتر لیزوزیم(از محلول پایه ۱۰ میکـــروگرم بر میلی لیتر) به مـــدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس ۴۰ میکرولیتر سدیم پرکلرات ۴ مولار، ۲۴ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد و ۸ میکرولیتر پروتئیناز K (از غلظت پایه ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به محلول اضافه و بعد از هم زدن(وارونه کردن) به مدت ۲ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد. به محلول به دست آمده در مرحله قبل، ۲ حجم اتانول خالص(نگهداری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه یا بیشتر در فریزر نگهداری گردید.

محـــلول به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. سپس، اتانول دور ریخته شد و رسوب حاصله با ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد و مجدداً به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصله چند ثانیه در دمای اتاق نگهداری شد تا خشک گردد سپس، در ۵۰۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید. DNA به دست آمده با حجم مساوی ترکیب فنل: کلروفرم: آیزوآمیل الکل(۱:۲۴:۲۵) مخلوط شده و در دمای اتاق به صورت وارونه کردن هم زده شد تا کاملاً یکنواخت گردد. سپس به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ گردید تا سه فاز مجزا تشکیل گردید. فاز رویی به میکروتیوب تمیز و سترون منتقل و مرحله قبل ۳ بار تکرار شد. در هر بار محلول روئی به میکروتیوب سترون منتقل گردید. محلول روئی یک بار نیز با اضافه نمودن کلروفرم: ایزوآمیل الکل(۱:۲۴) رسوب داده شد. محلول روئی به میکروتیوب سترون منتقل و DNA با اضافه نمودن ۲ حجم اتانول خالص و ۰/۱ درصد حجم محلول استات سدیم ۳ مولار با PH=۴/۸ و سپس نگهداری در فریزر به مدت یک شب، رسوب داده شد. ترکیب به مدت ۵ دقیقه با سرعت rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و رسوب به دست آمده توسط اتانول ۷۰ درصد شسته شد. رسوب حاصله پس از خشک شدن در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حاوی(ریبونوکلئاز از محلول پایه ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به غلظت نهائی ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر) حل گردید(۱۱).

ی-تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراجی: برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد.

اندازه گیری غلظت DNA (تعیین کمیت) توسط اسپکتروفتومتر: قبل از اندازه گیری غلـــظت DNA نمونه ها، دستگاه اسپکتروفتومتر کالیبره شد. این کار توسط بافر TE یا آب مقطر دوبار سترون در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر صورت گرفت. برای انجام این‌کار ۴۵ میکرولیتر از بافر TE یا آب مقطر به محفظه ویژه اسپکتوفتومتر(کوت) اضافه و سپس در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ کالیبره شد. پس از آن ۲ میکرولیتر از نمونه DNA به آن اضافه و میـــزان جذب نوری(OD) اندازه گیـــری شـــد. در صـــورتی که نســـبت ۲۶۰OD/۲۸۰OD حدود ۲-۱/۸ بود، نشان دهنده کیفیت بالای DNA است و DNA از کیفیت مطلوبی برای PCR برخوردار است. نسبت کمتر از ۱/۶ نمایانگر حضور پروتئین و سایر آلودگی ها می باشد. نسبت های بالاتر از ۱/۸ نشان دهنده وجود اسیدهای نوکلئیک است. نسبت های بالاتر از ۲ نشان دهنده آلودگی نمونه به RNA است. جهت اطمینان بیشتر می توان با روش الکتروفورز DNA در ژل آگارز کیفیت و غلظت DNA را تعیین کرد.

تعیین کیفیت DNA توسط ژل آگارز: کیفیت DNA با مشاهده شکل باندها مورد بررسی قرار گرفت. وجود باندهای کاملاً تیز، و بدون کمترین کشیدگی حاکی از کیفیت مناسب می باشد. وجود کشیدگی در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 15:20 IRST on Tuesday February 12th 2019

فاصله بین چاهک و باندها حاکی از آلودگی پروتئینی در نمونه ها می باشد. وجود یک باند اضافی در پایین ژل و در فاصله ای زیاد از باند اصلی حاکی از وجود RNA در نمونه ها است.

