مطالعه تنوع ژنتیک باکتری‌های سینوریزوبیوم با استفاده از تکنیک PCR / RFLP 16S-23S rDNA

اسماعیل کریمی[۱]، امیر لکزیان[۱*]، کاظم خاوازی[۲]، احمد اصغرزاده[۲] و دکتر غلامحسین حق نیا[۱]

(تاریخ دریافت: ۸۵/۵/۲۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۲۴)

چکیده

مطالعه تنوع ژنتیک باکتری‌های ریزوبیومی و ارزیابی کارآیی همزیستی آنها در جمعیت‌های بومی خاک به منظور شناخت پاسخ آنها به سویه‌های تلقیح شده به خاک و هم‌چنین نقش مدیریت‌های متفاوت بر تنوع این باکتری‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مطالعات بسیار اندکی پیرامون تنوع ژنتیکی باکتری‌های ریزوبیومی بومی ایران انجام شده و گزارشی راجع به باکتری‌های بومی ریزوبیومی از لحاظ ژنتیکی ارائه نشده است. به همین منظور تنوع ژنتیکی ۱۵۰ جدایه باکتری سینوریزوبیومی جدا شده از خاک‌های استان همدان با به کارگیری تکنیک PCR / RFLP 16S-23S rDNA مطالعه شدند. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که به طور کلی جدایه‌های مورد مطالعه در سه گروه کاملاً متفاوت قرار گرفتند. گروه اول (I) ۱۲۲جدایه از ۱۵۰ جدایه را شامل شد و این گروه خصوصیات ژنتیکی *Sinorhizobium meliloti* را نشان دادند. گروه دوم (II) شامل ۲۵ جدایه بود و این گروه هم متعلق به *Sinorhizobium medicae* بود. گروه سوم (III) شامل دو جدایه بود که خصوصیات ژنتیکی کاملا متفاوت با دو گروه قبلی داشت. شاخص تنوع شانون جدایه‌های مورد مطالعه در بین یازده واحدهای فیزیوگرافی مختلف (تپه، اراضی نسبتاً مسطح، فلات، کوهپایه، اراضی پست و اراضی متفرقه) متفاوت بوده و با برخی از خصوصیات خاکی هم‌بستگی نشان داد. شاخص تشابه متفاوت در بین واحدهای فیزیوگرافی بیانگر تفاوت در گروه‌های موجود در هر واحد فیزیوگرافی بود.

واژه‌های کلیدی: شاخص تنوع شانون، شاخص تشابه، واحدهای فیزیوگرافی

مقدمه

امروزه استفاده از کودهای بیولوژیک ریزوبیومی در تولیدات کشاورزی برای افزایش عملکرد گیاهان لگومینه به دلیل مزایای اقتصادی و سلامت محیط زیست طرفداران زیادی پیدا کرده است. آنچه که در تولید این مایه‌های تلقیحی ریزوبیومی اهمیت دارد معرفی کردن سویه‌های ریزوبیومی است که بتوانند اولاً قسمت عمده‌ای از گره‌های ریشه‌ای را اشغال کنند و ثانیاً تثبیت بیولوژیکی نیتروژن را با راندمان بالایی انجام دهند. اگر این هدف محقق شود افزایش تولید عملکرد گیاهان لگومینه که از مهم‌ترین نتایج کاربرد این نوع کودهاست، قابل حصول خواهد بود (۱). تقریباً بیش از ۸۰ سال از تکنولوژی تولید کودهای بیولوژیک ریزوبیومی می‌گذرد و پیشرفت‌های قابل

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲. اعضای هیئت علمی مؤسسه تحقیقات خاک و آب، تهران

