

شناسایی فیلوژنتیکی باکتری‌های اندوفیت جدا شده از ریشه

بادمجان و بررسی توان آنتاگونیستی آن‌ها

فایقه اطمینانی^{۱*}، ادیبه اطمینانی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۳

چکیده

باکتری‌های اندوفیت با توانایی تولید ترکیبات آنتاگونیست، قادر به کنترل بیمارگرهای گیاهی هستند. این مطالعه به منظور بررسی توانایی تولید ترکیبات آنتاگونیستی در باکتری‌های اندوفیت بادمجان انجام پذیرفته است. در این پژوهش باکتری‌های اندوفیت از ریشه بادمجان، جداسازی گردید، سویه‌ها از نظر تولید سیدروفور، هیدروژن سیانید و آنزیم پروتئاز مورد بررسی قرار گرفتند. ۵ جدایه برای مطالعات ژنتیکی انتخاب شد. 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 16SrDNA گردید. تمام باکتری‌های جداسازی شده در این پژوهش قادر به تولید آنزیم پروتئاز بودند. تنها یک سویه قادر به تولید هیدروژن سیانید بود. نتایج آزمون سیدروفور برای دو سویه مثبت بود. نتایج تعیین توالی نشان داد که باکتری‌های جداسازی شده متعلق به باسیلوس اندوفیتیکوس است که با سویه تیپ شباهت ۱۰۰ درصدی دارند و سویه‌های جدا شده در این پژوهش، می‌توانند در افزایش رشد گیاه به کار روند. از آن‌جا که کشاورزی پایدار به توانایی حفظ تولید، همراه با استمرار نگهداشت منابع و حفظ محیط زیست تاکید دارد، لذا کاربرد باکتری‌های اندوفیت در راستای اهداف کشاورزی پایدار است و بی‌شک با شناخت و کشف مکانیزم‌های دخیل می‌توان به این مهم دست یافت.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، بادمجان، باکتری، سیدروفور

مقدمه

برای اولین بار در سال ۱۸۸۶ «دباری» پدر علم بیماری‌شناسی گیاهی اصطلاح اندوفیت را به کار برد (Kuzniar, 2013) در آغاز این اصطلاح برای قارچ‌هایی که در درون بافت گیاه تا بخش زیرین پوست وجود داشتند به کار می‌رفت. اما بعداً در مورد باکتری و هر میکروارگانیسمی که در ناحیه داخلی بافت گیاه پیدا شود، معمول گردید. باکتری‌های اندوفیت به باکتری‌هایی گفته می‌شوند که در داخل بافت گیاه سالم، بدون ایجاد علائم و آسیب حضور دارند و از آن‌جا که علائم آشکاری بروز نمی‌دهند تخمین صحیح از جمعیت آن‌ها مشکل است (Schulz and Boyle, 2006). باکتری‌های اندوفیت از ریشه، برگ، ساقه، بذر، غده، گل‌آذین و میوه‌های گیاهان مختلف جدا شده‌اند. بیش از ۳۰۰ هزار گونه گیاهی روی زمین

۱ و ۲. عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران

* (نویسنده مسئول: Faegheh.Etminani@yahoo.com)

وجود دارد (Hallman et al., 1997). محققان برآورد کرده‌اند که هر گیاه حداقل میزبان یک یا چند اندوفیت است (Strobel and Daisy, 2003). باکتری‌های اندوفیت ممکن است دارای هزاران گیاه میزبان باشند و یا احتمال دارد که دامنه میزبانی آن‌ها محدود به خانواده گیاهی مشخصی باشد (Kobayashi and Palumbo, 2000). تنوع باکتری‌های اندوفیت نه تنها در بین گیاهان مختلف، بلکه حتی در میان تاکسون‌های باکتریایی قابل ملاحظه است، به طوری که از جنس‌ها و گونه‌های مختلف، باکتری‌های مختلفی به عنوان اندوفیت معرفی گردیده‌اند (Bashan and Holguin, 1998). باکتری‌های اندوفیت شامل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی هستند. اگرچه تحقیقات حاکی از آن است که سهم وسیعی از باکتری‌های اندوفیت متعلق به باکتری‌های گرم منفی هستند (Hallmann et al., 1997). باکتری‌های اندوفیت در درختان جنگل از گروه‌های آلفا، بتا و گاما پروتئوباکتر، اکتینومیسیت‌ها و فرمیکوت‌ها گزارش شده است. جنس‌های غالب *Paenibacillus*، *Bacillus*، *Sphingomonas* و *Actinobacter*، *Pseudomonas* را شامل می‌شود. البته جنس‌های *Citrobacter* و *Chryseobacterium* از طریق روش‌های مستقل از کشت شناسائی گردیده‌اند و از آن جایی که مطالعات مستقل از کشت محدود است لذا احتمال اینکه جنس‌های باکتری بیش تری وجود داشته باشد، هست. البته مشکلاتی در مقایسه غنای باکتری‌ها بین میزبان‌ها و بافت‌های مختلف وجود دارد و نمی‌توان به توصیف روشنی دست یافت (Izumi, 2011).

