دانشگاه تبریز
دانشکده کشاورزی
گروه خاکشناسی

رساله
برای دریافت درجه دکتری در رشته خاکشناسی - گرایش بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

عنوان

همسانه‌سازی ژن رمزکننده فسفاتاز از سویه P13 باکتری *Pseudomonas putida* جهت انتقال به باکتری *Pantoea agglomerans* و ارزیابی کارایی باکتری تراریخته بر رشد گیاه گندم

استادان راهنما
دکتر ناصر علی‌اصغرزاد دکتر محمدعلی ملبوبی

استاد مشاور
دکتر بیژن بمبئی

پژوهشگر
محمدرضا ساریخانی

شهریور ماه 1389 شماره : 9

نام خانوادگی دانشجو: ساریخانی **نام**: محمد رضا

عنوان رساله: همسانه‌سازی ژن رمزکننده فسفاتاز از سویه P13 باکتری *Pseudomonas putida* جهت انتقال به باکتری *Pantoea agglomerans* و ارزیابی کارایی باکتری تراریخته بر رشد گیاه گندم

استادان راهنما: دکتر ناصر علی‌اصغرزاد دکتر محمدعلی ملبوبی
استاد مشاور: دکتر بیژن بمبئی

مقطع تحصیلی: دکتری **رشته**: خاکشناسی **گرایش**: بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک
دانشگاه: تبریز **دانشکده**: کشاورزی **تاریخ فارغ التحصیلی**: شهریور ماه 1389 **تعداد صفحات**: 138

کلید واژه‌ها: باکتری‌های حل کننده فسفات، فسفاتاز، کتابخانه ژنومی، غربالگری ، BCIP، *Pseudomonas putida* P13

چکیده:

فسفر در مقایسه با دیگر عناصر غذایی، در بیشتر خاک‌ها تحرک و قابلیت جذب کمی دارد. از آنجا که گیاهان فقط قادر به جذب یون فسفات آزاد از منابع فسفر آلی و معدنی می‌باشند، این عنصر یکی از اصلی‌ترین عوامل محدودکنندهٔ رشد گیاهان به شمار می‌رود. ریزسازواره‌های حل‌کنندهٔ فسفات نقش مهمی در تامین فسفر در قالب روش‌های سازگار با محیط زیست و پایدار می‌تواند داشته باشد. سازوکار اصلی برای رهاسازی فسفر معدنی و آلی موجود در خاک به ترتیب تولید اسیدهای آلی و آنزیم فسفاتاز توسط ریزسازواره‌ها می‌باشد. هدف اصلی این تحقیق شناسایی، جداسازی، همسانه‌سازی و بررسی ویژگی‌های آنزیمی یکی از ژن‌های فسفاتاز از باکتری *Pseudomonas putida* P13 بود. به منظور همسانه‌سازی ژن‌های فسفاتاز مورد نظر از روش غربالگری کتابخانه ژنومی *P. putida* P13 و شناسایی ژن‌ها از طریق مطالعات بیوانفورماتیک استفاده شد، گرچه انجام مطالعات بیوانفورماتیک و انتخاب ژن نامزد با توجه به اطلاعات موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی به منظور طراحی آغازگر موفقیت آمیز نبود، ولیکن تهیه کتابخانه ژنومی برای جداسازی ژن با استفاده از طراحی سیستم جدید غربالگری عملکردی ابداعی در محیط کشت حداقل حاوی یک سوبسترای رنگزا منجر به جدا نمودن دو همسانه مستقل از هم شد. مطالعات بعدی در راستای رسیدن به توالی رمزکننده فسفاتازها از طریق زیرهمسانه سازی با توجه به نقشه برشی آن‌ها و با استفاده از آغازگرها در دو طرف مناطق رمزکننده موجود در همسانه ژنومی جداشده انجام پذیرفت. پس از شناسایی منطقه رمزکننده فسفاتازها، برای بیان فراوان آن‌ها ژن-های جداشده درون ناقلpGEM-T easy در باکتری *E. coli* DH5α انتقال یافتند. بررسی ویژگی‌های آنزیمی ژن‌های جداشده بعد از خالص سازی پروتئین نشان داد که یکی از آنها به نام PPP1 دارای فعالیت فیتازی است و دیگری به نام PPP2 رمزکننده آنزیم فسفاتاز قندی است. بررسی‌های بیشتر بر روی آنزیم‌ها نشان داد که هر دو آنزیم فعالیت بهینه‌ای در pH 5 و دمای 60 درجه سانتیگراد دارند.

بررسی‌ها در حضور فیتات نشان داد که ثابت های بیوشیمیایی K_m و V_{max} برای ژن های فیتاز با وزن مولکولی 27 kDa به ترتیب 0/237mM و $\mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$ 281 و برای فسفاتاز قندی با وزن مولکولی 50kDa 0/192mM و $\mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$ 20 می‌باشد. نتایج HPLC نشان داد که ژن PPP1 قادر به رهاسازی 5 گروه فسفات از 6 گروه فسفات ملکول فیتات می باشد، در حالی‌که ژن PPP2 تنها یک گروه فسفات را آزاد می‌نماید. هر دو آنزیم در دماهای بالا پایدار بوده و نگهداری در دماهای 55 و 60 درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه اثری بر فعالیت آنزیم فیتاز و فسفاتاز قندی ندارد. گرچه رفتار آنزیمی و ویژگی‌های بیوشیمیایی این آنزیم‌ها با آنزیم‌های شناخته شده در کلاس 4 گانه فیتازی (به ویژه HAPها) یا کلاس 3 گانه اسید فسفاتازهای غیر ویژه (به ویژه کلاس A) تفاوت چندانی نشان نمی‌دهد، اما از نظر توالی اسید آمینه، با کلاس‌های فوق هیچ تشابهی نشان نداده و به نظر می‌رسد که خود در کلاس جداگانه ای قرار می‌گیرند. توالی اسید آمینه ژن‌های جدا شده بیشتر با پروتئین‌های تسهیل کننده (Major facilitator superfamily) تشابه نشان می‌دهد.