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Alakzian@yahoo.com

توجهی در زمینه فرمولاسیون مایه‌های تلقیحی ایجاد شده است. اما به جرات می‌توان گفت که هنوز امکان استفاده از پتانسیل‌های موجود در باکتری‌های استفاده شده در مایه‌های تلقیحی به نحو مطلوب فراهم نشده است. از دلایل عمده عدم موفقیت در رسیدن به این مهم را می‌توان به از بین رفتن باکتری‌های تلقیح شده تا زمان شروع همزیستی، ناتوانی باکتری‌های تلقیح شده در رقابت با ریزوبیوم‌های بومی رقیب، عدم ماندگاری و پایداری کافی ژنوتیپ‌های فعال و کارامد مایه تلقیحی در بین دوره کشت لگوم و یا می‌توان به ترکیبی از این عوامل اشاره کرد (۱۷). معمولاً بالاترین توان جدایه‌های معرفی شده در سال اول حاصل می‌شود و بعد از آن جمعیت تلقیحی معمولاً سیر نزولی شدیدی پیدا می‌کنند به ویژه اگر خاک‌ها دارای ریزوبیوم‌های رقیب و موثر نیز باشند. راندمان پایین اشغال ریشه گیاه میزبان همزیست توسط جدایه‌های معرفی شده در واقع نمایانگر عدم شناخت کافی محققین از مسایلی است که پیرامون این موضوع وجود دارد. تنوع زیستی، ساختار جمعیت، توزیع جغرافیایی و سازگاری‌های اکولوژیکی باکتری‌های ریزوبیومی از جمله مواردی هستند که مطالعه آنها از اهمیت و ضرورت خاصی برخوردار است. این موضوع زمانی اهمیت فوق العاده پیدا می‌کند که بخواهیم پاسخ باکتری‌های ریزوبیومی بومی خاک در برابر مایه‌های تلقیحی معرفی شده به خاک را دریابیم. برای این منظور شناخت تنوع ژنتیکی و هم‌چنین کارایی تثبیت بیولوژیکی نیتروژن باکتری‌های ریزوبیومی بومی خاک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. متاسفانه تاکنون مطالعات بسیار کمی در این زمینه در ایران انجام شده است (۱ و ۳). امروزه با فراهم شدن امکانات مطالعه تنوع ژنتیکی باکتری‌ها با به کارگیری تکنیک‌های ژنتیک مولکولی می‌توان تأثیر عوامل محیطی را بر تنوع باکتری‌های ریزوبیومی بومی خاک‌ها مطالعه کرد و پیامدهای ناشی از عملیات زراعی و استراتژی‌های مدیریتی خاص را روی شاخص‌های تنوع بررسی کرد (۶). برادیک و همکاران (۵) تنوع و ارتباط ژنتیکی جمعیت بومی سینوریزوبیوم را به منظور افزایش اطلاعات در زمینه گره زایی گیاه یونجه و کارایی همزیستی جدایه‌ها سینوریزوبیوم با استفاده از PCR/RFLP مطالعه کردند. نتایج آنها نشان داد که کلیه جدایه‌های مورد مطالعه متعلق به گونه *Sinorhizobium meliloti* بودند. سویه‌های V11, OS6 , C16 را با انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای به عنوان کاراترین جدایه‌ها معرفی کردند. جبرا و همکاران (۱۱) پلاسمید پروفیل ۱۳۴ جدایه و ارتباط ژنتیکی ۸۹ جدایه سینوریزوبیوم را با استفاده از PCR/RFLP 16SIGS از منطقه تونزیا را مطالعه کردند. نتایج آنها نشان داد که تکنیک PCR/RFLP به خوبی قادر است که تفاوت بین *S. meliloti* و *S. medicae* را مشخص کند. جبرا و همکاران (۱۱) هم‌چنین گزارش کردند که جدایه‌های میزبان‌های *Medicago sativa* و *M. scutelleta* به جدایه‌های میزبان *M. truncatula* شباهت بیشتری در مقایسه با میزبان‌های دیگر داشتند. کارلی و همکاران (۷) تنوع ژنتیکی ۵۳۱ جدایه سینوریزوبیوم را که از دو خاک متفاوت در طی چهار سال از گره‌های گیاه میزبان جدا شده بودند را مطالعه کردند. نتایج آنها نشان داد که ترکیب جمعیت در طی چهار سال مطالعه تغییر کرده است اما تأثیر نوع خاک در سال‌های آخر مطالعه روی ترکیب جمعیت معنی‌دار نبود. بنابر این به دنبال شناخت تنوع باکتری‌های خاک و اهمیت آن در جمعیت‌های بومی خاک می‌توان در جهت حفظ آن و استفاده از پتانسیل‌های بالقوه مجهول در جمعیت‌های باکتری‌های ریزوبیومی بومی خاک تصمیم‌گیری‌های مناسبی را اتخاذ کرد.

از آنجایی که یونجه یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی علوفه‌ای در ایران است و نقش عمده‌ای در تغذیه دام و تولید پروتئین دارد و بر طبق آمارهای زراعی سال ۸۱-۱۳۸۰ وزارت جهاد کشاورزی بالغ بر ۵۳۷۲۸۷ هکتار از اراضی در ایران به این گیاه زراعی اختصاص داده شده است و بیشترین سطح زیر کشت آن در استان همدان می‌باشد (۲ و۴). در این تحقیق تنوع ژنتیکی باکتری‌های همزیست یونجه (سینوریزوبیوم) با استفاده از تکنیک PCR/ RFLP 16S-23S rDNA مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است تا با شناخت این ویژگی بسیار مهم

جمعیتی بتوانیم مبنای تحقیقات بهتری را برای مطالعات بعدی در این زمینه فراهم سازیم.

