خوشه‌بندی ژنتیکی گونه غالب باکتری‌های گره‌زای ریشه باقلا بر پایه ژن 16 rDNA و الگوی فنوتیپ آن‌ها

Clustering of the Dominant Broad-Bean Root Nodulating Bacteria Based on 16S rDNA and Their Phenotypic Pattern

نگار سراج‌زاده[۱] و غلام خداکرمیان[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۳۰

چکیده

باقلا یکی از مهم‌ترین بقولات دانه‌ای جهان است. شناسایی و خوشه‌بندی باکتری‌های همزیست با ریشه این گیاه برای استفاده زراعی و نیز تعیین جایگاه رده‌بندی باکتری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در بهار ۱۳۸۸ از ریشه باقلا در مزارع استان لرستان با حرکت زیگزاگی در قطر مزرعه به‌صورت تصادفی نمونه‌برداری شد. از گره‌های ریشه باقلا ۶۵ استرین باکتری روی محیط‌کشت YMA جدا شد که ۵۸ استرین گره‌زا بودند. ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های گره‌زا براساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی بررسی شد. نتایج نشان داد که باکتری‌های گره‌زای ریشه باقلا در استان لرستان وابسته به گونه‌های *Rhizobium leguminosarum* به‌عنوان گونه غالب و *R. etli* هستند. پس از استخراج DNA از استرین‌ها از پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن کدکننده 16SrDNA استفاده شد. توالی محصول PCR به‌دست آمده از یک استرین نماینده غالب تعیین و با بانک داده‌های سایت NCBI مقایسه شد. نتایج حاصل از مقایسه توالی نوکلئوتیدهای تکثیر شده ژن مزبور نشان داد که استرین NSZ3 شباهت بالایی به استرین *R. leguminosarum* bv. *viciae* strain BIHB 1157 دارد. خوشه‌بندی استرین‌های جدا شده بیانگر قرار گرفتن استرین NSZ3 در یک خوشه جداگانه ولی با شباهت بالا و درمیان استرین‌های متنوع شناسایی شده *R. leguminosarum* bv. *viciae* بود.

واژه‌های کلیدی: *Rhizobium leguminosarum*، *Rhizobium etli*، *R. leguminosarum* bv. *viciae*، بقولات

