نشریه علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳ (ص۱۴۶-۱۳۵)

شناسایی مولکولی ریزوبیوم‌های همزیست نخود در مناطق غربی ایران

احسان علویان‌مهریان[۱]، مسعود بهار[۲*] و مجید طالبی‌بداف[۳]
۱، ۲ و۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران.
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۷ـ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۱/۳۰)

چکیده

نخود در سطح وسیعی از مناطق غربی ایران (استان‌های کرمانشاه، همدان، لرستان و چهارمحال‌وبختیاری) کشت می‌شود. با توجه به نقش مهم ریزوبیوم‌ها در تثبیت بیولوژیکی نیتروژن و افزایش عملکرد نخود، شناسایی گونه‌های ریزوبیومی همزیست با آن و نیز تعیین ساختار جمعیتی آنها در مناطق مختلف اکولوژیکی برای مدیریت توسعهٔ این محصول در ایران ضروری است. در این مطالعه، شناسایی گونه‌های ریزوبیومی همزیست با نخود مناطق غربی ایران براساس روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی شامل PCR- RFLP ناحیهٔ عمومی 16S rDNA و تعیین توالی نوکلئوتیدی این قطعهٔ ژنی به همراه ردیابی و توالی‌یابی ژن‌های مؤثر در همزیستی (*nodC, nifH*) بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که تنوع گونه‌های ریزوبیومی همزیست نخود در مناطق نامبرده محدود و اکثر جدایه‌های همزیست با نخود از گونهٔ *Mesorhizobium cicer* است. جدایه‌هایی از *Agrobacterium tumefaciens* نیز در گره‌های نخود کشت‌شده در خاک‌های لرستان ردیابی شد که توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی آنها ثابت نشده است. احتمالاً سابقهٔ طولانی کشت نخود در استان‌های غربی کشور و رابطهٔ بسیار اختصاصی ریزوبیوم‌های نخود با میزبان، در غالبیت *M. cicer* و فقدان گونه‌های دیگری از *Mesorhizobium* sp. همزیست نخود در این مناطق نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم، نخود، *Mesorhizobium* ciceri، ژن rDNA S۱۶، *nodC, nifH*

مقدمه

نخود زراعی با نام علمی *Cicer arietinium* L.، گیاهی دیپلوئید با ۱۶ کروموزم (16n2=) از خانوادهٔ Fabaceae، زیرخانوادهٔ پروانه‌آسا (Papilionaceous) و جنس *Cicer* است. سومین گیاه زراعی از خانوادهٔ لگوم که در برخی از مناطق دنیا از جمله مدیترانه، خاورمیانه، شرق آسیا، اروپا، استرالیا، آمریکا و مکزیک کشت می‌شود (Singh *et al.*, 1997). نخود نیز مانند سایر گیاهان لگوم با ریزوبیوم‌ها همزیستی دارد (Nap & Bisseling, 1990) که حاصل آن تثبیت حدود ۱۲۰ـ۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار است (Herridge *et al.*, 1995). همزیستی ریزوبیوم‌ها با نخود بسیار اختصاصی است. ریزوبیوم‌ها به لحاظ سرعت رشدشان در محیط کشت با هم تفاوت دارند (Jarvis *et al.*, 1997). با استفاده از هیبریداسیون DNA-DNA، پلی‌مورفیسم ناحیهٔ 16SrDNA و همولوژی توالی نوکلئوتیدی همین ناحیه، DNA دو گروه متفاوت ریزوبیومی با نام‌های Rhizobium ciceri (Nour *et al.*, 1994) و *R. mediterraneum* (Nour *et al.*, 1995) شناسایی شدند. در تحقیقات بعدی این ریزوبیوم‌ها با نام *Mesorhizobium ciceri* و *M. mediterraneum* طبقه‌بندی شدند (Jarvis *et al.*, 1997) که اعتبار این طبقه‌بندی هنوز پابرجاست. ریزوبیوم‌هایی که تاکنون همزیست با گیاه نخود معرفی شده‌اند، به‌استثنای یک گونه از جنس *Sinorhizobium* (Maatallah *et al.*, 2002)، همگی متعلق به جنس *Mesorhizobium* (Laranjo *et al.* 2008; Laranjo *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 2007) و شامل گونه‌های *M. cicer* و *M. meditrrraneum* هستند.

باوجود اهمیت فراوان کشت و تولید نخود در مناطق مرکزی و غرب ایران، تحقیقات چندانی در زمینهٔ

تلفن: ۰۳۱۱۳۹۱۳۴۰۰
E-mail: mbahar@cc.iut.ac.i

همزیستی گیاه نخود با باکتری‌های خانوادهٔ ریزوبیوم انجام نگرفته است. تعیین کارایی سوش‌های بومی *M.ciceri* در تثبیت نیتروژن نخود (Asgharzadeh *et al*., 2002)، بررسی تلقیح مزوریزوبیوم بر عملکرد و اجزای عملکرد نخود دیم(Soleimani & Asgharzadeh, 2010)، گره‌زایی ژنوتیپ‌های نخود با ریزوبیوم‌های نخود با رژیم‌های مختلف رطوبتی (Khazaie *et al*., 2008)، تأثیر چند جنس باکتریایی از جمله *Mesorhizobium*، *Azotobacter*، *Azospirillum* و *Pseudomonas* بر افزایش عملکرد گیاه نخود (Rokhzadi *et al*., 2008) و نیز تأثیر خشکی بر فعالیت آنزیم نیتروژناز ریزوبیوم همزیست نخود (Nasr Esfahani *et al*., 2010)، از جمله پژوهش‌های انجام‌گرفته بر روی باکتری‌های همزیست با نخود در ایران است. البته دربارهٔ ویژگی تاکسونومیکی گونه‌های همزیست با گیاه نخود در کشور بررسی خاصی نشده است. بنابر اهمیت شناسایی دقیق همزیست‌های ریزوبیومی غالب نخود و نیز تعیین ساختار جمعیتی آنها در مناطق مختلف اکولوژیکی برای مدیریت توسعهٔ این محصول در ایران، لازم است گونه‌ها و نژادهای این ریزوبیوم‌های همزیست با گیاهان شناسایی و شباهت و تفاوت‌های آنها با ریزوبیوم‌های گزارش‌شده از مناطق دیگر مقایسه شود. برای تعیین تنوع سوش‌های ریزوبیومی از روش‌های مختلفی استفاده شده است. اگرچه در گذشته استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی برای شناسایی ریزوبیوم‌های همزیست مرسوم بود (Jamila & Sanjuan, 2002)، ولی در چند دههٔ اخیر به تکنیک‌های مبتنی بر تجزیه و تحلیل مستقیم ساختار ژنتیکی به منظور تفکیک و طبقه‌بندی ریزوبیوم‌ها بیشتر توجه شده است. با استفاده از تکنیک PCR-RFLP محصول ژن‌های حفاظت‌شدهٔ کروموزومی و پلاسمیدی ریزوبیوم‌ها مانند ژن‌های *nifH* و *nodC* (*Laguerre et al., 2001*)، ژن nodD (Mutch &Young. 2004)و ژن nifA چهارگونه *M. cicer*، *M. mediterraneum*، *M. tianshanenes* و M. loti از یکدیگر تفکیک و گونه‌های همزیست با نخود تشخیص داده شدند (Michiels *et al*., 1994).

براساس چندشکلی ناحیهٔ 16SrDNA و تعیین ترادف نوکلئوتیدی آن، همزیست‌های نخود در مراکش *M. ciceri*, *M. loti*، *M. mediterraneum* و جدایه‌ای از *Sinorhizobium* sp. معرفی شدند(Maatallah *et al*., 2002) و گزارش‌هایی نیز مبنی بر جداسازی گونه‌های *M. tianshanense* و *M. amorphae* از گره‌های ریشهٔ نخود در خاک‌های پرتغال و اسپانیا ارائه شد (Laranjo *et al*., 2004). همچنین، همزیستی *medicae* *Sinorhizobium* در گره‌های نخود گزارش شده است؛ ولی کارایی این گونه در تثبیت بیولوژیکی نیتروژن ثابت نشده است (Ben Romdhane *et al*., 2007 ; Laranjo *et al*., 2004).