مواد و روش‌ها

۱۵۰ جدایه باکتری سینوریزوبیومی همزیست گیاه یونجه برای انجام مطالعات تنوع ژنتیکی از کلکسیون بخش بیولوژی خاک مؤسسه تحقیقات خاک و آب در سال ۱۳۸۲ انتخاب شدند. جدایه‌های مذکور از خاک‌های متفاوت سراسر استان همدان از گره‌های گیاه میزبان *Medicago sativa* cv .*Hamedani* جداسازی شده بودند. DNA ژنومی ۱۵۰ جدایه سینوریزوبیومی و سویه سینوریزوبیوم ملیلوتی MVII با استفاده از کلروفرم و روش پیشنهاد شده توسط چن وهمکاران استخراج شد (۸). غلظت و خلوص DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تخمین زده شد. واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم DNA ، ۲۰۰ میکرو مولار dNTP ، ۰/۱ میکرو مولار از هر کدام از آغازگرها، ۵ میکرولیتر بافر PCR×۱۰، ۲/۵ واحد آنزیم Tag-polymerase ، ۵ میکرولیتر DMSO ۵ درصد) انجام شد. در همه موارد یک شاهد منفی بدون DNA نیز در نظر گرفته شد. برای تکثیر فاصله ژنی 16S-23S از دو آغازگر پیشبرنده و پسبرنده که به ترتیب دارای ردیف بازهای آلی 926F 5' GGT TAA AAC T(C/T)A AA(G/T) GAA TTG ACG G 3' از انتهای منطقه 16S rDNA و 115R/23S 5'CCG GGT T(T/G/C)C CCC ATT CGG3 23S rDNA از انتهای منطقه باکتری *E. coli* استفاده شد. می‌باشد. واکنش PCR در ترمو سایکلر (Biomera) با برنامه حرارتی ۵ دقیقه در ۹۰ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ سیکل برنامه دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه، نهایتاً دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه به عنوان گسترش نهایی انجام شد. برای اطمینان از تکثیر منطقه IGS (فاصله ژنی بین 16SrRNA و 23SRRNA) مورد نظر ۵ میکرولیتر از محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد با ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شد و در پایان با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با دستگاه ژل داک عکسبرداری شد. پس از اطمینان از حصول نتیجه مطلوب ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش با استفاده هر یک از آنزیم‌های *HinfI* و *HealII* بر طبق دستورالعمل کارخانه سازنده هضم آنزیمی شدند. پس از اتمام عمل هضم تمامی محصولات هضم شده با استفاده از ژل آگارز ۳ درصد در ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، عکسبرداری شدند. الگوهای حاصله برای مطالعه تنوع بین ۱۵۰ جدایه سینوریزوبیوم مورد استفاده قرار گرفت.

شاخص تنوع شانون و شاخص تشابه در واحدهای فیزیوگرافی از طریق نقشه منابع و استعداد خاک‌های ایران سال ۱۳۸۲ با استفاده از نرم افزار ILWIS تهیه و محاسبه شد. شاخص شانون و شاخص تشابه به صورت زیر محاسبه شد:

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

H شاخص شانون و Pi فراوانی نسبی هر گونه در یک اجتماع می‌باشد و مقدار آن برابر است با ni/N که ni تعداد هر گونه و N تعداد کل جامعه را نشان می‌دهد.

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

S شاخص تشابه، C_{ij} تعداد گونه‌های مشترک بین دو منطقه، C_i تعداد گونه‌های منطقه ۱ و C_j تعداد گونه های منطقه ۲. گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس مطالعه PCR/RFLP با تشکیل ماتریس صفر (عدم حضور باند) و ۱ (حضور باند) با استفاده از نرم‌افزار JMP انجام شد. به منظور بررسی نقش برخی از عوامل خاکی در میزان تنوع شانون خصوصیاتی نظیر میزان کربن آلی، آمونیم، نیترات، اسیدیته، هدایت الکتریکی و درصد شن، سیلت، رس و میزان فسفر بروش اولسن اندازه‌گیری شد. میانگین عددی فاکتورهای خاکی برای هر واحد فیزیوگرافی بر آورد شد.

نتایج و بحث

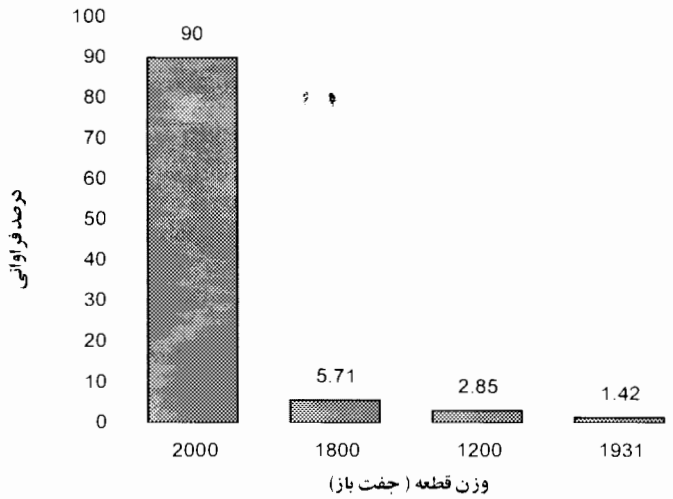
نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که ۹۰ درصد جدایه‌های مورد مطالعه دارای IGS با ۲۰۰۰ جفت باز، ۵/۷ درصد دارای ۱۸۰۰، ۲/۹ درصد دارای ۱۲۰۰ جفت باز آلی

