# پراکنش گونه‌های سینوریزوبیومی *Sinorhizobium meliloti* و *S. medicae* همزیست با یونجه در مناطق غربی ایران

مجید طالبی بداف[۱]، مسعود بهار[۱*]، قدرت الله سعیدی[۲] و سید ابوالقاسم محمدی[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۳/۲۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۱۱/۲۱)


## چکیده

**به منظور تعیین پراکنش جغرافیایی سینوریزوبیوم‌های همزیست با یونجه در نواحی غرب و شمال غرب ایران، تعداد ۹۵۰ جدایه از سینوریزوبیوم‌های همزیست با دو جمعیت یونجه داخلی (همدانی و نیک شهری) و یک جمعیت خارجی (کودی) در هشت خاک جمع‌آوری شده از استان‌های کردستان، کرمانشاه، آذربایجان شرقی و کردستان انتخاب شدند. شناسایی دقیق این جدایه‌ها به همراه ۱۴ جدایه تولید کننده گره در یونجه زرد (*Melilotus officinalis*) و ۳۱ جدایه همزیست با شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) در منطقه اصفهان، براساس روش‌های ملکولی صورت گرفت. با تکثیر قسمتی از نواحی ژن‌های *nod* و *mucR* در این جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای توصیه شده، توالی یابی نوکلئوتیدی نواحی مزبور و هضم آنزیمی قطعه تکثیری قسمتی از ناحیه ژنی 16S rRNA با استفاده از آنزیم برشی *RsaI*، سه جدایه از یونجه، هفت جدایه از یونجه زرد و ۱۳ جدایه از شنبلیله به عنوان باکتری *S. medicae* تشخیص داده شدند و بقیه جدایه‌ها (۹۴۳ از یونجه، هفت جدایه از یونجه زرد و ۱۸ جدایه از شنبلیله) متعلق به گونه *S. meliloti* بودند. گرچه هر دو گونه سینوریزوبیومی از تمام گیاهان میزبان جداسازی شدند، ولی غالب بودن *S. meliloti* در مناطق مختلف روی جمعیت‌های یونجه مشخص نمود که *S. meliloti* پراکنش جغرافیایی وسیعی در مناطق غربی ایران دارد. در این مطالعه الگوی قطعات حاصل از برش آنزیمی قطعه تکثیر یافته ژن 16S rRNA با آنزیم *Rsa* I، دو گونه *S. medicae* و *S. meliloti* را به آسانی از هم تفکیک نمود که نشانگر مناسب بودن این روش برای تشخیص سریع ریزوبیوم‌های ایجاد کننده گره در یونجه است.**


**واژه‌های کلیدی: یونجه، شنبلیله، یونجه زرد، PCR-RFLP ، *Sinorhizobium meliloti*، *Sinorhizobium medicae***

## مقدمه

یکی از ویژگی‌های مهم گیاهان خانواده لگوم مانند یونجه، توانایی آنها در همزیستی با باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن می‌باشد. همزیستی اختصاصی بین یک گونه خاص باکتری ریزوبیوم و گونه مشخصی از لگوم با مبادله سیگنال‌های پیچیده ملکولی آغاز می‌شود و باکتری پس از ورود به داخل ریشه، گره‌هایی ایجاد می‌کند که درون این گره‌ها تثبیت بیولوژیکی نیتروژن انجام می‌گیرد (۱۰).

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. دانشیار زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳. دانشیار زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mbahar@cc.iut.ac.ir



[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.58.6 ]

باکتری‌های همزیست با گیاهان خانواده لگومینوز دارای نام عمومی *Rhizobia* هستند که در پنج جنس *Rhizobium*، *Azorhizobium*، *Bradyrhizobium*، *Mesorhizobium* و *Sinorhizobium* قرار گرفته‌اند (۲۴). جنس *Sinorhizobium* شامل پنج گونه *S. meliloti*، *S. medicae*، *S. terangae*، *S. saheli* و *S. fredii* است که در بین آنها *S. meliloti* و *S. medicae*، که در جنس‌های گیاهی *Medicago*، *Melilotus* و *Trigonella* تولید گره می‌کنند، قرابت بیشتری باهم دارند (۱۱). اگرچه دو گونه از نظر تحمل به نمک و نیز فعالیت در خاک‌های با دامنه pH مختلف با هم متفاوت‌اند (۱۵ و ۲۳)، ولی مجموع بررسی‌های مربوط به تنوع ژنتیکی ریزوبیوم‌های همزیست با گونه‌های مختلف *Medicago* نشان می‌دهد که *S. meliloti* فراوانی بیشتری نسبت به *S. medicae* در همزیستی با این گیاهان دارد (۱، ۲، ۵، ۷، ۹، ۱۲، ۱۳، ۲۵ و ۲۶). به نظر می‌رسد در این رابطه متقابل، گونه میزبان در تعیین همزیست مناسب نقش اساسی داشته باشد. گونه *S. medicae* اغلب در یونجه‌های یکساله و گونه *S. meliloti* در یونجه‌های چند ساله گره‌سازی و تثبیت نیتروژن را انجام می‌دهند (۵)، همزیستی *S. medicae* با یونجه‌های چند ساله و یا *S. meliloti* با یونجه‌های یک ساله منتفی نمی‌باشد (۵ و ۲۵). چون هر دوگونه *S. meliloti* و *S. medicae* در گیاهان متعلق به جنس‌های *Medicago*، *Melilotus* و *Trigonella* تولید گره می‌نمایند، در برخی موارد ممکن است عدم شناسایی دقیق گونه همزیست باعث اشتباه در ارزیابی صحیح از تنوع درون جمعیتی جدایه‌های آن گونه شود، لذا شناسایی آنها از اهمیت زیادی برخوردار است. به دلیل شباهت خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سینوریزوبیوم‌های *S. meliloti* و *S. medicae*، تشخیص دقیق این دو گونه بر اساس مشخصات رشد در محیط انتخابی و یا خصوصیات ویژه بیوشیمیایی ممکن نیست و لازم است برای تفکیک سریع آنها شیوه‌های مناسب‌تری بر مبنای روش‌های مولکولی به کار گرفته شوند.

