اثر رشد گلدانی پنبه تراریخته Bt روی باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری خاک

زهرا السادات شاهمرادی، مسعود توحیدفر، حسن مرعشی[1]، سعید ملک‌زاده-شفارودی و ابراهیم کریمی

دانشجوی دکتری دانشگاه فردوسی مشهد؛ Za.shahmoradi@stu.um.ac.ir

دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی؛gtohidfar@abrii.ac.ir

استاد دانشگاه فردوسی مشهد؛ marashi@um.ac.ir

دانشیار دانشگاه فردوسی مشهد؛ malekzadeh-s@um.ac.ir

مربی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران؛ ekarimi@abrii.ac.ir

دریافت: 96/4/28 و پذیرش: 96/12/22

چکیده

در این مطالعه، پنبه تراریخته (Bt) *Bacillus thuringiensis* نسل T2 (لاین 61) و پنبه غیرتراریخته برای بررسی پویایی باکتری‌ها در طی دوره‌های رشد و نمو (نونهالی، تشکیل کاسبرگ، گلدهی و تشکیل غوزه) با استفاده از دو روش قابل کشت (شمارش کلنی‌های زنده) و غیرقابل کشت PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد باکتری‌های–عملکردی تثبیت‌کننده نیتروژن، حل‌کننده فسفات معدنی و آلی ناحیه ریزوسفر از طریق کشت در محیط‌های ویژه رشد باکتری تعیین شد. آنالیز شمارش کلونی‌های زنده، افزایش در ساختار جمعیت و تعداد کل باکتری‌های ریزوسفر را در هر دو واریته تراریخته و غیرتراریخته در مقایسه با خاک غیرریزوسفری را نشان داد. روش PCR-DGGE موید نتایج ارزیابی شمارش کلونی‌های زنده بود که تغییرات در جمعیت‌های باکتری‌ها برای تمام مراحل رشدی پنبه در خاک ریزوسفر و غیرریزوسفری را نشان می‌داد. تعداد باکتری‌های عملکردی میان پنبه تراریخته Bt و پنبه غیرتراریخته در یک مرحله مشخص اختلاف معنی‌دار نداشت. با این وجود اختلاف معنی‌دار در تعداد جمعیت باکتری‌های ریزوسفر خاک در مراحل مختلف رشدی در هر دو گیاه تراریخته و غیرتراریخته مشاهده شد ولی برای خاک غیرریزوسفری مشاهده نشد. در مجموع نتایج نشان داد، پنبه تراریخته Bt نسل T2 (لاین 61) احتمال وجود اثرات نامطلوب روی ساختار جمعیت و تعداد کل باکتری‌های قابل کشت در ناحیه ریزوسفر را نداشت.

واژه‌های کلیدی: تکنیک DGGE، جمعیت میکروبی، خاک ریزوسفر

---

1. نویسنده مسئول، آدرس: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، دپارتمان بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات

مقدمه

پنبه یکی از مهمترین گیاهان الیافی با ویژگی‌های انحصاری به عنوان یک گیاه تجاری است، که به طور گسترده در دنیا کشت می‌شود. در ایران، پنبه چهارمین گیاه صنعتی مهم بعد از کلزا، نیشکر و چغندر قند به شمار می‌رود. کرم قوزه یکی از مهم‌ترین آفات گیاه پنبه است که سالانه خسارت زیادی به مزارع پنبه وارد می‌کند. کرم قوزه دارای میزبان‌های زراعی و علف‌های هرز زیادی است، لاروهای آن از برگ گیاه تغذیه کرده سپس به غنچه و گل و قوزه حمله نموده، از الیاف تغذیه می‌کنند و باعث کاهش کیفیت الیاف می‌شوند (ایکوز و استوتزکی، 2008). امروزه با ظهور زیست‌فناوری کشاورزی، گیاهان تراریخته با عملکرد بیشتر و صفات بهبود یافته برای مقاومت در مقابل آفات، پاتوژن‌ها، تحمل علف‌کش‌ها، همچنین بهبود توانایی تحمل تنش‌های محیطی و ... تولید شده‌اند. در ایران نیز برای اولین بار در سال 1380 با استفاده از فنآوری مهندسی ژنتیک و انتقال ژن‌های ضد آفت کرم قوزه *cry1Ab* ، پنبه مقاوم به آفات تولید گردید. پروتئین‌های حشره کش تولید شده توسط باکتری *Bacillus thuringiensis* یک ابزار مؤثر برای کنترل طیف وسیعی از آفات هستند و بیش از 40 سال است که از این فراورده‌ها در کشاورزی به عنوان حشره‌کش استفاده می‌شود.

با توجه به افزایش روزافزون استفاده از گیاهان تراریخته، نگرانی‌هایی در مورد تأثیر این گیاهان بر روی سلامتی انسان و موجودات غیر هدف و اکوسیستم‌های خاک به ویژه ریزجانداران وجود دارد. از میان این نگرانی‌های اکولوژیکی، یکی از مهمترین مسائل برای بررسی، تأثیر گیاهان تراریخته روی جوامع میکروبی خاک است (ایکوز و استوتزکی، 2008؛ لیو و همکاران، 2004؛ برونسما و همکاران،2003).