جهت کاهش خسارت بیمارگرهای گیاهی، کاربرد ریزموجودات، در قیاس با سایر روش‌ها اقتصادی‌تر به نظر می‌رسد در عین حال به پایداری و حفاظت فلور خاک کمک می‌کند. زمانی کنترل زیستی موفق عمل می‌کند که در شرایط متفاوت محیطی، غلظت‌های یونی متفاوت، اسیدیته و دماهای مختلف، فعال باقی بماند. کنترل‌کننده‌های زیستی با تولید ترکیبات بازدارنده رشد، رقابت برای آهن، سمیت‌زدائی و تجزیه فاکتورهای بیماری‌زایی به صورت مستقیم و با القای مقاومت سیستمیک در گیاهان در برابر بیمارگرها، ایجاد رقابت بر سر فضای اکولوژیک و ترکیبات غذایی و اختلال در بقا و تأثیر بر جوانه‌زنی و اسپورزائی بیمارگر به صورت غیرمستقیم در کنترل زیستی بیمارگر نقش دارند. باکتری‌های اندوفیت به کمک مکانیزم‌های مختلفی مانند تولید آنتی‌بیوتیک، سیدروفور و سنتز آنزیم‌های لیتیک قادر به ممانعت از رشد بیمارگرهای قارچی می‌گردند (Lugtenberg and Kamilova, 2009). در راستای اهمیت این موضوع، هدف از انجام این تحقیق، جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت بادمجان، و بررسی توانایی آن‌ها در تولید ترکیبات آنتاگونیست بود تا با بهره‌وری صحیح از این سویه‌ها بتوان از آن‌ها به جای کود و سموم شیمیایی در افزایش کمی و کیفی محصولات بهره‌جست و از مشکلات زیست محیطی کاست.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

در بهار سال ۱۳۹۳، از ریشه‌های سالم گیاه بادمجان (*Solanum melongena* L.) در روستاهای اطراف شهر سنندج با مختصات جغرافیایی (طول جغرافیایی ۴۶/۴۹۱۷۳۷ و عرض جغرافیایی ۳۵/۲۶۴۸۵۱)، نمونه برداری به عمل آمد. نمونه‌ها در کیسه‌های تمیز و مجزا که حاوی مشخصات کد نمونه، محل نمونه برداری و تاریخ نمونه برداری بودند قرار داده شد سپس به آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه کردستان منتقل و تا زمان استفاده در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

جداسازی باکتری‌های اندوفیت از بافت گیاهی

به منظور جداسازی باکتری‌های اندوفیت قطعات مختلفی از ریشه با آب مقطر سترون شسته شدند. پس از خشک کردن با کاغذ صافی، نمونه‌های مورد نظر به قطعات کوچک‌تر خرد گردیدند. سپس توسط هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۴ دقیقه شستشو داده شدند و برای حذف ماده ضد عفونی کننده، مجدداً توسط آب مقطر سترون ۴ تا ۵ بار شستشو گردیدند. برای جداسازی باکتری اندوفیت نمونه‌های گیاهی سترون شده، در هاون سترون حاوی ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون کاملاً له شدند. بعد از ۳۰ دقیقه از سوسپانسیون حاصل، به مقدار ۵۰ میکرولیتر روی چهار محیط کشت مختلف NA^3 ، $NA+S^4$ و LB^4 و KB^5 به کمک میله شیشه‌ای سرکج در تمام سطح پخش گردید. پتری‌ها به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هر روز از کلنی‌های جدید انتخاب و به عنوان جدایه‌های پایه برای آزمایش‌های بعدی در نظر گرفته شد. به منظور اطمینان از سترون شدن، قطعاتی از بافت گیاهی که به روش مذکور ضد عفونی شده بودند در ۵ میلی‌لیتر 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 شیشه‌ای در تمام سطح پخش گردید و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Jasim et al., 2014).

