

گروه بندی ژنتیکی برخی از سویه های ریزوبیومی بومی خاکهای ایران با استفاده از تکنیک های 16S-23S IGS PCR-RFLP و پروفیل پلاسمیدی

حسینعلی علیخانی^{1*}، باقر یخچالی و هانی آنتوان

استادیار گروه علوم خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران؛ Haalikani@yahoo.com

استادیار مرکز تحقیقات ملی ژنتیک و فن آوری های زیستی؛ Byakhchali@yahoo.com

استاد دانشگاه لاوال کانادا؛ Hantoun@ulaval.ca

چکیده

در بین پروکاریوتها مجموعه ای از باکتریهای خاکزی که اصطلاحاً ریزوبیا نامیده می شوند به لحاظ توانایی در ایجاد سیستم همزیستی تثبیت کننده نیتروژن مولکولی با گیاهان خانواده لگوم حائز اهمیت فراوانی می باشند. توالی بین دو قطعه 16S و 23S از مجموعه ژن های rDNA که اصطلاحاً 16S-23S IGS نامیده می شود از نظر اندازه و ترتیب نوکلوتیدها بسیار متفاوت بوده و ابزار مفیدی برای گروه بندی سویه های ریزوبیومی می باشد. در این مطالعه تعداد 52 سویه برتر ریزوبیومی که بعنوان عوامل محرک رشد گیاه (PGPR) شناخته شده اند، به طریق 16S-23S IGS PCR-RFLP و پروفیل پلاسمیدی (روش اکهارت) وبا استفاده از نرم افزار phylyp version 3.6a3 گروه بندی شده اند. نتایج حاصله نشان می دهد که IGS سویه های ریزوبیومی مورد مطالعه از نظر اندازه بسیار متنوع (bp 600-1486) می باشند بعلاوه تعداد نسخه های IGS سویه های مختلف نیز یکسان نبوده واز یک تا سه نسخه متفاوت می باشد. براساس روش 16S-23S IGS PCR-RFLP مجموع 52 سویه ریزوبیومی در 46 گروه مختلف قرار گرفته که افراد 11 گروه دارای 70% تشابه بین سویه ای می باشند. با استفاده از این روش بجز 12 سویه 54Bj و 53Bj و همچنین سویه های 28Rlv و 27Rlv، سویه های 24Rlv و 23Rlv، سویه های 17Rlp و 16Rlp همینطور سویه های 13Sm و 12Sm و 11Sm و 10Sm، مابقی سویه ها (77%) را کاملاً از یکدیگر تفکیک کرده است. بنابراین روش مذکور بدلیل سادگی و نیازهای اندک آزمایشگاهی (نسبت به سایر روش های مولکولی) بر ارضی قابل انجام بوده و از کارآمدی و اطمینان بالایی نیز برخوردار است. گروه بندی مبتنی بر پروفیل پلاسمیدی سویه های مختلف ریزوبیومی مورد استفاده در این تحقیق تا حدودی با نتایج حاصل از روش IGS PCR-RFLP هماهنگی دارد، به طور مثال سویه های 54Bj و 53Bj، سویه های 24Rlv و 23Rlv، همچنین سویه های 17Rlp و 16Rlp و سویه های 13Sm و 12Sm و 11Sm در هر دو روش بصورت کاملاً مشابه در کنار یکدیگر و درون گروه های کلاستری جداگانه ای قرار گرفته اند.

واژه های کلیدی: سویه های ریزوبیومی، 16S-23S IGS PCR-RFLP، پروفیل پلاسمیدی، گروه بندی ژنتیکی

مقدمه

اکوسیستم ها گردیده است de Oliveria و همکاران (1999). معهذ این وضعیت رکود در نتیجه دستیابی محققین به تکنیک های متفاوتی از جمله TPF و

در سالهای گذشته فقدان اطلاعات قوی ریخت شناسی حاصل از مطالعه جوامع پیچیده پروکاریوتها مانع از شناخت دقیق ساختار جوامع میکروبی در اغلب

1- نویسنده مسئول، آدرس: کرج، چهار راه دانشکده، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه علوم خاک دانشکده مهندسی آب و خاک.

* دریافت: 83/2/9 و پذیرش: 85/9/1

ژن های 16S و 23S که اصطلاحاً 16S-23S IGS نامیده می شود مشکل مذکور را به طور قابل ملاحظه ای کاهش داده است Martinez و همکاران (1999) ، Normand و همکاران (1996).

Gurtler و Stanisch (1996) گزارش نمودند که منطقه 16S-23S IGS از نظر طول قطعه و توالی آن حتی در بین گروه های تاکسونمیک با قرابت زیاد متفاوت است. Kostman و همکاران (1992) این تعداد را از 1 تا 11 عدد گزارش کرده اند. لذا به عقیده بسیاری از محققین از جمله Bourcier و همکاران (2000)، Martinez و همکاران (1999)، Quatrini و همکاران مطالعه طول و ترکیب توالی نوکلئوتیدهای این قطعه، ابزار بسیار مفیدی برای مطالعه تغییرات زیستی و یا گروه بندی پروکاریوتها می باشد. Roth و همکاران (1998) مشاهده نمودند که در اغلب باکتریها بجز اندکی استثناء ترتیب مکانی زیر واحدهای rRNA به صورت 16S-23S-5S می باشد.

Martinez و همکاران (1999) و نیز Normand و همکاران (1996) نشان دادند که این اختلاف طول IGS اساساً ناشی از وجود واحدهای عمل کننده¹ متعددی است که در این قطعات قرار گرفته اند. از جمله این واحدها می توان ژن های tRNA مختلف را نام برد که در اغلب باکتریهای مطالعه شده به تعداد یک یا دو نسخه در هر IGS قرار دارند. Squires و Condon (1995) نشان داده اند که حذف این قسمت از IGS در باکتریهای جهش داده شده مانعی برای رشد باکتری ایجاد نکرده است.

Bourcier و همکاران (2000) همچنین Somasegaran و Hoben (1994) ثابت کردند که مگاپلاسمیدها معمولاً حاوی ژن های گره زایی (nod) ، ژن های لازم برای انتخاب گیاه میزبان خاص (hsn) و ژن های لازم برای فرایند تثبیت ازت مولکولی (nif) می باشند. لذا اصطلاحاً پلاسمیدهای سمبیوتیک (یا سیمپلاسمید) و بطور اختصار pSym نامیده می شوند. Chen و Kuo (1994) همچنین Somasegaran و Hoben (1994) و نیز Nour و همکاران (1994 a,b) نشان دادند که ممکن است در برخی از سویه های ریزوبیومی حدود 25 تا 50 درصد از DNA سلول باکتری بصورت مگاپلاسمید باشد. Martinez - Romero و Caballero-Mellado (1996) گزارش دادند که انتقال مگاپلاسمیدها نقش بسیار مهمی در تغییرات ژنتیکی و تکامل باکتریهای ریزوبیومی دارد. همچنین Guo و همکاران (1999)، Laguerre و همکاران، Somasegaran و Hoben (1994) ثابت کردند که می توان ریزوبیوم های

PCR RAPD و rep-PCR و... که همگی مبتنی بر PCR می باشند تا حدودی مرتفع گردیده است. Kostman و همکاران (1992)، Laguerre و همکاران (1996)، Normand، و همکاران (1996) تکنیک های مولکولی اخیر از طریق تکثیر و دست ورزی ژن های باکتریایی مطالعه پروکاریوتها را به طور مستقیم و در بسیاری از موارد بدون نیاز به مراحل کشت و خالص سازی آنها امکان پذیر ساخته است. Bourcier و همکاران (2000) همچنین Wernegreen و همکاران (1997) ثابت کردند که در بین پروکاریوتها مجموعه ای از باکتریهای خاکزی که اصطلاحاً ریزوبیوا نامیده می شوند به لحاظ توانایی در ایجاد سیستم همزیستی تثبیت کننده نیتروژن ملکولی با گیاهان خانواده لگومینوز حائز اهمیت فوق العاده ای می باشند. به عقیده Laguerre و همکاران (1996)، Perret و Broughton (1998) و Jensen و همکاران (1993) طی یک دهه اخیر اطلاعات بسیار ارزشمندی در نتیجه کاربرد مجموعه ای از روشهای مولکولی مبتنی بر PCR در خصوص طبقه بندی و ارتباط ژنتیکی باکتریهای ریزوبیوا حاصل شده است. Wernegreen و همکاران (1997) گزارش کردند که براساس مطالعه توالی ژن های rDNA 16S که در سالهای اخیر مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است، باکتریهای ریزوبیوا یک مجموعه پلی فلیتیک می باشند.