جمعیت‌های میکروبی خاک، هم از نظر زیست‌توده و هم از نظر فعالیت، جانداران غالب خاک هستند (ایکوز و استوتزکی، 2008). آن‌ها در فعالیت‌های مهمی‌از جمله تجزیه مواد آلی، مواد مغذی معدنی، تجزیه مواد شیمیایی کشاورزی و بهبود ساختار خاک، نقش اساسی دارند (وی و همکاران، 2012؛ ایکوز و استوتزکی، 2008) . ترکیبات فلور میکروبی خاک نتیجه واکنش متقابل بین ترشحات ریشه، خاک و شرایط محیطی است (برگ و اسمالا، 2009؛ جیوانتی و همکاران، 2005). ترشحات ریشه نقش کلیدی در انتخاب فلور میکروبی و اثر انتخابی رشد میکروب‌ها ایفا می‌کند (وی و همکاران، 2012). در واقع ویژگی‌های کمیتی و کیفیتی ترشحات ریشه ممکن است به طور گسترده تنوع ساختاری و عملکردی جمعیت‌های میکروبی خاک را تغییر دهد (زمان و همکاران، 2015؛ هینسینگر و همکاران، 2009؛ بروستی و همکاران، 2004). از آنجایی که گیاهان تراریخته حداقل دارای یک پروتئین اضافی هستند حضور این پروتئین اضافی در ترشحات ریشه "ممکن است" دارای تأثیرگذاری احتمالی بر روی جمعیت میکروبی ناحیه ریزوسفر باشد (چن و همکاران، 2012؛ فیلون، 2008؛ ایکوز و استوتزکی، 2008؛ رویی و همکاران، 2005؛ زو و همکاران، 2005).

دانش ما در مورد تنوع میکروبی خاک به این علت که بسیاری از گروه‌های میکروبی در شرایط آزمایشگاهی قابل کشت نیستند، محدود و جزئی است (شمیت و والدرون، 2015). تقریباً 1% از جمعیت میکروبی خاک با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی استاندارد قابل کشت هستند (وانگ و همکاران، 2013؛ تورسویک و کیوریس، 2002). بیشتر اطلاعات در مورد ترکیبات طبیعی جمعیت‌های میکروبی از طریق تکنیک‌های غیرمستقیم میکروبیولوژی بدست آمده است. امروزه محققان با استفاده از روش‌های مولکولی مستقل از کشت نظیر DGGE استفاده می‌کنند تا این کمبود اطلاعات را تا حدودی جبران کنند (هیرش و همکاران، 2010؛ فیلون، 2008). به طور کلی، بهترین راهکار برای بدست آوردن نتایج خوب، استفاده از ترکیب هر دو روش در این زمینه است.

مطالعات زیادی در دنیا در مورد اثر گیاهان تراریخته بر روی فلور میکروبی صورت گرفته است. بنابراین با توجه به اهمیت گیاهان تراریخته و اثرات آن‌ها و همچنین فلور میکروبی مختلف هر منطقه، بررسی اثر کشت پنبه تراریخته Bt بر جمعیت میکروبی خاک مزارع پنبه کشور از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف این مطالعه بررسی اثر پنبه تراریخته Bt روی جمعیت باکتری‌های خاک در شرایط گلخانه بود. بدین منظور، از دو روش شمارش کلنی‌های زنده و DGGE برای آنالیز اثر پنبه تراریخته روی جمعیت میکروبی خاک ریزوسفر استفاده شد. نتایج این تحقیق می تواند به شفاف‌سازی پتانسیل خطر محیطی پنبه تراریخته Bt روی اکوسیستم خاک کمک کند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و خاک

خاک از لایه‌های سطحی (20-0 سانتیمتر) مزرعه پنبه‌ای در ورامین جمع‌آوری شد، جایی که تاکنون هیچ پنبه تراریخته‌ای در آن کشت نشده است. خاک به

درون گلدان‌ها اضافه و سپس به گلخانه تراریخته پژوهشگاه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ایران منتقل شد. از پنبه تراریخته Bt نسل T2 (لاین 61) و پنبه والدی به عنوان گیاه شاهد در این آزمایش استفاده شد (توحیدفر و همکاران، 2008).

نمونه‌برداری از خاک

بذرهای پنبه تراریخته و غیرتراریخته به صورت طرح کامل تصادفی با 4 تکرار درون گلدان تحت شرایط کنترل شده دما، نور طبیعی و آبیاری منظم کاشته شدند. نمونه‌های خاک از ناحیه ریزوسفر (خاک چسبیده به ریشه و متاثر از ترشحات ریشه) و غیرریزوسفری (خاک غیر متاثر از ترشحات ریشه یا همان خاک بالک) در 4 مرحله رشد و نموی مختلف یعنی نونهالی، شروع تشکیل کاسبرگ، گلدهی و زمان تشکیل قوزه برای هر دو گیاه تراریخته و غیرتراریخته (به عنوان شاهد) در طول 60 روز جمع‌آوری شدند. همه نمونه‌ها برای آنالیزهای بعدی به سرعت در دمای 20- درجه سانتیگراد ذخیره شدند.

