شناسایی آکتینومیست‌های کمپوست قارچ خوراکی دکمه‌ای با استفاده از ژن 16S rRNA

علی پاکدین (۱)، محمد فارسی (۲)، حسن مرعشی (۲)، خلیل ملک زاده (۳) و بنفشه جلال زاده (۳)

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، ۲- اعضای هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی ، دانشگاه فردوسی مشهد، ۳- اعضای گروه پژوهشی زیست فناوری قارچهای صنعتی جهاد دانشگاهی مشهد

چکیده

شناسایی ارگانسیم‌های مفید موجود در کمپوست گام مهمی است که انجام دستورزی های مختلف در جهت افزایش راندمان عملکرد بر وزن کمپوست را در قارچ‌های خوراکی دکمه‌ای امکانپذیر می‌سازد. آکتینومیست‌ها، بویژه گونه‌های گرمادوست، بعنوان اصلی ترین اجزای میکروفلور کمپوست قارچ خوراکی دکمه‌ای شناخته‌شده‌اند. آکتینومیست‌های گرمادوست با استفاده از روش رقیق‌سازی بر روی محیط کشت آگار و انکوبه شدن در دمای ٤٨ درجه سانتی‌گراد جداسازی شدند.. جهت تفکیک ایزوله‌ها، جزء کوچک ژن RNA ریبوزومی (16SrRNA) به طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر شد. با استفاده از آنزیم‌های برشی، ژن 16SrRNA تکثیر شده هر ایزوله، جداگانه هضم و الگوی برشی هر آنزیم با الکتروفورز روی ژل آگارز تعیین گردید. بر اساس نتایج، بیشترین آکتینومیست‌های جداسازی شده از کمپوست قارچ خوراکی دکمه‌ای به جنس‌های *Streptomysis*، *Saccharomonospora*، *Thermomonospora*، *Nocardioides*، *Microbispora* و *Glycomyces* **تعلق داشتند.**

مقدمه

قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید برای رشد بهینه نیازمند مهیا کردن یک محیط رشد انتخابی و با کیفیت عالی می‌باشد تا بتواند با میکروارگانیسمهای دیگر رقابت کند. در حین فرایند تهیه کمپوست میکروارگانیسم‌های گرمادوست معینی شامل آکتینومیست‌ها، قارچهای گرمادوست و باکتری‌های گرمادوست جداسازی و شناسایی شده‌اند. این میکروارگانیسم‌ها یک محیط مطلوب برای رشد میسلیوم قارچ دکمه‌ای تولید می‌کنند و در عین حال سوبسترای نامناسبی برای ارگانیسم‌های رقابت‌کننده بوجود می‌آورند. روش‌های سنتی مورد استفاده برای شناسایی آکتینومیست‌های شاخه‌دار هوازی نیاز به صرف وقت و زمان زیاد داشته و غالباً نیازمند یک سری از تستهای ویژه می‌باشند. شناسایی باکتریایی بر پایه توالی های حفاظت شده دی ان آی ریبوزومی مفیدترین و دقیقترین روش شناسایی می‌باشد. در این بررسی فلور میکروبی کمپوست قارچ دکمه‌ای، با استفاده از تکثیر توالی ژن 16S rRNA مورد شناسایی قرار گرفت.

نمونه‌های کمپوست در مراحل مختلف تهیه کمپوست جمع آوری شدند. نمونه‌های کمپوست در محلول رینگر رقیق شده (۰/۲۵ غلظت) استریل حل شد. از این محلول برای تهیه غلظت‌های سریالی استفاده شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه شده روی سطح پتری دیش‌های حاوی محیط کشت پخش شد پتری دیش‌های در ٤٦ °C انکوبه و برای مدت ۲ هفته به صورت روزانه بررسی شدند. تک کلنی‌های ظاهر شده به محیط کشت جدید منتقل و به صورت مخطط واکشت شدند. DNAی ژنومی باکتری از هر کشت خالص برای بررسی‌های مولکولی جداسازی گردید. از پرایمرهای عمومی fD1 و rP2 برای تکثیر

توالی تقریبا کامل ژن 16S rRNA استفاده شد. سپس قطعه تکثیری توسط آنزیمهای برشی *Mbo*I, *Kpn*I, *Sca*I, *Pst*I, *Hind*III, *Sna*BI, *Sal*I, *Pvu*II, *Age*I, *Sac*I برای تجزیه و تحلیل ژن 16S rRNA هضم شد.

این تحقیق نشان داد که با استفاده از تکثیر ژن محافظت شده 16S rRNA و هضم آن با استفاده از آنزیم‌های برشی مناسب می‌توان برای هر باکتری یک الگوی برشی تهیه نمود. نتایج الگوی برشی نشان داد آکتینومیست‌های جداشده مربوط به جنس‌های استرپتومیسس، ساکارومونوسپورا، ترمومونوسپورا، نوکاردیوایدس، میکروبیسپورا و گلیکومایسس می‌باشند. همچنین بیشترین تعداد متعلق به ایزوله‌های جنس استرپتومایسین بود که دارای نقش مهم و محوری در تجزیه بقایای گیاهی و تولید کمپوست می‌باشند.