ژن rDNA 16S یکی از ژن های بسیار متداول و مورد استفاده در مطالعات فیلوژنتیکی باکتریها می باشد. این ژن از نظر ساختمانی شامل بخشهای فوق العاده محافظت شده ای می باشد که بصورت مناطق موزائیکی در بین قطعات غیر حفاظتی (متغیر) قرار گرفته است. این مناطق حفاظت شده خصوصاً در تعیین میزان قرابت ژنتیکی و طبقه بندی پروکاریوتها حائز اهمیت فوق العاده زیاد می باشد. طول توالی های موجود در 16S بسیار ثابت می باشد، Rainey و همکاران (1996) کل اختلاف در قطعه 1550 جفت بازی ملکول 16S باکتری *Clostridium paradoxum* را در حدود 200 جفت باز گزارش نموده اند، لذا امکان تفکیک و تمایز اختلافات ژنی براساس اندازه ملکول 16S به راحتی امکان پذیر نمی باشد. بعلاوه Martinez و همکاران (1999) نشان دادند علیرغم اینکه آن بخش از توالی نوکلئوتیدها در مولکول 16S که بسیار متغیر می باشد و می تواند اطلاعات بسیار مفیدی برای مطالعه ارتباط بین پروکاریوتها فراهم سازد، اما این مقدار تغییرات برای تفکیک پروکاریوت هایی با قرابت زیاد به طور مثال گونه های درون یک جنس کافی نمی باشد. ولی برخلاف ملکول 16S، استفاده از توالی بین

اندازه دو برابر حجم آن، به مدت 24 ساعت در دمای °C 20- نگهداری شدند. لوله های مذکور در دمای °C 4 و به مدت 30 دقیقه در 12000 rpm سانتریفیوژ و محلول رویی خارج گردید. DNA رسوب دو نوبت با اتانول 70% شستشو و نهایتاً توسط دستگاه خشک کننده سانتریفیوژی (speed -vac) خشکانیده شد. نهایتاً DNA حاصله در 50 میکرولیتر بافر TE 1X به آرامی حل شد. صحت DNA استخراج شده از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگاروز 0/7 درصد بررسی و برای استفاده در مراحل بعدی تحقیق در دمای °C 20- نگهداری گردید.

2- تکثیر قطعه 16S-23S IGS توسط PCR

برای تکثیر قطعه 16S-23S IGS از دو پرایمر پیش رونده¹ FGPS1490 (TGCGGCTGGATCACCTCCTT) و پس رونده² FGPS32/ (CCGGGTTTCCCCATTCGG) استفاده شده است (2). پرایمر اول از قسمت انتهایی (3) قطعه 16S و پرایمر دوم از قسمت ابتدایی (5) قطعه 23S طراحی شده است. عمل PCR در حجم نهایی 50 میکرولیتر شامل مقادیر: 1 μl از نمونه DNA، 1 μl از هر کدام از پرایمرهای پیش رونده و پس رونده (5 μM) 8 μl مخلوط dNTPs (1250 μM)، 5 μl بافر PCR 10X، 1/5 μl از محلول 1/5 U (50 mM) MgCl₂ آنزیم DNA Tag polymerase (5u/μl) و بعلاوه 33/5 ml آب دوبار تقطیر فاقد یون توسط دستگاه ترموسایکلر مدل ERKIN P ELMER CETUS 480 با پریود دمایی: 5 دقیقه °C 95 و سپس طی 35 سیکل متوالی شامل: 1 دقیقه °C 95، 1 دقیقه °C 56 و 2 دقیقه °C 72 انجام پذیرفت.

برای بررسی صحت انجام فرایند PCR مقدار 5 μl از هر نمونه توسط ژل آگاروز 0/7 درصد به مدت یک ساعت در 50 ولت الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی ژل به مدت 30 دقیقه در محلول رنگی اتیدیوم بروماید (1 μg/ml) و سپس رنگ بری آن در آب مقطر انجام و ژل مذکور تحت تابش نور ماوراء بنفش در طول موج 312 نانومتر بررسی و تصویربرداری شد.

محصول نهایی PCR با استفاده از کیت QIAquickR spin خالص سازی شده و برای استفاده در مراحل بعدی تحقیق در دمای °C 20- نگهداری گردید.

غیر همزیست را از خاک جدا و پس از وارد نمودن مجدد سیمپلاسمید به درون سلول باکتری بار دیگر توان برقراری هم زیستی با گیاه لگوم را ایجاد نمود.

Wernegreen و همکاران (1997) گزارش کردند که فعالیتهای انسانی در سطح مزرعه ممکن است موجب افزایش انتقال مگاپلاسمیدها بین جمعیتهای ریزوبیومی خاک گردد. گزارش Guo و همکاران (1999)، همچنین Tan و همکاران (2001)، Pisabarro و همکاران (1998) تأییدی مجدد بر فرضیه ی نقش انتقال سیمپلاسمیدها در فرایند تکاملی ریزوبیوم ها می باشد. Kuo و Chen (1994) همچنین Somasegaran و Hoben (1994) نشان دادند که تعداد و اندازه مگاپلاسمیدهای سویه های ریزوبیومی را می توان بعنوان روشی برای گروه بندی سویه های ریزوبیومی مورد استفاده قرار داد. روش مذکور اصطلاحاً تهیه پروفیل پلاسمیدی نامیده می شود و اغلب بر پایه روش Eckhardt (1978) انجام می پذیرد.

مواد و روش ها

1- سویه های باکتری، شرایط کشت و استخراج DNA

در این تحقیق از تعداد 52 سویه ریزوبیومی متعلق به 4 جنس سینوریزوبیوم، برادی ریزوبیوم، ریزوبیوم و مزوریزوبیوم استفاده شده است. تکثیر ایزوله های ریزوبیومی بر روی محیط کشت مایع TY در دمای °C 28 و بر روی شیکر دورانی در 120rpm انجام پذیرفته است. استخراج DNA ژنومی مطابق روش پیشنهادی چن و کاو (1993) به شرح زیر انجام شده است.