شمارش کلنی‌های زنده

کل باکتری‌های قابل کشت با استفاده از روش سری رقت شمارش شدند (بن- دیوید و دیویدسون، 2014). برای این کار 1 گرم از خاک‌های نمونه‌برداری شده (4 تکرار از هر مرحله رشدی نمونه برداری شده و با هم مخلوط شدند) در 9 میلی‌لیتر NaCl 0/9% مخلوط و به مدت 15 دقیقه تکان داده شد. میزان جمعیت باکتری‌ها به صورت واحد تشکیل دهنده کلنی (Colony Forming Units; cfu) از طریق پخش 100 میکرولیتر از رقت تهیه شده بر روی محیط کشت مناسب (محیط Tryptic Soy Agar, TSA برای رشد باکتری‌ها) با سه تکرار تعیین شد. پتری دیش‌ها در گرمخانه دمای 28 درجه سانتیگراد به مدت 3 روز نگهداری شدند و سپس کلونی‌ها برای تعیین جمعیت کل باکتری‌ها (cfu) قابل کشت شمارش شد. از همین روش برای شمارش و تعیین جمعیت باکتری‌های عملکردی قابل کشت نیز استفاده شد. از محیط کشت‌های اختصاصی برای تعیین باکتری‌های عملکردی مختلف استفاده شد: تثبیت‌کننده نیتروژن (10گرم گلوکز، 0/2 گرم KH_2PO_4، $MgSO_4_7H2O$ ، NaCl، 5 گرم $CaCO_3$، 0/1 گرم $CaSO_4_2H_2O$، 15 گرم آگار، pH7)، حل‌کننده فسفات معدنی (10گرم گلوکز، 0/5 گرم عصاره مخمر، 0/1 گرم $CaCl_2$، 0/3 گرم $MgSO_4_7H2O$، 2/5 گرم $Ca_3(PO_4)_2$، 15 گرم آگار، pH 7/2) و آلی (10گرم گلوکز، 0/5 گرم عصاره مخمر، 0/1 گرم $CaCl_2$، 0/3 گرم $MgSO_4_7H2O$، 2/5 گرم Fythic Acid، 15 گرم آگار، pH 7/2)(هو و همکاران، 2008؛ رویی و همکاران، 2005). در محیط کشت باکتری‌های حل‌کننده فسفات معدنی، کلونی‌هایی با هاله شفاف تولید می‌شود(هو و همکاران، 2008).

استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR[1])

استخراج DNA کل ژنومی با استفاده از کیت PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO) انجام شد. از جفت آغازگر F341-GC/R518 (توالی آغازگر رفت-′5 GC-clamp-CCTACGGGAGGCAGCAG-′3 و توالی برگشت ′5-ATTACCGCGGCTGCTGG-′3) برای تکثیر ناحیه متغیر V3 ژن 16S rRNA جمعیت باکتریای نمونه‌های ناحیه ریزوسفر و غیرریزوسفری استفاده شد (یوآن و همکاران، 2010). توالی GC شامل (-′5 CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGG ′3-GGCACGGGGGG) بود. تکثیر قطعه 16S rRNA با طول 180bp با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل BioRad iCycler) و طبق برنامه 5 دقیقه دمای 95°C، بعد از آن 35 سیکل (94 °C برای 60 ثانیه، 51 °C برای 60 ثانیه، 72 °C برای 30 ثانیه)، در آخر هم 72°C به مدت 10 دقیقه برای گسترش نهایی صورت گرفت. سنجش کمی محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز الکتروفورز (دستگاه الکتروفورز مدل BioRad Sub-Cell) انجام شد. سنجش کیفی محصول PCR و استخراج DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (مدل ThermoScientific Nanodrop 2000c) انجام گرفت.

اجرای DGGE

20 مایکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل اکریلامید 8% با شیب 20-50 % از مواد دناتوره کننده اوره و فرمامید با استفاده از دستگاه DCode (BioRad DCode System DGGE) الکتروفورز شد. محصول PCR با دمای 60 درجه سانتیگراد به مدت 4 ساعت با ولتاژ150 ولت الکتروفورز شد(وی و همکاران، 2012). سپس به مدت 15 دقیقه با اتیدیوم بروماید در شرایط تاریکی رنگ آمیزی شد. بعد از آن به مدت 15 دقیقه با آب مقطر دوبار استریل رنگ‌زدایی صورت گرفت و با استفاده از دستگاه ژل‌داک (مدل Syngene Gbox EF Gel Documentation System) الگوی باندها مشاهده و عکسبرداری شد. نتایج آنالیز کلاستر الگوهای باندی DGGE و رسم درخت تبارزایی با استفاده از ماتریس تشابه بر پایه ضریب تشابه دایس (Dice coefficients) و روش جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی (Group Pair Unweighted Method with Arithmetic Mean, UPGMA) با نرم افزار NTSYS ورژن2/1 انجام شد.

---

[1]. Polymerease Chain Reaction

آنالیز داده‌ها

آنالیزهای آماری برای شمارش میکروبی (Log_{10} cfu) به وسیله تجزیه واریانس یک طرفه وتست دانکن در سطح 5% با نرم افزار Excel و SAS ورژن 9/4 انجام شد.

