Downloaded from journalofbiosafety.ir at 23:06 +0430 on Sunday September 20th 2020

مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶

بررسی تاثیر پنبه حاوی ژن *chi* بر روی جمعیت باکتریایی خاک

ابراهیم کریمی[۱] ، مسعود توحیدفر [۲]، سولماز خسروی[۳] و اکرم صادقی*[۴]

۱- کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، ۳- مربی پژوهشی بیوتکنولوژی کشاورزی، ۴- استادیار ژنتیک مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- دانشیار گروه مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

aksadeghi@abrii.ac.ir

چکیده

جمعیت‌های میکروبی عنصری کلیدی در کیفیت و حاصلخیزی خاک هستند. هدف این پژوهش مطالعه تاثیر پنبه تراریخته رقم کوکر حاوی ژن *chi* لوبیا بر جمعیت‌های باکتریایی خاک بود. لاین R8 به عنوان گیاه تراریخته حامل ژن *chi* حاصل از چهار بار تلاقی درون جمعیتی و لاین ۱۰۱۱ به عنوان شاهد غیر تراریخته (تیپ وحشی) تهیه شد و در گلخانه گیاهان تراریخته (سطح ایمنی ۲) واقع در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) کشت شد. نمونه برداری از خاک ناحیه ریزوسفر و بالک گیاهان ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روزه انجام شد. تعیین جمعیت باکتری کل و اکتینومیستها با استفاده از محیط TSA، آب آگار و ISP2 انجام شد. ماده وراثتی (دی ان ای) از یک گرم خاک و با استفاده از Ultra Clean soil DNA kit استخراج شد. سپس PCR–DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) برای نشان دادن تنوع باکتریایی در نمونه‌های خاک انجام شد. تعداد کل باکتری‌های قابل کشت در نمونه‌های خاک $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۷}$ واحد تشکیل دهنده کلنی (CFU) در هر گرم خاک خشک به ترتیب برای خاک بالک و رایزوسفر بود. تعداد باکتری کل و اکتینومیستهای خاک رایزوسفر گیاهان ۳۰ و ۶۰ روزه تراریخته بیشتر از شاهد غیر تراریخته بود. اگرچه در پایان دوره رشد (۹۰ روز پس از کشت بذر) جمعیت باکتریایی گیاه تراریخته و غیر تراریخته برابر بود. بررسی مولکولی بر اساس PCR–DGGE نیز الگوی مشابه‌ای را برای جمعیت کل باکتریایی و اکتینومیستی مشخص کرد. نتایج ارائه شده در این پژوهش تفاوت معنی داری را بین تعداد باکتری کل و اکتینومیستی موجود در خاک رایزوسفری و بالک پنبه تراریخته و غیر تراریخته در پایان دوره رشد گیاه (۹۰ روز) نشان نداد. علاوه بر این به نظر می‌رسد دوره رشد گیاه تاثیر قابل توجه‌ای بر جمعیت میکروبی دارد.

واژه‌های کلیدی: اکتینومیست، تراریخته، جمعیت باکتریایی، رایزوسفر، DGGE.

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 23:06 +0430 on Sunday September 20th 2020

