مطالعه تنوع ژنتیکی، توانایی گره‌زایی و کارایی تثبیت نیتروژن باکتری‌های ریزوبیوم جداسازی شده از گره‌های یونجه

علی اشرف سلطانی طولارود، حسینعلی علیخانی[1*]، غلامرضا صالحی جوزانی، هادی اسدی رحمانی، کاظم خاوازی و احمدعلی پوربابایی

دانشجوی سابق دکتری دانشگاه تهران و استادیار دانشگاه محقق اردبیلی؛ ali_soltani_t@yahoo.com

دانشیار دانشگاه تهران؛ halikhan@ut.ac.ir

استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران؛ gsalehi@abrii.ac.ir

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب کشور؛ asadi_1999@yahoo.com

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب کشور؛ kkhavazi@yahoo.com

استادیار دانشگاه تهران؛ pourbabaei@ut.ac.ir

چکیده

تثبیت نیتروژن مولکولی توسط باکتری‌های ریزوبیومی، منبع اصلی برای ورود پایدار نیتروژن مورد نیاز گیاهان به سیستم-های کشاورزی است. تثبیت زیستی مولکول نیتروژن در کشاورزی می‌تواند به وسیله مایه‌زنی گیاهان لگوم با باکتری‌های ریزوبیومی دارای توانایی بالا در تثبیت این مولکول بهبود پیدا کند. آگاهی از تنوع زیستی جمعیت‌های بومی این باکتری-ها برای طراحی تدابیر مایه‌زنی موفق می‌تواند مفید واقع شود. در این تحقیق تنوع زیستی، توانایی گره‌زایی و کارایی تثبیت نیتروژن 48 باکتری ریزوبیوم جداسازی شده از گره‌های گیاه یونجه کشت شده در مناطق مختلف استان همدان مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های مورد مطالعه با استفاده از تکنیک ITS-PCR-RFLP نشان داد که باکتری‌های مورد بررسی دارای تنوع ژنتیکی قابل توجه بوده و در سطح شباهت 70 درصد به 4 گروه I, II, III و IV تقسیم‌بندی شدند. نتایج آزمون گره‌زایی نشان داد که اکثر سویه‌ها دارای توانایی ایجاد گره در گیاه یونجه بودند، در حالیکه در اثر تلقیح این گیاه با سویه‌های KH16، KH24، KH10، KH6، KH133 و KH193 گره‌ای حاصل نشد. بر اساس نتایج حاصل از آزمون بررسی کارایی تثبیت نیتروژن سویه‌های مورد مطالعه، این باکتری‌ها به چهار دسته غیر مؤثر، نسبتاً مؤثر، مؤثر و خیلی مؤثر تقسیم‌بندی شدند.

واژه‌های کلیدی: یونجه، تنوع زیستی، گره‌زایی و کارایی تثبیت نیتروژن

مقدمه

یونجه (*Medicago sativa* L.) یک لگوم پایایی است که به طور گسترده‌ای در سرتاسر دنیا برای تغذیه دام و به عنوان یکی از منابع مهم کود سبز کشت می‌شود. این گیاه قادر است که با باکتری‌های گرم منفی خاکزی از جنس *سینوریزوبیوم* همزیستی مفید تثبیت‌کننده نیتروژن برقرار کند (مرابت و همکاران، 2010؛ لانگر و همکاران،

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: کرج، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران-دانشکده فناوری کشاورزی، گروه مهندسی علوم خاک

* دریافت: 91/10/6 و پذیرش: 92/2/5

Archive of SID

www.SID.ir

2008). باکتری‌های تندرشد جنس *سینوریزوبیوم* از یازده گونه تشکیل شده‌اند: *سینوریزوبیوم فردی*، *سینوریزوبیوم زینجیانگنس* (چن و همکاران، 1998) *سینوریزوبیوم ملیلوتی*، *سینوریزوبیوم ساحلی*، *سینوریزوبیوم ترانژائه* (دی‌لاجودی و همکاران، 1994) *سینوریزوبیوم مدیکا* (روم و همکاران، 1996) *سینوریزوبیوم آربوریس*، *سینوریزوبیوم کوستینس* (نیک و همکاران، 1999) *سینوریزوبیوم کومروائه* (وی و همکاران، 2002) *سینوریزوبیوم مرولنس* (ونگ و همکاران، 2002) و *سینوریزوبیوم امریکانوم* (تولدو و همکاران، 2003). در میان گونه‌های *سینوریزوبیوم* دو گونه *سینوریزوبیوم ملیلوتی* و *سینوریزوبیوم مدیکا* دارای توانایی ایجاد گره در ریشه گیاه یونجه می‌باشند (بایلی و همکاران، 2006).

در سال‌های اخیر تکنیک‌های مولکولی متنوعی از قبیل: ERIC-PCR[1]، AFLP[2]، RAPD[3] و PCR-RFLP[4] برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ریزوبیومی استفاده شده‌اند (وینوسا و همکاران، 2005؛ رینکون-روسالس و همکارن، 2009؛ اسدی رحمانی و همکاران، 2011). درمیان روش‌های ذکر شده تکنیک PCR-RFLP توسط محققین مختلف به عنوان یک روش شناسایی سریع برای باکتری‌ها گزارش شده است (لاگور و همکاران، 1994؛ گورتلر و همکاران، 1996؛ دیوف و همکاران، 2000). در باکتری‌های ریزوبیومی توالی DNA در حد فاصل 16S rRNA و 23S rRNA (ITS)[5] تغییرات زیادی از نظر طول توالی و ترتیب بازها نشان می‌دهند (جنسن و همکاران، 1993). مطالعه و تجزیه و تحلیل این ناحیه از DNA با استفاده از تکنیک PCR-RFLP به عنوان یک روش مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی باکتری‌های ریزوبیومی گزارش شده است (بیوندی و همکاران، 2003؛ واسیک و همکاران، 2009؛ ونگ و همکاران، 2009).