نتایج و بحث

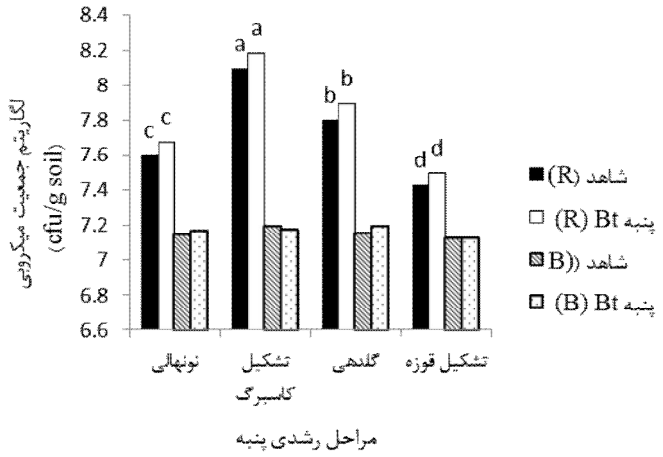
روش قابل کشت

نتایج نشان داد که تغییرات صورت گرفته در جمعیت باکتری‌های قابل کشت ناحیه ریزوسفر گیاه پنبه تراریخته از یک روند مشابه با جمعیت باکتری‌های قابل کشت ناحیه ریزوسفر پنبه غیرتراریخته پیروی کرد. آنالیز داده‌ها همچنین نشان داد که هیچ اختلاف معنی‌داری در اندازه جمعیت باکتری‌های خاک ریزوسفر و غیرریزوسفری بین گیاه پنبه Bt و والدی در یک مرحله رشدی مشابه، وجود ندارد (جدول1). اختلاف معنی‌دار در جمعیت باکتری‌های ریزوسفر خاک بین مراحل رشدی مختلف برای هر دو گیاه تراریخته و شاهد مشاهده شد، ولی این اختلاف برای خاک غیرریزوسفری وجود نداشت. بیشترین جمعیت باکتری ریزوسفری در مرحله رشدی تشکیل کاسبرگ یافته شد که در مراحل بعدی یعنی گلدهی و تشکیل قوزه در هر دو گیاه شاهد و تراریخته کاهش یافت (شکل1).

جدول 1- تجزیه واریانس جمعیت کل باکتری‌ها و باکتری‌های عملکردی در خاک ریزوسفری پنبه تراریخته Bt و غیرتراریخته

نوع باکتری	واریته	خطا	مراحل رشدی	خطا
کل باکتری‌ها	0/004 n.s	0/127	1/11*	0/256
باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن	0/019 n.s	0/068	0/561*	0/003
باکتری‌های حل‌کننده فسفات معدنی	0/00002 n.s	0/027	0/22*	0/001
باکتری‌های حل‌کننده فسفات آلی	0/001 n.s	0/0136	0/112*	0/0005

*: در سطح 5 درصد معنی‌دار است؛ n.s : غیرمعنی‌دار است

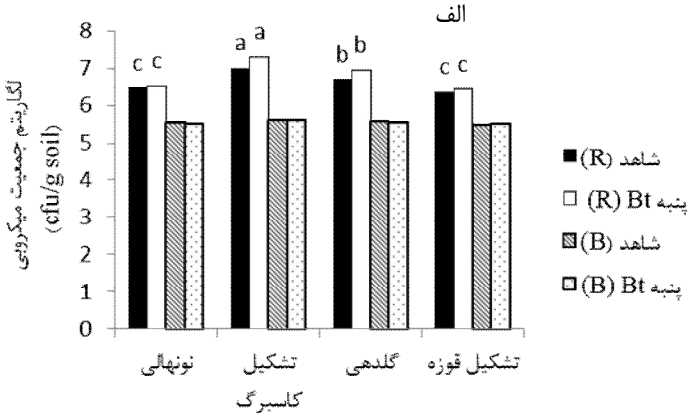


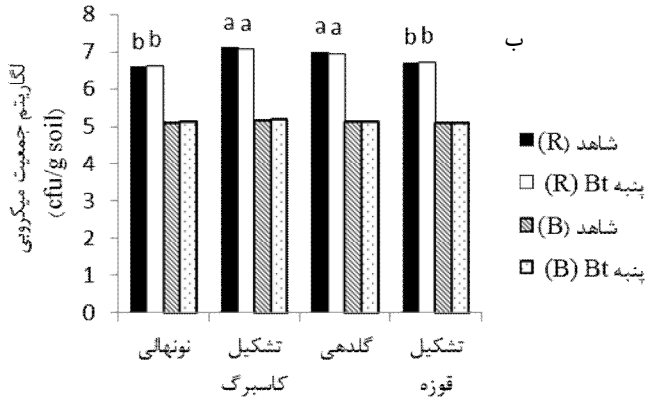
شکل 1- مقایسه میانگین جمعیت باکتری‌های خاک ریزوسفری(R) و غیر ریزوسفری(B) در مراحل رشدی مختلف گیاه پنبه تراریخته Bt و شاهد

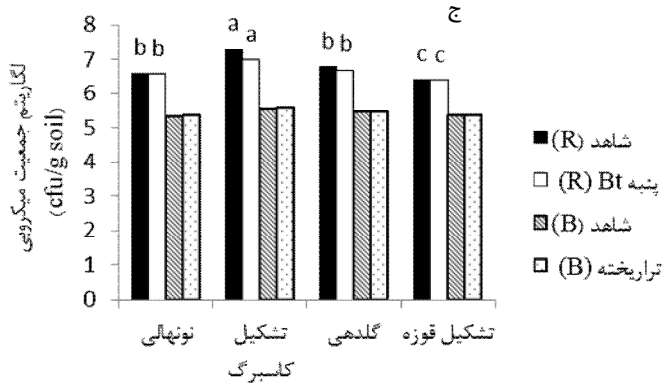
نتایج نشان داد که تغییرات در تعداد جمعیت باکتری‌های عملکردی قابل کشت ناحیه ریزوسفر گیاه پنبه تراریخته از یک روند مشابه با جمعیت باکتری‌های قابل کشت ناحیه ریزوسفر پنبه غیرتراریخته پیروی می‌کند (شکل2). طبق جدول 1 هیچ اختلاف معنی‌داری بین باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن قابل کشت ریزوسفر پنبه تراریخته Bt و غیرتراریخته در مراحل رشدی مشابه وجود نداشت. اختلاف معنی‌داری بین مراحل رشدی مختلف نونهالی، تشکیل کاسبرگ، گلدهی و تشکیل قوزه هم برای پنبه تراریخته و هم غیرتراریخته مشاهده شد (الف-2).

