شناسائی جدایه های *Sinorhizobium meliloti* بومی بر اساس توالی 16SrRNA

هوشنگ خسروی[۱]، حسینعلی علیخانی[۲] و باقر یخچالی[۳]

۱- دانشجوی دکتری دانشکده مهندسی آب و خاک دانشگاه تهران.
۲- استادیار دانشکده مهندسی آب و خاک دانشگاه تهران.
۳- استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و دانشکده مهندسی آب و خاک دانشگاه تهران.

مقدمه

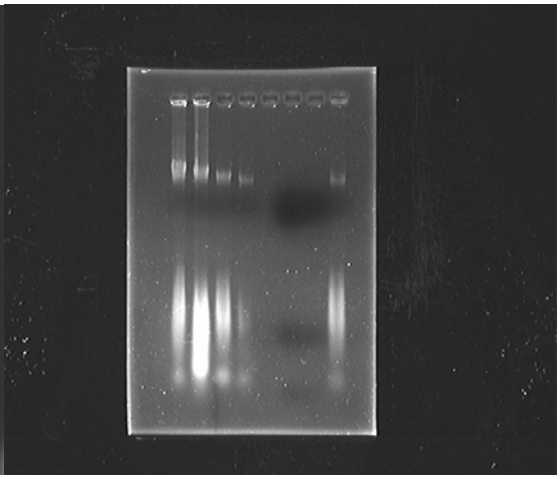
مقایسه توالی‌های rRNA ابزاری قوی برای روابط فیلوژنی و تکاملی در بین باکتریها، آرکئا و موجودات یوکاریوت است. این روش‌ها تأییدی مطمئن برای شناسایی باکتری‌ها تا سطح سویه می‌باشد. باکتری *Sinorhizobium meliloti* از نظر کشاورزی دارای اهمیت زیادی است زیرا این باکتری با یونجه که یکی از گیاهان علوفه‌ای مهم و منبع تغذیه دام‌ها ست رابطه همزیستی تثبیت کنندگی نیتروژن مولکولی هوا را دارد. بیش از ۶۰۰ هزار هکتار از مزارع ایران زیر کشت یونجه می‌باشند. در این تحقیق ۵ جدایه از باکتری *Sinorhizobium meliloti* بومی خاک‌های مناطق مختلف ایران از نظر توالی 16srRNA مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور با توجه به دشواری استخراج DNA از ریزوبیوم با استفاده از روش فنل کلروفرم اصلاح شده (Agrawal و همکاران،۲۰۰۶) از پنج جدایه DNA ژنومی استخراج شد(شکل ۱). DNA ژنومی با استفاده از PCR و پرایمرهای fD1 و rD1 (Weisburg و همکاران،۱۹۹۱) از نظر تکثیر توالی 16 srRNA مورد بررسی قرار گرفتند. شرایط PCR برای جدایه‌های مختلف در جدول ۱ آمده است. واکنش‌ها در حجم ۲۵ میکرولیترحاوی ۷۰mmol/lبافر PCR, ۲/۵ mmol/L از $MgCl_2$، ۲۰۰ mmol/L از هر $dNTP_s$ ، ۱µmol/L از هر پرایمر، حدود ۳۰ نانوگرم از DNA، و ۱/۵ واحد taq DNA پلیمراز در ۳۰ سیکل انجام شد.

Template (Isolate)	Initial denaturation (^{0}C)	Time min	Denaturation (^{0}C)	Time (min)	Annealing (^{0}C)	Time (min)	Extention (^{0}C)	Time (min)	Final extention (^{0}C)	Time ((min)
Sm27	۹۵	۵	۹۴	۱	۴۹	۱	۷۲	۲	۷۲	۱۰
Sm40	۹۵	۵	۹۴	۱	۵۲	۱	۷۲	۲	۷۲	۱۰
Sm45	۹۵	۵	۹۴	۱	۵۳	۱	۷۲	۲	۷۲	۱۰
Sm71	۹۵	۵	۹۴	۱	۵۴	۱	۷۲	۲	۷۲	۱۰
Sm95	۹۵	۵	۹۴	۱	۵۴	۱	۷۲	۲	۷۲	۱۰

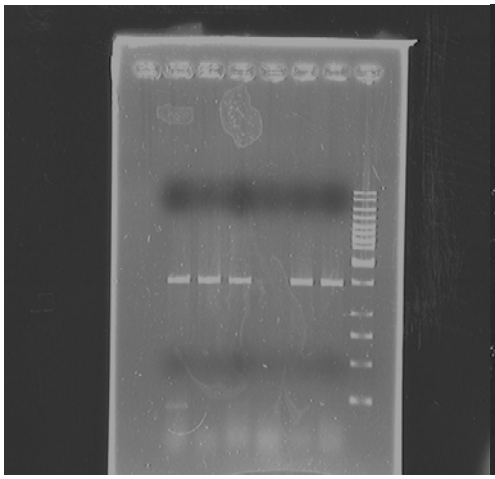
نتیجه حاصل از PCR بر روی ژل آگارز یک درصد در شکل ۲ نشان داده شده است. مارکر مورد استفاده Lader1kb بود. اندازه قطعات DNA حاصل (16SrRNA) حدود ۱/۵kb بودند. محصول PCR با استفاده از کیت خالص‌سازی شد. توالی‌یابی (Sequencing) نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی fD1 و rD1 انجام شد. با استفاده از برنامه BLAST بین باکتریهای مورد بررسی و باکتریهای موجود در Data bases نتایج زیر بدست آمد. جدایه Sm40 دارای۹۹٪ مشابهت با *Sinorhizobium sp* strain BK1 ، جدایه Sm27 دارای ۹۹٪ مشابهت با *Sinorhizobium sp*. CCBAU 83493 ، جدایه Sm45 دارای ۱۰۰٪ مشابهت با *Sinorhizobium meliloti* isolate RPA13 ، جدایه Sm71 دارای ۱۰۰٪ مشابهت با *Sinorhizobium sp*., strain BK1، جدایه Sm95 دارای ۹۹٪ مشابهت با *Sinorhizobium meliloti* strain S33. بود.

بر اساس نتایج بدست آمده سویه‌های بومی شناسایی و به طریق زیر نامگذاری شدند.SmKYA27، SmKYA40 SmKYA71,SmKYA45, SmKYA95.

نتایج بدست آمده حکایت از این دارد که روش plant infection test که برای شناسایی باکتری‌های ریزوبیوم بکار می‌رود اگر با دقت انجام شود روش مطمئنی است و با روش‌های ژنتیکی مطابقت دارد با اینحال روش تشخیص ژنتیکی سریعتر، ارزان‌تر و مطمئن‌تر است.



شکل ۱- استخراج DNA



شکل ۲- نتایج 16 srRNA

منابع

[1] Agraval, R., S. Bajoria.2006. DNA isolation from Rhizobium by phenol chloroform M. protocol online.htttp://www.protocol-online,org.

[2] Bradic M., S. Sikora, S. Rudzepovic and Z. Stafa.2003. Genetic Identification and Symbiotic Efficiecy of an Indigenous Sinorhizobium meliloti Field Population.Food Technol. Biotechnol. 41: 69-75

[3] Weisburg William G., Susan M. Barns, Dale A. Pelletier and David Gene-Trak System.1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic. J.Bacteriology, p. 697-703.