۱. دانشجوی سابق بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

۲. استاد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

*: نویسنده مسوول Email: khodakaramian@yahoo.com

مقدمه

حبوبات پس از غلات مهم‌ترین منبع غذایی بشر و باقلا از مهم-ترین بقولات دانه‌ای جهان محسوب می‌شود. باکتری‌های وابسته به خانواده‌های *Rhizobiaceae*، *Bradyrhizobiaceae* و *Phyllobacteriaceae* اصطلاحاً *Rhizobia* نامیده می‌شوند. این باکتری‌ها در ایجاد همزیستی برای تثبیت نیتروژن ملکولی با گیاهان خانواده لگومینوز حائز اهمیت زیادی است. *لیوشینا* (Lioshina, 2009). از زمانی‌که به اهمیت باکتری‌های همزیست ریشه در تثبیت ازت پی بردند همواره شناسایی، رده‌بندی و بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها مورد توجه قرار گرفته است. *سگویا* و همکاران (Segovia *et al.*, 1993) استرین‌های تیپ یک *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* آمریکا را به-عنوان گونه جدید *R. etli* نام‌گذاری کردند. پس از آن علاوه‌بر تعیین ویژگی‌های فنوتیپی از روش‌های مولکولی در شناسایی باکتری‌های گره‌زا به‌ویژه برای شناسایی سریع آن‌ها و پی بردن به تنوع ژنتیکی میان آن‌ها استفاده کردند. شمس‌الدین و همکاران برای تمایز و شناسایی *R. leguminosarum* bv. *viciae* و *Sinorhizobium meliloti* که روی ریشه باقلا گره ایجاد می‌نمودند از آنالیز ژن‌های گره‌زایی و ژن‌های rDNA و روش ARDRA استفاده کردند. با تلفیق روش‌های کلاسیک و مدرن و تعیین ویژگی‌های فنوتیپی و ژنتیکی *تیان* و همکاران (Tian *et al.*, 2008) یک گونه جدید به نام *Rhizobium fabae* از گره‌های ریشه باقلا جدا نمودند. به‌طورکلی باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و همزیست ریشه گیاهان تیره لگومینوزه و ازجمله باقلا دارای تنوع فنوتیپی، ژنتیکی و میزبانی هستند و بررسی‌های متعددی این پدیده را نشان داده است. *ون‌برکام* و همکاران، *ویر* و همکاران (Van Berkum *et al.*, 1995 and Weir *et al.*, 2004). استفاده از الگوی گره‌زایی، ایستادگی در برابر استرس، تکثیر ژن‌های گره‌زایی و بررسی الگوی RAPD-PCR و RFLP ژن‌های کدکننده 16SrRNA برای تعیین ژنوتیپ *R. leguminosarum* biovar *viciae* توسط *موشتی* و همکاران (Moschetti *et al.*, 2005) استفاده شده است. بررسی‌های *لاگور* و همکاران (Laguerre *et al.*, 2003) نشان داده که استرین‌های گره‌زای ریشه باقلا با این گیاه سازگاری بالایی داشته و این پدیده سبب می‌شود تا ازت بیشتری تثبیت شود. جداسازی *Rhizobia* به‌طور مستقیم از خاک یا ریزوسفر به خاطر جمعیت زیاد باکتری‌های خاکزی دشوار است. این باکتری‌ها اغلب از گره‌های ایجاد شده در ریشه گیاهان لگومینوز جداسازی می شوند. *جوسیک* و همکاران (Josic *et al.*, 2008). پس از فتوسنتز، تثبیت بیولوژیکی نیتروژن یعنی احیا نیتروژن مولکولی اتمسفر (N_2) به دو مولکول آمونیاک دومین فرایند بیولوژیکی با اهمیت روی کره زمین است. ثبیت بیولوژیکی ازت نقش اکولوژیکی مهمی در حفظ منابع کافی ازت در جهان داشته و در تعادل ازت کره زمین اهمیت اساسی دارد زیرا ازت تثبیت شده به‌طور مستمر در معرض از بین رفتن به وسیله دنیتریفیکاسیون و هم چنین آبشویی است. *پلانجنار* (Polanjnar, 2009). استفاده از کودهای بیولوژیک ریزوبیومی در تولیدات کشاورزی برای افزایش عملکرد گیاهان لگوم به‌دلیل مزایای اقتصادی و سلامت محیط‌زیست 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 در برگیرند و ثانیاً تثبیت بیولوژیکی نیتروژن را با راندامان بالایی انجام دهند. باکتری‌های ریزوبیوم گرم منفی، متحرک و متعلق به خانواده *Rhizobiaceae* هستند. آن‌ها کموارگانوتروف و هوازی بوده در حضور اکسیژن به‌خوبی رشد کرده و از قندها و آمینواسیدهای نسبتاً ساده استـــفاده می‌کنند. *راجاسونداری* و همکاران (Rajasundari *et al.*, 2009). حدود ۹۰ درصد از گیاهان لگومینـــوز قابلیت گـــره‌زایی دارند. *ال‌فیکی* (El-Fiki, 2006). تاکنون مطالعات اندکی برای شناسایی باکتری های همزیست در محیط‌های بومی انجام شده و اغلب بررسی‌های انجام شده بر مبنای آزمایشات گره‌زایی و شاخص‌های رشد بوده است. طی یک دهه اخیر اطلاعات بسیار ارزشمندی در نتیجه کاربرد مجموعه‌ای از روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR در خصوص طبقه‌بندی و ارتباط ژنتیکی ریزوبیوم‌ها حاصل شده است. *جوسیک* و همکاران (Josic *et al.*, 2008). استفاده از مارکرهای مولکولی به ویژه مارکرهای موجود در ریبونوکلئیک اسیدهای ریبوزومی، مطالعات دقیق فیلوژنی این باکتری‌ها را مقدور ساخته است. *لودویگ* و همکاران (Ludwig *et al.*, 1998). *کریمی* و همکاران (Karimi *et al.*, 2008) تنوع ژنتیکی استرین‌های *Sinorhizobium* از استان همدان را بررسی کردند و نشان دادند که این استرین‌ها سه گروه هستند که بیشتر آن-ها شبیه *S. meliloti* بودند. تعیین ویژگی‌های فنوتیپی، اهمیت زیادی برای شناسایی و گروه‌بندی استرین‌های باکتریایی دارند. مطالعات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، برای شناسایی باکتری‌ها و انتخاب استرین‌های سازگار با محیط استفاده می‌شوند و برای آنالیز تاکسونومی بهتر است همراه روش‌های مولکولی به‌کار گرفته شوند، *زاخیا و دلاجودی* (Zakhia and de Lajudie, 2001). ژن کدکننده 16S rRNA یکی از ژن‌هایی است که در مطالعات فیلوژنتیکی باکتری‌ها مورد استفاده فـــراوان دارد. از