طبق جدول1 نتایج هیچ اختلاف معنی‌داری را در اندازه جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات آلی در خاک ریزوسفر بین پنبه تراریخته و شاهد در طی مراحل رشدی یکسان نشان نداد. همانطور که در شکل (ب-2) مشخص است، اختلاف معنی‌دار در جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات آلی ریزوسفر خاک بین مراحل رشدی گلدهی و تشکیل کاسبرگ برای هر دو گیاه تراریخته و شاهد وجود نداشت و در این دو مرحله رشدی جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات آلی ریزوسفر بیشترین اندازه را دارا بودند. همچنین هیچ اختلاف معنی‌داری در اندازه جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات معدنی در خاک ریزوسفر بین پنبه تراریخته Bt و شاهد در طی مراحل رشدی مشابه مشاهده نشد. همچنین اختلاف معنی‌داری بین مراحل رشدی و همچنین بین واریته‌های تراریخته و شاهد در جمعیت باکتریایی خاک بالک یافته نشد (شکل ج-2).

این نتایج مشابه با نتایج هو و همکارانش (2008) بود، به طوری که آنها هیچ اختلاف معنی‌داری بین خاک ریزوسفری پنبه تراریخته Bt و پنبه غیرتراریخته در تعداد باکتری‌های عملکردی طی چهار مرحله نمونه‌برداری در چهار مزرعه نیافتند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر ایکوز و استوتزکی (2008) گزارش کردند که به طور آماری اختلاف معنی‌داری در جمعیت ریزجانداران، فعالیت آنزیمی آنها و pH بین خاک ذرت تراریخته Bt و ذرت غیرتراریخته بعد از چهار سال کشت متوالی ذرت وجود نداشت. علاوه بر این، لی و همکارانش (2011) ثابت کردند که کشت طولانی مدت پنبه تراریخته تغییر معنی‌داری روی ساختار جمعیت باکتری‌ها، اکتینومیست‌ها و قارچ‌ها ندارد. رویی و همکارانش (2005) نشان دادند که همبستگی بین سطوح توکسین Bt و تعداد باکتری‌های عملکردی قابل کشت وجود ندارد و عنوان کردند که توکسین Bt ممکن نیست به طور مستقیم باعث تغییر تعداد باکتری‌های عملکردی ریزوسفر شود. همچنین لیو و همکاران در سال 2015 یافتند که حضور کلزای تراریخته در جمعیت خردل وحشی هیچ اثر مستقیمی روی نماتدها و جوامع میکروبی خاک ندارد. نتایج حاصله از این آزمایش یعنی عدم اختلاف معنی‌دار بین خاک ریزوسفر پنبه تراریخته Bt و پنبه غیرتراریخته در تعداد باکتری‌های عملکردی قابل کشت در طی یک دوره رشدی مشابه، می‌تواند امکان ایمنی گیاهان تراریخته نسبت به ریزجانداران خاک را نشان دهد.





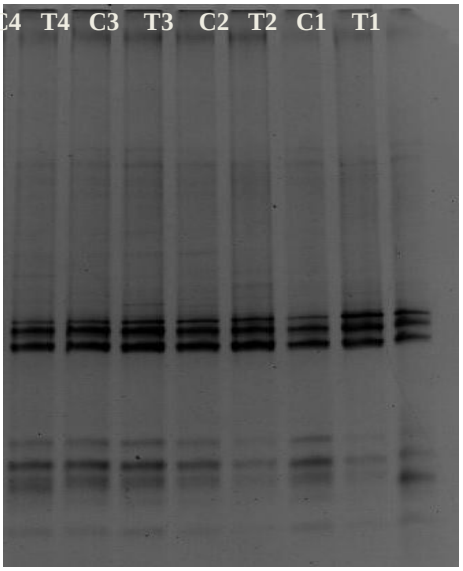


شکل 2- مقایسه میانگین جمعیت باکتری‌های عملکردی خاک ریزوسفری(R)و غیرریزوسفری (B) در مراحل رشدی مختلف گیاه پنبه تراریخته Bt و شاهد. الف) تثبیت‌کننده نیتروژن ب) حل‌کننده فسفات آلی ج) حل‌کننده فسفات معدنی خاک

