

## تنوع باکتری‌های ریزوبیومی جدا شده از گره‌های ریبوزومی ریشه گیاه یونجه آلفا (*Medicago sativa*) با استفاده از قطعات برشی ژن 16rRNA

شهرزاد گلابکش<sup>۱</sup>، شهرزاد خرم نژادیان<sup>۱\*</sup>، ابراهیم رجب زاده قطرمی<sup>۱</sup> و محمد رشنو<sup>۱،۳،۴</sup>

<sup>۱</sup> ایران، دماوند، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دماوند، دانشکده فنی، گروه محیط زیست

<sup>۲</sup> ایران، خرمشهر، دانشگاه علوم و فنون دریایی، دانشکده منابع طبیعی دریا، گروه شیلات

<sup>۳</sup> ایران، اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

<sup>۴</sup> ایران، اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

### چکیده

گیاه یونجه آلفا (*Medicago sativa*)، از منطقه پشمینه‌زار اندیمشک و در فصل بهار سال ۱۳۹۸ جمع‌آوری شد. پس از کشت همسانه‌های هر جدایه روی محیط آگار مغذی، ویژگی‌های میکروسکوپی بررسی شد. جهت بیان ژن 16S rDNA، باکتری‌های ایزوله شده در محیط YMA در شرایط هوازی و در دمای ۲۵-۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شدند. پرایمرهای عمومی و کامل باکتری سینوریزوبیوم بر اساس ژن 16S rRNA gene sequences از سایت NCBI استخراج و در توالی‌یابی ژن‌های باکتری‌های جداسازی شده در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. ترادف‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار Chromas Pro ویرایش و با استفاده از نرم افزار بلاست در پایگاه داده‌های NCBI مورد تجزیه و تحلیل و مقایسه قرار گرفتند. سه سویه از ریزوسفر گیاه یونجه‌ی آلفا (*Medicago sativa*) جداسازی و شناسایی شد. در بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی ۳ سویه باکتری شناسایی شد. باکتری شماره ۱ شناسایی شده گرم منفی و با ایجاد کلنی‌های کرم رنگ و برجسته، دومین باکتری گرم منفی و دارای کلنی‌های قرمز رنگ و کلنی باکتری سوم جداسازی شده از گیاه جنس یونجه آلفا (*Medicago sativa*) صورتی بود. نتایج توالی‌یابی 16S rRNA سویه جدا شده از ریزوسفر گیاه یونجه را گونه (Sequence ID= CP) *Sinorhizobium meliloti* (021215.1) (باکتری ۱) (درصد همپوشانی ۹۷ و گپ‌های بازی ۲ درصد)، باکتری دوم Sequence ID= CP-000738.1) *Sinorhizobium medicae* (باکتری ۲) (درصد همپوشانی ۹۷ و گپ‌های بازی ۲ درصد) و باکتری سوم Sequence ID= DQ-145546.1) *Sinorhizobium meliloti* (درصد همپوشانی ۹۶/۰۴ و گپ‌های بازی ۴ درصد) شناسایی شد. با توجه به نقش تثبیت‌کنندگی این باکتری‌های ریبوزومی، با تکثیر این گروه‌های باکتریایی و افزودن آن‌ها به خاک می‌توان، ضمن افزایش رشد گیاهان زراعی، استفاده از کودهای شیمیایی را کاهش داد.

واژه‌های کلیدی: تنوع، باکتری ریزوبیومی، کرهک، یونجه، ژن 16rRNA.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۷۶۳۰۱۲۲۶، پست الکترونیکی: [Khoramnejad@damavandiau.ac.ir](mailto:Khoramnejad@damavandiau.ac.ir)

### مقدمه

گیاهان خانواده لگومینوز شامل ۱۹۳۰۰ گونه از ۷۵۰ جنس، با تولید مقادیر بالای پروتئین و تثبیت مقادیر بالای ازت به دلیل همزیستی با باکتری‌های ریزوبیومی در سراسر جهان اهمیت زیادی دارند (۱). بیشتر گیاهان تیره لگوم شامل نخود، لوبیاها و شبدرها گره‌ها یا اجزای غده ای شکلی روی ریشه‌های خود دارند. این گره‌ها در شرایط کمبود

16rRNA یک ژن باکتریایی عمومی و محافظت شده با اعمال ثبت و مشخص است. این ژن با توالی ژنی در باکتری‌های مختلف در تعیین روابط فیلوژنی یا شناسایی باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد که این روش را به عنوان یکی از مفیدترین روش‌های شناسایی باکتری معرفی می‌کند (۲۲). Daduk و همکاران (۲۰۱۲) شناسایی فیلوژنیک باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن جدا شده از ریزوسفر گیاه مارچوبه با استفاده از 16rRNA (۶) و نیز استفاده از این ژن در مطالعه‌ی Omid Nasab و Khodakarmian (۲۰۱۷) در جداسازی باکتری‌های اپی‌فیت یونجه نیز گزارش شده است (۱۶). Darmawati و Fuskhah (۲۰۱۹) جداسازی باکتری‌های ریزوبیومی با استفاده از محیط کشت‌های مختلف و نقش آنها در افزایش تولید سویا را مورد بررسی قرار دادند (۷). در کشور ایران به علت تنوع آب و هوایی و نوع خاک احتمالاً سویه‌های منحصر به فردی از نظر فیلوژنی و میزان کارایی همزیستی با یونجه وجود دارد که این امر شناسایی باکتری‌های ریزوبیومی را به منظور استفاده از آنها به عنوان یک عامل بیولوژیک که با تثبیت نیتروژن، کاهش مصرف کودهای نیتروژن را به دنبال دارد را به موضوعی مهم تبدیل کرده است. علاوه بر این با توجه به توانایی تثبیت نیتروژن، می‌توان از باکتری‌های ریزوبیومی شناسایی شده در کاهش فسفات و نیتروژن پساب‌های صنعتی و شهری به عنوان یک مسیر دوستدار طبیعت استفاده کرد. از اینرو، هدف از مطالعه‌ی حاضر شناسایی تنوع باکتری‌های ریزوبیومی جدا شده از گرهک‌های ریشه گیاه یونجه آلفا (Medicago sativa) است.