اگرچه دو گونهٔ *M.ciceri* و *M. mediterraneum* همزیست‌های اصلی نخود هستند، ولی به دلیل انتقال ژن‌های مرتبط با گره‌سازی بین ریزوبیوم‌های نخود، تنوع فیلوژنتیکی بسیاری بین آنها وجود دارد (Rivas *et al*., 2007). با توجه به وجود شرایط اقلیمی بسیار متنوع و همچنین سابقهٔ طولانی کشت نخود در ایران ، در این پژوهش تلاش شد تا ریزوبیوم‌های همزیست نخود در مناطق مختلف کشت این محصول درغرب ایران شناسایی و تنوع آنها بررسی شود. به‌این‌ترتیب امکان تشخیص سوش‌های برتر و سازگار با هر منطقه به منظور استفادهٔ آتی از حداکثر تثبیت بیولوژیکی نیتروژن در نخود فراهم خواهد شد.

مواد و روش

نمونه‌برداری از خاک

برای بررسی ریزوبیوم‌های همزیست موجود در برخی از مناطق غربی و مرکزی ایران، تابستان ۱۳۸۸ دوازده نمونه خاک از مناطق با سابقهٔ کشت نخود از استان‌های کرمانشاه، همدان، لرستان و چهارمحال‌وبختیاری جمع‌آوری شد (جدول ۱).

نمونهٔ خاک، از سه مزرعهٔ هر منطقه فراهم شد. به این منظور، از سه قسمت متفاوت هر مزرعه سه نمونه خاک، از عمق ۳۰ـ۰ سانتی‌متری برداشته شد. این سه نمونه کاملاً با هم مخلوط و حاصل آن نمایندهٔ خاک مزرعه در نظر گرفته شد. پس از یادداشت مشخصات ضروری، نمونه‌های خاک هر سه مزرعهٔ آن ناحیه مخلوط و نمونهٔ خاک منطقه به آزمایشگاه منتقل شد.

کشت گیاهان در گلخانه

هر نمونه خاک جمع‌آوری‌شده با نسبت یک به دو (۱:۲) با ماسه‌های کاملاً سترون‌شده، با اتوکلاو مخلوط شد. مخلوط خاک به گلدان‌های نو پلاستیکی با قطر ۲۵ سانتی‌متر و ضدعفونی‌شده با الکل ۹۶ درصد منتقل شد. در این آزمایش از بذر نخود در نقش میزبان تله (Trape plant) برای به دام انداختن باکتری‌های ریزوبیوم موجود در نمونه‌های خاک مختلف و درنهایت بررسی تنوع ژنتیکی ریزوبیوم‌های بومی این مناطق استفاده شد. برای هر نمونه خاک دو گلدان (دو تکرار) و درمجموع ۲۴ گلدان برای ۱۲ نمونه خاک آزمایشی استفاده شد.

پس از ضدعفونی سطحی دانه‌های نخود با ۲۰ درصد هیپوکلریت سدیم تجارتی به مدت پنج دقیقه و سه بار شست‌وشو با آب مقطر استریل، دانه‌ها درمحیط آب‌ـ آگار به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند تا جوانه بزنند. دانه‌های جوانه‌زده درون گلدان‌ها کاشته و از هفتهٔ سوم، هر پنج روز یک‌بار با محلول غذایی B&D (Broughton & Dilworth, 1971) با غلظت بهینه‌ای از عناصر ماکرو و میکرو فاقد منبع نیتروژن آبیاری شدند. دمای گلخانه C° ۳۵ـ ۲۲ و رطوبت نسبی ۶۰ـ۵۰ درصد بود.

جداسازی باکتری‌های ریزوبیومی از گره‌ها

دو ماه پس از کاشت و رشد کافی بوته‌ها، جداسازی ریزوبیوم از گره‌های تشکیل‌شده روی ریشهٔ هر گیاه انجام گرفت. از هر ریشهٔ گیاه تعدادی گرهٔ بزرگ، کامل و صورتی‌رنگ انتخاب و پس از ضدعفونی سطحی در اتانول ۷۰ درصد (به مدت یک دقیقه) و هیپوکلریت سدیم ۱ درصد (به مدت سه دقیقه) و شست‌وشو با آب مقطر سترون (سه مرتبه)، هر گره در ۱۰ میکرولیتر آب مقطر سترون له شد. از سوسپانسیون جریان تودهٔ ریزوبیومی داخل گره در قطرهٔ آب، با یک لوپ سترون روی محیط‌های TY Agar یا YMA(Vincent, 1970)، کشت شد. محیط‌های کشت در انکوباتور به مدت ۱۲۰ ساعت با دمای ۲۸ºC نگهداری شدند تا باکتری‌ها به اندازهٔ کافی رشد کنند. از هر نمونهٔ کشت‌شده، یک کلونی باکتریایی سفید، لعابی و با حاشیهٔ نامنظم رشدکرده بر روی محیط کشت، انتخاب شد و روی محیط TY کشت شد. برای نگهداری طولانی مدت جدایه‌های ریزوبیومی، یک میلی‌لیتر از هر جدایه رشدکرده در محیط کشت TY مایع به لوله‌های کرایو محتوی ۵۰۰ میکرولیتر گلیسرول سترون‌شده انتقال یافت و بلافاصله پس از انجماد کامل در نیتروژن مایع، به فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شد.

استخراج DNA از جدایه‌های ریزوبیومی

برای استخراج DNA از جدایه‌های ریزوبیومی روش تغییریافتهٔ فرانکلین و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد. مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر جدایه ۲۴ ساعت رشدیافته در محیط TY مایع، به مدت دو دقیقه در ۱۴۰۰۰rpm رسوب داده و مایع رویی حذف شد. به رسوب باکتریایی هر لوله مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (20 mM Tris-HCl pH 7.8, 20 mM EDTA pH 8, 0.5% SDS) اضافه و پس از ورتکس، سوسپانسیون حاصل برای لغزنده شدن دیوارهٔ سلولی باکتری‌ها، مدت ده دقیقه جوشانیده شد. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر (هم‌حجم بافر استخراج) از مخلوط alchol Chloroform/Isoamyl با نسبت ۲۴:۱ به لوله‌ها اضافه شد و پس از چند بار وارونگی به منظور مخلوط‌کردن محتویات درون لوله‌ها، نمونه‌ها به مدت ده دقیقه در ۱۴۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. فاز بالای نمونه به لولهٔ جدید منتقل و به ازای هر ۱۰۰ میکرولیتر از فاز رویی، دو میکرولیتر RNaseA 10mg/ml (Sigma Co. R-4875) به آن اضافه و دو ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از این مرحله، هر نمونه دو بار با Chloroform/Isoamyl alchol پالایش و با مقدار برابر خود با Isopropanol سرد مخلوط شد. سپس نمونه‌ها ده دقیقه با دور ۱۴۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. مایع رویی بادقت حذف و رسوب DNA دو بار با ۳۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۰ درصد شست‌وشو شد. پس از خشک‌شدن رسوب DNA به کمک دستگاه غلیظ‌کنندهٔ DNA (Concentrator DNA)، ۲۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار استریل به هر نمونه اضافه شد تا رسوب DNA در آب حل شود. پس از تعیین کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج‌شدهٔ اصلی به روش اسپکتروفتومتری، با افزودن آب دو بار تقطیرشدهٔ سترون، غلظت DNA هر نمونه در ۲۵ نانوگرم در هر میکرولیتر، مجدداً به روش