آن‌جا که تاکنون بررسی جامعی در مورد شناسایی استرین‌های همزیست ریشه باقلا صورت نگرفته است، این بررسی برای تعیین ویژگی‌ها و گروه‌بندی ژنتیکی آن‌ها انجام شد تا در مدیریت تولید بهینه باقلا مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جداسازی، گره‌زایی و شناسایی استرین‌های باکتری:

در بهار ۱۳۸۸ از مزارع باقلا در استان لرستان، نمونه‌های گیاهی به‌صورت تصادفی و با حرکت در قطرهای مزارع گردآوری و به آزمایشگاه منتقل شد. هر نمونه شامل گیاه سالم و شاداب به‌همراه حدود ۱۰۰ گرم خاک فراریشه بود. از گره‌های روی ریشه و خاک اطراف آن برداشته و در هاون استریل حاوی چند سی‌سی آب‌مقطر استریل خرد شدند. سپس سوسپانسیون حاصل روی محیط‌کشت Yeast Malt Agar (YMA) با pH معادل هفت به‌صورت مخطط کشت شد. برای انتخاب بهتر ریزوبیوم به محیط‌کشت YMA مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر کنگورد یک درصد در لیتر اضافه شد. سپس تشتک‌های پتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از گذشت دو روز تک کلونی‌های لعابدار، شیری، شفاف و گردی که رنگ قرمز کنگورد را جذب نکرده بودند، جدا و تا خالص‌سازی کامل روی محیط مذکور مخطط شدند، *پریفر* و همکاران (Perifer *et al*., 2001). برای اطمینان از صحت جداسازی استرین‌های باکتری انتخاب شده، آزمون گره‌زایی انجام شد *تیان* و همکاران (Tian *et al*., 2007). تعداد ۲۵ استرین گره‌زا انتخاب و ویژگی‌های فنوتیپی آن‌ها بر پایه روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی تعیین شد *شاد* و همکاران (Shaad *et al*., 2001). آزمون اکسیداز به روش *کواکس* (Kovacs, 1956)، هوازی و بی‌هوازی به روش *هیو* و *لایفسن* - (Hugh and Leifson, 1953)، استفاده از کربوهیدرات‌ها، تحمل NaCl در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۵ درصد و آزمون توانایی استرین‌ها در هیدرولیز نشاسته به روش *شاد* و همکاران (2001)، تحمل pH ۴، ۶ و ۸/۵ *پریفر* و همکاران (2001)، رشد در ۴، ۱۰، ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، کانامایسین، نئومایسین، جنتامایسین، تتراسایکلین و نالیدیکسیک اسید به روش *آمارگر* و همکاران (Amarger *et al*., 1997) انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، DNA باکتری‌ها به‌روش *اوسبل* و همکاران (Ausubel *et al*., 2004) استخراج شد. از پرایمرهای fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد. شرایط این واکنش شامل یک دقیقه واسرشت در ۹۲ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه اتصال پرایمر در ۶۱ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه گسترش آغازگر در ۶۸ درجه سانتی‌گراد به تعداد ۳۵ چرخه بود. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر و غلظت مواد به‌کار رفته به‌صورت استاندارد بود. همچنین پرایمرهای atpD273F -5' (CTGGGSCGYATCMTGAACGT-3') و atpD771R (-5' GCCGACACTTCCGAACCNGCCTG-3') با شرایط: یک دقیقه واسرشت در ۹۲ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه اتصال پرایمر در ۵۸ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه گسترش آغازگر در ۶۸ درجه سانتی‌گراد به تعداد ۳۵ چرخه به‌کار رفتند. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر و غلظت مواد به‌کار رفته به‌صورت استاندارد بود. محصول تکثیر شده در ژل آگارز الکتروفورز و در اتیدیوم‌بروماید با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر رنگ‌آمیزی گردید و با دستگاه ژل داکیومنت از آن عکس‌برداری شد. باند به‌دست آمده از واکنش PCR با پرایمرهای fD1 و rD1 برای به‌دست آوردن توالی نوکلئوتیدهای سازنده آن به کشور کره جنوبی ارسال شد. درخت فیلوژنیک توالی نوکلئوتیدهای استرینNSZ3 باکتری *Rhizobium* گره‌زای ریشه باقلا با نرم‌افزار MEGA رسم شد.