ابتدا 1/5ml از کشت باکتری با دانسیته نوری 0/5 (OD_{620nm}) به مدت سه دقیقه در 12000rpm سانتریفیوژ شد. به رسوب باکتری در ته لوله های اپندروف مقدار 200 میکرولیتر از بافرلیزکننده: 40 mM Tris-acetate pH 7.8, 20 mM sodium- acetate, 1 mM EDTA, 1% SDS اضافه و با پی پت کردن های متوالی مجدداً سوسپانسیون یکنواختی حاصل گردید. به منظور حذف پروتئین ولاشه باکتری ها، مقدار 66 میکرولیتر محلول 5M NaCl افزوده شد و به خوبی مخلوط گردید. مخلوط حاصل بمدت 10 دقیقه در دمای °C 4 در 12000rpm سانتریفیوژ شد و آنگاه بخش شفاف رویی به لوله اپندروف استریل دیگری منتقل و هم حجم آن کلروفرم اضافه گردید. لوله های اخیر حداقل 50 مرتبه تکان داده شدند تا مخلوطی کاملاً شیری رنگ حاصل گردد. محتویات لوله های اپندروف بمدت 3 دقیقه در 12000rpm سانتریفیوژ شده و مجدداً بخش شفاف هر لوله به لوله اپندروف دیگری منتقل و پس از افزودن اتانول 100% به

1 - Forward

2- Reverse

0/8 درصد که قبلاً درون هر کدام از چاهکهای آن 25 µl از محلول xylene cyanol FF (1mg/ml) + SDS 10% قرار گرفته و به سمت بالای چاهکها حرکت داده شده بودند قرار گرفت. الکتروفورز در دو مرحله؛ اول - به مدت نیم ساعت در 40 ولت و سپس 12 ساعت در 100 ولت درون سردخانه (4°C) انجام شد. ژل های مذکور پس از رنگ آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید، توسط نور UV مورد بررسی و تصویربرداری قرار گرفتند (شکل شماره 3).

نتایج و بحث

1- آنالیز IGS PCR-RFLP

الف- اندازه و تعداد قطعات IGS تکثیر شده بوسیله PCR

آزمون انجام شده برای انتخاب مناسب ترین آنزیم برای برش قطعات IGS باکتریهای ریزوبیومی نشان داد که تعداد 6 آنزیم از مجموع 8 آنزیم مورد استفاده دارای بیشترین کارایی در برش قطعات IGS می باشند که بر حسب کارایی آنها در دو گروه قرار گرفتند. سری اول (شامل آنزیم های *Hae III*, *HhaI*, *Hinf I*) که کارایی نسبتاً بیشتری داشتند و آنزیم های سری دوم (شامل *RsaI*, *DdeI*, *AluI*) که کارایی نسبتاً کمتری از خود نشان دادند.

اندازه ی طول قطعه (ها)ی IGS 16S-23S در سویه های مختلف ریزوبیومی از دوطریق؛ اندازه گیری مستقیم قطعات IGS PCR قبل از برش آنزیمی و مجموع اندازه ی قطعات DNA حاصل از برش آنزیمی قطعه IGS PCR توسط آنزیم های سه گانه سری اول (*HhaI*, *HinfI*) و (*HaeIII*) در مقایسه با مارکر اندازه مولکولی DNA (in vitro, 100bp) تخمین زده شد. نتایج حاصل نشان می دهد که طول قطعه ی IGS سویه های ریزوبیومی بسیار متفاوت و از 600 bp (سویه *Rlp* 21) تا 1486 bp (سویه های (*Rlp* 19, *Rlt* 34 و *Rlt* 36) تغییر می کند. جنس و همکاران (1993)، نورمند و همکاران (1996) همچنین کاترینی و همکاران (2002) نیز طول قطعه -16S IGS 23S سویه های ریزوبیومی را در مقایسه با دیگر باکتریهای خاکزی بسیار متفاوت و بزرگتر گزارش کرده اند (8, 15, 20). بطور مثال کاترینی و همکاران (2002) طول قطعه IGS 16S-23S را در باکتریهای جنس برادی ریزوبیوم حدود 800bp، جنس مزوریزوبیوم 800-900bp، گونه ریزوبیوم لگو مینوزاروم حدود 1100bp و در جنس سینوریزوبیوم 1100-1300bp گزارش کرده اند (20). جدول شماره 1 اندازه قطعه (ها)ی IGS سویه های مختلف را نشان می دهد. تفاوت در اندازه ی قطعات IGS را می توان عمدتاً مربوط به تعداد و نوع ژن های tRNA موجود در مناطق IGS دانست (I, 13). گو و همکاران

3- برش آنزیمی محصولات IGS PCR و آنالیز IGS PCR-RFLP

تعیین اندازه و مقایسه طول قطعات IGS PCR سویه های ریزوبیومی، با برداشت 5µl از محصول نهایی PCR هر نمونه و انجام عمل الکتروفورز بر روی ژل آگاروز 2% به کمک مارکر 100 bp انجام پذیرفته است. آزمون تناسب آنزیم¹ برای انتخاب مناسب ترین آنزیم اندونوکلاز برای برش قطعات IGSPCR با استفاده از 8 آنزیم مختلف (*HaeIII*, *Dde I*, *cfol*, *RsaI*, *AluI*, *Hinf I*, *HhaI*, *MspI*) انجام و از بین آنها 6 آنزیم (*HhaI*, *HaeIII*, *RsaI*, *DdeI*, *AluI*, *HinfI*) برای تهیه الگوی برش قطعات IGS انتخاب گردید. واکنش برش آنزیمی درون لوله های اپندروف استریل حاوی 7 µl از نمونه DNA، 2µl بافر آنزیم مربوطه، 1 U آنزیم اندونوکلاز و 10µl آب مقطر دوبار تقطیر در حجم نهایی 20 µl به مدت 30 دقیقه دردمای 37°C انجام شده است. نمونه های IGS برش داده شده توسط هر آنزیم بر روی ژل آگاروز 3% بمدت 6 ساعت در 70 ولت الکتروز شده است هر ژل، پس از رنگ آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید (1µg/ml) و نیز رنگ بری با آب مقطر، در طول موج 312 nm تصویربرداری شد (شکل شماره 2). برای گروه بندی سویه های ریزوبیومی براساس IGS PCR-RFLP و نیز پروفیل پلاسمیدی از نرم افزار Phylip version 3.6a3 استفاده شده است.

4- استخراج پلاسمید

تهیه پلاسمید سویه های ریزوبیومی به روش اکهارت (با اصلاحات جزئی) و لیز سلولی درون چاهکهای ژل² آگاروز 0/8 درصد انجام شد (5). در این روش 1/5 اکشت ریزوبیومی (رشد یافته بر روی محیط کشت TY) با دانسیته نوری OD_{620nm} 0/2 در دور 13000 rpm به مدت 5 دقیقه رسوب داده شد. رسوب باکتری ریزوبیومی طی دو مرحله، اول توسط 500 µl آب مقطر استریل و سپس محلول 0/3 درصد سدیم سارکوزینات شستشو داده شد. به لوله اپندروف حاوی سلولهای ریزوبیوم مقدار 40 µl محلول TE10mM+2%FiCoII اضافه گردید. لوله های اپندروف مذکور به مدت 15 دقیقه بر روی یخ نگهداری و سپس مقدار 10 µl از محلول لیز کننده: [TE(10mM)+RNAs A(0.4mg/ml) +lysosyme] + [Bromophenol Red (1mg/ml)] (1mg/ml) به هر لوله افزوده و آنگاه تمامی محتویات لوله ها بر روی ژل آگاروز