اسپکتروفتومتری، تنظیم شد. نمونه‌های DNA تا قبل از استفاده در واکنش‌های PCR در فریزر ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تکثیر قطعه 16S rDNA و هضم با استفاده از آنزیم‌های برشی محدودکننده

برای تکثیر قطعهٔ 16S rDNA جدایه‌های ریزوبیومی از جفت آغازگر fD1 (5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′) و rD1 (5′-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3′) استفاده شد(Weisburg, *et al*., 1991). واکنش PCR برای هر نمونه به‌صورت یک مخلوط ۱۵ میکرولیتری شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر۱۰ برابر حاوی کلریدمنیزیم ۱۵ میلی‌مولار، یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase، ۰/۳ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs و ۲ میکرولیتر از DNA استخراج‌شدهٔ هر نمونه (حدود۵۰ نانوگرم) تهیه شد. به هر نمونه یک قطره روغن معدنی سترون اضافه شد و تکثیر در دستگاه ترموسایکلر اپندورف مدل master cycler gradient انجام گرفت. برنامهٔ انجام واکنش PCR شامل یک چرخه در ۹۵° درجهٔ سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، ۳۰ چرخه در ۹۴° سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه بود. محصول PCR نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱/۲ درصد با بافر TBE الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید، از ژل با اشعهٔ ماوراء بنفش عکسبرداری شد. در واکنش PCR-RFLP، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه در واکنشی جداگانه با یک میکرولیتر (۵واحد) از هر یک از آنزیم‌های برشی RsaI ، AluI ، HaeIII و Hin61 (Fermantas Co.)، ۱/۵ میکرولیتر بافر مربوطه و ۲/۵ میکرولیتر آب در یک واکنش ۱۵ میکرولیتری هضم شد. پس از نگهداری سه ساعتهٔ واکنش در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد ، قطعات هضم‌شده روی ژل پلی‌اکریل‌آمید با بافر Tris-Glycin از یکدیگر تفکیک شدند.

همسانه‌سازی و توالی‌یابی قطعه 16S rDNA

برای تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعات DNA حاصل از تکثیر مکان 16S rDNA، ابتدا قطعات DNA نامبرده مطابق فرمول کیتIns TA clone™ PCR, #K1214 (Farmantas Co.)در ناقل pTZ57R/T همسانه‌سازی و پس از انتقال به باکتری Eschericia coli MC1061 ، کلونی‌هایی با قطعهٔ کلون‌شده به‌روش غربالگری سریع (Rapid screening) و Colony PCR انتخاب شدند (Titus, 1991). همسانه‌های منتخب برای توالی‌یابی به شرکت Macrogen کرهٔ جنوبی ارسال شد. پس از دریافت نتایج تعیین توالی در هر دو جهت مستقیم و معکوس هر قطعهٔ DNA، الکتروگرام توالی هر نمونه با نرم‌افزار Chromas version 2.2 و DNA MAN version 6.03.66 بررسی شد و پس از اطمینان از کیفیت مناسب توالی با برنامهٔ BLASTN، توالی بررسی‌شده با توالی‌های نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن مقایسه شد. عملیات مونتاژ قطعات توالی‌یابی شده، همردیف‌سازی و تعیین رابطهٔ ژنتیکی توالی نمونه‌های مختلف با نرم‌افزار DNA MAN انجام گرفت.

ردیابی ژن *nodC* و *nifH* در جدایه‌ها

ژن *nodC* از دسته ژن‌های عمومی *nod* بوده و محصول پروتئینی این ژن، N-acetylglucosaminyl Transferase هدایت تولید chitinoligomers از پیش‌مادهٔ UDP-N-acetyl-D-glucosamine را برعهده دارد.

Vance, C. P. (2002) برای تکثیر قطعهٔ قسمتی از ژن *nodC* از جفت آغازگر *nodCF* (AYGTHGTYGAYGACGGTTC) و (CGYGACAGCCANTCKCTATTG) nodCI استفاده شد (Laranjo, *et al*., 2001). ژن nifH زیرواحد II آنزیم نیتروژناز به‌نام دی‌نیتروژناز ردوکتاز را کد می‌کند که حضور این ژن نشانهٔ تثبیت نیتروژن مولکولی در جدایه‌هاست (Hennecke *et al*., 1985). در این تحقیق، از جفت آغازگر nifH-1 (CGTTTTACGGCAAGGGCGGTATCGGCA) و nifH-2 (TCCTCCAGCTCCTCCATGGTGATCGG)،

به منظور ردیابی این ژن به روش PCR در جدایه‌های آزمایشی استفاده شد (Perret & Broughton, 1998).

در این آزمایش‌ها، جدایهٔ *M.cicer* (اهدایی دکتر Marco Bazzicalupo دانشگاه Universita'degli Studi di Firenze فلورانس، ایتالیا) شاهد مثبت و آب شاهد منفی بود و شرایط اجرای واکنش‌های PCR مطابق توصیه‌های منابع علمی فراهم شد. پس از پایان واکنش PCR، محصول هر واکنش PCR با سه میکرولیتر از بافر بارگذاری مخلوط و با نشانگر ۱۰۰ bp روی ژل آگارز ۱/۲ درصد با ۱۰۰ ولت و مدت یک‌ونیم ساعت الکتروفورز شد. پس از رنگ‌آمیزی به مدت ۱۰ دقیقه در محلول اتیدیوم‌برماید، از ژل عکسبرداری شد.

تعیین قدرت گره‌سازی جدایه‌های همزیست نخود

برای اطمینان از توانایی همزیستی جدایه‌های به‌دست آمده با نخود، مایه‌زنی گیاهچه‌های نخود با پنج سوش انتخابی از بین جدایه‌ها در گلخانه انجام گرفت. ابتدا نمونه‌هایی از جدایه‌های ریزوبیومی نخود، مربوط به مناطق مختلف غرب کشور CKr8 (کرمانشاه)، CKr16 (ماهیدشت)، CA1 (الیگودرز)، CD1 (دورود) و CB8 (بروجن) در ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت YMA مایع و دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد با تکانه (۱۲۰ دور در دقیقه) به‌مدت ۷۲ ساعت رشد داده شدند. سوسپانسون‌های باکتریایی در لوله‌های فالکون پنج دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب حاصل از هر سوش با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر سترون شست‌وشو داده شد و پس از سانتریفیوژ مجدد، رسوب باکتریایی دوباره در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر سترون به‌آرامی به حالت سوسپانسیون درآمد. در این آزمایش ۱۰ بذر نخود پس از ضدعفونی سطحی به روش قبلی جداگانه در هر پتری استریل و روی سطح کاغذ صافی استریل قرار داده شدند. نخودهای جوانه‌زدهٔ هر پتری با پنج میلی‌لیتر از جدایه‌های ریزوبیومی مایه‌زنی و جوانه‌های پتری ششم با آب مقطر (شاهد منفی) تلقیح شد. سپس ۱۰ بذر جوانه‌زدهٔ تلقیح شده با هر تیمار باکتریایی، در یک گلدان کشت و در شرایط گلخانه نگهداری شدند. پس از حدود دو ماه، ریشه‌ها از هر گلدان خارج شد و پس از شست‌وشوی ریشه‌های گیاهان درون هر گلدان، تعدادی گرهٔ بزرگ از ریشه‌های هر تیمار جدا و پس از استریل کردن، جداسازی ریزوبیوم و استخراج DNA از آنها به روش‌های قبلی انجام گرفت. برای تعیین مطابقت جدایه‌های به‌دست‌آمده از کشت گره‌های این آزمایش با باکتری تلقیح‌شده، از تکنیک PCR-RFLP استفاده شد. ابتدا توالی 16S-rRNA سایر جدایه‌های به‌دست آمده از گره‌های هر گلدان با استفاده از آغازگرهای اختصاصی fD1 و rD1 تکثیر شد و محصول PCR هریک با آنزیم *HaeIII* برش داده شد تا الگوی باندی این جدایه‌های به‌دست آمده با الگوی جدایه‌های تلقیح‌شده مقایسه شود.