نتایج و بحث

جداسازی، گره‌زایی و شناسایی استرین‌های باکتری:

از نمونه‌های ریشه باقلای جمع‌آوری شده ۶۵ استرین باکتری روی محیط YMA حاوی کنگورد جدا و خالص شد. استرین‌های جدا شده برای آزمون گره‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند. در آزمون گره‌زایی پس از شش هفته از رشد گیاه، ریشه‌ها جدا شده و وجود گره‌ها روی ریشه گیاهان تأیید و باکتری گره‌زا دوباره از آن‌ها جدا شد که با ویژگی‌های باکتری مایه‌کوبی شده مطابقت داشت. از استرین‌های مایه‌کوبی شده ۵۸ استرین گره‌زا بودند.

نتایج آزمون‌های فنوتیپی ۲۵ استرین باکتری گره‌زای ریشه باقلا در استان لرستان که از بین تمام استرین‌های جدا شده انتخاب شدند، در جدول یک نشان داده شده است.

جدول ۱: ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های باکتری‌های گره‌زای ریشه باقلا جدا شده از مزارع استان لرستان

Table 1: Phenotypic features of the *broad bean* root nodulating bacteria from Lorestan province farms

آزمون Test	*R. etli*	*R. leguminosarum*	آزمون Test	*R. etli*	*R. leguminosarum*
واکنش گرم Gram	–	–	آسپاراژین Asparagine	+	–
اکسیداز Oxidase	+	+	اال-پرولین L-Proline	V	–
هوازی/بی‌هوازی O/F	O	O	ال-تریپتوفان L-tryptophane	+	–
مانیتول Mannitol	V	+	ال- آرژنین L-Arginine	-	-
زایلوز Xylose	V	+	ال-سیستئین l-cystein	-	+
لاکتوز Lactose	V	+	ایزولوسین Isolusine	+	-
گلوکز Glucose	+	+	تولید ملانین از تیروزین Tyrosinase	V	+
دی-فروکتوز D-fructose	+	+	حساسیت به Sensitivity to:		
ریبوز Ribose	+	+	تتراسایکلین Tetracycline	+	+
سوربیتول Sorbitol	V	+	نالیدیک اسید Nalidixic acid	-	+
رافینوز Raffinose	–	+	اسپکتینومایسین Spectinomycin	-	+
گالاکتوز Galactose	+	+	کانامایسین Kanamycin	–	+
دولیسیتول Dulcitol	V	+	استرپتومایسین Streptomycin	-	+
مالتوز Maltose	–	+	نئومایسین Neomycin	-	-
آرابینوز Arabinose	+	+	جنتامایسین Gentamycin	-	+
ترهالوز Trehalose	V	+	نمک یک درصد NaCl 1%	+	-
سوربوز Sorbose	–	-	نمک ۲ درصد NaCl 2 %	+	–
رامنوز Rhamnose	–	–	pH 4	–	-
مزواریتریتول erythritol	–	+	pH 6	+	+
هیدرولیز نشاسته Starch hydrolysis	–	-	pH 8.5	+	+
سیترات Citrate	-	-	4°C	+	+
ا ال-آلانین L-Alanine	+	–	30°C	+	+
ا ال-سرین L-Serine	+	–	40°C	–	-
لاکتات Lactate	+	-			

+: ٪۸۰ یا بیشتر از ۸۰٪ استرین‌ها واکنش مثبت داشتند، –: ٪۸۰ یا بیشتر از ۸۰٪ استرین‌ها واکنش منفی داشتند، V: ۲۱ تا ٪۷۹ استرین‌ها مثبت