### مواد و روشها

**جمع‌آوری نمونه از گرهک ریشه گیاه یونجه آلفا**  
(*Medicago sativa*): گیاه یونجه آلفا (*Medicago sativa*)، از منطقه پشمینه‌زار اندیمشک و در فصل بهار ۱۳۹۸ جمع‌آوری شد. به منظور جداسازی گرهک‌ها، ۱۵

ازت و در نتیجه آلودگی ریشه‌های موئین این گیاهان با دسته‌ای از باکتری‌ها بنام ریزوبیوم ایجاد می‌شوند (۹). گیاه یونجه یکی از مهمترین گیاهان علوفه‌ای بومی است که با داشتن سیستم ریشه‌ای قوی و مقاوم به شرایط نامساعد محیطی با وجود باکتری‌های همزیست ریزوبیومی، نقش بسیار مهمی در حاصلخیزی خاک‌ها دارد (۴). باکتری‌های ریزوبیوم مهمترین میکروارگانیسم‌های موجود در خاک هستند که در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌های خاک نقش مهمی در تبدیل نیتروژن اتمسفر به اشکال آمونیوم و نیتروژن آلی و تثبیت ازت دارند (۷،۲۱). ریزوبیوم‌ها گروهی از باکتری‌ها هستند که قادر به تشکیل گره بر روی ریشه گیاهان خانواده بقولات می‌باشند. این باکتری‌ها هوایی بوده و قادر به استفاده از منابع مختلف قند مثل پنتوزها و هگزوزها به عنوان منبع کربن می‌باشند و از آمونیوم و نترات به عنوان منبع نیتروژن استفاده می‌کنند. حضور این باکتری‌ها در ساختار گیاه، علاوه بر افزایش قابلیت بقای گیاه در شرایط نامساعد نظیر شوری و دمای بالا، با انحلال فسفات و آهن خاک، جذب مواد کم مصرف و در برخی از موارد کنترل عوامل بیماری‌زا رشد گیاه را نیز تحریک می‌کنند (۱۸). توانایی این باکتری‌های ریزوبیومی در تطبیق با شرایط تنشی خاک، در بقا و همزیستی باکتری و گیاه نقش اساسی دارند. برخی از این باکتری‌های همزیست دارای توانمندی بالاتری در برابر تنش‌ها زیستی، فیزیکی و شیمیایی هستند (۱). Zhang و همکاران (۱۹۹۱) تنوع باکتری‌ها ریزوبیومی ریشه را در گره‌زایی گیاهان تیره لوگوم را مورد بررسی قرار دادند (۲۵). Hosseini و همکاران (۲۰۱۴) جداسازی و شناسایی سوش‌های ریزوبیوم همزیست با یونجه و شنبلیله را مورد بررسی قرار دادند (۱۱). Tashokri و همکاران (۲۰۱۶) صفات فنوتیپی و خصوصیات محرک رشدی باکتری‌های ریزوبیومی گره‌های ریشه‌ای سویا را مورد بررسی قرار دادند (۲۱).

برای شناسایی دقیق باکتری‌های ریزوبیومی، روش‌های مبتنی بر PCR به عنوان راه‌حلی سریع و مطمئن هستند. ژن

مینزیم ۰/۲ گرم، کلرید سدیم ۰/۱ گرم، مانیتول ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۰/۵ گرم و آگار ۱۵ گرم (۲) برای جداسازی باکتری‌ها استفاده شد. یک دهم میلی‌لیتر از سوسپانسیون گره و محلول نمک بر روی پتری دیش حاوی محیط کشت YMA پخش و در انکوباتور در دمای ۲۸-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. با مشاهده رشد کلنی باکتری در امتداد خطوط کشت، باکتری‌ها به منظور خالص‌سازی جدایه‌ها روی محیط کشت دیگری کشت داده شدند و طی چند مرحله خالص‌سازی انجام گردید. پس از تهیه کشت‌های خالص به منظور نگهداری طولانی مدت آنها ایزوله‌های جداسازی شده در لوله‌های مورب دارای محیط YMA کشت داده و در دمای یخچال نگهداری گردیدند. از هر سوش ۴-۵ نمونه تهیه گردید (۷).