نتایج

در این مطالعه از گره‌های تشکیل شده بر روی ریشهٔ گیاهان نخود کشت‌یافته در نمونه خاک‌های جمع‌آوری شده از استان‌های کرمانشاه، همدان، لرستان و چهارمحال‌وبختیاری، ۸۷ جدایه ریزوبیومی به‌دست آمد (جدول۱). به دلیل کندی رشد جدایه‌های ریزوبیومی نخود در مقایسه با سرعت رشد زیاد باکتری‌ها و قارچ‌های ساپروفیت در محیط کشت، خالص‌سازی باکتری‌های همزیست از همهٔ گره‌های به‌دست‌آمده ممکن نشد.

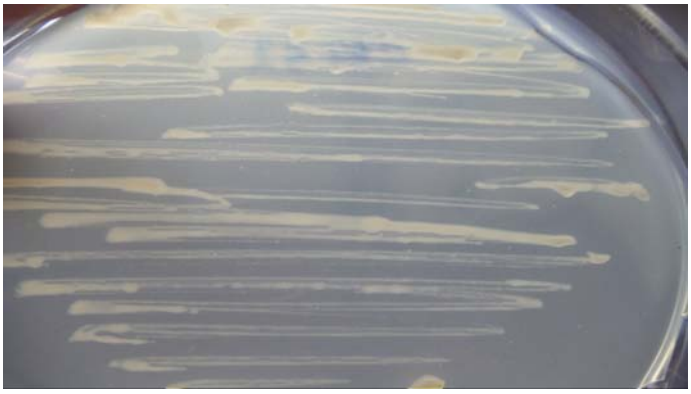
بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و گره‌سازی جدایه‌ها

جدایه‌های ریزوبیومی به دست‌آمده از نخود در خاک استان‌های کرمانشاه، همدان، لرستان و چهارمحال‌وبختیاری به لحاظ سرعت رشد و تشکیل پرگنه بر روی محیط کشت TY و YEMA در دو گروه مستقل از هم قرار گرفتند. بیشتر جدایه‌ها سرعت رشد متوسطی داشتند و مدت زمان لازم برای رشد بهینهٔ پرگنهٔ آنها ۱۲۰ـ۹۶ ساعت تخمین‌زده و در گروه اول طبقه‌بندی شدند. اعضای این گروه کلونی‌های کوچک، تقریباً کروی و شفاف بر روی محیط کشت تشکیل دادند که با خصوصیات مورفولوژیکی کلونی باکتری‌های ریزوبیومی مرجع از جنس *Mesorhizobium* شباهت داشتند (شکل۱).

گروه دوم شامل جدایه‌های CN1, CN6, CN7, CN18, CA1, CA3 با سرعت رشد بالا بودند و مدت زمان لازم برای رشد مناسب پرگنه‌ها ۴۸ ساعت بود. پرگنه‌های تشکیل‌شده بزرگ، نامنظم و لعاب‌دار بودند و

به لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی با پرگنه جدایه‌های مرجع جنس *Mesorhizobium* تفاوت داشتند.

هر یک ازجدایه‌های CKr8، CKr16، CD1 و CB8 در آزمایش تعیین قابلیت گره‌زایی، در ریشه‌های نخود گره‌های مشخصی به‌وجود آوردند که در بازیابی مجدد از گره‌ها، الگوی PCR-RFLP مشابه با جدایه‌های تلقیح‌شده داشتند. در ریشهٔ بوته‌های تلقیح‌شده با CA1 گره‌های سفیدرنگ و ریزی تشکیل شد که باکتری جدا شده به لحاظ مورفولوژیکی و الگوی PCR-RFLP با جدایه CA1 متفاوت بود.



شکل۱. رشد یک هفته‌ای کلونی جدایه CKr16 روی محیط کشت TY.

جدول۱. مشخصات جدایه‌های ریزوبیومی نخود جمع‌آوری‌شده از نمونه‌های خاک استان‌های کرمانشاه، لرستان و چهارمحال‌وبختیاری

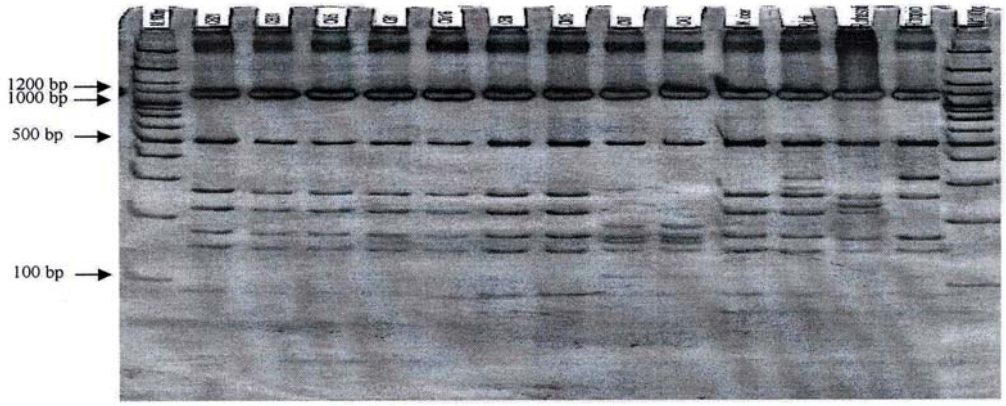
نمونهٔ خاک	محل جمع‌آوری	سابقهٔ کشت نمونهٔ خاک	نام جدایه
۱	کرمانشاه	نخود	CKr1, CKr2, CKr4, CKr5,CKr6, CKr8, Ckr9, CKr10
۲	سنقر (کرمانشاه)	نخود و اسپرس	CKr11, CKr12, CKr13, CKr14, CKr15
۳	ماهیدشت (کرمانشاه)	نخود و لوبیا	CKr16, CKr17, CKr18, CKr19,CKr20
۴	کرمانشاه (مسیر کرمانشاه به ایلام)	نخود و لوبیا و عدس	CKr30,CKr31,CKr32,CKr33,CKr34,CKr35,CKr36,CKr37,CKr38, Ckr39,CKr40,CKr41,CKr42,CKr43,CKr44,CKr45,CKr46,CKr47, CKr48,CK49
۵	هرسین (کرمانشاه)	نخود و لوبیا و عدس	CKr50,CKr51,CKr52,CKr53,CKr54,CKr55,CKr56,CKr57, CK58
۶	خرم‌آباد	لوبیا	CKh1, CKh2, CKh3, CKh4, CKh5, CKh6
۷	الیگودرز (لرستان)	لوبیا و عدس	CA1, CA2, CA3
۸	نورآباد (لرستان)	عدس	CN1, CN4, CN6, CN7, CN15, CN18
۹	دورود (لرستان)	لوبیا و اسپرس	CD1, CD2, CD5
۱۰	فیروزان (همدان)	یونجه	CHa1,CHa2, CHa3, CHa4, CHa5, Cha7, Cha8, Cha9, Cha10, Cha11
۱۱	امام‌قیس (چهارمحال‌وبختیاری)	لوبیا	CBr20, CBr22, CBr23, CBr24, CBr25, CBr26
۱۲	بروجن (چهارمحال‌وبختیاری)	لوبیا	CB1, CB8, CB11, CB17, CB21, CB31

بررسی خصوصیات ژنتیکی جدایه‌ها

استفاده از تکنیک PCR – RFLP – 16S rDNA

در شناسایی و تفکیک گونه‌های ریزوبیومی همزیست با جدایه‌های آزمایشی، با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی fD1 و rD1 قطعهٔ ۱۴۸۲bp مربوط به زیرواحد کوچک ریبوزیوم، در همهٔ جدایه‌های نخود وگونه‌های مرجع تکثیر شد (شکل‌های ۲ و۳).