بودند (شکل ۱). ۱/۵ درصد دارای دو نوع IGS بودند که مجموع وزن این دو نوع IGS ۱۹۳۰ و میانگین آنها ۹۶۵ جفت باز آلی بود. سویه MVII که به عنوان سویه مرجع در این مطالعه استفاده شده است دارای IGS با وزن ۲۰۰۰ بود. متغیر بودن اندازه این ناحیه در جدایه‌های مختلف باکتری‌های ریزوبیوم در مطالعات پافتی و همکاران (۱۵) نیز گزارش شده است. بررسی‌های این محققان در مورد ۹۶ جدایه سینوریزوبیوم نشان داد که اندازه منطقه IGS در ۹۸ جدایه سینوریزوبیومی همزیست یونجه ۱۳۵۰ و درمورد یک جدایه ۱۴۵۰جفت باز آلی بوده است. آنها دلیل این امر را اضافه شدن یک ژن tRNA در منطقه IGS عنوان کردند. با توجه به این که بالای ۸۰ درصد از جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق دارای IGS با وزن bp ۲۰۰۰ می‌باشند بنابراین به نظر می‌رسد در جدایه‌هایی که وزن ناحیه IGS کمتر از bp ۲۰۰۰ می‌باشد احتمالاً برخی از ژن‌های tRNA موجود در این ناحیه حذف شده باشند.

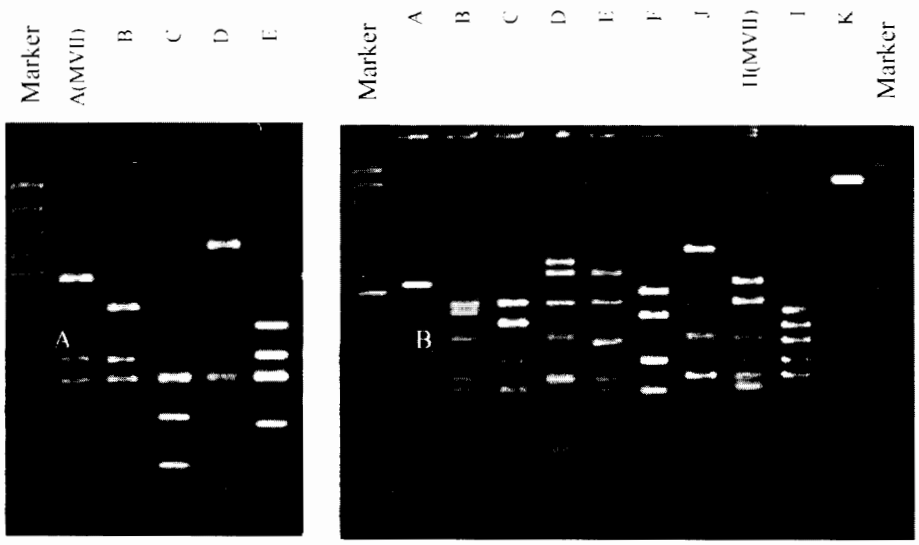
جبرا و همکاران (۱۱) نیز طول این ناحیه را در ۸۹ جدایه سینوریزوبیوم همزیست یونجه bp ۱۳۵۰ گزارش کرده‌اند. مطالعاتی هم که در مورد سایر گونه‌های ریزوبیومی انجام گرفته ومتغیر بودن وزن این منطقه را در داخل جمعیت یک گونه تایید می‌کنند و حتی وجود دو نوع اپرون IGS هم برای آنها گزارش شده است (۱۳ و۱۴). نتایج حاصله از هضم آنزیمی IGS تکثیر شده با دو آنزیم برشی *HaeIII* و *HinfI* نشان داد که آنزیم *HinfI* فقط پنج نیمرخ پروفیلی متفاوت در بین ۱۵۰ جدایه سینوریزوبیومی مورد مطالعه ایجاد کرد. هضم محصول PCR (فاصله ژنی IGS) تکثیر شده با آنزیم *HinfI* تولید سه قطعه کرد ولی در بعضی از نمونه ها این قطعات به ۵ عدد نیز رسید. در حالی که آنزیم *HaeIII* ده نیمرخ پروفیلی متفاوت ایجاد کرد و تعداد قطعه‌های حاصله نیز در اکثر نمونه‌ها به ۶ عدد رسید (شکل ۲). آنزیم *HaeIII*، منطقه IGS جدایه ها را بیشتر از آنزیم *HinfI* برش داد.