تاکنون روش‌های مولکولی زیادی برای تشخیص دقیق گونه‌های سینوریزوبیومی همزیست با یونجه مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در یک تحقیقی ابتدا از الگوهای باندی آغازگر BOX برای تفکیک اولیه گونه‌های همزیست جمعیت‌های یونجه یکساله *M. truncatula* شد و سپس از هضم آنزیمی قطعه تکثیر یافته 16S rDNA به وسیله آنزیم برشی *Rsa*I برای تشخیص گونه‌های *S. meliloti* و *S. medicae* تولید کننده گره در این گیاه استفاده گردید(۲۶). در بررسی دیگر با تجزیه و تحلیل ناحیه فواصل بین ژنی (Intergenic spacer, IGS) بین دو ژن *nifD* و *nifK* گونه‌های *S. meliloti* و *S. medicae* از همدیگر متمایز شدند (۱۳). بیوندی و همکاران با استفاده از RFLP ژن‌های *nod*D، انگشت نگاری ناحیه بین ژنی 16S-23S rDNA و نشانگر AFLP ( Amplification fragment length polymorphism) گونه‌های *S. meliloti* و *S. medicae* همزیست با گیاهان میزبان *Medicago* را تفکیک نموده و نتیجه گرفتند که *S. medica* از جمعیت‌های متنوع *S. meliloti* منشا گرفته است (۵). توالی یابی DNA ژنومی (۱۵و ۱۶)، توالی یابی چند مکانی (Multilocus sequence typing, MLST) در ژنوم (۲۱) و مطالعه الگوی چند شکلی بر اثر تغییرات تک نوکلئوتیدی در توالی DNA ( Single nucleotide polymorphism, SNP) (۱۱) از جمله روش‌های دیگری هستند که در بررسی ژنتیکی گونه‌های ریزوبیومی همزیست با یونجه مورد توجه بوده‌اند.

مقایسه توالی‌های rRNA ابزار قدرتمندی برای بررسی روابط فیلوژنتیکی و تکاملی موجودات زنده به ویژه باکتری‌هاست(۲۲). چون الگوی برشی قطعه تکثیر یافته 16S rDNA با استفاده از آنزیم برشی *Rsa*I در بین گونه‌های *S. meliloti* و *S. medicae* منحصر به فرد است (۲، ۵، ۱۷ و ۲۵)، لذا از این روش نیز در تفکیک گونه‌های مزبور سینوریزوبیومی همزیست با*M. truncatula* استفاده شده است (۱ و۲۶). اخیراً نیز یک روش شناسایی سریع گونه *S. meliloti* از بقیه ریزوبیوم‌های همزیست *Medicago* بر مبنای PCR معرفی گردیده است. در این روش از آغازگرهای طراحی شده



[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.58.6 ]

از نواحی حفاظت شده مکان nodbox4 در پلاسمید p*Sym* و ژن *muc*R در کروموزوم *S. meliloti*، برای تشخیص سوش‌های *S. meliloti* استفاده می‌شود (۱۹).

در ایران کاشت یونجه به عنوان یک محصول مهم علوفه‌ای رایج است، اما به غیر از تعیین غالبیت گونه *S. meliloti* نسبت به *S. medicae* در منطقه همدان (۱)، اطلاعات بیشتری در رابطه با پراکنش ریزوبیوم‌های همزیست با یونجه در مناطق مختلف کشور وجود ندارد و لازم است وضعیت گسترش هرکدام از این گونه‌های ریزوبیومی مشخص شود. در این تحقیق دو روش تکثیر مکان nodbox4 و ژن *muc*R به وسیله PCR و هم‌چنین هضم آنزیمی قطعه تکثیر یافته 16S rDNA با آنزیم برشی *Rsa*I، برای تعیین پراکنش طبیعی گونه‌های *S. meliloti* و *S. medicae* همزیست با گیاهان *Medicago* در ایران مورد استفاده قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه‌ها و استخراج DNA

به منظور جداسازی ریزوبیوم‌های همزیست با یونجه، ابتدا سه جمعیت یونجه چندساله شامل دو جمعیت داخلی (همدانی و نیک شهری) و یک جمعیت اصلاح شده خارجی (کودی) به طور جداگانه در دو نمونه خاک متفاوت از مناطق مختلف و با سه تکرار کشت گردید و با شرایط دمایی ۳۵°C- ۲۲ در گلخانه نگه‌داری شد. نمونه‌های خاک از یک مزرعه یونجه و یک زمین بایر از هر یک از مناطق چغاکبود کرمانشاه، سنندج کردستان، عجب شیر آذربایجان شرقی و نورآباد لرستان جمع‌آوری شده بود. پس از ده هفته، به طور تصادفی چهار گیاه از هرگلدان و چهار گره از هر گیاه انتخاب شد. هرگره پس ازسترون کردن سطحی در الکل ۹۶ درصد به مدت دو دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ (مایع تجارتی سفید کننده ۱۰٪) به مدت یک دقیقه و سه بار شستشو در آب مقطر استریل، به کمک پنس سترون در یک قطره آب سترون داخل یک ظرف پتری سترون له گردید. یک لوپ باکتریایی از مخلوط به دست آمده روی محیط جامد TY (Tryptone 5g, Yeast extract 3g, $CaCl_2$ 0.9g, Agar 15g, $ddH_2O$ 1liter) کشت گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸°C نگه‌داری شد. یک پرگنه مشخص ریزوبیومی از هر کشت انتخاب شد و پس از تکثیر هر جدایه در محیط مایع TY، ۶۰۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مزبور با ۳۰۰ میلی‌لیتر گلسیرول سترون در داخل لوله‌های کرایو مخلوط گردید و پس از انجماد کامل در نیتروژن مایع برای نگه‌داری طولانی مدت به فریزر ۸۰°C- انتقال یافت.