1- Enzyme suitability test

2 -in- gel lysis method of Eckhardt

ریزوبیومی مورد مطالعه، ابتدا نحوه‌ی ارتباط ژنتیکی بین سویه‌ها براساس مشخصات (اندازه‌ی طول و تعداد) قطعات IGS تکثیر شده توسط PCR (قبل از هر گونه هضم آنزیمی) و از طریق ترسیم درخت ژنتیکی (Dendrogram) و گروه‌بندی آنها مورد بررسی قرار گرفته (شکل شماره 4-A) گروه بندی حاصله نشان می‌دهد، تعداد 52 سویه‌ی ریزوبیومی موجود که مربوط به 7 گروه (جنس، گونه و بیووار) مختلف می‌باشند از این طریق در 16 گروه مختلف قرار گرفته اند که اعضای بسیاری از شاخه‌ها بدون اختلاف (تفکیک) در کنار یکدیگر قرار دارند. در بین سویه‌های *Sm*، تعداد سه سویه (*2Sm* و *3Sm* و *4Sm*) بصورت مجزا قرار گرفته اند. سویه‌های *13Sm* و *12* و *11* و *10* و *9* نیز بدون هیچگونه اختلاف و در کنار یکدیگر در گروه 4 قرار دارند. سویه‌های *7Sm* و *6* و *5* ضمن 50% اختلاف با سویه‌های *24Rlv* و *23* همگی در گروه 3 واقع شده اند. سویه *8Sm* در نزدیکی سویه‌های *33Rlv*، *30*، *29* و *26* و *35Rlt* قرار گرفته است. سویه‌های *36Rlt* و *34* نیز با حدود 70% تشابه در نزدیکی سویه‌های *Sm* در گروه 4 قرار دارند. سویه‌های کند رشد *51Bj* و *50* در کنار سویه کند رشد *37Bsp* (در شاخه 15) و سویه‌های تند رشد *51Bj* و *53* در کنار سویه‌های *47Mc* و *15Rlp* (در شاخه 14) واقع شده اند. سویه‌های *Rlp* نیز بصورت مجزا و یا عمدتاً در گروه 5 قرار گرفته اند. از بین سویه‌های جنس مزوریزوبیوم، سویه‌های *48Mc* و *46* بصورت مجزا ولی سویه‌های *43Mc*، *42*، *41*، *40* همراه با سویه *52Bj* می‌باشند، ضمناً سویه‌ی *47Mc* در کنار سویه‌های تند رشد *54Bj* و *53* در گروه 14 و سویه‌ی *44Mc* در کنار سویه‌های *19Rlp*، *17*، *16* قرار دارند. این وضعیت نشان می‌دهد که سویه‌های *Sm* از نظر طول و تعداد قطعات IGS بیشتر شبیه سویه‌های *Rlv* و *Rlt* می‌باشند. در مقابل سویه‌های مزوریزوبیوم که بصورت مجزا و یا همراه با سویه‌های کند رشد و تند رشد *Bj* و حتی برخی سویه‌های *Rlp* می‌باشند دارای پراکنش بین گروهی فراوانی هستند که با ماهیت و نحوه‌ی رفتاری این گروه از نظر سرعت رشد نیز هماهنگی دارد. کاترینی و همکاران (2002) همچنین نور و همکاران (1994 a و b) با استفاده از تکنیک PCR-RFLP IGS 16S-23S نشان داده اند که ناهمگنی زیادی در بین سویه‌های جنس مزوریزوبیوم که قادر به تلقیح گیاه نخود (*Cicer arietinum*) می‌باشند وجود دارد (20,17,16).

همچنین الگوی برش آنزیمی قطعه‌ی IGS 23S - 16S سویه‌های مختلف ریزوبیومی توسط هر کدام از

(1999) حذف یا اضافه شدن¹ DNA را دلیل دیگری برای اختلاف در طول قطعه IGS در سویه‌های مختلف می‌داند (6). بطور کلی در 44 درصد از سویه‌های ریزوبیومی مورد مطالعه طول قطعه IGS کمتر از 1000 bp و در 56 درصد از سویه‌ها در حدود 1000-1400 bp می‌باشد. بیشترین تفاوت در اندازه IGS در بین سویه‌های *Rlp* (600-1486) و از طرف دیگر بیشترین یکسانی اندازه IGS در بین سویه‌های *Rlt* (1290-1486) می‌باشد. در اندازه‌گیری طول قطعه اصلی IGS از طریق مستقیم در مقایسه با مجموع اندازه قطعات DNA حاصل از برش برخی از آنزیمها هماهنگی نسبتاً قابل قبولی مشاهده می‌شود. بطور مثال در 42 سویه (حدود 80%) مجموع اندازه قطعات IGS حاصل از برش آنزیم *HinfI* با طول قطعه‌ی اصلی IGS کمتر از 20% اختلاف دارد. برای آنزیم *Hha I* این اختلاف اندازه IGS (اختلاف کمتر از 20%) در 25 سویه (48% سویه‌ها) و برای آنزیم *Hae III* تنها در 14 سویه (27% سویه‌ها) مشاهده می‌شود لذا بیشترین هماهنگی بین مجموع اندازه‌ی قطعات DNA حاصل از هضم آنزیمی قطعه‌ی IGS با اندازه‌ی طول قطعه‌ی اصلی IGS (قبل از هضم) مربوط به آنزیم *HinfI* و کمترین آن مربوط به آنزیم *HaeIII* می‌باشد و این بدان معنا است که در نتیجه اثر آنزیم *HaeIII* بر قطعه‌ی IGS قطعات بسیار کوچک DNA حاصل می‌شود که بر روی ژل آگاروز 3 درصد قابل تشخیص و اندازه گیری نیستند. برعکس نتیجه اثر آنزیم *Hinf I* بر قطعه IGS تولید قطعات بزرگتر و قابل تشخیص DNA، بر روی ژل آگاروز 3 درصد می‌باشد. تعداد نسخه (ها)ی IGS حاصل از PCR در سویه‌های مختلف ریزوبیومی نیز یکسان نمی‌باشد (جدول 1) این تعداد در بین سویه‌های ریزوبیومی از یک تا سه نسخه متفاوت بوده است. در مجموع از بین 52 سویه ریزوبیومی مورد مطالعه، تعداد 39 سویه (75%) دارای یک نسخه IGS، 4 سویه (7/7%) دارای 2 نسخه IGS و تعداد 9 سویه ریزوبیومی (3/17%) هر کدام 3 نسخه IGS داشته اند. بیشترین یکسانی از نظر تعداد نسخه‌های IGS در بین سویه‌های *Bj* (همگی دارای یک نسخه IGS) و بیشترین اختلاف در بین سویه‌های *Rlv* (5) سویه هر کدام سه نسخه و 6 سویه دیگر هر کدام یک نسخه) مشاهده شد.

(ب) - گروه بندی سویه‌های ریزوبیومی

با توجه به اختلاف قابل توجه مشاهده شده در اندازه‌ی طول و تعداد نسخه‌های قطعات IGS سویه‌های

تمیز بین آنها نبود از آنزیمهای سه گانه سری دوم که شامل *DduI*، *AluI*، *RsaI* استفاده گردید. الگوی برش هر کدام از این آنزیمها و نیز الگوی ترکیبی برش آنزیمهای مذکور برای 15 سویه های باقی مانده تهیه شده است. در الگوی برش هر دو آنزیم *AluI* و *RsaI* سویه های *53Bj* و *54Bj* از یکدیگر تفکیک شده اند در صورتیکه آنزیم *DduI* قادر نبود تفاوت بین این دو سویه را نشان دهد. بعلاوه در اثر آنزیم *AluI* سویه های *10Sm* و *13Sm* از مجموعه ی تفکیک نشده ی *13Sm* و *12* و *11* و *10* جدا شده اند. تمامی چهار سویه ی ریزوبیومی تفکیک شده توسط آنزیم های *AluI* و *RsaI* (شامل *54Bj* و *53* و نیز *13Sm*)، 10 کماکان دارای حدود 70% تشابه بین گروهی می باشند و لذا درون کلاسترهای مربوطه خود قرار دارند. مابقی مجموعه های تفکیک نشده سویه های ریزوبیومی به علت عدم تأثیر آنزیمهای سه گانه سری دوم به همان صورت درون گروههای کلاستر *C1* و *C3* و *C4* و *C5* باقی مانده اند. اثر آنزیمهای سری دوم تنها منجر به تفکیک 20% از سویه های تفکیک نشده (15 سویه) گردید.

