Archive of SID

مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۳، ۱۳۸۹ (۶۳۳-۶۲۳)

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت ریزوبیوم‌های بومی همزیست با سه گونه شبدر به کمک روش انگشت نگاری rep- PCR

بنفشه جلال‌زاده مقدم شهری[1]*، مسعود بهار[2] و خورشید رزمجو[3]
۱، محقق گروه پژوهشی زیست فناوری قارچ‌های صنعتی، جهاد دانشگاهی واحد مشهد
۲، ۳، دانشیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان
(تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۲۵ - تاریخ تصویب: ۸۹/۱/۲۵)

چکیده

اولین قدم در تولید مواد تلقیحی ریزوبیومی بررسی تنوع میان جمعیت‌های بومی به منظور غربال‌سازی و یافتن نژادهای جدید و مؤثری است که بیشترین سازگاری را با میزبان لگومی خود داشته باشند. با هدف تعیین تنوع ژنتیکی، جمعیت جدایه‌های *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii همزیست با سه گونه شبدر کاشته شده در خاک هفت منطقه جغرافیای مختلف کشور، با استفاده از روش انگشت‌نگاری rep-PCR بررسی گردید. از میان ۱۵۲ جدایه جمع‌آوری شده، ۲۲ نژاد مختلف برای سه گونه شبدر مورد بررسی، شناسایی گردید. مقایسه الگوهای انگشت‌نگاری و دندروگرام مربوطه تنوع قابل توجهی را میان سویه‌های جدا شده از گونه‌های مورد بررسی نشان داد. نتایج نشان داد که تکنیک rep- PCR ابزار مناسبی برای تفکیک نژادهای ریزوبیومی نزدیک به هم می‌باشد. همچنین مقایسه الگوهای انگشت نگاری نشان می‌دهد که گونه‌های شبدر در جلب همزیستی نژادهای ریزوبیومی تا حد زیادی اختصاصی عمل می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: همزیستی، تثبیت بیولوژیکی نیتروژن، فراوانی نژادی، غالبیت نژادی، rep-PCR.

مقدمه

ریزوبیوم‌ها گروهی از باکتری‌های خاک هستند که قادر به تثبیت نیتروژن مولکولی در برقراری رابطه همزیستی با گیاهان خانواده لگومینوز می‌باشند. ریزوبیوم‌های همزیست در صورت وجود گیاهان میزبان جزئی از میکروفلور طبیعی خاک بوده و همزیستی میان ایندو شریک از طریق در اختیار قرار دادن نیتروژن احیاء شده که عاملی حیاتی و محدود کننده در تغذیه گیاه است، گیاه را نسبت به این عنصر اتوتروف می سازد. به واسطه همین ویژگی، کشت گیاهان لگوم عاملی مؤثر در افزایش حاصلخیزی خاک می‌باشد. امروزه در بسیاری کشورها، ریزوبیوم‌ها به عنوان مایه تلقیح گیاهان خانواده لگومینوز مورد استفاده قرار می‌گیرند. از طریق معرفی ریزوبیوم‌های سازگار و مؤثر به خاک، محصولات کشاورزی متعددی به نواحی جغرافیایی جدیدی در دنیا معرفی شده‌اند. اولین مرحله در تولید اینگونه مواد تلقیحی، بررسی جمعیت‌های مختلف به منظور انتخاب نژادهایی است که بالاترین پتانسیل را از نظر گره زایی و تثبیت نیتروژن داشته باشند. علاوه بر آن، اطمینان از سازگاری ریزوبیوم تلقیحی معرفی شده با میزبان خود و

* نویسنده مسئول: بنفشه جلال‌زاده تلفن: ۸۷۸۱۵۱۴- ۰۵۱۱ E-mail: bjalalzadeh@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

قدرت رقابت با نژادهای بومی غیر موثر در خاک‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است (McInnes et al., 2004).

