مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه

Afsi_1364@yahoo.com

سویا دارای تنوع ژنتیکی محدود می‌باشد و ارقام اصلاح شده جدید آن نیز اغلب از روش‌هایی بدست می‌آیند که موجب کاهش مقدار تنوع ژنتیکی بین آنها می شود. در این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین ۱۱ ژنوتیپ مختلف سویا از نشانگر ISSR استفاده شد. جهت استخراج DNA ژنومی از روش دلاپورتا استفاده گردید و کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل ۱% و رنگ آمیزی با اتیدیم برماید بررسی شد. سپس DNA استخراج شده توسط ۵ پرایمر ISSR تکثیر شد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها بر اساس صفات مورد مطالعه آنها را در ۳ کلاس قرار داد. کمترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های ۲ و۳ با میزان تشابه ۰/۸۵ و بیشترین فاصله بین ژنوتیپ‌های ۱ و ۶ با میزان تشابه۰/۳۰ بود، بنابراین نتایج حاصل از ماتریس تشابه ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از روش دایس نشان داد که فاصله ژنتیکی از ۰/۳۰ تا ۰/۸۵ متغیر بوده است، همچنین ضریب همبستگی کوفنتیک r =۰/۷۶ نشان داد که دندروگرام توجیه مناسبی از همبستگی می‌باشد. . نتایج حاصل از محتوای چند شکلی (PIC) نشان داد که بالاترین مقدار PIC مربوط به IS1 با ۰/۴۰ بود که نشان دهنده کارایی بالای این پرایمر در این آزمایش می‌باشد، IS13 با ۰/۱۷ دارای کمترین مقدار PIC می‌باشد همچنین میانگین PIC در این آزمایش برابر ۰/۲۵ می‌باشد.

سویا، تنوع ژنتیکی، ISSR

بررسی قارچ‌های مولد آنزیم CBHI از جنگل‌های ایران به روش مولکولی

نسیم نجارزاده، احمدرضا بهرامی، منصور مشرقی، مریم مقدم متین، حمید روحانی

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

دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

NasimNajjarzadeh@gmail.com

سلولز ترکیب اصلی بیومس گیاهی است که سالانه در حجم بسیار زیادی در سرتاسر جهان تولید می‌شود. قارچ‌ها مهمترین میکروارگانیسم‌ها در بازیافت این پلیمر به شمار می‌روند. از سه گروه آنزیم سلولازی، اگزوگلوکونازها (سلوبوهیدرولازها) کلیدی‌ترین آنزیم سلولازی و CBHI مهمترین سلوبیوهیدرولاز در روند تخریب سلولز می‌باشد. در این مطالعه از روش استخراج مستقیم DNA از خاک جنگل‌های ایران استفاده شد تا بدون نیاز به روش‌های وابسته به کشت که کارایی پایینی در رشد تمام قارچ‌ها دارند بتوان به محتوی ژنتیکی میکروارگانیسم‌های قابل کشت و غیرقابل کشت خاک دسترسی پیدا کرد. برای اطمینان از وجود DNA قارچی در رسوب حاصل، پرایمری که چهار گروه اصلی قارچ‌ها را شناسایی می‌کند مورد استفاده قرار گرفت. سپس پرایمر دژنره مخصوص cbhI به کار برده شد تا این ژن از میکروارگانیسم‌های خاک‌زی جداسازی شود. در نهایت ضمن این‌که این ژن‌ها به عنوان بخشی از ذخایر ژنتیکی خاک‌های ایران گزارش می‌شوند، با مقایسه‌ی آن‌ها با توالی‌های ثبت شده در GeneBank گونه‌ی آن در صورت امکان شناسایی و به عنوان قارچ حاوی ژن مورد نظر در خاک‌های ایران اعلام می‌گردند. تاکنون با این روش، DNA موجود در ۵ ناحیه از جنگل‌های ایران استخراج شده و پس از حصول نتیجه با پرایمر 18s rDNA، باندهای متعددی از خاک سه ناحیه به دست آمد که نتایج آن در این گزارش آورده خواهد شد.