ک-واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR): به منظور شناسائی جدایه ها از آزمون Polymerase chain reaction DNA استفاده گردید حضور ژن 16S rDNA با کمک جفت آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس(Rp1 و Fd2) انجام پذیرفت(جدول شماره ۱). سپس محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی گردیدند. و باندها توسط دستگاه transilluminator (White/ultra violet مدل Uvitek کشور انگلستان) مشاهده و عکسبرداری شد(۱۱).

جدول شماره ۱ . آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگرها	توالی آغازگر	اندازه مورد انتظار
Rp 1	5-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3	۱٫۵Kb
Fd 2	5-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3	

ل-تهیه ترکیبات واکنش برای انجام PCR: واکنش زنجیره ای پلی مراز، در دستگاه ترمال سایکلر مدل MJ Research ساخت شرکت BioRad کشور آمریکا انجام شد. همه مواد مصرفی توسط شرکت سیناژن تهیه گردید. آزمون در واکنش های ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر(غلظت ۱۰ پیکومولار)، ۱ میکرولیتر DNA الگو(غلظت تقریبی ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر سترون و دیونیزه انجام گردید(۱۲). Master mix حاوی PCR Reaction buffer(۱۰X)، کلرور منیزیم($MgCl_2$)، dNTPs و آنزیم Taq-DNA Polymerase بود.

م-چرخه حرارتی PCR: قبل از انجام PCR، چرخه های حرارتی مختلف برای چند نمونه، آزمایش شدند. در این آزمون برای به دست آوردن بهترین درجه حرارت باند شدن آغازگرها به DNA هدف، محدوده دمایی برای هر آغازگر به صورت گرادیانت در نظر گرفته شد(۱۱). چرخه حرارتی واکنش زنجیره ای پلی مراز برای آغازگرهای ژن 16S rDNA در جدول شماره ۲ قابل ملاحظه است.

جدول شماره ۲. چرخه حرارتی واکنش زنجیره ای پلی مراز برای آغازگرهای ژن 16S rDNA

تعداد چرخه	نام مرحله	مدت زمان	درجه حرارت
۱ چرخه	واسرشت اولیه	۴ دقیقه	۹۵ درجه سانتی‌گراد
۳۵ چرخه	واسرشت	۱ دقیقه	۹۴ درجه سانتی‌گراد
	اتصال	۱ دقیقه	۵۱ درجه سانتی‌گراد
	بسط	۲ دقیقه	۷۲ درجه سانتی‌گراد
۱ چرخه	بسط نهائی	۷ دقیقه	۷۲ درجه سانتی‌گراد

ن-الکتروفورز محصولات PCR: الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد انجام گرفت. برای تهیه ژل، ۰/۶ گرم آگارز به ۵۰ میلی لیتر بافر ۱TAEx اضافه و مخلوط شد سپس در دستگاه گرمادهنده ذوب گردید، پس از پایین آمدن دمای ژل تا حدود ۵۰ درجه سانتی گراد در سینی ریخته شد.

بعد از بسته شدن ژل، شانه به آرامی از آن خارج و سینی ژل در تانک الکتروفورز حاوی بافر ۱TAEx قرار گرفت سپس ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر Loading buffer6x (۰/۲۵گرم زایلن سیانول، ۰/۲۵ گرم برم فنل بلو، ۳۰ میلی‌لیتر گلیسرول و ۷۰ میلی لیتر آب مقطر) درون چاهک ها ریخته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 15:20 IRST on Tuesday February 12th 2019

الکتروفورز نمونه ها در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه انجام گرفت(۱۲).