برای جداسازی جدایه‌های ریزوبیومی همزیست با یونجه زرد (*Melilotus officinalis* (L.) Pall.) و شنبلیله (*Trigonella polycerata* L.)، از گره‌های تشکیل شده روی ریشه این گیاهان در شرایط طبیعی مزارع اطراف اصفهان استفاده شد. تمام مراحل ضدعفونی، کشت و نگه‌داری این باکتری‌ها مشابه با شرایط ذکر شده برای باکتری‌های همزیست یونجه انجام گرفت.

برای استخراج DNA از جدایه‌ها، یک لوپ از پرگنه‌های ۲۴ ساعت رشد کرده هر جدایه درTY در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون به صورت سوسپانسیون در آمد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰°C جوشانده شد و بلافاصله روی یخ قرار گرفت. پس از سرد شدن نمونه‌ها و سانتریفوژ در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، از مایع رویی محتوی DNA هر نمونه مقدار دو میکرولیتر در واکنش‌های PCR استفاده گردید.

### تکثیر مکان nodbox4 و ژن *muc*R به وسیله PCR

به منظور تکثیر مکان nodbox4 در جدایه‌های ریزوبیومی مورد بررسی، از جفت آغازگر nodbox1/nodbox3 و برای تکثیر ژن *muc*R از جفت آغازگر mucRf/mucRr مندرج در جدول ۱ استفاده گردید (۱۸). دو جدایه (*S. meliloti*) Rm1021 و(*S. medicae*) LMG18864 (اهدایی پروفسور Bazzicalupo، دانشگاه فیورنتینا- ایتالیا) به عنوان جدایه‌های ریزوبیومی استاندارد در این آزمایش‌ها به کار رفتند. واکنش‌های PCR با مواد خریداری شده از شرکت Roche Co. در حجم ۱۵



[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.58.6 ]

**جدول ۱. نام، توالی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق 5′**

| نام آغازگر | توالی | دمای اتصال(°C) |
|---|---|---|
| nodbox1 | 5′ – TCTTTTCTTATCCATAGGGTGG – 3′ | ۵۷/۲۸ |
| nodbox3 | 5′ – ACGGATCGTCCTCGAAG – 3′ | ۵۷/۱ |
| mucRf | 5′ – ATGACAGAGACTTCGCTCGGT – 3′ | ۵۹/۸ |
| mucRr | 5′ - TCACTTGCCGCGACGCTT – 3′ | ۵۸/۲ |
| fDl | 5′ - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3′ | ۵۸ |
| rDl | 5′ - AAGGAGGTGATCCAGCC – 3′ | ۵۵ |

میکرولیتری شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X حاوی کلرید منیزیوم ۱۵ میلی‌مولار، یک واحد *Taq* DNA Polymerase، ۰/۳۳ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs و دو میکرولیتر از DNA استخراج شده تهیه شد. پس از اضافه کردن یک قطره روغن معدنی سترون به هر نمونه، واکنش‌های PCR در دستگاه اپندورف مدلEppendorf mastercycler gradient انجام گرفت که برمبنای ۲۵ چرخه با دمای ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۳ °C به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و نهایتا یک چرخه هفت دقیقه در دمای ۷۲ °C برنامه‌ریزی شده بود. محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد با بافر TBE الکتروفورز شدند و ژل پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید ۱۰µ g/ml، به وسیله دستگاه Gel document عکس‌برداری شد.

**همسانه‌سازی و توالی‌یابی قطعات PCR**

قطعات حاصل از تکثیر مکان nodbox4 و ژن *muc*R به وسیله کیتIns TA clone™ PCR,) #K1214) شرکت Fermentas در ناقل pTZ57R/T همسانه‌سازی شد و به میزبان *E. coli* سویه MC1061 انتقال یافت. به منظور غربالگری اولیه همسانه‌ها از روش غربالگری سریع (Rapid screening) استفاده گردید (۲۰). پلاسمید همسانه‌های به دست آمده، به کمک کیت RBC (Real Biotech Corp.) استخراج گردید. صحت انتخاب همسانه‌ها با تکثیر قطعه‌های کلون شده در این پلاسمیدها به کمک جفت آغازگرهای مربوطه در واکنش PCR و نیز هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *Pst*I و *Eco*RI (Fermentas Co.) تأیید شد. ترتیب توالی این قطعات توسط شرکت Macrogen کره جنوبی انجام گرفت. توالی قطعات همسانه‌سازی شده با ژن‌های موجود در بانک اطلاعات ژن (NCBI) مقایسه گردید.

**تکثیر قطعه16S rDNA و هضم با استفاده از آنزیم برشی*Rsa*I**

برای تکثیر قطعه 16S rDNA جدایه‌ها از جفت آغازگر fD1 و rD1 استفاده گردید (۲۲). توالی و دمای ذوب آغازگرهای مذکور نیز در جدول ۱ آمده است. واکنش PCR برای نمونه‌ها در حجم ۱۵ میکرولیتری شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر۱۰X حاوی کلریدمنیزیم ۱۵ میلی‌مولار، یک واحد *Taq* DNA polymerase، ۰/۳ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs و دو میکرولیتر از DNA استخراج شده از هر نمونه تهیه شد. به هر نمونه یک قطره روغن معدنی استریل اضافه شد و لوله‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. برنامه انجام واکنش PCR شامل یک چرخه در ۹۵ °C به مدت چهار دقیقه، ۳۰ چرخه در ۹۴ °C به مدت یک دقیقه، ۶۰ °C به مدت یک دقیقه و ۷۲ °C به مدت دو دقیقه و یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ °C به مدت پنج دقیقه بود. از محصول PCR هر نمونه ابتدا پنج میکرولیتر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد با بافر TBE الکتروفورز گردید وپس از رنگ آمیزی به وسیله اتیدیوم بروماید و مشاهده قطعه مورد انتظار، ۱۰ میکرولیتر دیگر واکنش به وسیله یک میکرولیتر آنزیم برشی *Rsa*I (۵U/µl) با ۱/۵ میکرولیتر بافر مربوطه و ۲/۵ میکرولیتر آب در یک واکنش ۱۵ میکرولیتری هضم گردید. پس از نگه‌داری سه ساعته واکنش در ۳۷ °C، قطعات هضم شده



[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.58.6 ]

روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد با بافر TBE از یکدیگر تفکیک گردیدند.