نتایج این تحقیق نشان می دهد که اولاً تنوع ژنتیکی فراوانی بین سویه های ریزوبیومی یک گونه و حتی بیووار مشاهده می شود. این نتیجه با مشاهدات بسیاری از محققین دیگر در این زمینه همخوانی دارد (1,6,4,14,25). ثانیاً اینکه روش IGS PCR-RFLP 16S-23S قادر است تفاوت بین سویه های ریزوبیومی مورد مطالعه را که اختلاف آنها از جهات مختلف قبلاً ثابت شده است، بخوبی و در حد قابل قبولی نشان دهد. بطوریکه با استفاده از این روش تعداد 40 سویه (77%) از مجموع 52 سویه مورد مطالعه به خوبی و مشخصاً از یکدیگر تفکیک شده اند. بارسیر و همکاران (2002) همچنین لاگری و همکاران (1996 و 1994) نیز ثابت نمودند که قدرت تشخیص و تفکیک باکتریهای ریزوبیومی در سطح سویه توسط روش IGS PCR-RFLP 16S-23S نسبت به روشهای دیگر همچون تعیین توالی منطقه *rDNA* 16S و یا تکنیک RFLP این منطقه (16S ARDRA) بسیار بیشتر است. (1,10,11). بطور کلی می توان روش IGS PCR-RFLP را بدلیل توانایی آن در تفکیک بین سویه ها همچنین بدلیل سادگی آن در مقایسه با دیگر روشهای مولکولی موجود برای مطالعه ی نحوه ی ارتباط ژنتیکی بین سویه ای و نیز گروه بندی سویه های ریزوبیومی مناسب دانسته و توصیه نمود. Bourcier و همکاران (2000)، Martinez و همکاران (1999) همچنین - Martinez Romero و Caballero-Mellado (1996) نیز تکنیک حاضر را به دلیل کارآمدی و اطمینان، سادگی و نیازهای

آنزیمهای سه گانه سری اول شامل *HinfI* و *HhaI* و *HaeIII* تهیه شده است، بعلاوه با توجه به الگوی ترکیبی هضم آنزیمهای سه گانه مذکور اقدام به ترسیم درخت ژنتیکی و گروه بندی سویه ها شده است (تصویر شماره B-4). براین اساس مجموع 52 سویه ریزوبیومی مورد مطالعه در 36 گروه مختلف قرار گرفته اند. افراد 11 گروه (شامل 31 سویه) از مجموع 36 گروه حاصله حدوداً دارای 70% تشابه بین سویه ای می باشند. و تعداد 21 سویه ریزوبیومی بصورت مجزا قرار گرفته اند. جدول شماره 1 وضعیت گروه های کلاستری 11 گانه ی (با تشابه درون گروهی بیش از 70%) و سویه های مربوطه را نشان می دهد. دندوگرام ترسیم شده نشان می دهد که بجز سویه های *4Sm* و *3* و *2* که به صورت مجزا قرار دارند مابقی سویه های *Sm* درون گروه های *G1* و *G2* قرار گرفته اند و این موضوع حاکی از تشابه درون گروهی (بین سویه ای) آنها می باشد. درعوض تمامی سویه های *Rlp* بجز سویه های *17Rlp* و *16* بصورت مجزا می باشند. گروه های *G6* و *G5* و *G4* حاوی تمامی سویه های *Rlv* (به استثنای سویه های *32Rlv* و *26*) است. سویه های *Rlt* نیز درون گروه *G7* قرار گرفته اند و سویه ی *34Rlt* با اندکی اختلاف (حدود 15%) بصورت جداگانه قرار دارد. همچنین سویه های تند رشد *Bj* (*54 Bj* و *53*) درون گروه *G12* واقع شده و گروه *G11* نیز حاوی سویه های کند رشد *51Bj* و *50* می باشد دیگر سویه ی کند رشد، *52Bj* با اختلاف بسیار کم (کمتر از 5%) همراه با سویه *45Mc* درون گروه *G9* قرار گرفته است. اغلب سویه های *Mc* شامل *48 Mc* و *43* و *42* و *41* و *40* درون گروه *G8* قرار گرفته اند. گروه *G10* نیز شامل سویه های *49 Mc* و *46* می باشد سویه های *47 Mc*، *44* نیز به صورت مستقل قرار گرفته اند. همچنین دندوگرام حاصل از الگوی ترکیبی هضم آنزیمهای سه گانه نشان می دهد که 15 سویه ریزوبیومی شامل سویه های *7Sm* و *6* و *5* (گروه *G1*)، سویه های *13Sm* و *12* و *11* و *10* (گروه *G2*)، همچنین سویه های *17Rlp* و *16* (گروه *G3*)، سویه های *34Rlv*، *23* (گروه *G4*)، سویه های *28Rlv* و *27* (گروه *G5*) و نیز سویه های *54Bj* و *53* (گروه *G12*) بدون اختلاف درون گروه های کلاستری مربوط به خود قرار گرفته اند. بطور کلی استفاده از سه آنزیم سری اول و نیز الگوی ترکیبی هضم این سه آنزیم توانسته است تعداد 37 سویه (71/2%) از مجموع 52 سویه ریزوبیومی مورد مطالعه را کاملاً از یکدیگر تفکیک نماید.

برای مطالعه ارتباط ژنتیکی و امکان تفکیک تعداد 15 سویه ریزوبیومی که آنزیمهای سه گانه سری اول قادر به

آزمایشگاهی کمتر برای تشخیص سریع، توصیف و غربال کردن سویه های ریزوبیومی توصیه کرده اند.

2 گروه بندی سویه های ریزوبیومی براساس پروفیل پلاسمیدی

پروفیل پلاسمیدی سویه های ریزوبیومی به روش اکهارت تهیه شده است. در این روش DNA پلاسمیدی تمامی 52 سویه ریزوبیومی توسط سه ژل آگاروز 0/8 درصد با ابعاد 20×25 cm الکتروفورز شد. ژل اول شامل سویه های *Rlp* و *Sm*، ژل دوم شامل سویه های *Rlv*، *Rlt*، *Bsp* و ژل سوم شامل سویه های *Bj* و *Mc* بوده است. بدلیل فراهم نشدن مارکر مولکولی مناسب برای ارزیابی اندازه پلاسمیدها امکان گزارش اندازه قطعات پلاسمیدها فراهم نشد. لذا تنها مقایسه ی پلاسمیدی بین سویه های مربوط به هر ژل آگاروز انجام پذیرفت. برای ترسیم دندوگرام مربوط به پروفیل پلاسمیدی سویه های ریزوبیومی نیز از نرم افزار *Phylip version 3.6* استفاده شده است. دندوگرام مربوط به پروفیل پلاسمیدی سویه های مذکور در 9 گروه قرار گرفته اند. سویه های *Sm*، *7Sm*، *6*، *4* بدون اختلاف با یکدیگر بر روی بخشی از گروه یک قرار دارند و در کنار آنها سویه *2Sm* با اختلاف نسبی حدود 17% قرار گرفته است. سویه های *Sm* 8 و 5 و 3 نیز با اندکی اختلاف (حدود 30%) بر روی گروه 2 و مابقی سویه های *Sm* شامل سویه *Sm* 13 و 12 و 11 بدون اختلاف در کنار یکدیگر در گروه 3 قرار دارند. تمامی سویه های *Rlp* درون گروه های 5 و 9 واقع شده اند که اعضای گروه 5 (*Rlp* 17 و 16 و 15) بصورت یک گروه با تشابه درون گروهی حدود 70% ولی سویه های درون شاخه 9 (*Rlp* 20 و 19 و 18 و 14) با اختلافی بیش از 30% در کنار هم قرار گرفته اند.