برای ارزیابی اثر باکتری‌های حل کننده فسفات بر رشد گیاه و جذب فسفر توسط گیاه گندم رقم روشن، آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با 3 تکرار با اعمال 4 تیمار باکتریایی شامل باکتری*P. putida* P13 ، *P. agglomerans* P5، *P. fluorescence* CHAO، باکتریهای *P. putida* بعلاوه *P. agglomerans* و شاهد (بدون تلقیح باکتری) در خاک استریل با بافت لوم انجام شد. تجزیه آماری بر روی صفات اندازه‌گیری شده، شامل وزن تر و خشک بخش هوایی، تعداد خوشه، تعداد دانه و وزن دانه، فسفر بخش هوایی در میان دوره (50 روز) و انتهای دوره رشد (120 روز) و فسفر موجود در دانه، نشان داد که تیمارهای باکتریایی در مقایسه با شاهد باعث افزایش غلظت فسفر بخش هوایی می-شود، به گونه‌ای که تیمار حاوی دو باکتری P13 بعلاوه P5 دارای بالاترین میانگین می‌باشد. ولیکن اعمال تیمارها تاثیری بر افزایش بیوماس گیاهی نداشته است، هر چند که پارامترهایی نظیر تعداد خوشه یا تعداد دانه و وزن دانه در برخی از تیمارهای باکتریای دارای میانگین بالاتری نسبت به شاهد بودند.

فهرست مطالب | صفحه

چکیده

مقدمه 1

فصل 1: بررسی منابع

1-1 فسفر و اهمیت آن در گیاه 4

2-1 فراهمی فسفر در خاک 4

3-1 باکتری‌های حل کننده فسفر 6

1-3-1 انحلال فسفر معدنی 6

2-3-1 معدنی شدن فسفر آلی 8

4-1 سازوکارهای انحلال فسفات 9

1-4-1 انحلال فسفات‌های معدنی 9

2-4-1 معدنی شدن فسفر آلی 10

1-2-4-1 فسفاتازها 11

5-1 ژنتیک باکتری‌های حل‌کننده فسفر 14

1-5-1 ژنتیک انحلال فسفر معدنی 14

2-5-1 ژنتیک معدنی شدن فسفر آلی (فسفاتازها و فیتازها) 16

6-1 NSAP (اسیدفسفاتازهای غیر ویژه) 17

1-6-1 فسفاتازهای اسیدی گروه A 18

2-6-1 فسفاتازهای اسیدی گروه B 19

3-6-1 فسفاتازهای اسیدی گروه C 19

7-1 فیتازها 20

1-7-1 منابع میکروبی فیتاز 21

2-7-1 منابع غیر میکروبی فیتازها 22

3-7-1 کلاس‌های فیتاز 24

1-3-7-1 HAP (هیستیدین اسید فسفاتاز) 25

2-3-7-1 BPP (بتا پروپلر فیتاز) 26

3-3-7-1 PAP (اسید فسفاتاز بنفش) 27

4-3-7-1 CP (سیستئین فسفاتاز) 28

4-7-1 کاربرد فیتازها 28

1-4-7-1 در تغذیه دام و جیره غذایی 28

2-4-7-1 کاربرد غذایی و تغذیه انسان 29

1-7-4-3 تهیه مایواینوزیتول فسفات‌ها 29
1-7-4-4 صنعت پالپ و کاغذ 30
1-7-4-5 اصلاح‌کننده خاک 30
1-8 غربالگری باکتری‌های حل‌کننده فسفر و ژن‌های فسفاتاز (فیتاز) 30
1-9 انتقال ژن 33
1-9-1 هم یوغی 33
1-10 مطالعات بیوشیمیایی آنزیم‌ها 36
1-11 گیاه‌شناسی گندم و تغذیه گندم 39
1-11-1 نقش فسفر در گندم و آثار کمبود فسفات آن 41
1-12 کودهای زیستی و آثار آن‌ها 42
فصل 2: مواد و روش
2-1 سویه‌های باکتریایی و پلاسمیدهای مورد استفاده 45
2-2 محیط های کشت مورد استفاده 46
2-2-1 محیط LB 46
2-2-2 محیط نگهداری باکتری 46
2-2-3 محیط Sperber و PSM 46
2-2-4 محیط SOC و محیط SOB 47
2-2-5 محیط M9 48
2-2-6 محلول‌های ذخیره X-gal و IPTG و آنتی‌بیوتیک‌ها 48
2-3 کشت باکتری‌های حل کننده فسفر و آزمون‌های اولیه 49
2-4 استخراج DNA ژنومی 49
2-4-1 استخراج DNA ژنومی به روش Syn & Swarup 49
2-4-2 استخراج DNA ژنومی به روش CTAB 50
2-5 استخراج DNA پلاسمیدی 50
2-5-1 روش کیت شرکت Roche 50
2-5-2 روش قلیا 51
2-5-3 روش TELT 52
2-6 اندازه‌گیری غلظت DNA پلاسمیدی یا ژنومی از روی OD 53
2-7 تهیه سلول‌های مستعد تراریختی 53
2-7-1 سلول‌های مستعد الکتروپوریشن 53
2-7-2 تهیه سلول‌های مستعد به روش کلسیم کلراید 54