آزمون تولید پروتئاز

این آزمون، به منظور بررسی توانایی باکتری‌های اندوفیت در کنترل زیستی سایر میکروارگانیسم‌های مضر مورد بررسی قرار

-
2. Nutrient agar with Sucrose
 3. Nutrient agar
 4. Lysogeny broth
 5. King B

می‌گیرد، 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، ضد عفونی گردید. جدایه‌های باکتری بعد از کشت به صورت نقطه‌ای، در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تشکیل هاله بی‌رنگ در اطراف کلنی باکتری، نشان از توانائی جدایه‌ها در تولید آنزیم پروتئاز بود (Maurhofer et al., 1995, Abo-Aba et al., 2006).

آزمون تولید سیدروفور

برای بررسی تولید سیدروفور از محیط (CAS^۶) استفاده گردید که از ترکیب چهار محلول زیر بدست می‌آید:

محلول اول: این محلول از اختلاط ۱۰ میلی‌لیتر $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ۱ میلی‌مولار (در محلول ۱۰ میلی‌مولار اسید کلریدریک) با ۵۰ میلی‌لیتر محلول شامل ۶۰ میلی‌گرم CAS تهیه شد. این محلول ارغوانی تیره به آرامی و همراه با تکان‌های پیوسته به ۴۰ میلی‌لیتر محلول آب مقطر شامل ۷۳ میلی‌گرم HDTMA^{V} اضافه شد. محلول بدست آمده جداگانه اتوکلاو و تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد شد.

محلول دوم: ۳۰/۲۴ گرم پپرازین بیس اتان سولفونیک اسید (Pipes) در ۷۵۰ میلی‌لیتر 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 بدست آمده پس از افزودن ۱۵ گرم آگار اتوکلاو گردید سپس تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد شد.

محلول سوم: شامل ۲ گرم گلوکز، ۲ گرم مانیتول، ۴۹۳ میلی‌گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱۱ میلی‌گرم $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱/۱۷ میلی‌گرم $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱/۴ میلی‌گرم H_3BO_3 ، ۰/۰۴ میلی‌گرم $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، ۱/۲ میلی‌گرم $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و ۱ میلی‌گرم $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ در ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر است. این محلول نیز پس از اتوکلاو تا دمای ۵۰ درجه سرد گردید.

محلول چهارم: ۳ گرم کاز آمینواسید در ۲۷ میلی‌لیتر 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 هم‌زدن آرام و بدون ایجاد حباب، محلول اول نیز به آن اضافه گردید و در پلیت ریخته شدند. سپس باکتری‌ها به صورت نقطه‌ای روی محیط کشت داده شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری صورت گرفت. در صورت مشاهده هاله نارنجی رنگ در اطراف کلنی باکتری آزمون تولید سیدروفور برای جدایه‌ها مثبت تلقی شد (Schywan and Neilands, 1987).

آزمون تولید سیانید هیدروژن

برای توانایی تولید سیانید هیدروژن جدایه‌های باکتری جداگانه بر روی پتری کشت گردید. در داخل هر تشتک پتری ۱۰۰

6. Chrome Azurol S

7. Hexadecyl trimethyl ammonium

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 پارافیلیم بسته شد تا از خروج هرگونه متابولیت فرار و گازی از جمله HCN جلوگیری شود. پتری‌ها به صورت وارونه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور به مدت یک هفته قرار داده شد. در صورت تولید HCN توسط باکتری رشد یافته روی سطح محیط‌کشت، تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره تا آجری رنگ دیده می‌شود که نشانه تفاوت در میزان تولید HCN توسط باکتری می‌باشد (Alstrom and Burns, 1989).

شناسایی مولکولی باکتری‌های اندوفیت :

جداسازی DNA کروموزومی باکتری‌ها

باکتری در محیط‌کشت مایع نوترینت براث کشت داده شد و بعد از رشد به میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری منتقل و با سرعت ۳۰۰۰ دور به مدت ۱/۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب بدست آمده پس از نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر، در ۲۰۰ میکرولیترا بافر TE^A حل گردید. نمونه‌ها پس از اضافه نمودن ۸ میکرولیترا لیزوزیم (از محلول پایه ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس ۴۰ میکرولیترا سدیم پرکلرات ۴ مولار، ۲۴ میکرولیترا ۱۰٪ SDS^۱ و ۸ میکرولیترا پروتئیناز K^۱ (از غلظت پایه ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به محلول اضافه و بعد از هم زدن (وارونه کردن) به مدت ۲ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به محلول به دست آمده در مرحله قبل، ۲ حجم اتانول خالص (نگهداری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه یا بیش‌تر در فریزر نگهداری گردید. محلول به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس، اتانول دور ریخته شد و رسوب حاصله با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و مجدداً به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصله چند ثانیه در محیط معمولی اتاق نگهداری شد تا خشک گردد سپس، در ۵۰۰ میکرولیترا بافر TE^A حل گردید. DNA به دست آمده با حجم مساوی ترکیب فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل^{۱۱} (۱:۲۴:۲۵) مخلوط شده و در درجه حرارت معمولی اتاق به صورت وارونه کردن هم زده شد تا کاملاً یکنواخت گردد. سپس به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید تا سه فاز مجزا تشکیل گردید. فاز رویی به میکروتیوب تمیز و سترون منتقل و این مرحله 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

