*۴- کارشناس ارشد اصلاح نباتات*

Habibibahareh@yahoo.com

یونجه(Medicago *sativa* ) ملکه گیاهان علوفه ای است که بعلت پروتیئن زیاد و خوش خوراکی،شاید از مهمترین و بهترین علوفه ها باشد . تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مختلف نقش کلیدی در برنامه های به نژادی ایفا می کند. یکی از مهم ترین شاخص ها جهت انتخاب، والدین است. در این تحقیق، الگوی پروتئینی ۱۸ ژنوتیپ ی یونجه دائمی (Medicago sativa) با استفاده از پروتئین‌های محلول مورد ارزیابی قرار گرفت. گرفت. عصاره‌گیری از ۰/۳ گرم برگ هر ژنوتیپ با روش لاملی انجام شد و با استفاده از ژل پلی اکریل آمید تنوع باندهای پروتئینی در بین ژنوتیپ‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ تعداد باندهای پروتئینی، محل قرار گرفتن روی ژل، تراکم و شدت باندها اختلاف وجود داشت. تعداد ۲۴ باند در جمعیت مطالعه شده مشاهده گردید که بیشترین تعداد باندها مربوط به جمعیت ۵ و کمترین تعداد مربوط به جمعیت های ۱۲ و ۱۴ بود. تجزیه خوشه ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد انجام شد و جمعیت های مورد بررسی به ۳ کلاستر تقسیم شدند. سپس با استفاده از ماتریس تشابه تجزیه مختصات انجام گرفت که نتایج تجزیه کلاستر را تائید نمود. ماتریس تشابه بر مبنای ضرایب جاکارد، نشان داد که بیشترین شباهت و کمترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیت های (۱۷و۱۶) ، (۹و۶) و (۷ و ۳) با ضریب تشابه یک و کمترین تشابه و بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت های (۱۴ و ۲)، (۱۲و ۳) و(۱۲و ۷)با ضریب تشابه ۲۳/. بود.

واژگان کلیدی:یونجه، تنوع ژنتیکی، پروتئین، SDS-PAGE

## جداسازی باکتری‌های گرمادوست سلولولیتیک از چشمه آب گرم دیگ رستم در ایران

ساره حجی آبادی، مریم مقدم متین، منصور مشرقی، احمدرضا بهرامی، کیارش قزوینی

*دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد*

*دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد*

*دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد*

*دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد*

*استادیار گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد*

*Sa_hajiabadi@yahoo.com*

سلولز یکی از اجزای ساختاری اصلی در ضایعات لیگنوسلولزی است که قابلیت تبدیل به اتانول را به کمک آنزیم سلولاز دارد. سوخت زیستی مشتق شده از توده زیستی، تجدیدپذیر، ارزان و تمیز می‌باشد. بعلاوه سلولازها در صنایع مختلف کاربرد فراوانی دارند. سلولازها توسط طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل قارچ‌ها و باکتری‌ها طی رشد روی مواد سلولزی تولید می‌شوند. تنوع وسیع باکتری‌ها در محیط اجازه‌ی غربالگری باکتری‌ها با سلولازهای کارا برای کمک به حل چالش‌های تولید سوخت زیستی را می‌دهد. هدف این مطالعه جداسازی باکتری‌های گرمادوست تجزیه کننده‌ی سلولز از چشمه‌های آب گرم است. نمونه گیری از آب و خاک چشمه آب گرم دیگ رستم انجام و غنی سازی باکتری‌ها در محیط کشت حاوی سلولز به عنوان تنها منبع کربن انجام گردید. نمونه‌ها در شرایط هوازی و بیهوازی در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از واکشت‌های مکرر در محیط مایع جهت اطمینان یافتن از مصرف سلولز به عنوان تنها منبع کربن، جداسازی کلنی‌های خالص در محیط جامد دارای سلولز انجام و شناسایی مقدماتی کلنی‌های باکتریایی مانند خصوصیات ریخت شناسی، رنگ آمیزی گرم، تاژک، اسپور و تعدادی از تست‌های بیوشیمیایی انجام شد. باکتری‌های حاصل همچنین قادر به رشد بر روی محیط سلوبیوز بودند که نشان دهنده‌ی تولید بتاگلوکوزیداز به عنوان یکی از آنزیم‌های سیستم سلولاز است. به این ترتیب ۴ ایزوله CDB1، CDB2، CDB3 و CDB4 با توجه به خصوصیات ریخت شناسی، فیزیولوژی و ویژگی‌های بیوشیمیایی در شرایط هوازی و بیهوازی جداسازی شد و آنالیز ژن 16S

rDNA این باکتری‌ها نیز انجام گردید.