## نتایج و بحث

از کشت مخلوط گره‌های ریشه جمعیت‌های مختلف یونجه رشد یافته در خاک‌های جمع‌آوری شده از مناطق غرب و شمال غرب کشور تعداد ۹۵۰ جدایه باکتری سینوریزوبیومی جداسازی گردید. از گره‌های ریشه گیاهان یونجه زرد (*M. officinalis*) و شنبلیله (*T. polycerata*) نیز به ترتیب ۱۴ و ۳۱ جدایه به دست آمد.

در واکنش همزمان PCR، جدایه استاندارد Rm1021 به همراه ۹۴۳ جدایه یونجه،هفت جدایه یونجه زرد و ۳۱ جدایه شنبلیله، قطعه‌های مورد انتظار ۶۳۷ نوکلئوتیدی با جفت آغازگر nodbox1/nodbox3 و حدود۴۳۲ نوکلئوتیدی با آغازگر mucRf/mucRr را تولید نمودند. سه جدایه C41-7، A71-10 و B41-13 از یونجه، چهار جدایه *M. officinalis* به همراه نمونه LMG18864 (*S. medicae*)، فقط باند ۶۳۷ جفت بازی را تولید کردند و با جفت آغازگر mucRf/mucRr واکنشی نداشتند. از طرف دیگر چهار جدایه یونجه A11-14، C51-2، C41-3 و B11-8 نیز تنها باند ۴۳۲ جفت بازی را تکثیر نمودند (شکل۱). سانچز و همکاران تکثیرهر دو قطعه ۶۳۷ جفت بازی مربوط به جفت آغازگر nodbox1/nodbox3 و قطعه ۴۳۲ جفت بازی مربوط به جفت آغازگر mucRf/mucRr را اختصاصی گونه *S. meliloti* در نظر گرفته‌اند (۱۹). بر مبنای این نظریه چون در مطالعه حاضر تمام جدایه‌های مورد بررسی هر دو و یا یکی از باندهای ۶۳۷ و یا ۴۳۲ بازی را تولید کردند و جدایه‌ای نبود که فاقد هر دو باند باشد، باید تمام جدایه‌های مورد بررسی به عنوان گونه *S. meliloti* طبقه‌بندی می‌شدند. ولی عدم حضور باند ۶۳۷ بازی در چهار جدایه یونجه و نیز عدم تکثیر باند ۴۳۲ بازی در سه نمونه یونجه، چهار جدایه *M. officinalis*، به همراه جدایه LMG18864 (*S. medicae*) موجب تردید در این نام‌گذاری شد.

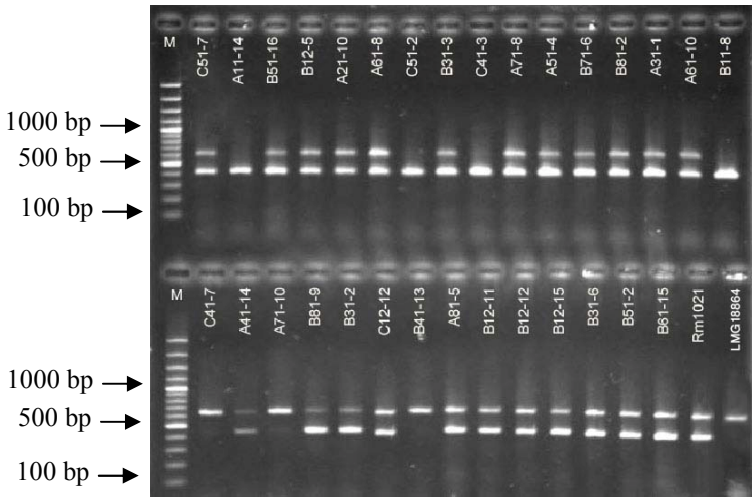
به منظور تأیید ارتباط این باندها با *S. meliloti* ، قطعه ۶۳۷ جفت بازی تکثیر یافته در جدایه B41-13 و قطعه تکثیر یافته در جدایه B11-8 توالی‌یابی گردیدند و توالی‌های مزبور با توالی ژن‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد. نتایج نشان داد که قطعه ۶۳۷ جفت بازی که در هر دو جدایه استاندارد LMG18864 (*S. medicae*) و Rm 1021 (*S. meliloti*) تکثیر یافته بود به مقدار ۹۹٪ (Accession no. CP000738) و ۱۰۰٪ ( Accession no. CP000740 ) با ناحیه پارالوگ ژن *nodM* در جدایه WSM419 باکتری *S. medicae* شباهت دارد که وظیفه آن تولید glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase در این باکتری است(۳). ارزیابی این شباهت با ژن *nodM* باکتری *S. meliloti* در حد ۸۶٪ (Accession no.X58632)، ۸۷٪ (Accession no. AE007238) و ۸۸٪ ( Accession no.AL591788) بود (شکل۲). در *S. meliloti* نیز ژن *nodM* موجب ساخته شدن D-glucosamine synthetase می‌شود که به عنوان یک سیگنال شناسایی در رابطه متقابل ریزوبیوم- گیاه میزبان اهمیت دارد (۱۴). قطعه ۴۳۲ جفت بازی که در جدایه استاندارد LMG18864 (*S. medicae*) تکثیر نیافته بود اما در جدایه استاندارد Rm 1021 (*S. meliloti*) تکثیر داشت، در عین تشابه ۱۰۰٪ با ژن *muc*R مربوط به گونه *S. meliloti* در بانک ژن (Accession no. L37353 و Accession no. AL591785)، شباهت ۹۴٪ با ژن *muc*R تولید کننده یک پروتئین فرضی با ساختار zinc finger باکتری *S. medicae* ( Accession no. CP000738) نشان داد (شکل۳ ).