8. Tris-EDTA buffer

9. Sodium dodecyl sulfate

10. Proteinase K

11. Phenol:Chloroform:IsoamylAlcohol

(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^{۱۲} 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 ۱۳۰۰۰ دور سانتیفریوژ 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^{۱۳} از محلول پایه ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به غلظت نهائی ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر) حل گردید (Sambrook and Russell, 2001).

۲-۸-۲ تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراجی

برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد.

الف- اندازه گیری غلظت DNA توسط اسپکتروفوتومتر

قبل از اندازه گیری غلظت DNA نمونه‌ها، دستگاه اسپکتروفوتومتر کالیبره شد. این کار توسط بافر TE یا آب مقطر دوبار سترون در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر صورت گرفت. برای انجام این کار ۴۵ میکرولیتر از بافر TE یا آب مقطر به محفظه ویژه اسپکتوفوتومتر (کو^{۱۴}) اضافه و سپس در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ کالیبره شد. پس از آن ۲ میکرولیتر از نمونه DNA به آن اضافه و میزان جذب نوری (OD^{۱۵}) اندازه گیری شد. در صورتی که نسبت OD/۲۸۰ OD/۲۶۰ حدود ۲-۱/۸ بود، نشان دهنده کیفیت بالای DNA است و DNA از کیفیت مطلوبی برای PCR برخوردار است. نسبت کم تر از ۱/۶ نمایانگر حضور پروتئین و سایر آلودگی‌ها می باشد. نسبت‌های بالاتر از ۱/۸ نشان دهنده وجود اسیدهای نوکلئیک است. نسبت‌های 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 (Weisburg et al., 1991).

ب- تعیین کیفیت DNA توسط ژل آگارز

کیفیت DNA با مشاهده شکل باندها مورد بررسی قرار گرفت. وجود باندهای کاملاً واضح^{۱۶}، و بدون کم ترین کشیدگی حاکی از کیفیت مناسب می باشد. وجود کشیدگی در فاصله بین چاهک و باندها حاکی از آلودگی پروتئینی در نمونه‌ها می باشد. وجود یک باند اضافی در پایین ژل و در فاصله‌ای زیاد از باند اصلی حاکی از وجود RNA در نمونه‌ها است.

-
12. Sodium acetate
 13. Ribonuclease
 14. Cuvette
 15. Optical Density
 16. Sharp

۹-۲ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)^{۱۷}

برای شناسایی جدایه‌ها از تعیین توالی ژن 16S rDNA استفاده شد (Weisburg et al., 1991).

آغازگر^{۱۸}های اختصاصی گونه مورد استفاده در واکنش، در جدول (۱) آمده است.

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن 16S rDNA برگرفته از منبع (Weisburg et al., 1991)

نام آغازگرها	توالی آغازگر	قطعه مورد انتظار
rp1	5-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3	۱/۵Kb
Fd2	5-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3	

۹-۲-۱ تهیه ترکیبات واکنش برای انجام PCR

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، در دستگاه ترمال سایکلر مدل MJ Research ساخت شرکت BioRad کشور آمریکا انجام شد. همه مواد مصرفی توسط شرکت سیناژن تهیه گردید. آزمون در واکنش‌های ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (شرکت سیناکلون)، 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 (Sambrook and Russell, 2001).

Master mix حاوی PCR Reaction buffer (۱۰X)، کلرور منیزیم (MgCl₂)، dNTPs و آنزیم Taq-DNA Polymerase بود.

۹-۲-۲ چرخه حرارتی PCR

قبل از انجام PCR، چرخه‌های حرارتی مختلف برای چند نمونه، آزمایش شدند. در این آزمون برای بدست آوردن بهترین درجه حرارت باند شدن آغازگرها به DNA هدف، محدوده دمایی برای هر آغازگر به صورت گرادینت در نظر گرفته شد (Weisburg et al., 1991). چرخه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای آغازگرهای ژن 16S rDNA در جدول (۲) قابل ملاحظه است.