جنگل‌های ایران، CBHI، قارچ

بررسی خصوصیات فنوتیپی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های باکتری عامل پوسیدگی نرم و ساق سیاه سیب‌زمینی در استان گلستان

معصومه ممشلی، سعید نصراله نژاد، حشمت اله رحیمیان، میثم تقی نسب

دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دانشیار گره گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مربی گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Masume.mamashli@gmail.com

گیاه سیب‌زمینی به عنوان یک گیاه صنعتی و پردرآمد به صورت جهانی کشت می‌شود و در کشور ما نیز در دهه گذشته تحول شگرفی داشته است. پکتوباکتریوم‌ها یا اروینیاهای عامل پوسیدگی نرم گروه مهمی از باکتری‌های بیماریزای گیاهی هستند که طیف وسیعی از آنها سبب خسارت به سیب‌زمینی می‌شوند. شناسایی دقیق عامل بیماری و بررسی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی باکتری‌ها، برای اعمال روشهای کنترلی، ضروری است. بدین منظور طی سال زراعی ۹۰-۸۹ از مزارع شهرهای مختلف استان گلستان نمونه برداری انجام گردید، و ۱۸ جدایه مورد بررسی قرار گرفتند. شناسایی جدایه‌ها با آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک انجام گرفت. به منظور ارزیابی دامنه تنوع ژنتیکی جدایه‌ها، DNA ژنومی استخراج و در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با روش BOX-PCR به کار برده شدند. محصول تکثیر شده در ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز و با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شد. از ضریب تشابه جاکارد برای تعیین تشابه جدایه‌ها و از روش UPGMA و نرم‌افزار NTYSYS-pc نسخه ۲ برای آنالیز خوشه‌ای استفاده شد . طبق نتایج جدایه‌ها به عنوان جنس Pectobacterium spp. شناسایی شدند، جدایه‌ها براساس خصوصیات فنوتیپی اختلافاتی جزئی را نشان دادند. آنالیز خوشه‌ای نتایج، نشان داد که در سطح تشابه ۳۰ درصد، جدایه‌ها به ۸ گروه تقسیم شدند. نتایج فوق تنوع را درون جدایه‌ها نمایش می‌دهد.

تنوع ژنتیکی، پوسیدگی نرم، ساق سیاه، BOX-PCR

شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی جدایه های Botrytis cinerea عامل کپک خاکستری توت فرنگی در استان مازندران

سید جعفر نصیری طالشی، صفر علی مهدیان، محمد علی تاجیک قنبری، سید امین علیان

دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

استادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

استادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

بررسی قارچ‌های مولد آنزیم CBHI از جنگل‌های ایران به روش مولکولی

نسیم نجارزاده[1*]، احمدرضا بهرامی[2]، منصور مشرقی[3]، مریم مقدم متین[4]، حمید روحانی[5]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
2- گروه پژوهشی سلولی و ملکولی، پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی
3- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
4- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
5- استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

NasimNajjarzadeh@gmail.com

سلولز ترکیب اصلی بیومس گیاهی است که سالانه در حجم بسیار زیادی در سرتاسر جهان تولید می‌شود. قارچ‌ها مهمترین میکروارگانیسم‌ها در بازیافت این پلیمر به شمار می‌روند. از سه گروه آنزیم سلولازی، اگزوگلوکونازها (سلوبوهیدرولازها) کلیدی‌ترین آنزیم سلولازی و CBHI مهمترین سلوبیوهیدرولاز در روند تخریب سلولز می‌باشد. در این مطالعه از روش استخراج مستقیم DNA از خاک جنگل‌های ایران استفاده شد تا بدون نیاز به روش‌های وابسته به کشت که کارایی پایینی در رشد تمام قارچ‌ها دارند بتوان به محتوی ژنتیکی میکروارگانیسم‌های قابل کشت و غیرقابل کشت خاک دسترسی پیدا کرد. برای اطمینان از وجود DNA قارچی در رسوب حاصل، پرایمری که چهار گروه اصلی قارچ‌ها را شناسایی می‌کند مورد استفاده قرار گرفت. سپس پرایمر دژنره مخصوص *cbhI* به کار برده شد تا این ژن از میکروارگانیسم‌های خاک‌زی جداسازی شود. در نهایت ضمن این‌که این ژن‌ها به عنوان بخشی از ذخایر ژنتیکی خاک‌های ایران گزارش می‌شوند، با مقایسه‌ی آن‌ها با توالی‌های ثبت شده در GeneBank گونه‌ی آن در صورت امکان شناسایی و به عنوان قارچ حاوی ژن مورد نظر در خاک‌های ایران اعلام می‌گردند.