اشتراکات توالی نوکلئوتیدی این دو گونه ریزوبیومی در حدی بود که تشخیص قاطع *S. meliloti* با این دو آغازگر را سوال‌انگیز نمود و چنین تلقی شد که تنها براساس نتایج حاصل از واکنش جدایه‌های ریزوبیومی با این دو جفت آغازگر نمی‌توان به نتیجه‌گیری دقیقی در مورد تفکیک دو گونه *S. medicae* و *S. medicae* دست یافت. از آنجایی‌که سانچز و همکاران فقط به شناسایی *S. meliloti* توجه نموده و احتمال این را نادیده گرفته بودندکه ممکن است فقط یکی از

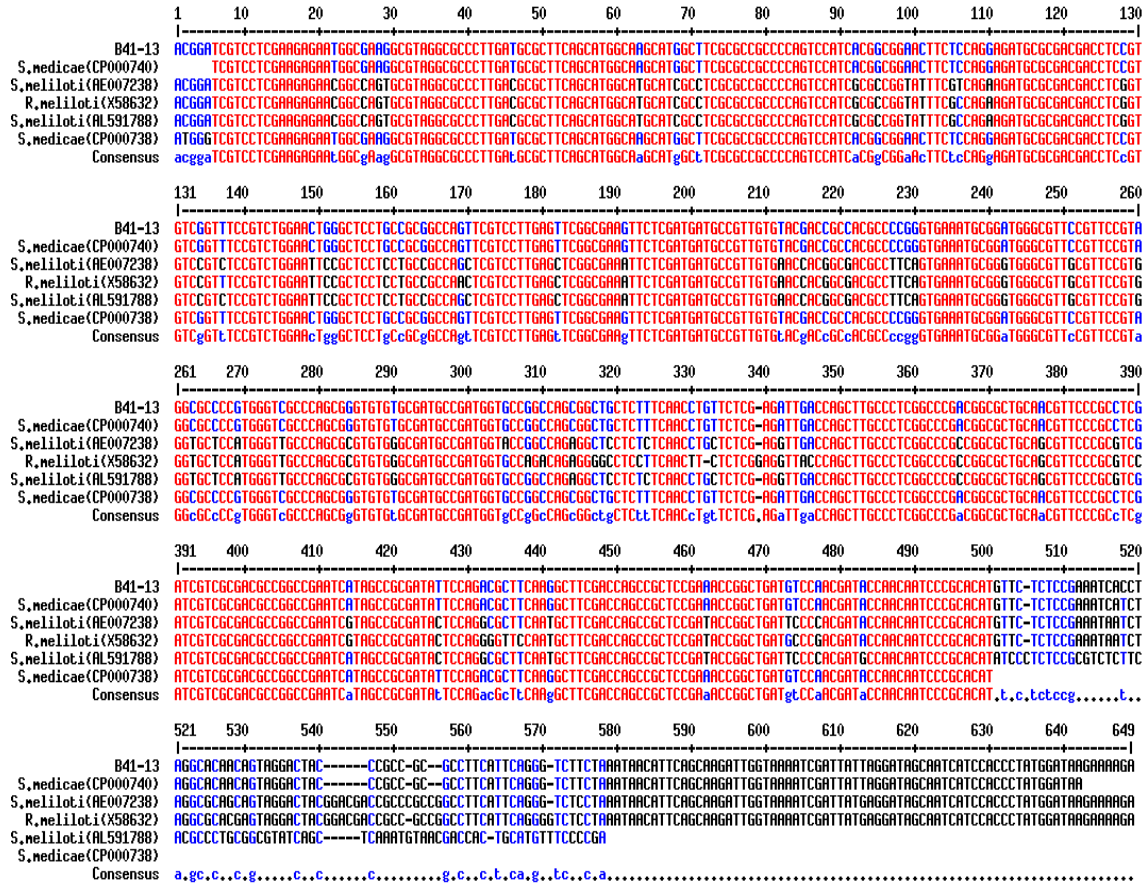


[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.58.6 ]




**شکل ۱. نقوش الکتروفورزی محصول PCR با جفت آغازگرهای mucRr/mucRf و nodbox1/ nodbox3 در جدایه‌های جمع‌آوری شده از جمعیت‌های یونجه چند ساله در خاک‌های مناطق مختلف غرب و شمال غرب ایران**