8-2 تراریختی	55
1-8-2 تراریختی به روش کلسیم کلراید (شوک حرارتی)	56
2-8-2 تراریختی به روش الکتروپوریشن (شوک الکتریکی)	56
9-2 تهیه کتابخانه ژنومی	57
1-9-2 برش ناقل یا هضم آنزیمی پلاسمید	57
2-9-2 دفسفریله کردن ناقل	59
3-9-2 برش کامل آنزیمی DNA ژنومی	59
4-9-2 برش ناقص آنزیمی DNA ژنومی	60
5-9-2 واکنش اتصال	60
6-9-2 خالص سازی DNA از روی ژل	61
2- 10 غربالگری کتابخانه ژنومی	61
11-2 مراحل تایید همسانه‌ها	62
12-2- 1 آغازگرهای طراحی شده برای توالی یابی	62
2-11-2 طراحی آغازگر و انجام PCR	63
3-11-2 همسانه‌سازی مناطق رمز کننده	64
12-2 خالص سازی آنزیم	64
1-12-2کشت باکتری و آماده کردن عصاره آنزیمی	65
2-12-2 استفاده از دستگاه FPLC	66
1-2-12-2 ستون Mono S HR 5/5 Chromatography	66
2-2-12-2 ستون Sephacryl S-200 HR Chromatography 16/60 یا Gel filtration	66
13-2 سنجش آنزیمی	67
14-2 منحنی استاندارد فسفر	67
15-2 ژل SDS-PAGE	67
16-2 روش Bradford به منظور تعیین مقدار پروتئین	68
17-2 آزمون‌های بیوشیمیایی	69
1-17-2 pH بهینه	69
2-17-2 دمای بهینه	69
3-17-2 هضم آنزیمی سوبستراهای مختلف	70
3-17-2 تعیین پارامترهای بیوشیمیایی آنزیم‌های نوترکیب حاصل	70
4-17-2 اثر برخی از یون‌ها و معرف‌ها	71
5-17-2 بررسی پایداری آنزیم	71

2-17-6 بررسی مسیر تجزیه فیتات و محصول نهایی 71
2-18 انتقال ژن 72
2-18-1 هم یوغی 72
2-18-1-1 آماده کردن ناقل‌های pUT وpBSL118 حاوی ژن جهت هم یوغی 73
2-19 رسم درخت فیلوژنتیک 75
2-20 مطالعات بیوانفورماتیک برای انتخاب ژن مورد نظر در *P. putida* 76
2-21 کشت گیاه گندم 77
2-22 آنالیز بافت گیاهی 78
2-23 رسم منحنی استاندارد برای اندازه گیری فسفر 79
فصل 3: نتایج و بحث
3-1 مطالعات بیوانفورماتیک 81
3-2 بررسی‌های اولیه و طراحی محیط غربالگری 82
3-3 تهیه کتابخانه‌های ژنومی و غربالگری آن‌ها 85
3-3-1 بهینه سازی شرایط الکتروپوریشن 86
3-4 همسانه SBC2 87
3-4-1 تهیه نقشه برشی و یافتن قسمت رمزکننده 87
3-4-2 تکثیر ORFها و همسانه سازی آن‌ها 90
3-5 همسانه S1H 93
3-5-1 تهیه نقشه برشی و یافتن قسمت رمزکننده 93
3-5-2 تکثیر ORFها و همسانه سازی آن‌ها 94
3-6 انتقال ژن 96
3-7 توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای دو ژن 99
3-8 آنالیز فیلوژنتیک 101
3-9 مطالعات بیوشیمیایی 105
3-9-1 خالص سازی آنزیم 105
3-9-2 تعیین pH بهینه فعالیت آنزیم‌ها 106
3-9-3 تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم‌ها 108
3-9-4 پایداری آنزیم 109
3-9-5 ترجیح سوبسترایی آنزیم‌ها 110
3-9-6 پارامترهای بیوشیمیایی آنزیم‌ها 112
3-9-7 وزن مولکولی آنزیم 113

3-9-8 اثر برخی از یون‌ها و معرف‌ها بر فعالیت آنزیم 115
3-9-9 بررسی مسیر تجزیه و محصول نهایی 117
3-10 آنالیز کمی و کیفی رشد گیاه گندم در حضور باکتری‌های حل کننده فسفر 125
3-11 نتیجه گیری 126
پیشنهادها 128
منابع 130

فهرست جداول صفحه

فصل 1: بررسی منابع

جدول 1-1 قابلیت انحلال فسفات معدنی به وسیله باکتری‌های مختلف 7
جدول 1-2 باکتری‌های مختلف و نوع سوبسترای آلی حاوی فسفات 9
جدول 1-3 ژن‌های درگیر در انحلال فسفر معدنی در باکتری‌های مختلف 14
جدول 1-4 فیتازهای میکروبی مختلف شناخته شده به همراه ویژگی‌های مهم آنزیمی 23
جدول 1-5 توصیه کودی با توجه آزمون خاک برای تولید 12 تن گندم در هکتار 41