+ : 80% or more showed positive reaction -: 80% or more showed negative reaction, V: 21-79% showed positive reaction

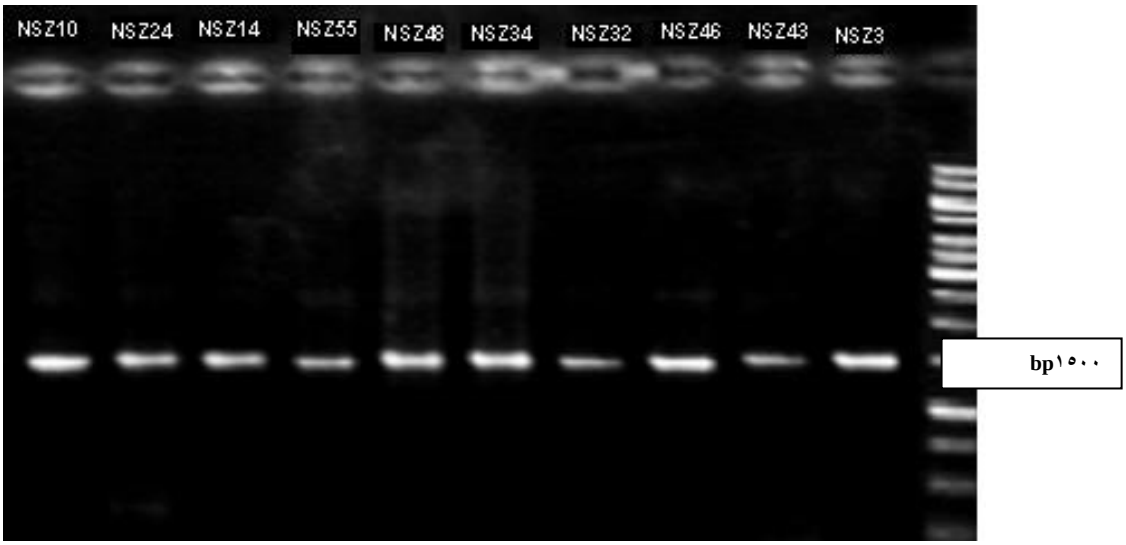
با توجه به آزمون‌های فنوتیپی استرین‌های باکتری‌های مورد بررسی در دو گروه قرار گرفتند. استرین‌های گروه نخست توانایی مصرف سیترات و تولید اسید از سوربوز را نداشتند اما تریپتوفان و تیروزین را مصرف نمودند. تمام استرین‌ها به تتراسایکلین حساس و نسبت به نالیدیکسیک‌اسید مقاوم بودند. بیشتر استرین‌های مورد بررسی به استرپتومایسین و کانامایسین و بعضی از آن‌ها به جنتامایسن و نئومایسین مقاوم بودند. بیشتر این استرین‌ها قادر به رشد در نمک طعام دو درصد و تعدادی نیز در نمک طعام سه درصد بودند. هیچ‌یک از استرین‌های باکتری‌های مورد آزمایش در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد رشد نکردند. این استرین‌ها pH قلیایی را به خوبی تحمل کردند اما در pH برابر چهار فقط تعداد کمی از آن‌ها

قادر به رشد بودند. با توجه به این ویژگی‌ها، این استرین‌ها به گونه *R. etli* نسبت داده شدند *سگوویا* و همکاران (Segovia *et al.*, 1993). پراکندگی این گونه در شرق استان بیشتر از مناطق غربی بود.