مقدمه

پنبه (*Gossypium* spp) به علت استفاده در صنایع نساجی، تولید روغن و علوفه ارزش اقتصادی زیادی دارد و از گیاهان زراعی مهم دنیا است. پژمردگی ورتیسلیومی (*Verticillium* wilt) یکی از مهمترین بیماری‌های پنبه و از مشکلات اساسی برای تولید تجاری آن است. کنترل این بیمارگر گیاهی به وسیله قارچ‌کش مشکل است. قارچ به داخل بافت آوند چوب نفوذ می‌کند و می‌توانند به صورت سیستماتیک در تمام قسمت‌های گیاه گسترش پیدا کند (۱). کاشت گیاهان تراریخته با ویژگی مقاومت به آفات و بیماری‌ها به عنوان راهی ایمن برای محیط زیست توانایی بالقوه خوبی برای کاهش مصرف سموم شیمیایی در کشاورزی دارند (۲). در این تحقیق از پنبه تراریخته مقاوم به قارچ *ورتیسیلیوم داهلیا* (*Verticillium dahlia*) و حامل ژن کیتیناز لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) تحت کنترل پیشبر CaMV35S که در مطالعات قبلی تولید شده بود استفاده شد (۳). بزرگترین مزیت استفاده از این پنبه تراریخته کاهش مصرف قارچ‌کش شیمیایی برای مقابله با بیمارگرهای قارچی مانند *ورتیسیلیوم* که در مناطق کشت پنبه ایران شیوع زیادی دارد است (۴). اکتینومیست‌ها باکتری مفید خاک هستند که نقش مهمی در حاصلخیزی و بازگرداندن مواد عالی حاصل از تجزیه باقیمانده‌های محصولات کشاورزی به خاک دارند (۵). استفاده از گیاهان تراریخته به واسطه ناشناخته بودن تاثیرات احتمالی اجزای گیاه شامل ترشحات ریشه، برگ‌های بر زمین ریخته و باقیمانده‌های پس از برداشت بر فلور میکروبی خاک نگرانی‌هایی را به همراه دارد. در این پژوهش تاثیر پنبه تراریخته تولید شده توسط پژوهشگران ایرانی بر جمعیت یوباکتریاها و اکتینومیست‌های خاک در دوره‌های مختلف رشد گیاه مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

بررسی گلخانه‌ای و تهیه نمونه خاک

بذور پنبه رقم کوکر لاین ۱۰۱۱ به عنوان شاهد غیر تراریخته و لاین R8 (گیاه تراریخته حاصل از چهار بار تلاقی درون جمعیتی) در گلدان‌های پلی اتیلن ۲ کیلویی پر شده با خاک مزرعه پنبه واقع در ورامین کشت شد (شکل ۱). گلدان‌ها در گلخانه مخصوص گیاهان تراریخته (سطح ایمنی ۲) واقع در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی-کرج با شرایط مشابه مزرعه شامل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای روز ۳۰ درجه سلسیوس و دمای شب ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۵ درصد نگهداری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. نمونه‌برداری از خاک ناحیه بالک و رایزوسفر ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز پس از کشت بذر انجام شد. نمونه‌ها تا زمان بررسی در آزمایشگاه در فریزر با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی جمعیت میکروبی خاک

یک گرم از خاک بالک و یا ناحیه ریزوسفری به ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی حاوی ۰/۹ درصد کلرید سدیم اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در شیکر با دور rpm ۸۰ نگهداری شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل بر روی محیط جامد TSA (Tryptic Soy Agar) و یا آب آگار (۲۰ گرم آگار/ لیتر pH ۷/۲) ریخته و با استفاده از پاروی شیشه‌ای

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 23:06 +0430 on Sunday September 20th 2020

بر روی سطح محیط پخش شد. پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت کلنی‌های ظاهر شده بر روی محیط TSA و پس از یک هفته کلنی‌های تشکیل شده بر روی آب آگار شمارش شد. باکتری‌های مشاهده شده بر روی آب آگار برای اطمینان و بررسی مشخصات ظاهری به محیط اختصاصی ISP2 (۱۰ گرم در لیتر عصاره مالت، ۴ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۴ گرم در لیتر گلوکز و ۱۸ گرم در لیتر آگار با اسیدیته ۷/۲) منتقل شد.