ب

سانتی‌متر از خاک اطراف گیاه یونجه و به عمق ۲۰ سانتی‌متر کنار زده شد و ریشه گیاه یونجه بدون آسیب خارج شد. جهت حذف رطوبت و جلوگیری از انتقال آلودگی، ریشه پس از خروج از زمین با خاک اطرافی با قرارگیری درون کیسه‌ی پلاستیکی، به آزمایشگاه انتقال پیدا کرد. در آزمایشگاه ریشه‌ها درون ظرف پر از آب و با استفاده از جریان جاری آب به آرامی شستشو شدند. ضد عفونی کردن کره‌ها با استفاده از اتانول ۹۵ درصد (۱۰-۵ ثانیه) و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد (۳-۲ دقیقه) انجام شد. سپس گره‌ها ۵-۶ بار با آب مقطر استریل در کنار شعله شسته و سه بار آخر کره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در آب استریل نگهداری شدند. در هاون چینی استریل، گره‌ها به همراه محلول نمک ۸/۵ گرم در لیتر استریل له شدند. از محیط کشت YMA (دی‌پتاسیم فسفات ۰/۵ گرم، سولفات



الف

شکل ۱- گیاه یونجه الف- گیاه و ریشه ب- تراکم گره‌های ریزوبیوم

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و شامل ۱۸ میکرولیتر آب PCR، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱ میکرولیتر پرایمر Forward، ۱ میکرولیتر پرایمر Reverse، ۱ میکرولیتر Taq DNA Polymeraz، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم DNA ژنومی، انجام شد. آغازگرهای (پرایمر) عمومی و کامل باکتری سینوریزوبیوم بر اساس ژن 16s rRNA gene sequences از سایت NCBI استخراج و در توالی یابی ژن‌های باکتری‌های جداسازی شده در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

**شناسایی جدایه‌های باکتری:** شناسایی ساختار ظاهری جدایه‌ها بر پایه راهنمای باکتری‌شناسی رده‌بندی (سیستماتیک) کلانس و برگیز (۵) انجام شد. پس از کشت همسانه‌های هر جدایه روی محیط آگار مغذی، به مدت سه روز در انکوباتور ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس ویژگی‌های میکروسکوپی همسانه‌ها شامل شکل، واکنش گرم، حرکت، سیترات، تولید H<sub>2</sub>S، اکسیداز و کاتالاز بررسی شد (۲۰).

**تکثیر قطعه 16S rDNA باکتری‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز:** خالص‌سازی DNA ژنومیک با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سینا ژن انجام شد.

جدول ۱- آغازگرهای عمومی 16s rRNA مورد استفاده در باکتری های ریزومی گیاه یونجه از سایت NCBI

ردیف	آغازگر
آغازگر پیشرو (27 F)	AGAAGTTTGATCMTGGCTCAG
آغازگر معکوس (1492R)	GGTACCTTGTACGACTT

واکنش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. PCR توسط ژل الکتروفورز ۱ درصد آگارز در بافر تریس ارزیابی و تایید گردید. ترادف‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار Chromas Pro ویرایش و با استفاده از نرم افزار بلاست در پایگاه داده‌های NCBI مورد تجزیه و تحلیل و مقایسه قرار گرفتند (۱۷).

## نتایج

سه سویه از ریزوبیوم گیاه یونجه‌ی آلفا ( *Medicago sativa* ) جداسازی و شناسایی شد که همه جدایه‌ها مشخصات تست‌های بیوشیمیایی تپیک باکتری‌های سینوریزوبیوم را نشان دادند. برخی از مشخصات بیوشیمیایی این باکتری‌ها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- خصوصیات بیوشیمیایی باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر گیاه یونجه‌ی آلفا

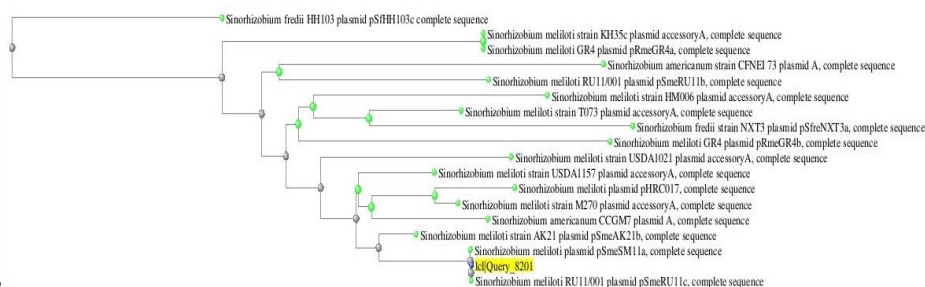
کاتالاز	اکسیداز	تولید H <sub>2</sub> S	حرکت	سیترات	شکل سلول	رنگ آمیزی گرم	
+	+	-	+	-	باسیل	گرم منفی	باکتری ۱
+	+	v	+	-	باسیل	گرم منفی	باکتری ۲
+	+	v	+	-	باسیل	گرم منفی	باکتری ۳

توالی‌یابی 16S rRNA سویه جدا شده از ریزوسفر گیاه یونجه را گونه (Sequence ID= CP 021215.1) *Sinorhizobium meliloti* (باکتری ۱) معرفی کرد.

در بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی، باکتری شماره ۱ با ویژگی‌های گرم منفی و ایجاد کلنی‌های گرم رنگ و برجسته بر روی محیط کشت YMA بود (شکل ۲).



الف



ب

شکل ۲- باکتری ریزوبومی شماره ۱ (*Sinorhizobium meliloti* (Sequence ID= CP 021215.1) الف- کلنی باکتری، ب-درخت فیلوژنی

باکتری، ج- توالی ژنی

شناسایی *Sinorhizobium meliloti* (ID= DQ-145546.1) شد (شکل ۴).