تثبیت نیتروژن مولکولی توسط باکتری¬های ریزوبیومی، منبع اصلی برای ورود پایدار نیتروژن مورد نیاز گیاهان به سیستم¬های کشاورزی است. تثبیت زیستی مولکول نیتروژن در کشاورزی می¬تواند به وسیله مایه-زنی گیاهان لگوم با باکتری¬های ریزوبیومی دارای توانایی بالا در تثبیت این مولکول بهبود پیدا کند (اسدی و همکاران، 2011).

یونجه گیاهی علوفه‌ای است که امروزه کشت آن در کشور بسرعت در حال توسعه می‌باشد. این نبات دارای سابقه تاریخی بسیار قدیمی می‌باشد که قدمت آن به ابتدای تاریخ تمدن می‌رسد. یونجه به طور گسترده در مناطق مختلف ایران کشت شده و حدود 700 هزار هکتار از اراضی کشاورزی کشور را به خود اختصاص داده است. با وجود پر اهمیت بودن گیاه یونجه به عنوان یک گیاه استراتژیک در ایران، در خصوص ارزیابی توان تثبیت نیتروژن در سویه‌های ریزوبیومی بومی همزیست با این گیاه، و تنوع زیستی این باکتری‌ها اطلاعات چندانی در کشور وجود ندارد. این در حالی است که تثبیت نیتروژن مولکولی بیشتر توسط باکتری‌های ریزوبیومی می‌تواند از طریق انتخاب سویه‌های برتر تثبیت کننده N_2 حاصل شود (هوویسون، 1995؛ رنگل، 2002). بدیهی است آگاهی از تنوع ژنتیکی و وضعیت تاکسونومیکی این باکتری‌ها به منظور انتخاب سویه‌های برتر به عنوان مایه‌تلقیح ضروری می‌باشد. از طرف دیگر ایران یکی از خاستگاه‌های مهم یونجه در دنیا گزارش شده است (کریمی، 1384؛ میچواد و همکاران، 1984) و آگاهی از تنوع زیستی و شناسایی ریزموجودات همزیست با این گیاه می‌تواند برای محققین داخل و خارج از کشور نیز حائز اهمیت باشد. اهداف این پژوهش مطالعه تنوع ژنتیکی باکتری‌های همزیست با گیاه یونجه با استفاده از نشانگر ITS-PCR-RFLP و ارزیابی توان تثبیت نیتروژن در سویه‌های ریزوبیومی بومی ایران همزیست با گیاه یونجه و معرفی بهترین گونه تثبیت کننده نیتروژن بود.

مواد و روش‌ها

تهیه سویه‌های باکتری

برای انجام این تحقیق تعداد 48 سویه ریزوبیومی جداسازی شده از گره‌های یونجه بر اساس پراکنش جغرافیایی، مشخصات اقلیم و خاک منطقه از کلکسیون میکروبی موسسه خاک و آب انتخاب گردید. سویه‌ها با باز کشت بر روی محیط کشت YMA[6] خالص‌سازی شدند. همچنین 4 سویه مرجع *سینوریزوبیوم ملیلوتی* سویه HAMBI1318، *سینوریزوبیوم* ملیلوتی سویه HAMBI2148، *آگروباکتریوم تومفاسیئنس* سویه HAMBI1811 و *سینوریزوبیوم مدیکا* سویه HAMBI12306 از کلکسیون میکروبی دانشگاه هلسینکی فنلاند (HAMBI) نیز در کنار سویه‌های مورد استفاده مورد آزمایش قرار گرفتند (جدول 1).

جداسازی DNA باکتری‌ها

استخراج DNA از سلول باکتری با استفاده از روش‌های لیز قلیایی (بائله و همکاران، 2000) و استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA (PowerMicrobial® DNA Midi DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc) انجام گرفت.

---

1. entrobacterial repetitive intergenic consensus genomic finger printing –PCR
2. amplified fragment length polymorphism
3. random amplified polymorphic DNA
4. restriction fragment length polymorphism –PCR
5. intergenic transcribed spacer
6. Yeast Manitol Agar

Archive of SID

www.SID.ir

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و هضم ژن ITS

تکثیر قطعه 16S-23S rDNA با استفاده از آغازگرهای[1] FGPS1490 و FGPS132 (لاگور و همکاران، 1996) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در 50µl محلول واکنش با استفاده از دستگاه PTC-200 peltier thermal cycler(MJ Research) طبق الگوی: واسرشت شدن اولیه[2] در دمای 94^{oC} برای 10 دقیقه، 34 دوره (واسرشت شدن در دمای 94^{oC} به مدت 35 ثانیه، اتصال[3] در دمای 52^{oC} برای یک دقیقه و بسط[4] در دمای 72^{oC} برای دو دقیقه) و بسط نهایی در دمای 72^{oC} برای 10 دقیقه انجام گردید. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، بر اساس تعداد نمونه‌ها یک مخلوط PCR[5] شامل شامل همه مواد به جزء DNA الگو تهیه و سپس مقدار 49 میکرولیتر آن در هر تیوب مخصوص PCR توزیع گردید و در نهایت مقدار 100ng از DNA الگو به آن افزوده شد. غلظت و اندازه محصول واکنش به وسیله الکتروفورز روی ژل آگاروز 1/5 درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید ارزیابی گردید. به منظور هضم آنزیمی، 5µl از محصول PCR به وسیله 4/5 واحد از هر آنزیم محدودکننده[6] *Hae*III و *Msp*I هضم گردید. قطعات DNA قطعات DNA حاصل از هضم بوسیله الکتروفورز افقی روی ژل آگاروز 3% رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید از یکدیگر تفکیک گردید. عمل الکتروفورز در ولتاژ 100 ولت و برای 2 ساعت انجام شد. ژل‌ها تحت شرایط UV به وسیله دوربین کداک DC-290 و نرم‌افزار مولکولی کداک عکس‌برداری گردیدند. الگوهای حاصل از هضم آنزیمی به منظور رسم دندروگرام UPGMA[7] به وسیله نرم نرم افزار Bionumerics نسخه 6 مورد استفاده قرار گرفتند. در این روش سویه‌های دارای الگوی هضم مشابه در یک گروه ITS قرار گرفتند (اسدی رحمانی و همکاران، 2011).

