تنوع ژنتیکی گونه‌های مزوریزوبیوم همزیست نخود بومی خاک‌های ایران

احمد اصغرزاده[1]*، مهشید رفیعی دولت آبادی، محمد کارگر و هادی اسدی رحمانی

عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات خاک و آب؛ a_asgharzadeh_2000@yahoo.com

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم؛ mah_ra16@yahoo.com

عضو هیأت علمی دانشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم؛ mkargar@jia.ac.ir

عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات خاک و آب؛ asadi_1999@yahoo.com

چکیده

استفاده از مایه تلقیح‌های ریزوبیومی در زراعت گیاهان لگوم از جمله نخود به دلیل مزایای اقتصادی، کاهش مصرف کودهای شیمیایی نیتروژنی و تأمین سلامت محیط زیست در سال‌های اخیر طرفداران زیادی پیدا کرده است. در ایران نیز تولید و مصرف این کودها از یک دهه پیش آغاز شده است. تولید مایه تلقیح ریزوبیومی مستلزم در اختیار داشتن باکتری‌های مؤثر و شناخته شده می‌باشد. هدف از انجام تحقیق جاری، شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت ریزبیوم-های همزیست با گیاه نخود موجود در کلکسیون میکروبی موسسه تحقیقات خاک و آب می‌باشد. در این تحقیق ابتدا باکتری‌های مذکور بر روی محیط YMA خالص سازی شدند و علاوه بر بررسی‌های میکروسکوپی و مرفولوژیک، توان ریزوبیوم‌های مورد مطالعه در ایجاد گره بر روی ریشه گیاه میزبان از طریق آزمون آلوده‌سازی گیاه نیز مورد بررسی قرار گرفت. از 120 جدایه‌ای که تحت آزمون آلوده‌سازی گیاه قرار گرفتند، 82 جدایه توانایی گره‌زایی داشتند و به عنوان جدایه‌های nod^+ در نظر گرفته شدند. به منظور شناسایی جدایه‌های مذکور از آزمون‌های بیوشیمیایی شامل مصرف قندهای و اسیدهای آمینه مختلف و نیز رشد در شرایط متفاوت استفاده گردید. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی برای خوشه‌بندی جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفت که منجربه قرار گرفتن جدایه‌ها در شش خوشه اصلی شد. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی نشان داد که اکثر جدایه‌ها در گونه *M.ciceri* و مابقی در گونه *M.mediterraneum* قرار می‌گیرند. توالی ژنتیکی ژن 16S rRNA در شش جدایه که نماینده هر یک از خوشه‌ها بودند تعیین گردید. مقایسه توالی تعیین شده با اطلاعات ژن بانک NCBI نشان داد که از لحاظ توالی 16SrRNA جدایه‌های C-22, C-35, C-35A, C-97, C-105 در گونه *M.ciceri* و جدایه SWRI-9 در گونه *M.mediterraneum* قرار می‌گیرند.

واژه‌های کلیدی: ریزوبیوم، نخود، مایه تلقیح، تنوع ژنتیکی

مقدمه

فراهم آوردن منابع نیتروژن برای گیاهان یکی از اصلی‌ترین عوامل مؤثر در تولید محصولات کشاورزی می‌باشد. حبوبات و از جمله نخود بدلیل محتوای بالای پروتئین نیازمند مقادیر زیادی از نیتروژن می‌باشند.

معمول‌ترین راه تأمین نیتروژن مورد نیاز گیاه استفاده از کودهای شیمیایی نیتروژن‌دار است. مصرف کودهای شیمیایی علاوه بر هزینه بالا، اثرات سوء برمحیط زیست داشته و آلودگی آب‌های زیرزمینی را نیز به همراه دارد.

ریزوبیوم‌ها باکتری‌های خاکزی هستند که توان ایجاد گره و همزیستی تثبیت کننده نیتروژن با گیاهان

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: کرج، میدان استاندارد، بعد از رزکان نو، بلوار امام خمینی، موسسه تحقیقات خاک و آب

* دریافت: آذر 1386 و پذیرش: آبان 1391

Archive of SID

www.SID.ir

خانواده لگومینوز را دارا می‌باشند. نیتروژن تثبیت شده توسط این سیستم همزیستی می‌تواند به صورت کامل جایگزین کودهای شیمیایی نیتروژن‌دار شده و یا بخشی از نیاز گیاه را فراهم نماید و سبب پایداری تولید در کشت گیاهان لگوم گردد (هریدج و همکاران، 2008).

نخود محصولی است که از سطح کشت قابل توجهی در ایران برخوردار بوده و نقش زیادی در رژیم غذایی مردم دارد. این گیاه می‌تواند با ریزوبیوم‌های مؤثر همزیست رابطه برقرار نموده و مقادیر قابل توجهی نیتروژن تثبیت نماید. شناسایی ریزوبیوم‌های همزیست با لگوم‌ها می‌تواند در جداسازی و انتخاب ریزوبیوم‌های کارآمد از خاک و یا از بین توده‌ای از یک جمعیت ریزوبیومی مؤثر بوده و سبب افزایش کارایی مایه تلقیح‌های تولیدی گردد.