فصل 2: مواد و روش‌ها

جدول 2-1 فهرست سویه‌های باکتریایی و یا ناقلین ژنی 45
جدول 2-2 اجزاء تشکیل دهنده محیط LB 46
جدول 2-3 اجزا تشکیل دهنده محلول ذخیره باکتری‌ها 46
جدول 2-4 اجزاء سازنده محیط‌های Sperber (چپ) و محیط PSM (راست) 47
جدول 2-5 اجزاء تشکیل دهنده محیط SOB 47
جدول 2-6 اجزاء تشکیل دهنده محیط M9 48
جدول 2-7 اجزاء تشکیل دهنده محلول‌های TE و TES 50
جدول 2-8 اجزاء تشکیل دهنده محلو ل‌های شماره I، II و III 52
جدول 2-9 اجزاء تشکیل دهنده در محلول TELT (سمت چپ) و محلول Lysozyme 53
جدول 2-10 اجزا تشکیل دهنده محلولهای TFBI و TFBII 55
جدول 2-12 اجزاء تشکیل دهنده واکنش دفسفریله کردن 59
جدول 2-13 اجزاء واکنش هضم آنزیمی DNA ژنومی (سمت راست) و پلاسمید 59
جدول 2-14 اجزاء تشکیل دهنده واکنش اتصال 60
جدول 2-15 آغازگرهای طراحی شده به منظور کامل نمودن توالی 62
جدول 2-16 آغازگرهای طراحی شده به منظور همسانه سازی از طریق PCR 63
جدول 2-17 اجزاء واکنش PCR 64
جدول 2-18 مواد مورد استفاده در تهیه ژل SDS-PAGE 68
جدول 2-19 اجزاء مورد استفاده در تهیه منحنی استاندارد غلظت پروتئین 69
جدول 2-20 بافرهای استفاده شده در پروفایل pH آنزیم 69
جدول 2-21 آغازگرهای استفاده شده برای ژن‌های منتخب در مطالعات بیوانفورماتیک 76
جدول2– 22 برخی از خصوصیات اندازه گیری شده خاک مورد استفاده در کشت گیاه 78
جدول 2-23 اجزاء مورد استفاده در رسم منحنی استاندارد 79

فصل 3: نتایج و بحث

جدول 3-1 بررسی تاثیرمقاومت و ظرفیت خازن در میزان تراریختی باکتری *E. coli*
جدول 3-2 آزمایش آنتی بیوتیک‌های مختلف در رشد یا عدم رشد 86
جدول 3-3 مراحل خالص سازی پروتئینPPP1 (آنزیم فیتاز) رمز شده با ORF 99
جدول 3-4 خالص سازی پروتئین PPP2 (آنزیم فسفاتاز قندی) رمز شده با ORF 105
جدول 3-5 بررسی فعالیت آنزیم‌های خالص شده از ژن های PPP1 و PPP2 105
جدول 3-6 پارامترهای بیوشیمیایی آنزیم فیتاز (PPP1) مربوط به سوبستراهای مختلف 109
جدول 3-7 پارامتر های بیوشیمیایی آنزیم فسفاتاز قندی (PPP2) 111
جدول 3-8 بررسی اثر برخی از یون‌ها و معرف‌ها بر فعالیت آنزیم های رمز شده 112
جدول3-9 تجزیه واریانس تعدادخوشه در هر گلدان 114
جدول 3-10 تجزیه واریانس تعداد دانه در هر گلدان 117
جدول 3-11 تجزیه واریانس وزن دانه در هر گلدان 118
جدول 3-12 تجزیه واریانس غلظت فسفر بخش هوایی 119
جدول 3-13 تجزیه واریانس مقدار فسفر بخش هوایی 120
جدول 3-14 تجزیه واریانس فسفر دانه 121
123

فهرست اشکال صفحه

فصل 1: بررسی منابع

شکل 1-1 نمایشی از ساختار مولکولی بتا پروپلر فیتازها 27
شکل 1-2 پلاسمید F-factor و اجزای سازنده آن 35
شکل 1-3 نمایشی از سازوکار هم یوغی 35
شکل 1-4 قسمتی از ناقل pUT و انتهاهای I و O و محل ورود ژن در جایگاه NotI 36
شکل 1-5 منحنی پیشرفت واکنش (سمت چپ) و نحوه تعیین سرعت 36
شکل 1-6 نمودار مایکلیس و منتن و رابطه آن 38
شکل 1-7 منحنی لینوور- بورک به دست آمده از منحنی مایکلیس منتن و معادله مربوطه 38

فصل 2: مواد و روش ها

شکل 2-1 نقشه پلاسمید pBS و جایگاه‌های برشی آن 58
شکل 2-2 نقشه ناقل pBSL118 74
شکل 2-3 نقشه ناقل pUT (mini-Tn5 km1) 74
شکل 2-4 نقشه پلاسمید pGEM-T easy و جایگاه‌های برش چندگانه آن 75