از میان گیاهان علوفه‌ای متعلق به خانواده بقولات گیاه شبدر (*Trifolium spp.*) به لحاظ ارزش کمی و کیفی علوفه جایگاه ویژه‌ای در کشاورزی جهان دارد (Zohary & Heller, 1984). این گیاه دارای سازگاری وسیعی در نواحی مختلف جغرافیایی کره زمین می‌باشد. شبدر دارای سیستم ریشه‌ای قوی می‌باشد که با کمک باکتری‌های ریزوبیوم به حاصلخیزی خاک و بهبود زهکشی آن کمک می‌کند. علاوه بر تأثیر در بهبود کیفیت خاک، شبدر در سراسر دنیا در تأمین علوفه، کاه، کود سبز و علوفه سیلو شده و همچنین تولید عسل نقش دارد (Taylor, 1985). این گیاه دارای ۱۲ گونه تجاری مهم است که پنج گونه آن در ایران کشت می‌شوند و بومی ایران می‌باشند. ریزوبیوم‌های شبدر، متعلق به گونه *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* هستند. بررسی تنوع جمعیت‌های طبیعی شبدر نشان می‌دهد که تنوع بالایی از نظر کارایی و یا عدم کارایی فرایند تثبیت ازت میان ریزوبیوم‌های همزیست و گونه‌های مختلف شبدر وجود دارد (Tefaye & Holl, 1999; Svenning et al., 2001). روش‌های مختلف ژنوتیپی و فنوتیپی در برآورد تنوع جمعیت ریزوبیوم‌ها نشان می‌دهد که ساختار جمعیت ریزوبیوم‌ها در نواحی مختلف بسیار متنوع است (Hartman & Amarger, 1991). تجزیه و تحلیل فنوتیپی جمعیت ریزوبیوم‌ها شامل بررسی خصوصیات تغذیه‌ای، مقاومت به فاژها یا آنتی‌بیوتیک‌ها (Josic et al., 2002)، عکس‌العمل در برابر آنتی‌سرم‌های خاص، تحمل به فلزات سنگین، الکتروفورز ایزوآنزیم‌ها (Engvild et al., 1990)، نوع منبع کربن و اسیدهای آمینه مصرفی (Thiao et al., 2004)، الگوی الکتروفورز ژل SDS (Noel et al., 1980) و همچنین تعداد و اندازه پلاسمیدها (Hartman & Amarger, 1991; Josic et al., 2002) در تعیین تنوع میان جدایه‌های مختلف ریزوبیوم مورد استفاده قرار گرفته است. بررسی خصوصیات ژنومی ریزوبیوم‌ها در سطح مولکولی مطمئن‌ترین روش برای تعیین تنوع میان آنها می‌باشد (Hartman & Amarger, 1991; Josic et al., 2002). روش‌های متعدد انگشت‌نگاری بر مبنای PCR شامل تکنیک‌های RAPD, AFLP, PCR- RFLP و rep- PCR از جمله تکنیک‌های رایج در برآورد تنوع جمعیت‌های ریزوبیومی می‌باشند. در مقایسه با سایر روش‌های بیولوژیکی مولکولی رایج، روش rep-PCR به دلیل نشان دادن چندشکلی زیاد، سهولت اجرا، سرعت در کسب نتیجه و نیاز به مقادیر بسیار کم DNA ژنومی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Abd- El- Haleem et al., 2002; Taurian et al., 2006; Blazinkov et al., 2007). نخستین بار Versalovic et al. (1991) از این توالی‌های تکراری حفاظت شده برای طراحی آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی REP، ERIC و BOX، به منظور جستجوی ژنوم طیف وسیعی از باکتری‌ها و یافتن توالی‌های مشابه به کمک تکنیک PCR، بهره بردند. De Bruijn (1992)، جهت بررسی امکان به کارگیری روش rep-PCR در طبقه بندی نژادهای ریزوبیومی نزدیک به هم، الگوی حاصل از تکثیر DNA ژنومی ۱۲ نژاد R. meliloti را که از نواحی جغرافیایی بسیار متنوعی جمع آوری شده بودند، با یکدیگر مقایسه نمود. نتایج آزمایشات وی نشان داد که توالی‌های مشابه REP و ERIC در ژنوم ریزوبیوم‌ها، اگروباکتریوم‌ها و سودوموناس‌ها بسیار حفاظت شده می‌باشند و روش‌های REP و ERIC-PCR می‌توانند برای تشخیص و طبقه بندی نژادهای ریزوبیومی بسیار نزدیک به کار روند. از آنجاییکه خصوصیات ژنتیکی ریزوبیوم‌های همزیست و میزان سازگاری آنها با گیاهان میزبان مهمترین عامل تعیین‌کننده قدرت رقابت نژادهای مختلف برای گره‌زایی می‌باشد، اطلاع از تنوع میان جمعیت نژادهای موجود در خاک‌های مختلف، میزان فراوانی نژادها و شناسایی نژادهای سازگار با گونه‌های مختلف میزبان همواره مورد توجه محققین بوده است. منظور از گره‌زایی سازگار بنا بر تعریفی که توسط Howeison & Ballard (2004) بیان شده عبارت است از انتخاب ترجیحی برخی نژادها توسط گیاه میزبان، از میان جمعیتی از نژادهای مختلف و مؤثر که همگی قادر به گره‌زایی هستند. در این پژوهش، کارایی روش انگشت‌نگاری rep- PCR در تعیین تنوع ژنتیکی نژادهای بومی همزیست با گونه‌های مختلف شبدر و همچنین نقش گونه شبدر میزبان در شکل گیری این تنوع، مورد بررسی قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

تهیه سویه‌های ریزوبیوم

نمونه‌های خاک از هفت منطقه جغرافیایی کشور شامل استان‌های لرستان، اصفهان، خراسان، همدان کردستان، کرمانشاهان و آذربایجان جمع‌آوری گردید (جدول۱). بذور سه گونه شبدر مصری (*T. alexanderinum*)، شبدر قرمز (*T. pratense*) و شبدر ایرانی (*T. resupinatum*) به طور جداگانه در خاک مناطق ذکر شده کاشته شدند. به این ترتیب ۲۱ گلدان با ترکیبات مختلف خاک-گونه گیاهی آماده گردید. پس از نگهداری در گلخانه و تشکیل گره بر روی ریشه‌ها، گره‌های درشت و صورتی رنگ از ریشه گیاهان جدا شدند. گره‌ها ابتدا به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد و سپس به مدت دو دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی گردیدند. سپس به داخل پتری حاوی آب مقطر استریل منتقل گردیده و شستشو داده شدند. به منظور جداسازی باکتری‌ها از داخل گره‌ها، یک قطره آب مقطر استریل بروی سطح پتری استریل قرار داده شد سپس با قرار دادن هرگره در داخل قطره و فشار مکانیکی توسط یک پنس استریل، گره له گردید تا توده باکتریایی خارج و به داخل آب انتقال یابد. یک لوپ از سوسپانسیون باکتریایی حاصل با رعایت شرایط سترون روی محیط جامد TY آگار کشت داده شد و با استفاده از چندین بار کشت خطی بر روی این محیط خالص سازی گردید. پس از رشد ریزوبیوم‌های خالص شده روی محیط جامد و اطمینان از خالص بودن آن، از محیط کشت هر باکتری یک تک کلونی برداشته شد به لوله‌های آزمایش حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت TY مایع منتقل گردید و پس از رشد کافی باکتری‌ها در محیط کشت (OD= ۰/۹-۱) به‌منظور نگهداری طولانی مدت، ابتدا یک میلی‌لیتر از محیط کشت مایع حاوی باکتری رشد یافته داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس ۵۰۰ میکرولیتر از گلیسرول سترون شده به آنها اضافه گردید و پس از فریز شدن در نیتروژن مایع، به فریزر ۸۰ - درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