جدول ۲: چرخه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای آغازگرهای ژن 16S rDNA

تعداد چرخه	نام مرحله	مدت زمان	درجه حرارت
۱ چرخه	واسرشت اولیه ^{۱۹}	۴ دقیقه	۹۵ درجه سانتی‌گراد
۳۵ چرخه	واسرشت ^{۲۰} اتصال ^{۲۱} بسط ^{۲۲}	۱ دقیقه	۹۴ درجه سانتی‌گراد
		۱ دقیقه	۵۱ درجه سانتی‌گراد
		۲ دقیقه	۷۲ درجه سانتی‌گراد

17. Polymerase Chain Reaction

18. Primer

19. Initial denaturation

20. Denaturation

21. Annealing

22. Extention

۱ چرخه	بسط نهائی ^{۲۳}	۷ دقیقه	۷۲ درجه سانتی‌گراد
--------	-------------------------	---------	--------------------

۲-۹-۳ الکتروفورز محصولات PCR

الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد انجام گرفت. برای تهیه ژل، ۰/۶ گرم آگارز به ۵۰ میلی‌لیتر بافر TAE^{۲۴} اضافه و مخلوط شد سپس در دستگاه گرمادهنده ذوب گردید، پس از پایین آمدن دمای ژل تا حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد در سینی ریخته شد. بعد از بسته شدن ژل، شانه به آرامی از آن خارج و سینی ژل در تانک الکتروفورز حاوی بافر TAE ۱x قرار گرفت سپس ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر 6x Loading buffer (۰/۲۵ گرم زایلن سیانول^{۲۵}، ۰/۲۵ گرم برم فنل بلو، ۳۰ میلی‌لیتر گلیسرول و ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر) درون چاهک‌ها ریخته شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه انجام گرفت (Sambrook and Russell, 2001).

۲-۹-۴ رنگ آمیزی ژل و مشاهده باندها

پس از اتمام الکتروفورز، ژل توسط اتیدیوم بروماید^{۲۶} با غلظت نهائی (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید. جهت حذف رنگ اضافه ژل توسط آب مقطر شسته شد و باندها توسط دستگاه White/ ultra violet transilluminator مدل Uvitek کشور انگلستان مشاهده و با استفاده از دستگاه gel documentation عکس‌برداری شد.

۲-۱۰ آنالیز داده‌های 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 توالی‌های 16S rDNA (۱۳۶۷ باز) انجام پذیرفت (Hall, 1999)، سپس توالی بدست آمده در سایت NCBI، با سایر توالی‌های سویه‌های استاندارد موجود در سایت NCBI با استفاده از نرم افزار Standard Nucleotide BLAST مقایسه گردید (Altschul et al., 1990).

۲-۱۱ آنالیزهای فیلوژنتیکی

هم‌ردیف کردن توالی‌ها با توالی‌های سویه‌های تیپ، با استفاده از نرم افزار Clustalx v.1.8 (Thompson et al., 1997) انجام

23. Final extention
 24. Tris- Acetate EDTA
 25. XylenCyanol
 26. Ethidium bromide

شد. آنالیزهای فیلوژنتیکی به روش NJ²⁷ به کمک نرم‌افزار PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2002) انجام شد. درخت حاصل از آنالیزهای فیلوژنتیکی به وسیله نرم‌افزار Tree View (Page, 1996) مشاهده شد. روش NJ با تصحیح دو پارامتری و ۱۰۰ تکرار²⁸ انجام گردید (Kimura, 1980).

نتایج

تمام سویه‌ها از نظر توانایی تولید آنزیم پروتئاز مثبت بودند، از نظر تولید هیدروژن سیانید تنها eg5 این توانایی را داشت و از نظر تولید سیدروفور، eg2 و eg4 دارای این توانایی بودند که در جدول ۳ قابل ملاحظه است.