شکل۲. قطعهٔ ۱۴۸۲ جفت بازی تکثیرشده 16S rDNA با آغازگرهای fD1 / rD1 در برخی از جدایه‌های ریزوبیومی جمع‌آوری شده از جمعیت نخود در خاک چند منطقهٔ ایران(کد نمونه‌ها در تصویر مشخص شده است).



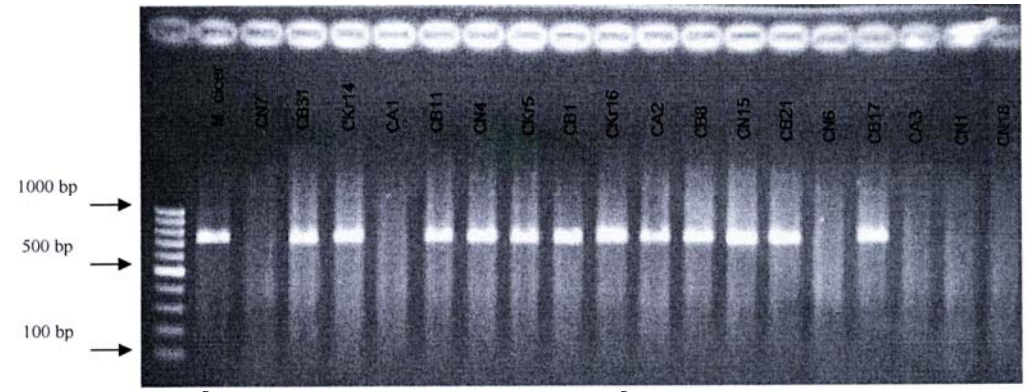
شکل۳. الگوی هضم آنزیمی قطعهٔ تکثیرشده 16SrDNA با جفت آغازگر rD1 / fD1 به‌وسیلهٔ آنزیم برشی *HeaIII* در جدایه‌های جمع‌آوری شده از جمعیت نخود در خاک چند منطقهٔ ایران (کد نمونه‌ها در تصویر مشخص شده است).

هضم آنزیمی قطعهٔ 16S rDNA جدایه‌ها در آزمون PCR-RFLP، منجر به گروه‌بندی جدایه‌های آزمایشی در دو گروه مستقل شد.

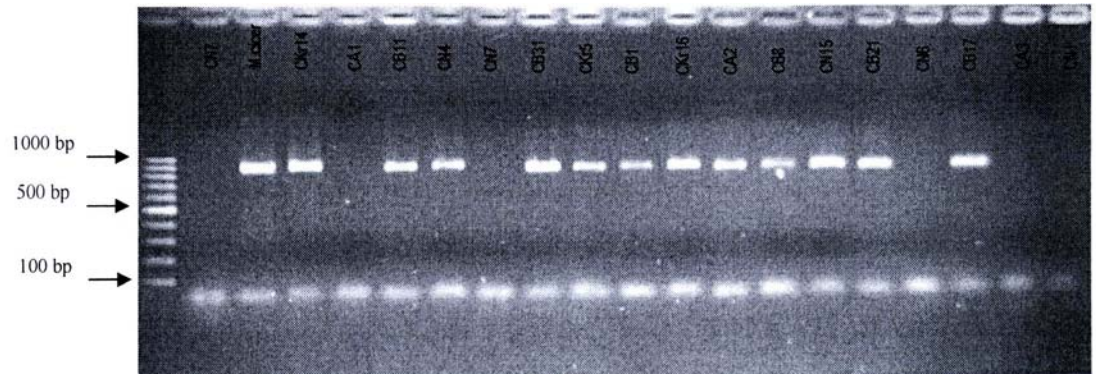
تعداد ۸۱ جدایه با پرگنه‌های رشد متوسط، الگوی باندی مشابه استرین *M. cicer* داشتند، ولی الگوی باندی جدایه‌های گروه دوم شامل جدایه‌های CN1, CN6, CN7, CN18, CA1, CA3 متفاوت بود.

ردیابی ژن‌های *nodC* و *nifH* در جدایه‌های ریزوبیومی نخود

با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی *nodC1 / nodC2* ، یک قطعه ۹۳۰bp فقط در جدایه‌های گروه اول تکثیر شد (شکل۵). در بررسی وجود ژن تثبیت نیتروژن *nifH* نیز با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی *nifH1/nifH2* یک قطعهٔ ژنی bp ۷۸۰ از جدایه‌های گروه اول به‌دست آمد که در گروه دوم این قطعه تکثیر نشد (شکل۴).



شکل۴. قطعهٔ ۷۸۰ جفت بازی تکثیرشده ژن *nifH* با آغازگرهای *nifH1* و *nifH2* در جدایه‌های جمع‌آوری شده از جمعیت نخود در خاک مناطق ایران(کد نمونه‌ها در تصویر مشخص شده است).

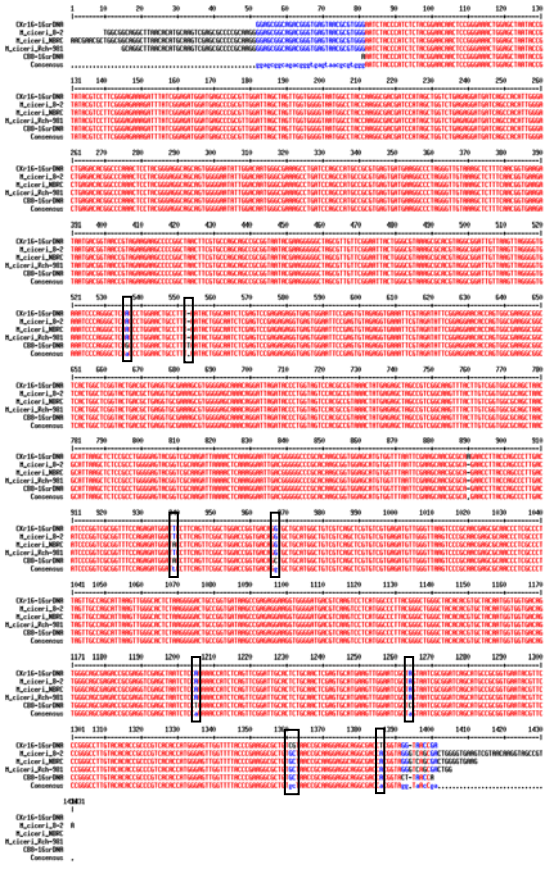


شکل۵. قطعهٔ ۹۳۰ جفت بازی تکثیرشدهٔ ژن *nodC* با آغازگرهای *nodC1* و *nodCF* در جدایه‌های جمع‌آوری شده از جمعیت نخود در خاک مناطق ایران(کد نمونه‌ها در تصویر مشخص شده است).

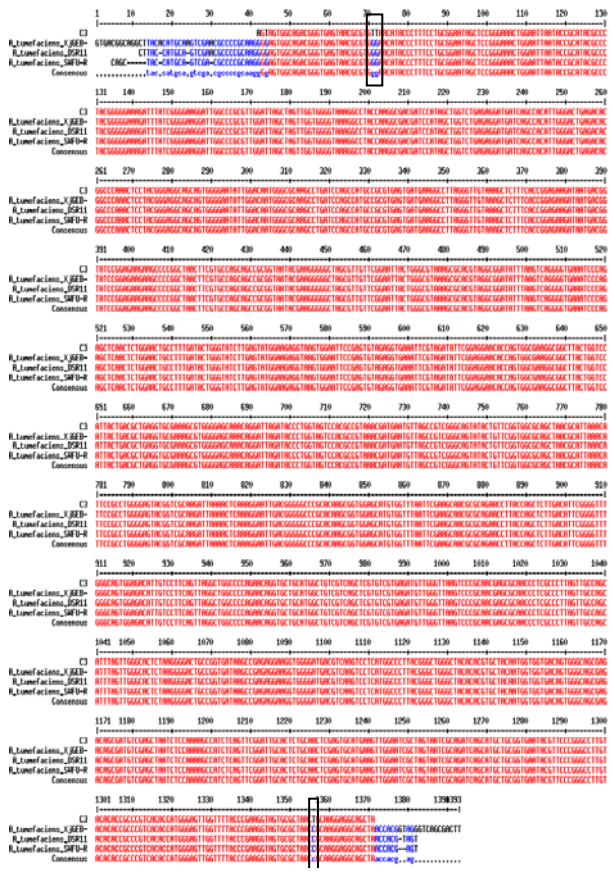
براساس نتایج حاصل از بررسی‌های خصوصیات مورفولوژیکی و PCR – RFLP – 16S rDNA و بررسی وجود ژن‌های *nodC* و *nifH* در جدایه‌ها، درمجموع سایر جدایه‌های ریزوبیومی نخود در دو گروه مستقل تفکیک شدند؛ گروه اول شامل سایر نمونه‌ها با کلونی متوسط و گروه دوم، جدایه‌های CN1, CN6, CN7, CN18, CA1, CA3 با کلونی‌های بزرگ.

