# بررسی چند روش ژنتیکی جهت تفکیک سویه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی (Sinorhizobium meliloti)

کاظم خاورزی[۱]

یونجه یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای است که حدود ششصدهزار هکتار از اراضی زراعی کشور را به خود اختصاص می‌دهد. این گیاه که از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی ایران محسوب می‌شود، قادر است در شرایط مطلوب و در حضور باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی مقدار زیادی از ازت مولکولی را تثبیت نماید. یکی از اساسی‌ترین مراحل مطالعات تثبیت ازت مولکولی و همچنین تولید مایه تلقیح‌های ریزوبیومی، جمع‌آوری و تفکیک سویه‌های جداسازی شده می‌باشد. برای تفکیک سویه‌های ریزوبیومی از روش‌های آنتی‌بیوتیکی، سرولوژیکی، ریزوبیوفاژ و ژنتیکی استفاده می‌شود که روش اخیر از دقت و کارآیی بیشتری نسبت به سایر روش‌ها برخوردار می‌باشد. در این تحقیق، مجموعاً یازده سویه مورد بررسی قرار گرفت که سویه‌های ۲S، ۱۱S، ۱۲S، ۲۰ S، ۲۱ S و ۲۹ S از گیاه Medicago sativa و سویه‌های ۵T، ۹T، ۱۳T، ۱۸T و ۱۹T از Medicago trancatula جدا شده بودند. همچنین سویه‌های Rm۲۰۱۱ و MvII به ترتیب به عنوان سویه بدون پلاسمید Cryptic و دارای پلاسمیدهای مشخص از نظر وزن مولکولی، در سر تا سر آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. بطور کلی برای تفکیک سویه‌های مذکور از تکنیک‌های Plasmid profile Analysis (PPA) ، Restriction Fragment length polymorphism (RFLP) و Polymerase chain reaction (PCR) استفاده شد.

برای تجزیه پروفیل پلاسمید سویه‌ها از روش اکهارت (Eckhardt) استفاده شد. نتایج این تجزیه نشان داد که کلیه باکتری‌های مورد آزمایش علاوه بر مگاپلاسمیدهای شماره یک و دو، دارای پلاسمیدهای کریپتیک مختلفی می‌باشند، بطوری که تعداد و وزن مولکولی آنها معیار خوبی برای تفکیک سویه‌ها می‌باشد. به عنوان مثال سویه‌های ۱۲S، ۱۸T و ۲۰S فقط دارای یک پلاسمید کریپتیک بودند، سویهٔ ۲ S پلاسمید کریپتیک نداشت و بقیه سویه‌های مورد آزمایش دارای دوپلاسمید کریپتیک با وزن مولکولی مختلف بودند. محدوده وزن مولکولی پلاسمید کریپتیک سویه‌ها، ۹۵ تا بیش از ۸۰۰ کیلو بیس (Kb) بود.

برای تفکیک سویه‌های مذکور با استفاده از روش RFLP ، ابتدا کل ژنوم باکتریها استخراج و پس از حصول اطمینان از خلوص و همچنین غلظت DNA ، ژنوم باکتری با استفاده از آنزیم ECORI برش داده شد و سپس الکتروفورز شد. آنگاه ژل مذکور با استفاده از روش Vacuum Southern Blotthing به فیلترهای مخصوص انتقال داده شد. پروب‌های (probes) مورد استفاده برای DNA Hybridization

---

[۱] عضو هیأت علمی و سرپرست بخش تحقیقات بیولوژی خاک مؤسسه تحقیقات خاک و آب

شامل، پروب Leu (قطعه‌ای حاوی ژن‌های ساخت لوسین با وزن مولکولی ۴/۴ کیلوبیس که توسط آنزیم ECORI از کروموزم سینوریزوبیوم ملیلوتی بریده شده و بر روی پلاسمید psup قرار گرفته بود)، پروب Rec A (قطعه‌ای از ژن Rec A سینوریزوبیوم ملیلوتی که با PCR تکثیر یافته بود)، پروب nod D مگاپلاسمید شماره یک سینوریزوبیوم ملیلوتی که با PCR تکثیر یافته بود) و پروب EXP-Cluster (پنج قطعه از مگاپلاسمید شماره دو سینوریزوبیوم ملیلوتی که حاوی ژن‌های ساخت LPS بوده و در پلاسمیدهای puX21 و pk18mob کلون شده بودند) بودند. برای نشان‌دار کردن DNA نیز از روش غیر رادیواکتیو DIG استفاده شد. همچنین در مطالعات هیبریداسیون DNA ، برای تخمین وزن مولکولی قطعات از λ Hind III به عنوان استاندارد استفاده شد. نتایج آزمایشات RFLP نشان داد که هیبریداسیون DNA با پروب‌های Leu ، Rec A ، Exp-cluster و nod D سویه‌های مورد آزمایش را به ترتیب به یک، دو، سه و یازده گروه تفکیک نمودند. برای آزمایش PCR نیز از توالی ۲۲ تا ۴۱ و همچنین ۱۰۲۵ تا ۱۰۴۴ ژن nod H سینوریزوبیوم ملیلوتی به ترتیب به عنوان پرایمر (Primer) یک و دو استفاده شد. نتایج آزمایش PCR نشان داد که nod H برای تفکیک سویه‌های مذکور مناسب نبوده و همه آنها را در یک گروه قرار می‌دهد در مجموع تجزیه پروفیل پلاسمید به عنوان بهترین و سریعترین روش تفکیک سویه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی توصیه می‌گردد.