آنالیز مولکولی جمعیت میکروبی با استفاده از سامانه DGGE

استخراج DNA از ۱ گرم خاک با استفاده از کیت استخراج دی ان آ از خاک (Ultra Clean soil DNA kit (MO BIO Laboratories, Inc)) و بر اساس دستورالعمل آن انجام شد. آنالیز PCR-DGGE (PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن 16s rRNA با توالی GCF357:5-CCTACGGGAGGCAGCAG-3; R518:5-ATTACCGCGGCTGCTGG-3 و GCStrepB: 5-ACAAGCCCTGGAAACGGGGT-3;StrepE:5-CACCAGGAATTCCGATCT-3 و گیره جی سی (GC clamp): CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGC CGCCCCCGCCCG برای آغازگر رو به جلو استفاده شد. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل دمای واسرشت اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه تکثیر با دمای واسرشت ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود (۶). محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از سامانه DGGE ساخت شرکت Bio-Rad و بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد محتوی شیب ۷۰-۲۰ درصد از مواد واسرشت کننده اوره و فرمامید و با دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ ساعت با ولتاژ ۱۵۰ ولت الکتروفورز شد. پس از الکتروفورز، ژل‌ها ظرف حاوی ژل رد (۱:۱۰۰۰ رقیق شده در آب مقطر) به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در شرایط تاریکی رنگ آمیزی و با استفاده از نور UV سیستم ژل داکیومنت (Syngene GBox Gel Documentation System) مشاهده شد (۷).

نتایج

بررسی وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تراریخته و غیر تراریخته (شاهد) وجود نداشت (داده‌ها نشان داده نشده است).

بررسی جمعیت باکتریایی خاک

بر اساس شمارش‌های انجام شده از سری رقت های خاک مشخص شد که در هر گرم خاک خشک رایزوسفر مضربی از $۱۰^{۷}$ و در ناحیه بالک مضربی از $۱۰^{۶}$ واحد تشکیل کلنی (cfu) وجود داشت. جمعیت باکتری در خاک ناحیه رایزوسفر و بالک اگر چه در دوره‌های مختلف رشد گیاه تغییر کرد اما در هر سه دوره و برای هر دو گروه تراریخته و غیر تراریخته در ناحیه رایزوسفر بیشتر از بالک بود. جمعیت باکتری رایزوسفر گیاه غیر تراریخته ۳۰، ۶۰ و

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 23:06 +0430 on Sunday September 20th 2020

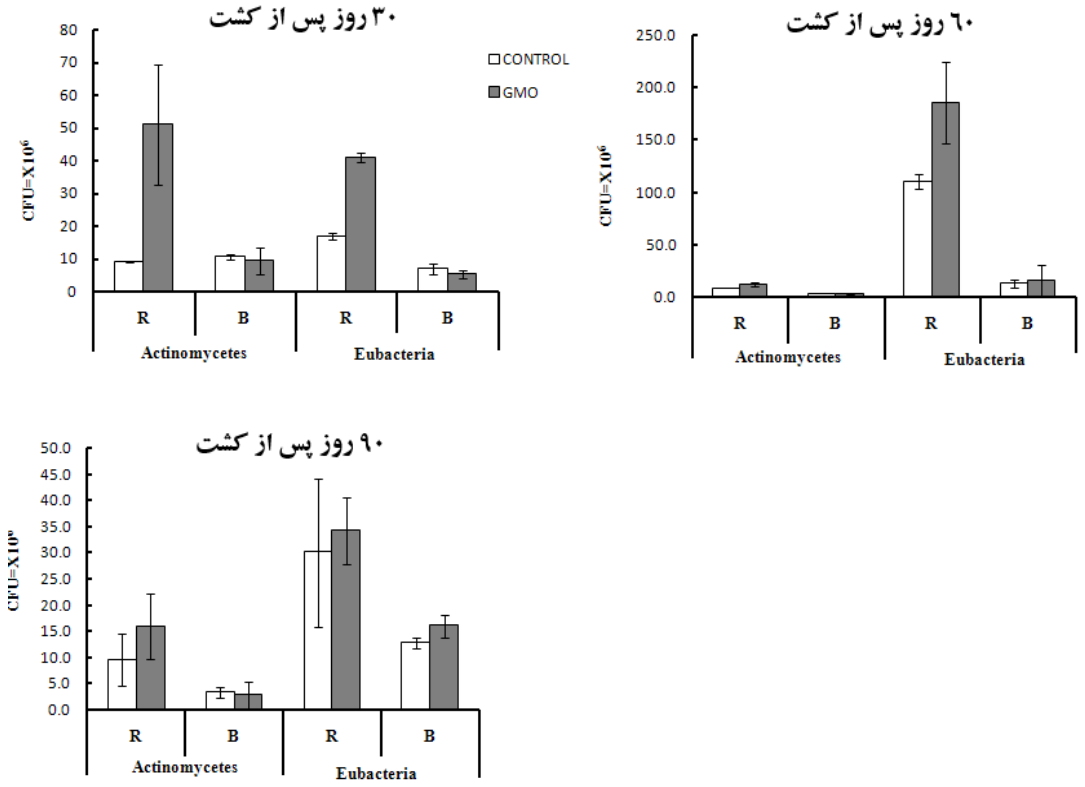
شکل ۱. کشت و نگهداری پنبه تراریخته (سمت راست) و شاهد غیر تراریخته (سمت چپ) در گلخانه تراریخته