دندوگرام مربوط به پروفیل پلاسمیدی سویه های *Bsp* و *Rlt* و *Rlv* نشان می دهد بجز سویه های *Rlv* 30 و 22 که به صورت مجزا قرار گرفته اند. سویه های *Rlv* 24 و 23 بدون اختلاف در گروه 2 واقع شده و در کنار آنها سویه های *Rlv* 29 و 28 و 26 و 25 و به صورت یک گروه با تشابه حدود 70% واقع شده اند. سویه های *Rlv* 31 و 27 نیز بدون اختلاف با یکدیگر در گروه 6، همچنین سویه های *Rlv* 33 و 32 بدون اختلاف در کنار یکدیگر و همراه با سویه های *Rlt* 36 و 34 در گروه 8 قرار دارند. این سویه ها در کنار سویه های *Bsp* 38 و 37 بدون اختلاف همگی در گروه 12 واقع شده اند.

دندوگرام سوم مربوط به سویه های *Bj* و *Mc* می باشد که در این دندوگرام سویه های *Mc* 46 و 45 و 44

و 43 و 41 بدون اختلاف درون گروه اول قرار گرفته اند ولی سویه ی *Mc* 49 با سویه های قبل اندکی اختلاف دارد. سویه های *Mc* 48 و 42 نیز با اختلاف بیش از 30% درون گروه 2 واقع شده اند. سویه *Mc* 47 در کنار سویه های تند رشد *Bj* 54 و 53 قرار گرفته است. سویه های کند رشد *Bj* 51 و 50 بدون اختلاف در یک گروه می باشند ولی سویه *Bj* 52 اختلاف نسبتاً زیادی با آن دو سویه دارد.

در مجموع گروه بندی مبتنی بر پروفیل پلاسمیدی سویه های مختلف ریزوبیومی مورد استفاده در این تحقیق تا حدودی با نتایج حاصل از روش IGS PCR-RFLP هماهنگی دارد، به طور مثال سویه های *Bj* 54 و 53، سویه های *Rlv* 24 و 23، همچنین سویه های *Rlp* 17 و 16 و سویه های *Sm* 13 و 12 و 11 در هر دو روش بصورت کاملاً مشابه در کنار یکدیگر و درون گروه های کلاستری جداگانه ای قرار گرفته اند. Rigottier-Gois و همکاران (1998) و Laguerre و همکاران (1992) نیز گزارش نمودند که همبستگی نسبی بین ژنوتیپ های سیمپلاسمیدی و ژنوتیپ های کروموزمی ریزوبیوم ها وجود دارد (12، 22). البته قدرت تفکیک و تمایز بین سویه های ریزوبیومی در روش RFLP بیشتر از روش پروفیل پلاسمیدی بود، بطوریکه از مجموع 52 سویه تعداد 41 سویه (حدود 79%) از یکدیگر تفکیک شدند در صورتیکه در روش پروفیل پلاسمیدی تنها تعداد 26 سویه از مجموعه 50 سویه ریزوبیومی (52%) با دیگر سویه ها متفاوت بوده و بین مابقی سویه ها تفاوتی مشاهده نشد. Laguerre و همکاران (1992) گزارش دادند که عدم وجود همبستگی کامل بین دو روش مذکور، صرف نظر از ماهیت دو روش، احتمالاً به استعداد سویه های ریزوبیومی برای از دست دادن و یا دریافت مجدد پلاسمید های خود نیز ارتباط دارد.

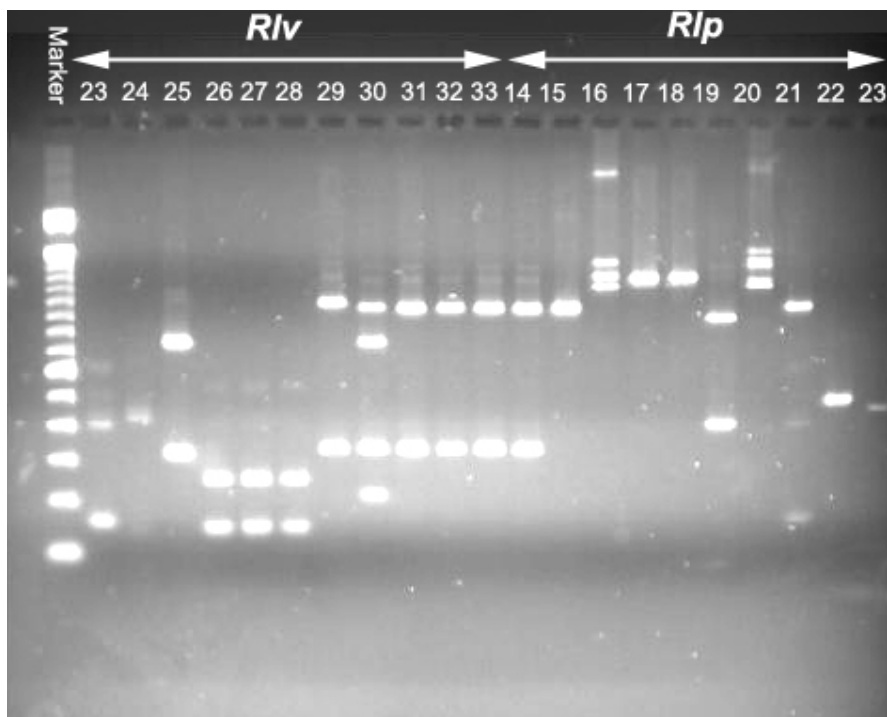
سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت های مالی آزمایشگاه بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه لاوال انجام پذیرفته است، که بدینوسیله از مساعدت های انجام شده تشکر و قدردانی بعمل می آید. همچنین از راهنمایی های دوست عزیز آقای دکتر محمود محمدی و نیز از آقای R. Kuwa کارشناس آزمایشگاه تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، مرکز تحقیقات علوم زیستی دانشگاه لاوال تشکر می شود. در پایان لازم است از مساعدت ریاست محترم مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور استاد محترم آقای دکتر جعفر ملکوتی و نیز همکاران ایشان تشکر و سپاسگزاری بعمل آید.