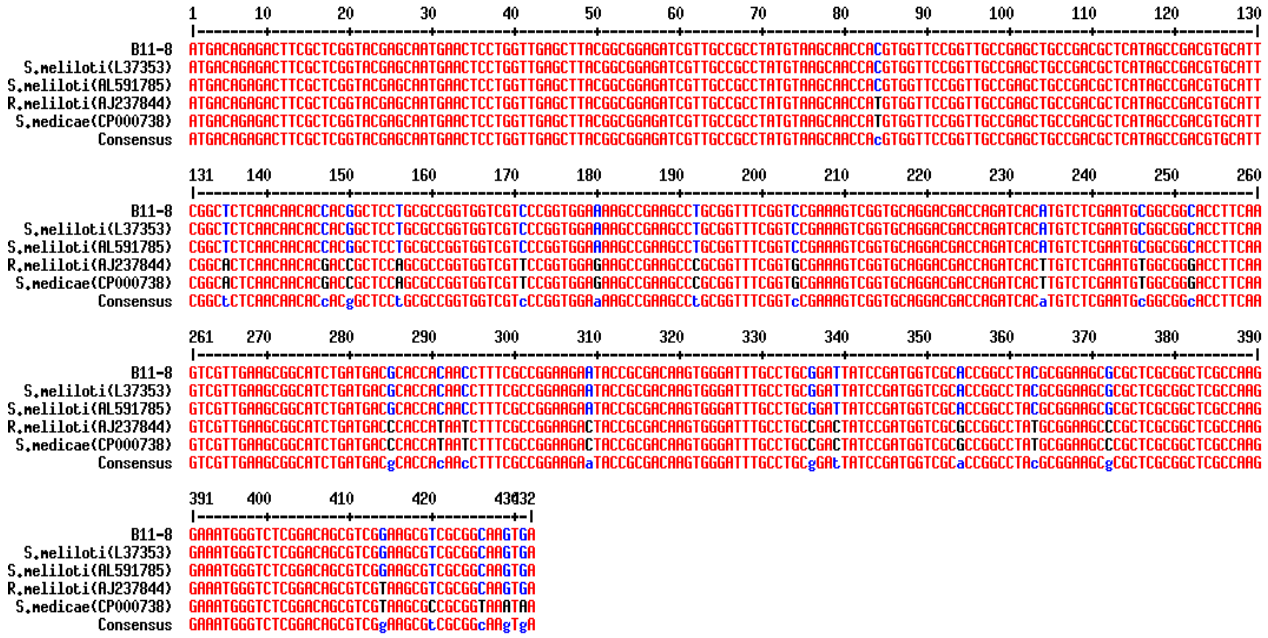



**شکل ۲. مقایسه توالی قطعه DNA تکثیر یافته به وسیله جفت آغازگر nodbox3/nodbox1 درجدایه ریزوبیومی B41-13 با جدایه‌های موجود در بانک ژن (NCBI)**



[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.58.6 ]




**شکل ۳. مقایسه توالی قطعه DNA تکثیر یافته به وسیله جفت آغازگر mucRf/mucRr در جدایه ریزوبیومی B11-8 با جدایه‌های موجود در بانک ژن (NCBI)**

قطعه‌های ۶۴۶ و یا ۴۳۲ نوکلئوتیدی در جدایه‌های همزیست با یونجه تکثیر شود(۱۹)، بنابراین چنین استنباط شد که در صورت استفاده از دو جفت آغازگر مذکور، تکثیر دو باند ۶۳۷ و ۴۳۲ جفت بازی و یا تکثیر تنها قطعه ۴۳۲ جفت بازی می‌تواند به منزله وجود گونه *S. meliloti* تلقی گردد. در حالی‌که تکثیر باند ۶۳۷ جفت بازی وعدم تکثیر باند ۴۳۲ بازی به تفکیک دو گونه *S. medicae* و *S. meliloti* از هم دیگر کمک نمی‌نماید.

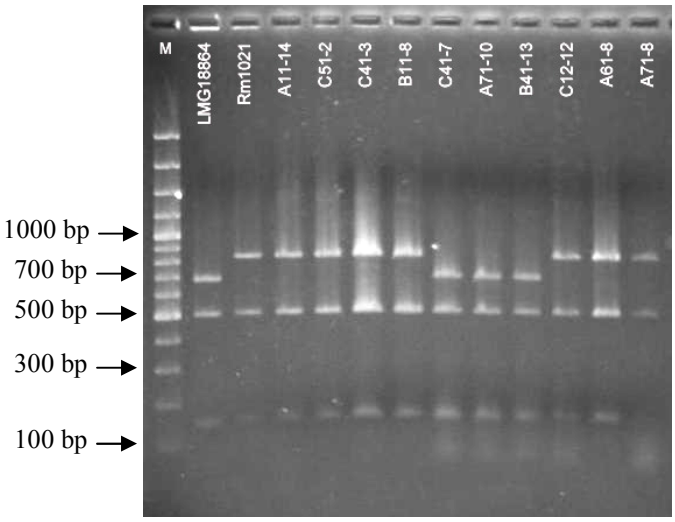
چون تمایز گونه‌های *S. meliloti* و *S. medicae* در بین جدایه‌های مورد بررسی با استفاده از جفت آغازگرهای nodbox1/nodbox3 و mucRf/mucRr با تردید همراه بود، به منظور شناسایی دقیق‌تر گونه‌ها از روش هضم با آنزیم برشی *Rsa*I قطعه تکثیرشده 16S rDNA جدایه‌ها به وسیله آغازگرهای rD1 و fD1 استفاده گردید (۲۲). پس از تکثیر باند حدود ۱۴۸۰ نوکلئوتیدی 16S rDNA در تمام جدایه‌ها و هضم با آنزیم برشی *Rsa*I، مشخص شد الگوی حاصل از برش آنزیمی در سه جدایه یونجه C41-7، A71-10 و B41-13، هفت جدایه یونجه زرد و ۱۴ جدایه شنبلیله با الگوی برشی جدایه LMG18864 (*S. medicae*) مشابه می‌باشد و الگوی بقیه نمونه‌ها هم با الگوی جدایه RM1021 (*S. meliloti*) شباهت دارد (شکل۴). بر اساس این نتایج و مطابقت آن با نتایج دیگران (۵)، سه جدایه یونجه C41-7، A71-10 و B41-13، هفت جدایه *M. officinalis* و ۱۳ جدایه شنبلیله متعلق به گونه *S. medicae* تشخیص داده شدند و بقیه جدایه‌ها (۹۴۳ جدایه یونجه، هفت جدایه *M. officinalis* و ۱۸ جدایه شنبلیله) به عنوان *S. meliloti* در نظر گرفته شدند. در مطالعات متعدد قبلی نیز از الگوی باندی PCR RFLP- 16S rDNA به منظور جداسازی و تفکیک دو گونه *S. meliloti* و *S. medicae* همزیست با لگوم‌ها استفاده شده است (۵،۱، ۱۸، ۲۵ و ۲۶).