۹۰ روز پس از کشت به ترتیب $۱۰^{۷}$*۲، $۱۰^{۷}$*۱۰ و $۱۰^{۷}$*۳/۵ و برای گیاه تراریخته به ترتیب $۱۰^{۷}$*۵، $۱۰^{۷}$*۱۵ و $۱۰^{۷}$*۳/۵ بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد جمعیت باکتریایی رایزوسفر گیاه تراریخته ۳۰ و ۶۰ روز پس از کشت بیشتر از گیاه غیر تراریخته بود. در حالیکه در آخرین مرحله نمونه برداری این تفاوت معنی دار نبود . جمعیت باکتری خاک ناحیه بالک گیاه غیر تراریخته ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز پس از کشت به ترتیب ۱۰۷*۰/۶۸، $۱۰^{۷}$*۱/۲ و $۱۰^{۷}$*۱/۲ و برای گیاه تراریخته به ترتیب $۱۰^{۷}$*۰/۵۱، $۱۰^{۷}$*۱/۵۸ و $۱۰^{۷}$*۱/۶ بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد تفاوت جمعیت باکتریایی خاک ناحیه بالک گیاه تراریخته و غیر تراریخته در هیچ یک از سه دوره رشد گیاه معنی دار نبود. الگوی افزایش جمعیت باکتری خاک ناحیه بالک در طول دوره رشد و ثبات آن با افزایش سن گیاه بر خلاف خاک رایزوسفری بود. الگوی تغییرات جمعیت در رایزوسفر و بالک برای گیاه تراریخته و شاهد یکسان بود (شکل ۲).

بررسی جمعیت اکتینومیستی خاک

تفاوت جمعیت اکتینومیستی خاک رایزوسفر و ناحیه بالک در گیاه غیر تراریخته معنی دار نیست. در حالیکه در گیاه تراریخته در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار دیده شد. تفاوت در جمعیت ناحیه رایزوسفر و بالک در هر سه دوره رشد گیاه وجود داشت. جمعیت اکتینومیستی گیاه تراریخته در اولین مرحله نمونه برداری (۳۰ روز پس از کشت بذر) بیشتر از گیاه غیر تراریخته بود. این تفاوت اگر چه ۶۰ روز پس از همچان وجود داشت اما در نهایت در آخرین مرحله نمونه برداری بی معنی شد. الگوی جمعیت اکتینومیستی در طول دوره رشد گیاه از نوع کاهشی بود (شکل ۲).

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 23:06 +0430 on Sunday September 20th 2020



شکل ۲. تعداد باکتری کل و اکتینومیستی خاک ناحیه رایزوسفر (R) و بالک (B) پنبه تراریخته (GM) و شاهد (CONTROL) ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز پس از کشت

آنالیز مولکولی جمعیت میکروبی با استفاده از سامانه DGGE

نتایج به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز حاصل از جفت آغازگرهای GCF357/ R518 و GCStrepB/ StrepE به ترتیب مربوط به ژن 16S rDNA یوباکتریایی و اکتینومیستی بر روی ژل آگارز ٪۱، یک باند نزدیک به bp ۳۰۰ را در همه نمونه‌های تهیه شده از ناحیه بالک و ریزوسفر گیاه تراریخته و غیر تراریخته (کنترل) نشان داد. این باند در نمونه‌های مربوط به خاک ریزوسفر گیاه تراریخته واضح تر و ضخیم تر بود (شکل ۳). الکتروفورز این تک باند با دستگاه DGGE بر روی ژل اکریل آمید ۸ درصد حاوی شیب مواد دناتوره کننده قادر به نشان دادن تنوع موجود در جمعیت یوباکتریایی و یا اکتینومیستی نبود.