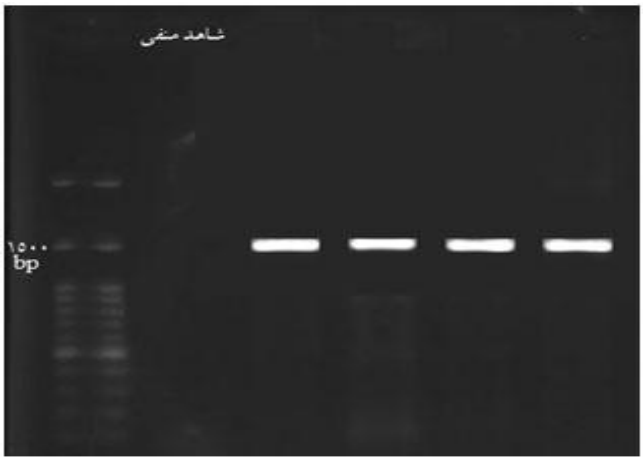
س-رنگ آمیزی ژل و مشاهده باندها: پس از اتمام الکتروفورز، ژل توسط اتیدیوم بروماید با غلظت نهائی ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه رنگ آمیزی گردید. جهت حذف رنگ اضافه، ژل توسط آب مقطر شسته شد و باندها توسط دستگاه ترانسلومیناتور مشاهده و با استفاده از دستگاه gel documentation عکسبرداری شد.

ع-آنالیز داده های نوکلئوتیدی: پس از اطمینان از صحت انجام PCR و عدم وجود آلودگی از طریق الکتروفورز محصولات، محصول PCR جهت تعیین توالی به همراه آغازگرهای رفت و برگشت به شرکت ماکروژن کره جنوبی(توسط شرکت تکاپو زیست) ارسال گردید. به کمک توالی دو رشته رفت و برگشت و با استفاده از نرم افزار BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0 تطبیق توالی های 16S rDNA انجام پذیرفت(۱۳)، سپس توالی به دست آمده در سایت NCBI، با سایر توالی های سویه های استاندارد موجود در سایت NCBI با استفاده از نرم افزار Blast X مقایسه گردید(۱۴).

ف-آنالیزهای فیلوژنتیکی: هم ردیف کردن توالی ها با توالی سویه های تیپ، با استفاده از نرم افزار Clustalx v.1.8(۱۵) انجام شد. آنالیزهای فیلوژنتیکی به روش NJ به کمک نرم افزار PAUP v. 4.0b10، انجام شد(۱۶). درخت حاصل از آنالیزهای فیلوژنتیکی به وسیله نرم افزار Tree View(۱۷) مشاهده شد. روش NJ با تصحیح دو پارامتری و ۱۰۰۰ تکرار انجام گردید(۱۸).

یافته های پژوهش

شناسائی مولکولی با تکثیر ژن 16S rDNA: برای شناسایی جدایه ها از تعیین توالی اختصاصی بخشی از ژن 16S rDNA استفاده شد. جفت آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس به کار برده شده در این پژوهش rp_1 و Fd_2 بودند. نقوش الکتروفورزی محصول PCR برای جدایه ها در شکل شماره ۱ قابل ملاحظه است.



شکل شماره ۱. نقوش الکتروفورزی محصول PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد

از بین سویه های باکتریائی، ۴ سویه شامل Pseudomonas protegens بود که در این میان ۲ سویه از برگ، ۲ سویه از ساقه های مختلف برگ نو جداسازی گردید. تمام جدایه ها از نظر توانایی تولید آنزیم پروتئاز مثبت بودند، از نظر تولید هیدروژن سیانید تنها BN3 این توانایی را داشت و از نظر تولید سیدروفور، تنها BN2 دارای این توانائی بودند که در جدول شماره ۳ نتایج قابل ملاحظه است.