واژگان کلیدی:باکتری‌های تجزیه کننده سلولز، سلولاز، 16S rDNA

## معرفی سه آنتاگونیست موثر Pseudomonas tolaasii

## عامل بیماری لکه قهوه ای قارچ خوراکی

شادی تجلی پور، نادر حسن زاده، اصغر حیدری، حسین خباز جلفایی و ابوالقاسم قاسمی

*دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد تهران علوم و تحقیقات*

*دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد تهران علوم و تحقیقات*

*استادیار موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور*

*مربی پژوهشی موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور*

*مربی پژوهشی موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور*

*sh_tajalli_pour@yahoo.com*

جهت کنترل بیولوژیک عامل بیماری باکتریایی لکه قهوه‌ای (P. tolaasii)، ۴۰ جدایه باکتری غیربیماریزای همراه قارچ خوراکی تکمه‌ای ( Agaricus bisporus ) جداسازی و پتانسیل آنتاگونیستی آنها علیه باکتری عامل بیماری تحت شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی ابتدا بر اساس آزمون آنتی‌بیوز و هاله بازدارندگی ۳۰ جدایه انتخاب گردید، سپس توان بازدارندگی جدایه‌ها در آزمون ایجاد لکه قهوه‌ای روی بلوک‌های قارچ خوراکی تکمه‌ای مورد سنجش قرار گرفت. بلوک‌ها در اندازه‌های ۲/۵×۲ سانتی متر برش داده شدند. سپس سطح هر بلوک، با سوسپانسیون مخلوط باکتری آنتاگونیست و بیمارگر به ترتیب در غلظت‌های تقریبی $10^8$ cfu/ml و $10^6$ cfu/ml و با نسبت ۱:۳ (آنتاگونیست: بیمارگر) تیمار شد. برای هر تیمار ۴ تکرار درنظر گرفته شد و همه بلوک‌ها در شرایط رطوبتی ۹۵ درصد و دمای $25^0$ C نگهداری شدند. نتایج پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت یادداشت برداری شد. آنتاگونیست‌ها به تناسب قدرت نسبی بازدارندگی و کاهش آلودگی در حد متوسط، ضعیف و بدون علایم بیماری در سه گروه مجزا قرار گرفتند. از گروه آنتاگونیست‌های برتر، دو گونه باکتری P. reactans (جدایه A2) و P. fluorescens (جدایهA3) و Bacillus sp. (جدایه B1) بر پایه صفات فنوتیپی و ژنوتیپی مورد شناسایی قرار گرفت. DNA ژنومی هر سه باکتری استخراج و ژن 16SrRNA جدایه B1 با استفاده از جفت آغازگرهای RP1/FD2 و ژن rpoB جدایه‌های A2 و A3 با استفاده از جفت آغازگرهای LAPS/LAPS27 تکثیر شد. محصول PCR جدایه A2 تعیین توالی و نتایج بدست آمده تأییدی بر تشخیص این باکتری‌ها بر اساس صفات فنوتیپی بود.

واژگان کلیدی:کنترل بیولوژیک، لکه قهوه ای، آنتاگونیست، بیمارگر، Pseudomonas tolaasii

## اثرات تنش سرما روی ویژگی‌های آناتومیکی برگ دو ژنوتیپ گیاه برنج

احمد آقایی[1*]، فاطمه زرین کمر[2]، حسن زارع مایوان[2]، فواد مرادی[3]، نسا آلبوغبیش[2]

*گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران*

*گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران*

# جداسازی باکتری‌های گرمادوست سلولولیتیک از چشمه آب گرم دیگ رستم در ایران

ساره حجی آبادی، مریم مقدم متین، منصور مشرقی، احمدرضا بهرامی، کیارش قزوینی

*دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد[1]**
*گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد[2]*
*گروه پژوهشی سلولی مولکولی، پژوهشکده‌ی فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد[3]*
*گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد[4]*