در بین جدایه‌های شناسایی شده متعلق به گونه *S. medicae* دو جدایه B41-13 و C41-7 از خاک‌های منطقه چغا کبود کرمانشاه و جدایه A71-10 از خاک‌های منطقه عجب شیر جمع‌آوری شده بودند. جدایه A71-10 با جمعیت یونجه همدانی، جدایه B41-13 با جمعیت یونجه نیک شهری و



[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.58.6 ]




**شکل ۴. الکتروفورز محصول PCR ژن 16S rDNA هضم شده با آنزیم برشی RsaI در جدایه‌های جمع‌آوری شده از جمعیت‌های یونجه چند ساله و در خاک‌های مناطق مختلف ایران**

جدایه C41-7 با جمعیت یونجه کودی همزیستی داشته‌اند. گرچه تعداد جدایه‌های *S. medicae* شناسایی شده در یونجه بسیار محدود (۳/۹۵۰) بود ولی فراوانی این گونه در *M. officinalis* (۷/۱۴) و شنبلیله (۱۳/۳۱) نشان داد که گیاهان یک ساله جنس *Medicago* در مقایسه با یونجه چندساله همزیستی گسترده‌تری با *S. medicae* دارند.

در این پژوهش از هر بوته میزبان چهار جدایه متفاوت بررسی شد و در همه موارد جدایه‌های به دست آمده از هر بوته متعلق به یک گونه بودند، تنها در یک مورد از بین چهار ریزوبیوم جداسازی شده از تک بوته شنبلیله دو جدایه به *S. meliloti* و دو جدایه دیگر به گونه *S. medicae* تعلق داشتند.

با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد گونه *S. meliloti* در خاک‌های مناطق غرب و شمال غرب کشور و در همزیستی با جمعیت‌های مختلف یونجه چند ساله غالب باشد که در پژوهش قبلی مربوط به تفکیک سینوریزوبیوم‌های همدان نیز چنین نتیجه‌ای به دست آمده بود (۱). از آنجا که یونجه‌های چند ساله اغلب با گونه *S. meliloti* همزیستی دارند (۵) لذا دست‌یابی به چنین نتیجه‌ای دور از انتظار نیست. از طرف دیگر گرچه به دلیل تعداد محدود *S. medicae* جدا شده از یونجه‌های مورد بررسی در بعضی از خاک‌های مورد بررسی نمی‌توان در مورد نقش شرایط محیطی و جمعیت‌های مختلف یونجه در همزیستی با گونه‌های مختلف ریزوبیوم داوری نمود ولی می‌توان گفت که همزیستی گونه *S. medicae* با یونجه‌های چند ساله منتفی نیست.

فراوانی نسبی جمعیت *S. medicae* در گیاهان یکساله *Medicago* نسبت به یونجه چند ساله (*M. sativa*) در این بررسی با یافته‌های قبلی سایر پژوهشگران مطابقت دارد. شناسایی ۷۲ جدایه *S. medicae* دربین ۲۹۹ جدایه همزیست با یونجه یکساله *M. truncatula* در خاک‌های تونس (۲۵)، وابستگی حدود دو سوم جدایه‌های همزیست با *M. trauncatula* در فرانسه به گونه *S. medicae* (۱۵) و انحصاری بودن همزیستی گیاه یکساله *M. polymorpha* با *S. medicae* (۸) نشان می‌دهد که یونجه های یک ساله در مقایسه با یونجه چندساله تعداد بیشتری از ریزوبیوم‌های *S. medicae* را جذب می‌نمایند. با وجود چنین روندی، نتایج مطالعات نشان می‌دهد *S.meliloti* در یونجه و حتی گیاهان یکساله *Medicago* sp. فراوانی بیشتری نسبت به *S. medicae* دارد (۵، ۲۵ و ۲۶)، به طوری‌که در مناطق مختلف مکزیک از



[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.58.6 ]

بین ۱۷۶ جدایه جداسازی شده از جمعیت‌های مختلف یونجه شامل گونه‌های *M. sativa*، *M. lupulina* و *M. polymorpha* تنها شش جدایه متعلق به گونه *S. medicae* گزارش شده است (۱۸). مشاهده تنوع ژنتیکی بالا در بین جدایه‌های گونه *S. meliloti* و عدم وجود تنوع ژنتیکی شش جدایه متعلق به گونه *S. meliloti* بیانگر مشتق شدن گونه *S. medicae* از گونه *S. meliloti* در نظر گرفته شده است(۱۸). باران و همکاران نیز نشان دادند که گونه *M. laciniata* باگروه خاصی از گونه *S. meliloti* گره‌سازی می‌نماید (۴). به این ترتیب می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بدون در نظر گرفتن شرایط محیطی خاک و تفاوت‌های ژنتیکی افراد داخل جمیت میزبان گیاهی، باکتری *S. meliloti* همزیست اختصاصی گیاه یونجه است (۵) ولی گونه‌های دیگر *Medicago* می‌توانند با طیف وسیع‌تری از گونه‌های ریزوبیومی همزیستی داشته باشند (۶). مطابق نتایج این پژوهش پراکنش گونه‌های ریزوبیومی *S. meliloti* و *S. meliloti* در ایران نیز از این نظریه پیروی می‌کند و برای دست‌یابی به این اطلاعات، استفاده از الگوی برش آنزیمی ناحیه PCR-RFLP 16S rDNA ریزوبیومی توسط *Rsa*I (۱ و ۲۶) روش مطمئن‌تری نسبت به استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از ناحیه nodbox4 و ژن *muc*R است.

## منابع مورد استفاده


۱. کریمی، ا.، ا. لکزیان، ک. خاوازی، ا. اصغرزاده و غ. حق نیا. ۱۳۸۶. مطالعه تنوع ژنتیک باکتری‌های سینوریزوبیوم با استفاده از تکنیک PCR/ RFLP 16S-23S rDNA. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۱۱(۴۲ب):۴۴۱- ۴۴۹.