بحث و نتیجه‌گیری

بر پایه گزارش سرویس بین المللی دستیابی به کاربرد بیوتکنولوژی در کشاورزی (www.isaaa.org)، در حال حاضر نزدیک به ۱۲ میلیون هکتار از اراضی کشاورزی دنیا به کشت پنبه بی تی (BT) اختصاص دارد. ایالات متحده آمریکا و هند یکی از تولید کنندگان عمده پنبه تراریخته هستند. پنبه بی تی با

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 23:06 +0430 on Sunday September 20th 2020

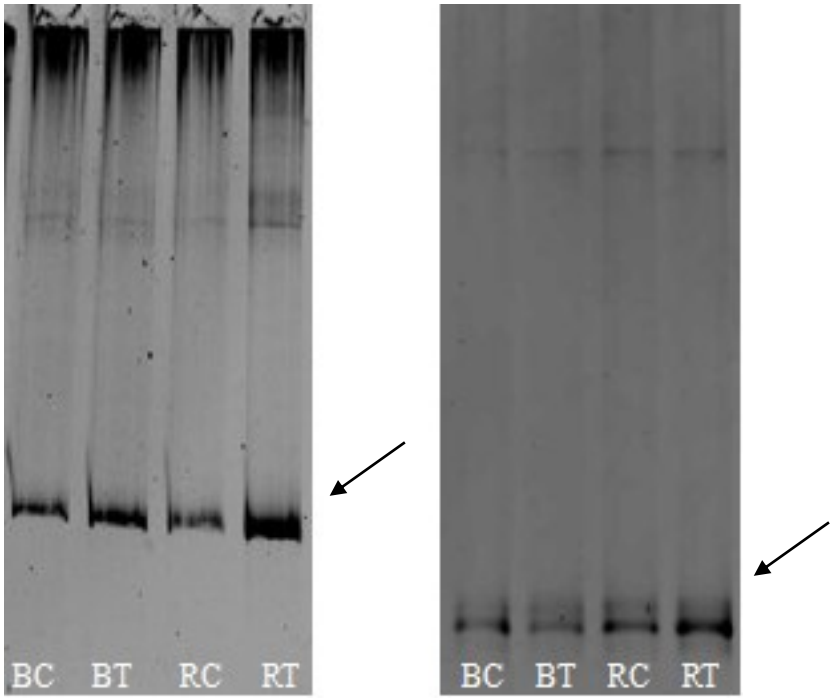
مقاومت به آفات پروانه‌ای موجب کاهش مصرف سموم شیمیایی شده است. بر اساس آزمون‌های گلخانه‌ای پنبه chi مقاومت خوبی نسبت به پژمردگی آوندی ورتیسیلیومی نشان داده است (۸). این گیاه تراریخته و یا نتاج حاصل از تلاقی آن با ارقام بومی و تجاری مورد استفاده در کشور پس از گذراندن آزمون های مربوط به ایمنی زیستی می‌تواند در مزارع کشت شود. چنانچه گیاه تراریخته متابولیت جدیدی را تولید و از طریق ریشه وارد خاک کند ممکن است رشد برخی از میکروب‌ها بویژه در فضای رایزوسفری را تغییر دهد. نمونه‌ای که به خوبی این تاثیر را نشان می دهد گیاه تراریخته *لوتوس کورنیکولاتوس* (*Lotus corniculatus*) است که به واسطه ترشح اپینها (opines) جمعیت باکتری‌های مصرف کننده اپین در ریزوسفر آن پنج تا ده برابر بیشتر از والد غیر تراریخته بود. دیگر توده‌های باکتریایی در اطراف ریشه تراریخته و غیر تراریخته تفاوت نداشت (۹). اگر چه این تغییرات گذرا هستند و در صورت تغییر الگوی کشت به وضعیت سابق برمیگردند اما آزمایش این همانی متابولیت‌های گیاه تراریخته و والد می‌تواند نگرانی‌های احتمالی را از بین ببرد. در این تحقیق تاثیر ترشحات و یا حضور ریشه پنبه تراریخته بر فلور میکروبی منطقه رایزوسفر به خوبی نشان داده شد. همچنین مشخص