بررسی توان گره‌زایی و کارایی تثبیت نیتروژن درسویه‌ها

به منظور بررسی توان گره‌زایی و کارایی تثبیت نیتروژن سویه‌های مورد مطالعه از روش ویسنت و همکاران (1970) و فریرا و مارکوس (1992) استفاده گردید. بدین منظور بذرهای یونجه تهیه شده از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر یکدست‌سازی و با استفاده از الکل 96% (به مدت 30 ثانیه) و هیپو کلریت سدیم (به مدت 3 دقیقه) استریل سطحی شدند. زادمایه سویه‌های مورد مطالعه در فلاسک‌های 100 میلی¬لیتری حاوی 50 میلی¬لیتر محیط YMB تهیه و 20 عدد بذر از قبل جوانه¬دار شده به درون هر یک از فلاسک¬های حاوی زادمایه باکتری و فلاسک شاهد منتقل گردید. فلاسک‌ها به مدت نیم ساعت روی شیکر با دور 120rpm و دمای 28 درجه سانتی¬گراد قرار داده شدند. سپس فلاسک¬های حاوی بذر و همچنین گلدان‌های پلاستیکی (200 گرمی) حاوی ماسه شسته شده با اسید رقیق به درون لامینار منتقل گردید. بذرهای جوانه¬دار داخل هر فلاسک با قرار دادن آنها بر روی دستمال کاغذی استریل به مدت حدود 2 دقیقه آبگیری شدند. برای هر سویه عمل کشت در سه تکرار انجام و گلدان‌های تلقیح شده به مدت 60-45 روز در گلخانه نگهداری شدند. پارامترهای وزن تر و خشک اندام هوایی، اندازه‌گیری گردید و با استفاده از روابط موجود کارایی همزیستی سویه‌ها (SE[8]) محاسبه شد.

نتایج و بحث

به منظور بررسی تنوع زیستی باکتری‌های مورد مطالعه، میزان متغیر بودن طول و ترتیب توالی قطعه حد فاصل بین دو ژن 16S rRNA و 23S rRNA با استفاده از روش PCR-RFLP بررسی گردید. گزارشات مختلف حاکی از آن است که قطعهITS می‌تواند یک نشانگر مولکولی مؤثر برای شناسایی تفاوت‌های ژنتیکی در سطوح مختلف باکتری‌ها و گروه‌بندی آنها باشد و محققین مختلف استفاده از ITS-PCR-RFLP را به عنوان یک روش سریع، کارا و قابل اعتماد برای تشخیص تنوع ژنتیکی باکتری‌های همزیست با گیاهان لگوم پیشنهاد نموده‌اند (لین و همکاران، 2007؛ ونگ و همکاران، 2009؛ اسدی و همکاران، 2011).

در این مطالعه واکنش زنجیری پلیمریزاسیون قطعه ITS برای اکثر سویه‌ها یک باند منفرد (با اندازه حدوداً 1500bp-1200bp) تولید نمود. قطعه تولید شده برای دو سویه KH16 و KH24 کوچک‌تر از قطعه ITS بقیه سویه‌های مورد مطالعه بود. یک باند اضافی در سویه KH186 مشاهده گردید (شکل1). بعد از هضم آنزیمی محصول PCR، 15 ژنوتیپ در میان 48 سویه مورد مطالعه و 4 سویه مرجع تشخیص داده شد (اشکال2، 3 و 4). در دندروگرام رسم شده با استفاده از شباهت بین الگوهای مختلف RFLP و الگوریتم UPGMA، 15ژنوتیپ باکتریایی در سطح شباهت 70 درصد به 4 گروه I, II, III و IV تقسیم‌بندی شدند (شکل5). گروه I در سطح شباهت 85 درصد به سه زیر گروه Ia, Ib و Ic تقسیم گردید. گروه Ia که باکتری‌های مرجع *سینوریزوبیوم*

1. Primers
2. Denaturation
3. Annealing
4. Extention
5. Master Mix PCR
6. Restriction enzymes
7. Unweighted Pair Grouping with Mathematic Average
8. Symbiotic Efficiency

Archive of SID

www.SID.ir

ملیلوتی سویه HAMBI1318 و *سینوریزوبیوم ملیلوتی* سویه HAMBI2148 در این گروه قرار گرفت، با 57/69 درصد و گروه Ic با 23 درصد بیشترین تعداد سویه‌ها را در خود جای دادند. گروه Ib شامل فقط دو سویه مورد مطالعه بود. باکتری‌های مرجع *سینوریزوبیوم مدیکا* سویه HAMBI12306 و *آگروباکتریوم تومافیسئنس* سویه HAMBI1811 به ترتیب در گروه‌های II و III همراه با یک و سه سویه مورد مطالعه قرار گرفتند. دو سویه KH24 و KH16 جدا از دیگر سویه‌ها در گروه IV قرار گرفتند. سویه‌های KH133 و KH10 در هیچکدام از گروه‌ها قرار نگرفتند.