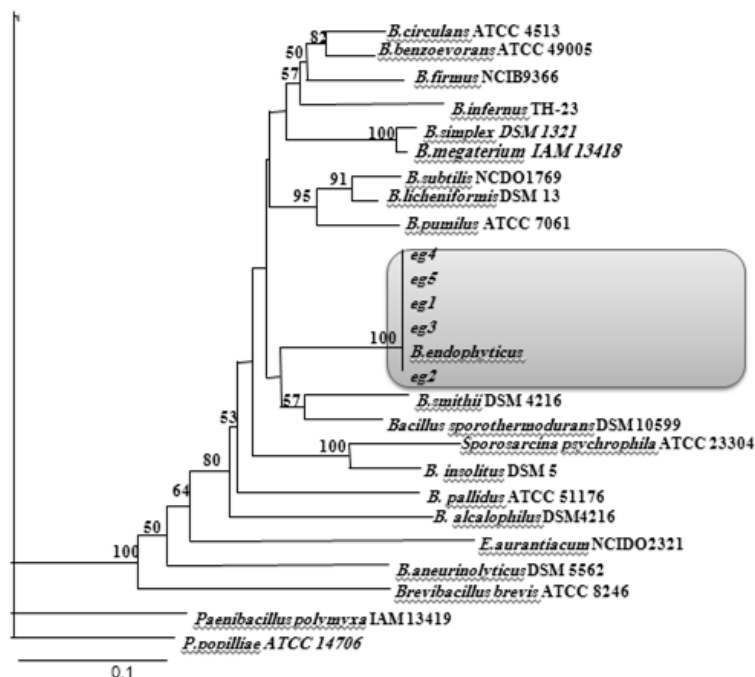
جدول ۳: نتایج آزمون‌های بازدارندگی سویه‌ها

نام سویه	آزمون پروتئاز	توانایی تولید هیدروژن سیانید	توانایی تولید سیدروفور
eg1	+	-	-
eg2	+	-	+
eg3	+	-	-
eg4	+	-	+
eg5	+	+	-

در این تحقیق بخش‌های ابتدائی و انتهائی که در بعضی از توالی‌ها وجود نداشتند، از آنالیزها حذف گردیدند. آنالیزها با روش NJ انجام شد. روش NJ جایگزینی نوکلئوتیدی K₂P انجام شد. براساس نتایج مطالعات مولکولی، سویه‌های eg1، eg2، eg3، eg4 و eg5 با بوت استرپ ۱۰۰ با *Bacillus endophyticus* در یک گروه قرار گرفتند. برای رسم درخت فیلوژنتیکی از ۲۱ گونه متعلق به این جنس استفاده شد. مقادیر بوت استرپ روی شاخه‌ها در شکل ۱ قابل ملاحظه است.

27. Neighbor- Joining

28. Boot strap



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی حاصل از توالی بخشی از ژن 16S rDNA مربوط به گونه‌های جنس *Bacillus*. مقادیر بوت استرپ مربوط به آنالیز Neighbour-Joining روی شاخه‌ها نشان داده شده است. گونه *Paenibacillus polymyxa* و *Paenibacillus popilliae* به عنوان فرد برون گروه انتخاب شد.

بحث

باکتری‌های اندوفیت با حفظ بقای خود در گیاه میزبان معمولاً نه تنها زیانی به میزبان نمی‌رسانند بلکه با کمک سازوکارهای مختلف به طور مستقیم و غیرمستقیم سبب افزایش رشد گیاهان می‌گردند (Mantelin and Touraine, 2004, Luna et al., 2002). تحریک غیرمستقیم رشد گیاه زمانی اتفاق می‌افتد که باکتری، اثرات زیان‌آور یک یا چند بیمارگر گیاهی را خنثی کند که این امر از دو راه میسر می‌گردد. در یک روش باکتری با ترشح سیدروفور (Rasolisedghiyani et al., 2005)، تولید سیانید هیدروژن (Bagnasco et al., 1998)، ترشح آنزیم‌های برون‌سلولی مانند کیتیناز، بتا-یک و سه گلوکوناز، پروتئاز و لیپاز (Nagarajkumar et al., 2004) فعالیت عامل بیماری را کاهش می‌دهد یا آن را متوقف می‌سازد. در روش دیگر باکتری سبب فعال شدن مکانیسم مقاومت سیستمیک القایی در گیاه می‌گردد (Bakker et al., 2003) در این زمینه می‌توان به سیدروفورها، لیپوپلی‌ساکاریدها و اسید سالیسیلیک اشاره نمود. سیدروفور علاوه بر اثر غیرمستقیم، می‌تواند 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 کلات‌کننده برای حل و انتقال آهن غیرآلی (معدنی) وابسته است. بیش‌ترین و متنوع‌ترین کلات‌های بیوسنتزی، سیدروفورهای میکروبی و به نسبت کم‌تر فیتوسیدروفورهای تولید شده به وسیله گرامینه‌ها می‌باشند. سیدروفورها ترکیباتی با وزن مولکولی کم (کم‌تر از ۱۰۰۰ دالتون) دارای میل ترکیبی بالا با آهن سه ظرفیتی می‌باشند که توسط باکتری‌های مختلف برای حل کردن آهن سه