شد که در نواحی دورتر از ریشه (خاک ناحیه بالک) فلور میکروبی خاک گیاه تراریخته و شاهد در طول دوره رشد گیاه بر اساس یک الگوی یکسان تغییر می‌کند و تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند. ارتباط مستقیم ریشه گیاهان و فلور میکروبی از چندین دهه پیش شناخته شده است (۱۰). تغییر قابل توجه فلور میکروبی خاک در نتیجه کشت گندم اصلاح شده به روش سنتی در پی جانشینی یک جفت کروموزوم یک رقم گندم بهاره نسبتا مقاوم به بیماری پوسیدگی ریشه با کروموزوم متناظر آن از یک رقم گندم بهاره بسیار حساس گزارش شده است (۱۱-۱۲). این مطالعه نشان داد که ویژگی‌های کمی و کیفی میکروفلور رایزوسفر می‌تواند در اصلاح نبات سنتی با جانشینی اطلاعات ژنتیکی از رقمی به رقم دیگر تغییر کند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد تفاوت جمعیت یوباکتریایی پنبه chi که تنها در یک ژن با والد خود تفاوت دارد گذرا است و در طول رشد گیاه ناپایدار بود. با توجه به اینکه تولید پنبه بی تی پیشینه بیشتری دارد، تاثیر آن بر فلور میکروبی خاک در حدود ۲۰ سال پیش انجام شد. نتایج این پژوهشگران همسو با نتایج پژوهش حاضر افزایش گذرا در جمعیت قابل کشت باکتری و قارچ در دو لاین از سه لاین پنبه تراریخته مورد آزمایش را نشان داد (۱۳). تفاوت صفات فیزیولوژیکی بین لاین‌های گوناگون گیاهان تراریخته گزارش شده است. مطالعه دونگان و همکاران تاثیر متفاوت لاین‌های مختلف پنبه بی تی بر فلور میکروبی را نیز تایید کرد. همچنین تاثیر متفاوت واریته‌های مختلف کلزای تراریخته بر جمعیت میکروبی قابل کشت خاک گزارش شده است (۱۴). در مجموع از مطالعات انجام شده می‌توان این برداشت را داشت که تاثیر هر لاین تراریخته بر فلور میکروبی خاک باید به طور جداگانه بررسی شود.