نتایج حاصله از گروه بندی جدایه‌های مورد مطالعه بر اساس مطالعه PCR/RFLP نشان داد که تمامی جدایه‌ها در سه گروه اصلی قرار گرفتند (شکل ۳). گروه اول (I) ۱۲۲جدایه از ۱۵۰ جدایه را شامل شد و سه زیر گروه را تشکیل داد. زیرگروه اول آن شامل ۱۰۴ جدایه بود و جدایه MVII (جدایه مرجع) نیز در این گروه قرار گرفت. در زیرگروه دوم ۱۱ جدایه قرار گرفت و در زیر گروه سوم هفت جدایه وجود داشت که خود به سه دسته دیگر تقسیم شدند. گروه دوم (II) شامل ۲۵ جدایه بود که خود این گروه دو زیر گروه مستقل را تشکیل داد که اولی ۶ جدایه و دومی ۱۹ جدایه را در خود جای داد .گروه سوم هم که در فاصله دورتری نسبت به دو گروه قبل قرار داشت. شامل دو جدایه ۲-۱۲ و ۱۳ بود. جدایه‌های این گروه هر یک دارای دو اپرون IGS بودند. همان طور که قبلاً بحث شد دوگونهٔ سینوریزوبیومی، به نام‌های *S. meliloti* و *S. medicae* می‌توانند یونجه را گره دار کنند که از لحاظ تکاملی فاصله ژنتیکی نزدیک‌تری باهم دارند و به ترتیب با یونجه‌های چند ساله و یکساله همزیستی مؤثر بر قرار می‌کنند بنابراین باتوجه به قرار گرفتن سویه MVII در گروه I که اکثریت جدایه‌ها را نیز شامل می‌شد به احتمال زیاد این گروه در برگیرنده جدایه‌های *S. meliloti* و گروه II شامل جدایه‌های *S. medicae* باشد. نتایج به دست آمده با تکنیک PCR/RFLP 16S-23S_rDNA در این مطالعه منطبق با نتایج به دست آمده در مطالعات جبرا و همکاران است (۱۱) که ۸۹ جدایه همزیست یونجه را با این روش مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که جمعیت مورد مطالعه می‌توانند به دو گروه اصلی تقسیم شود گروه اول که اکثریت جدایه‌ها را در بر می‌گرفت و سویه *S. meliloti SU47* در آن گروه قرار گرفت به عنوان ملیلوتی و گروه دوم که سویه *S. medicae M1* هم در داخل آن گروه قرار داشت به عنوان جدایه‌های *S. medicae* تشخیص داده شدند. شاخص تنوع شانون نشان داد که میزان تنوع در واحدهای فیزیوگرافی مختلف متفاوت بوده ولی مقدار آن برای همه واحدهای فیزیوگرافی کمتر از یک بود (جدول ۱).

این موضوع با توجه به مطالعه بخش کوچکی از جمعیت باکتری‌های همزیست یونجه و کاربرد یک گیاه میزبان برای



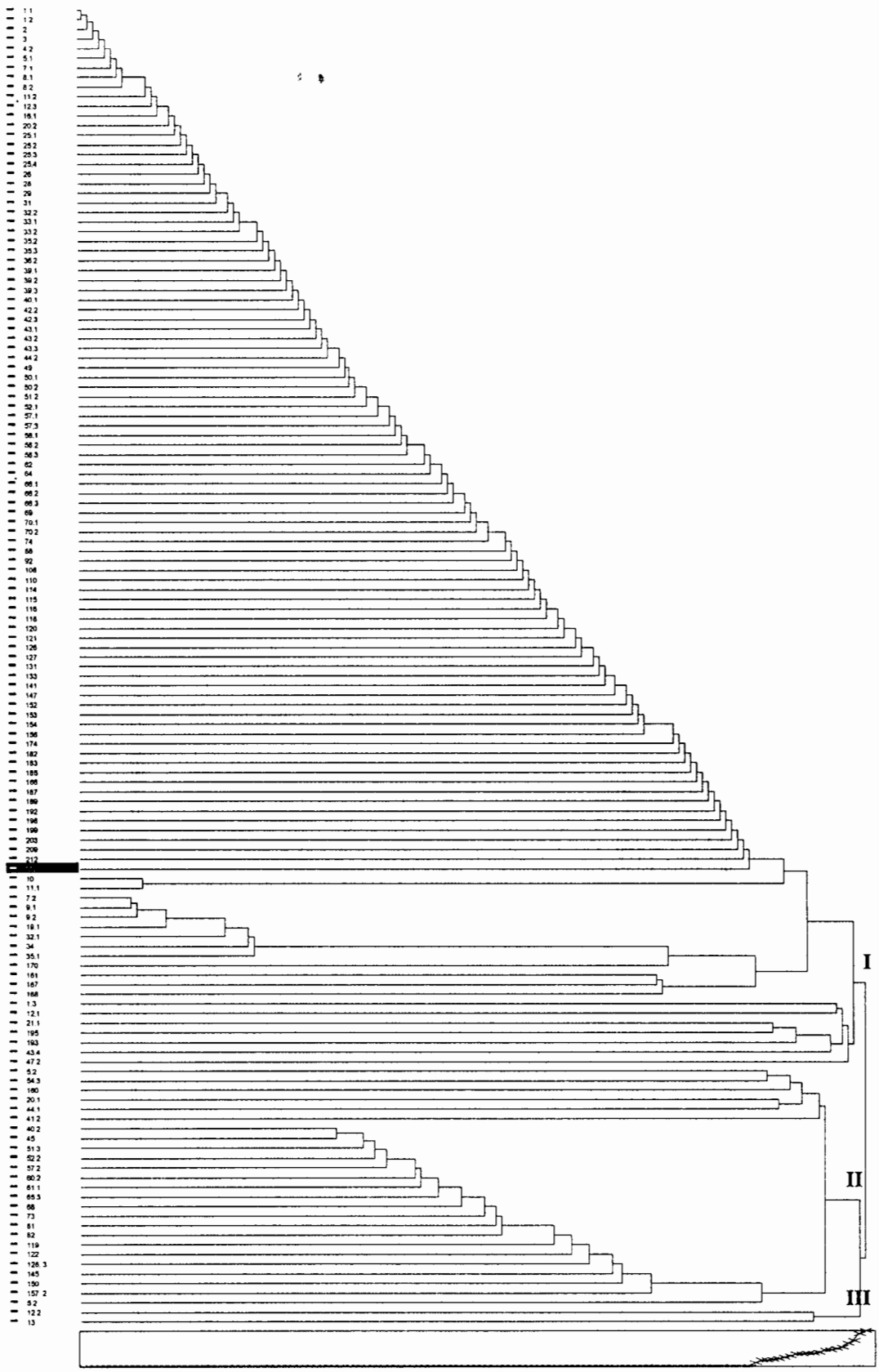
شکل ۱. درصد فراوانی قطعات مختلف IGS شناسایی شده در بین ۱۵۰ جدایه‌های سینوریزوبیوم خاک‌های استان همدان