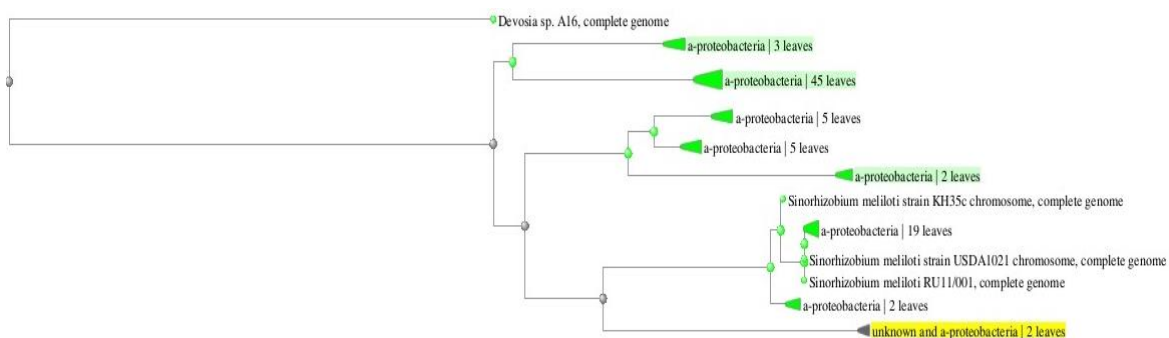
همترازی جفت بازی (بلاست) ژن‌های ورودی در نرم افزار بلاست با تعداد بازهای ژن‌های مختلف و نیز درصد همپوشانی و گپ‌های بازی برای سه باکتری شناسایی شده در شکل ۵ نشان داده شده است.

دومین باکتری گرم منفی و دارای کلنی‌های قرمز رنگ بر روی محیط کشت YMA بود (شکل ۳). باکتری دوم شناسایی شده از ریزوبیوم گیاه یونجه گونه Sequence ID= *Sinorhizobium medicae* (CP-000738.1) (باکتری ۲) بود.

کلنی باکتری شماره ۳ جدا شده از گیاه جنس یونجه آلفا ( *Medicago sativa* ) صورتی بود. باکتری ( Sequence



الف



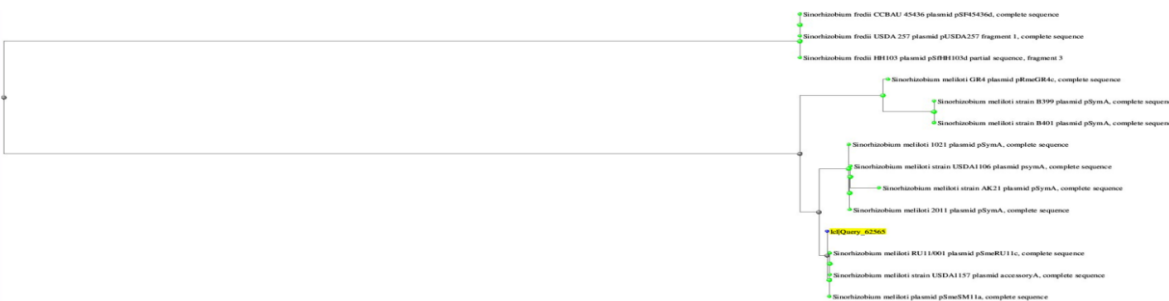
ب

شکل ۳- باکتری ریزوبیومی شماره ۲ (*Sinorhizobium meliloti* (Sequence ID= CP-000738.1) الف- کلنی باکتری، ب-درخت فیلوژنی

باکتری، ج- توالی ژنی



الف



ب

شکل ۴- باکتری ریزوبیومی شماره ۳ (*Sinorhizobium meliloti* (Sequence ID= DQ-145546.1) الف- کلنی باکتری، ب-درخت فیلوژنی

باکتری

**Sinorhizobium meliloti plasmid pSmeSM11a, complete sequence**Sequence ID: [DQ145546.1](#) Length: 144170 Number of Matches: 1Range 1: 141793 to 142452 [GenBank](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1109 bits(600)	0.0	643/660(97%)	17/660(2%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGCTGATGAGCGCTCCAAAGGTTTCATACACCTATCCCAACACGTCGGACGATCCAGAC			60
Sbjct 141793	ATGGCTGATGAGCGCTCCAAAGGTTTCATACACCTATCCCAACACGTCGGACGATCCAGAC			141852
Query 61	CGGACGAACGTTCTGAAAAAC--ATGGGGAATTGAAACCCATTCCGAGCTGCGCGTGAAA			118
Sbjct 141853	CGGACGAACGTTCTGAAAAACAGATGGGGAATTGAAACCCATTCCGAGCTGCGCGTGAAA			141912
Query 119	GAGTATCGCGGACCGCGGTGCGGATGCAGGAAATCGCTGAAGGAGACGGCCCGCAAGGC			178
Sbjct 141913	GAGTATCGCGGACCGCGGTGCGGATGCAGGAAATCGCTGAAGGAGACGGCCCGCAAGGC			141972
Query 179	AATTTTCGACAAAGCCACCTGAAG--GATTACGCGTTACATTTTTCAGGATGTGTACGAA			236
Sbjct 141973	AATTTTCGACAAAGCCACCTGAAGGCGATTACGCGTTACATTTTTCAGGATGTGTACGAA			142032
Query 237	TGGCCCGGTATACGCGCAACGAAAG--CCGTCGTTGAGGGTCAGCGCTAGAGCCGATC			294
Sbjct 142033	TGGCCCGGTATACGCGCAACGAAAGTCCCGTCGTTGAGGGTCAGCGCTAGAGCCGATC			142092
Query 295	GGCGCCCTCTAAGGGCGGCACGTCCTTCCGCGCCGCTCGCGCATAGAAATGGGCTCG			354
Sbjct 142093	GGCGCCCTCTAAGGGCGGCACGTCCTTCCGCGCCGCTCGCGCATAGAAATGGGCTCG			142152
Query 355	GACGAGGCGCTGAAGCCGATCCGAGA--CGCAGGCTTTTCGCAATGCAACGCTGAGGAG			412
Sbjct 142153	GACGAGGCGCTGAAGCCGATCCGAGATCCGAGGCTTTTCGCAATGCAACGCTGAGGAG			142212