مطالعه فلور میکروبی خاک کشت شده با پنبه حامل ژن کیتیناز و گلوکاناز و مقایسه آن با پنبه غیر تراریخته در دوره‌های مختلف رشد نشان داد که تعداد باکتری های قابل کشت دو گروه گیاه مورد نظر تفاوت معنی داری نداشت. تنوع بین جنس‌های باکتریایی شناسایی

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 23:06 +0430 on Sunday September 20th 2020

شده در رایزوسفر گیاه تراریخته کمتر از گیاه غیر تراریخته بود که با افزایش سن گیاه و در طول دوره رشد و تکامل این تفاوت کاهش پیدا کرد (۱۵).

مطالعه فلور میکروبی رایزوسفر پنبه Bt+CpTI و



شکل ۳. پروفایل DGGE ژن 16S rRNA خاک ناحیه رایزوسفر و بالک پنبه تراریخته و شاهد برای جمعیت یوباکتری (سمت راست) و اکتینومیستی (سمت چپ). بالک کنترل BC، بالک تراریخته BT، رایزوسفر کنترل RC، رایزوسفر تراریخته RT. قطعه ۳۰۰ جفت بازی تکثیر شده از روی ژن 16s rRNA با فلش سیاه رنگ مشخص شده است.

مقایسه آن با والد غیر تراریخته انجام شده است. نتایج این مطالعه نیز تفاوت معنی داری را در کمیت جمعیت باکتری‌های قابل کشت حتی در طول دوره کشت گزارش نکرد. هر چند در مورد باکتری‌هایی با عملکرد مشخص مانند باکتری‌های اکسید کننده آمونیوم تفاوت‌هایی مشاهده شد. در مرحله تشکیل کاسبرگ تعداد این باکتری‌ها در گیاه غیر تراریخته و تراریخته به ترتیب ۴ و ۲ برابر افزایش پیدا کرد. در مرحله گل دهی جمعیت این باکتری‌ها در رایزوسفر گیاه شاهد کاهش و در گیاه تراریخته افزایش پیدا کرد. در مرحله غوزه باکتری‌های مورد نظر در شاهد افزایش نشان داد در حالیکه در رایزوسفر پنبه تراریخته تغییر نکرد. پس از باز شدن غوزه اگر چه جمعیت باکتری‌های اکسید کننده آمونیوم در هر دو گروه کاهش قابل توجه نشان داد اما برای هر گروه متفاوت از دیگری بود. در مجموع تغییرات باکتری

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 23:06 +0430 on Sunday September 20th 2020

های مفید در رایزوسفر گیاه تراریخته ملایم تر بود که می‌تواند یکی از مزایای آن باشد (۱۶). همسو با این نتایج تفاوت جمعیت اکتینومیستی پنبه Chi و شاهد در خاک رایزوسفری معنی دار بود. افزایش قابل توجه این باکتری‌های مفید اوایل و اواسط دوره رشد گیاه در خاک رایزوسفری گیاه تراریخته می‌تواند یکی از مزایای آن باشد.

نتایج حاصل از مقایسه کمی تکثیر قطعات ۳۰۰ جفت بازی (با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی برای یوباکتریاها و اکتینومیست‌ها) از روی ژن 16s rRNA ماده وراثتی اسخراج شده از مقدار مشخص (یک گرم) خاک ناحیه بالک و رایزوسفر گیاه تراریخته و شاهد نشان داد تعداد کپی‌های بیشتری از الگو در رایزوسفر و بالک گیاه تراریخته نسبت به شاهد وجود دارد. تفکیک قطعات تکثیر شده با استفاده از سامانه DGGE قادر به نمایش تنوع قطعات تکثیر شده نبود. بررسی متاژنومی خاک ناحیه رایزوسفری لاین‌های پنبه تراریخته در دوره‌های مختلف رشد در مطالعات آتی به بررسی دقیق تر تاثیر پنبه تراریخته بر فلور باکتریایی خاک کمک خواهد کرد.

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 23:06 +0430 on Sunday September 20th 2020