باکتری‌های مورد بررسی در این تحقیق دارای تنوع ژنتیکی از نظر طول قطعه حد فاصل بین دو ژن 16S rRNA و23S rRNA بودند. تنوع طولی این قطعه در باکتری‌های ریزوبیوم همزیست با گیاهان لگوم توسط محققین مختلف گزارش شده است (آندرید و همکاران، 2002؛ بن‌رومدهان و همکاران، 2005؛ اسدی و همکاران، 2011). در این تحقیق الگوهای متفاوت حاصل از هضم آنزیمی قطعه ITS و تشکیل 15 ژنوتیپ باکتریایی در سویه‌های مورد مطالعه نشان‌دهنده متغیر بودن توالی این قطعه در سویه‌های مورد بررسی می‌باشد. ونگ و همکاران (2009) وجود تنوع ژنتیکی بالا از نظر توالی قطعه ITS را در میان ریزوبیوم‌های مورد مطالعه نشان دادند. آندرید و همکاران (2002) و اسدی و همکاران (2011) نیز متغیر بودن توالی این قطعه را در باکتری‌های همزیست با لگوم‌ها گزارش نمودند. وجود یک باند اضافی در الگوی PCR سویه KH186 مبین این واقعیت است که قطعه ITS دو کپی در ژنوم این سویه دارد و این دو کپی از نظر طولی با هم متفاوت می‌باشند. این تفاوت در طول عمدتاً می‌تواند به دلیل وارد شدن ژن‌های متنوع tRNA در مناطق ITS باشد (جنسن و همکاران، 1993). حضور کپی‌های متعدد از ژن ITS در ژنوم باکتری‌های ریزوبیومی نشانگر این واقعیت است که اپرون rRNA در کپی‌های متعدد در ژنوم این باکتری‌ها وجود دارد. این موضوع توسط محققین مختلف گزارش شده است (جیناکس و همکاران، 1993؛ هابر و سلنسکاپابل، 1994؛ استوارت و کاواناق، 2007). نتیجه PCR دو سویه KH24 و KH16 نشان داد که اندازه قطعه ITS در این دو باکتری بطور قابل ملاحظه‌ای کوچکتر با دیگر سویه‌های مورد مطالعه است. همچنین در دندروگرام رسم شده با استفاده از شباهت بین الگوهای مختلف RFLP و الگوریتم UPGMA قطعه ITS، این دو سویه کاملاً جدا از سویه‌های دیگر گروه‌بندی شدند. این نتایج نشان می‌دهد که دو سویه KH24 و KH16 می‌توانند متفاوت با باکتری‌های دیگر باشند و هیچ خویشاوندی با بقیه سویه‌های مورد مطالعه نداشته باشند.

نتایج حاصل از آزمون گره‌زایی نشان داد که اکثر سویه‌های مورد بررسی دارای توانایی ایجاد گره در گیاه یونجه بودند. در اثر تلقیح این نبات علوفه‌ای با سویه‌های KH16، KH24 ، KH10، KH6، KH133 و KH193 گره‌ای حاصل نشد (جدول2). در این تحقیق دامنه وسیعی از درصد کارایی همزیستی در بین باکتری‌های مورد بررسی مشاهده شد. بر اساس نتایج حاصل از آزمون بررسی کارایی همزیستی سویه‌های مورد مطالعه، این باکتری‌ها به چهار دسته غیر مؤثر، نسبتاً موثر، مؤثر و خیلی مؤثر تقسیم‌بندی شدند (جدول2). درصد کارایی همزیستی در سویه‌های غیر مؤثر زیر 75، در سویه‌های نسبتاً مؤثر 75-100، در سویه‌های مؤثر 100 و در سویه‌های خیلی مؤثر بالای 100 بود. دو سویه KH186 و KH13 از نظر تثبیت N_2 غیر مؤثر بودند. سویه‌های KH202، KH126، KH57 و KH21 بالاترین S.E.% را داشتند.

تثبیت نیتروژن مولکولی بیشتر توسط باکتری‌های ریزوبیومی می‌تواند از طریق انتخاب سویه‌های برتر تثبیت کننده N_2 حاصل شود (هوویسون، 1995؛ رنگل، 2002). به‌منظور دستیابی به سویه‌های برتر، بررسی توانایی سویه‌ها در تثبیت N_2 تحت شرایط کنترل شده گلخانه‌ای و شرایط طبیعی در مزرعه لازم است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که توانایی اکثر سویه‌های مورد مطالعه در تثبیت نیتروژن مولکولی نسبتاً خوب بود و این موضوع نشان می‌دهد که تلقیح با سویه‌های برتر به‌منظور دستیابی به مقادیر بالای تثبیت N_2 نیاز است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که روش ITS PCR-RFLP می‌تواند یک نشانگر مولکولی مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی و غربالگری‌های اولیه باکتری‌های همزیست با گیاهان لگوم باشد. نتایج حاصل از آزمون گره‌زایی نشان داد که بعضی از سویه‌های مورد بررسی توانایی ایجاد گره در ریشه‌های یونجه را نداشتند. این نتایج و نتایج گروه‌بندی انجام شده با استفاده از تکنیک ITS PCR-RFLP نشان می‌دهد که باکتری‌های غیر ریزوبیومی در میان باکتری‌های جداسازی شده از گره‌های یونجه وجود دارد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق به منظور شناسایی هر چه دقیق‌تر، مطالعه فیلوژنی 16 باکتری نماینده با استفاده از توالی‌یابی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های خانه‌دار[1] و ژن‌های درگیر در گره‌زایی[2] و تثبیت نیتروژن[3] پیشنهاد می‌گردد.

1. House keeping genes
2. Nod genes
3. Nif genes

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 1- سویه‌های مورد استفاده در این پژوهش