ظرفیتی در محیط خارج سلولی ترشح می‌شوند. *Bacillus* یکی از جنس‌های مطرح اندوفیتی است که گونه‌های مختلف آن به عنوان افزایش‌دهنده رشد در ذرت، درخت نوتل، کاج و نراد شناخته و معرفی گردیده است (احمد زاده، ۱۳۹۲). در این مطالعه براساس آزمون‌های آنتاگونیستی برای ۱۵ باکتری اندوفیت در ریشه بادمجان انجام پذیرفت و ۵ جدایه که حداقل در یکی از آزمون‌ها خاصیت آنتاگونیستی را نشان داده بودند، برای مطالعات مولکولی و شناسایی با استفاده از آغازگرهای توالی ژن S rDNA ۱۶ انتخاب شدند که طبق نتایج با بوت استرپ ۱۰۰ درصد با باکتری *B. endophyticus* در یک گروه فیلوژنتیکی قرار گرفتند. (Kumar et al., 2012) گزارش کردند که باکتری *Bacillus* sp. BPR7 قادر به تولید سیانید هیدروژن می‌باشد. در این پژوهش آن‌ها دریافتند که سویه‌های مذکور علاوه بر تولید سیانید هیدروژن، قادر به حل فسفات، تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی و فعالیت آنتاگونیستی علیه قارچ‌های *S. sclerotiorum*, *F. solani*, *F. oxysporum* و *M. phaseolina* نشان دادند. (Amaresan et al., 2012) نیز بیان داشتند که در مطالعه‌ی آن‌ها هیچ یک از سویه‌های *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus circulans* و *Bacillus licheniformis* نگردیده‌اند. در این مطالعه تنها سویه eg5 دارای این توانایی بود این در حالی است که بقیه فاقد این توانایی تشخیص داده شدند. (Szilagyi-Zecchin et al., 2014) گزارش نمودند که در مطالعه آن‌ها *Bacillus* قادر به تولید سیدروفور می‌باشد. در مطالعات دیگر محققان این توانایی را در گونه‌های *Bacillus pumilus* گزارش شده است. (Amaresan et al., 2012). در این مطالعه هم eg 2 و eg 4 از این نظر مثبت ارزیابی گردید.

در تحقیقی در همین رابطه، علاوه بر بررسی نقش باکتری‌های اندوفیت خرما (*Paenibacillus xylanexedens* و *Enterobacter cloace*) در تولید آنزیم ۱-آمینوسیکلوپروپان ۱-کربوکسیلیک اسید دی‌آمیناز، تولید هورمون‌های محرک رشد، توانایی کلات نمودن آهن، حل فسفات و پتاسیم، تولید آمونیاک مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که باکتری مذکور قادر به تولید آنزیم آمینوسیکلوپروپان ۱-کربوکسیلیک دی‌آمیناز و هورمون اندول استیک اسید بودند که این امر به جذب مواد غذایی از ریشه کمک می‌نماید (Yaish et al., 2015).

(Szilagyi-Zecchin et al., 2014) سویه *Bacillus pumilus* را به عنوان باکتری با قابلیت تولید آنزیم‌های لیتیک معرفی نمودند که نتایج آن‌ها با پژوهش حاضر هم خوانی داشت. تمام سویه‌های مورد بررسی قادر به تولید آنزیم پروتئاز گردیدند. از تحقیق حاضر چنین مشخص می‌شود که باکتری‌های اندوفیت با توانایی تولید این گروه از آنتاگونیست‌ها، توان بالقوه‌ای در کنترل بیمارگرها خواهند داشت، که چنین امید می‌رود با شناسایی هر چه بیشتر این گروه از میکروارگانیسم‌ها در گیاهان مختلف و انجام مطالعات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بتوان از آن‌ها به عنوان جایگزینی برای سموم موجود در بازار بهره جست.

سیاسگزاری

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.

منابع

احمدزاده، م. (۱۳۹۲). کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران، ۴۷۴ صفحه.

Abo-Aba, S.E.M., Solinum, E.A.M., Nivien, A.A. (2006) Enhanced production of extra cellular alkaline protease in *Bacillus circulance* through plasmid transfer. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2: 526-530.

Alstrom, S., Burns, R.G. (1989) Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. Biology and Fertility of Soils, 7: 232- 238.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Mayers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 5: 215: 403-410.

Amaresan, N., Jayakumar, V., Thajuddin, N. (2012) Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with chilli (*Capsicum annuum*) grown in coastal agricultural ecosystem. Indian Journal of Biotechnology, 13: 247-255.

Bagnasco, P., De la fuente, L., Gualtieri, G., Noya, F., Arias, A. (1998) Fluorescent *Pseudomonas* spp. As biocontrol agent against forage legume root pathogenic fungi. Soil Biology and Biochemistry, 30: 1317-1322.

