بررسی تنوع ژنتیکی باکتری های سودوموناس فلورسنت جداسازی شده از ریزوسفر برنج

محمود رضا رمضانپور[1]، کاظم خاوازی[2]،هادی اسدی رحمانی[3]

1- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران - ساری

2- عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات خاک و آب - کرج

3- عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب - کرج

mrramezanpour@yahoo.com

چکیده

استفاده از روشهای مولکولی برای شناخت روابط متقابل بین گیاهان و میکرو ارگانیسم ها روز به روز پیشرفت هایی را در زمینه بیولوژی خاک فراهم می کند. در این مطالعه تنوع ژنتیکی 50 جدایه از سودوموناس های فلورسنت جداسازی شده از ریزوسفر برنج که از نقاط مختلف شمال ایران جمع آوری شده بود مورد بررسی قرار گرفت. مارکر مولکولی مورد استفاده RFLP بود. نتایج این تحقیق نشان داد که این باکتری ها دارای تنوع ژنتیکی بوده و بر اساس نمودار خوشه ای دارای 11 ژنوتیپ بودند که در پنج گروه سودوموناس فلورسنت قرار گرفتند. اکثر سویه های مورد مطالعه سودوموناس فلورسنس بود.

کلمات کلیدی: برنج، تنوع ژنتیکی، ژنوتیپ، سودوموناس فلورسنت

مقدمه

برنج یکی از منابع مهم ازران کربوهیدرات برای بسیاری از مردمان، در کشور های مختلف است. در ایران بیش از 630 هزار هکتار در سال برنج کشت می شود که تولید آن در سال حدود 2/1 میلیون تن می باشد، مازندران، گلستان و گیلان از مهم ترین مناطق کشت برنج در ایران می باشد(بی نام، 1388). باکتری های جنس سودوموناس، بطور فراوان در نقاط مختلف از جمله خاک و دیگر محیط های طبیعی پراکنده شده اند (Anzi و همکاران، 2000). سودوموناس ها از مهمترین باکتری های افزاینده رشد گیاه هستند که می توان به عنوان کودهای بیولوژیک استفاده کرد و از طریق مکانیسم های مستقیم و غیر مستقیم باعث افزایش عملکرد و رشد محصولات مختلف می شوند (Walsh و همکاران، 2001). تحقیقات مختلف نشان داده که سودوموناس های فلورسنت از فراوان ترین باکتری های ریزوسفر گیاهان مختلف می باشند (Kumar و Sugitha، 2004 و Ramos Solano و همکاران، 2006). شناسایی تنوع ژنتیکی سودوموناس ها می تواند تاثیر و کارایی آنها را در کلونیزه کردن برنج و افزایش رشد آنها را بهتر توضیح دهد. ارزیابی تنوع ژنتیکی سودوموناس ها با PCR ژن 16s rDNA توسط محققین مختلف گزارش شده است (Misko و Germida، 2002). هدف از این مطالعه تعیین تنوع ژنتیکی سودوموناس های فلورسنت جداسازی از ریزوسفر برنج بود تا بر اساس آن شناخت خوبی از وضعیت پراکنش این باکتری ها در شالیزارهای شمال ایران بدست آید.

مواد و روشها

در این مطالعه 50 جدایه سودوموناس های فلورسنت که از ریزوسفر برنج جداسازی شده بود و بر اساس تستهای بیوشیمایی مورد مطالعه قرار گرفته بود مورد ارزیابی ژنتیکی قرار گرفت. سه ایزوله رفرنس برای سودوموناس فلورسنس (*P. fluorescens*