2. Andropov, E.E., M.L. Roumyantseva, V.V. Sagoulenko and B.V. Simarov. 1999. Effect of the host plant on the genetic diversity of a natural population of *Sinorhizobium meliloti*. Russian J. Genet. 35: 1169–1176.
3. Beav, N., G. Endre, G. Petrovics, Z. Banfalvi and A. Kondorosi. 1991. Six nodulation genes of nod box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: nodM codes for D-glucosamine synthetase. Mol. Gen. Genet. 228:113-124
4. Barran, L.R., E.S.P. Bromfield and D.C.W. Brown. 2002. Identification and cloning of the bacterial nodulation specificity gene in the *Sinorhizobium meliloti–Medicago laciniata* symbiosis. Can. J. Microbiol. 48: 765–771.
5. Biondi, E.G., E. Pilli, E. Giuntini, M.L. Roumiantseva, E.E. Andronov, O.P. Onichtchouk, O.N. Kurchak, B.V. Simarov, N.I. Dzyubenko, A. Mengoni and M. Bazzicalupo. 2003. Genetic relationship of *Sinorhizobium meliloti* and Sinorhizobium medicae strains isolated from Caucasian region. FEMS Microbiol. Lett. 220: 207-213.
6. Brockwell, J., R.A. Holliday, D.M. Daoud and L.A. Materon. 1988. Symbiotic characteristics of a *rhizobium*-specific annual medic *Medicago rigidula* (L.) all. Soil Biol. and Biochem. 20:593–600.
7. Bromfield, E.S.P., N.P. Thurman, S.T. Whitwill and L.R. Barran. 1987. Plasmids and symbiotic effectiveness of representative phage types from two indigenous populations of *Rhizobium meliloti*. J. Gen. Microbiol. 133: 3457–3466.
8. Brunel, B., S. Rome, R. Ziani and J.C. Cleyet-Marel. 1996. Comparison of nucleotide diversity and symbiotic properties of *Rhizobium meliloti* populations from annual *Medicago* species. FEMS Microbiol. and Ecol. 19:71–82.
9. Carelli M., S. Gnocchi, S. Fancelli, A. Mengoni, D. Paffeti, C. Scotti and M. Bazzicalupo. 2000. Genetic diversity and dynamics of *Sinorhizobium meliloti* populations nodulating different alfalfa cultivars in Italian soils. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4785-4789.
10. Denarie, J., F. Debelle and J.C. Prome. 1996. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Annu. Rev. Biochem. 65: 503-535.
11. Guo, X., M. Flores, L. Morales, D. Garcia, P. Bustos, V. Gonzalez, R. Palacios and G. Davila. 2007. DNA diversification in two *Sinorhizobium* species. J. Bacteriol. 189: 6474- 6476.
12. Hartmann, A., J.J. Giraud and G. Catroux. 1998. Genotypic diversity of *Sinorhizobium* (formerly *Rhizobium meliloti*) strains isolated directly from a soil and from nodules of alfalfa (Medicago sativa) grown in the same soil. FEMS Microbiol. and Ecol. 25: 107–116.
13. Jebara, M., R. Mhamdi, M.E. Aouani, R. Ghrir and M. Mars. 2001. Genetic diversity of Sinorhizobium populations recovered from different *Medicago* varieties cultivated in Tunisian soils. Can. J. Microbiol. 47: 139–147.
14. Keller, M., A. Roxlau, W.M. Weng, M. Schmidt, J. Quandt, K. Niehaus, D. Jording, W. Arnold. and A. Puhler




[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.58.6 ]

1995. Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti* mucR gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. Mol. Plant Microbe Interact. 8: 267-277.

15. Rome, S., B. Brunel, P. Normand, M.P. Fernandez and J.C. Cleyet-Marel. 1996. Evidence that two genomic species of *Rhizobium* are associated with *Medicago truncatula*. Arch. Microbiol. 165: 285–288.
16. Rome, S., J.C. Cleyet-Marel, L.A. Materon, P. Normand and B. Brunel. 1997. Rapid identification of *Medicago* nodulating strains by using two oligonucleotide probes complementary to 16S rDNA sequences. Can. J. Microbiol.43: 854-861.
17. Roumiantseva, M.L., E.E. Andronov, L.A. Sharypova, T. Dammann-Kalinovski, M. Keller, J.P.W. Young and B.V. Simarov. 2002. Diversity of *Sinorhizobium meliloti* from the central Asian alfalfa gene center. Appl. Environ. Microbiol. 68: 4694-4697.
18. Silva, C. F., L. Kan and M.R. Esperanza. 2007. Population genetic structure of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* isolated from nodules of Medicago spp. in Mexico. FEMS *Microbiol* and Ecol. 60: 477-289.
19. Sanchez-Contreras, M., J. Lloret, M. Martin, M. Villacieros, I. Bonilla and R. Rivilla. 2000. PCR use of highly conserved DNA regions for identification of *Sinorhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3621-3623.
20. Titus, D.E. 1991. Protocols and Applications Guide. 2nd ed., Promega Corporation., Madison, USA.
21. Van Berkum, P., P. Elia and B. D. Eardly. 2006. Multilocus sequence typing as an approach for population analysis of medicago-nodulating rhizobia. J. Bacteriol. 188: 5570-5577.
22. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173: 697–703.
23. Yan, A., E. T. Wang, F.L. Kan, Z.Y. Tan, X.H. Sui, B. Reinhold-Hurek and W.X. Chen. 2000. *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. in arid saline soils in Xinjiang, China Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 1887-1891.
24. Zakhia F. and P. De Lajudie. 2001. Taxonomy of rhizobia. Agronomie 21: 569-576.
25. Zribi, K., R. Mhamdi, T. Huguet and M.E. Aouani. 2004. Distribution and genetic diversity of rhizobia nodulating natural populations of *Medicago truncatula* in Tunisian soils. Soil Biol. & Biochem. 36: 903–908.
26. Zribi, K., R. Mhamdi, T. Huguet and M.E. Aouani. 2005. Diversity of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* nodulating *Medicago truncatula* according to host and soil origins. World J. Microbiol. and Biotech. 21:1009-1015.

[ Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.58.6 ]