واژگان کلیدی: جنگل‌های ایران، CBHI، قارچ

مقدمه

سلولز پلی‌ساکاریدی غیرقابل حل در آب، با فرمول شیمیایی $(C_6H_{10}O_5)n$ و متشکل از زنجیره‌های طویل واحدهای گلوکز است که با پیوند بتا-1و4 به هم متصل شده‌اند (1). سلولز فراوانترین توده‌ی زیستی تجزیه‌پذیر زمین بوده و قسمت اعظم دیواره‌ی سلولی گیاهان عالی را تشکیل می‌دهد. این پلی-ساکارید دارای نواحی بلورین و غیربلورین می‌باشد، قدرت کششی بالایی دارد و به دلیل قرارگیری در زمینه‌ای از پلی‌ساکاریدهای دیگر از جمله لیگنین، همی‌سلولز و پکتین، که سبب دسترسی کمتر آنزیم‌ها می‌شود، نسبت به سایر پلیمرهای گلوکز در برابر تجزیه مقاوم‌تر است(2) . این ماده علاوه بر دیواره‌ی سلولی گیاهان در جلبک‌ها، برخی قارچ‌ها و کیست برخی پروتوزوئرها یافت می‌شود.

سلولازها آنزیم‌هایی متشکل از واحدهای مجزای ساختاری و عملکردی هستند که به طور مجزا تا خورده‌اند (3). آن‌ها خانواده‌ای متشکل از حداقل سه گروه آنزیم هستند که شامل آنزیم‌های endo(1,4)-β-D-glucanase، exo(1,4)-β-D-glucanase و β-glucosidase می‌باشند (4). این آنزیم‌ها بصورت هماهنگ با یکدیگر عمل می‌کنند تا سلولز را به اولیگوساکاریدهای کوچک و در نهایت به گلوکز تجزیه کنند(5). از بین آنزیم‌های سلولازی، سلوبیوهیدرولازها مهمترین آن‌ها به شمار می‌روند. اعضای متعلق به خانواده‌ی CBHI، آنزیم‌هایی متشکل از چند جزء می‌باشند که از حداقل یک بخش کاتالیتیک و یک بخش متصل شونده به سلولز تشکیل شده است که با یک پل رابط غنی از پرولین/ سرین/ ترئونین به هم متصل شده‌اند (6,7). سلوبیوهیدرولازها بر اساس تشابه توالی اسیدآمینه‌ای، در سه خانواده‌ی گلیکوزید هیدرولازی GH6،GH7 وGH48 قرار می‌گیرند که از بین آن‌ها GH7 منحصرا متعلق به قارچ‌ها می‌باشد (3).

بدلیل تنوع زیاد قارچ‌های تجزیه‌کننده‌ی سلولز و نیز بدلیل اینکه تجزیه‌ی کامل لیگنین تنها توسط بازیدیومیست‌ها و برخی آسکومیست‌ها انجام می‌گیرد، (8,9) قارچ‌های ساپروترف به عنوان اولین عوامل تجزیه در مناطق جنگلی به شمار می‌روند (10). با این وجود اطلاعات ناقصی درباره‌ی این قارچ‌ها و نحوه-ی عمل آن‌ها وجود دارد و نیاز به تحقیقات بیشتری بر روی آن‌ها احساس می‌شود. بدلیل کارایی پایین روش کشت در رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها، در این بررسی از روش‌های مستقل از کشت استفاده شده است تا از مشکلات موجود در روش کشت اجتناب شود.

مواد و روش‌ها

DNA از خاک: در ابتدا 0/25 گرم از خاک نواحی مختلف با نیتروژن مایع به خوبی سائیده شد تا کاملا به حالت پودر درآید. سپس با استفاده از روش عمومی استخراج DNA با استفاده از فنول – کلروفرم، رسوب DNA جمع آوری و در 50 ماکرولیتر آب مقطر حل و نگهداری شد.

PCR نمونه‌ی استخراج شده: PCR اختصاصی ژن *cbh1* پس از تائید وجود DNA قارچی در نمونه با استفاده از پرایمرهای عمومی قارچ‌ها (11)، با مخلوط واکنشی شامل 12/25 ماکرولیتر آب، 2 ماکرولیتر بافر، 0/5 ماکرولیتر $MgCl_2$، 0/5 ماکرولیتر از هر پرایمر و 0/25 ماکرولیتر آنزیم Taq