سویه	گیاه میزبان	منطقه جداسازی سازی شده	ITS ژنوتیپ
KH21	یونجه	چپقلو	2
KH183	یونجه	شیرین سو	2
KH49	یونجه	زنگنه	2
KH152	یونجه	فاماست	2
KH69	یونجه	میلاجرد	2
KH162	یونجه	وهمان	2
KH182	یونجه	کوهاون	2
KH198	یونجه	باباخنجر	2
KH95	یونجه	قلعه آسی جان	2
KH44	یونجه	حاتم آباد	2
KH121	یونجه	سلم سرایی	2
KH43	یونجه	کبودر آهنگ	2
KH202	یونجه	رزن	2
KH153	یونجه	جعفرآباد	2
KH70	یونجه	امامزاده پیرنهان	2
KH31	یونجه	ده دلیان	2
KH212	یونجه	قلقل آباد	2
KH57	یونجه	کرتیل آباد	2
KH126	یونجه	قوری چای	2
KH42	یونجه	سردارآباد	2
KH25	یونجه	حاجی آباد	2
KH142	یونجه	سامن	2
KH187	یونجه	طارقیه	2
KH209	یونجه	کرفس	2
KH74	یونجه	نیشر	2
KH109	یونجه	بیتران	2
KH22	یونجه	خماجین	2
KH41	یونجه	سرداران	3
KH115	یونجه	دربند	4
KH140	یونجه	ملایر	5
KH82	یونجه	زمان آباد به طرف ملایر	6
KH150	یونجه	آورزمان	6
KH173	یونجه	قوره جنیه	6
KH40	یونجه	سرورآباد	6
KH63	یونجه	برزون	6
KH119	یونجه	حسن قشلاق	6
KH105	یونجه	اسد آباد	7
KH81	یونجه	سیاکمر	7
KH33	یونجه	شراء	7
KH73	یونجه	علی آباد	7
KH10	یونجه	النجه	8
KH6	یونجه	چنار علیا	9
KH133	یونجه	توشمال	11
KH13	یونجه	زیر باغ	12
KH193	یونجه	گنبد چای	12
KH186	یونجه	کمی قلعه	14
KH16	یونجه	ازن دریان	15
KH24	یونجه	دهلق	15
HAMBI1318		هلسینکی	1
HAMBI21148		هلسینکی	1
HAMBI12306		هلسینکی	10
HAMBI1811		هلسینکی	13

Archive of SID

www.SID.ir

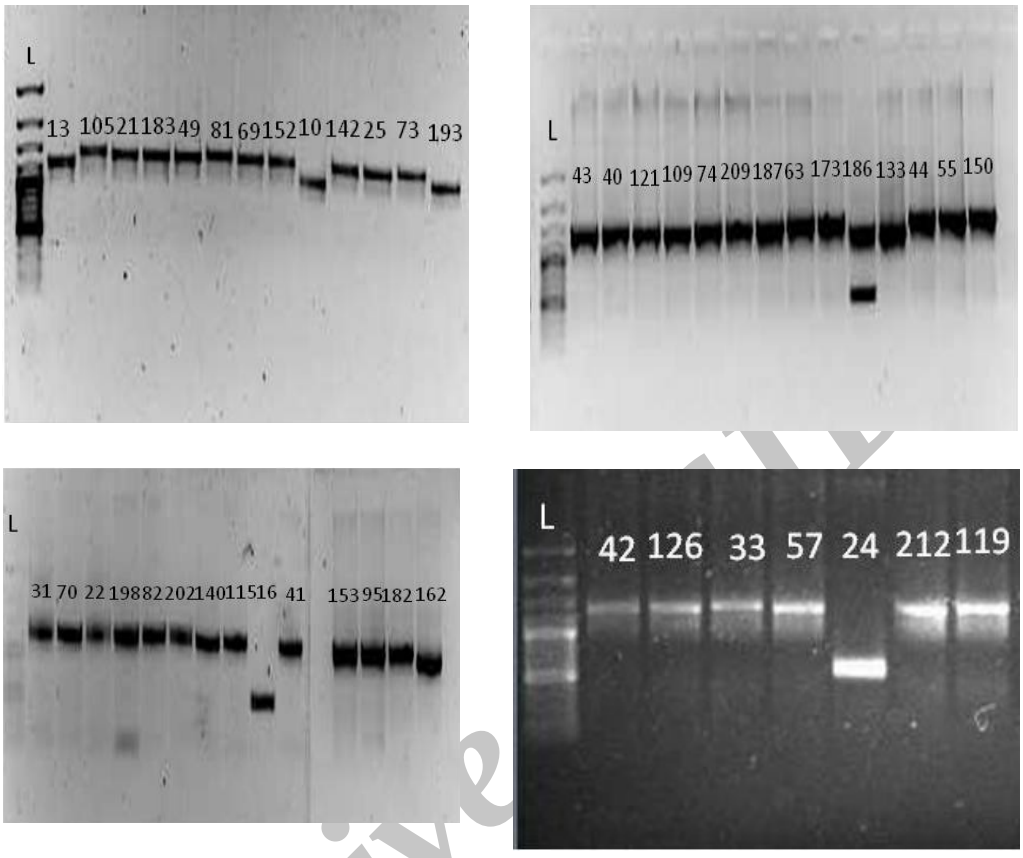
جدول 2- نتایج حاصل از آزمون گره‌زایی و S.E.% سویه‌های مورد استفاده

سویه	آزمون گرزایی	S.E.%
KH21	+	106
KH183	+	96
KH49	+	104
KH152	+	80
KH69	+	101
KH162	+	84
KH182	+	85
KH198	+	86
KH95	+	82
KH44	+	77
KH121	+	62
KH43	+	76
KH202	+	121
KH153	+	97
KH70	+	84
KH31	+	92
KH212	+	105
KH57	+	110
KH126	+	114
KH42	+	90
KH25	+	90
KH142	+	100
KH187	+	78
KH209	+	93
KH74	+	75
KH109	+	91
KH22	+	93
KH41	+	94
KH115	+	100
KH140	+	103
KH82	+	80
KH150	+	83
KH173	+	87
KH40	+	79
KH63	+	66
KH119	+	90
KH105	+	94
KH81	+	70
KH33	+	97
KH73	+	92
KH10	-	16
KH6	-	15
KH133	-	17
KH13	+	63
KH193	-	13
KH186	+	70