فصل 3: نتایج و بحث

شکل 3-1 درخت فیلوژنتیک ژن‌های نامزد در ژنوم *P. putida* KT2440 81
شکل 3-2 بخشی از همردیفی توالی اسیدآمینه ژن‌های نامزد با نماینده ژن‌ها 82
شکل 3-3 رشد باکتری *P. putida* P13 در محیط Sperber حاوی BCIP 83
شکل 3-4 کشت باکتری *P. putida* P13 و *P. agglomerans* P5 در محیط 83
شکل 3-5 مولکول BCIP و شکستن مولکول فسفات در اثر فعالیت آنزیم فسفاتاز 84
شکل 3-6 کشت همزمان *P. putida* P13 و E. coli DH5α در محیط Sperber 84
شکل 3-7 برش DNA ژنومی *P. putida* (سمت راست LM) و DNA پلاسمیدی 85
شکل 3-8 محیط غربالگری مورد استفاده و انتخاب باکتری‌های با فنوتیب آبی 86
شکل 3-9 برش پلاسمید همسانه SBC1 به وسیله آنزیم 1-7-4 کاربرد فیتازها 87
شکل 3-10 برش آنزیمی پلاسمید SBC1 با آنزیم‌های مختلف 87
شکل 3-11 پلاسمید PBS برش یافته با دو آنزیم تهیه مایواینوزیتول فسفات‌ها 88
شکل 3-12 نقشه آنزیمی قطعه همسانه شده در pBS اصلاح‌کننده خاک 88
شکل 3-13 نقشه آنزیمی در همسانه SBC2 89
شکل 3-14 برش قطعه ورودی SBC2 و ناقل pBS با آنزیم‌های PstI 89
شکل 3-15 نمایی از باکتری‌های مربوط به زیرهمسانه‌سازی ژن مربوط به همسانه SBC2 90
شکل 3-16 ORF های تشخیص داده شده در همسانه SBC2 به وسیله ORF Finder 91

شکل 3-17 باندهای تکثیر شده توسط PCR مربوط به هر یک از ORFهای 91
شکل 3-18 تایید همسانه سازی قطعات حاوی ORFهای نامزد برای رمزکنندگی فسفاتاز 92
شکل 3-19 تایید همسانه‌سازی قطعات حاوی ORFهای نامزد برای رمزکنندگی فسفاتاز 92
شکل 3-20 برش آنزیمی پلاسمید همسانه S1H و پلاسمید pBS 93
شکل 3-21 قطعه DNA موجود در همسانه 1H 94
شکل 3-22 قطعه DNA موجود در همسانه S1H 94
شکل 3-23 قطعات برش یافته همسانه S1H و ناقل (pBS) 94
شکل 3-24 ORFهای تشخیص داده شده در همسانه S1H به وسیله ORF Finder 95
شکل 3-25 تکثیر ORFهای (1- و 2-) در همسانه S1H از طریق PCR 95
شکل 3-26 برش آنزیمی پلاسمیدهای pGEM-T easy حاوی ORFهای 96
شکل 3-27 در شکل سمت راست برش آنزیمی ناقل pBSL118 و پلاسمید همسانه S1H 97
شکل 3-28 برش آنزیمی ناقل pUT حاوی قطعات ژن همسانه SBC2 و S1H 97
شکل 3-29 برش ناقل pGEM-T easy عاری از ژن و حاوی ژن موجود در همسانه 98
شکل 3-30 توالی DNA رمزکننده PPP1 (ژن فیتاز) در همسانه S1H 100
شکل 3-31 توالی DNA رمزکننده PPP2 (ژن فسفاتاز قندی) در همسانه SBC2 100
شکل 3-32 توالی اسید آمینه مربوط به PPP1 (ژن فیتاز) در همسانه S1H 100
شکل 3-33 توالی اسید آمینه مربوط به PPP2 (ژن فسفاتاز قندی) در همسانه SBC2 100
شکل 3-34 درخت فیلوژنتیکی ژن‌های جدا شده از *P. putida* P13 و پروتئین‌های 103
شکل 3-35 درخت فیلوژنتیکی ژن‌های جدا شده از *P. putida* P13 و پروتئین‌های 103
شکل 3-36 درخت فیلوژنتیکی ژن‌های جدا شده از *P. putida* P13 و نماینده 104
شکل 3-37 درخت فیلوژنتیکی ژن‌های جدا شده از *P. putida* P13 و نماینده 104
شکل 3-38 پروفایل pH برای دو آنزیم رمز شده توسط دو ژن جدا شده 106
شکل 3-39 پروفیل دمایی برای دو آنزیم رمز شده توسط دو ژن جدا شده 107
شکل 3-40 پایداری آنزیم‌های PPP1 (فیتاز) و PPP2 (فسفاتاز قندی) نسبت 108
شکل 3-41 ژل SDS-PAGE مربوط به دو آنزیم نیمه خالص سازی شده فیتاز 113
شکل 3-42 مولکول فیتات و شماره گذاری مولکول‌های فسفات در آن 116
شکل 3-43 کروماتوگرام تجزیه فیتات و مواد حدواسط ایجاد شده در رابطه با آنزیم PPP1 116
شکل 3-44 کروماتوگرام تجزیه فیتات و مواد حدواسط ایجاد شده در رابطه با آنزیم PPP1 117
شکل 3-45 مقایسه میانگین تیمارهای اعمال شده بر روی تعداد خوشه در هر گلدان 118
شکل 3-46 مقایسه میانگین تیمارهای اعمال شده بر روی تعداد دانه در هر گلدان 119
شکل 3-47 مقایسه میانگین تیمارهای اعمال شده بر روی وزن دانه 120

شکل 3-48 مقایسه میانگین تیمارهای اعمال شده بر روی غلظت فسفر بخش هوایی 121
شکل 3-49 مقایسه میانگین تیمارهای اعمال شده بر روی مقدار فسفر بخش هوایی 122
شکل 3-49 مقایسه میانگین تیمارهای اعمال شده بر روی غلظت فسفر دانه 123