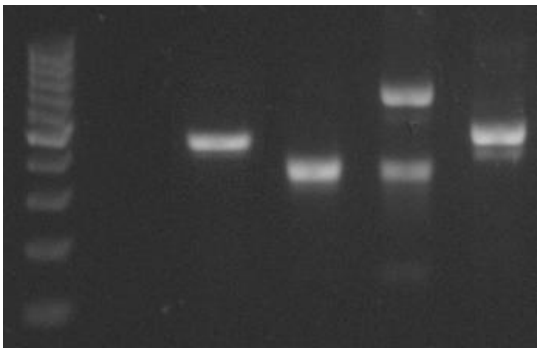
polymerase انجام شد. واکنش برای 40 دور شامل 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 40 ثانیه، 56 درجه سانتی‌گراد به مدت 50 ثانیه، 72 درجه سانتی-گراد به مدت 1/45 دقیقه انجام شد. پس از پایان 40 دور، واکنش به مدت 10 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. در مرحله‌ی بعد 4 ماکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز 1/2٪ الکتروفورز گردید. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید و مشاهده‌ی باندها، DNA از ژل با استفاده از کیت استخراج DNA (Fermentase) استخراج شد.

توالی یابی و آنالیز بیوانفورماتیکی: پس از توالی یابی نوکلئوتیدی نمونه‌های استخراج شده از ژل، توالی هر یک از آن‌ها با اطلاعات موجود در بانک ژنی با برنامه‌ی Blast مقایسه و بررسی شد.

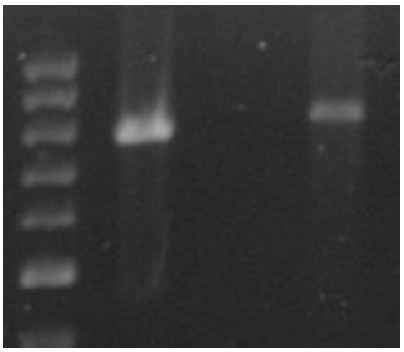
نتایج و بحث

استخراج DNA از خاک و PCR: پس از PCR با پرایمر عمومی قارچ‌ها و اختصاصی، چند باند بر روی ژل مشاهده شد که پس از استخراج، سه باند با طول 400 و 600 جفت باز برای توالی یابی فرستاده شد.

نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی: مقایسه توالی این ژن‌ها با توالی‌های موجود در GeneBank هیچ نوع تشابهی با توالی‌های موجود نشان نداد.



نتیجه PCR با پرایمر مخصوص *cbh1* . به ترتیب از چپ با راست: مارکر مولکولی، کنترل منفی، کنترل مثبت، نمونه‌های خاک مناطق مختلف جنگل‌های ایران



نتیجه PCR با پرایمر عمومی قارچ‌ها. به ترتیب از چپ با راست: مارکر مولکولی، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌ی خاک

تقدیر و تشکر

در نهایت از تمام عزیزانی که در تهیه‌ی تمامی مراحل این مقاله مرا یاری نموده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع

(1) Bhiri, F., A. Gargouri, et al. (2010). "Molecular cloning, gene expression analysis and structural modelling of the cellobiohydrolase I from Penicillium occitanis." Enzyme and Microbial Technology 46(2): 74-81.

(2) J.L. Wang, P. J. G. (1999). "PCR mediated analysis of transcription of CBH 1 and 2 genes from Trichoderma pseudokoninjii and Penicillium janthinellum." Biotechnology letters 21: 321-324.

(3) B.Henrissat, T. T. T., R.A.J. Warren (1998). "Transcriptional regulation of two cellobiohydrolase encoding genes (cel1 and cel2) from the wood-degrading basidiomycete Polyporus arcularius "FEBS Letters 425: 352-354.

(4) D. Deswal, R. C. K. (2011). " Optimization of cellulase production by a brown rot fungus Fomitopsis sp. RCK2010 under Solid State Fermentation." Bioresource Technology 102: 6065-6072.

(5) Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl, and I. S. Pretorius. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66:506–577.

(6) Divne C, Ståhlberg J, Teeri TT, Jones TA. (1998). High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei. J Mol Biol 275:309–25.

(7) Tomme P, Warren RA, Miller Jr RC, Kilburn DG, Gilkes NR. (1995). Cellulose-binding domains: classification and properties. In: Saddler JN, Penner M, editors. Enzymatic degradation of insoluble polysaccharides. Washington: American Chemical Society. p. 63–142.

(8) Cooke, R. C., and A. D. M. Rayner. 1984. Ecology of saprotrophic fungi. Longman, London, United Kingdom

(9) Cullen, D. 1997. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. J. Biotechnol. 53: 273–289.

(10) Thorn, R. G., C. A. Reddy, D. Harris, and E. A. Paul. 1996. Isolation of sapro-phytic basidiomycetes from soil. Appl. Environ. Microbiol. 62:4288–4292.

(11) James Borneman, R. Jack Hartin. (2000). PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples. Appl. Environ. Microbioool 66:4356-4360