ATCC 49642)، سودوموناس پوتیدا(*P. putida* (ATCC 12633 و سودوموناس ایروژنوزا (*P. aeruginosa* GRP3)از ذخایر باکتریایی مؤسسه تحقیقات خاک و آب فراهم شد. و پس از جداسازی و خالص سازی DNA با روش اصلاح شده (PCI)فنل، کلروفورم ایزومیل الکل (Marmur 1961) ، ژن 16s rDNA را با استفاده از دو آغازگرfD1 (5′_AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3′) وrD1 (5′- AAGGAGGTGATCCAGCC 3′) استحصال شد(Weisburg و همکاران، 1991). برای PCR از ترموسایکلر با برنامه حرارتی، زمانی زیر استفاده شد. واسرشت سازی با 32 سیکل در دمای 95 درجه سانتیگراد به مدت 2/5 دقیقه، اتصال در دمای 51 درجه ساتیگراد به مدت 1 دقیقه و بسط در دمای 72 درجه ساتیگراد به مدت 10 دقیقه و در آخر بسط نهایی به مدت 10 دقیقه در دمای 72 درجه سانتیگراد. برای تایید نهایی انجام موفقیت آمیز همانند سازی DNA، و استخراج ژن 16s rDNA، نمونه ها را بر روی ژل آگاروز (1/3%)، الکتروفورز کرده پس از رنگ آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید (ا میلی گرم بر لیتر)از ژل ها در زیر نور UV عکسبرداری شد. محصولات تولیدی از PCR را با استفاده از افزودن دو آنزیم برشی *Msp*I و *Hae*III، هضم نموده و برای ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از مارکر مولکولی RFLP آماده نمودیم. الکتروفورز نمونه ها بر روی ژل آگاروز 3% به مدت دو ساعت و با ولتاژ 100 و عکسبرداری از آنها انجام شد. نتایج حاصل را در یک ماتریس دو طرفه با ضریب شباهت Dice و ترسیم نمودار درختی با استفاده از UPGMA و نرم افزار NETSYS، تجزیه و تحلیل شد(Rohlf، 1993).

نتایج و بحث

DNA و ژن 16s rDNA تمام نمونه ها، استخراج شد. نتایج حاصل از PCR این نمونه ها بغیر از یک مورد شامل یک باند 1200 جفت بازی بود که از هضم با آنزیم های برشی حاصل شد و با الکتروفورز، الگوی متفاوتی را نشان داد. آنزیم برشی *Hae*III و*Msp*I ، ژن 16s rDNA را به الگوهای 3 تا 6 قطعه ای، با وزن مولکولی از 130 تا 950 جفت بازی تولید نمود. که تفاوت بین ژنوتیپ ها با استفاده از این مارکر مولکولی ناشی از تولید همین الگو های متفاوت بود. پس از ترکیب نتایج الگوهای این دو آنزیم، یازده ژنوتیپ 16s rDNA حاصل شد (جدول 1). بر اساس نمودار خوشه ای این ژنوتیپ ها در پنج گروه مختلف سودوموناس فلورسنت با 83% شباهت قرار گرفت. 35 سویه به صورت ژنتیکی با سودوموناس فلورسنس ATCC 49642 در ارتباط بود. از این تعداد 21 سویه در همان شاخه سودوموناس فلورسنس رفرنس قرار گرفت و 14 سویه با آن ارتباط ژنتیکی داشت. هشت سویه از لحاظ ژنتیکی به سودوموناس پوتیدا ATCC 12633 نزدیک بود و چها سویه به سودوموناس ایروژنزا رفرنس (GRP3) وابستگی داشت. که دو سویه در این شاخه و دو سویه نزدیک به آن بود.

در این مطالعه ما از مارکر مولکولی RFLP استفاده کردیم و تنوع ژنتیکی سویه ها را بر اساس ژن 16s rDNA آنها ارزیابی نمودیم همانطوریکه در تحقیقات دیگر، انگشت نگاری این ژن مورد مطالعه واقع شده است و تفاوتهای ژنتیکی بعضی از باکتری ها بررسی شده است (Fischer و همکاران، 2007؛ Sun و همکاران، 2008). نتیجه حاصل از این مطالعه نشان داد که اکثر سویه های مورد بررسی، سودوموناس فلورسنس بود. تعیین تنوع ژنتیکی و آنالیز ژنوتیپ های DNA ریبوزومی با استفاده از مارکر مولکولی RFLP، به عنوان مارکر مولکولی خوبی برای شناسایی سودوموناس ها مورد اسفاده واقع می شود چرا که روشی سریع و آسان می باشد. همانطوریکه با استفاده از این مارکر، نتایج قبلی تستهای بیوشیمایی را تایید نمود (Ramezanpour و همکاران، 2008).