استرین‌های گروه دوم نیز قادر به تولید اسید از سوربوز و مصرف سیترات و ایزولوسین نبودند اما بیشتر آن‌ها مزواریتریتول را مورد استفاده قرار می‌دادند. تعداد کمی قادر به استفاده از لاکتات و تریپتوفان بودند. همه استرین‌های این گروه از ال- سیستئین استفاده کردند و به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک‌اسید، استرپتومایسین و تتراسایکلین، کانامایسین، جنتامایسین و نئومایسین حساس بودند. تعداد کمی قادر به رشد در pH، چهار بودند اما pH، هشت‌ونیم را بهتر تحمل نمودند. با توجه به صفت‌های ذکر شده، استرین‌های این گروه به گونه *R. leguminosarum* نسبت داده شدند *آمارگر* و همکاران (1997). بیشتر استرین‌های این گروه قادر به تولید ملانین از تیروزین بودند و از غرب استان لرستان جداسازی شدند. احتمالاً یک دلیل گره‌زایی باقلا توسط *R. etli* به‌دلیل کشت متناوب باقلا و لوبیا در مزارع نمونه‌برداری شده است و دلیل دوم می‌تواند انتقال پلاسمیدهای حاوی ژن‌های گره‌زا باقلا از *R. leguminosarum* به *R. etli* باشد. طبق گزارش *تیان* و همکاران (Tian *et al.*, 2000) و *شمس‌الدین* و همکاران (Shamseldin *et al.*, 2009) گونه *R. etli* در ریشه‌های باقلا توانایی گره‌زایی مؤثر داشته و ازت تثبیت می‌کنند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و رسم درخت فیلوژنی با مقایسه توالی ژن 16SrDNA

تکثیر ژن 16SrDNA به روش PCR با استفاده از پرایمرهای fD1 و rD1، منجر به تشکیل یک باند ۱/۵ کیلو جفت بازی در تمام استرین‌ها شد. باند مزبور که در مقابل ۱/۵ کیلو جفت باز مارکرهای مولکولی قرار داشت، در تمام استرین‌های هر دو گونه شناسایی شده وجود داشت. این یافته‌ها با نتایج *تیان* و همکاران (2008) *موشتی* و همکاران (2005) و *شمس‌الدین* و همکاران (2009) مطابقت دارد.



شکل ۱: باندهای حاصل از تکثیر ژن 16srDNA استرین‌های *Rhizobium*: گره‌زا ریشه باقلا جدا شده از مزارع استان لرستان

به ترتیب از چپ به راست: ده تک باند اول متعلق به استرین‌های باکتریایی و باند آخر مربوط به DNA size marker است

Fig. 1: the bands of replication of 16srDNA gene of *Rhizobium* strains nodulating *Faba Bean* roots isolated from Lorestan province farms

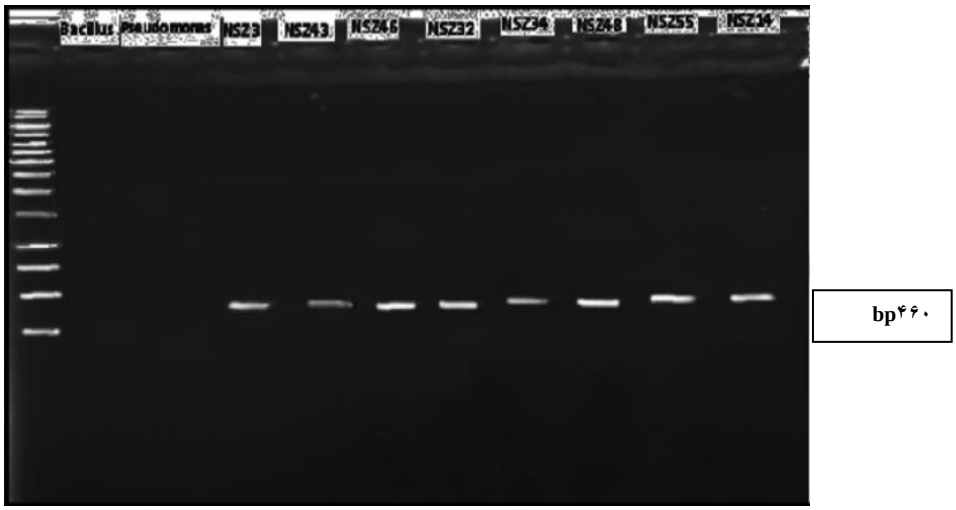
From left to right: first ten single bands are belong to Bacterial strains and the last band is belongs to DNA size marker

تکثیر ژن *atpD* باکتری *R. leguminosarum* به روش *PCR* با استفاده از پرایمرهای *atpD273F* و *atpD771R* موجب تشکیل تک باند ۴۶۰ کیلو بازی در تمام استرین‌های گره‌زای هر این گونه شد. تشکیل این باند با بررسی‌های *تیان* و همکاران (2008) *موشتی* و همکاران (2005) و شمس‌الدین و همکاران (2009) مطابقت دارد. ژن *atpD* یک ژن حفاظت شده است که زیرواحدهای بتای غشای دخیل در سنتز *ATP* را کد می‌کندکه برای تولید انرژی ضروری است *شمس‌الدین* و همکاران (*Shamseldin et al., 2009*).