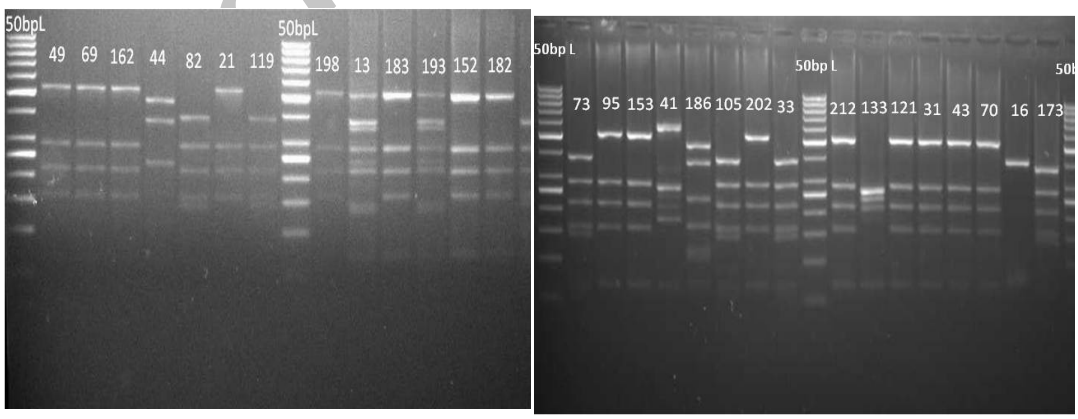
Archive of SID

www.SID.ir

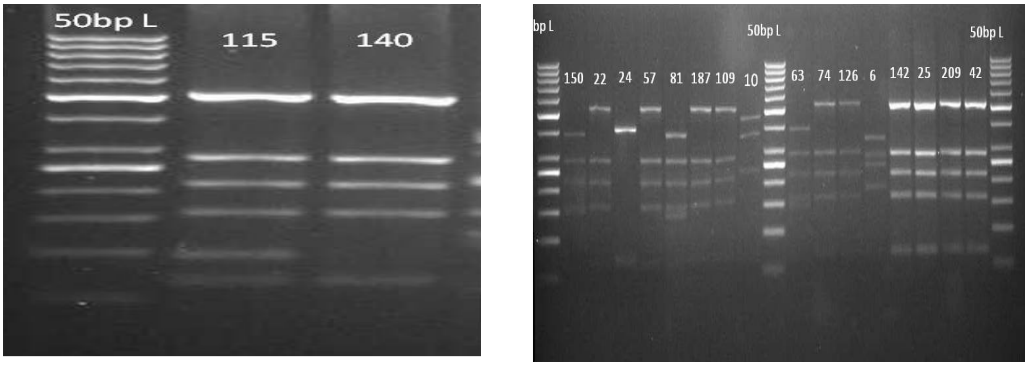
10	-	KH16
14	-	KH24



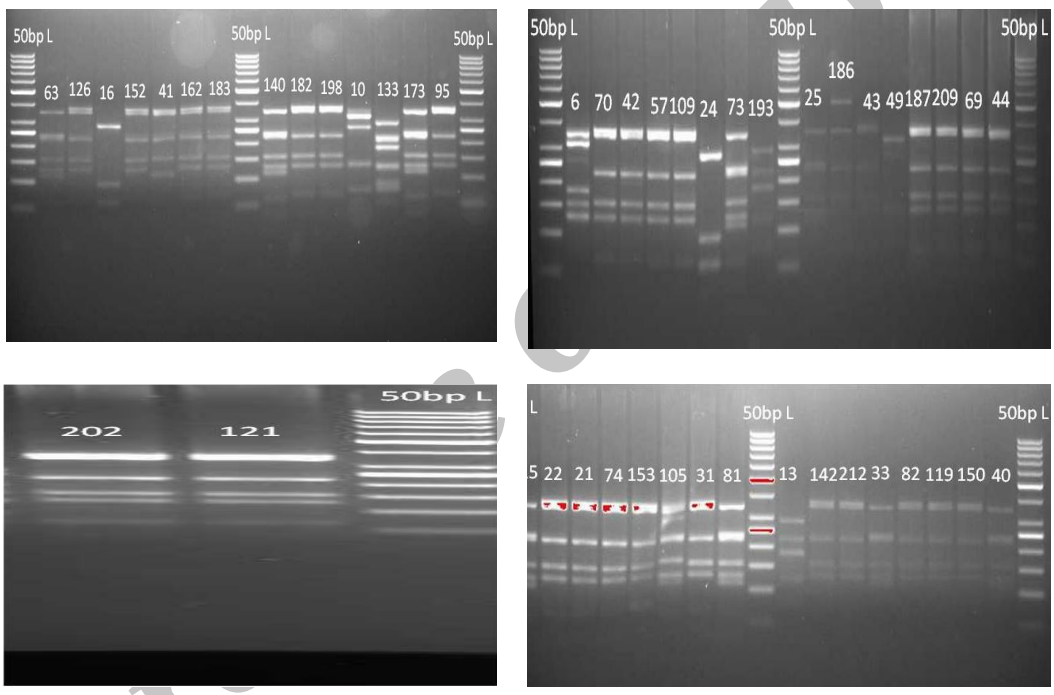
شکل 1- مشاهده محصولات واکنش زنجیری پلیمریزاسیون قطعه ITS روی ژل آگاروز 1/5 درصد
L: نشانگر مولکولی استفاده شده (100 bp plus Fermentas) شماره روی چاهک ها: شماره سویه های استفاده شده



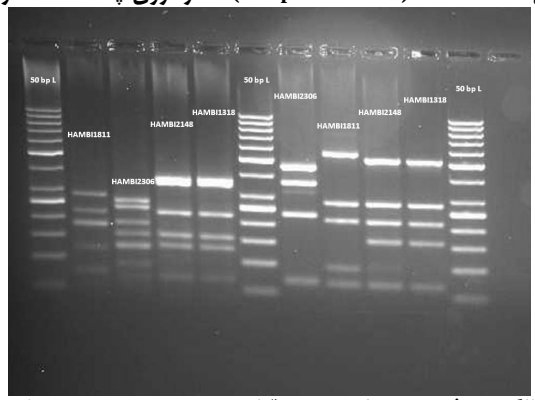
www.SID.ir



شکل 2- الگوی برشی محصولات PCR قطعه ITS با استفاده از آنزیم برشی HaeIII
L: نشانگر مولکولی استفاده شده (50 bp Fermentas) شماره روی چاهک‌ها: شماره جدایه‌های استفاده شده