*Sinorhizobium meliloti* (Sequence ID= CP 021215.1) باکتری شماره ۱

(درصد همپوشانی ۹۷ و گپ‌های بازی ۲ درصد)

**Sinorhizobium medicae WSM419, complete genome**Sequence ID: [CP000738.1](#) Length: 3781904 Number of Matches: 1Range 1: 135 to 401 [GenBank](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
442 bits(239)	4e-120	259/267(97%)	8/267(2%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGCCAAATACAACCTTGGCGAAAAAGGCGACCCGCAAGATCGCACGCCGTACCAGCAGTG			60
Sbjct 135	ATGGCCAAATACAACCTTGGCGAAAAAGGCGACCCGCAAGATCGCACGCCGTACCAGCAGTG			194
Query 61	AACAAGGCC--CGTTCGCGTGTTCGTAACCTCGTCCGCAAGGTCGAAGAGGCATCGCT			118
Sbjct 195	AACAAGGCCCGTTCGCGTGTTCGTAACCTCGTCCGCAAGGTCGAAGAGGCATCGCT			254
Query 119	TCCGGGATCAGGCAGTCGCA--CGCCGCCGTAAGGCA--GCAGCCGAGCTGATGCGT			174
Sbjct 255	TCCGGGATCAGGCAGTCGCAAGCCGCCGTAAGGCAAGGCAAGGTCGAAGAGGCATCGCT			314
Query 175	GCCGCTACCAAGGCGTGTGATTCACACGCGCTCGCGTAAGGTTTCGCGCCTGGCG			234
Sbjct 315	GCCGCTACCAAGGCGTGTGATTCACACGCGCTCGCGTAAGGTTTCGCGCCTGGCG			374
Query 235	CAGCGTGTGAAAAGCCT--CGGCCTAA 259			
Sbjct 375	CAGCGTGTGAAAAGCCTTTTCGGCCTAA 401			

*Sinorhizobium medicae* (Sequence ID= CP-000738.1) باکتری شماره ۲

(درصد همپوشانی ۹۷ و گپ‌های بازی ۲ درصد)

**Sinorhizobium meliloti RU11/001 plasmid pSmeRU11c, complete sequence**Sequence ID: [CP021215.1](#) Length: 144210 Number of Matches: 1Range 1: 38472 to 39722 [GenBank](#) [Graphics](#)

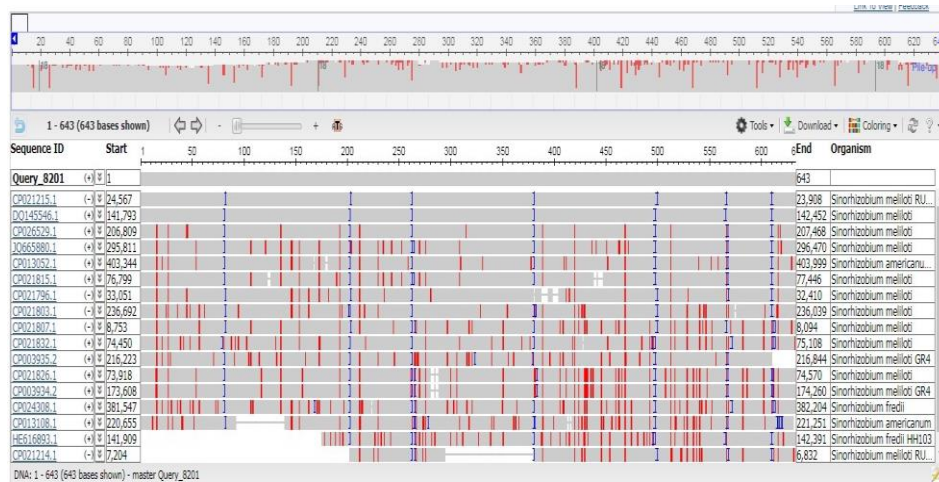
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1910 bits(1034)	0.0	1189/1251(95%)	62/1251(4%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGAACCTCTTATTCTC--TCTGGGACTTGCTTGGCAATA---TGCTTGTGGGGCTC			54
Sbjct 38472	ATGGAACCTCTTATTCTCCTGCTGGGACTTGCTTGGCAATAGGTTTGTGTGGGGCTC			38531
Query 55	GAGCGTGGATGGCG--AAGGGAAGCGCGGAGGAGCGAGCCGAGGATCCGCACT			111
Sbjct 38532	GAGCGTGGATGGCGGAAAGGGAAGCGCGGAGGAGCGAGCCGAGGATCCGCACT			38591
Query 112	TACGGTATTTCCGGTCTGCTTGGAGGGATAGTGGCC--CTGTCGACGACAGCGCAGC			168
Sbjct 38592	TACGGTATTTCCGGTCTGCTTGGAGGGATAGTGGCCGCACTGTCGACGACAGCGCAGC			38651