استخراج DNA

جداسازی DNA ژنومی بر اساس روش مبتنی بر SDS از کشت ۲۴ ساعته تک کلونی باکتری‌ها در TY مایع صورت گرفت. روش مورد استفاده بر اساس دستورالعمل تغییر یافته Moller et al. (1992) بود. رسوب باکتریایی حاصل در ۲۲۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده به صورت سوسپانسیون در آمد. سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد و پس از آن به مدت پنج دقیقه روی یخ نگهداری شد. به هر نمونه مقدار ۸۰ میکروگرم از محلول تازه تهیه شده لایزوزایم اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از اضافه نمودن ۴۰۰ میکرولیتر از بافر مخصوص استخراج به همراه ۴۰ میلی‌لیتر از SDS ۲۰ درصد به محتویات قبلی در ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از گذشت ۱۰ دقیقه ۲۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار اضافه گردید و لوله‌ها ۲۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. در مرحله بعد لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ شدند و فاز رویی به لوله‌های جدید منتقل گردید. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محلول کلروفرم-ایزوآمیل‌الکل به هر لوله اضافه شد و به مدت پنج دقیقه با همان دور قبلی سانتریفوژ گردید. فاز رویی مجدداً به لوله‌های جدید انتقال یافت و به آن مقدار ۰/۶ حجم نمونه از ایزوپروپانول سرد افزوده شد. پس از سانتریفوژ نمونه به‌مدت پنج دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور، رسوب DNA تشکیل گردید. در انتها، رسوب DNA با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد و پس از خشک شدن کامل، DNA در ۲۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر استریل حل گردید. به منظور تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از اسپکترومتری و الکتروفورز ژل اگارز ۱٪ استفاده گردید. غلظت DNA در کلیه نمونه‌ها در حدود ۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر تنظیم شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

واکنش‌های rep-PCR به کمک آغازگر (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') BOXAIR (TIB-MOLBIOL) انجام شد. واکنش‌های BOX-PCR بر اساس روش ارایه شده توسط Versalovic et al. (1994) انجام گرفت. به طور خلاصه غلظت نهایی مواد در مخلوط واکنش ۱۵ میکرولیتری شامل ۲۵ نانوگرم DNA الگو، ۱x از بافر دیونیزه، ۱۰٪

www.SID.ir

Archive of SID

DMSO، ۰/۲ mM از مخلوط dNTP، ۱/۲ mM از $MgCl_2$، ۳ واحد از *Taq* DNA polymerase (سیناژن)، ۲/۶mM از آغازگر BOXAIR بود. الگوی دمایی مورد استفاده در واکنش‌های BOX-PCR به ترتیب شامل: واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه به ترتیب واسرشت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، گسترش در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه و گسترش نهایی در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ دقیقه، بود. مراحل تکثیر در دستگاه ترموسایکلر اپندورف مدل صورت گرفت. محصولات PCR روی ژل‌های آگارز ۱/۵٪ TBE الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید ۱٪، با دستگاه gel document (viber lourmat TCR-20-M) عکس برداری گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

ارزش دهی باندها به صورت صفر برای عدم حضور و یک برای حضور باند صورت گرفت. ماتریس تشابه بر اساس ضرایب تشابه مختلف و روش‌های مختلف کلاستر بندی تشکیل شد و ضریب کوفنتیک برای تمامی روش‌های مورد استفاده محاسبه گردید. کلاستر نهایی به کمک ضریب جاکارد (Jaccard index) و روش UPGMA در نرم افزار NTSYS 2.0 ترسیم گردید.

نتایج و بحث

در این بررسی ۱۵۲ جدایه ریزوبیومی جدا شده از گره‌های سه گونه شبدر در خاک‌های هفت ناحیه جغرافیایی کشور با هدف امکان استفاده از روش rep-PCR در تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های ریزوبیومی نزدیک به هم و بررسی همزمان نقش عامل گونه میزبان بر چگونگی پراکنش این تنوع، مورد بررسی قرار گرفتند. این بررسی در سه مرحله صورت گرفت. در مرحله نخست الگوی انگشت‌نگاری با آغازگر BOXAIR برای تمامی جدایه‌ها در داخل هر تیمار به‌طور جداگانه مورد مقایسه قرار گرفت. در این مرحله شاخص فراوانی نژادی و غالبیت نژادی برای جدایه‌های داخل هر تیمار (یک خاک - یک گونه شبدر) محاسبه گردید. پس از مقایسه الگوی باندی در داخل تیمارها، جدایه‌هایی که الگوی مشابهی داشتند یک نژاد در نظر گرفته شده و به عنوان نمایندگان نژادهای هر تیمار در مقایسات بعدی انتخاب شدند. در این مرحله تنوع میان الگوهای مشاهده شده پایین بود به طوریکه میانگین تنوع مشاهده شده داخل تیمارها برای ۲۱ تیمار گونه شبدر- منطقه جغرافیایی، کمتر از ۳۰٪ بود. مرحله بعدی، مقایسات بین گونه‌ای در خاک‌های ثابت بود. به این صورت که نژادهای منتخب مربوط به هر سه گونه که در داخل یک خاک کشت شده بودند با یکدیگر مقایسه شدند و تعداد تیپ‌های نژادی و فراوانی هر تیپ نژادی برای هر نمونه خاک تعیین گردید. به عنوان مثال از ۷ جدایه منتخب از روی شبدر مصری، ایرانی و قرمز کاشته شده در خاک اصفهان، تنها دو جدایه که ازگونه‌های شبدر متفاوتی جداسازی شده بودند الگوی مشابهی داشتند و سایر جدایه‌ها کاملاً متفاوت بودند. بنابراین میزان تنوع نژادی جدایه‌های این سه گونه در خاک اصفهان ۸۰٪ (۶ جدایه از ۷ جدایه) در نظر گرفته شد (شکل ۱). میانگین این معیار برای مجموع خاک‌های مورد بررسی بیش از ۷۰٪ تخمین زده شد. در مرحله سوم مقایسات، تیپ‌های نژادی مشخص شده برای هر خاک در مقایسه دو به دوی خاک‌ها مورد مقایسه قرار گرفتند. در نهایت ۲۲ جدایه که الگوی انگشت نگاری کاملاً متفاوتی داشتند شناسایی گردیدند (شکل ۲). از میان ۲۲ نژاد شناسایی شده، پنج تیپ نژادی جمعیت غالب گره‌های ریزوبیومی را تشکیل می‌دادند به‌طوریکه فراوانی یک جدایه (شماره۹) به تنهایی بیش از ۲۰٪ از جدایه‌های بدست‌آمده بود. مقایسه شاخص‌های فراوانی (جدول ۲) بدست آمده برای خاک‌های هفت منطقه مورد بررسی با مشخصات این خاک‌ها (جدول ۱) نشان می‌دهد که تنوع نژادهای ریزوبیوم همزیست در نواحی شبدرخیز و یا آنهایی که سابقه کشت شبدر داشتند بیشتر می‌باشد به‌طوریکه در نمونه خاک مربوط به استان لرستان که از زمین بایر جمع‌آوری شده و نمونه خاک مشهد که مربوط به مزرعه یونجه می‌باشد، تنوع ریزوبیومی نسبت به سایر خاک‌ها بسیار پائین‌تر است. این امر می‌تواند به دلیل عدم وجود گیاه میزبان اختصاصی باشد. در خاک لرستان از میان ۲۴ جدایه ریزوبیومی جدا شده از گونه‌های مختلف شبدر، جدایه‌های بدست‌آمده از دو

www.SID.ir

Archive of SID

گونه شبدر ایرانی و شبدر قرمز دارای الگوی انگشت‌نگاری یکسانی بودند. این الگو با فراوانی زیادی برابر با ۰/۶۶ مشاهده‌شد. در مورد شبدر مصری نیز تنها دو الگوی متفاوت دیده شد. میزان تنوع زیاد جمعیت‌های ریزوبیومی در خاک‌های زراعی با سابقه کاشت گیاه میزبان لگوم نسبت به زمین‌های بایر توسط دیگران نیز تأیید شده است (MacInnes et al., 2004).

در حضور لگوم میزبان، به علت وجود رقابت بر سر گره‌زائی، بروز تنوع در جمعیت نژادهای ریزوبیومی بالا می باشد و بالعکس در غیاب میزبان لگومی، این تنوع در جمعیت ساپروفیت‌های خاک رخ می‌دهد و بنابراین این امکان وجود خواهد داشت که تنها نژادهای ریزوبیومی محدودی در چنین خاک‌هایی غالبیت یابند (Zribi et al., 2004).

جدول ۱- اطلاعات مربوط به مناطق جمع‌آوری نمونه خاک

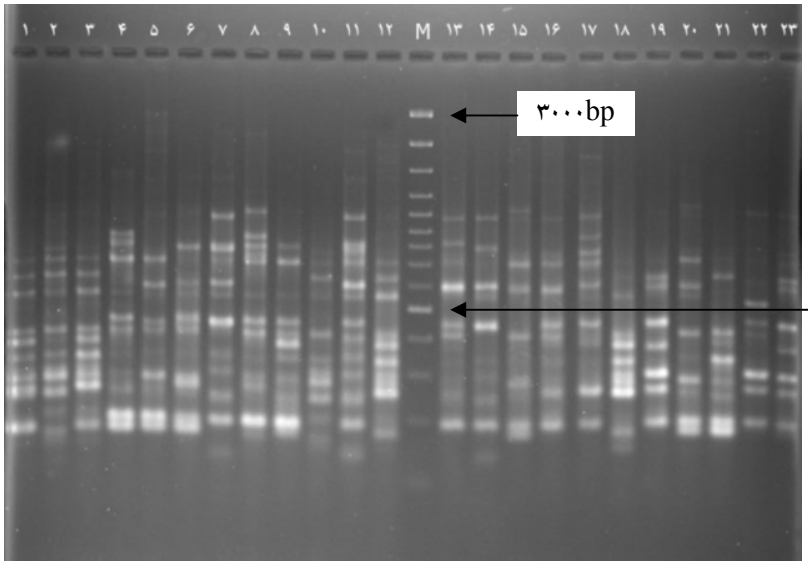
شماره خاک	نام منطقه	محل جمع آوری خاک
۱	لرستان- درود- روستای کنگاباد	زمین بایر
۲	اصفهان- نطنز	خاک شبدرخیز
۳	خراسان- مشهد- روستای چاهشک	مزرعه یونجه
۴	همدان	خاک شبدرخیز
۵	کرمانشاه- چقاکبود	خاک شبدرخیز
۶	کردستان- کامیاران	خاک شبدرخیز
۷	آذربایجان غربی ـ میاندوآب	خاک شبدرخیز

جدول ۲- مقادیر شاخص فراوانی نژادی برای ۲۱ تیمار گونه شبدر- منطقه جغرافیایی

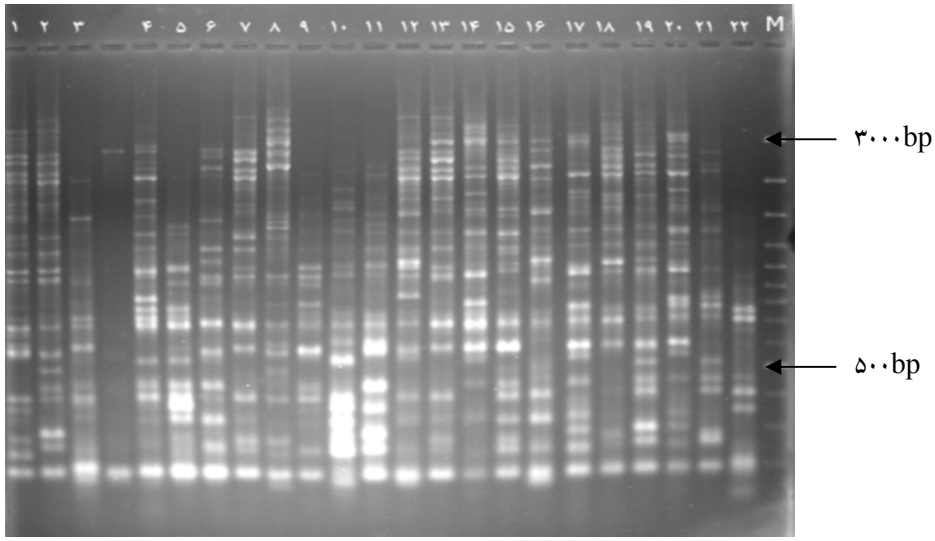
ردیف	منطقه	گونه میزبان	فراوانی نژادی	فراوانی نژادی بین گونه‌ای	فراوانی نژادی کل
۱	لرستان	*T. alexanderinum*	۰/۲۵	۰/۷۵	۰/۱۲
		T. resupinatum	۰/۱۲		
		T. pratense	۰/۱۲		
۲	اصفهان	*T. alexanderinum*	۰/۲	۰/۸۵	۰/۲۸
		T. resupinatum	۰/۵		
		T. pretense	۰/۲۵		
۳	خراسان	*T. alexanderinum*	۰/۲۵	۰/۶۶	۰/۱۶
		T. resupinatum	۰/۳۷		
		T. pratense	۰/۱۲		
۴	همدان	*T. alexanderinum*	۰/۲۵	۰/۸۰	۰/۱۹
		T. resupinatum	۰/۱۲		
		T. pretense	۰/۴		
۵	کردستان	*T. alexanderinum*	۰/۴	۰/۷۵	۰/۳۳
		T. resupinatum	۰/۶		
		T. pretense	۰/۳۷		
۶	کرمانشاه	*T. alexanderinum*	۰/۵	۰/۵	۰/۱۹
		T. resupinatum	۰/۲۵		
		T. pratense	۰/۴۲		
۷	آذربایجان غربی	*T. alexanderinum*	۰/۲۸	۰/۶۶	۰/۲۶
		T. resupinatum	۰/۳۷		
		T. pratense	۰/۵		

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۱- الگوی DNA تکثیریافته با آغازگر BOXAIR، ۱-۱۲ : مقایسه جدایه‌های منتخب سه گونه شبدردر خاک نطنز، ۱۳-۲۳: مقایسه جدایه‌های منتخب سه گونه شبدر در خاک همدان، M : ۱۰۰ bp plus DNA ladder



شکل ۲- نمایش الگوی انگشت نگاری ۲۲ نژاد ریزوبیومی شناسایی شده از گونه‌های شبدر با استفاده از آغازگر BOXAIR (چاهک‌های ۲۲-۱)، M: ۱۰۰ bp plus DNA ladder

مقایسه شاخص‌های فراوانی جدایه‌های مورد بررسی، نشان داد که تنوع نژادی بالایی میان جمعیت‌های بومی ریزوبیوم درخاک‌های تحت مطالعه وجود دارد. همچنین گونه‌های شبدر نیز در جذب جدایه‌های ریزوبیومی تفاوت‌های آشکاری از خود نشان دادند به طوریکه تنوع مشاهده شده در مقایسه جدایه‌های مربوط به یک گونه کمتر و در مقایسه جدایه‌های مربوط به گونه‌های مختلف کاشته شده در یک نوع خاک بیشتر بود (جدول۲). به این معنی که گونه‌های مختلف در اکثر موارد با نژادهای مختلفی گره‌زایی شده بودند. در این تحقیق نژادهای شماره ۱، ۲، ۶، ۱۰ و ۱۲ با گونه شبدر مصری، نژادهای ۴، ۷، ۱۳ و۲۰ با شبدر ایرانی و نژادهای ۵، ۱۱، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۲۱ و ۲۲ با شبدر قرمز گره‌زایی نمودند. همچنین، نژادهای شماره ۳ و ۱۹ با گونه‌های شبدر ایرانی و قرمز، نژاد شماره ۹ با گونه‌های ایرانی و مصری و نژادهای ۸، ۱۷ و ۱۸ با هر سه گونه شبدر گره‌زایی نمودند.

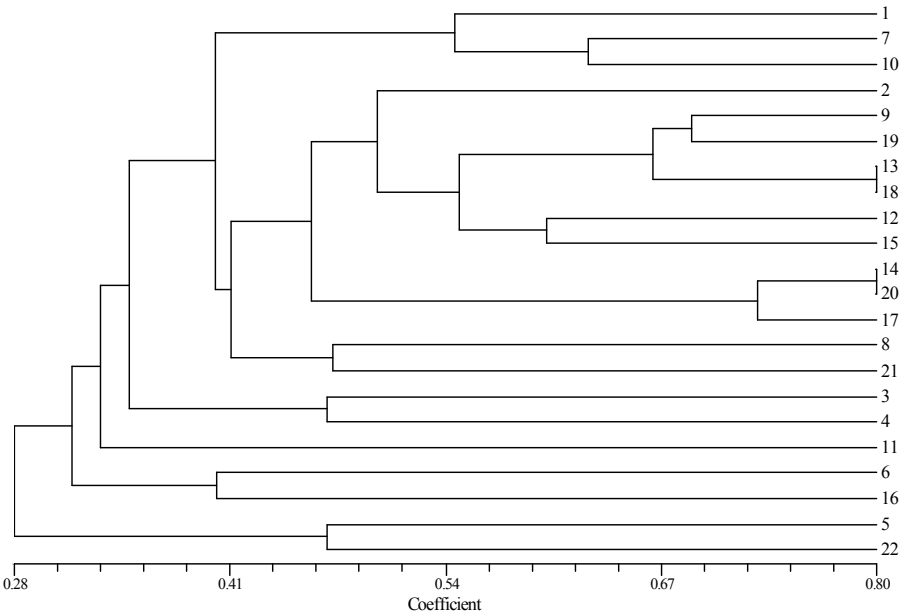
به منظور گروه‌بندی و تعیین فواصل ژنتیکی ۲۲ نژاد

www.SID.ir

Archive of SID

شناسائی شده، در این تحقیق با استفاده از داده‌های مربوط به انگشت‌نگاری مبتنی بر تکنیک BOX- PCR ماتریس تشابه بر اساس ضرایب تشابه مختلف و روش‌های مختلف کلاستربندی تشکیل شد و ضریب کوفنتیک برای تمامی روش‌ها، محاسبه شده و کلاستر نهایی به کمک ضریب جاکارد و روش UPGMA در نرم‌افزار NTSYS2.0 ترسیم گردید. با توجه به دندروگرام، بیشترین تشابه بین نژادهای شماره ۱۳ و ۱۸ و نژادهای شماره ۱۴ و ۲۰ (با ضریب تشابه ۸۰ درصد) و کمترین تشابه بین نژادهای ۸ و ۲۲ (با ضریب تشابه ۱۰ درصد) دیده‌شد (شکل ۳). اگرچه بر اساس دندروگرام حاصل، فاصله ژنتیکی نژادهایی که از گونه‌های متفاوت و خاک‌های مختلف جدا شده‌اند، بیشتر است، اما این موضوع در مورد تمام نژادها صادق نیست بطوریکه در چند مورد شباهت میان نژادهایی که از گونه‌ها و یا خاک‌های متفاوت جدا شده‌اند، از شباهت نژادهای مربوط به یک گونه و خاک مشترک بیشتر است. همچنین همانطور که قبلا نیز ذکر شد در چند مورد دو گونه متفاوت با جدایه یکسانی گره‌زایی نموده بودند. بروز این موارد استثناء می‌تواند به این دلیل باشد که گیاه شبدر یک لگوم دگرگشن بوده و انتظار می‌رود هتروزیگوسیتی بالایی میان جمعیت گیاهان داخل هر گونه وجود داشته باشد لذا این امکان وجود دارد که اختلاط ژرم پلاسم‌ها در داخل گونه‌های مختلف شبدر سبب شده که در برخی موارد گونه‌ها در جذب جدایه‌های همزیست کاملاً انتخابی عمل نکنند و با نژادهای مشابهی رابطه برقرار نمایند.

همزیستی ریزوبیوم‌ها با میزبان اختصاصی، نتیجه تنوع همزمان گیاه میزبان و ریزوبیوم‌های همزیست می‌باشد. این پدیده از طریق مقایسه تنوع جمعیت ریزوبیوم‌های متعلق به گونه‌ها یا بیوارهای مشترکی که از روی میزبان‌های متفاوت جداسازی شده اند، به خوبی قابل مشاهده است. شاهد دیگر این ادعا تنوع بالای جمعیت ریزوبیوم‌ها در مناطقی است که منشأ تنوع گیاهان میزبان می‌باشند (Young & Johnson, 1989). در مطالعات متعددی به نقش و اهمیت میزبان گیاهی در شکل‌گیری تنوع ژنتیکی جمعیت ریزوبیوم‌های همزیست اشاره شده است (Handley et al., 1998; Laczian & Bromfield, 2004). در یک بررسی جدایه‌های جمع‌آوری شده از دو گونه *Galega orientalis* و *Galega officinalis* در خاک قفقاز که مرکز تنوع این گیاه می‌باشد، با استفاده از تکنیک AFLP مورد انگشت نگاری ژنومی قرار گرفتند. نتایج AFLP، الگوهای کاملاً متفاوتی را برای جدایه‌های جمع‌آوری شده از دو گونه مذکور نشان داد. از این بررسی چنین نتیجه‌گیری شد که در صورت وجود تنوع



شکل ۳- دندروگرام حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی ۲۲ نژاد شناسایی شده با استفاده از آغازگر BOXAIR

www.SID.ir

Archive of SID

زیاد در جمعیت میزبان‌های گیاهی، جدایه‌های ریزوبیومی متنوعی نیز وجود خواهند داشت (Andronov et al., 2003). طی آزمایش دیگری که به منظور تعیین اهمیت ژنوتیپ میزبان گیاهی در ردیابی تنوع جمعیت‌های *R. leguminosarum* bv. *viciae* در خاک‌های مناطق مختلفی از انگلستان با استفاده از تکنیک RAPD صورت گرفت، نشان داده شد که حتی گیاهان مختلف متعلق به یک گونه ممکن است با نژادهای ریزوبیومی متفاوتی همزیست شوند (Harrison, 1992).لذا به نظر می‌رسد انتخاب گونه میزبان در باززایی جمعیت نژادهای خاصی از ریزوبیوم‌های خاک تأثیر زیادی دارد. این امر در مطالعاتی که به جای یک میزبان از چندین گونه گیاهی برای به دام اندازی ریزوبیوم‌ها در یک خاک ثابت استفاده شده است به خوبی دیده می‌شود (McInnes et al., 2004). از طرف دیگر چنین عنوان شده است که برخی گونه‌های گیاهی در مقایسه با سایر گونه‌ها قادرند جمعیت‌های متنوع‌تری را برای گره‌سازی در ریشه‌های خود بپذیرند (Souza et al., 1994). در یک بررسی، ۱۰۶ جدایه *Bradyrhizobium japonicum* از گره‌های ریشه دو رقم متفاوت سویا، با استفاده از روش 16s-23s rRNA PCR- RFLP مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که با تغییر رقم گیاه میزبان در نوع جدایه‌های جذب شده تفاوت‌هایی دیده شد. اگرچه تفاوت در نوع تیپ‌های نژادی به صورت صد در صد نبود با اینحال در فراوانی تیپ‌های نژادی از گونه‌ای به گونه دیگر تفاوت آشکاری مشاهده گردید و لذا چنین نتیجه‌گیری شد که ترکیب جمعیتی جدایه‌های *B. Japonicum* تحت تأثیر نوع گونه میزبان قرار دارد (Lakzian & Bromfield, 2004).

در این تحقیق از میان ۲۲ نژاد متفاوتی که بر روی سه گونه شبدر در خاک هفت ناحیه از کشور شناسایی گردید، پنج تیپ نژادی، جمعیت غالب گره‌های ریزوبیومی را تشکیل دادند. این مطلب که اکثر گره‌ها با تعداد کمی از تیپ‌های نژادی ایجاد می‌شوند، اولین بار در مطالعه‌ای توسط Broughton et al. (1987) مطرح شد. بر طبق این نظریه، این امکان وجود دارد که حتی در مناطقی که نژادهای ریزوبیومی متنوعی درخاک وجود داشته باشند، شانس تصاحب گره در یک میزبان خاص به تعداد محدودی از نژادها اختصاص یابد. شواهد نشان می‌دهد در صورتیکه از گونه‌ها یا ارقامی استفاده شود که در جذب ریزوبیوم اختصاصی عمل می‌کنند، تعداد و فراوانی تیپ‌های نژادی در جمعیت ریزوبیوم‌های خاک به طور موثری کاهش می‌یابد. با این وجود دلایل بسیاری وجود دارد که نشان می‌دهند پائین بودن شاخص فراوانی در برخی مناطق به علت محدودیت تیپ‌های نژادی موجود در خاک می‌باشد (McInnes et al., 2004). بنا بر یک نظریه انتخاب به نفع نژادهای موثر *R. leguminosarum* در همزیستی با گونه‌های شبدر در خاک‌های بایر که به صورت معمول دارای تنوع نژادی کمتری هستند، بیشتر است(Yates et al., 2008). به عنوان مثال، به نظر می‌رسد، پائین بودن شاخص فراوانی در خاک شماره ۱ (که مربوط به شهرستان درود می‌باشد)، به علت فقدان تنوع نژادی در خاک این منطقه باشد. به طوریکه دو گونه شبدر ایرانی و قرمز در این خاک تنها توسط یک نژاد ریزوبیومی، گره‌زائی شده‌اند و فراوانی نژادی برای گونه شبدر مصری نیز در این خاک بالا نمی‌باشد. در صورتی که همین دو گونه در خاک نواحی دیگر نژادهای متنوع‌تری را به خود جذب نموده‌اند.

در مطالعه‌ای که به‌منظور بررسی تنوع جمعیت جدایه‌های *R.leguminosarum* bv. *trifolii* در مناطق مختلفی از خاک استرالیا به کمک پروب‌های کروموزومی صورت گرفت، شاخص فراوانی نژادی بدست آمده برای جمعیت ریزوبیوم‌های خاک، بسیار پایین بود (McInnes et al., 2004). این شاخص برای جمعیت‌های مرتبط با گونه شبدر زیرزمینی ۰/۲۸ و برای شبدر قرمز تنها ۰/۰۷ ارزیابی شد. در همین مطالعه، تنوع نژادی جمعیت‌های ریزوبیومی که از گونه شبدر سفید در خاک مناطق جغرافیایی مختلفی در استرالیا جمع آوری شده بودند، به کمک روش الکتروفورز چند آنزیمی بررسی گردید. نتایج نشان داد که تنها ۱۷٪ از شاخص‌های فراوانی مربوط به مناطق مختلف بالاتر از ۰/۳ بود. در تحقیق حاضر با استفاده از تکنیک انگشت‌نگاری rep-PCR با استفاده ازآغازگر BOXAIR، شاخص‌های فراوانی نژادی بین گونه‌ای برای مناطق مختلف بین ۰/۵ تا ۰/۸۵ و میانگین این مقادیر بیش از ۰/۷ می‌باشد

www.SID.ir

Archive of SID

(جدول۲). اگرچه استفاده از تکنیک RAPD نیز در چند گزارش برای تفکیک جدایه‌های ریزوبیومی مناسب تشخیص داده شده است (Harrison, 1992; Dooley & Harrison, 1993)، ولی به نظر می‌رسد با توجه به عدم اطمینان کافی به نتایج این نشانگر تصادفی، استفاده از تکنیک rep-PCR ارجحیت بیشتری برای تمایز جدایه‌های ریزوبیومی داشته باشد. استفاده از این روش توسط محققین دیگر نیز مورد توجه بوده‌است (Gao et al., 2001; Seguin et al., 2001, Saldana et al., 2003; Pandy et al., 2004).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که تکنیک rep-PCR مبتنی بر آغازگر BOXAIR در ردیابی تنوع و تفکیک نژادهای بسیار نزدیک ریزوبیومی از قدرت و تکرارپذیری کافی برخوردار می‌باشد. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که نژادهای ریزوبیومی در ایجاد رابطه همزیستی با میزبان خود تا حد زیادی اختصاصی عمل می‌کنند. از نقطه نظر کشاورزی پایدار، وجود میزبان‌های لگومی که در جذب نژادهای همزیست به صورت انتخابی عمل می‌کنند از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. در شرایطی که ساختار ژنتیکی جمعیت ریزوبیوم‌های خاک یک منطقه بسیار متنوع باشد، به علت رقابت بر سر گره‌زایی، شانس اینکه یک نژاد تلقیحی موثر بتواند تعداد زیادی از گره‌ها را به خود اختصاص دهد اندک است بنابراین استفاده از میزبان‌هایی که دارای اختصاصیت بالا در جذب نژادها هستند امکان تصاحب گره را توسط نژاد تلقیحی به کار رفته افزایش خواهد داد. تفاوت نژادهای ریزوبیومی همزیست با شبدر در گونه‌های مختلف مورد مطالعه در این تحقیق، نشان می‌دهد که در صورت یافتن یک نژاد ریزوبیومی برتر و موثر برای شبدر، واکنش‌های گونه‌های زراعی برای همزیستی با آن باید مشخص گردد تا با استفاده از گونه‌های شبدر سازگارتر بتوان حداکثر بهره‌برداری را از این همزیستی کسب نمود.

لذا بررسی دقیق‌تر نقش گونه شبدر در تعیین رابطه همزیستی با ریزوبیوم، از طریق کاشت طیف متنوع‌تری از گونه‌های شبدر و بررسی قدرت رقابت برای گره‌سازی و توانایی تثبیت ازت مولکولی برای نژادهای غالب شناسایی شده برای هر منطقه و هر یک از گونه‌های شبدر قدمی است که در مطالعات آتی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. همچنین بررسی دقیق‌تر نقش گونه شبدر در تعیین رابطه همزیستی با ریزوبیوم، از طریق کاشت طیف متنوع‌تری از گونه‌های شبدر و جداسازی همزمان *R. leguminisarum* bv. trifolii از گره‌های موجود بر روی ریشه گیاهان و از خاک مورد کاشت توصیه می‌گردد.

REFERENCES

1. Abd- El- Haleem, D., Layton, A. C. & Sayler, G. S. (2002). Long PCR- amplified rDNA for PCR- RFLP and Rep- PCR- based approaches to recognize closely related microbial species. *Journal of Microbiological Methods*, 49, 315- 319.
2. Andronov, E. E., Terefework, Z., Roumiantsera, M. L., Dzyubenko, N. I., Onichtchouk, O. P., Kurchak, O. N., Dresler- Nurmi, A., Young, J. P. W., Simarov, B. V. & Lindström, K. (2003). Symbiotic and genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolates collected from the *Galega oriental* gene center in the Caucasus. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1067- 1074.
3. Blazinkov, M., Sikora, S., Macesic, D. & Redzepovic, S. (2007). Genotypic characterisiation of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* field population in Croatia. *Agricultyrae Conspectus Scientificus*, 72(2), 135- 158.
4. Broughton, W. J., Heycke, N., Priefer, V., Schneider, G. M. & Stanley, J. (1987). Ecological genetics of *Rhizobium meliloti*: diversity and competitive dominance. *FEMS Microbiological Letters*, 40, 245- 249.
5. De Bruijn, F. J. (1992). Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(7), 2180- 2187.
6. Dooley, J. J. & Harrison, S. P. (1993). Phylogenetic grouping and identification of rhizobium isolates on the basis of random amplified polymorphic DNA profiles. *Canadian Journal of Microbiology*, 39, 665- 673.
7. Engvild, K. C., Jensen, E. S. & Skept, L. (1990). Parallel variation in isoenzyme and nitrogen fixtion markers in a Rhizobiom population. *Plant and Soil,* 128, 283- 286.

www.SID.ir

Archive of SID

8. Gao, J., Terefework, Z., Wenxin, C. & Lindström, K. (2001). Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astrgalas adsurgens* growing in different geographical regions of china. *Journal of Biotechnology*, 91, 155- 168.
9. Handley, B. A., Hedges, A. J. & Beringer, J. (1998). Importance of host plants for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(2), 241-249.
10. Harrison, S. (1992). Characterisation of Rhizobium isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 1009- 1015.
11. Hartman, A. & Amarger, N. (1991). Genotypic diversity of an indigenous *Rhizobium meliloti* field population assessed by plasmid profiles, DNA fingerprinting and insertion sequence typing. *Canadian Journal of Microbiology*, 37, 600- 608.
12. Howeison, J. G. & Ballard, R. (2004). Optimizing the legume symbiosis in stressfull and competitive environments within southern Australia- some contemporary thoughts. *Soil Biology & Biochemistry*, 36, 1261- 1273.
13. Josic, D., Popovic, V., Mladenovic- Drinc, S. & Konstantiov, K. (2002). Biodiversity among indigenous *R. Leguminosarum* bv. *trifolii* revealed by genotypic and phonotypic methods. *Symposium*, 9, 1- 6.
14. Lakzian, A. & Bromfield, E. (2004). The effect of trap plants on the population diversity of *Bradyrhizobium japonicum*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2(2), 90-96.
15. McInnes, A., Thies, J. E., Abbott, L. K. & Howieson, J. G. (2004). Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities- a review. *Soil Biololgy and Biochemistry*, 36, 1295-1308.
16. Moller, E. M., Bahnweg, G., Sanderman, H. & Geiger, H. H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 20(22), 6115- 6116.
17. Noel, K. & Brill, W. J. (1980). Diversity and dynamics of indigenous *Rhizobium Japonicum* populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 40, 931- 938.
18. Pandy, P., Sahgal, M., Maheswari, D. K. & Johri, B. N. (2004). Genetic diversity of rhizobia isolated from medicinal legumes growing in the sub- Himalayan region of Uttaranchal. *Current Science*, 86(1), 202- 207.
19. Saldaña, G., Martinez- Akántara V., Vinardell, J. M., Bellogín R., Ruíz-Sainz, J. E. & Balatti, P. A. (2003). Genetic diversity of fast-growing rhizobia and that nodulate soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Archives of Microbiology*, 180, 45- 52.
20. Seguin, P., Grahom, P. H., Sheaffer, C. C., Ehlke, N. J. & Russelle, M. P. (2001). Genetic diversity of Rhizobia nodulating *Trifolium ambigum* in North America. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 81-85.
21. Souza, V., Eguiarte, L., Avila, G., Cappello, R., Gallardo, C., Montoya, J. & Pinero, D. (1994). Genetic structure of *Rhizobium elti* bv. *phaseoli* associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *phaseolus coccineus*) in Morelo, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1260- 1268.
22. Svenning, M. M., Gudmundsson, J., Fagerli, I. L. & Leinonen, P. (2001). Competition for nodule occupancy between introduced strains of *rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its influence on plant production. *Annals of Botany*, 88, 781-787.
23. Taurian, T., Ibanez, F., Fabra, A. & Aguilar, O. M. (2006). Genetic diversity of Rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in central Argentinean soils. *Plant and Soil*, 282, 41- 52.
24. Taylor, N. L. (1985). *Clover science and technology*. Wisconsin: American Society for Agronomy, Crop Science Society of America.
25. Tesfaye, M. & Holl, F. B. (1999). Rhizobium strains that nodulate *Trifolium semipilosum* Fres. are Phylogenetically distinct. *Plant and Soil*, 207, 147- 154.
26. Thiao, M., Neyra, M., Isidore, E., Sylla, S. & Lesueur. D. (2004). Diversity and effectiveness of rhizobial strains from *Gliricidia sepium* native to Reunion Island, Kenya and New Caledonia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 703- 709.
27. Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823- 6831.
28. Yates, R. J., Howieson J. G., Reeve, W. G., Brau, L., Speijers, J., Nandasena, K., Real, D., Sezmis, E. & O'Hara, G. W. (2008). Host-strain mediated selection for an effective nitrogen- fixing symbiosis between Trifolium spp. and *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Soil Biololgy and Biochemistry*, 40, 822-833.
29. Young, J. P. W. & Johnson, A. W. B. (1989). The evolution of specificity in the legume- Rhizobium interaction. *Trends in Ecology & Evolution*, 4, 341- 349.

www.SID.ir

Archive of SID

30. Zohary, M. & Heller, D. (1984). *The Genus Trifolium*. The Israel Academy of Science and Humanities, Jerusalem: Ahva printing press.
31. Zribi, K., Mhamadi, R., Muguet, T. & Aouani, M. E. (2004). Distribution and genetic diversity of rhizobia nodulating natural population of *Medicago truncatula* in Tunisian soils. *Soil Biololgy and Biochemistry*, 36, 903- 908.

www.SID.ir