شکل ۲. نتایج هضم آنزیمی محصول PCR با استفاده از آنزیم *HinfI* (A) و *HaeIII* (B) جدایه‌های *Sinorhizobium* SPP

جدول ۱. شاخص تنوع شانون در واحدهای فیزیوگرافی مختلف استان همدان برمبنای (PCR/RFLP 16 – 23S rDNA)

واحدهای فیزیوگرافی	شاخص شانون (H)	تعداد جدایه در هر واحد فیزیوگرافی
۱۷	۰/۴۱	۲۱
۱۸	۰/۵۷	۳
۲۸	۰/۳۰	۲
۳۰	۰/۲۵	۳۳
۴۳	۰/۲۷	۶
۴۴	۰/۲۴	۴
۴۵	۰/۴۳	۲۰
۴۷	۰/۴۱	۷
۵۵	۰/۳۹	۳۰
۸۳	۰	۵
۸۵	۰/۴۷	۱۹



شکل ۳. دندروگرام حاصل از مطالعه جدایه‌ها باکتری‌های سینوریزوبیوم بر مبنای PCR / RFLP 16S-23S rDNA

جدول ۲. شاخص تشابه در واحدهای فیزیوگرافی مختلف استان همدان بر مبنای PCR/RFLP (16S –23S rDNA)

واحدهای فیزیوگرافی	۳۰	۸۵	۱۷	۴۵	۴۷	۴۳	۴۴	۵۵	۲۸	۸۳	۱۸
۳۰	۱	۰/۶۷	۰/۵۷	۰/۶۷	۰/۸۰	۰/۵۰	۰/۷۷	۰/۵۷	۰/۵۰	۰/۶۷	۰/۸۷
۸۵		۱	۰/۴۴	۰/۵۰	۰/۵۷	۰/۳۳	۰/۶۶	۰/۶۷	۰/۳۳	۰/۴۰	۰/۶۷
۱۷			۱	۰/۴۴	۰/۵۰	۰/۲۹	۰/۵۷	۰/۴۰	۰/۲۹	۰/۳۳	۰/۵۷
۴۵				۱	۰/۵۷	۰/۳۳	۰/۶۷	۰/۶۷	۰/۳۳	۰/۴۰	۰/۶۷
۴۷					۱	۰/۴۰	۰/۸۰	۰/۵۰	۰/۴۰	۰/۵۰	۰/۸۰
۴۳						۱	۰/۵۰	۰/۲۹	۰/۵۰	۰/۶۷	۰/۵۰
۴۴							۱	۰/۵۷	۰/۵۰	۰/۶۷	۰/۶۵
۵۵								۱	۰/۲۹	۰/۳۳	۰/۵۷
۲۸									۱	۰/۶۷	۰/۵۰
۸۳										۱	۰/۶۷
۱۸											۱

جدول ۳. ضریب هم‌بستگی بین عوامل خاکی و شاخص تنوع شانون بر مبنای PCR/RFLP (16S –23S rDNA)

	P	Clay	Silt	Sand	$EC\left(\frac{dS}{m}\right)$	pH	NH_4^+	NO_3^-	OC
ضریب هم‌بستگی	۰/۰۶	-۰/۳۶	-۰/۶۲	۰/۷۰	-۰/۲۹	-۰/۵۴	-۰/۵۸	-۰/۲۴	-۰/۵۳
سطح معنی‌داری (p)	۰/۸۳	۰/۲۵	۰/۰۴	۰/۰۱۴	۰/۳۷	۰/۰۸	۰/۰۵	۰/۴۵	۰/۰۸

جداسازی جدایه‌ها چندان دور از انتظار هم نیست. زیرا نتایج تحقیقات دیگران نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی به نوع گیاه میزبان که برای جدا سازی باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد بستگی دارد (۱۳). علاوه بر این، زمانی که از گیاه میزبان در جداسازی باکتری استفاده می‌شود فقط آن جدایه هایی مورد مطالعه قرار می‌گیرند که قدرت رقابتی بالایی داشته و بتوانند گیاه میزبان را گره‌دار کنند و سایر جدایه‌های خاک عملاً از مطالعه حذف می‌شوند. هم‌چنین شاخص تشابه گروه‌ها در واحدهای مختلف بیانگر این نکته می‌باشد که گروه‌های موجود در واحدهای مختلف نیز با هم متفاوت می‌باشند (جدول ۲).