www.SID.ir

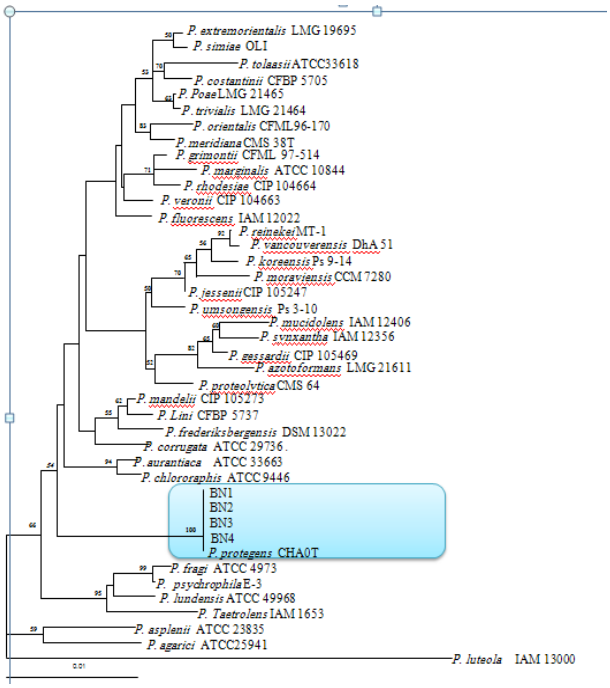
Archive of SID

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 15:20 IRST on Tuesday February 12th 2019

جدول شماره ۳. نتایج آزمون های بازدارندگی جدایه ها

نام جدایه	آزمون پروتئاز	توانائی تولید هیدروژن سیانید	توانائی تولید سیدروفور
BN1	+	-	-
BN2	+	-	+
BN3	+	+	-
BN4	+	-	-

در این تحقیق بخش های ابتدایی و انتهایی که در بعضی از توالی ها وجود نداشتند، از آنالیزها حذف گردیدند. آنالیزها با روش NJ انجام شد. روش جایگزینی نوکلئوتیدی K_2P انجام شد. بر اساس نتایج مطالعات مولکولی، سویه های BN1، BN2، BN3، BN4 با بوت استرپ ۱۰۰ با Pseudomonas protegens در یک گروه قرار گرفتند. برای رسم درخت فیلوژنتیکی از ۳۸ گونه متعلق به جنس Pseudomonas استفاده شد. گونه Pseudomonas luteola به عنوان فرد برون گروه در نظر گرفته شد. مقادیر بوت استرپ روی شاخه ها در شکل شماره ۲ نشان داده شده است.



شکل شماره ۲. درخت فیلوژنتیکی حاصل از توالی بخشی از ژن 16S rDNA مربوط به گونه های جنس Pseudomonas. مقادیر بوت استرپ مربوط به آنالیز Neighbour-Joining روی شاخه ها نشان داده شده است. گونه Pseudomonas luteola به عنوان فرد برون گروه در نظر گرفته شد.

بحث و نتیجه گیری

باکتری های اندوفیت با حفظ بقای خود در گیاه میزبان معمولاً نه تنها زیانی به میزبان نمی رسانند بلکه با کمک ساز و کارهای مختلف به طور مستقیم و غیرمستقیم سبب افزایش رشد گیاهان می گردند. تحریک غیرمستقیم رشد گیاه زمانی اتفاق می افتد که باکتری، اثرات زیان آور یک یا چند بیمارگر گیاهی را خنثی کند که این امر از دو راه میسر می گردد. در یک

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 15:20 IRST on Tuesday February 12th 2019

روش باکتری با ترشح سیدروفور، تولید سیانید هیدروژن، ترشح آنزیم های برون سلولی مانند کیتیناز، بتا-یک و سه گلوکوناز، پروتئاز و لیپاز فعالیت عامل بیماری را کاهش و یا آن را متوقف می سازد. در روش دیگر باکتری سبب فعال شدن مکانیسم مقاومت سیستمیک القایی در گیاه می گردد(۱۹). در این زمینه می توان به سیدروفورها، لیپوپلی ساکاریدها و اسید سالیسلیک اشـــاره نمـــود. سیدروفور علاوه بر اثر غیرمستقیم، می تواند به طور مستقیم در افزایش رشد گیاه میزبان کمک نماید. در واقع در شرایط کمبود آهن، جذب آهن توسط ریزجانداران و گیاهان، عموماً به عوامل کلات کننده برای حل و انتقال آهن غیرآلی (معدنی) وابـــسته است. بیشترین و متنوع ترین کلات های بیوسنتزی، سیدروفورهای میکروبی و به نسبت کمتر فیتوسیدروفورهای تولید شده به وسیله گرامینه ها می باشند. سیدروفورها ترکیباتی با وزن مولکولی کم(کمتر از ۱۰۰۰ دالتون) دارای میل ترکیبی بالا با آهن سه ظرفیـــتی می باشند که توســط باکتری های مختلف برای حل کردن آهن سه ظرفیتی در محیط خارج سلولی ترشح می شوند. سودوموناس به عنوان جنس غالب اندوفیتی با توانایی تولید ترکیبات محرک رشد در این پژوهش معـــرفی گـــردید. باکتری های جنس سودوموناس به طور وسیعی در طبیعت گسترش پیدا کرده اند و از بیشتر محیط ها جدا شوند(۲۰). باکتری های مذکور از لحاظ طیف متنوع متابولیت های محرک رشد گیاهی از جمله تولید سیانید هیدروژن، تولید سیدروفور، حل کنندگی فسفات و تولید اکسین حائز اهمیت اند(۲۱). اوماماهسواری و همکاران (۲۲) این جنس را به عنوان باکتری اندوفیت محرک رشد در گیاهان زراعی معرفی نمودند. احمدزاده(۲۳) نشـــان داد کـــه باکتـــری های Pseudomonas fluorescens و Pseudomonas putida در کاج و باکتری Pseudomonas aureofaciens در نراد قادر به افزایش ارتفاع و زیست توده گیاه می گردند باکتری اندوفیت Pseudomonas در آرابیدوپسیس و سویا شناسایی گردیده است(۲۴).