*Sinorhizobium meliloti* (Sequence ID= DQ-145546.1) باکتری شماره ۳

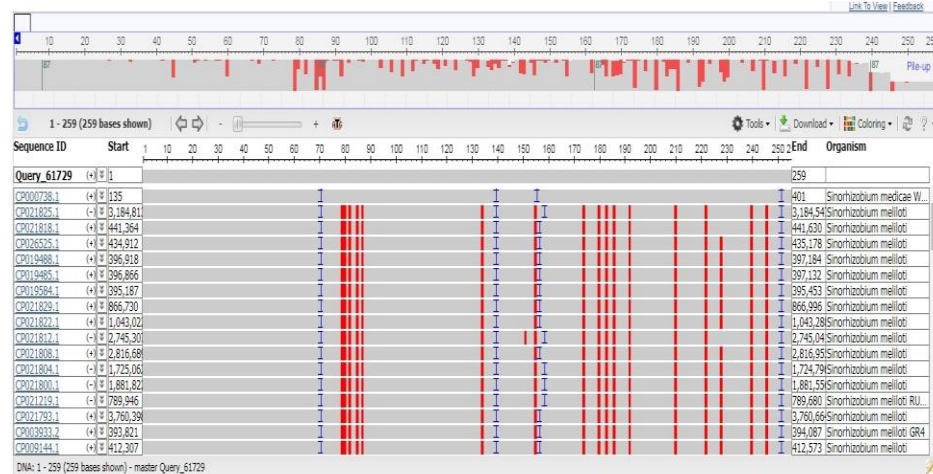
(درصد همپوشانی ۹۶/۰۴ و گپ‌های بازی ۴ درصد)

شکل ۵- هم‌ترازی جفت بازی ژن‌های باکتری‌های ریزوبیومی

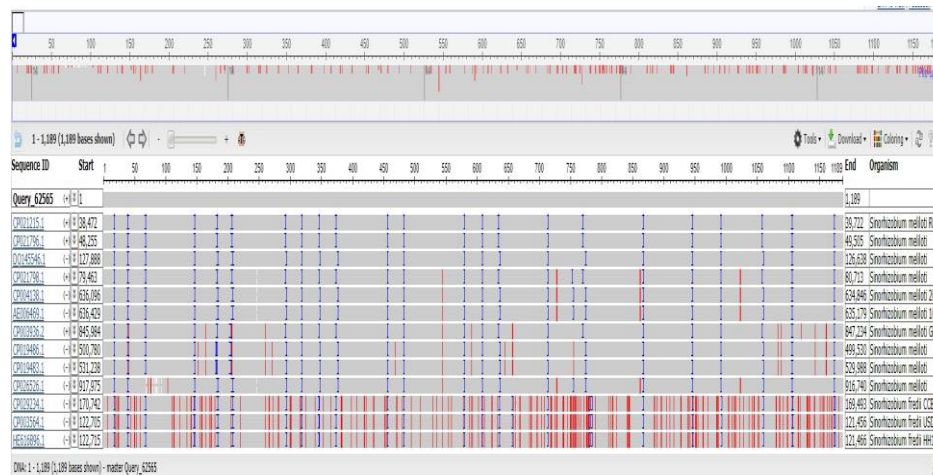
همترازی چندبازی با انواع ژن‌های موجود در بانک ژنی و بازهای آنها برای ۳ باکتری جدا شده در شکل ۶ نشان داده شده است.



باکتری شماره ۱ (Sequence ID= CP 021215.1) *Sinorhizobium meliloti*



باکتری شماره ۲ (Sequence ID= CP-000738.1) *Sinorhizobium medicae*



باکتری شماره ۳ (Sequence ID= DQ-145546.1) *Sinorhizobium meliloti*

شکل ۶- همترازی چندبازی ژن‌های باکتری‌های ریزوبیومی با انواع ژن‌های موجود در بانک ژنی

## بحث

باکتری‌های ریزوبیومی سریع‌الرشد نام بردند (۲۵). Shafizadeh و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی لگوم‌های نمونه‌های یونجه و اسپرس (۱۹)، Jabli و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی باکتری‌های همزیست دو گونه یونجه *Medicago rigida* و *M. sativa* در همدان (۱۲) و Norooz Nejad و همکاران (۲۰۰۹) در جداسازی ریزوبیوم‌های یونجه استان فارس، گونه‌ی باکتری همزیست *Sinorhizobium meliloti* (۱۵) را به عنوان گونه‌ی غالب گزارش کردند. Hosseini و همکاران (۲۰۱۴) باکتری *Rhizobium hainanense* را به عنوان ریزوبیوم غالب در یونجه و شنبليله در بیرجند گزارش کردند (۱۱). علت تفاوت در نوع گونه باکتری و یا سویه‌های مختلف، شرایط محیطی متفاوت شامل شوری و خشکی است که باعث می‌شود به مرور زمان باکتری‌ها مقاوم شده و توانایی استقرار بر روی ریشه و ایجاد رابطه‌ی همزیستی را پیدا کنند. Castro Pires و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی ویژگی‌های باکتری‌های ریزوبیومی خاک در برزیل، عنوان کردند که نوع ریزوبیوم در هر منطقه تابعی از شرایط خاک و محیط است (۴). به این ترتیب در هر منطقه با توجه به وجود استرس‌های محیطی نوع خاصی از ریزوبیوم بومی و به شکل همزیست با گیاه وجود دارد (۳) که با توجه به وابستگی نوع باکتری ریزوبیومی به شرایط محیطی، می‌توان از باکتری‌های شناسایی به شکلی اختصاصی برای افزایش تثبیت نیتروژن و کاهش استفاده از کودهای شیمیایی در زمین‌های کشاورزی خوزستان استفاده کرد.