پس از به‌دست آوردن توالی نوکلئوتیدهای ژن 16SrDNA تکثیر شده از استرین NSZ3، این توالی با بانک اطلاعاتی سایت NCBI به‌وسیله نرم‌افزار بلاست نوکلئوتید همتراز شدند. نتایج

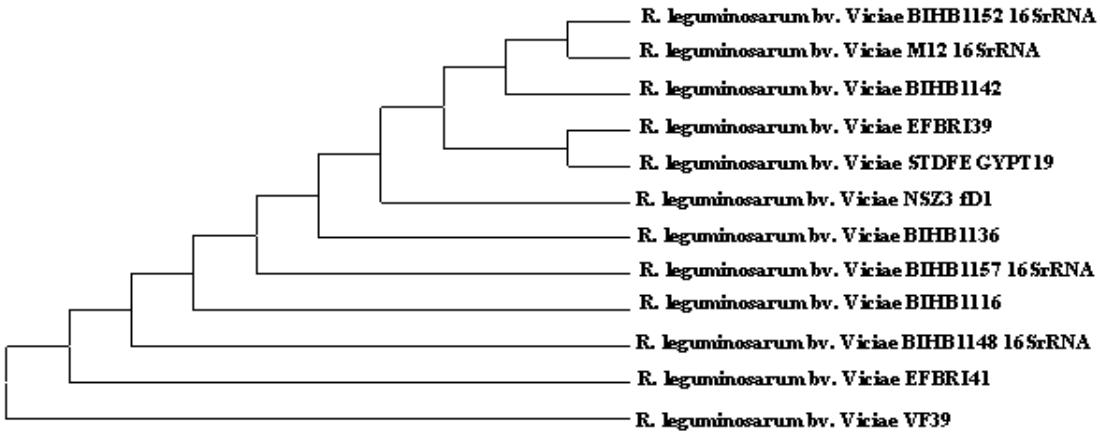
بلاست نشان داد که NSZ3 جدا شده از گره‌های ریشه گیاه باقلا از مزارع استان لرســـتان، به باکتری *leguminosarum R. bv. viciae* تعلق دارد که با نتایج *لاگور* و همکاران؛ *زاخیا* و همکاران و *شمس الدین* و همکاران (Laguerre *et al*., 2003، Zakia *et al*., 2001 و Shamseldin *et al*., 2009) مطابقت دارد . استرین مورد بررسی بیشترین شـــباهت را به باکتـری‌های *R. leguminosarum* bv. *viciae* strain BIHB 1157 16srRNA، *R. leguminosarum* bv. *viciae* strain BIHB 1152 16srRNA، *R. Legumionsarum* bv. *viciae* strain 1148 16srRNA، *R. leguminosarum* bv. *viciae* strain 1142 16srRNA نشان داد.

تیان و همکاران (2007) و *تیان* و همکاران (2008) براساس آنالیز سکونس ژن 16srRNA، استرین‌های جدا شده از گره‌های ریشه باقلا در کشور چین را به *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370 منتصب کردند. بررسی *شمس‌الدین* و همکاران (2009) به منظور تعیین دقیق موقعیت تاکسونومیکی استرین-های جداسازی شده از گیاه باقلا در مصر، نشان داد که از میان نه استرین توالی‌یابی شده، سه استرین به *R. leguminosarum* bv. *viciae* strain 3841، چهار استرین به *S. meliloti* و یک استرین به *R. etli* و یک استرین به *R. rubi* شباهت داشتند.