در ارزیابی توانایی باکتری ها در تولید سیدروفور، لوپر و هنکلز(۲۵) ایجاد هاله در اطراف کلنی را به عنوان معیاری از توانائی باکتری در تولید سیدروفور در نظر گرفتند. در واقع هاله نارنجی نتیجه تولید سیدروفور است که با حذف آهن از کمپلکس دای موجب تغییر رنگ محیط از آبی به نارنجی می گردد. رسولی صدیقیانی و همکاران(۱۹) هاله نارنجی تا نارنجی مایل به قرمز را معیاری از توانائی تولید سیدروفور در نظر گرفتند. در مطالعات میلاگرس و همکاران(۲۶) در محیط های کروم آزرول اس سیدروفورهای منوهیدروکسامات و تری هیدروکسامات به ترتیب به رنگ نارنجی مایل به قرمز و نارنجی ملاحظه گردیدند. در حالی که کمپلکس های کاتکولی موجب تغییر رنگ محیط از آبـــی به ارغـــوانی تا قرمز مایل به ارغوانی می گردند. در بیشتر موارد سیدروفور تولید شده توسط Pseudomonas از نوع هیدروکسامات گزارش گردید. از آن جا که سرعت رشد باکتری ها در محیط کروم آزرول اس با هم دیگر متفاوت است، لذا برای تشکیل هاله، محیط کشت ها چند روز در انکوباتور نگهداری گردیدند. سویه های مورد بررسی در این پژوهش، قابلیت نسبتاً خوبی در تولید هاله نارنجی رنگ داشتند. در پژوهش حاضر در بین باکتری های سودوموناس تنها سویه های BN1 قادر به تولید سیدروفور گردیدند. سیانید هیدروژن از متابولیت های ثانویه بسیاری از ریزجانداران است و به طور مستقیم از پرولین، گلایسین و یا گلیکوزیدهای سیانوژنیک ساخته می شود. تولید سیانید هیدروژن در باکتری های سودوموناس به میزان آهن قابل جذب بستگی دارد. این ترکیب از طرفی برای قارچ ها ســـمی و از طرف دیگر تولید آن توسط باکتری ها موجب تشکیل ریشه های مویین می گردد. سیانید هیدروژن تولید شده، سیستم تنفسی قارچ های بیماری زا را مختل نموده و از این طریق موجب توقف رشد آن ها گردد. سیانید بازدارنده قوی آنزیم سیتوکروم اکسیداز(جزء نهایی چرخه تنفس هوازی) در بسیاری از موجودات زنده است. در گونه های سودوموناس تولید سیانید هیدروژن(تولید سیانید هیدروژن و دی اکسید کربن از گلایسین) توسط آنزیم سیانید هیدروژن اکسیداز موجود در غشاء انجام می پذیرد. این آنزیم به اکسیژن مولکولی بسیار حساس بوده و تنها بعضی از گونه های سودوموناس به ویژه سودوموناس فلورسنس