جدول شماره 1 - مشخصات IGS-PCR و IGS PCR-RFLP 16S-23S سویه های ریزوبیومی

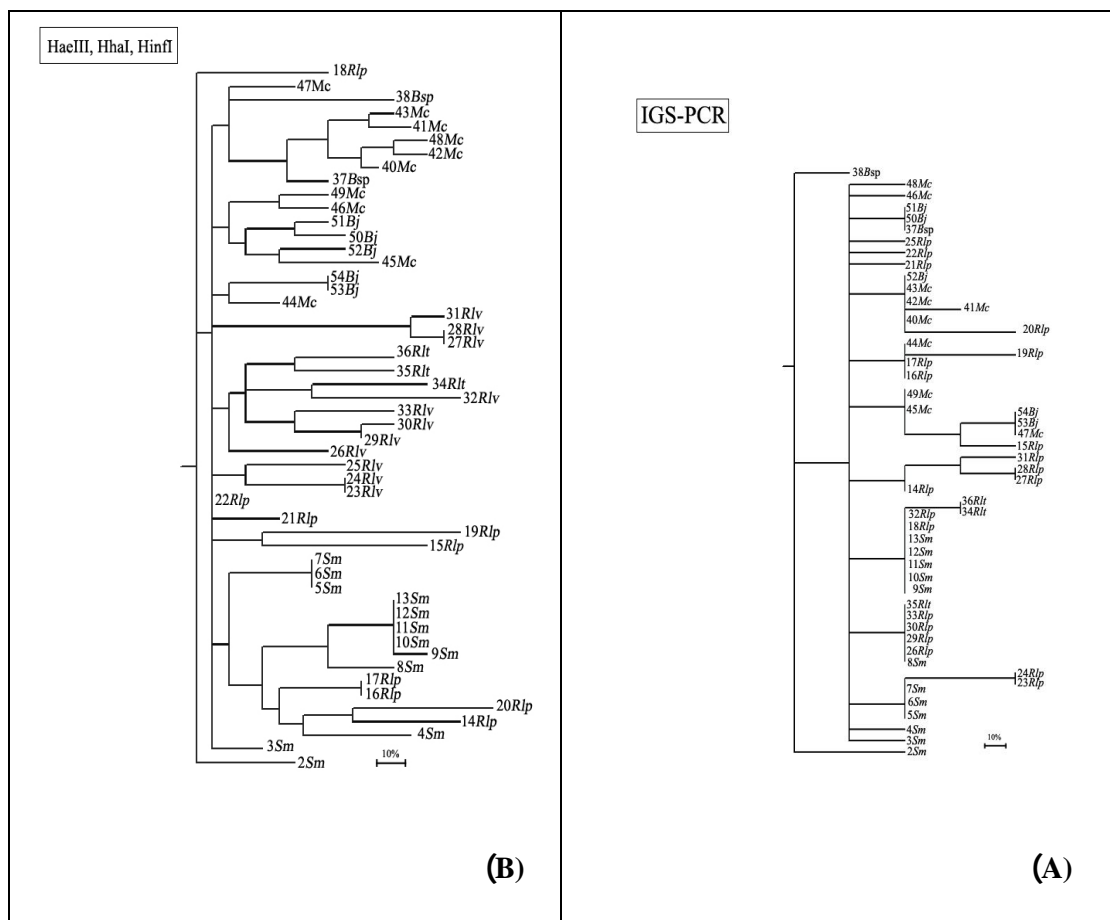
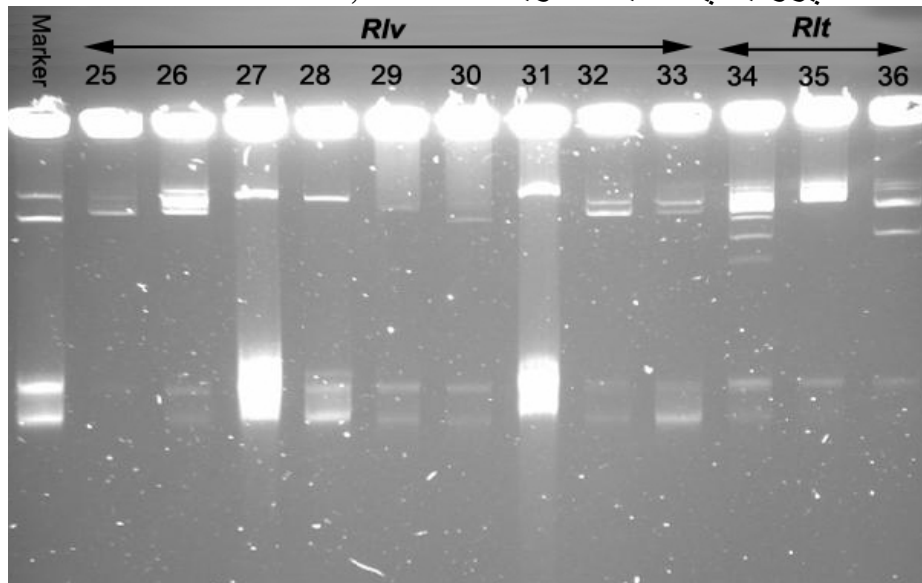
کد سویه ریزوبیومی	تعداد	طول قطعه IGS اندازه گیری شده (bp) از طریق :	گروه بندی سویه های ریزوبیومی براساس IGS PCR PFLP (حدود 70% تشابه)	مجموع اندازه های قطعات DNA حاصل از برش آنزیم : اندازه گیری مستقیم				
				Hinf 1	Hae I	Hae III		
اختصاری	گیاه میزبان	قطعات IGS	قبل از برش آنزیم					
2 <i>Sm</i>	<i>Sm</i> 7	یونجه	3	625+677+767 (2069)	575	768	855	جدا
3 <i>Sm</i>	<i>Sm</i> 38	"	1	665	415	423	281	جدا
4 <i>Sm</i>	<i>Sm</i> 44	"	1	1098	1075	1048	737	جدا
5 <i>Sm</i>	<i>Sm</i> 52	"	1	625	425	490	475	G1
6 <i>Sm</i>	<i>Sm</i> 54	"	1	625	425	490	475	G1
7 <i>Sm</i>	<i>Sm</i> 73	"	1	625	425	490	475	G1
8 <i>Sm</i>	<i>Sm</i> 119	"	1	1352	1390	1059	785	G2
9 <i>Sm</i>	<i>Sm</i> 125	"	1	1290	1320	1191	846	G2
10 <i>Sm</i>	<i>Sm</i> 127	"	1	1290	1333	1191	846	G2
11 <i>Sm</i>	<i>Sm</i> 128	"	1	1290	1333	1191	846	G2
12 <i>Sm</i>	<i>Sm</i> 129	"	1	1290	1333	1191	846	G2
13 <i>Sm</i>	<i>Sm</i> 164	"	1	1290	1333	1191	846	G2
14 <i>Rlp</i>	<i>Rlp</i> 254	لوبیا	1	926	1000	853	629	جدا
15 <i>Rlp</i>	<i>Rlp</i> 256	"	3	1352+1230+ 1067 (3649)	2497	963	2999	جدا
16 <i>Rlp</i>	<i>Rlp</i> 257	"	1	1173	1317	727	1071	G3
17 <i>Rlp</i>	<i>Rlp</i> 261	"	1	1173	1317	727	1071	G3
18 <i>Rlp</i>	<i>Rlp</i> 272	"	1	1290	939	1086	1021	جدا
19 <i>Rlp</i>	<i>Rlp</i> 274	"	3	1486+1352+1173 (4011)	2717	1764	3503	جدا
20 <i>Rlp</i>	<i>Rlp</i> 281	"	3	971+650+678 (2299)	1249	1136	1141	جدا
21 <i>Rlp</i>	<i>Rlp</i> 305	"	1	600	489	418	175	جدا
22 <i>Rlp</i>	<i>Rlp</i> 307	"	1	634	630	580	220	جدا
23 <i>Rlv</i>	<i>Rlv</i> 319	باقلا	3	731+577+525 (1833)	1442	1039	913	G4
24 <i>Rlv</i>	<i>Rlv</i> 320	"	3	731+577+525(1833)	1442	1039	913	G4
25 <i>Rlv</i>	<i>Rlv</i> 329	"	1	1418	1380	1249	987	جدا
26 <i>Rlv</i>	<i>Rlv</i> 331	"	1	1352	1316	1339	922	G4
27 <i>Rlv</i>	<i>Rlv</i> 336	"	3	926+731+675 (2332)	2065	2171	2208	جدا
28 <i>Rlv</i>	<i>Rlv</i> 338	"	3	926+731+675(2332)	2065	2171	2208	G5
29 <i>Rlv</i>	<i>Rlv</i> 340	"	1	1352	1316	1175	904	G6
30 <i>Rlv</i>	<i>Rlv</i> 342	"	1	1352	1316	1378	904	G6
31 <i>Rlv</i>	<i>Rlv</i> 345	"	3	926+731+650(2307)	2065	2162	2208	G5
32 <i>Rlv</i>	<i>Rlv</i> 488	عدس	1	1290	3789	3531	1666	جدا
33 <i>Rlv</i>	<i>Rlv</i> 490	"	1	1352	2403	2073	904	G6
34 <i>Rlt</i>	<i>Rlt</i> 360	شپدر	2	1486+1290 (2776)	2403	2179	1582	جدا
35 <i>Rlt</i>	<i>Rlt</i> 362	"	1	1352	2467	2153	828	G7
36 <i>Rlt</i>	<i>Rlt</i> 363	"	2	1486+1290 (2776)	2403	2873	828	G7
37 <i>Bsp</i>	<i>Bsp</i> 226	بادام زمینی	1	883	874	887	798	جدا
38 <i>Bsp</i>	<i>Bsp</i> 229	"	2	670+680(1350)	914	993	347	جدا
40 <i>Mc</i>	<i>Mc</i> 241	نخود	1	971	874	742	798	G8
41 <i>Mc</i>	<i>Mc</i> 243	"	2	971+926 (1897)	1817	676	1342	G8
42 <i>Mc</i>	<i>Mc</i> 248	"	1	971	989	762	763	G8
43 <i>Mc</i>	<i>Mc</i> 375	"	1	971	989	646	827	G8
44 <i>Mc</i>	<i>Mc</i> 378	"	1	1173	1030	420	650	جدا
45 <i>Mc</i>	<i>Mc</i> 381	"	1	1064	1145	344	798	G9
46 <i>Mc</i>	<i>Mc</i> 382	"	1	1119	975	596	853	G10
47 <i>Mc</i>	<i>Mc</i> 384	"	1	1230	1214	325	681	جدا