تعیین ترادف نوکلئوتیدی ناحیهٔ 16SrDNA و ژن‌های *nodC* و *nifH* جدایه‌های ریزوبیومی نخود

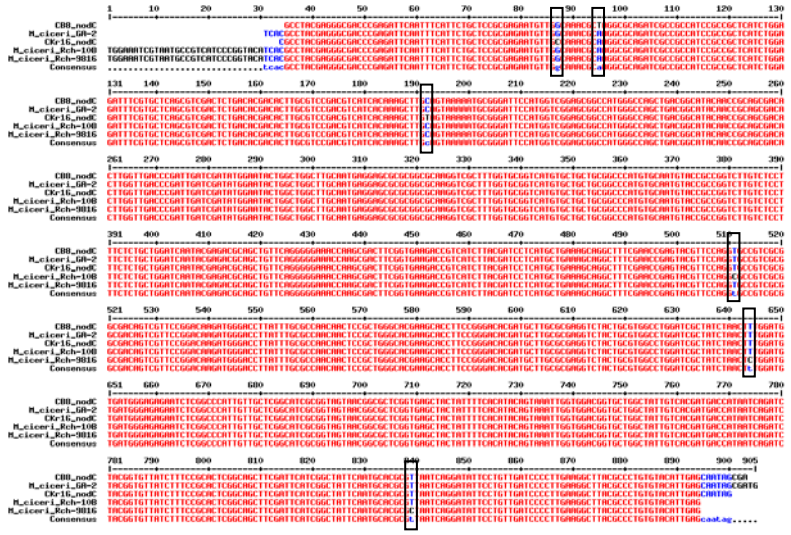
برمبنای نتایج حاصل از همردیف‌سازی توالی ناحیهٔ 16S rDNA دو نماینده به نام‌های CKr16 (accession no.JX891458) و CB8 (accession no.JX891459) از گروه اول و یک نماینده به نام CA3 از گروه دوم با توالی‌های مشابه در استرین‌های مرجع موجود در بانک ژن، جدایه‌های گروه اول شباهت زیادی به گونهٔ *M. cicer* دارند (شکل۶)، در حالی‌که جدایه‌های گروه دوم نزدیک‌به ۹۹ درصد مشابه*Agrobactrium tumefacient* بودند (شکل۷). این تشابه برای بخشی از ژن *recA* در جدایه گروه دوم با همین ژن در *A. tumefacient* تقریباً ۱۰۰درصد بود (اطلاعات منتشر نشده). توالی‌های قطعهٔ ۹۳۰ نوکلئوتیدی بخشی از ژن nodC نمونه‌های CKr16 (accession no.JX885708) و CB8 (accession no.JX885707) و نیز قطعه ۷۸۰ نوکلئوتیدی قسمتی از ژن *nifH* جدایه‌های CKr16 (accession no.JX885706) و CB8 (accession no.JX885705) ، به اندازهٔ ۹۹ درصد با توالی ژن‌های *nodC* و *nifH* جدایه‌های شناخته‌شدهٔ *M. cicer* (شکل۸ و ۹) همولوژی نشان دادند.



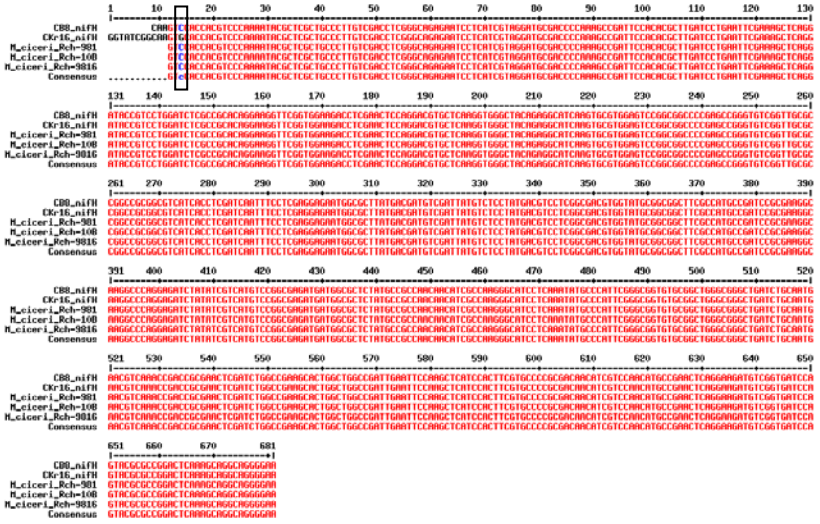
شکل۶. مقایسهٔ توالی قسمتی از 16SrDNA تکثیرشده با جفت آغازگر rD1 / fD1 در جدایه ریزوبیومی نخود CKr16 (accession no.JX891458) با جدایه‌های موجود در بانک ژن (NCBI)، شباهت زیادی به گونهٔ *Mesorhizobium cicer* داشت.



شکل۷. مقایسهٔ توالی قسمتی از 16SrDNA تکثیرشده با جفت آغازگر rD1 / fD1 در جدایه ریزوبیومی نخود CA3 با جدایه‌های موجود در بانک ژن (NCBI)، شباهت زیادی به گونهٔ *Agrobacterium tumefaciens* داشت.



شکل۸. توالی قسمتی از ژن *nodC* تکثیرشده با جفت آغازگر *nodCF/nodC1* در جدایه ریزوبیومی نخود (accession CKr16 no.JX885708) با جدایه‌های موجود در بانک ژن (NCBI)، شباهت زیادی به گونهٔ *Mesorhizobium cicer* داشت.



شکل۹. مقایسهٔ توالی قسمتی از ژن *nifH* تکثیرشده با جفت آغازگر *nifH1/nifH2* در جدایه ریزوبیومی نخود (accession CKr16 no.JX885706) با جدایه‌های موجود در بانک ژن (NCBI)، شباهت زیادی به گونهٔ *Mesorhizobium cicer* داشت.