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 15:20 IRST on Tuesday February 12th 2019

دارای چنین آنزیمی هستند و حداکثر تولید سیانید هیدروژن توسط این باکتری ها در پایان مرحله رشد تصاعدی و ابتدای فاز ساکن می باشد(۲۷). انگوما و همکاران(۲۸) قادر به شناسایی باکتری اندوفیت Pseudomonas از پنبه گردیدند که قادر به تولید هیدروژن سیانید بود. در حالی که در این مطالعه تنها یکی از سویه های Pseudomonas توانست سیانید هیدروژن تولید نمایند(۲۹). Szilagyi-Zecchin و همکاران سویه سودوموناس را به عنوان باکتری با قابلیت تولید آنزیم های لیتیک معرفی نمودند که نتایج آن ها با پژوهش حاضر هم خوانی داشت. تمام سویه های مورد بررسی قادر به تولید آنزیم پروتئاز گردیدند. تحقیق حاضر نشان داد که باکتری های اندوفیت با توانایی تولید این گروه از آنتاگونیست ها، توان بالقوه ای در کنترل بیمارگرها خواهند داشت، که چنین امید می رود با شناسایی هر چه بیشتر این گروه از میکروارگانیسم ها در گیاهان مختلف و انجام مطالعات آزمایشگاهی و گلخانه ای به توان از آن ها به عنوان جایگزینی برای سموم موجود در بازار بهره جست.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1.Bean WJ. Trees and shrubs hardy in the british isles. 1th ed.Sunders Publication.1978; P. 576-577.

2.Schulz B, Boyle C. What are endophytes? Microbial root Endophyt Verlag2006;4:1-13.

3.Verma JP, Yadav J, Tiwari KN, Kumar A. Effect of indigenous Mesorhizobium spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea Cicer arietinum L. under sustainable agriculture. Ecol. Eng 2013; 51: 282-86. doi: 10.1016/j.ecoleng.2012.12.022

4.Krey T, Vassilev N, Baum C, Eichler-Lobermann B. Effect of long-term phosphorus application and plant-growth promoting rhizobacteria on maize phosphorus nutrition under field conditions. Eur J Soil Biol 2013; 55: 124-30. doi: 10.1016/j.ejsobi.2012.12.007

5.Schywan B, Neilands JB. Universal chemical assay for detection and determination of sidrophores. Anal Biochem 1987; 160: 47-56.

6.Hidayati U, Chaniago IA, Munif A, Andreas Santosa S, Andreas Santosa S. Potency of plant growth promoting endophytic bacteria from rubber plants Hevea brasiliensis Mull. Arg J Agron 2014; 13: 147-52. doi: 10.3923/ja.2014.147.152

7.Sziderics AH, Rasche F, Trognitz F, Sessitsch A, Wilhelm E. Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants Capsicum annuum L. Can J Microbiol 2007; 53: 1195-202. doi: 10.1139/W07-082.

8.Jasim B, Joseph AA, John CJ, Mathew J, Radhakrishnan EK. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of Zingiber officinale. Biotechnology 2014; 4: 197-04. doi: 10.1007/s13205-013-0143-3

9.Aboaba SEM, Solinum EAM, Nivien AA. Enhanced production of extra cellular alkaline protease in Bacillus circulance through plasmid transfer. Res J Agricul Biol Sci 2006; 2: 526-30.

10.Alstrom S, Burns RG. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. Biolo Fert Soil 1989; 7: 232- 38. doi: 10.1007/BF00709654

11.Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 1991; 173: 697- 03.