منابع

Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16s rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clinical Microbiology Reviews. 17(4): 840-862.

Cook A. E. and Meyers P. R. 2003. Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology., 53: 1907-1915.

Misbah, S., Hassan, H., Yusof, M. Y., Hanifah, Y. A. and AbuBakar, S. 2005. Genomic species identification of Actinobacter of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. Singapore Med. J. 46(9): 461-464.

Abstract

Actinomycetes, Specially the thermopile genus, are known as principle elements of compost micro flora. To identify bacteria isolate existing in compost micro flora, 30 isolates were isolated from compost samples using dilution method. After DNA extraction, the conserved small sub unit of 16s rRNA gene was amplified for all the isolates. The 1500 bp amplified fragment was subjected to enzyme digestion and separated through agaros gel electrophoresis. According to banding pattern, Actinomycetes isolated from compost belonged to the genera *Streptomysis*, *Saccharomonospora*, *Thermomonospora*, *Nocardioides*, *Saccharopolyspora*, *Microbispora*, *Glycomyces.*

بررسی جنین زایی سوماتیکی توسط ریزنمونه برگ در دو رقم انگور بیدانه قرمز و فلیم سیدلس

مریم کریمی (۱)، علی عبادی (۲) و منصور امیدی (۳)
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران، ۲و ۳- دانشیار دانشگاه تهران

چکیده

تولید جنین های سوماتیکی با استفاده از اندام های رویشی به علت فراهم بودن ریز نمونه در طول سال بسار حائز اهمیت می باشد. در این آزمایش از دو رقم بیدانه قرمز و فلیم سیدلس ریز نمونه های برگی گرفته شد. ریز نمونه ها برای تولید کالوس در محیط کشت MS حاوی دو هورمون BAP، 2,4-D و کازئین هیدرولیزات کشت شدند. از دو هورمون IAA و BAP برای تولید جنین های سوماتیکی استفاده گردید. محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر IAA و ۵ میلی گرم در لیتر BAP بیشترین تولید جنین را داشتند. رقم فلیم سیدلس نیز در تولید جنین های سوماتیکی نسبت به رقم بیدانه قرمز بهتر عمل کرد.

مقدمه

انجام برنامه های انتقال ژن روشی جدید برای تولید ارقام جدید با داشتن خصوصیات مطلوب می باشد.در انگور نیز برنامه های انتقال ژن برای کسب خصوصیاتی مانند مقاومت به بیماریها و آفات مد نظر قرار گرفته است. لازمه عملی شدن برنامه های انتقال ژن داشتن بافت هایی می باشد که توانایی پذیرش ژن ها را داشته و در مراحل بعد به گیاهانی کامل تبدیل شوند. جنین های سوماتیکی از جمله بافتهایی می باشند که چنین خصوصیتی را دارند. در انگور برای اولین بار جنین های سوماتیکی با استفاده از کشت تخمدان نارس رقم کابرنت ساوینون(مالینز[3] و سری ناواسان[4] ۱۹۷٦) ممکن گردید. تولید جنین های سوماتیکی از کشت ریز نمونه برگ در ارقام Thompson Seedless و Chardonnay نیز گزارش شده است(۵).

مواد و روش‌ها

برگ های جوان رشد یافته در انتهای شاخساره های سال جاری بوته های انگور ارقام بیدانه قرمز و فلیم سیدلس در بهار ۸٦ جمع آوری شد. اندازه برگ ها حدود ۵-۲ سانتیمتر بوده و فاقد علائم بیماری یا آفت بودند. محلول ۰/۸ ٪ هیپوکلریت سدیم به همراه چند قطره توین ۲۰ به مدت ۱۰ دقیقه برای ضد عفونی برگ ها استفاده شد. از محلول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک جنتامایسین به مدت ۳۰ ثانیه برای کنترل آلودگی های باکتریایی استفاده شد. ریز نمونه های برگ در محیط MS با تیمار هورمونی 2,4-D با غلظت ٤/۵ میکرومولار و BAP با غلظت ۱/۱ میکرومولار، ۱ گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات، ۲۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۷ گرم در لیتر آگار با pH= ۵/۸ کشت شدند. در ریز نمونه های برگی علائم متورم شدن بافت بعد از ۱۰ روز قابل مشاهده بود و در هفته سوم کالوس ها بر روی سطح ریز نمونه ها مشاهده شدند. برای تحریک جنین زایی، این کالوس ها به محیط MS با هورمون های IAA به میزان ۱،۲ و ۳/۵ میلی گرم در لیتر و BAP به میزان۲، ۵ و۱۰ میلی گرم در لیتر منتقل شدند. شرایط نگهداری برای کالوس ها در این محیط تاریکی مطلق و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد برای مدت یک

[3] Mullins
[4] serinivasan