مقدمه

فسفر یکی از عناصر غذایی پرمصرف ضروری و اصلی برای رشد و نمو گیاهان است و مقدار کل آن در خاک $400\text{-}1200\ mg\ kg^{-1}$ می‌باشد (Rodriguez & Fraga, 1999). گر چه فسفر در خاک ها به دو شکل آلی و معدنی به مقدار فراوان یافت می‌شود (Khan et al., 2007). اما در مقایسه با سایر عناصر غذایی، فسفر در بیشتر خاک‌ها تحرک و قابلیت جذب کمی دارد، غلظت فسفر محلول در خاک معمولاً خیلی پایین است، در حدود $1\ mg\ kg^{-1}$ یا کمتر می‌باشد. سلول ممکن است چندین شکل فسفر را جذب نماید ولی غالب‌ترین شکل جذبی آن $H_2PO_4^-$ یا HPO_4^{2-} می‌باشد. بزرگترین منابع فسفر سنگ‌ها و دیگر رسوبات از قبیل آپاتیت‌های اولیه و دیگر اشکال معدنی اولیه حاصل شده از دوران‌های زمین‌شناسی است. اشکال معدنی فسفر در خاک به شکل کانی‌های اولیه از قبیل آپاتیت، هیدروکسی آپاتیت یا اُکسی آپاتیت یافت می‌شود (علی‌اصغرزاد، 1376). اغلب خاک‌های کشاورزی منابع بزرگی از فسفر را دارا می‌باشند، بخش قابل ملاحظه‌ای از آن در نتیجه تجمع حاصل از کاربرد منظم کودهای فسفره است. زیرا بخش زیادی از فسفات معدنی محلول که به شکل کود شیمیایی به خاک اضافه می‌شود تثبیت شده و برای گیاهان غیرقابل استفاده می‌گردد (Rodriguez & Fraga, 1999). بنابراین نزدیک به 80% فسفر اضافه شده به خاک ممکن است در نتیجه تثبیت آلی و معدنی و یا حتی فیزیکی برای گیاهان غیر قابل استفاده شود (Raghothama & Karthikeyan, 2005). دومین منبع مهم فسفر در خاک ماده آلی است. اَشکال آلی فسفر 30-50 درصد کل فسفر را در اغلب خاک‌ها به خود اختصاص می‌دهند، گرچه که ممکن است از 5% تا 95% در نوسان باشد. فسفر آلی در خاک بیشتر به فرم فیتات یا اینوزیتول هگزا فسفات می‌باشد. خیلی از ترکیبات فسفر آلی موادی با وزن مولکولی بالا می‌باشند که ابتدا بایستی به فسفات معدنی محلول ($H_2PO_4^-$ وHPO_4^{2-}) یا فسفات آلی با وزن مولکولی کمتر تبدیل شوند تا به وسیله سلول جذب گردند (علی‌اصغرزاد، 1376). گزارش‌های متعددی از توانایی گونه‌های مختلف باکتری در انحلال فسفات معدنی کم محلول از قبیل تری‌کلسیم فسفات، دی‌کلسیم فسفات، هیدروکسی آپاتیت و سنگ فسفات وجود دارد. در بین باکتری‌هایی با این قابلیت، جنس‌های *Pseudomonas* (راثی‌پور و علی‌اصغرزاد، 1384، Malboobi et al., 2009; Ghaderi et al., 2008)، *Bacillus* (Oliveira et al., 2009)، *Rhizobium* (علیخانی و همکاران، 2006)، *Pantoea* (Jung et al., 2002، Malboobi et al., 2009)، *Bulkhorderia* (Oliveira et al., 2009)، *Agrobacterium*، *Achromobacter* و *Flavobacterium* (Rodriguez & Fraga, 1999) مشاهده می‌شود. بر اساس این گزارش‌ها، جمعیت‌های متنوعی از باکتری های حل‌کننده فسفات در خاک و در ریزوسفر گیاه وجود دارد که شامل گونه‌های هوازی و بی‌هوازی با غالبیت گونه‌های هوازی است. همچنین جمعیت آن‌ها در ریزوسفر در مقایسه با خاک غیر ریزوسفری به مراتب بیشتر می‌باشد. به منظور قابل استفاده شدن فسفر برای رشد گیاه، فرم آلی بایستی به فسفر معدنی هیدرولیز شود. معدنی شدن اغلبِ ترکیبات فسفر آلی به وسیله آنزیم‌های فسفاتاز صورت می‌گیرد.

حضور مقدار ویژه‌ای از فسفاتازها در خاک و فعالیت آنها گزارش شده است. در واقع منشا اصلی فسفاتازها در خاک، میکروب‌ها هستند که در ریزوسفر فعالیت بیشتری دارند (توسلی و همکاران، 1379، Tabatabai,

1994). باکتری‌های خاک مقدار زیادی از فسفاتاز اسیدی را تولید می‌کنند کـه شـامل گونـه‌هـایی از جـنس *Rhizobium* ، *Enterobacter*، *Serratia*، *Citrobacter*، *Proteus*، *Klebsiella* و همچنـین *Pseudomonas* و *Bacillus* می‌باشد (Rodriguez & Fraga, 1999). اگرچـه ممکـن اسـت در یـک خـاک همزمـان چنـدین باکتری حل کننده فسفات حضور داشته باشند، ولی معمولاً تعدادشان کافی نمی‌باشد که با دیگر باکتری‌های موجود در ریزوسفر رقابت کنند، یا حتی ممکن است گونه‌های کارآمدی نباشـند. بنـابراین مقـدار فـسفر آزاد شده به وسیله آنها معمولاً برای افزایش رشد گیـاه کـافی نمـی باشـد. در نتیجـه تلقـیح گیاهـان بـه وسـیله ریزسازواره های موثر و با جمعیت زیادتر از حدی که معمولاً در خاک یافـت مـی‌شـوند بـه افـزایش عملکـرد محصول کمک می‌کند. امروزه علاوه بر تهیه زادمایه های[1] میکروبی، به منظور فراهم ساختن عناصر غذایی و سایر اثرات جنبی مفید آن‌ها، کارهای مبتنی بر فناوری DNA نوترکیب هم صورت می‌پذیرد. در ایـن میـان، مطالعاتی در زمینه تولید صنعتی آنزیم‌ها از قبیل فسفاتاز و فیتاز توسط ریزسازواره‌ها، همچنین همسانه سازی ژن آن‌ها و انتقال به سایر باکتری‌های مفید و سازگار با محیط خاک صورت پذیرفته اسـت تـا بـا ایجـاد ایـن توانایی در باکتری گیرنده، بتوان خصوصیات مفید را در یک گونه باکتری برای کاربردهایی مثل کود زیـستی جمع نمود (Konietzny & Greiner, 2004; Rodriguez et al., 2000b; Pandy et al., 2001).