Bakker, P.A.H.M., Ran, L.X., Pieterse, C.M.J., Van loon, L.C. (2003) Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant disease. Canadian Journal of Plant Pathology, 25: 5-9.

Bashan, Y. and Holguin, G. (1998) Proposal for the division of plant growth promoting rhizobacteria in to two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. Soil Biology Biochemistry, 30: 1225-1228.

Hall, T.A. (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98 NT. Nucleic acid symposium series, 41: 95-98.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology, 43: 895-914.

Izumi, H. (2011) Diversity of Endophytic Bacteria in Forest Trees. Pp. 95-105. In: Pirttilä A.M. and Frank A.C (eds). Endophytes of Forest Trees. Springer Netherlands.

Jasim, B., Joseph, A.A., John, C.J., Mathew, J., Radhakrishnan, E.K. (2014) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. Biotechnology, 4: 197-204.

- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. *Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Kobayashi, D.Y., Palumbo, J.D. (2000) Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. Pp. 199-233. In: Bacon CW and White JF (eds). *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, New York.
- Kumar, P., Dubey, R.C., Maheshwari, D.k. (2012) *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, 167: 493-499.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63: 541–556.
- Luna, C.L., Mariano, R.L.R., Souto-Maior, A.M. (2002) Production of a Biocontrol agent for Crucifers Black Rot Disease. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19: 133-140.
- Mantelin, S., Touraine, B. (2004) Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*, 55: 27-34.
- Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D., Defago, G. (1995) Influence of plant species disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced antibiotic production. *Plant Pathology*, 44: 40- 50.
- Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R., Velazhahan, R. (2004) Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice, sheath blight pathogen. *Microbiological Research*, 159: 73-81.
- Page, R.D.M. (1996) Tree view: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Cabios Application Note*, 12: 357-358.
- Rasolisedghiyani, M., Rahimiyan, P., Khavari, K., Malakoti, M.H. (2005) Study of population density and identification of wheat rhizospheric fluorescent *pseudomonas* in different region in Iran. *Journal of Water and Soil Science*, 19: 224-234.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1863P.
- Schulz, B., Boyle, C (2006) What are endophytes? Pp 1–13 In Schulz B, Boyle C and Sieber T.N (eds). *Microbial Root Endophytes Springer-Verlag, Berlin*
- Schywan, B., Neilands, J.B. (1987) Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160: 47-56.
- Stepniewska, Z., Kuzniar, A. (2013) Endophytic microorganisms- promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 9589-9596.
- Strobel, G., Daisy, B. (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67: 491-502.
- Swofford, D.L. (2002) *Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)*. Sunderland, Massachusetts Sinauer Associates.
- Szilagyi-Zecchin, V.J., Ikeda, A.C., Hungria, M., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Glienke, C., Galli-Terasawa, L.V.G. (2014) Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express*, 4: 2-9.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J. Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997) The clustal-x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids*

Research, 15: 4876-4882.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697- 703.

Yaish, M.W., Antony, I. and Glick, B.R. (2015) Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting bacteria from date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) and their potential role in salinity tolerance. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107: 1519-1532.

Phylogenetic characterization endophytic bacteria isolated from egg plant root with antagonistic ability

F. Etmnani*²⁹, A. Etmnani³⁰

Received: 2016.9.20
Accepted: 2017.5.24

Abstract

Endophytic bacteria are able to control plant pathogens by producing antagonistic compounds. This research was conducted to determine antagonistic ability of bacterial endophytes in egg plant (*Solanum melongena* L.). In this research endophytic bacteria were isolated from root of eggplant. Strains were surveyed for siderophore, Hydrogen cyanide and protease tests. 5 isolates were selected for genetic assay. After genomic DNA extraction, 16S rDNA gene was amplified using PCR for precisely bacterial identification. Then, the PCR product was sequenced by BLAST. All isolated bacteria were able to produce protease. Only one strain (eg5) was able to produce cyanide hydrogen. The siderophore test was positive for two strains (eg2 and eg4). Based on the 16S rDNA sequence studies, this bacterium belonged to *Bacillus endophyticus* and indicated 100% similarity to type strain. The endophytic bacteria isolated in this study can be used to promote plant growth. Knowledge about endophytic bacteria- plant interaction can provide effective strategy to develop sustainable agriculture in order to ensure yield improvement without leaving a negative impact on the environment.

Keywords: bacteria, siderophore, eggplant, endophyte.

²⁹, 2. Young Researchers and Elite Club, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran
(Corresponding Author: Faegheh.Etmnani@yahoo.com)