12.Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor NY LabPublication. 2001; P. 1863

13.Hall TA. Bioedit a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98 NT. Nucl Acid Sym1999; 41: 95-8.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 15:20 IRST on Tuesday February 12th 2019

14.Altschul SF, Gish W, Miller W, Mayers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990; 5: 403-10.
15.Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The clustal-x windows interface: flexible strategis for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucl Acid Res 1997; 15: 4876-882.
16.Swofford DL. Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Sunderland Massachsetts Sinauer Associates. 2002.
17.Page RDM. Tree view: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Cabios Appl Note 1996; 12: 357-58.
18.Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base subsituation through comparative studies of nucleotide sequence. Mol Evol 1980; 16: 111-20. doi: 10.1007/BF01731581
19.Rasolisedghiyani M, Rahimiyan P, Khavari K, Malakoti MH. Study of population density and identification of wheat phizospheric fluorescent pseudomonas in different region in Iran. J Water Soil Sci 2005; 19: 224-34.
20.Alexander DB, Zuberer D. Responses by iron efficient and inefficient oat cultivation with siderophore producing bacteria in a calcareous soil. Biolo Fert Soils 1993; 16: 118-24. doi:10.1007/BF00369412
21.Schippers B, Bakker AW, Bakker PAHM. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Ann Rev Phytopathol 1987; 25: 339-58.
22.UmaMaheswari T, Anbukkarasi K, Hemalatha T, Chendrayan K. Studies on phytohormone producing ability of indigenous endophytic bacteria isolated from tropical legume crops. IJCMAS 2013; 2: 127-36.
23.Ahmadzadeh, M. Biological control of plant disease plant probiotic bacteria. Uni Tehran Publication. 2013; P. 474
24.Panchal H, Ingle S. Isolation and characterization of endophytes from the root of medicinal plant Chlorophytum borivilianum Safed musli. J Adv Dev Res 2011; 2: 205-9.
25.Loper JE, Henkels MD. Utilization of heterologous siderophores enhances level of iron available to Pseudomonas putida in the rhizosphere. Appl Environl Microb 1999; 65: 5357-363.
26.Milagres AM, Machua A, Napoleao D. Detection of sidrophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrom azurol agar plate assay. J Microbiol Meth 1999; 37: 1-6.
27.Schippers B, Bakker AW, Bakker PAHM. Intractions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Ann Rev Phytopathol 1987; 25: 339-58. doi: 10.1146/annurev.py.25.090187.002011
28.Ngoma L, Mogatlangane K, Babalola OO. Screening of endophytic bacteria towards the development of coltage industry an invitro study. J Hum Ecol 2014; 47: 45-63. doi: 10.1080/09709274.2014.11906738
29.Szilagyizecchin VJ, Ikeda AC, Hungria M, Adamoski D, Kavacordeiro V, Glienke C, Galliterasawa LVG. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn Zea mays L. roots with biotechnological potential in agriculture. AMB Exp 2014; 4: 2-9. doi: 10.1186/s13568-014-0026-y

www.SID.ir

Archive of SID

Phylogenetic Characterization oF Endophytic Bacterium Pseudomonas Protegens with Antagonistic Ability Isolated From privet

Etminani F[1], Etminani A[2]

(Received: October 26, 2016 Accepted: May 1, 2017)

Abstract

Introduction: Endophytic bacteria are able to control plant pathogens by producing antagonistic compounds. This research was conducted to determine the antagonistic ability of bacterial endophytes in privet (Ligustrum vulgare L.).

Materials & Methods: In this study, endophytic bacteria were isolated from stem and leaf of privet (Ligustrum vulgare L.). After genomic DNA extraction, 16S rDNA gene was amplified using polymerase chain reaction (PCR) technique for precise bacterial identification. Then, the PCR product was sequenced by BLAST. Strains were examined for siderophore, hydrogen cyanide, and protease tests .

Findings: All the isolated bacteria were able to produce protease. Only one strain (BN3) was able to produce hydrogen cyanide. The siderophore test was positive for one strain (BN2). Based on the 16S rDNA sequence studies, the strain bacteria belonged to Pseudomonas protegens and indicated 100% similarity to type strain .

Discussion & Conclusions: The endophytic bacteria isolated in this study can be used to promote plant growth. Knowledge about endophytic bacteria-plant interaction can provide an effective strategy to develop sustainable agriculture in order to ensure yield improvement without affecting environment.

Keywords: Bacteria, Endophytic, Privet, Siderophore

1. Young Researchers and Elite Club Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Sanandaj,Iran
** Corresponding author Email: agriculture. student@yahoo.com*

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 15:20 IRST on Tuesday February 12th 2019

www.SID.ir