

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

مجید طالبی بداف<sup>۱</sup>، مسعود بهار<sup>۲\*</sup>، قدرت الله سعیدی<sup>۲</sup> و سید ابوالقاسم محمدی<sup>۳</sup>

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

### چکیده

به منظور تعیین پراکنش جغرافیایی سینوریزوپیوم‌های همزیست با یونجه در نواحی غرب و شمال غرب ایران، تعداد ۹۵۰ جدایه از سینوریزوپیوم‌های 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 شبیله (*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 شبیله به عنوان باکتری *S. medicae* *S. meliloti* تشخیص داده شدند و بقیه جدایه‌ها از یونجه، هفت جدایه از یونجه زرد و ۱۸ جدایه از شبیله متعلق به گونه *S. meliloti* بودند. گرچه هر دو گونه سینوریزوپیومی از تمام گیاهان میزان 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. meliloti* و *S. medicae* را به آسانی از هم تفکیک نمود که نشانگر مناسب بودن این روش برای تشخیص سریع ریزوپیوم‌های ایجاد کننده گره در یونجه است.

**واژه‌های کلیدی:** یونجه، شبیله، یونجه زرد، PCR-RFLP

### مقدمه

ریزوپیوم 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 تثیت بیولوژیکی نیتروژن انجام می‌گیرد (۱۰).

یکی از ویژگی‌های مهم گیاهان خانواده لگوم مانند یونجه، توانایی آنها در همزیستی با باکتری‌های تثیت کننده نیتروژن می‌باشد. همزیستی اختصاصی بین یک گونه خاص باکتری

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

گونه‌های سینوریزوپیومی 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 قطعهٔ تکثیر یافته 16S rDNA به وسیله آنزیم برشی *RsaI* برای تشخیص گونه‌های *S. medicae* و *S. meliloti* *S. meliloti* تولید کننده گره در این گیاه استفاده گردید(۲۶). در بررسی دیگر با تجزیه و تحلیل ناحیهٔ فواصل بین ژنی (Intergenic spacer, IGS) (AFLP) بین دو ژن *nifK* و *nifD* گونه‌های *S. medicae* و *S. meliloti* از همدیگر تمایز شدند (۱۳). یوندی و همکاران با استفاده از AFLP ژن‌های *nodD* انگشت نگاری ناحیه بین ژنی Amplification fragment (AFPL) 16S-23S rDNA و نشانگر *S. medicae* و *S. meliloti* (length polymorphism) همزیست با گیاهان میزبان *Medicago* را تفکیک نموده و نتیجهٔ گرفتند که *S. medicae* از جمعیت‌های متعدد *S. meliloti* باشند. گرفته است (۵). توالی یابی DNA ژنومی (۱۵ و ۱۶)، توالی یابی (Multilocus sequence typing, MLST) چند مکانی (Single nucleotide polymorphism, SNP) در ژنوم (۲۱) و مطالعه الگوی چند شکلی بر اثر تغییرات تک نوکلئوتیدی در توالی DNA (SNP) از جمله روش‌های دیگری هستند که در بررسی ژنتیکی گونه‌های ریزوپیومی همزیست با یونجه مورد توجه بوده‌اند.

مقایسه توالی‌های rRNA ابزار قدرتمندی برای بررسی روابط فیلوزنیکی و تکاملی موجودات زنده به ویژه باکتری‌های (۲۲). چون الگوی برشی قطعهٔ تکثیر یافته 16S rDNA با استفاده از آنزیم برشی *RsaI* در بین گونه‌های *S. medicae* و *S. meliloti* منحصر به فرد است (۲، ۵ و ۱۷)، لذا از این روش نیز در تفکیک گونه‌های مزبور سینوریزوپیومی همزیست با *M. truncatula* استفاده شده است (*S. meliloti* ۱ و ۲۶). اخیراً نیز یک روش شناسایی سریع گونهٔ PCR از بقیه ریزوپیوم‌های همزیست *Medicago* بر مبنای معرفی گردیده است. در این روش از آغازگرهای طراحی شده