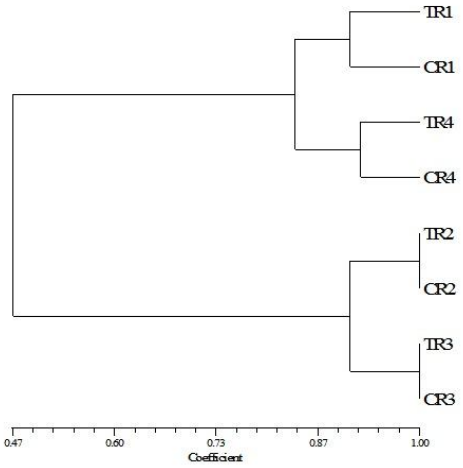
روش غیرقابل کشت

طبق نتایج روش غیرقابل کشت، محصولات PCR برای ژن 16S rRNA الگوهای باندی تقریباً مشابهی برای گیاهان تراریخته و غیرتراریخته نشان داد (شکل3). نتایج حاصل از خوشه‌بندی پروفایل باکتری‌ها در ریزوسفر گیاه تراریخته Bt و شاهد نشان داد که در مراحل رشدی یکسان گیاه تراریخته و کنترل در یک گروه قرار دارند. در دندروگرام باکتری‌ها (شکل4)، مشاهده می‌گردد که نمونه‌های مرحله‌های رشدی تشکیل کاسبرگ وگلدهی برای هر دو گیاه تراریخته و شاهد در یک گروه قرار گرفته‌اند که بیشترین رشد باکتری‌ها نیز مربوط به این دو مرحله رشدی است. در دندروگرام باکتری‌ها (شکل4) نمونه‌های مرحله رشدی نونهالی و تشکیل قوزه در یک شاخه مجزا قرار گرفته‌اند. این نوع کلاستربندی مشخص می‌کند که تاثیر مراحل رشد و نموی پنبه روی جمعیت‌های میکروبی خاک بیشتر از تأثیر واریته پنبه تراریخته بودند.

آنالیزهای مولکولی نیز ارزیابی‌های بر پایه پلیت را که نشان دهنده تغییرات در جوامع باکتری‌ها برای تمام مراحل نموی در ناحیه ریزوسفر بودند را تأیید کرد. این بدان معنی است که پنبه تراریخته در مقایسه با پنبه کنترل، اثر منفی روی جمعیت میکروبی خاک ندارد. همچنین نتایج مشابهی توسط ژانگ و همکاران در سال 2015 ارایه شد، نتایج آنها نشان داد که تغییرات معنی‌داری مرتبط با اثر مراحل رشدی پنبه در تعداد باکتری‌ها، قارچ‌ها و اکتینومیست‌های ریزوسفر خاک وجود دارد، ولی اختلاف معنی‌داری در اندازه و ساختار جمعیت میکروبی خاک ریزوسفر بین پنبه تراریخته Bt (NC 33B) و پنبه غیرتراریخته وجود نداشت.



شکل 3- پروفایل DGGE آمپلیکون‌های PCR مربوط به 16S rRNA در نمونه‌های خاک ریزوسفری مورد آزمایش. پنبه تراریخته (T)، پنبه غیرتراریخته (C)، شماره‌های 1 تا 4 هم چهار مرحله رشدی نونهالی، تشکیل کاسبرگ، گلدهی و تشکیل قوزه



شکل 4- درخت تبارزایی برای باکتری‌های خاک ریزوسفر پنبه تراریخته Bt و غیرتراریخته در 4 مرحله رشدی. پنبه تراریخته Bt (T)، پنبه غیرتراریخته (C)، مراحل رشدی مختلف (R از شماره 1 تا 4 به ترتیب شامل مرحله نونهالی، تشکیل کاسبرگ، گلدهی و تشکیل قوزه)

نتیجه‌گیری

خاک محیطی پیچیده و مخزنی بزرگ از تنوع ژنتیک میکروبی است (راجندران و گوناسکران، 2008). تنوع ریزجانداران خاک بسیار زیاد است و از آن به عنوان جعبه سیاه خاک یاد می‌کنند. به همین دلیل آمار دقیقی از گونه‌های ریزجانداران و تعداد آنها نمی‌توان به دست آورد (اسکولز و همکاران، 2013؛ برندسن و همکاران، 2012). پیچیدگی تنوع میکروبی از چندین پارامتر و فاکتور متقابل حاصل می‌شود، یکی از مهمترین این فاکتورها واکنش متقابل جمعیت‌های میکروبی با گیاهان و محیط زیست اطرافشان است. ترشحات ریشه گیاهان ممکن است اثرات مختلفی بر روی بقا، رشد و نمو ریزجانداران خاک داشته و باعث تغییر در اکوسیستم خاک شود. در حقیقت، ارتباط بین گیاهان و میکروب‌های خاک می‌تواند ترکیبات جمعیت میکروبی ریزوسفر را تغییر دهد. عملکرد و فعالیت ریزجانداران ریزوسفر بسته به گونه گیاهی یا واریته و مراحل رشد و نمو گیاه، دارد (فیلون، 2008).