کد سویه ریزوبیومی		گیاه میزبان	تعداد قطعات IGS	طول قطعه IGS اندازه گیری شده (bp) از طریق : مجموع اندازه‌ی قطعات DNA حاصل از برش آنزیم : اندازه‌گیری مستقیم				گروه بندی سویه های ریزوبیومی براساس IGS PCR PFLP (حدود 70% تشابه)	
اختصاری	کلکسیون			قبل از هضم آنزیم	Hif 1	Hha I	Hae III		
48	<i>Mc</i>	<i>Mc</i> 419	"	1	1018	989	762	729	G8
49	<i>Mc</i>	<i>Mc</i> 433	"	1	1064	874	596	827	G10
50	<i>Bj</i>	<i>Bj</i> 180	سویا	1	883	788	823	544	G11
51	<i>Bj</i>	<i>Bj</i> 193	"	1	883	742	812	544	G11
52	<i>Bj</i>	<i>Bj</i> 223	"	1	971	784	557	784	G9
53	<i>Bj</i>	<i>Bj</i> 239	"	1	1230	1214	601	970	G12
54	<i>Bj</i>	<i>Bj</i> 240	"	1	1230	1214	601	970	G12



شکل 2- الگوی برشی سویه های Rlv و Rlp توسط آنزیم HinfI

شکل 3- پروفیل پلاسمیدی سویه های Rlv , Rlt



شکل 4- (A) دندوگرام IGS-PCR قبل از برش (B) بعد از برش توسط آنزیم های سری اول (*HaeIII* , *HhaI* , *HinfI*)

فهرست منابع:

1. Bourcier, F. D., A. Willems, R. Coopman, G. Laguerre, M. Gillis, and P. Lajudie. (2000). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small Senegalese legumes by 16S–23S rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3987-3997.
2. Chen, W. P., and T. T. Kuo. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram negative bacterial genomic DNA. *Nucl. Acids Res.* 21: 2260.
3. Condon, C., and C. L. Squires. (1995). Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 59: 623-645.
4. de Oliveria, V. M., H. L. C. Coutinho, B. W. S. Sobral, C. T. Guimares, J. D. Van Elsas, and G. P. Manfio. (1999). Discrimination of *Rhizobium tropici* and *R. leguminosarum* strains by PCR specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis. *Lett. Appl. Microbiol.* 28:137-141.
5. Eckhardt, T. (1978). A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid.* 1:584-588.
6. Guo, X. W., X. X. Zhang, and F. Di Li. (1999). Characterization of *Astragalus sinicus* Rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and nodulation genes regions. *Current Microbiol.* 39: 358-364.
7. Gurtler, V. and Stanisich, V.A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer. *Microbiology* 142,3-16.
8. Jensen, M. A., J. A. Webster, and N. Straus. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 945-952.
9. Kostman, J.R. Edind, T.D., Lipuma, J.J. and Stull, T.L. (1992). Molecular epidemiology of *Pseudomonas Cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J. Clin Microbiol.* 30,2084_2087.
10. Laguerre, G., M. R. Allard, F. Rovey, and N. Amarger. (1994). Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 56-63.
11. Laguerre, G., P. Mavingui, M. R. Allard, M. P. Charnay, P. Louvrier, S. I. Mazurier, L. Rigottier-Gois, and N. Amarger. (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. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2029-2036.
12. Laguerre, G., S. I. Mazurier, and N. Amarger. (1992). Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* in field populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 101: 17-26.
13. Martinez, J. G., S. G. Acinas, A. I. Anton, and F. R. Valera. (1999). Use of the 16S-23S ribosomal gene spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J. Microbiol. Methods.* 36:55-64.
14. Martinez –Romero, E. and Caballero – Mellado (1996) Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit: Rev. Plant Sci.* 15:113-140.
15. Normand, P., C. Ponsonnet, X. Nesme, M. Neyra, and P. Simonet. (1996). ITS analysis of prokaryotes. In *Molecular Microbial Ecology Manual* ed. Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D. and De Bruijn, F.J. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic.
16. Nour, S. M., J. C. Cleyet-Marel, D. Beck, A. Effosse, and M. P. Fernandez. (1994a.) Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Can. J. Microbiol.* 40:345-354.

17. Nour, S. M., M. P. Fernandez, P. Normand, and J. C. Cleyet-Marel. (1994b). *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 511-522.
18. Perret, X., and W. J. Broughton. (1998). Rapid identification of *Rhizobium* strains by targeted PCR fingerprinting. Plant. Soil. 204: 21-34.
19. Pisabarro, A., A. Correia and J. Martin (1998). Characterization of the *rrnB* operon of the plant pathogen *Rhodococcus Fascians* and targeted integrations of exogenous genes at *rrn* loci. Appl. Environ. Microbiol. 64:1276-1282.
20. Quatrini, P., G. Scaglione, M. Caradonna and A. M. Puglia. (2002). *Bradyrhizobium* sp. nodulating the Mediterranean shrub spanish broom (*Spartium junceum* L.). J. Appl. Microbiol. 92: 13-21.
21. Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., Janssen, P.H., Hippe, H. and Stackebrandt, E. (1996). *Clostridium paradoxum* DSM 7308^T Contains multiple 16S rRNA genes with heterogenous intervening sequences. Microbiol. 142:2087-2095.
22. Rigottier-Gois, L., S. L. Turner, J. P. W. Young, and N. Amarger. (1998). Distribution of *repC* plasmid-replication sequences among plasmids and isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* from field populations. Microbiol. 144:771-780.
23. Roth, A., M. Fischer, M. E. Hamid, S. Michalke, W. Ludwig and H. Mauch. (1998). Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. J. Clin. Microbiol. 36:139-147.
24. Somasegaran, P., and H. J. Hoben. (1994). Handbook for Rhizobia Methods in Legume-Rhizobium Technology. P. 267-278. Springer-Verlag, New York.
25. Tan, Z., T. Hurek, P. Vinuesa, P. Muller, J. K. Ladha, and B. R. Hurek. (2001). Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3655-3664.
26. Wernegreen, J. J., E. E. Harding, and M. A. Riley. 1997. *Rhizobium* gone native: unexpected plasmid stability of indigenous *Rhizobium leguminosarum*. Proc Natl Acad Sci USA. 94:5483-5488.