## نتیجه‌گیری

بعد از نمونه‌برداری و جداسازی کره‌گ‌های گیاه یونجه‌ی آلفا آلفا (*Medicago sativa*) از محیط کشت YMA برای جداسازی باکتری‌ها استفاده شد. جداسازی باکتری‌های ریزوبیومی با استفاده از روش تکثیر قطعه 16S Rdna انجام شد که طی آن ۳ گروه باکتریایی شامل گونه *Sinorhizobium meliloti* (باکتری ۱)، باکتری دوم *Sinorhizobium medicae*

در بسیاری از نقاط دنیا گونه‌های مختلف باکتری ریزوبیومی از گونه‌های مختلف یونجه به جهت استفاده‌ی تجاری در تثبیت ازت جداسازی شده‌اند. ریزوبیوم از خانواده ریزوبیاسه، مشهورترین باکتری آندوفیت طبیعی لگوم و تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن مولکولی است که جز گروهی از باکتری‌ها با نام ریزوباکتری‌ها محرک رشد گیاه محسوب می‌شود (۴،۱۰). از طرفی این روزها، مسیرهای ژنتیکی برای تعریف و درک سیستم‌های ژنتیکی ارتباط باکتری‌های همزیست و میزبان آن‌ها استفاده می‌شوند. توالی ژنوم نژادهایی از نودول‌های ریزوبیومی سیمبیوتیک همانند *E. meliloti* 1021 (۸)، *M. loti* Rlv 3841 (۲۴)، *Bradyrhizobium diazoefficiens* MAFF303099 (۱۳) یا USDA110<sup>T</sup> (۱۴) مشخص شده و بینش‌های جدیدی را در خصوص این تعاملات همزیستی ایجاد کرده است.

در این مطالعه از روش PCR 16S rDNA جهت شناسایی و تعیین گونه‌های باکتری جدا شده از ریشه یونجه آلفا آلفای استان خوزستان استفاده شد. این روش که در آن از قطعات اختصاصی باکتری استفاده می‌شود، در مقایسه با روش‌های قدیمی امکان تشخیص دقیق روابط خانوادگی بین باکتری‌ها را فراهم ساخته و می‌توان باکتری‌های هم خانواده را به درستی تشخیص داد. تکثیر ژن 16S rDNA با استفاده از آغازگرهای بیان شده منجر به تولید قطعاتی با طول ۳۷۸۱۹۰۴-۱۴۴۱۷۰ جفت باز در جدایه‌های باکتریایی شد. براساس میزان تشابه باکتری‌ها با توالی ژن-های ثبت شده در NCBI، باکتری‌های شناسایی شده از جنس *Sinorhizobium* و شامل دو گونه (*Sinorhizobium meliloti* و *Sinorhizobium medicae* شامل دو نژاد CP 021215.1 و DQ-145546.1) بودند.

Zhang و همکاران (۱۹۹۱) در مطالعه‌ی که به بررسی باکتری‌های جدا شده از گره‌ک‌های ریشه گیاهان لوگومینوز پرداخته بودند از این دو باکتری به عنوان

## تقدیر و تشکر

(باکتری ۲) و باکتری سوم *Sinorhizobium meliloti* شناسایی

شد.

با سپاس فراوان از سازمان آب و برق خوزستان در  
همراهی برای انجام این پژوهش.

## منابع

- 1- Andrewa, M., Andrewa, M. 2017. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. International Journal of Molecular Sciences. 18: 705- 744.
- 2- Beck, D.P., Materon, L. A., Afandi, F. 1993. Practical Rhizobium-Legume Technology Manual. Technical Manual. 389 pp.
- 3- Callahan, B.J., Wong, J., Heiner, C., Oh, S., Theriot, C.M., Gulati, A.S., McGill, S.K., Dougherty, M.K. 2019. High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. Nucleic Acids Research. 47:103-113.
- 4- Castro Pires, R., Junior, F., Zilli, J., Fischer, D., Hofmann, A., James, E., Simon, M. 2018. Soil characteristics determine the rhizobia in association with different species of Mimosa in central Brazil. Plant Soil. 423: 411-428.
- 5- Claus, D., Berkely, R. 1986. Genus Bacillus. In Bergey's manual of systematic bacteriology, ed. by Williams, S.T., Sharp, M.E., and Holt, J.C., Williams and Wilkins, Baltimore MD 21202, pp. 1105-1139.
- 6- Daduk, M., Begleran, M., Mehrabeian, Y., Zali, H., Adadi, M., Salehi, M., Malaki, M.H., Zargher, M. 2012. In the first place, the united states is the only country in the world to have a good time. Scientific Journal of Danish science supreme. 20: 129-123.
- 7- Fuskhah, E., Darmawati, A. 2019. Inoculation of rhizobium bacteria and nutrient of seawater to increase soybean production and quality as food. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science.
- 8- Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R.; Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A.; Boistard, P., et al. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science. 293: 668-672
- 9- Ghorbani Z. 2010. Contains the muethr gene in competition and performance lgom family coexistence. Master thesis, College of agriculture, Isfahan University of technology. 20 (1): 2-10.
- 10- Gonzalez, V., Santamaria, R.I., Bustos, P., Hernandez-Gonzalez, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Janga, S.C., Ramirez, M.A., Jimenez-Jacinto, V., Collado-Vides, J., et al. 2006. The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. Proceeding of the National Academy of Sciences. 103: 3834-3839
- 11- Hosseini, S.M., Mohammadi, A., Sayyari, M.H. 2014. Isolation and identification of rhisobiome *scinus scinus* leachate with alfalfa and fenuliyeh in Birjand. 3rd National Congress on Organic and Conventional Agriculture. University of Mohaghegh Ardabili.
- 12- Jabli, M., Naderi Shahab, M.A., Pourbababi, A.A., Ghamari Zare, A., Jafari, A., 2007. The study of the likeity of bacteria symbiotic with one year alfalfa (*Medicago rigidula*) and multi-year alfalfa (*M. sativa*). Journal of Genetic Research and Breeding of Range and Forest Plants of Iran. 15: 295-284.
- 13- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., et al. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Research. 7: 331-338.
- 14- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., et al. 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. DNA Research. 9: 189-197
- 15- Norooz Nejad, M.J., Kargar, M., Kargar, M., Kavus Ayazpour, K., Reiszadeh, S. 2009. Evaluation of Rhisobiome Native, Animal Manure and Urea Treatments on Alfalfa Growth in Fars Province. Journal of the World of Microbes. 2: 275-270.
- 16- Omidi Nasab, M., Khodakarmian, G. 2017. Decontamination of alfalfa epiphyte bacteria on the bacterium chowdge is the cause of alfalfa