Sa_hajiabadi@yahoo.com

سلولز یکی از اجزای ساختاری اصلی در ضایعات لیگنوسلولزی است که قابلیت تبدیل به اتانول را به کمک آنزیم سلولاز دارد. سوخت زیستی مشتق شده از توده زیستی، تجدیدپذیر، ارزان و تمیز می‌باشد. بعلاوه سلولازها در صنایع مختلف کاربرد فراوانی دارند. سلولازها توسط طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل قارچ‌ها و باکتری‌ها طی رشد روی مواد سلولزی تولید می‌شوند.
تنوع وسیع باکتری‌ها در محیط اجازه‌ی غربالگری باکتری‌ها با سلولازهای کارا برای کمک به حل چالش‌های تولید سوخت زیستی را می‌دهد. هدف این مطالعه جداسازی باکتری‌های گرمادوست تجزیه کننده‌ی سلولز از چشمه‌های آب گرم است.
نمونه گیری از آب و خاک چشمه آب گرم دیگ رستم انجام و غنی سازی باکتری‌ها در محیط کشت حاوی سلولز به عنوان تنها منبع کربن انجام گردید. نمونه-ها در شرایط هوازی و بیهوازی در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. جداسازی کلنی‌های خالص در محیط جامد دارای سلولز انجام و شناسایی مقدماتی کلنی‌های باکتریایی مانند خصوصیات ریخت شناسی، رنگ آمیزی گرم، تاژک، اسپور و تعدادی از تست‌های بیوشیمیایی انجام شد. باکتری‌های حاصل همچنین قادر به رشد بر روی محیط سلوبیوز بودند که نشان دهنده‌ی تولید بتاگلوکوزیداز به عنوان یکی از آنزیم‌های سیستم سلولاز است.
به این ترتیب ۴ ایزوله CDB1، CDB2، CDB3 و CDB4 با توجه به خصوصیات ریخت شناسی، فیزیولوژی و ویژگی‌های بیوشیمیایی در شرایط هوازی و بیهوازی جداسازی شد و آنالیز ژن 16S rDNA این باکتری‌ها نیز انجام گردید.

**واژگان کلیدی:** باکتری‌های تجزیه کننده سلولز، سلولاز، 16S rDNA

## مقدمه

حیات روی زمین بستگی به فتوسنتز دارد که منجر به تولید توده‌ی زیستی گیاهی دارای سلولز به عنوان جزء اصلی می‌شود. توده‌ی زیستی همیشه یک منبع مهم انرژی برای بشر از زمان‌های قدیم به شمار می‌رفته است(۶).کاربرد توده‌ی زیستی به عنوان یک منبع انرژی تجدید پذیر و نسبتاً مساعد محیطی بسیار جالب توجه است و مواد سلولزی خصوصاً در این زمینه به دلیل قیمت نسبتاً پایین و مقدار زیاد، اهمیت فراوانی دارند(۴و ۵). مواد لیگنوسلولزی در ۴ گروه باقیمانده‌های جنگل، ضایعات جامد شهری، ضایعات کاغذ و پسماندهای کشاورزی طبقه بندی می‌شوند(۱).
همراه با تحقیقات اساسی بر روی سلولاز در طی سال‌ها، مطالعات کاربردی آن‌ها با یک سرعت فوق‌العاده گسترش یافته است. بیوتکنولوژی سلولاز در اوایل دهه‌ی ۱۹۸۰ ابتدا در غذای حیوانات شروع و با کاربردهای غذایی دنبال شد(۸). بعدا آنها در صنایع مختلفی همچون نساجی، رختشویی، کاغذ و خمیر کاغذ و کشاورزی استفاده شدند.(۳).
سلولاز به دلیل کاربرد فراوان در صنایع مختلف سومین آنزیم فراوان صنعتی در سراسر جهان است و اگر اتانول، بوتانول یا محصولات تخمیری قندها از توده‌ی زیستی تولید شوند، فراوانترین آنزیم صنعتی خواهد شد(۹).
باکتری‌ها با پتانسیل تولید سلولاز به طور وسیعی در طبیعت توزیع شده‌اند و در طی سال‌ها باکتری‌های تولیدکننده‌ی سلولاز از منابع مختلف مثل توده‌ی کمپوست، مواد گیاهی در حال تجزیه، ضایعات جنگل و کشاورزی، مدفوع نشخوارکنندگان ، خاک و مواد آلی و محیط‌های سخت مثل دریاچه‌های آب گرم بدست آمده‌اند(۲).

## مواد و روش‌ها

نمونه برداری تحت شرایط استریل از آب و گل ولای چشمه‌ی دیگ رستم از دو دمای ۵۱ و ۷۳ درجه‌ی سانتیگراد انجام شد.