جدول 1: انواع ژنوتیپ 16s rDNA سویه های سودموناس فلورسنت

سویه	مکان نمونه برداري	انواع ژنوتیپ .a
MZ 3	Mazandaran	I
MZ 7	Mazandaran	I
MZ 8	Mazandaran	VIII
MZ 9	Mazandaran	I
MZ 10	Mazandaran	I
MZ 11	Mazandaran	I
MZ 13	Mazandaran	I
MZ 14	Mazandaran	I
MZ 15	Mazandaran	I
MZ 16	Mazandaran	I
MZ 18	Mazandaran	I
MZ 20	Mazandaran	I
MZ 21	Mazandaran	I
MZ 22	Mazandaran	I
MZ 24	Mazandaran	I
MZ 26	Mazandaran	I
MZ 29	Mazandaran	VI
MZ 33	Mazandaran	I
MZ 36	Mazandaran	I
MZ 37	Mazandaran	I
MZ 42	Mazandaran	III
MZ 44	Mazandaran	III
MZ 45	Mazandaran	IV
MZ 47	Mazandaran	VIII
MZ 49	Mazandaran	III
GO 1	Golestan	I
GO 2	Golestan	II
GO 5	Golestan	X
GO 7	Golestan	X
GO 11	Golestan	VII
GO 12	Golestan	III
GO 15	Golestan	II
GO 20	Golestan	III
GO 22	Golestan	II
GO 23	Golestan	III
GU 1	Guillan	I
GU 4	Guillan	IV
GU 5	Guillan	IX
GU 7	Guillan	III
GU 8	Guillan	I
GU 10	Guillan	IV
GU 22	Guillan	IV
GU 23	Guillan	IX
GU 24	Guillan	III
GU 25	Guillan	XI
GU 28	Guillan	VI
GU 34	Guillan	III
GU 35	Guillan	III
GU 36	Guillan	VI
GU 37	Guillan	III
P. fluorescens ATCC 49642	SWRI Culture Collection	I
P. putida ATCC 12633	SWRI Culture Collection	V
P. aeruginosa GRP 3	SWRI Culture Collection	VIII

P. fluorescens ATCC 49642و *P. putida* ATCC 12633 و *P. aeruginosa* GRP3 به عنوان ایزوله های رفرنس از مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهیه شد.

منابع

1- بی نام، 1388. آمار نامه کشاورزی، جلد اول: محصولات زراعی و باغی (86- 1385). نشریه شماره 88/09 دفتر آمار و فن آوری اطلاعات معاونت برنامه ریزی و اقتصاد وزارت جهاد کشاورزی، تهران.

Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H and Oyaizu H, 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50: 1563-1589.

Fischer SE, Sandra I, Fischer SM and Gladys BM, 2007. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. World J. Microbiol. Biotechnol., 23: 895-903.

Kumar K and Kumari Sugitha TC, 2004. Diazotrophic diversity in rice ecosystem. International symposium on Microbial Ecology. Cancan, Mexico.

Marmur J and Doty P, 1961. Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. J. Molecular Biol., 3: 585-594.

Misko AL and Germida JJ, 2002. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. FEMS Microb. Ecol., 42: 399-407.

Ramezanpour MR, Popov Y and Khavazi, K, 2008. Isolation and characterization of fluorescent pseudomonads species of paddy fields in the North of Iran. Biol. J. Armenia. 1: 141-146.

Ramos Solano B, Pereyra de la Iglesia MT, Probanza A, Lucas Garcia JA, Megias M, Gutierrez and Mannero FG, 2006. Screening for PGPR to improve growth of Cistus ladanifer seedlings for reforestation of degraded Mediterranean ecosystems. Plant Soil, 287: 59-68.

Rohlf FJ, 1993. NTSYS-PC. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York.

Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X, Dong X and Song W, 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (Oryza sativa L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. Microb. Ecol., 55: 415-424.

Walsh UF, Morrissey JP and O'Gara F, 2001. Pseudomonas for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. Curr. Opin. Biotechnol., 12: 289-295.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA and Lane DJ, 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol., 173: 697-703.