طبقه‌بندی ریزوبیوم‌ها در یکصد سال اخیر همواره دستخوش تغییر بوده و هر ساله جنس‌ها و گونه-های جدیدتری معرفی می‌شوند. در قرن نوزدهم فرانک اولین کسی بود که نام *Rhizobium leguminosarum* را برای انواع باکتری‌های مولد گره بر روی ریشه لگوم‌ها پیشنهاد کرد. در اوایل قرن بیستم Bergey میکروبیولوژیست امریکایی شروع به انتشار Bergey's Manual of Determinative Bacteriology نمود. خصوصیات محدود ذکر شده برای ریزوبیوم‌ها در این کتاب شامل بیهوازی، متحرک و فاقد اسپور به حدی نبودند که سبب تفکیک این باکتری‌ها از سایرین شوند . لذا توان این باکتری‌ها برای ایجاد گره در گیاهان میزبان به عنوان معیاری برای طبقه‌بندی آنها مورد توجه قرار گرفت (Fred et al., 1932). براین اساس و در نسخه 1974 این کتاب ریزوبیوم‌ها دارای یک جنس *Rhizobium* و6 گونه *R.japonicum* , *R.meliloti* , *R.phaseoli* , *R.leguminosarum* , *R.lupini* , *R.trifolli* بودند و مشخصات فنوتیپی محدودی برای این گونه‌ها ذکر شده بود که چهار گونه اول دارای رشد سریع و دو گونه دوم دارای رشد کند بودند. انواع همزیست نخود بدلیل سرعت رشد بینابینی در این طبقه‌بندی جایگاه نامشخصی داشتند .این طبقه‌بندی تا مدتها قابل پذیرش بود تا جوردن در سال 1982 با تفکیک انواع کند رشد جنس *Bradyrhizobium* را برای آنها انتخاب کرد. در سال‌های بعد استفاده از روش‌های جدید جهت ارزیابی شباهت‌ها و تفاوت‌ها در بین باکتری‌ها منجربه بروز تغییرات در طبقه‌بندی و نام‌گذاری باکتری‌های ریزوبیوم شد که معرفی جنس‌ها و گونه‌های جدیدی را در پی داشت. در ابتدا معرفی تاکسونومی Numerical، روشی جهت ترکیب داده‌های کلاسیک با داده‌های فیزیولوژیک، مورفولوژیک، سرولوژی و غیره فراهم کرد. پس از آن با پیشرفت و گسترش تکنیک‌های مولکولی خصوصیات بیشتری مورد بررسی قرار گرفت و به کمک آن طبقه بندی فیلوژنتیک و Polyphasic ارائه شد (ویلمز، 2006).

در اوایل دهه 90 به کمک روش‌های ژنتیکی، مطالعاتی بر روی توالی ژن 16S rRNA صورت گرفت که نقش مؤثری در بررسی خصوصیات ریزوبیوم‌ها ایفا کرد. نور و همکاران (1995)، با انجام مطالعات تاکسونومیکی، فیلوژنتیکی و فنوتیپی مختلف، تنوع زیستی ریزوبیوم‌های همزیست با نخود را مجدداً بررسی کردند. این مطالعات در نهایت منجربه تشریح دو گونه *R.ciceri* و *R.mediterraneum* گردید. جارویس و همکاران (1997)، ریزوبیوم‌های همزیست نخود را به دو گروه تند رشد و کند رشد تقسیم کردند. سپس توسط جارویس این دو گونه به جنس جدید *Mesorhizobium* انتقال داده شد.

امروزه 22 گونه در این جنس تشخیص داده شده است (Euzéby, 2011) که تنها 2 گونه *M.ciceri* و *M.mediterraneum* به عنوان همزیست نخود شناسایی شده است. البته در سال‌های اخیر گزارش شده است که باکتری *Sinorhizobium medicae* نیز در گیاه نخود ایجاد گرهک می‌نماید ولی این گرهک‌ها جهت تثبیت ازت مؤثر نیستند (اوآنی و همکاران، 2001).

در ایران اصغرزاده و همکاران (1375و1380) در دو بررسی جداگانه به مطالعه پتانسیل تثبیت نیتروژن استرین‌های همزیست نخود و شناسایی مولکولی این باکتری‌ها پرداختند. در تحقیقی دیگر، ضمن مطالعه 30 استرین از باکتری‌های ریزوبیوم همزیست نخود از لحاظ ایجاد گره فعال در روی ریشه، شکل کلنی در محیط YMA و رشد در محیط حاوی2% NaCl، تعداد 6 سویه فعال را انتخاب و به منظور تلقیح میکروبی معرفی شده است (رفیعی و همکاران 1385).

در سال‌های اخیر و با یافتن ژنهای جدیدتر مانند *recA, atpD* که به شناسایی ریزوبیوم‌ها کمک نموده و در مطالعات فیلوژنتیکی کاربرد زیادی دارند، انجام این گونه مطالعات از دقت بیشتری برخوردار است با این حال کماکان استفاده از ژن 16S rRNA و مطالعه توالی این ژن در انواع ریزوبیوم‌ها منجمله ریزوبیوم‌های همزیست با نخود کاربرد زیادی دارد.

مواد وروش ها

باکتری های مورد استفاده

120 جدایه باکتری مزوریزوبیوم مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون میکروبی موسسه تحقیقات

Archive of SID

www.SID.ir

خاک و آب تهیه گردیدند. این باکتری‌ها در سال‌های قبل جداسازی و مورد آزمون آلودگی گیاه قرار گرفته و کارایی آنها از نظر تثبیت بیولویک در شرایط گلخانه و قدرت رقابت آنها علاوه بر توان تثبیت بیولوژیک در شرایط مزرعه اندازه‌گیری شده بودند (اصغرزاده، 1375). در جدول 1 محل نمونه‌برداری از گره‌های ریشه نخود آورده شده است.

برای اطمینان از عدم آلودگی و جهش‌های احتمالی در جدایه‌های مورد استفاده، که سبب از دست رفتن توان گره‌زایی ریزوبیوم‌ها می‌گردند، جدایه‌های انتخاب شده مجدداً در محیط YMA کشت و خالص سازی شدند (یک و همکاران،1993) و سپس مورد بررسی‌های میکروسکوپی، مورفولوژیک و آزمون آلوده سازی گیاه قرار گرفتند. به منظور اطمینان از توان گره‌زایی جدایه‌ها، این باکتری‌ها از گره‌های ایجاد شده در آزمون آلوده‌سازی گیاه میزبان جداسازی شده و برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمون‌های های بیوشیمیایی

به منظور شناسایی صفات فیزیولوژیک و تفکیک گونه‌های مزوریزوبیوم آزمون‌های زیر بر روی جدایه‌ها انجام گرفت. در ابتدا باکتری‌ها به محیط کشت مایع Yeast Mannitol Broth (YMB) انتقال داده شدند و پس از 24ساعت، با مشاهده کدورت لازم در محیط و فقدان آلودگی، آزمون‌های مورد نظر بشرح زیر انجام گرفت.

آزمون استفاده از کربوهیدرات‌ها

در این آزمون توان جدایه‌ها برای مصرف قندهای گلوکونات، دی- لاگزوز، ال- زایلوز، گالاکتوز و دی- رافینوز بررسی شد (نوری و همکاران،1995 و آمارگر و همکاران، 1997).

آزمون استفاده از اسیدهای آمینه

در این آزمون مصرف و یا عدم مصرف اسید های آمینه بتا- آلانین، ال- آلانین ، ال- لایسین، ال- اورنیتین، ال- تریپتوفان، ال- لوسین، ال- آسپارتات، ال- تیروزین و ال- فنیل آلانین توسط جدایه‌های همزیست نخود بررسی شد (مات الله و همکاران،2002 و آمارگر و همکاران،1997).

آزمون تحمل نمک کلر و سدیم

در این آزمون تحمل جدایه‌ها به غلظت 2% نمک NaCl بررسی شد (مات الله و همکاران،2002).

آزمون رشد در دماهای مختلف

در این آزمون توانایی رشد باکتری‌ها در دماهای 45 ، 40، 28 و 5 درجه سانتی‌گراد بررسی شد (مات الله و همکاران، 2002 و جارویس و همکاران 1997).

ارزیابی قابلیت حل کنندگی فسفات در استرین‌های مزوریزوبیوم

در این آزمون توانایی جدایه‌ها در محلول سازی فسفر از منبع نامحلول تری کلسیم فسفات بررسی شد (آمارگر و همکاران،1997).

پس از انجام آزمون‌های مورد نظر، داده‌های بدست آمده در جداولی منظم شد و سپس این داده‌ها در برنامه آماری Excel به صورت صفر و یک تبدیل شده و با استفاده از نرم افزار NTSYS گروه‌بندی داده‌ها به روش جاکارد انجام گردید.

آزمون مطالعه توالی ژن 16S rRNA

تهیه DNA الگو و تکثیر ژن 16S rRNA

برای تهیه DNA الگو برای استفاده در فرآیند PCR از روش ذوب و انجماد استفاده شد (اصغرزاده، 1380). برای تکثیر این ژن از آغازگرهای (5`-TGG CTC AGA AGG AAC GCT GGC GGC-3`) Y1 و (5`-TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC CAG TC-3`) Y3 استفاده شد. بدین منظور از دستگاه PCR-Genius مدل Techne و برنامه حرارتی شامل 2دقیقه دمای 92/5 درجه سانتی‌گراد برای دناتوره شدن رشته های DNA، 30 مرحله اتصال به صورت 1دقیقه دمای 92/5 درجه سانتی گراد، 1دقیقه دمای 62 درجه سانتی گراد، 2دقیقه دمای 72 درجه سانتی گراد و مرحله بسط شامل3 دقیقه دمای 72 درجه سانتی‌گراد بود(لارانجو و همکاران،2004).

پس از تکثیر ژن 16S rRNA محصولات PCR بر روی ژل آگارز 0/7 درصد مشاهده و باند 1400 نوکلوتیدی با استفاده از نشانگر وزنی مورد شناسایی قرار گرفت. سپس با بهینه سازی فرآیند PCR باندهای اضافی حذف و ژن مورد نظر استخراج و به صورت رفت و برگشتی وبا استفاده از آغازگرهای Y1 و Y3 تعیین توالی شد. با توجه به گروه‌بندی بدست آمده از آزمون‌های بیوشیمیایی ژن 16S rRNA 6 جدایه برای تععین توالی انتخاب شدند. پس از دریافت نتایج تعیین توالی با کمک نرم افزار Chromaspro141 توالی ژن 16S rRNA با داده‌های حاصل از تعیین توالی رفت و برگشتی کامل شده و توالی قطعه کامل شده با توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI مورد مقایسه قرار گرفت و جدایه‌های مذکور شناسایی شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

از میان 120 جدایه، 82 جدایه توانستند در گیاه نخود ایجاد گره نمایند. این جدایه مجدداً از گره‌ها جداسازی و خالص سازی شدند و برای انجام آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. آزمون‌های بیوشیمیایی بر روی 82 جدایه باکتری‌ها صورت گرفت که نتایج مربوط به سه جدایه بدلیل رشد نامناسب بر روی محیط کشت-های تهیه شده برای انجام آزمون‌ها حذف و نتایج 79 جدایه در جدول (2) آورده شده است.

نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی

براساس نتایج بدست آمده مشخص شد جدایه‌های مورد استفاده از نظر خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی دارای تنوع قابل توجهی می‌باشند به طور مثال تنها 7/3 درصد از جدایه‌ها قادر به استفاده از اسید آمینه فنیل آلانین بودند، در حالیکه تمامی آنها توان استفاده از لوسین را داشتند. این تنوع در مورد مصرف کربوهیدرات‌ها، رشد در شرایط دمایی مختلف و غلظت 2% کلرید سدیم و نیز توان حلالیت فسفات‌های نامحلول نیز دیده شد.

گره‌بندی داده‌های حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی نیز بر تنوع جدایه‌های مورد بررسی دلالت داشت. بر اساس گروه‌بندی حاصله 79 جدایه مورد بررسی در 6 گروه قرار گرفتند (جدول 3). بر اساس نتایج بدست آمده 62 جدایه (78%) در گروه اول قرار گرفتند. جدایه‌های این گروه توان استفاده از لاگزوز و زایلوز را داشتند و لذا در گونه *M.ciceri* قرار گرفتند. مابقی جدایه-ها در 5 گروه دیگر توزیع شدند با این حال همگی از نظر خصوصیات مشابه گونه *M.mediterraneum*. بودند. باکتری‌های موجود در هر گروه خود دارای تفاوت‌های قابل توجهی از نظر توان رشد در دماهای مختلف و یا وجود کلرید کلسیم در محیط کشت بودند.نتایج بدست آمده از تکثیر ژن 16S rRNA در 82 جدایه دارای توان گره‌زایی در این تحقیق نشان داد که تمامی باکتری‌ها دارای یک باند در محدوده 1400 جفت باز بودند هر چند تفاوت‌هایی در بین جدایه‌ها وجود داشت. 17/7 درصد باکتری‌ها علاوه بر باند 1400 جفت‌بازی، دارای باندی به وزن 1300 جفت باز نیز بودند (شکل 1) که با بهینه سازی شرایط PCR باند های اضافی حذف شدند (شکل1).

با بررسی خوشه‌های بدست آمده از آزمون‌های بیوشیمیایی 6 جدایه C-22, C-35, C-35A, C-97, C-105, SWRI-9 مورد تعیین توالی ژن 16S rRNA قرار گرفتند. مقایسه توالی تعیین شده با اطلاعات ژن بانک NCBI نشان داد که از لحاظ توالی 16SrRNA جدایه-های C-22, C-35, C-35A, C-97, C-105 در گونه *M.ciceri* و جدایه SWRI-9 در گونه و *M.mediterraneum* قرار می‌گیرند.

بحث و نتیجه‌گیری

از 120 جدایه‌ای که تحت آزمون آلوده سازی گیاه قرار گرفتند، 82 جدایه توانایی گره‌زایی داشتند و به عنوان nod^+ در نظر گرفته شدند. آزمون-های بیوشیمیایی انجام شده نشان داد که 78 درصد جدایه‌ها دارای تشابه زیادی با یکدیگر بوده و در یک گروه قرار می‌گیرند و 17 جدایه (22 درصد) در پنج گروه دیگر قرار گرفتند. استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی ریزوبیوم‌ها توسط سایر محققین با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است (آمارگر و همکاران،1997، نوری و همکاران 1994).

جدایه‌های مورد مطالعه در 2 خوشه اصلی با تشابه 77% قرار گرفتند. در این فاصله 4 خوشه فرعی نیز وجود داشت که تعداد محدودی باکتری در آنها قرار گرفتند.

نور و همکاران (1994 و 1995) با استفاده از 100 نوع منبع مختلف کربن نشان دادند که ریزوبیوم‌های همزیست نخود تنها قادر به استفاده از 50 ترکیب می‌باشد. بر اساس نتایج تحقیقات این محققین، ریزوبیوم‌های گره‌زای نخود براساس استفاده از قندهای لاگزوز و زایلوز در 2 گروه مجزا قرار می‌گیرند، بدین معنا که باکتری‌های مصرف کننده لاگزوز و زایلوز، *M.ciceri* هستند و باکتری‌هایی که توانایی مصرف این دو قند را ندارند *M.mediterraneum* می‌باشند. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، جدایه‌های مورد آزمایش در دو گونه *M.ciceri* و *M.mediterraneum* قرار می‌گیرند که 62 جدایه گروه اول که 78 درصد را شامل می‌شوند در گونه *M.ciceri*. و 17 جدایه سایر گروها در گونه *M.mediterraneum* قرار می‌گیرند. در این تحقیق مشخص شد که اکثریت جدایه‌ها از گلوکونات استفاده کردند که با نتایج نور و همکاران (1994) مطابقت ندارد.

بر اساس آزمایشات جارویس و همکاران (1997) هیچیک از گونه‌های مزوریزوبیوم تلقیح کننده نخود نمی‌توانند از رافینوز استفاده کنند. درحالیکه که 54/8 درصد باکتری‌های همزیست نخود مورد بررسی در این تحقیق که از مناطق آگرواکولوژیکی متفاوت تهیه شده بودند به خوبی از رافینوز استفاده کردند. در این خصوص به نظر می‌رسد انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه ضروری بنظر می‌رسد.

Archive of SID

www.SID.ir

از لحاظ مصرف اسیدهای آمینه نیز اکثر باکتری‌های مورد مطالعه در گروه *M.ciceri* قرار گرفتند هر چند تفاوت‌هایی نیز با نتایج نور و همکاران (1994) بدست آمد.

در حقیقت با وجود آنکه استفاده از ال-تریپتوفان در هر دو گونه مثبت گزارش شده است ولی در این تحقیق جدایه‌هایی وجود داشتند که تریپتوفان را مصرف نکردند. از طرف دیگر طبق گزارشات گذشته، هر دو گونه توانایی استفاده از تیروزین را داشتند ولی در این تحقیق باکتری‌هایی مشاهده شدند که از تیروزین استفاده نکردند.

طی گزارشات قبلی هیچ یک از گونه‌های نخود توانایی استفاده از لایسین و فنیل آلانین را نداشتند، ولی در این تحقیق اکثریت نمونه‌ها از لایسین استفاده کردند و تنها تعداد کمی از آنها فاقد این توانمندی بودند و 7/3 درصد باکتری‌ها نیز از فنیل آلانین استفاده کردند.

بر اساس مطالعات که توسط مات الله (2002)، نور و همکاران (1994) و جارویس و همکاران (1997) تکیه بر توان رشد باکتری‌های همزیست نخود در محیط دارای 2% کلرید سدیم و یا محیط با دماهای متفاوت برای گروه‌بندی این باکتری‌ها از اعتبار زیادی برخوردار نیست و همواره تناقضات قابل توجهی در این رابطه به چشم می‌خورد. در این تحقیق نیز جدایه‌های مورد مطالعه در یک گروه نیز از لحاظ این صفات دارای تفاوت‌هایی با یکدیگر بودند.

توالی ژن 16S rRNA نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه به دو گونه *M.ciceri* و *M.mediterraneum* تعلق دارند که اکثریت جدایه‌ها در گونه *M.ciceri* قرار گرفتند. طی مطالعاتی که توسط لارانجو و همکاران (2004) بر روی مزوریزوبیوم نخود در کشور پرتقال انجام گرفت، وجود دو گونه مذکور تأیید گردید.

در این تحقیق نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و نیز تعیین توالی ژن 16S rRNA منجربه شناسایی دو گونه *M.ciceri* و *M.mediterraneum* گردید ولی عدم تطابق-هایی نیز در این نتایج دیده شد. نتایج مشابهی توسط لارانجو و همکاران (2004) نیز گزارش شده است. از دلایل اصلی این عدم تطابق می‌توان به دقت کمتر آزمون-های بیوشیمیایی نسبت به روش تعیین توالی ژن 16S rRNA و نیز وجود تبادلات قطعات ژنی در ریزوبیوم‌های همزیست با نخود اشاره کرد که خود می‌تواند منجربه پیدایش گونه‌های بینابینی تحت عنوان *Mesorhizobium* sp. گردد (زهران،2001).

نتایج حاصل از تکثیر قطعه ژن 16S rRNA نشان داد که جدایه‌ها علیرغم داشتن بان در محدوده 1400 جفت باز، تفاوت‌هایی نیز با یکدیگر دارند. متغیر بودن اندازه این ناحیه و وجود چند باند در جدایه‌های مختلف باکتری‌های ریزوبیوم در مطالعات نور و همکاران (1995) نیز گزارش شده است. بررسی‌های این محققان در مورد جدایه‌های مزوریزوبیوم مورد آزمایش نشان داد که همگی این جدایه‌ها دارای باند 16S rRNA با وزن حدود 1500 جفت باز بودند.

نتایج حاصل از تعیین توالی این ژن در جدایه-های C-22, C-35, C-35A, C-97, C-105, SWRI-9 به کمک اطلاعات بانک ژن موجود در NCBI تجزیه و تحلیل شد و جایگاه هریک از باکتری‌های مورد بررسی در بین ریزوبیوم‌ها مشخص شد. این نتایج نشان داد که با وجود اینکه طول و نوع توالی تعیین شده برای 6 جدایه تفاوت‌هایی با یکدیگر دارند ولی از بین 6 جدایه مورد مطالعه، 5 جدایه جزء گونه *M.ciceri* و یک گونه (SWRI-9) به *M.mediterraneum* تعلق دارد، ولی اختلاف بین 5 جدایه گونه *M.ciceri* نیز قابل توجه می‌باشد. به عبارتی این موضوع نشانگر تفاوت فاحش بین گونه‌ای در این جنس از ریزوبیوم‌ها می‌باشد. با توجه به اختلافات مشاهده شده در جدایه‌های بومی کشور مطالعات بیشتری در این زمینه لازم است.

جدول 1- مشخصات محل نمونه برداری گره‌های ریشه‌ای از استان‌های مختلف

ردیف	کد نمونه	محل نمونه برداری
1	C-1	لرستان= کیلومتر 28 جاده اندیمشک
2	C-5	لرستان= گوهردشت، کیلومتر 40 جاده خرم‌آباد
3	C-6	لرستان= گوهردشت، کیلومتر 30 جاده خرم‌آباد
4	C-8	لرستان= گوهردشت، کیلومتر 5 جاده رومشگان
5	C-9	لرستان= گوهردشت، کیلومتر 15 جاده رومشگان
6	C-10	لرستان= گوهردشت، کیلومتر 15 جاده رومشگان
7	C-12	لرستان= گوهردشت، روستای طراحان، 40 کیلومتر به بابازید
8	C-15	لرستان= گوهردشت، روستای رومشگان، کیلومتر 20 جاده بابازید
9	C-16	لرستان= خرم‌آباد، کیلومتر 12 جاده نورآباد

Archive of SID

www.SID.ir

10	C-17	لرستان= خرم‌آباد، کیلومتر 25 جاده نورآباد
11	C-19	لرستان= سلسله، ابتدای جاده نورآباد
12	C-20	لرستان= سلسله، ابتدای جاده نورآباد
13	C-21	لرستان= سلسله، کیلومتر 15 جاده نورآباد
14	C-22	لرستان= سلسله، کیلومتر 15 جاده نورآباد
15	C-23	لرستان= دلفان، کیلومتر 35 جاده نورآباد
16	C-24	لرستان= خرم‌آباد، کیلومتر 22 جاده بروجرد
17	C-25	لرستان= درود، کیلومتر 10 جاده الیگودرز
18	C-44	خراسان= نیشابور، ابتدای جاده تربت حیدریه
19	C-48	خراسان، تربت حیدریه، خماری، جاده تربت حیدریه
20	C-49	خراسان، تربت حیدریه، جاده تربت حیدریه، پلیس راه کیلومتر 20
21	C-50	خراسان، تربت حیدریه، کیلومتر 15 جاده مشهد
22	C-56	خراسان= سبزوار، جاده سبزوار، قوچان کیلومتر 21
23	C-59	خراسان= سبزوار، کلپین، قوچان، سبزوار کیلومتر 60
24	C-60	خراسان= اسفراین، آب روان، قوچان، سبزوار کیلومتر 80
25	C-65	خراسان= شیروان، یزدان‌آباد سفلی، جاده شیروان به قوچان، 12 کیلومتر به قوچان
26	C-68	اردبیل= جاده اردبیل به خلخال، روستای حفظ‌آباد، کیلومتر 75
27	C-75	اردبیل= گرمی، جاده گرمی به اردبیل شهر رضی
28	C-79	اردبیل= نیر، کیلومتر 17 جاده اردبیل
29	C-77	اردبیل= گرمی، سه راه اردبیل و گرمی و مشکین‌شهر، 40 کیلومتر به مشکین‌شهر
30	C-90	کرمانشاه= تازه‌آباد، 25 کیلومتر قبل از روانسر
31	C-91	کرمانشاه= روانسر، قبل از محدوده شهر
32	C-92	کرمانشاه= صفی‌آباد، نرسیده به جوان‌رود
33	C-93	کرمانشاه= ساروخان، نرسیده به دولت‌آباد
34	C-95	روانسر= سنجابی، نرسیده به کوزران
35	C-97	روانسر، پالابند به طرف کرمانشاه
36	C-99	اسلام‌آباد، انتهای محدوده شهری به طرف کرند
37	C-100	اسلام‌آباد= خسروآباد 15 کیلومتر به کرند
38	C-101	قصر شیرین= شهرک حلقه (جاده کرند-قصر شیرین)
39	C-105	اسلام‌آباد= بعد از تنگه مرصاد، نرسیده به سه‌راهی کوزران
40	C-110	هریسن= هریسن به طرف نورآباد
41	C-119	مرکزی= فرمیهن، سه‌راه نظام‌آباد، به طرف روستای نظام‌آباد
42	2/1 A	آذربایجان شرقی، تبریز، خلعت‌پوشان
43	5 A	آذربایجان‌شرقی، تبریز، جاده ممقان، 10 کیلومتر به آذرشهر، جاده فرعی
44	6/*	آذربایجان غربی، قوشچی، گروند قوشچی
45	8/*	آذربایجان شرقی= مراغه، ایستگاه مراغه
46	12/1A	آذربایجان غربی= ارومیه، روستای حیدرلو
47	14 A	آذربایجان شرقی= بناب، مدخل ورودی شهر از مراغه
48	15 A	آذربایجان شرقی= بناب، 5 کیلومتر از بناب به طرف میاندوآب
49	15/2A	آذربایجان شرقی= بناب، 5 کیلومتر از بناب به طرف میاندوآب
50	19 A	آذربایجان غربی=25 کیلومتر به قوشچی از طرف ارومیه
51	21 A	آذربایجان شرقی= مراغه، روستای آغجه‌اوبه
52	21/* A	آذربایجان شرقی= روستای آغجه‌اوبه، مراغه
53	23/1 A	شهران= اتوبان تهران کرج، روبروی پیکان‌شهر
54	35 A	کردستان= مهاباد، 20 کیلومتر به بوکان
55	3801 A	کردستان= مهاباد، 20 کیلومتر به سقز از بوکان روبروی رستوران
56	42 A	کردستان= مهاباد، 35 کیلومتر به دیوان دره از طرف سقز
57	43 A	کردستان= مهاباد، 5 کیلومتر به دیوان دره از طرف سقز
58	48 A	همدان= 50 کیلومتر به همدان از طرف قروه
59	IC-146	هند ICRISAT

Archive of SID

www.SID.ir

60	IC-59	هند ICRISAT
61	CP-36	سوریه ICARDA
62	CP-31	سوریه ICARDA
63	11/*	آذربایجان شرقی= مراغه، روستای بایقوت
64	IC-76	هند ICRISAT
65	IC-94	هند ICRISAT
66	IC-2091	هند ICRISAT
67	15/1 A	آذربایجان شرقی= 5 کیلومتر از بناب به طرف میاندآب
68	26.2 A	آذربایجان غربی= 47 کیلومتر به نقده از طرف ارومیه
69	C-35	استان فارس= شیراز بعد از خلف‌آباد
70	48A	استان فارس= شیراز بعد از خلف‌آباد
71	C-111	همدان= سنقر، سه راهی باقرآباد، جاده بیستون، سنقر
72	C-43	استان خراسان= نیشابور، 5 کیلومتر به نیشابور از مشهد
73	C-27	استان فارس= مرودشت، روستای فیروزی
74	32 A	کردستان= مهاباد، 5 کیلومتر به بوکان
75	C-98	کرمانشاه، اسلام‌آباد، انتهای مشهد به طرف کرند
76	C-26	لرستان= درود، کیلومتر 20 جاده الیگودرز
77	11 AA	آذربایجان شرقی= مراغه، روستای بایقوت
78	C-88	کرمانشاه، جاده کمربندی سنندج، مزستان کشاورزی شهید کلانتری
79	C-4	لرستان، گوهردشت، کیلومتر 40 جاده خرم‌آباد

جدول 2- نتایج آزمون های بیوشیمیایی انجام شده بر روی جدایه‌ها

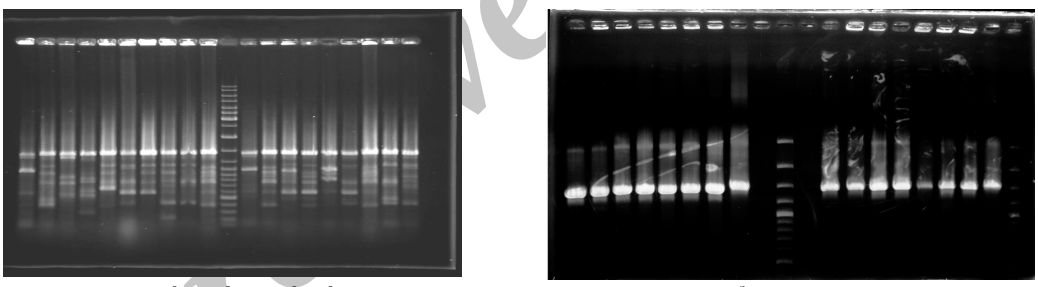
آزمون های مورد استفاده		درصد جدایه های با نتیجه مثبت
دما (°C)	45	12/1
	40	25/6
	28	100
	5	70/7
حلالیت فسفاتهای نامحلول		12
رشد در غلظت 2% کلرید سدیم		46/3
استفاده از کربوهیدرات ها	گلوکونات	85/3
	دی-لاگزوز	98/7
	ال-زایلوز	100
	گالاکتوز	86/5
	دی-رافینوز	54/8
استفاده از اسیدهای آمینه	بتا-آلانین	91/4
	ال-آلانین	96/3
	ال-لایسین	98/7
	ال-اورنیتین	95/1
	ال-تریپتوفان	89
	ال-لوسین	100
	ال-آسپارتات	42/6
	ال-تیروزین	87/8
	ال-فنیل آلانین	7/3

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 3- گروه‌بندی جدایه‌های ریزوبیوم همزیست نخود بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی

آزمون ها	گروه I (n=62)	گروه II (n=6)	گروه III (n=4)	گروه IV (n=3)	گروه V (n=2)	گروه VI (n=2)
گلوکونات	% 69/5	%3/6	%3/6	%2/4	%2/4	%1/2
دی -لاگزوز	%75/6	%7/3	%4/8	%3/6	%2/4	%2/4
ال - زایلوز	%75/6	%7/3	%4/8	%3/6	%2/4	%2/4
گالاکتوز	%73/1	%6	%4/8	%1/2	%1/2	0
دی - رافینوز	%48/7	%7/3	0	0	0	0
بتا – آلانین	%73/1	%7/3	%4/8	%2/4	0	%2/4
ال -آلانین	%75/6	%7/3	%4/8	%3/6	%1/2	%2/4
ال - لایزین	%73/1	%7/3	%4/8	%3/6	%2/4	%2/4
ال - اورنیتین	%71/9	%6	%3/6	%3/6	%2/4	%2/4
ال -تریپتوفان	%67	%7/3	%3/6	%3/6	%3/6	%2/4
ال - لوسین	%75/6	%7/3	%4/8	%3/6	%2/4	%2/4
ال - آسپارتات	%37/8	%1/2	0	%1/2	%2/4	0
ال - تیروزین	%70/7	%6	%4/8	0	%2/4	%2/4
ال - فنیل آلانین	0	%4/8	0	0	0	%2/4
NaCl 2%	%46/3	%7/3	%3/6	%3/6	%2/4	%2/4
دمای ^{0C} 5	%60/9	0	%2/4	0	%2/4	%1/2
دمای ^{0C} 28	%75/6	%7/3	%4/8	%3/6	%2/4	%2/4
دمای ^{0C} 40	%12/1	%7/3	%3/6	0	%2/4	0
دمای ^{0C} 45	%2/4	%3/6	%4/8	0	0	0
حل کنندگی فسفات	%17	0	%4/8	0	0	0



شکل 1- تصویر ژل آگارز نمونه‌های تکثیر شده ژن 16S rRNA قبل (چپ) و بعد (راست) از بهینه سازی تکثیر ژن 16S rRNA

Archive of SID

فهرست منابع:

1. اصغرزاده، ا ، صالح راستین ،ن.، محمدی ،م.1375. بررسی پتانسیل تثبیت ازت در همزیستی سویه‌های بومی مزوریزوبیوم با دو رقم اصلی نخود (*Cicer arietinum*) پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.
2. اصغرزاده، ا.، حسینی مزینانی، س.م.، ملکوتی، م.ج.، فیض آبادی، م.م. 1380. شناسایی سویه‌های باکتری‌های همزیست نخود ایرانی مزوریزوبیوم سیسری (*Mesorhizobium ciceri*) با کارایی تثبیت ازت متفاوت با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی. پایان نامه دکترا، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.
3. رفیعی .م.، اصغرزاده ،ا.، کارگر .م.1385. تعیین گونه های مزوریزوبیو (*Mesorhizobium*) تلقیح کننده نخود (*Cicer arietinum* L.) با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و مارکرهای مولکولی 16S و .IGS .پایان نامه کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد واحد جهرم

www.SID.ir

4. Amarger, N., Macheret, V. and Laguerre, G. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov . and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. International Journal of systematic Bacteriology.47: 996-1006.
5. Aouani, M.E., Mhamdi, R., Jebara, M. and Amarger, N. 2001. Characterization of *Rhizobia* nodulating chickpea in tunisia . *Agronomie.* 21: 577-581.
6. Beck, D. P., Materon, L.A., Afandi, F. 1993. Practical *Rhizobium*–Legume Technology Manual. Technical Manual No. 19. ICARDA Syria.
7. Euzéby, J.P. 2011. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature- Genus *Mesorhizobium*. http://www.bacterio.cict.fr/m/mesorhizobium.html.
8. Fred, E.B., Baldwin, I.L. and McCoy, E. 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin, Madison.
9. Herridge, D.F., Peoples, M.B. and Boddey, R.M., 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant and Soil 311: 1–18.
10. Jarvis, B.D.W., Van Berkum, P., Chen, W.X., Nour, S.M., Fernandez, M.P., Cleyet-Marel, J.C. and Gillis, M. 1997 . Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. International *Journal of Systematic Bacteriology*. 47: 895-898.
11. Laranjo, M., Machado, J., Young, J.P.W. and Oliveira, S. 2004. High diversity of chickpea *Mesorhizobium* species isolated in a Portuguese agricultural region. *FEMS Microbiology Ecology*. 48: 101-107.
12. Maatallah, J., Berraho, E.B., Sanjan, J. and Lluch, C. 2002. Phenotypic characterization of *Rhizobia* isolated from Chickpea *(Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie.*22: 321-329.
13. Nour, S.M., Cleyet-Marel, J.C., Normand, P.H. and Fernandez, M.P. 1995. Genomic heterogeneity of strain nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L)and description of Rhizobium mediterraneum sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 45: 640-648.
14. Nour, S.M., Fernandez, M.P., Normand, P., and Cleyet-Marel, J.C. 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). International Journal of Systematic Bacteriology. 44: 511-522.
15. Willems, A. 2006. The taxonomy of *Rhizobia* : An overview. Plant and Soil. 287: 3-14.
16. Zahran, H.H. 2001. *Rhizobia* from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 91: 143-153.

Archive of SID

www.SID.ir