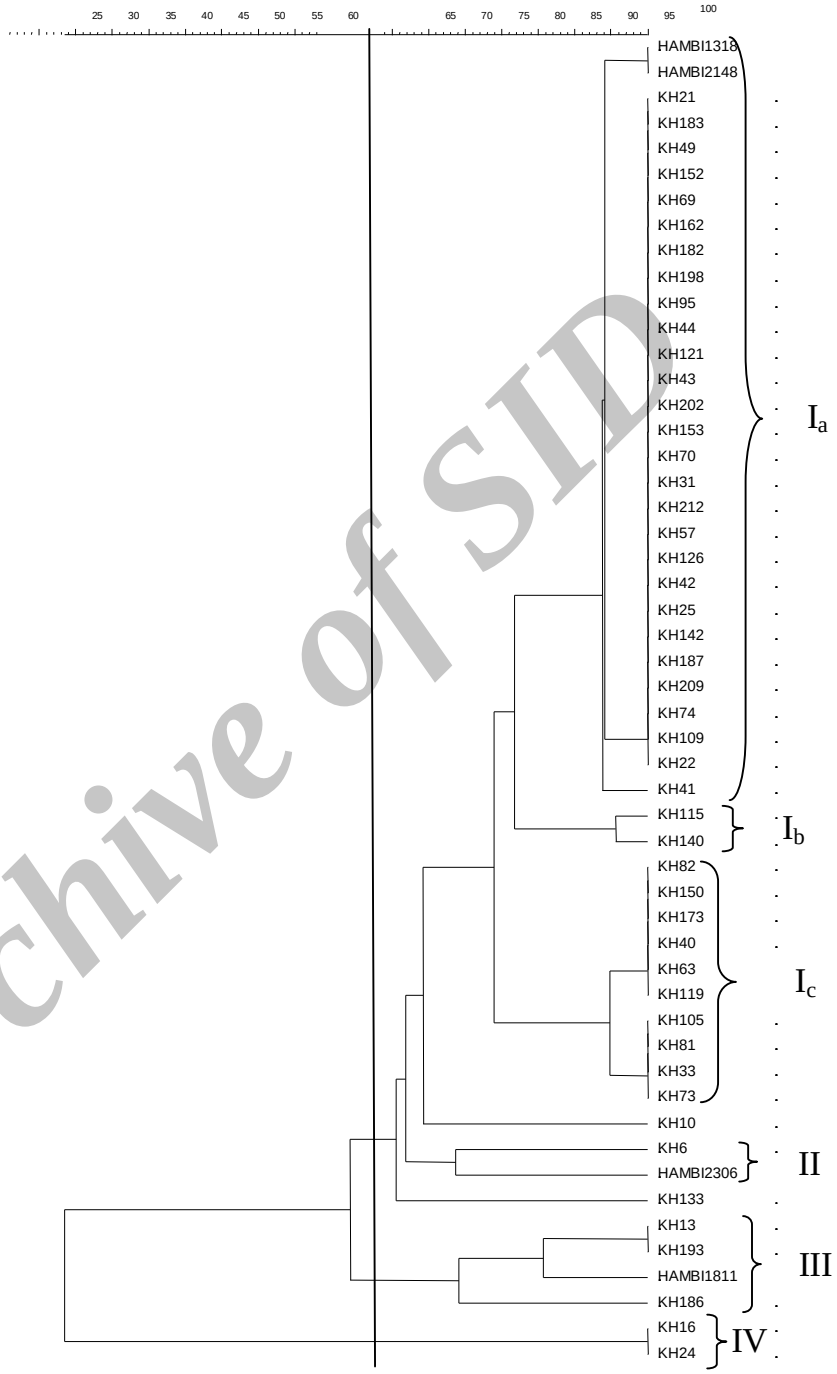


شکل 3- الگوی برشی محصولات PCR قطعه ITS با استفاده از آنزیم برشی MSPI
L: نشانگر مولکولی استفاده شده (50 bp Fermentas) شماره روی چاهک‌ها: شماره جدایه‌های استفاده شده



شکل 4- الگوی برشی محصولات PCR قطعه ITS سویه‌های مرجع با استفاده از آنزیم‌های برشی *Hae*III (سمت راست) و *MSP*I (سمت چپ)
L: نشانگر مولکولی استفاده شده (50 bp Fermentas) شماره روی چاهک‌ها: شماره جدایه‌های استفاده شده

www.SID.ir



شکل 5- دندروگرام رسم شده با استفاده از شباهت بین الگوهای مختلف RFLP قطعه ITS و الگوریتم UPGMA

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست منابع:

1. هادی کریمی: زراعت و اصلاح گیاهان علوفه‌ای، انتشارات دانشگاه تهران، سال 1384.
2. Andrade DS., Murphy PJ. and Giller KE. 2002. The Diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. Applied and Environmental Microbiology. 68: 4025–4034.
3. Asadi Rahmani, H., Räsänen, L.A., Afshari, M. and Lindström, K. 2011. Genetic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris L.* grown in soils of Iran. Applied Soil Ecology.
4. Baele M., Baele P., Vaneechoutte M., Storms V., Butaye P., Devriese LA., Verschraegen G., Gillis M. and Haesebrouck F. 2000. Application of tRNA intergenic spacer PCR for identification of *Enterococcus* species. Journal of Clinical Microbiology. 38: 4201–4207.
5. Bailly, X., Olivieri, I., Demita, S., Cleyet-Marel, J.C. and Bena, G. 2006. Recombination and selection shape the molecular diversity pattern of nitrogen-fixing *Sinorhizobium* sp. associated to *Medicago*. Molecular Ecology. 15: 2719–2734.
6. Benromdhane S., Naser H., Samba-mbaye R., Neyra M. and Habib ghorbal M. 2005. Diversity of *Acacia tortilis* rhizobia revealed by PCR/RFLP on crushed root nodules in tunnsia. Annals Microbiology. 55: 249-258.
7. Biondi EG., Pilli E., Giuntini E., Roumiantseva ML., Andronov EE., Onichtchouk OP., Kurchak ON., Simarov BV., Dzyubenko NI., Mengoni A. and Bazzicalupo M. 2003. Genetic relationship of *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* strains isolated from Caucasian region. FEMS Microbiology Letter. 220: 207–213.
8. Chen, W. X., Yan, G. H. and Li, J. L. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 38: 392–397.
9. de Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M. D., Dreyfus, B., Kersters, K. and Gillis, M. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 44: 715–733.
10. Diouf, A., de Lajudie, P., Neyra,M., Kersters, K., Gillis, M., Martı´nez-Romero, E. and Gueye, M. 2000. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). Int International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50:159-170.
11. Ferreira EM. and Marques JF. 1992. Selection of Portuguese *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains for production of legume inoculants. Plant Soil. 147: 151–158.
12. Geniaux E., Laguerre G. and Amarger N. 1993. Comparison of geographically distant populations of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* . Molecular Ecology. 2: 195-302.
13. Gurtler, V. and Stanisich, V. A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiology. 142:3–16.
14. Howieson JG. 1995. Characteristics of an ideotype acid tolerant pasture legume symbiosis in Mediterranean agriculture. Plant Soil. 171: 71–76.
15. Huber I. and Selenska-Pobell S. 1994. Pulsed-field electrophoresis fingerprinting, genome size estimation and rrn loci number of Rhizobium galegae. Journal of Applied Bacterialogy. 77: 528-533.
16. Jensen, M. A., Webster, J. A. and Straus, N. 1993. Rapid identification of the bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Applied and Environmental Microbiology. 59:945–952.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Laguerre G., Mavingui P., Allard MR., Charnay MP., Louvrier P., Mazurier SI., Rigottier-Gois L. and Amarger N. 1996. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. Applied and Environmental Microbiology. 62: 2029–2036.
18. Laguerre, G., Allard, M.R., Revoy, F. and Amarger, N. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology. 60: 56–63.
19. Langer, H., Kemanthi G, N., John G, H., Milko, J., and Fernando, B. 2008. Genetic diversity of *Sinorhizobium meliloti* associated with alfalfa in Chilean volcanic soils and their symbiotic effectiveness under acidic conditions. World Journal Microbiology Biotechnology. 24:301–308.
20. Lin DX., Man CX., Wang ET. and Chen WX. 2007. Diverse rhizobia that nodulate two species of *Kummerowia* in China. Arch Microbiol. 188: 495–507.
21. Merabet, C., Martens, M., Mahdhi, M., Zakhia, F., Sy, A., Le Roux, C., Domergue, O., Coopman, R., Bekki, A., Mars, M., Willems, A. and de Lajudie, P. 2010. Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from Lotus arabicus (Senegal), Lotus creticus, *Argyrolobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 60: 664–674.
22. Michaud R., Lehman WF. and Rumbaugh MD. 1987. World distribution and historical development, In Hanson AA., Barnes DK. , Hill RR. Alfalfa and alfalfa improvement. American Society of Agronomy, Madison, Wis. p. 25-91.
23. Nick, G., de Lajudie, P., Eardly, B. D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., Gillis, M. and Lindstrom, K. 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. International Journal of Systematic Bacteriology. 49: 1359–1368.
24. Rengel Z. 2002. Breeding for better symbiosis. Plant Soil. 245: 147–162.
25. Rinco´ n-Rosales, R., Lloret, L., Ponce, E. and Martı´nez-Romero, E. 2009. Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. FEMS Microbiology Ecology. 67: 103–117.
26. Rome, S., Fernandez, M. P., Brunel, B., Normand, P. and Cleyet-Marel, J.-C. 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. International Journal of Systematic Bacteriology. 46: 972–980.
27. Stewart FJ. and Cavanaugh CM. 2007. Intragenomic Variation and Evolution of the Internal Transcribed Spacer of the rRNA Operon in Bacteria. Journal of Molecular Evolution. 65: 44- 67.
28. Toledo, I., Lloret, L. and Martı´nez-Romero, E. 2003. *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. Systematics and Applied Microbiology. 26: 54–64.
29. Vincent JM. and Humphrey BA. 1970. Taxonomically significant group antigens in *Rhizobium*. J Gen Microbiology. 63: 379–382.
30. Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M. J., Izaguirre-Mayoral, M. L., Bedmar, E. J. and Martı´nez-Romero, E. 2005. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from rrs, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. Systematics and Applied Microbiology. 28: 702–716.

Archive of SID

www.SID.ir

31. Wang H., Man CX., Wang ET. and Chen WX. 2009. Diversity of rhizobia and interactions among the host legumes and rhizobial genotypes in an agricultural-forestry ecosystem. Plant Soil. 314: 169–182.
32. Wang, E. T., Tan, Z. Y., Willems, A., Ferna´ ndez-Lo´ pez, M., Reinhold-Hurek, B. and Martı´nez-Romero, E. 2002. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. Int International Journal of Systematic Bacteriology. 52: 1687–1693.
33. Wasike, V. W., Lesueur, D., Wachira, F. N., . Mungai, N. WL., Mumera, M., Sanginga, N., buru, H. N. M., Mugadi, D., Wango, P. and Vanlauwe, B. 2009. Genetic diversity of indigenous *Bradyrhizobium* nodulating promiscuous soybean [*Glycine max* (L) Merr.] varieties in Kenya: Impact of phosphorus and lime fertilization in two contrasting sites. Plant Soil. 322, 151–163.
34. Wei, G. H., Wang, E. T., Tan, Z. Y., Zhu, M. E. and Chen, W. X. 2002. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 2231–2239.

Archive of SID

www.SID.ir