نتایج بررسی هم‌بستگی تنوع شانون بر مبنای PCR / RFLP با عوامل خاکی نشان داد که شاخص تنوع، یک رابطه منفی با میزان آمونیم و میزان سیلت داشته و دارای یک هم‌بستگی مثبت با درصد شن در خاک‌ها دارد که در سطح ۹۵ درصد معنی دار بود(جدول ۳).

هم‌چنین یک رابطه منفی بین تنوع جدایه های سینوریزوبیومی با میزان کربن آلی اسیدیته وجود داشت ولی این ارتباط از اعتبار آماری کمتری برخوردار بود. برقراری یک رابطه رگرسیونی چند متغیره با عوامل خاکی نشان داد شاخص شانون بهترین رابطه را با درصد سیلت در خاک دارد. در مطالعات متعددی بررسی میزان تنوع زیستی با عوامل خاکی و سایر عوامل محیطی مورد توجه و بحث قرار گرفته است و در اکثر این مطالعات رابطه معنی‌داری بین تنوع باکتری‌ها و فاکتورهای خاکی گزارش گردیده است. مطالعات انجام شده در خاک‌های برزیل نشان داد که تفاوت معنی داری بین حضور جدایه های مختلف در بین خاک‌های متفاوتی که بر روی آنها تیمارهای مختلفی اعمال شده بود وجود دارد. در این مطالعه مشخص شد که به دلیل استفاده از مواد شیمیایی کشاورزی و عملیات فیزیکی اعمال شده در کشت سویا تنوع باکتری‌های ریزوبیومی موجود در خاک کاهش چشمگیری پیدا کرده است (۹). رابطه منفی بین تنوع ریزوبیوم و سطح فسفات و پتانسیل نیتروژنی خاک گزارش شده است (۱۶). علاوه بر اینها ممکن است تنوع به واسطه عواملی که در میزان پتانسیل نیتروژن و فسفات دخالت دارند تحت تأثیر قرار گیرد. گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد غلظت کلسیم و منیزیم در خاک روی تنوع اثر گذاشته است. اسیدیته خاک نیز از جمله عوامل مؤثر در تنوع بوده و

کمترین میزان تنوع در اسیدیته‌های پایین گزارش شده است (۱۰ و۱۶). البته مواردی هم گزارش شده که در آنها رابطه‌ای بین تنوع و فاکتورهای خاکی یافت نشده است. مطالعات کوین و همکاران نشان داد که تنوع نیمرخ پلاسمیدی در جدایه‌های ریزوبیوم لگومینوزاریوم هم‌بستگی معنی داری با عوامل خاکی مانند درصد فسفر ، درصد نیترات، اسیدیته و شوری خاک ندارد (۱۲).

نتیجه‌گیری

بخش عمده‌ای از جدایه‌های سینوریزوبیومی مورد مطالعه فاقد تنوع ژنتیکی می‌باشند که در گروه I دسته‌بندی شدند، احتمالا این جدایه‌ها توانایی رقابت بسیار زیادی در اشغال گره‌های گیاه میزبان دارند. گروه II درصد کمتری از جمعیت جدایه‌های مورد مطالعه را در مقایسه با گروه I را شامل شد و احتمالاً این گروه بسیار نزدیک به *S. medicae* است. گروه III احتمالاً گونه‌ای جدید در بین جنس سینوریزوبیوم می‌باشد که خصوصیات ژنتیکی و مرفولوژیکی بسیار متفاوتی از دو گروه فوق داشتند. مطالعه دقیق دو جدایه ۲-۱۲ و ۱۳ با استفاده از تعیین ردیف بازهای آلی 16S rDNA می‌تواند مبنای مطالعات آتی در این تحقیق باشد که نتایج حاصله احتمالاً منجر به معرفی گونه جدیدی در جنس سینوریزوبیوم می‌شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و مرکز تحقیقات خاک و آب تهران که امکان این تحقیق را فراهم کردند تشکر می‌کنیم.

منابع مورد استفاده

۱. اصغرزاده، ا. ۱۳۸۰. شناسایی سویه‌های باکتری‌های همزیست نخود ایرانی *Mesorhizobium cicier* با کارایی تثبیت ازت متفاوت با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی. پایان نامه دکتری، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

۲. آمار نامه کشاورزی، جلد اول، محصولات زراعی و باغی (۱۳۸۱- ۱۳۸۰). وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه‌ریزی و اقتصاد، دفتر آمار و فناوری و اطلاعات، تهران.

۳. خاوازی، ک.۱۳۸۲. بررسی وضعیت عناصر غذایی، فراوانی، درجه کارایی باکتری‌های *Sinorhizobium meliloti* و پتانسیل تثبیت ازت در خاک‌های یونجه زار استان همدان. .پایان نامه دکتری دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

۴. کریمی، ه . ۱۳۶۹. یونجه. مرکز نشر دانشگاهی، تهران.