داده‌های این مطالعه نشان داد که جمعیت باکتری‌های ریزوسفر خاک به طور قابل ملاحظه‌ای در مراحل رشدی مختلف تغییر می‌کند، اما هیچ اختلاف معنی‌داری بین جوامع میکروبی پنبه تراریخته و شاهد وجود نداشت. برای جمعیت باکتری‌های عملکردی قابل کشت نیز اختلاف معنی‌داری بین خاک ریزوسفر پنبه تراریخته و پنبه غیرتراریخته در مرحله رشدی مشابه مشاهده نشد. مطالعات زیادی با روش‌های گوناگون بر روی اثرات محصولات Bt (مثل ذرت، پنبه، برنج، کلزا، سیب زمینی، توتون) روی جمعیت‌های میکروبی صورت گرفته است و اثرات مختلفی از این محصولات، روی جمعیت‌های میکروبی در خاک گزارش شده است. با این وجود، برای به دست آوردن دانش بهتر و جامع‌تر در مورد اثر گیاهان تراریخته روی جمعیت میکروبی خاک و کسب یک مفهوم کامل‌تر در مورد تنوع میکروبی، همچنان نیاز به استفاده از تکنولوژی‌های دیگر مثل توالی‌یابی‌های نسل بعد (Next Generation Sequencing, NGS) و تکرار آزمایشات در سطح مزرعه وجود دارد.

تشکر و قدردانی

از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (کرج) به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات لازم برای اجرای این مطالعه سپاسگزاری می‌شود.

فهرست منابع:

1. Ben-David, A. and Davidson, C.E. 2014. Estimation method for serial dilution experiments. Journal of microbiological methods 107:214-221. DOI: 10.1016 / j.mimet. 2014.08.023
2. Berendsen, R L., Pieterse, C M.J. and Bakker, P A.H.M. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in plant science 17:8. DOI:10.1016/j.tplants.2012.04.001
3. Berg, G. and Smalla, K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. FEMS microbiology ecology 68:1–13. DOI:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x
4. Bruinsma, M., Kowalchuk, G.A. and Van Veen, J.A. 2003. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. Biology and Fertility of Soils 37:329–337. DOI:10.1007/s00374-003-0613-6
5. Brusetti, L., Francia1, P., Bertolini, C., Pagliuca, A., Borin, S., Sorlini, C., Abruzzese, A., Sacchi, G., Viti, C., Giovannetti, L., Giuntini, E., Bazzicalupo, M. and Daffonchio, D. 2004. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non-transgenic counterpart. Plant and Soil 266:11–21.
6. Castaldini, M., Turrini, A., Sbrana, C., Benedetti, A., Marchionni, M., Mocali, S., Fabiani, A., Landi, S., Santomassimo, F., Pietrangeli, B., Nuti, M.P., Miclaus, N. and Giovannetti, M. 2005. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. Applied and environmental microbiology 71:6719–6729. DOI:10.1128/AEM.71.11.6719-6729
7. Chen, Z.H., Chen, L.J. and Wu, Z.J. 2012. Relationships among persistence of *Bacillus thuringiensis* and Cowpea trypsin inhibitor proteins, microbial properties and enzymatic activities in rhizosphere soil after repeated cultivation with transgenic cotton. Applied soil ecology 53:23–30. DOI:10.1016/j.apsoil.2011.10.019
8. Filion, M. 2008. Do transgenic plants affect rhizobacteria populations?. Microbial biotechnology 1(6):463–475. DOI:10.1111/j.1751-7915.2008.00047.x
9. Giovannetti, M., Sbrana, C. and Turrini, A. 2005. The impact of genetically modified crops on soil microbial communities. In: Rivista di Biologia/Biology Forum 98:393-418.
10. Hinsinger, P., Glyn Bengough, A., Vetterlein, D. and Young, I.M. 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. Plant and Soil 321:117–152. DOI:10.1007/s11104-008-9885-9

11. Hirsch, P.R., Mauchline, T.H. and Clark, I.M. 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. Soil Biology and Biochemistry 42:878-887. DOI:10.1016/j.soilbio.2010.02.019
12. Hu, H.Y., Liu, X.X., Zhao, Z.W., Sun, J.G., Zhang, Q.W., Liu, X.Z. and Yu, Y. 2008. Effects of repeated cultivation of transgenic Bt cotton on functional bacterial populations in rhizosphere soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25 (3): 357-366. DOI:10.1007/s11274-008-9899-8
13. Icoz, I. and Stotzky, G. 2008. Fate and effects of insect-resistant Bt crops in soil ecosystems. Soil Biology and Biochemistry 40:559–586. DOI: 10.1016 / j.soilbio. 2007.11.002
14. Li, X.G., Liu, B., Cui, J.J., Liu, D.D., Ding, S., Gilna, B., Luo, J.Y., Fang, Z.X., Cao W. and Han, Z.M. 2011. NO evidence of persistent effects of continuously planted transgenic insect-resistant cotton on soil microorganisms. Plant and Soil 339:247–257. DOI:10.1007/s11104-010-0572-2
15. Liu, B., Q. Zeng, F. Yan, H. Xu and C. Xu. 2004. Effects of Transgenic Plants on Soil Microorganisms. Plant and Soil 271:1-13. DOI:10.1007/s11104-004-1610-8
16. Liu,W., Lu, H.H., Wu, W.X., Wei, Q.K., Chen, Y.X. and Thies, J.E. 2008. Transgenic Bt rice does not affect enzyme activities and microbial composition in the rhizosphere during crop development. Soil Biology and Biochemistry 40:475–486.
17. Liu, Y., Li, J., Jr, C. N. S., Luo, Z. and Xiao. N. 2015. The effects of the presence of Bt-transgenic oilseed rape in wild mustard populations on the rhizosphere nematode and microbial communities. Science of the Total Environment 530-531:263-270.
18. Rajendhran, J. and Gunasekaran, P. 2008. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. Biotechnology advances 26: 576 – 590. DOI: 10.1016 / j.biotechadv. 2008.08.002
19. Rui, Y.K., Yi, G.X., Zhao, J., Wang, B.M., Li, Z.H., Zhai, Z.X., He, Z.P. and Li, Q. 2005. Changes of Bt toxin in the rhizosphere of transgenic Bt cotton and its influence on soil functional bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21:1279–1284. DOI:10.1007/s11274-005-2303-z
20. Saxena, D. and Stotzky, G. 2001. Bacillus thuringiensis (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. Soil Biology and Biochemistry 33:1225–1230. DOI:10.1016/S0038-0717(01)00027-X
21. Schmidt, T.M. and Waldron, C. 2015. Microbial diversity in soils of agricultural landscapes and its relation to ecosystem function. Pages 135-157 In: Hamilton SK, Doll JE, Robertson GP (eds) The Ecology of Agricultural Landscapes: Long-Term Research on the Path to Sustainability. Oxford University Press, New York, USA.
22. Schulz, S., Brankatschk, R., D¨umig, A., K¨ogel-Knabner, I., Schloter, M. and Zeyer, J. 2013. The role of microorganisms at different stages of ecosystem development for soil formation. Biogeosciences 10:3983–3996.
23. Tohidfar, M., Ghareyazie, B., Mousavi, M. and Yazdani, S. 2008. Agrobacterium mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a synthetic *cry1Ab* gene for enhanced resistance against *Heliothis armigera*. Iranian Journal of Biotechnology 6:164-173.
24. Turrini, A., Sbrana, C., Nuti, M.P., Pietrangeli, B. and Giovannetti, M. 2004. Development of a model system to assess the impact of genetically modified corn and aubergine plants on arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil 266:69–75.
25. Torsvik, V. and Øvreås, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Current opinion in microbiology 5:240–245. DOI:10.1016/S1369-5274(02)00324-7