منابع مورد استفاده

1. Fradin EF, Thomma BP. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 2006; 7(2): 71-86.
2. Lucht JM. Public Acceptance of Plant Biotechnology and GM Crops. *Viruses*, 2015; 7(8): 4254–4281.
3. Tohidfar M, Mohammadi M, Ghareyazie B. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. *Plant cell, tissue and organ culture*, 2005; 83(1): 83-96.
4. Sanei SJ, Razavi SE, Lotfalinezhad E. Epidemiology of Cotton *Verticillium* wilt in Golestan Province, the North of Iran. *Annual Review and Research in Biology*, 2013; 3 (4): 564-573.
5. El-Tarabily K. Promotion of tomato (Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant and Soil*, 2008; 1 (308): 161-174.
6. Saito A, Ikeda S, Ezura H, Minamisawa, K. Microbial analysis of the phytosphere using culture-independent methodolofies. *Microbes and Environments*, 2007; 22 (2): 93-105.
7. Das M, Royer TV Leff LG. Diversity of Fungi, Bacteria, and Actinomycetes on Leaves Decomposing in a Stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007; 73 (3): 756-767.
8. Tohidfar M, Hossaini R, Shokhandan Bashir N, Tabatabaei M. Enhanced Resistance to *Verticillium dahliaein* Transgenic Cotton Expressing an Endochitinase Gene from *Phaseolus vulgaris*. *Czech J. Genet. Plant Breed*, 2012; 48 (1): 33–41.
9. Oger P, Petit A, Dessaux Y. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. *Nature Biotechnology*, 1997; 15 (4): 369–372.
10. Rovira AD. Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 1965; 19: 241–266.
11. Neal JL, Atkinson TG, Larson RI. Changes in the rhizosphere microflora of spring wheat induced by disomic substitution of a chromosome. *Canadian Journal of Microbiology*, 1970; 16: 153–158.
12. Neal JL, Larson RI, Atkinson TG. Changes in rhizosphere populations of selected physiological groups of bacteria related to substitution of specific pairs of chromosomes in spring wheat. *Plant and Soil*, 1973; 39 (1): 209–212.
13. Donegan KK, Palm CJ, Fieland VJ, Porteous LA, Ganio LM, Schaller DL, Bucao LQ, Seidler RJ. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. *Applied Soil Ecology*, 1995; 2: 111–124.
14. Siciliano SD, Germida JJ. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. *Quest*, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. *Excel* and B. rapa cv. Parkland. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999; 29 (3): 263–272.
15. Li Z, Feng Z, Zhao L, Shi Y, Feng H, Zhu H. Effects of transgenic cotton expressing chitinase and glucanase genes on the diversity of soil bacterial community. *Yi Chuan*, 2015; 37 (8): 821-827.
16. Dong L, Meng Y, Wang J. Effects of transgenic Bt + CpTI cotton on rhizosphere bacteria and ammonia oxidizing bacteria population. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2014; 54 (3): 309-318.

Downloaded from journalofbiosafety.ir at 23:06 +0430 on Sunday September 20th 2020

Effect of *chi* cotton on soil bacterial communities

Ebrahim Karimi[1], Masoud Tohidfar[2], Solmaz Khosravi[3], Akram Sadeghi[4*]

1- M.Sc. of Plant Pathology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
2- Department of Biotechnology, Faculty of New Technologies and Energy Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, Islamic Republic of Iran.
3- Instructor of Agricultural Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4- Assistant Professor of Molecular Genetics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

aksadeghi@abrii.ac.ir

Abstract

Microbial communities are a key element of soil quality and fertility. This research aims to survey the effect of genetically modified cotton cultivar Coker, harbors an endochitinase gene (*chi*) from *Phaseolus vulgaris* (bean) on soil bacterial communities. The transgenic *chi*-resistant cotton (GM), line R8 was selfed for four generations and the corresponding original plant line 1011, wild-type (WT) were provided and planted in the transgenic greenhouse (Biosafety Level 2) at Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII). Samples of soil were collected from rhizosphere and bulk area of 30, 60 and 90 days old plants. Enumeration of total bacteria and Actinomycetes were carried out using TSA, Water Agar and ISP2 media. Soil DNA was extracted from 1-g samples by using an Ultra Clean soil DNA kit. PCR–DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) was performed to show diversity in different groups of bacteria. Total numbers of bacteria in soil samples was approximately 10^6 and 10^7 CFU/g of dried soil of rhizosphere and bulk soil respectively. Average number of total soil bacteria and Actinomycetes were higher in rhizosphere area of 30 and 60 days old GM plants compared to the control. Although, at the end of growth period (90 days) GM (transgenic) and non-GM plants were approximately equal in number of bacteria around their roots. Molecular analysis based on PCR-DGGE revealed similar microbial dynamics for both Actinomycetes and total batera. The data presented here showed no consistent statistically significant differences in the numbers of total bacteria and Actinomycetes between rhizosphere and bulk soil of chi and non-chi cotton at the end of the experiment. Furthermore, it seems that the growth stage of plant exerts a noticeable effect on the microbial community.

Key words: Actinomycetes, Transgenic, DGGE, Rhizosphere, Bacterial communities.