شکل ۲: باندهای حاصل از تکثیر ژن atpD استرین‌های *Rhizobium* گره‌زای ریشه باقلا جدا شده از مزارع استان لرستان
به‌ترتیب از چپ به راست: DNA size marker و استرین‌های باکتریایی

Fig. 2: the bands of replication of atpD gene of *Rhizobium* strains nodulating *Faba Bean* roots isolated from Lorestan province farms
from left to right: DNA size marker and bacterial strains



شکل ۳: درخت فیلوژنیک استرینNSZ3 باکتری *Rhizobium* گره‌زای ریشه باقلا جدا شده از مزارع استان لرستان رسم شده با نرم‌افزار MEGA

Fig. 3: phylogenetic tree of NS3 strains of *Rhizobium* bacteria nodulating *Faba bean* roots isolated from Lorestan province farms by MEGA software

همان‌گونه که در درخت فیلوژنی دیده می‌شود استرین NSZ3 همراه *R. leguminosarum* bv. *viciae* در یک گروه قرار دارد. توالی ژن‌های کدکننده RNA ریبوزومی در آنالیز روابط فیلوژنتیکی و شناسایی استرین‌هایب اکتریایی کاربرد دارد. آنالیز توالی این ژن می‌تواند به‌خوبی استرین‌های نادر و کمتر توصیف شده یا نامطمئن از لحاظ فنوتیپی را شناسایی و با سایر استرین‌های باکتریایی موجود در بانک داده‌های ژنتیکی مقایسه کند. امروزه توالی ژن 16SrDNA با بیش از ۱۰۰۰۰ توالی ثبت شده، بزرگ‌ترین بدنه اطلاعاتی برای بررسی روابط بین میکروارگانیسم‌هاست که همین تعداد زیاد از اطلاعات ثبت شده این ژن در مقایسه با ژن‌های دیگر ارجحیت انتخاب این ژن در تحقیقات را روشن می‌سازد. توالی‌های 16SrDNA در باکتری‌های حقیقی توالی‌های حفاظت شده‌ای هستند که آنالیز تغییرات ژنتیکی در این ناحیه برای تعیین تمایز در درون گونه-های ریزوبیوم مناسب نیست و بیشتر جهت شناسایی این باکتری‌ها مناسب است جوسیک و همکاران (Josic *et al.*, 2008).

از اوایل دهه۹۰، مقایسه توالی ژن 16SrDNA و روش‌های انگشت‌نگاری ژنتیکی براساس کاربرد *PCR* به‌طور گسترده‌ای برای شناسایی جنس *Rhizobium*ها به‌کار رفته است و با مقایسه توالی 16SrDNA این جنس به سه جنس *Azorhizobium*، *Rhizobium* و *Bradyrhizobium* تقسیم شده است و پس از آن جنس‌های *Mesorhizobium* و *Sinorhizobium* به آن‌ها افزوده شد.

براساس تاکسنومی رایج باکتری‌های گره‌زای ریشه، بیش از ۷۰ درصد همولوژی در *DNA-DNA* با ویژگی‌های فنوتیپی مجزا هماهنگی دارد و به‌عنوان یک معیار برای تعریف گونه‌ها درنظر گرفته می‌شود. در موارد معدود نیز استرین‌هایی با همولوژی کمتر (۶۰-۴۰ درصد) در یک گونه یافت می‌شوند. بهترین ژن‌هایی که ویژگی‌های کمتر تغییر یافته را دارا هستند، ژن‌های کدکننده *RNA*های ریبوزومی هستند و پروکاریوت‌ها سه نوع ژن کدکننده ریبوزومی دارند. ژن ۵*S* که دارای ۱۲۰ نوکلئوتید است و به فراوانی مطالعه شده است، اما برای استنتاج روابط فیلوژنتیکی در مقایسه با ژن ۲۳*S* و ژن ۱۶*S* که تعداد توالی‌های حفاظت شده مناسبی جهت مطالعه تنوع دارد، بسیار کوچک است. در میان دو ژن ۲۳*S* و ۱۶*S*، ژن ۲۳*S* به‌دلیل بزرگ‌تر بودن طول آن، امکان جهش و انعطاف‌پذیری بیشتری دارد و در نتیجه میزان اطمینان از اطلاعات حاصل از آن به اندازه اطلاعات ژن ۱۶*S* نیست. جهت طبقه‌بندی *Rhizobium*ها، مهم‌ترین منبع داده‌ها تعیین توالی ژن‌های *S* ۱۶*rRNA* یا زیرواحدهای کوچک *RNA* ریبوزومی است که به همین دلیل در این بررسی مورد استفاده قرار گرفته است.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۱۰-۱۱ متن انگلیسی مراجعه شود.