5. Bradic, M., S. Sikora, S. Redzepovic and Z. Stafa. 2003. Genetic Identification and Symbiotic Efficiency of an Indigenous *Sinorhizobium meliloti* Field Population. Food Technol. Biotechnol. 41: 69-75.
6. Bromfield, E. S. P., A. M. P. Behara, R. S. Singh and L. R. Barran. 1998. Genetic variation in local populations of *Sinorhizobium meliloti*. Soil Biol. and Biochem. 30(13): 1707- 1716.
7. Carelli, M., S. Gnocchi, S. Fancelli and A. Mengooni. 2000. Genetic diversity and dynamics of *sinorhizobium meliloti* populations nodoulating different alfalfa cultivars in Italian soils. Environ. Microbiol. 66: 4785-4789.
8. Chen, W. P. and T. T. Kuo. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram negative bacteria genomic DNA. Nucleic Acid Res. 21(9): 2260- 2260.
9. Coutinho, H. L. C., Oliveria. V. M., A. Lovato, A. H. N. Maia and G. P. Manfio. 1999. Evalution of the diversity of rhizobia in brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. Appl. Soil Ecol. 13: 159- 167.
10. Harrison, S. P., D. G. Jones and J. P. W. Young. 1989. *Rhizobium* population genetics: genetic variation within and between populations from diverse locations. J. General Microbiol. 135:1061–1069.
11. Jebara, M., R. Mhamdi, M. E. Aouani, R. Ghrir and M. Mars. 2001. Genetic diversity of *Sinorhizobium* populations recovered from different Medicago varieties cultivated in Tunisian soils. Can. J. Microbiol. 47(2): 139-147
12. Kevin Vessey. J., G. N. Cheminingwa. 2005. The genetic diversity of *Rhizobium legominosarum* bv. Viciae in cultivated soil of the eastern Canadian prairie. Soil Boil. and Biochem. 99: 2312-2318.
13. Lakzian, A. and E. Bromfiled. 2004. The effect of trap host plants on the population diversity of *Bradyrhizobium japanicum*. Iranian J. Biotechnol. 2(2): 90-96

14. Lakzian, A. 1998. Diversity and metal tolerance of *Rhizobium legominosarum* bv. Viciae in soils cantominated whit heavy metals. PhD. Thesis, University of Landon.
15. Paffetti, D., F. Daguin, S. Fancelli, S. Gnocchi, F. Lippi, C. Sctti and M. Bazzicalupo. 1998. Influence of plant genotype on the selection of nodulation *Sinorhiobium meliloti* strain by *Medicago sativa.* Environ. Microbiol. 66(11): 4785-4789.
16. Palmer, K. M. and J. P. W. Young. 2000. Higher Diversity of *Rhizobium leguminosarum Biovar viciae* Populations in Arable Soils than in Grass Soils. Appl. Environ. Microbiol. 66 (6): 2445–2450.
17. Thies, J. E., E. M. Holmes and A. Vachot. 2001. Application of molecular techniques to studies in *Rhizobium* ecology: A review. Aust. J. Experim. Agric. 41: 299- 321.

J. Sci. & Technol. Agric. & Natur. Resour., Vol. 11, No. 42 (B), Winter 2008, Isf. Univ. Technol., Isf., Iran.

Study of Genetic Diversity of *Sinorhizobium* Bacteria Using PCR / RFLP 16S-23S rDNA Technique

E. Karimi[1], A. Lakzian[1]*, K. Khavazi[2], A. Asgharzadeh[2] and Gh. Haghani[1]

(Received : Aug. 14-2006 ; Accepted : Feb. 13-2007)

Abstract

It is important to investigate the genetic diversity and evaluate symbiotic effectiveness of the indigenous rhizobial population. It helps understand the responses of indigenous isolates to different rhizobial inoculants. In spite of the importance of bacterial diversity, there are a few scientific reports about it in Iranian soils. Genetic diversity of 150 isolates of *Sinorhizobium* isolated from Hamadan soils was studied by using PCR / RFLP 16S-23S rDNA technique. The results showed that all isolates clustered in three different groups. Group (I) formed 122 isolates and they were quite similar to *Sinorhizobium meliloti* from viewpoint of genetic characteristics. Twenty five isolates were clustered in Group (II) and they belonged to *Sinorhizobium medicae.* Group (III) had two isolates and they were new species and quite different from the other groups. Shannon diversity index was different within eleven different land units (Medium gradient mountains, Level lands, Plateau, Foot slopes, Depressions and Composite land) and there was a correlation between Shannon index and some soil properties. Difference in Similarity index showed that *Sinorhizobium* groups in each land unit were different

Keywords: Shannon diversity index, Similarity index, Land unit

1. Former MSc. Student, Assoc. Prof. and Prof. of Soil Sci., Respectively, College of Agric., Ferdowsi Univ., Mashhad, Iran.
2. Faculty Member of Soil and Water Res. Instit., Tehran, Iran.
* : Corresponding Author, Email: Alakzian@yahoo.com