بحث

از بررسی گونه‌های ریزوبیومی همزیست با گیاه نخود جمع‌آوری شده از استان‌های کرمانشاه، همدان، لرستان و چهارمحال‌وبختیاری نتیجه شد که تنوع گونه‌های ریزوبیومی همزیست نخود در این مناطق بسیار محدود و گونهٔ غالب این مناطق بوده است. *M. cicer*

مجموعه عوامل تکثیر ناحیهٔ 16S rDNA مربوط به زیرواحد کوچک ریبوزیوم (قطعه مورد انتظار۱۴۸۲bp) در سایر جدایه‌های جمع‌آوری شده و نیز استرین‌ها و گونه‌های ریزوبیومی مرجع و همچنین تأیید وجود ژن دخیل در گره‌سازی (*nodC*) با جفت آغازگر اختصاصی nodC1/ nodC2 (قطعهٔ مورد انتظار۹۳۰bp) و ژن مؤثر در تثبیت نیتروژن (*nifH*) با جفت آغازگر اختصاصی *nifH1* / *nifH2* (قطعهٔ مورد انتظار۷۸۰bp) در جدایه‌های گروه اول و باکتری‌های ریزوبیومی مرجع، ریزوبیومی بودن ماهیت جدایه‌ها را اثبات می‌کنند. براساس نتایج برای تعیین دامنهٔ میزبانی در ریزوبیوم‌ها می‌توان از مقایسه توالی چند ژن شناخته‌شده مانند ژن‌های *nodC* و *nifH* استفاده کرد (Rivas *et al*., 2007; Laranjo *et al*., 2001)، که وجود یک کپی از هر یک از این ژن‌ها

در گونه‌های جنس *Mesorhizobium* و دو گونهٔ اختصاصی گره‌ساز در نخود به اثبات رسیده است (Schlaman *et al*., 1998). این روش تفکیک جدایه‌ها در مورد جدایه‌های همزیست با نخود نیز به‌کار رفته است. استفاده از PCR-RFLP نیز برای گروه‌بندی و تعیین گونه‌های ریزوبیومی روشی مناسب معرفی شده است (Harun-or Rashid *et al*., 2009) در این پژوهش، گروه‌بندی جدایه‌ها براساس روش PCR-RFLP-16SrDNA و تعیین توالی نوکلئوتیدی نماینده‌هایی از هر گروه و همردیف‌سازی توالی این قطعات با توالی‌های مشابه استرین‌های شناخته‌شده موجود در بانک ژن، تعلق جدایه‌های گروه اول به *M. ciceri* و نیز همولوژی گروه دوم به *A. tumefaciens* را تأیید کرد.

در این بررسی، غالب بودن *M. ciceri* در نقش همزیست نخود در مناطق مختلف غربی ایران مشخص شد. براساس نتایج حاصل از بررسی گونه‌های ریزوبیومی همزیست با گیاه نخود در برخی از مناطق کشور تونس، تنوع ژنتیکی گونه‌های همزیست با گیاه نخود کم است و فقط دو گونهٔ *M. cicer* و *M. mediterranum* دراین مناطق قدرت گره‌سازی در ریشه را دارند (Alexandre *et al*., 2009)؛ حتی در نواحی نیمه‌خشک تونس همزیست غالب نخود فقط گونهٔ *M. mediterranum* بود (Ben Romdhane *et al*., 2008). کمبود تنوع ریزوبیوم‌های همزیست با نخود را به سابقهٔ طولانی کشت نخود در این مناطق (Alexandre, *et al*., 2009)، وجود گونه‌های وحشی نخود در نواحی نامبرده و واکنش بسیار اختصاصی ریزوبیوم‌های نخود با میزبان خود نسبت داده‌اند (Laranjo *et al*., 2004). در مقابل، گونه‌های ریزوبیومی همزیست با نخود در خاک‌های اسپانیا و پرتغال تنوع بالایی داشتند، طوری‌که در یکی از این مطالعات فقط ۳۳ درصد از کل جدایه‌های بررسی شده از گونه‌های *M. cicer* و *M.* mediterranum و باقی جدایه‌ها به گونه‌های *M. huakuii* و *M. amorphea* تعلق داشتند (Laranjo *et al*., 2004). گره‌سازی این جدایه‌ها در ریشهٔ نخود پیش‌بینی نمی‌شد، زیرا گیاهان میزبان اختصاصی آنها به‌ترتیب *Astragalus sinicus* و *Amorphae fruticosa* نامبرده شده است که در منطقه وجود نداشتند. بنابراین قرارگیری جدایه‌های نامبرده در گونهٔ جدید پیشنهاد شد (Laranjo *et al*., 2004). تنوع بالای گونه‌های *Mesorhizobium* در اسپانیا و پرتغال را به محدود بودن کشت نخود، فقدان گونه‌های وحشی نخود در این مناطق و اختصاصی بودن میزبان ریزوبیوم‌های نخود نسبت داده‌اند؛ چون به‌نظر می‌رسد در حضور میزبان اصلی تنوع ریزوبیوم‌های همزیست کاهش یابد (Michiels *et al*., 1994). پراکنش و توزیع گونه‌های ریزوبیومی در مناطق مختلف اتفاقی نیست (Alexandre *et al*., 2009; Laranjo *et al*., 2004) و عوامل محیطی از جمله، دما، رطوبت و pH نیز نقش بسیار کلیدی در بقاء جمعیت گونهٔ باکتری دارند (Alexandre *et al*., 2009).

توالی‌های *nifH* و *nodC* دو نماینده از گروه اول همزیست‌های نخود در ایران (CKr16 و CB8) با توالی جدایه‌های *M.cicer* سایر کشورها ،ذخیره شده در بانک اطلاعاتی ژنومی NCBI سایر کشورها، بسیار شباهت داشتند. ولی به غیر از *M.cicer*، گونهٔ *M. mediterranum* و چند گونهٔ ریزوبیومی دیگر حامل ژن‌های *nifH* و *nodC* شناسایی شدند که قدرت گره‌سازی در نخود را نداشتند (Ben Romdhane ; Alexandre *et al*., 2009 *et al*., 2008). بدین ترتیب، انتظار می‌رفت که *M. mediterranum* نیز در بررسی جدایه‌های نخود ایرانی ردیابی شود که اینگونه نبود. از جمله دلایل در ارتباط با فقدان گونهٔ *M. mediterranum* بین جدایه‌های بررسی‌شدهٔ ایرانی، تعداد کم جدایه‌های آزمایشی در این پژوهش بود؛ احتمالاً با افزایش تعداد جدایه‌ها از مناطق اقلیمی گوناگون در ایران، اطلاعات بهتری از حضور یا فقدان این ریزوبیوم در خاک‌های ایران به‌دست خواهد آمد. کاهش جمعیت *M. mediterranum* در مقابل افزایش گونه‌های بی‌تأثیر در همزیستی با شرایط کمبود رطوبتی نیز ممکن‌است از دلایل دیگر این فقدان باشد (Ben Romdhane *et al*., ; Alexandre *et al*., 2009 2008). هشت جدایه از مجموع ۳۸ جدایهٔ همزیست نخود آزمایشی در این تحقیق *A. tumefaciens* تشخیص داده شدند که همگی از خاک استان لرستان جداسازی شده بودند. از جمله مهمترین دلایل گره‌سازی *A. tumefaciens* در گیاه نخود، افزایش جمعیت این باکتری در مناطق کم‌رطوبت است. براساس نتایج

تحقیقات در شرایط مرطوب، *A. tumefaciens* قادر به گره‌سازی در نخود نیست؛ اما در شرایط کمبود رطوبت این گونه در نخود گره ایجاد می‌کند(Ben Romdhane *et al.*, 2008). در پژوهش‌های قبل نیز همراهی *A. tumefaciens* با گونه‌های دیگر ریزوبیوم در گرهٔ ریشهٔ گیاهان تیرهٔ لگوم از جمله نخود گزارش شده بود (Mrabet *et al*., 2006)، لیکن دربارهٔ تثبیت نیتروژن در این گره‌ها تردید جدی وجود دارد (Ben Romdhane *et al*., 2008). فقدان ژن‌های *nifH* و *nodC* در جدایه‌های *Agrobactrium* موجود در این تحقیق نیز نشان می‌دهد که گره‌سازی و تثبیت نیتروژن مولکولی این استرین‌ها در گیاه نخود اثبات نشده‌است و به بررسی بیشتر نیاز دارد. در این تحقیق فقط گونهٔ ریزوبیومی *M. ciceri* همزیست نخود تشخیص داده شد اما تعداد کم جدایه‌ها مانع از آن بود که از فقدان گونه‌های دیگر sp. *Mesorhizobium* اطمینان حاصل شود. به دلیل مؤثربودن منطقهٔ جغرافیایی، نوع و pH خاک در پراکنش گونه‌های *Mesorhizobium* همزیست با نخود (Alexandre *et al*., 2009)، جمع‌آوری نمونه‌های بیشتر از مناطق گوناگون اقلیمی برای تعیین ساختار جمعیتی ریزوبیوم‌های نخود ایران پیگیری خواهد شد.