فسفاتازها دسته وسیعی از آنزیم‌ها می‌باشند که توانایی شکستن پیوندهای مونوفسفواستر در ترکیبات حـاوی فسفر آلی را دارند. این گروه از آنزیم‌ها زیرگروهی را در خود جای می‌دهند که قابلیت رهاسازی گروه فسفات یا هیدرولیز پیوندهای مونوفسفواستر موجود در اسیدفیتیک را دارا می‌باشند. با توجه به اهمیت و کاربرد ایـن دسته از آنزیم‌ها "فیتازها" و گستردگی آنها در طبیعت، حضور آن‌ها در ریزسازواره هـا، گیاهـان و حیوانـات مورد بررسی قرار گرفته‌اند. فیتازها فیتات را به فسفات و مشتقاتی از مایواینوزیتول تبدیل می‌کنند که با توجه به نوع آنزیم متفاوت می‌باشد. تا کنون فیتازهای مختلفی در منابع باکتریایی و قارچی چه بـه صـورت فیتـاز بومی و چه فیتاز نوترکیب مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به اهمیت وکاربرد فیتازها این دسته از آنزیم ها را با توجه به ویژگی‌های آنزیمی و تشابه توالی اسید آمینه به 4 گروه مختلف تقسیم بندی می‌کنند و بـه صورت مخفف به صورت HAP، PAP، BPP و CP نمایش می‌دهنـد (Mullany & Ullah, 2005). همچنـین فسفاتازهای اسیدی غیر ویژه را در 3 گروه A، B و C قرار می‌دهند (Rossolini et al., 1998).

در این تحقیق، علاوه بر ارائه یک روش به منظور غربالگری ژن‌های فسفاتاز و فیتاز از کتابخانه ژنومی باکتری *Pseudomonas putida* P13، برای نخستین بـار جداسـازی و همـسانه سـازی دو ژن "فیتـاز" و " فـسفاتاز قندی" از این گونه باکتری با استفاده از روش غربالگری عملکردی[2] گزارش می‌شود.

1- inoculant
2- functional screening

در این تحقیق اهداف زیر دنبال می‌شود:

1- جدا نمودن ژن یا ژن های رمزکننده رفتار فسفاتازی از باکتری *P. putida* P13

2- همسانه سازی ژن فسفاتاز یا فیتاز در باکتری *E. coli* و بررسی ویژگی های آنزیمی آن بعد از خالص سازی آنزیم

3- انتقال ژن یا ژنهای فوق به باکتری *P. agglomerans* P5

4- ارزیابی اثر باکتری تراریخته بر رشد و جذب فسفر درگیاه گندم در شرایط گلخانه

فصل اول
بررسی منابع

بررسی منابع

1-1 فسفر و اهمیت آن در گیاه

فسفر یکی از اجزاء ضروری متابولیسم انرژی، بخشی از اسیدهای نوکلئیک و غشاهای زیستی می‌باشد. فرایندهای اصلی بیوشیمیایی از قبیل فتوسنتز و تنفس به وسیله فسفات معدنی (Pi) یا مشتقات آلی آن فعال می‌شود. استرهای فسفات در کل به عنوان حامل‌های انرژی در مسیرهای متابولیکی مختلف عمل می‌کنند. فسفولیپیدها نقش مهمی در ساختار و کارکرد غشاءها بر عهده دارند. بعلاوه، فسفریله شدن و دِفسفریله شدن پروتئین‌ها برای مسیرهای انتقال پیام[1] در گیاهان ضروری می‌باشد. همچنین، هومئوستازیس فسفات[2] در کلروپلاست، انتقال قندهای فسفریله شده از خلال غشاء و سنتز نشاسته را تنظیم می‌کند (Raghothama & Karthikeyan, 2005).

تفاوت فاحشی بین غلظت فسفر درون سلول‌های گیاهی (در حد mM) و محلول خاک (در حد µM) وجود دارد. سطوح بسیار پایین فسفر قابل استفاده در ریزوسفر باعث می‌شود که این عنصر به عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل محدودکننده رشد در بسیاری از زیست بوم‌ها شناخته شود. شاید فسفر به عنوان یکی از عناصر غذایی با حداقل فراهمی در خاک مطرح باشد، غلظت فسفرقابل استفاده (Pi) در خاک به ندرت متجاوز از 10µM است. تثبیت معدنی و تشکیل کمپلکس‌های آلی فسفات غیر قابل جذب در خاک و تثبیت فیزیکی آن توسط دانه‌های رس، دلایل اولیه برای فراهمی کم این عنصر به شمار می‌رود (Raghothama & Karthikeyan, 2005).