26. Wei, M., Tan, F., Zhu, H., Cheng, K., Wu, X., Wang, J., Zhao, K. and Tang, X. 2012. Impact of Bt-transgenic rice (SHK601) on soil ecosystems in the rhizosphere during crop development. Plant, Soil and Environment 58 (5): 217–223.
27. Xue, K., Luo, H.F., Qi, H.Y. and Zhang, H.X. 2005. Changes in soil microbial community structure associated with two types of genetically engineered plants analyzing by PLFA. Journal of Environmental Sciences (China) 17:130–134.
28. Yuan, X., Xu, J., Chai, H., Lin, H., Yang, Y., Wo, X. and Shi, J. 2010. Differences of rhizo-bacterial diversity and the content of peimine and peiminine of *Fritillaria thunbergii* among different habits. Journal of Medicinal Plants Research 4(6):465-470. DOI:10.5897/JMPR09.484
29. Zaman, M., Mirza, M.S., Irem, S., Zafar, Y. and Rahman, M.-ur. 2015. A Temporal Expression of Cry1Ac Protein in Cotton Plant and its Impact on Soil Health. International Journal of Agriculture & Biology 17:280-288.
30. Zhang, Y.-J., Xie, M., Wu, G., Peng, D.-L. and Yu, W.-B. 2015. A 3-year field investigation of impacts of Monsanto's transgenic Bt-cotton NC 33B on rhizosphere microbial communities in northern China. Applied soil ecology 89: 18 – 24. DOI: 10.1016 / j.apsoil. 2015.01.003

Effect of Bt-transgenic Cotton Pot Cultivation on Rhizosphere and Non-Rhizosphere Bacterial Community

Z. S. Shahmoradi, M. Tohidfar, H. Marashi[1], S. Malekzadeh-shafaroudi, and E. Karimi

PhD student of Ferdowsi University of Mashhad; E-mail: Za.shahmoradi@stu.um.ac.ir
Associate professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Faculty of Energy Engineering and New Technology, Shahid Beheshti University; E-mail: gtohidfar@abrii.ac.ir
Professor, Ferdowsi University of Mashhad; E-mail: marashi@um.ac.ir
Associate professor, Ferdowsi University of Mashhad; E-mail: malekzadeh-s@um.ac.ir
Instructor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII); E-mail: ekarimi@abrii.ac.ir

Received: July, 2017 & Accepted: March, 2018

Abstract

In this study, effects of T_2 *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic cotton (line 61) and its non-transgenic line on bacterial dynamics were investigated during the cotton development stages (seedling, squaring, flowering and boll formation) using culturable (viable plate count) and unculturabale (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) assays. The number nitrogen-fixing bacteria, organic and inorganic phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere soil were also determined by cultivation on specific growth media. Viable plate count analysis showed an increase in the number of total bacteria in rhizosphere soils of both transgenic and non-transgenic cultivars as compared to the bulk soil. PCR-DGGE confirmed the results of viable plate count assays. No significant differences in number of functional bacteria were observed between rhizosphere soil of Bt transgenic and non-transgenic cotton at one particular stage. However, significant differences in bacterial population size in rhizosphere soil observed during the cotton development stages in both transgenic and non-transgenic plants, but not for bulk soil. The results indicated that Bt transgenic cotton (line 61) might have no adverse effects on community structures and total number of culturable bacteria in the rhizosphere.

Keywords: DGGE, Microbial communities, Rhizosphere soil

1. Corresponding author: Department of Biotechnology and plant breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran