شماره ۹۳، زمستان ۱۳۹۰

نشریه زراعت

(پژوهش و سازندگی)

تنوع پلاسمیدی جدایه های باکتری های *Sinorhizobium meliloti* جدا شده از یونجه در واحدهای مختلف فیزیوگرافی استان همدان

• **اسماعیل کریمی** (نویسنده مسئول)
عضو هیات علمی گروه خاک شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه
• **امیر لکزیان**
دانشیار گروه خاک شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی
• **احمداصغر زاده**
استادیار موسسه تحقیقات خاک و آب تهران
• **کاظم خاوازی**
استادیار موسسه تحقیقات خاک و آب تهران
• **سید بهمن موسوی**
عضو هیات علمی گروه خاک شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه
تاریخ‌دریافت: شهریور ماه ۱۳۸۶ تاریخ‌پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۸
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۱۷۶۹۳۱۰
Email: sm_ka80@yahoo.com

چکیده

پلاسمیدها مواد ژنتیکی محسوب می شوند که میزبان خود را در شرایط نامساعد محیطی یاری می کنند. پلاسمیدها در باکتـری هـای ریزوبیومی به دلیل حضور ژن هـای nod و nif (ژن های مربوط به گره بنـدی و تثبیت ازت) اهمیت زیادی دارند. مطالعه پلاسـمیدها با هدف بهره گیری از خصوصیات مفید آنها در کشـاورزی پایدار انجام می گیرد. در مطالعه حاضر ۱۹۶ جدایه *S.meliloti* همزیسـت گیاه یونجه که از خاک های اسـتان همدان با کاشت گیاه میزبان جدا شـده بودند با اسـتفاده از روش پروفیل های پلاسـمیدی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان داد که جدایه های مورد مطالعه دارای ۱۳ نوع پلاسمید مختلف بوده و به لحاظ تنوع پلاسمیدی تمامی جدایه ها در ۲۷ گروه متفاوت قرار گرفتند. نتایج حاصل از محاسـبه شاخص تنوع شانون و شـاخص تشابه در واحدهای فیزیوگرافی استان همدان نشـان داد که این شـاخص ها در هر یک از واحدهای فیزیوگرافی دارای مقادیر متفاوتی بودند. برقراری روابط رگرسـیونی بین شاخص تنوع شـانون و خصوصیات خاکی هر واحد فیزیوگرافی نشان داد که اثر عوامل خاکی بر روی میزان تنوع به صورت منفرد نبوده بلکه تنوع از مجموع خصوصیات خاکی به صورت ترکیبی متاثر می شود.

کلمات کلیدی: شاخص شانون، پروفیل های پلاسمیدی، *Sinorhizobium meliloti*، واحدهای فیزیوگرافی

www.SID.ir

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 93 pp: 19-24

Plasmid diversity of *Sinorhizobium meliloti* isolates from alfalfa in different physiographic units of Hamadan Province

By: E. Karimi, Member of Scientific Board of Soil, Agriculture Faculty, Maragheh University (Corresponding Author; Tel: +989141769310) A. Asgharzadeh, Assistant Professor of Soil and Water Research Institute, Tehran, A. Lakzian Assiciated Professor of Agriculture Faculty Ferdowsi University of Mashhad, K. Khavazi, Assistant Professor of Soil and Water Research Institute, Tehran, S. B. Mosavi Member of Scientific Board of Soil, Agriculture Faculty, Maragheh University.

Plasmids are genetic materials that help their host bacterial in unfavorable conditions. They have key roles in rhizobial bacteria because of the presence of nif and nod genes. The study of plasmids in rhizobial bacteria is the first step to use their useful capability in sustainable agriculture. In this study 196 isolates of *Sinorhizobium meliloti* isolated from the nodules of host plants (Medicago sativa cv. Hamedani) grown in different Hamadan soil samples were studied using Plasmid profiles technique. The results showed that 13 different plasmids were present among of all isolates and they were grouped in 27 different groups based on Plasmid profile pattern. Shannon diversity and similarity indices were estimated and the results showed that they are different in each physiographic unit. The results also showed that bacterial diversity affected by combination of soil characteristics not by individual factor.

Key words: Shannon index, Plasmid profiles, *Sinorhizobium meliloti* and physiographical units

مقدمه

پلاسمیدها بنا به تعریف، یک افزوده ژنتیکی غیر ضروری برای زنده ماندن سلول میزبان هستند که حضورشان به میزبان ویژگی هایی خاصی را اعطا می نمایند که می تواند در شرایط نا مساعد محیطی زنده بماند (۱). مقاومت به آنتی بیوتیک ها، فلزات سنگین، فعالیت های متابولیکی، تثبیت بیولوژیک نیتروژن، بیماریزایی و بعضی خصوصیات ناشناخته دیگر از جمله صفاتی هستند که بر روی پلاسمیدها قرار دارند (۱، ۲، ۱۳،۱۲). پلاسمیدها در باکتری های ریزوبیومی در دو گروه متفاوت قرار می گیرند(۱۲، ۱۶). پلاسمیدهای همزیستی(Psym) که همه ژن های ضروری برای عمل همزیستی را حمل می‌کنند و از جمله آنها می توان به ژن های nif و nod اشاره کرد و پلاسمیدهای غیر همزیستی(non Psym) که پلاسمیدهای کریپتیک هم نامیده می شوند. این گروه از پلاسمیدها در فرایند همزیستی تاثیر ندارند ولی دارای نقش های زیادی در رقابت برای گره زایی، بهره برداری از منابع مختلف کربن، تولید ملانین، رشد و زنده ماندن ریزوبیوم تحت شرایط تنش های محیطی، بهره گیری از ترشحات گیاه، ترکیبات آروماتیک، سنتز پلی ساکاریدهای سطحی، کمک به رشد ساپروفیتی ریزوبیوم در خاک و مقاومت به pH از جمله نقش های آنها به شمار می‌رود (۲،۱، ۷ ، ۱۲). اندازه و تعداد پلاسمید در بین باکتری های ریزوبیومی بسیار متغیر است. معمولاً ریزوبیوم ها بین ۱۰-۱ پلاسمید را در خودشان جای می دهند که وزن آنها بین kb ۱۵۰۰ -۱۵۰ متغیر می باشند (۱۵، ۱۶). تفاوت در تعداد و وزن پلاسمیدها در داخل گونه های باکتریایی این امکان را فراهم می آورد که بتوان سویه های مختلف را در داخل گونه گروه بندی کرد. علاوه بر این ها شواهد علمی و مطالعات انجام شده حکایت از آن دارند که کارآیی همزیستی باکتری های ریزوبیومی با تغییر فاکتورهای فیزیکی - شیمیایی مانند pH خاک، دمای خاک، رطوبت خاک و سایر عوامل تنش زا به شدت تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۴). مشخص شده که سویه هایی با کارآیی بالا در شرایط آزمایشگاهی الزاماً دارای همان عملکرد در شرایط مزرعه نمی باشند و حتی گاهی بر عکس این امر نیز اتفاق می افتد و سویه ای که در شرایط آزمایشگاهی عملکرد کمتری نسبت به یک سویه دارد در شرایط مزرعه همان نتیجه حاصل نمی شود (۷). همان گونه که بحث شد بسیاری از ژنهای مقاومت به تنش های محیطی بر روی پلاسمیدها قرار دارند که برای همزیستی مطلوب مورد نیازند. بهبود کارآیی تثبیت نیتروژن در سویه ها با تعویض پلاسمیدهای آنها با پلاسمیدهای سویه هایی که کارآیی زیادی دارند امکان پذیر است و این زمانی درخور اهمیت بیشتری است که سویه های ضعیف دارای خصوصیات مفیدتری به غیر از تثبیت نیتروژن باشند. محققین (۷) موفق به بهبود خصوصیات همزیستی در یک باکتری مقاوم به شرایط اسیدی از *R. leguminosarum* bv trifolii شدند که سویه مشتق شده دارای ۱۷ درصد افزایش عملکرد نسبت به سویه مادری بود. پایداری این پلاسمید در باکتری گیرنده پلاسمید یکی دیگر از نتایج به دست آمده از این تحقیق بود. انتقال ژن های توکسین از *Bacillus thuringiensis* به پلاسمید ریزوبیومی توسط Skot و همکاران (۱۴) که با حفظ قابلیت تولید گره باعث کنترل حمله آفات می شد یکی دیگر از شواهد علمی دربهره مندی از خصوصیات مفید پلاسمیدهاست. با توجه به مطالب ذکر شده از آنجایی که خاک مهمترین زیستگاه باکتری های ریزوبیومی می باشد لذا بررسی تنوع پلاسمیدی در ارتباط با خصوصیات خاکی می تواند به یافتن اطلاعات بیشتری در زمینه بهره گیری از پلاسمیدها کمک نماید و شاید بتوان گفت زیر بنای کلیه یافته های فوق شناخت پلاسمیدها و تنوع آنها در منطقه ای باشد که قرار است امکان استفاده از پتانسیل پلاسمیدی فراهم گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش ها

در این تحقیق ۱۹۶ جدایه سینوریزوبیومی همزیست یونجه که از خاک های مناطق مختلف استان همدان با روش کاشت گیاه میزبان (*Medicago sativa* cv.Hamedani) جدا شده بود و در کلکسیون باکتریهای ریزوبیومی بخش تحقیقات بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب کشور نگه داری می شدند، مورد مطالعه پلاسمیدی قرار گرفت. باکتریهای دریافت شده به صورت خالص و برروی اسلنت حاوی محیط کشت YEMA قرار داشتند(۱۵). برای تهیه نیمرخ پلاسمیدی از روش بهینه شده Hynes و همکاران (۹) استفاده شد. برای این منظور پس از اطمینان از خالص بودن جدایه ها که با کشت مجدد آن بر روی محیط کشت YEMA انجام گرفت، کلیه جدایه ها از روی این محیط به ۵ میلی لیتر محیط HP مایع مایه زنی شدند (۱۴). سوسپانسیون باکتری در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت رشد داده شد. یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری (مرحله۱) به اپندورف ۱/۵ میلی لیترمنتقل شده و بلافاصله بر روی آن سارکوسین ۰/۳ درصد اضافه شد. نمونه ها به آرامی به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ مخلوط شدند. سوسپانسیون باکتری ها در دور ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده ومایع رویی حذف گردید. نمونه ها دوباره روی یخ منتقل شد و ۳۲ میکرولیتر بافر لیزکننده (۱میلی گرم لیزوزیم ، ۱۰ میکروگرم RNAase و ۰/۰۵ درصد زایلن سیانول در ۱ میلی لیتر بافر TBE ۱X حاوی ۱۰ درصد ساکارز) به آن اضافه گردید. با چند بار بالا و پایین کردن پیپت بافر کاملاً با رسوب باکتری مخلوط شد و بلافاصله در چاهک‌های ژل ریخته شد. الکتروفورز نمونه ها ابتدا با ولتاژ ۱۰ به مدت ۲۰ دقیقه و سپس با ۱۱۰ ولت به مدت ۶ ساعت انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل در اتیدیوم بروماید به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شد و پس از شستشوی کامل درآب مقطر با استفاده از دستگاه ژل داک عکس برداری شد. برای تهیه نقشه واحدهای فیزیوگرافی استان مرزهای استان همدان بر روی نقشه منابع و استعداد اراضی کشور با استفاده از نرم افزار ILWIS بسته شده و واحدهای مختلف فیزیوگرافی بر اساس همان نقشه جداسازی شدند. برای تنوع گروه های پلاسمیدی در هر واحد فیزیوگرافی از فرمول شاخص تنوع شانون و برای بررسی تشابه گروه های موجود از شاخص تشابه استفاده گردید(۳).

$$H = -\sum_{i=1}^{s} Pi\, ln Pi$$

H شاخص شانون و Pi فراوانی نسبی هر گروه در واحد فیزیوگرافی می باشد و مقدار آن برابر است با ni/N که ni تعداد گروه های موجود و N تعدادکل گروه ها را نشان می دهد.

$$S = \frac{2C_{ij}}{C_i + C_J}$$

S شاخص تشابه، Cij تعداد گونه های مشترک بین دو منطقه، Ci تعداد گونه منطقه ۱ و Cj تعداد گونه منطقه۲

مقدار کربن آلی، pH خاک، مقدار آمونیوم و نیترات، مقدار آهک خاک، درصد شن، درصد سیلت، درصد رس و میزان فسفر خاک های محل نمونه برداری، از موسسه مذکور دریافت شدند. برای به دست آوردن یک عدد واحد از تک تک این خصوصیات در واحدهای فیزیوگرافی، میانگین پارامترهای فوق برای آن واحد فیزیوگرافی در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از نیمرخ پلاسمیدی ۱۹۶ جدایه‌های سینوریزوبیوم نشان داد که تمامی جدایه ها دارای ۴-۱ پلاسمید بودند و وزن آنها بین ۵۰ تا ۲۰۰ کیلو جفت باز آلی متغیر بود. در مجموع بین ۱۹۶ جدایه سینوریزوبیوم ۱۳ نوع پلاسمید (از لحاظ اندازه) شناسایی شدند که پلاسمید ۲۰۰ kb با درصد فراوانی صد در صد در همه جدایه ها حضور داشت. Jabra و همکاران (۱۰) با بررسی نیمرخ پلاسمیدی ۱۳۴ جدایه های سینوریزوبیوم ملیلوتی که از چهار رقم متفاوت یونجه جداسازی شده بودند نشان دادند که محتوای پلاسمیدی جدایه ها بین ۱ تا۶ پلاسمید در سلول متغیر بوده و وزن آنها بین ۵۶۶-۸ کیلوجفت باز آلی قرار داشت. در مطالعه دیگری، Hartman و همکاران (۸) محتوای پلاسمیدی ۶۷ جدایه سینوریزوبیوم جدا شده از گره را بین ۱ تا ۵ عدد گزارش نمودند که جدایه‌ها علاوه بر مگا پلاسمید، پلاسمیدهایی متفاوت با اندازه های بین ۱۵ تا ۶۰۶ کیلو جفت باز آلی داشتند.

به نظر می رسد که حضور یک یا چند پلاسمید با توجه به فلسفه وجود پلاسمید در باکتری ها نقش ارزنده ای را در سازگاری های محیطی سینوریزوبیوم داشته با شند. گروه بندی ۱۹۶ جدایه سینوریزوبیومی بر مبنای نیمرخ پلاسمیدی و بررسی توزیع جغرافیایی این گروها در سطح منطقه نشان داد که که این گروه ها به استثنای گروه اول که فقط پلاسمید ۲۰۰ kb را در بر می گرفت، دارای توزیع نامنظمی در سطح منطقه می باشند به گونه ای که برخی از گروه ها تمایل به تمرکز در مناطق خاصی از استان را دارند. Jabra و همکاران (۱۰) نیز توزیع ناهماهنگی را در مطالعات خود بر روی جدایه *S.meliloti* گزارش کرده اند و در مطالعه این محققان بیشترین تنوع پلاسمیدی را در مناطق شور ساحلی و کمترین آن را در زمین های زیر کشت غلات مشاهده شد. پس از مشخص نمودن واحدهای فیزیوگرافی منطقه که ۱۱ واحد فیزیوگرافی با خصوصیات و رده های خاکی متفاوت را شامل می شد، شاخص تنوع شانون در این واحدها محاسبه شد و نتایج به دست آمده نشان دادند که شاخص تنوع شانون در این واحد ها متفاوت می باشد (جدول ۱).

علاوه بر این محاسبه شاخص تشابه نشان داد که حتی گروه های موجود در هر واحد نیز متفاوت هستند (جدول ۲).

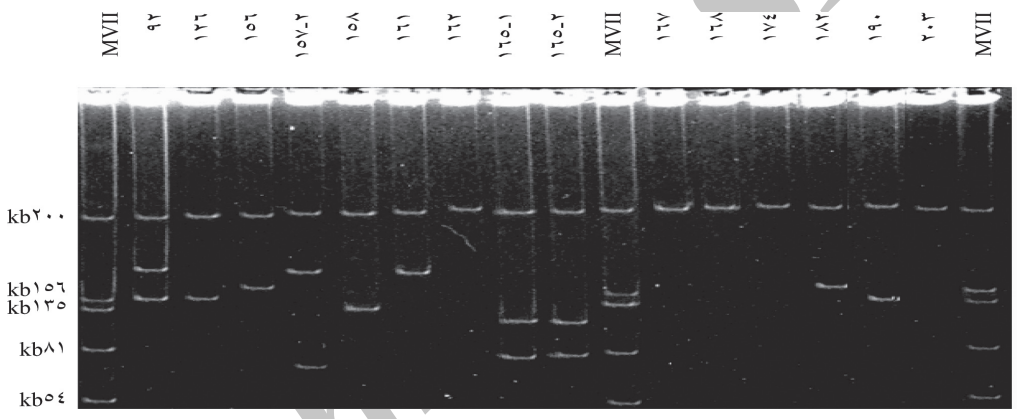
برای تعیین رابطه بین میزان تنوع گروه ها از نظر محتوای پلاسمیدی و نوع واحد فیزیوگرافی، برخی از خصوصیات خاکی هر واحد با میزان تنوع مورد بررسی قرار گرفت ، برای این منظور اثر عوامل مختلف خاکی مانند میزان pH، EC، NH_4^+ ، NO_3^- ، OC، درصد شن، درصد سیلت، درصد رس و فسفر خاک بر روی تنوع گروه های پلاسمیدی، داده‌های به دست از آمده از خاک و همبستگی آنها با شاخص های تنوع در هر خاک مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشان داد که رابطه معنی داری بین شاخص تنوع شانون و تک تک عوامل خاکی مورد بررسی وجود ندارد (جدول۳). یعنی هیچکدام از این عوامل به تنهایی در میزان تنوع شانون موثر نبودند. به منظور بررسی اثرات متقابل و ترکیبی این عوامل

Archive of SID

مدل‌های رگرسیونی چند متغیره بین شاخص تنوع شانون در خاک‌ها به عنوان تابع و عوامل خاکی به عنوان متغیرهای مستقل پس از آزمون VIFها با استفاده از رگرسیون گام به گام (Stepwise regression) به کمک نرم افزار Sigma stat مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این رگرسیون نشان داد که از بین مدل‌های رگرسیونی مورد مطالعه رگرسیون ۴ متغیره مستقل شامل کربن آلی، آمونیوم، نیترات و میزان رس در خاک های استان همدان با تابع (تنوع شانون) از لحاظ آماری در سطح احتمال ۱ درصد رابطه معنی‌داری وجود داشت (جدول ۴). مناسب‌ترین مدل رگرسیونی بدست آمده نشان داد که ۴ متغیر مستقل یاد شده توانستند ۸۳ درصد از تغییرات تابع یا تنوع ژنتیکی جمعیت باکتری سینوریزوبیوم همزیست یونجه را در واحدهای مختلف فیزیوگرافی استان همدان توجیه نمایند که این توجیه از لحاظ آماری در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار می‌باشد. به عبارت دیگر در این مطالعه ۱۷ درصد از تغییرات تابع به غیر از عوامل مورد مطالعه در این پژوهش (عوامل ناشناخته) توجیه می‌شود که به منظور شناسایی این تغییرات باید مطالعات بیشتری انجام گیرد. Coutinho (۵) معتقد است که تغییر و تفاوت در خصوصیات زیستگاه باکتری ریزوبیومی، تنوع این باکتری ها را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد. مطالعات انجام شده در خاک‌های برزیل که به منظور بررسی اثر کشت سویا و خاک‌ورزی (شخم خورده و بدون شخم) روی تنوع باکتریهای ریزوبیوم انجام گردیده بود، نشان داد که با وجود یکسان بودن شاخص تنوع شانون در خاک شخم خورده و بدون شخم، گروه های موجود در آنها با هم تفاوت چشمگیری داشتند و اعمال تیمار شخم به دلیل تغییر در خصوصیات خاک باعث تغییر در ترکیب گروه‌های ریزوبیوم و در نتیجه باعث جایگزینی برخی گروه‌ها با یکدیگر شده است.

$$Y = 1.2 + 0.398 O.C(\%) + 0.012 NO_3^- (mg.kg^{-1}) + 0.117 NH_4^+ (mg.kg^{-1}) + 0.037 Clay(\%)$$

$$R^2_{aj} = 0.8 \quad **$$



شکل ۱- نیمرخDNAی پلاسمیدی ۱۵ جدایه سینوریزوبیوم همزیست یونجه رقم همدانی جدا شده از خاک های استان همدان بر روی ژل آگارز (از سویه شاخص MVII به عنوان مارکر و شاهد مثبت استفاده شده است).

جدول ۱- شاخص تنوع شانون، گروه های پلاسمیدی و تعداد جدایه در واحدهای فیزیوگرافی متفاوت استان همدان بر مبنای نیمرخ پلاسمیدی

تعداد جدایه	گروه های پلاسمیدی(P)	(H) شاخص تنوع شانون	واحد فیزیوگرافی#
۲۶	۱،۳،۵،۶	۰/۴۰	۱۷
۳	۱،۶،۱۳	۰/۴۸	۱۸
۳	۱،۳	۰/۲۸	۲۸
۴۵	۲۳،۲۲،۲۱،۱،۳،۵،۶،۷،۹،۱۰،۱۵،۱۷،۱۸،۲۰	۰/۷۸	۳۰
۶	۲۴،۲۷	۰/۲۲	۴۳
۴	۱،۶	۰/۲۴	۴۴
۲۵	۱،۳،۴،۵،۶	۰/۴۰	۴۵
۱۳	۱،۲،۴،۷،۱۰	۰/۶۱	۴۷
۳۳	۱،۲،۳،۵،۶،۱۰،۱۸	۰/۴۹	۵۵
۵	۱،۱۳،۱۴	۰/۴۵	۸۳
۳۳	۱،۶،۷،۱۱،۱۶،۲۵،۲۶	۰/۳۹	۸۵

 # کد واحدهای فیزیوگرافی مذکور در این جدول، همان کدهای موجود بر روی نقشه ارزیابی و حاصلخیزی خاک های ایران (سال ۱۳۸۲) می باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۲- محاسبه شاخص تشابه گروه های به دست آمده برمبنای نیمرخ پلاسمیدی در واحدهای فیزیوگرافی مختلف

۱۸	۸۳	۲۸	۵۵	۴۴	۴۳	۴۷	۴۵	۱۷	۸۵	۳۰	واحد
۰/۲۲	**۰/۱۲**	۰/۲۴	۰/۴۵	۰/۲۴	۰	۰/۳۸	۰/۳۲	۰/۵۰	۰/۲۷	۱	۳۰
۰/۴	۰/۲	۰/۲۲	۰/۲۹	۰/۴۴	۰/۲۲	۰/۳۶	۰/۱۷	۰/۳۳	۱		۸۵
۰/۵	۰/۲۵	۰/۵۷	۰/۶۷	۰/۲۷	۰/۲۹	۰/۳	۰/۶	۱			۱۷
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۵۷	۰/۵۰	۰/۲۹	۰/۲۹	۰/۱۸	۱				۴۵
۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۵	۰/۳۱	۰/۲۹	۰/۲۹	۱					۴۶
۰/۴	۰/۴	۰/۵۰	۰/۲۲	۰/۵۰	۱						۴۳
۰/۸۰	۰/۴۰	۰/۵۰	۰/۴۴	۱							۴۴
۰/۴۰	۰/۲۰	۰/۴۴	۱								۵۵
۰/۴۰	۰/۴۰	۱									۲۸
۰/۶۷	۱										۸۳
۱											۱۸

جدول ۳- ضریب همبستگی بین عوامل خاکی و شاخص تنوع شانون بر اساس گروه های پلاسمیدی

	OC	۳-NO	۴+NH	pH	EC	Sand	Silt	Clay	P
r	۰/۰۰۴۵۷ ns	-	۰/۰۳۱۹-ns	-	-	۰/۳۶۹ ns	-	۰/۳۸۴ ns	-

جدول ۴- تجزیه واریانس رگرسیون گام به گام

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات
Regression	۴	۰/۲۲۳	**۰/۰۵۶
Residual	۶	۰/۰۴۵	۰/۰۰۷
Total	۱۰	۰/۲۶۷	۰/۰۲۶

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۴- جدول تجزیه واریانس حاصل از بررسی روابط رگرسیونی چند متغیره بین شاخص تنوع شانون و فاکتورهای خاکی

نام متغیرها	ضرایب	Error.Std	t	سطح معنی داری
عرض از مبداء	۱/۲۰۰	۰/۲۰۰	۵/۵۴۹	۰/۰۰۱
OC	۰/۳۹۸	۰/۱۸۸	۱۰۷۲	۰/۰۸۰
NO^-_3	۰/۰۱۲	۰/۰۰۶	۱/۹۱۶	۰/۱۰۳
NH^+_4	۰/۱۱۷	۰/۰۶۷	۱/۷۴۵	۰/۱۳۱
Clay	۰/۰۳۷	۰/۰۰۶	۵/۳۸۶-	۰/۰۰۱

www.SID.ir

مطالعه دقیق ضرایب مدل رگرسیونی چند متغیره به دست آمده نشان می‌دهد که از بین این ضرایب، ضریب ثابت معادله رگرسیونی و ضریب درصد رس در خاک در سطح احتمال ۱ درصد با تنوع ژنتیکی جمعیت باکتری سینوریزوبیوم همزیست یونجه در واحدهای مختلف فیزیوگرافی استان همدان رابطه مثبت نشان می‌دهد، اگرچه در مجموع بین متغیرهای مستقل موجود در مدل رگرسیونی و تابع ارتباط آماری قابل قبولی وجود دارد این در حالی است که از ۴ متغیر موجود در مدل، ضریب ۳ متغیر از لحاظ آماری (آزمون t) معنی‌دار نمی‌باشد (جدول ۵). با توجه به واریانس کل مدل رگرسیونی از کل تغییرات مربوط به تابع (تنوع ژنتیکی جمعیت باکتری سینوریزوبیوم همزیست یونجه در واحدهای مختلف فیزیوگرافی استان همدان) ۵۰ درصد این تغییرات توسط ضریب ثابت معادله رگرسیونی، ۴۴ درصد آن توسط درصد کربن آلی خاک و ۶ درصد بقیه توسط غلظت آمونیوم در خاک توجیه می‌شود. بنابراین از بین متغیرهای خاکی موجود در مدل اهمیت درصد کربن آلی به عنوان منشاء اصلی اشکال مختلف نیتروژن در خاک از سایر عوامل بیشتر است. این در حالی است که دو متغیر غلظت نیترات در خاک و درصد رس تنها کمتر از ۰/۵ درصد از تغییرات تابع را می‌توانند توجیه نمایند به عبارت ساده‌تر اگرچه ضریب ثابت درصد رس در خاک با تابع از لحاظ آماری در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است اما هیچ رابطه منطقی بین درصد رس خاک و تابع در شرایط این آزمایش وجود ندارد. اگر چه گره‌دار شدن یونجه توسط باکتری های سینوریزوبیومی به علت وجود ژن های nod و nif که در روی پلاسمید همزیستی قرار دارند، امکان پذیر می باشد. اما دلیل حضور پلاسمید فقط محدود به گره دار کردن گیاه میزبان نمی باشد. نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که حضور پلاسمیدها و تنوع آنها با خصوصیات خاکی مرتبط بوده و همبستگی معنی دار دارد. میزان کربن آلی، نیترات، آمونیم و درصد رس از جمله عواملی بودند که در حالت ترکیبی تنوع پلاسمیدها را تحت تاثیر قرار می دادند. با توجه به وجود عوامل متعدد دخیل در امر حیات باکتری به نظر می رسد نقش پلاسمیدها به عنوان سپر حفاظتی پیچیده بود و اظهار نظر در این موارد نیاز به اطلاعات فراوان دارد. همچنین احتمال دارد که عناصر کم مصرف و دیگر فاکتورها در تنوع پلاسمیدی جدایه ها دخالت داشته باشند.

سپاسگزاری

از مجموعه پرسنل موسسه تحقیقات خاک وآب تهران و آزمایشگاه خاک شناسی دانشکده کشاورزی مشهد بخاطر کمک های مالی و آزمایشگاهی و از آقای مهندس فیضی به خاطر مساعدت در بحث های آماری کمال تشکر را داریم.

منابع مورد استفاده

۱- احمدیان تهرانی، پ. (۱۳۷۷) مقدمه ای بر همسانه سازی ژن ها (کلون کردن ژن ها). انتشارت دانشگاه تهران ۴۱۵ صفحه.

۲- اصغرزاده، ا. (۱۳۸۰) شناسایی سویه های باکتری های همزیست نخود ایرانی *Mesorhizobium cicier* با کار آیی تثبیت ازت متفاوت با روش های بیوشیمیایی و مولکولی. پایان نامه دکتری دانشگاه تربیت مدرس

۳- نصیری محلاتی، (۱۳۸۰) اگرواکولوژی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۴۵۹ صفحه.

4- Ahmad S. D. and Hanif. T. (1994) *Biological nitrogen fixation (BNF) and the use of Rhizobium under low temperature and low pH in Azad Kashmir*. Proceedings of the International Symposium on Biotechnology for Sustainable Development, NIBGE Faisalabad, Pakistan.

5- Coutinho H. L. C., Oliveria. V. M., Lovato, A. Maia A. H. N. and Manfio. G. P. (1999) Evalution of the diversity of Rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Applied Soil Ecology* 13: 159- 167

6- Finan T. M., B. Kunkel, Vos G. F. D. and Signe. E. R. (1986) Second symbiotic megaplasmid in Rhizobium meliloti carrying exopolysacharide and thiamine synthesis genes.*Journal of Bacteriology*. 167 : 66-72

7- Gardezi, S. D. A. (2001) Biodiversity and performance of Rhizobia in relation to plasmid genes and their translational products. *Biological Science*. 1: 1134- 1144

8- Hartman. A., Giraud j. j. and Catroux G. (1997) Genetic diversity of Sinorhiobium (Formerly Rhizobia) meliloti Strain isolated directly from a soil and from noudules of alfalfa (*Medicago sativa*) grown in the same soil. *FEMS Microbiology Ecology* 25: 107-116

9- Hynes. M. F., Simon R. and Puhler. A. (1984) The development of plasmid-free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility whit a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate pAtc58. *Plasmid*. 13: 99-105

10- Jebara M., Mhamdi, R. Aouani, M. E. Ghrir R. and Mars. M. (2001) Genetic diversity of Sinorhizobium populations recovered from different Medicago varieties cultivated in Tunisian soils. *Canadian Journal of Microbiology*. 47: 139-147

11- Kevin Vessey. J., G. N. Cheminingwa. (2005) The genetic diversity of *Rhizobium legominosarum* bv. Viciae in cultivated soil of the eastern Canadian prairie. *Soil Boilogy and Biochemistry*. 99: 2312-2318

12- Lakzian. A. (1998) *Diversity and metal tolerance of Rhizobium leguminosarum bv. Viciae in soils contaminated whit heavy metals*. Ph.D thesis University of London.

13- Lederberg. J. (1998). Personal perspective plasmid. *Plasmid* 39: 1-9

14- Skot L., Harrison S. P. and Nathl. A. (1990) Expression of insecticidal activity in Rhizobium containing the endotoxin gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. tenebrionis. *Plant and Soil*. 127: 285-295.

15- Somasegaran P., and Hoben. H. J. (1994) *Handbook for rhizobia*. Method in legume- rhizobium technology. *Springer* – Verlay. U.S

16- Zou. X., Feng, X. L. Chen W. X. and Li. F.D. (1998) Biological behavior of plasmid in Rhizobium sp. strain S25 from *Tephrosia candida. Plasmid* 40: 158- 163.

Archive of SID
www.SID.ir