محیط کشت استفاده شده BM7 بوده که شامل 1.5 g/L دی هیدروژن پتاسیم فسفات، 2.9 g/L دی پتاسیم هیدروژن فسفات، 2.1 g/L اوره، 6.1 g/L عصاره‌ی مخمر، 6.1 g/L سیتئین هیدروکلراید ، 0.5 g/L منیزیم کلرید ۶ آبه، 0.0075 mg/L کلسیم کلرید دو آبه، ٪۱ سلولز میکروبلورین و 0.5 mg/L رزازورین و با pH نهایی ۷ بود(۷).

پس از تلقیح نمونه‌های آب در لوله‌های حاوی کشت مایع، لوله‌ها در جار بیهوازی محتوی گاز هیدروژن و در شرایط هوازی در دمای ۶۰ درجه قرار داده شدند.

پس از آن ۵ مرتبه واکشت در فواصل ۳ روز در محیط مایع برای اطمینان از مصرف سلولز به عنوان تنها منبع کربن انجام شد. سپس از هر کشت مایع روی پلیت حاوی محیط BM7 با ٪۱.۵ آگار کشت داده شده و از هر کلنی مجدداً در محیط مایع تلقیح و پس از ۳ روز بر روی محیط حاوی ٪۰.۵ سلوبیوز کشت شد.

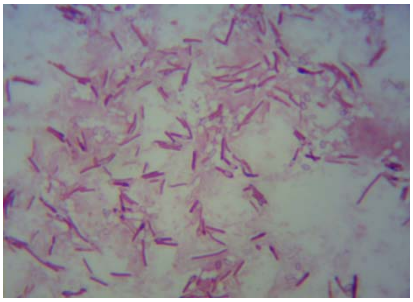
هم زمان با کشت بیهوازی، کشت هوازی نیز در دمای ۶۰ درجه انجام شد. رنگ آمیزی گرم، تست های SIM، اسکولین، کاغذ صافی و قرمز کنگو نیز بر روی کلنی‌های حاصل انجام گردید.

در مرحله بعد استخراج DNA باکتری های حاصل انجام و PCR این نمونه ها با پرایمرهای عمومی باکتری ها برای تکثیر ژن 16s rDNA صورت گرفته و محصولات PCR تعیین توالی شدند.

## نتایج و بحث

در هر مرحله از کشت رنگ آمیزی گرم انجام شد و فیزیولوژی نمونه های بیهوازی با *Clostridium thermocellum* مقایسه گردید.

مشخص شد که باکتری‌های حاصل در رنگ آمیزی، گرم منفی و غیر متحرک بوده و قادر به تشکیل اسپور و مصرف اسکولین و تشکیل هاله در رنگ آمیزی قرمز کنگو بودند. شناسایی دقیق این باکتری ها با تعیین توالی ژن 16s rDNA قابل انجام است. به این ترتیب ۴ ایزوله CDB1، CDB2، CDB3 و CDB4 با توجه به خصوصیات ریخت شناسی و تست های بیوشیمیایی جداسازی شدند.



شکل ۱: باکتری های حاصل از کشت بیهوازی و تشکیل اسپور

شکل ۲: تست مثبت اسکولین

## تقدیر و تشکر

از همه عزیزانی که در تمامی مراحل من را یاری نمودند کمال سپاس و تشکر را دارم.

## منابع

1. Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. Energy Conversion and Management. 52: 858–875
2. Doi, R., 2008. Cellulases of mesophilic microorganisms: cellulosome and nocellulosome producers. Annals of the New York Academy of Sciences. *1125*: 267-279
3. Kuhad, R. C., Gupta, R. &Singh, A., 2011. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. Enzyme Research: 1-10
4. Lynd, L., Weimer. P., WH, Z. &Pretorius, I., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiol Mol Biol Rev. 66: 506-577
5. Maki, M., Leung, K. T. &Qin, W., 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. International Journal of Biological Sciences *5*: 500-516
6. Putun, A., Ozcan, A., Gercel H. &Putun, E. (2001). Production of biocrudes from biomass in a fixed bed tubular reactor; product yields and compositions. Fuel 80: 1371–1378
7. Tachaapaikoon, C., Kosugi, A., Pason, P., Waeonukul, R., Ratanakhanokchai, K., Kyu, K. L., Arai, T., Murata, T. &Mori, Y., 2011. Isolation and characterization of a new cellulosome-producing Clostridium thermocellum strain. Biodegradation

8. Voragen, A., Heutink, R. &Pilnik, W. (1980). Solubilization of apple cell walls with polysaccharide degrading enzymes. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2: 452-468
9. Wilson, D. B., 2009. Cellulases and biofuels. Current Opinion in Biotechnology. 20:295-299.