1-2 فراهمی فسفر در خاک

فسفر یکی از عناصر غذایی پرمصرف ضروری و اصلی برای رشد و نمو موجودات زنده است. مقدار آن در خاک $400\text{-}1200\ mg\ kg^{-1}$ برآورد می‌شود. چرخه فسفر در زیست کره باز یا رسوبی[3] در نظر گرفته می‌شود، زیرا با اتمسفر تبادلی ندارد. ریزسازواره‌ها نقش اصلی در این چرخه ایفا می کنند. این چرخه به وسیله اکسایش و احیاء (کاهش) ترکیبات فسفر دنبال می‌شود، جائی که انتقال الکترون از حالت فسفین (3-) تا فسفات (5+) رخ می‌دهد. سازوکارهای بیوشیمیایی و ژنتیکی این تغییرشکل‌ها هنوز کاملاً به خوبی مشخص نشده است (Rodriguez & Fraga, 1999).

در مقایسه با سایر عناصر غذایی فسفر در بیشتر خاک ها تحرک و فراهمی کمی دارد، گر چه فسفر در خاک ها به دو شکل آلی و معدنی به مقدار فراوان یافت می‌شود (Khan et al., 2007). فسفر آلی درون محلول خاک بیشتر از فسفر معدنی است ولیکن جذب مستقیم آن به وسیله گیاهان غیر ممکن می‌باشد (به نقل از Tang et al., 2006). غلظت فسفر محلول در خاک معمولاً خیلی پایین است، در سطح $1\ mg\ kg^{-1}$ یا کمتر می‌باشد. سلول ممکن است چندین شکل فسفر را جذب نماید ولی غالب ترین شکل جذبی آن $H_2PO_4^-$ یا

[1] - signal transduction
[2] - phosphate homeostasis
[3] - sedimentary

HPO_4^{2-} می‌باشد. بزرگترین منابع فسفر صخره‌ها و دیگر رسوبات از قبیل آپاتیت‌های اولیه و دیگر اشکال معدنی اولیه حاصل شده از دورانهای زمین‌شناسی است. اشکال معدنی فسفر در خاک به شکل کانی‌های اولیه از قبیل آپاتیت، هیدروکسی‌آپاتیت یا اُکسی‌آپاتیت یافت می‌شود و به صورت صخره‌های لایه‌ای هستند که ویژگی اصلی آنها نامحلول بودن آن‌ها است. به رغم این موضوع، بزرگترین منبع این عنصر در خاک به شمار می‌روند و تحت شرایط مناسب می‌توانند به شکل محلول درآیند و برای گیاهان و ریزسازواره‌ها قابل استفاده گردند. در خاک‌های اسیدی، فسفات معدنی همراه با اکسیدهای آبدار Fe، Al و Mn یافت می‌شود که درجه انحلال و قابلیت جذب آن ضعیف می باشد. این ویژگی خاک‌های فرالیتی[1] است (Rodriguez & Fraga, 1999; Gyaneshwar et al., 2002).

اغلب خاک‌های کشاورزی منابع بزرگی از فسفر را دارا می باشند، بخش قابل ملاحظه‌ای از آن در نتیجه تجمع حاصل از کاربرد منظم کودهای فسفره است. بنابراین بخش زیادی از فسفات معدنی محلول که به شکل کود شیمیایی به خاک اضافه می‌شود تثبیت شده و برای گیاهان غیرقابل جذب می‌گردد (Rodriguez & Fraga, 1999; Gyaneshwar et al., 2002). در نتیجه نزدیک به 80% فسفر اضافه شده به خاک ممکن است در نتیجه تثبیت آلی و معدنی برای گیاهان غیر قابل جذب شود (Raghothama & Karthikeyan, 2005).

پدیده تثبیت و رسوب فسفر در خاک معمولاً به نوع خاک و pH آن بستگی دارد. بنابراین در خاک‌های اسیدی، فسفر به وسیله اکسیدها و هیدروکسیدهای Fe و Al تثبیت می‌شود در حالی که در خاک‌های قلیایی این کار به وسیله کلسیم انجام می‌گیرد و باعث کاهش راندمان کودهای فسفر در خاک می‌گردد (Rodriguez & Fraga, 1999; Gyaneshwar et al., 2002).

دومین جزء مهم فسفر در خاک ماده آلی است. اَشکال آلی فسفر ممکن است 30-50 درصد کل فسفر را در اغلب خاک ها به خود اختصاص دهد، گرچه که ممکن است از 5% تا 95% در نوسان باشد. فسفر آلی در خاک بیشتر به شکل فیتات[2] (اینوزیتول فسفات) می باشد. فیتات به وسیله ریزسازواره‌ها و گیاهان ساخته می‌شود و پایدارترین شکل فسفر آلی در خاک است به طوری که تا بیش از 50% فسفر آلی را تشکیل می‌دهد. دیگر ترکیبات فسفر آلی در خاک به شکل فسفومونواسترها، فسفودی‌استر ها (فسفولیپیدها و اسیدهای نوکلئیک) و فسفوتری‌استرها هستند (Rodriguez & Fraga, 1999; Gyaneshwar et al., 2002).

از کل فسفر آلی در خاک تقریباً 1% به اسیدهای نوکلئیک یا مشتقات آنها اختصاص دارد. مطالعات مختلف نشان داده است که تنها تقریباً 5-1 میلی گرم در کیلوگرم فسفر موجود در خاک از نوع فسفر به کار رفته در ساختار فسفولیپیدها است، گر چه این رقم تا 34 میلی گرم در کیلوگرم هم گزارش شده است (Rodriguez & Fraga, 1999).

[1] - Ferralitic soil
[2] - Phytate