REFERNCES

1. Alexandre, A., Brígido, C., Laranjo, M., Rodrigues, S. & Oliveira, S. (2009). A survey of chickpea rhizobia diversity in Portugal reveals the predominance of species distinct from *Mesorhizobium ciceri and Mesorhizobium mediterraneum*. *Microbial Ecol*, 58, 930-941.
2. Asgharzadeh, A., Rastin, N. & Mohammadi, M. (2002). Nitrogen fixation potential of rhizobium strains associated with two cultivars of Chickpea. *Plant Nutr*, 92, 660-661.
3. Ben Romdhane, S., Aouani, M. E. & Mhamdi, R. (2007). Inefficient nodulation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in the arid and Saharan climates in Tunisia by *Sinorhizobium meliloti* biovar *medicaginis*. *Ann. Microbiol*, 57, 15–20.
4. Ben Romdhane, S., Aouani, M .E ., Trabelsi, M., de Lajudie, P. & Mhamdi, P. (2008). Selection of high nitrogen-fixing rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) for semi-arid Tunisia. *J. Agron. Crop. Sci*, 194, 413–420.
5. Broughton, W. J. & Dilworth, M. J. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem. J*., 125, 1075–1080.
6. Franklin, R. B., Taylor, D. R., & Mills, A. L. (1999). Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Microbiol. Methods*, 35, 225-235.
7. Harun-or Rashid, M., Abdus Sattar, M., Imtiaz Uddin, M. & Young, J. P. W. (2009). Molecular characterization of symbiotic root nodulation of symbiotic root nodulting rhizobia isolation form Lentil (*Lens Culinaris* Medik). *EJEAF Che*., 8, 602–612.
8. Hennecke, H., Kaluza, K., Thöny, B., Fuhrmann, M., Ludwig, W. & Stackebrandt, E. (1985). Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. *Arch. Microbiol*, 142, 342-348.
9. Herridge, D. F., Marcellos, H., Felton, W. L., Turner, G. L & Peoples, M. B. (1995). Chickpea increases soil N fertility in cereal systems through nitrate sparing and N2 fixation. *Soil Biol. Biochem*, 27, 545-551.
10. Jamila, M., Berraho, E. & Sanjuan, J. (2002). Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. *Agronomie*, 22, 321–329.
11. Jarvis, B. D. Van Berkum, W., P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J.C. & Gillis, M. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Rhizobium ciceri*, tianshanense. Int**.** *J. Syst. Bacteriol*, 47, 895–898.
12. Khazaie, H. R., Parsa, M. & Hosseinpanahi, F. (2008). Effects of inoculation of *Rhizobium* native strains on nodulation of Kabuli and Dessi chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes in different moisture levels in vegetative stage. *Iran. J. Field Crops Res*, 6, 89-97.
13. Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouinb, P. & Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, 147, 981–993.
14. Laranjo, M., Rodrigues, R., Alho, L. & Oliveira, S. (2001). Rhizobia of chickpea from southern Portugal: symbiotic efficiency and genetic diversity. *J. Appl. Microbiol*, 90, 662–667.

15. Laranjo, M., Machado, J., Young, J. P. W. & Oliveira, S. (2004). High diversity of chickpea *Mesorhizobium* species isolated in a Portuguese agricultural region. *FEMS Microbiol. Ecol*, 48, 101–107.
16. Laranjo, M., Alexandre, A., Rivas, R., Velazquez, E., Young, J. P. W. & Oliveira, S. (2008). Chickpea rhizobia symbiosis genes are highly conserved across multiple *Mesorhizobium* species. *FEMS Microbiol. Ecol,* 66, 391–400.
17. Maatallah, J., Berraho, E. B., Munoz, S., Sanjuan, J. & Lluch, C. (2002). Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *J. Appl. Microbiol*, 93, 531–540.
18. Michiels, J., D'hooghe, I., Verreth, C., Pelemans, H. & Vanderleyden, J. (1994). Characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli *nifA* gene, a positive regulator of *nif* gene expression. *Arch. Microbiol*, 161, 404–408.
19. Mrabet, M., Mnasri, B., Romdhane, S. B., Laguerre, G. L., Aouani, M. E., & Mhamdi, R. (2006). *Agrobacterium* strains isolated from root nodules of common bean specifically reduce nodulation by *Rhizobium gallicum*. *FEMS Microbiol. Ecol*., 56, 304–309.
20. Mutch, L. A. & Young, J. P. W. (2004). Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae on wild and cultivated legumes. *Mol. Ecol*, 13,2435–2444.
21. Nap, J. P. & Bisseling, T. (1990). Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: The legume root nodule. *Science*, 250, 948–954.
22. Nasr Esfahani, M., Mostajeran, A. & Emtiazi, G. (2010). The effect of drought stress on nitrogenase and antioxidant enzymes activities in nodules formed form symbiosis of Chickpea with two strains of *Mesorhizobium ciceri*. *World Appl. Sci. J*, 10, 621–626.
23. Nour, S., Fernandez, M., Normand, P. & Marel. J. C. (1994). *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate Chickpeas *(Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol*, 44, 511–522.
24. Nour, S., Cleyet-Marel, J. C., Normand, P. & Fernandez, M. P. (1995). Genomic heterogeneity of strains nodulating Chickpeas *(Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobiurn mediterraneurn* **sp.** nov. *Int. Microbiol. Soc*, 45, 640-648.
25. Perret, X. & Broughton, W. J. (1998). Rapid identification of *Rhizobium* strains by targeted PCR fingerprinting. *Plant and Soil*, 204, 21–34.
26. Rivas, R., Laranjo, M., Mateos, P.F., Oliveira, S., Molina1, E. M., & Velazquez, E. (2007). Strains of *Mesorhizobium amorphae* and *Mesorhizobium tianshanense*, carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species, constitute a novel biovar (*ciceri*) capable of nodulating *Cicer arietinum*. *Lett. Appl. Microbiol*, 44, 412-418.
27. Rokhzadi, A., Asgharzadeh, A., Darvish, F., Nour-Mohammadi, G. & Majidi, E. (2008). Influence of plant growth-promoting rhizobacteria on dry matter accumulation and yield of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) under field condition. *Amer-Euras. J. Agric. Environ. Sci*, 3, 253–257.
28. 27. Schlaman, H. R., Phillips, D. A. & Kondorosi, E. (1998). Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. PP. 361–386. *In:* H. P. Spaink, A. Kondorosi, P. J. J. Hooykaas (eds.), *The Rhizobiaceae*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
29. Soleimani, R. & Asgharzadeh, A. (2010). Effects of *Mesorhizobium* inoculation and fertilizer application on yield and yield components of rainfed chickpea. *Iranian J. Pulses*, 1, 1-8.
30. Singh K.B., Pundir, R. P. S., Robertson, L. D., van Rheene, H. A., Singh, U., Kelley, T. J., Rao, P. P., Johansen, C. & Saxena, N. P. (1997). Chickpea. pp. 100-113 In: Fuccillo D, L. Sears and P. Stapleton (eds). *Biodiversity in Trust*, Cambridge University Press, U.K.
31. Titus, D. E. (1991). Protocols and Applications Guide, 2nd ed., Promega corporation. Madison, USA.
32. Vance, C. P. 2002. Root-bacteria interactions: symbiotic nitrogen fixation. p. 839–867 In: Waisel, Y., Eshel, A. and Kafkati, U. (Ed). *Plan Roots***:** The Hidden Half. (3 rd ed). Marcel Dekker Publishers .New York.
33. Vincent, J. M. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria*. Blackwell, Oxford, UK.
34. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol*, 173, 697–703.