باکتری‌های همزیست با گیاهان خانواده لگومینوز دارای نام *Rhizobium* هستند که در پنج جنس *Rhizobium* و *Mesorhizobium* *Bradyrhizobium* *Azorhizobium* و *Sinorhizobium* قرار گرفته‌اند (۲۴). جنس *S. terangae* *S. medicae* *S. meliloti* و *S. fredii* و *S. saheli* است که در بین آنها *S. meliloti* که در جنس‌های گیاهی *Medicago* *medicae* و *Melilotus* *Trigonella* تولید گره می‌کنند، قرابت بیشتری با هم 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 تنویر ژنتیکی ریزوپیوم‌های 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، ۹، ۱۲، ۱۳، ۲۵ و ۲۶). به نظر 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. meliloti* با یونجه‌های چند ساله و یا *S. medicae* یونجه‌های یک ساله متوفی نمی‌باشد (۵ و ۲۵). چون هر دو گونه *S. medicae* و *S. meliloti* در گیاهان متعلق به جنس‌های *Trigonella* *Melilotus* *Medicago* 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، *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

Tryptone 5g, Yeast extract 3g, CaCl<sub>2</sub> 0.9g, Agar ) TY در ۱liter (15g, ddH<sub>2</sub>O ۱liter) 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 ۳۰۰ میلی لیتر از سوسپانسیون مزبور با ۶۰۰ میلی لیتر گلکسیرون سترون در داخل لوله‌های کرایو مخلوط گردید و پس از انجماد کامل در نیتروژن مایع برای نگهداری طولانی مدت به فریزر ۸۰°C-۸۰°C-انتقال یافت.

برای جداسازی جدایه‌های ریزوبیومی همزیست با یونجه زرد (*Melilotus officinalis* (L.) Pall.) و شنبليه (*Trigonella polycerata* L.)، از گره‌های تشکیل شده روی ریشه این گیاهان در شرایط طبیعی مزارع اطراف اصفهان استفاده شد. تمام مراحل ضد عفنونی، 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 در TY در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون به صورت سوسپانسیون در آمد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰°C جوشانده شد و بلا فاصله روی یخ قرار گرفت. پس از سرد شدن نمونه‌ها و سانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، از مایع رویی محتوى هر نمونه مقدار دو میکرولیتر در واکنش‌های PCR استفاده گردید.

### تکثیر مکان nodbox4 و ژن mucR به وسیله PCR

به منظور تکثیر مکان nodbox4 در جدایه‌های ریزوبیومی مورد بررسی، از جفت آغازگر nodbox1/nodbox3 و برای تکثیر ژن mucR از جفت آغازگر mucRf/mucRr مندرج در جدول ۱ استفاده گردید (۱۸). دو جدایه (*S. meliloti*) Rm1021 (S. medicae) Bazzicalupo و LMG18864 (اهدایی پروفسور 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

از نواحی حفاظت شده مکان nodbox4 در پلاسمید pSym و ژن mucR 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 غالیت 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 mucR به وسیله PCR و همچین هضم آنزیمی قطعه تکثیر یافته 16S rDNA با آنزیم برشی *Rsa*I برای تعیین پراکنش طبیعی گونه‌های *S. medicae* و *S. meliloti* 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 ۲۲-۳۵°C در گلخانه نگهداری شد. نمونه‌های خاک از یک مزرعه یونجه و یک زمین بایر از هر یک از مناطق چغاکبود کرمانشاه، سنتنچ کردستان، عجب شیر آذربایجان شرقی و نورآباد لرستان جمع‌آوری شده بود. پس از ده هفته، به طور تصادفی چهار گیاه از هر گلدان و چهار گره از هر گیاه انتخاب شد. هر گره پس از سترون کردن سطحی در الکل ۹۶ درصد به مدت دو دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ (مایع تجاری 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 پتی سترون له گردید. یک لوپ باکتریایی از مخلوط به دست آمده روی محیط جامد

جدول ۱. نام، توالی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق<sup>۵</sup>

نام آغازگر	توالی	دماي اتصال(°C)
nodbox1	5' – TCTTTCTTATCCATAGGGTGG – 3'	57/28
nodbox3	5' – ACGGATCGTCCTCGAAG – 3'	57/1
mucRf	5' – ATGACAGAGACTTCGCTCGGT – 3'	59/8
mucRr	5' - TCACTTGCCGCGACGCTT – 3'	58/2
fDl	5' - AGAGTTGATCCTGGCTCAG – 3'	58
rDl	5' - AAGGAGGTGATCCAGCC – 3'	55

تائید شد. ترتیب توالی این قطعات توسط شرکت Macrogen کرده جنوبی انجام گرفت. توالی قطعات همسانه‌سازی شده با زن‌های موجود در بانک اطلاعات زن (NCBI) مقایسه گردید.

برای تکثیر قطعه  $16S$  rDNA  $RsaI$  و هضم با استفاده از آنزیم برشی  $RsaI$  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  $1/5$  میکرولیتر بافر  $X$  ۱۰٪ حاوی  $Taq$  DNA polymerase، یک واحد کلریدمنیزیم ۱۵ میلی مولار، ۰ میلی مولار  $dNTPs$  و دو ۰ میکرومولار از هر آغازگر،  $۰/۲$  میلی مولار 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  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت چهار دقیقه،  $30$  چرخه در  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت یک دقیقه،  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت یک دقیقه و  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت دو دقیقه و یک چرخه بسط نهایی در  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت پنج دقیقه بود. از محصول PCR هر نمونه ابتدا پنج میکرولیتر روی ژل آکاروز  $1/2$  درصد با بافر TBE الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی به وسیله اتیدیوم بروماید و مشاهده قطعه موردنظر،  $10$  میکرولیتر دیگر واکنش به وسیله یک میکرولیتر آنزیم برشی  $RsaI$  ( $5\text{U}/\mu\text{l}$ ) با  $1/5$  میکرولیتر بافر مربوطه و  $2/5$  میکرولیتر آب در یک واکنش  $15$  میکرولیتری هضم گردید. پس از نگهداری سه ساعته واکنش در  $37^{\circ}\text{C}$ ، قطعات هضم شده

میکرولیتری شامل  $1/5$  میکرولیتر بافر X حاوی کلرید منزیوم  $15$  میلی مولار، یک واحد *Taq DNA Polymerase* و دو  $0/233$  میکرومولار از هر آغازگر،  $0/2$  میلی مولار dNTPs و دو میکرومولار از DNA استخراج شده تهیه شد. پس از اضافه کردن PCR یک قطره روغن معدنی سترون به هر نمونه، واکنش های Eppendorf mastercycler gradient در دستگاه اپندورف مدل انجام گرفت که بر مبنای  $25$  چرخه با دمای  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت  $30$  ثانیه،  $53^{\circ}\text{C}$  به مدت  $45$  ثانیه و  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت  $30$  ثانیه و نهایتاً یک چرخه هفت دقیقه در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  برنامه ریزی شده بود. محصولات PCR روی ژل آگاروز  $1/2$  درصد با بافر TBE الکتروفورز شدند و ژل پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید  $10\mu\text{g/ml}$  به وسیله دستگاه Gel document عکس برداری شد.

## همسانه سازی و توالی یابی قطعات PCR

قطعات حاصل از تکثیر مکان ۴ nodbox و ژن *mucR* به وسیله کیت #K1214 (Fermentas TA clone™ PCR,) در شرکت (Ins) سویه *E. coli* میزبان همسانه سازی شد و به ناقل pTZ57R/T از MC1061 انتقال یافت. به منظور غربالگری اولیه همسانه ها روش غربالگری سریع (Rapid screening) استفاده گردید (۲۰). پلاسمید همسانه های به دست آمده، به کمک کیت (Real Biotech Corp.) استخراج گردید. صحت انتخاب همسانه ها با تکثیر قطعه های کلون شده در این پلاسمیدها به کمک جفت آغازگرهای مربوطه در واکنش PCR و نیز هضم آنزیمی توسط آنزیمهای برشی *PstI* و *EcoRI* (Fermentas Co.)

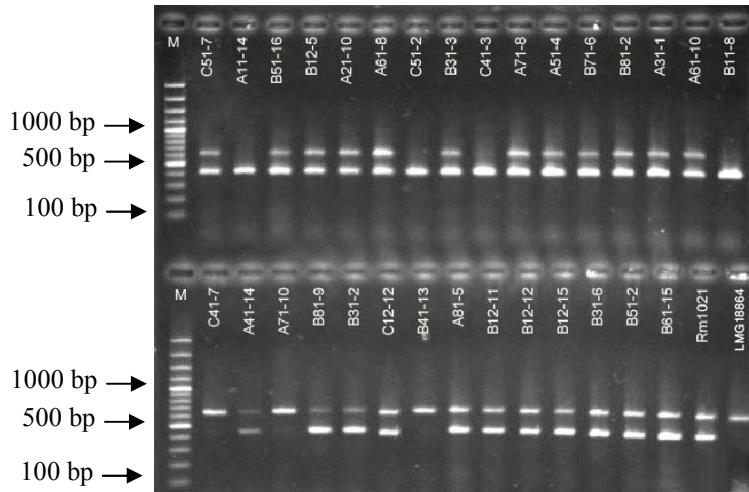
به منظور تأیید ارتباط این باندها با *S. meliloti*، قطعه ۶۳۷ جفت بازی تکثیر یافته در جدایه ۱۳-۴۱ و قطعه تکثیر یافته در جدایه ۸-۱۱ توالی یابی گردیدند و توالی‌های مزبور با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد. نتایج نشان داد که قطعه LMG18864 ۶۳۷ جفت بازی که در هر دو جدایه استاندارد *S. medicae* Rm 1021 (S. medicae) تکثیر یافته بود به Accession no. CP000738 (Accession no. CP000740) باکتری *S. medicae* WSM419 شباخت دارد که وظیفه آن تولید glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase این باکتری است (۳). ارزیابی این شباخت با ژن *nodM* باکتری *S. meliloti* در حد ۸۶٪ (Accession no. X58632) و ۸۸٪ (Accession no. AE007238) *nodM* (no. AL591788) بود (شکل ۲). در ژن *S. meliloti* موجب ساخته شدن D-glucosamine synthetase به عنوان یک سیگنال شناسایی در رابطه متقابل ریزوپیوم-گیاه میزان اهمیت دارد (۱۴). قطعه ۴۳۲ جفت بازی که در جدایه استاندارد *S. medicae* LMG18864 (S. medicae) Rm 1021 تکثیر نیافته بود اما در جدایه استاندارد ۱۰۰٪ با ژن *mucR* مربوط به گونه *S. meliloti* در بانک شباخته است (Accession no. AL591785) و Accession no. L37353) *S. medicae* finger zinc ساختار اشتراکات توالی نوکلئوتیدی این دو گونه ریزوپیومی 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 ریزوپیومی با این دو جفت آغازگر نمی‌توان به نتیجه‌گیری دقیقی در مورد تفکیک دو گونه و *S. medicae* *S. medicae* دست یافت. از آنجایی که سانچز و همکاران فقط به شناسایی *S. meliloti* توجه نموده و احتمال این را نادیده گرفته بودند که ممکن است فقط یکی از

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

## نتایج و بحث

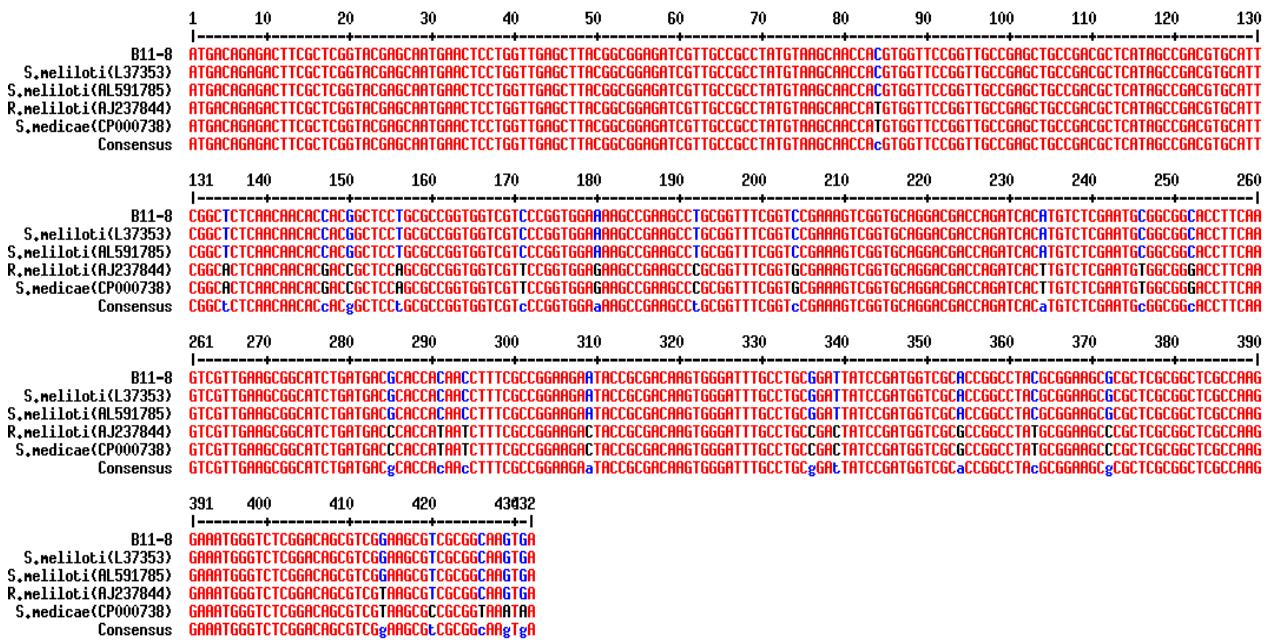
از کشت مخلوط گره‌های ریشه جمعیت‌های مختلف یونجه رشد یافته در خاک‌های جمع‌آوری شده از مناطق غرب و شمال غرب کشور تعداد ۹۵۰ جدایه باکتری سینوریزوبیومی جداسازی گردید. از گره‌های ریشه گیاهان یونجه زرد (T. polycerata) و شبیله (M. officinalis) نیز به ترتیب ۱۴ و ۳۱ جدایه به دست آمد.

در واکنش همزمان PCR، جدایه استاندارد Rm1021 به همراه ۹۴۳ جدایه یونجه، هفت جدایه یونجه زرد و ۳۱ جدایه شبیله، قطعه‌های مورد انتظار ۶۳۷ نوکلئوتیدی با جفت آغازگر nodbox1/nodbox3 و حدود ۴۳۲ نوکلئوتیدی با آغازگر mucRf/mucRr را تولید نمودند. سه جدایه A71-10، C41-7، C41-3 و B11-8 نیز تنها باند ۴۳۲ جفت بازی را تکثیر نمودند (شکل ۱). سانچز و همکاران تکثیر هر دو قطعه ۶۳۷ جفت بازی مربوط به جفت آغازگر nodbox1/nodbox3 و 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 (S. medicae) LMG18864 به همراه جدایه M. officinalis موجب تردید در این نام‌گذاری شد.



شکل ۱. نقوش الکتروفورزی محصول PCR با جفت آغازگرهای nodbox3/ nodbox1 و mucRr/mucRf 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 در جدایه ریزوبیومی B41-13 با جدایه های مه حمد د، بانک ژن (NCBI)



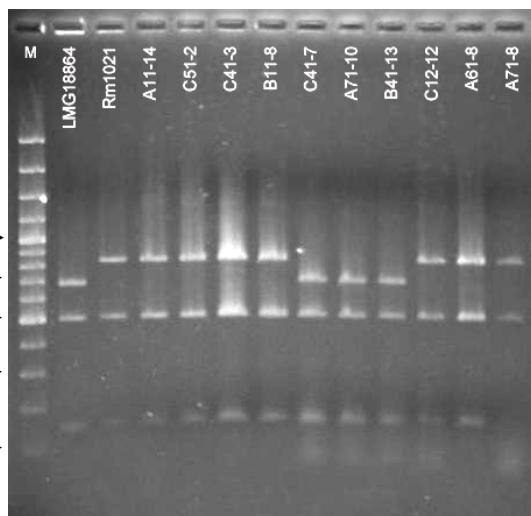
شکل ۳. مقایسه توالی قطعه DNA تکثیر یافته به وسیله جفت آغازگر mucRf/mucRr در جدایه ریزویومی ۸ (NCBI) با جدایه‌های موجود در بانک ژن

جدایه یونجه زرد و ۱۴ جدایه شنبیله با الگوی برشی جدایه *S. medicae* LMG18864 مشابه می‌باشد و الگوی بقیه نمونه‌ها هم با الگوی جدایه RM1021 (*S. meliloti*) شباهت دارد (شکل ۴). بر اساس این نتایج و مطابقت آن با نتایج دیگران (۵)، سه جدایه یونجه C41-7، A71-10 و ۱۳-۱۰، B41-13 و ۱۸ جدایه شنبیله متعلق به گونه *S. medicae* و ۱۳ جدایه *M. officinalis* 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 (۱۵، ۱۸ و ۲۶).

در بین جدایه‌های شناسایی شده متعلق به گونه *S. medicae* دو جدایه ۱۳-۱۰ 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 ۱۳-۱۰ B41-13 با جمعیت یونجه نیک شهری و

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 حالی که تکثیر باند ۶۳۷ جفت بازی و عدم تکثیر باند ۴۳۲ بازی به تفکیک دو گونه *S. meliloti* و *S. medicae* از هم دیگر کمک نمی‌نماید.

چون تمایز گونه‌های *S. medicae* و *S. meliloti* در بین جدایه‌های مورد بررسی با استفاده از جفت آغازگرهای mucRf/mucRr و nodbox1/nodbox3 منظور شناسایی دقیق‌تر گونه‌ها از روش هضم با آنزیم برشی قطعه تکثیر شده 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 *RsaI*، مشخص شد الگوی حاصل از برش آنزیمی در سه جدایه یونجه ۷، C41-7، A71-10 و ۱۳، هفت



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

از یونجه‌های مورد بررسی در بعضی از خاک‌های مورد بررسی نمی‌توان در مورد نقش شرایط محیطی و جمیعت‌های مختلف یونجه در همزیستی با گونه‌های مختلف ریزوپیوم داوری نمود ولی می‌توان گفت که همزیستی گونه *S. medicae* با یونجه‌های چند ساله متفق نیست.

فراوانی نسبی جمیعت *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* درین 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 یونجه‌های یک ساله در مقایسه با یونجه چندساله تعداد بیشتری از ریزوپیوم‌های *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 طوری که در مناطق مختلف مکزیک از

جدایه ۷ C41-7 با جمیعت 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 شبیله (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 میزان 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 ریزوپیوم جداسازی شده از تک بوته شبیله دو جدایه به *S. medicae* و دو جدایه دیگر به گونه *S. meliloti* 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 همzیستی با جمیعت‌های مختلف یونجه چند ساله غالب باشد که در پژوهش قبلی مربوط به تفکیک سینوریزوپیوم‌های همدان نیز چنین نتیجه‌ای به دست آمده بود (۱). از آنجا که یونجه‌های چند ساله اغلب با گونه *S. meliloti* همzیستی دارند (۵) لذا دست‌یابی به چنین نتیجه‌ای دور از انتظار نیست. از طرف دیگر گرچه به دلیل تعداد محدود *S. medicae* جدا شده

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 آنژیمی ناحیه PCR-RFLP 16S rDNA ریزوبیومی توسط *RsaI* (۱) و (۲۶) روش مطمئن‌تری نسبت به استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از ناحیه 4 nodbox و ژن *mucR* است.

بین ۱۷۶ جدایه جداسازی شده از جمعیت‌های مختلف یونجه شامل گونه‌های *M. polymorpha* و *M. lupulina* *M. sativa* شده از *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* گرسازی می‌نماید (۴). به این ترتیب می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بدون در نظر گرفتن شرایط محیطی خاک و

### منابع مورد استفاده

۱. کریمی، ا.، لکزیان، ک.، خوازی، 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(۴۲): ۴۴۹-۴۶۱.
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. Matheron. 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. Paffetti, 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. Ghfir 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

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. Matheron, 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. 2<sup>nd</sup> 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.