- withering. *Journal of the World of Microbes*. 10: 68-59.
- 17- Sanatizadeh, S., Alipour Babaei, A., Amoozgar, M. A. 2014. Determining the diversity of symbiotic bacteria isolated from alfalfa root nodules in Yazd region. *Journal of Applied Biology*. 4: 26-40.
- 18- Sarr, P.S., Araki, S., Begoude, D.A., Yemefack, M., Manga, G.A., Yamakawa, T., Htwe, A.Z. 2016. Phylogeny and nitrogen fixation potential of Bradyrhizobium species isolated from the legume cover crop Pueraria phaseoloides Roxb.) Benth. in Eastern Cameroon. *Soil Science and Plant Nutrition*. 62: 13–19.
- 19- Shafizadeh, SH., Seifollahi, A., Eskandari, Z., 2007. Extraction and identification of rhisobiome suscines with the most important rangeland legomes in Isfahan province. *Range and Desert Research of Iran*. 14: 312-302.
- 20- Swapna Nagalingam<sup>1</sup>, T.V., Nithyal, D., Gayathri<sup>1</sup>, A.S., Sagarika<sup>1</sup>, G., Supriya, D., Vidya, B., Kiran, K., Akhtar Rasool, Mir Morphological, M. I., 2020. Biochemical and Plant Growth Promoting Characterization of Rhizobia Isolated From Root Nodule of Cajanus Cajan L. *Plant Archives*. 20: 1293-1299 .
- 21- Tashokri, F., Ghorbani Nasrabadi, R., Barani Motlagh, M., Movahedi Naeini, S.A. 2016. Phenotypic traits and some growth symbiotic characteristics of rhisobiome bacteria isolated from soybean root nouns. *Journal of Soil Management and Sustainable Production*. 6: 64-45.
- 22- Winand, R., Bogaerts, B., Hoffman, S., Lefever, L., Delvoeye, M., Braekel, J., Fu, Q., Roosens, N., Keersmaecker, S., Vanneste, K. 2019. Targeting the 16S rRNA Gene for Bacterial Identification in Complex Mixed Samples: Comparative Evaluation of Second (Illumina) and Third (Oxford Nanopore Technologies) Generation Sequencing Technologies. *International Journal of Molecular Sciences*. 21: 298-320.
- 23- Yasamin.H.B. 2011. Isolation and characterization of Rizhospher. *Biotechnology*. 6(1):42-52.
- 24- Young, J.P., Crossman, L.C., Johnston, A.W., Thomson, N.R., Ghazoui, Z.F., Hull, K.H., Wexler, M., Curson, A.R., Todd, J.D., Poole, P.S., et al. 2006. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol*. 7: 34-41.
- 25- Zhang, X., Haepfer, R., Karsisto, M., Lindstrom, K. 1991. Diversirt of rhizobium bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. *International journal of systematic bacteriology*. 41: 104-113.

## Variation of rhizobium bacteria isolated from the ribosomal nodes of the root of alfalfa (*Medicago sativa*) plant using 16rRNA gene shear fragments

Golab Kesh Sh.<sup>1</sup>, Khoramnezhadian Sh.<sup>1\*</sup>, Rajabzadeh Ghatromi E.<sup>1,2</sup> and Rashno M.<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Environment, Damavand Branch, Islamic Azad University, Damavand, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources of the Sea, Khormashahr University of Marine Sciences and Technology, Khormashahr, I.R. of Iran.

<sup>3</sup> Dept. of Immunology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, I.R. of Iran

<sup>4</sup> Cellular and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences Ahvaz, I.R. of Iran

### Abstract

Alf Alfa (*Medicago sativa*) plant was collected from the area of Andimeshk and in the spring of 2018. To express the 16S rDNA gene, the isolated bacteria were cultured in YMA environment under aerobic conditions and at a temperature of 25-28 °c. Genomic DNA localization was performed using the DNA extraction kit of SINA Gene Co. General and complete primers of sinobium bacteria were extracted from the NCBI site based on 16s rRNA gene sequences, and were used in sequencing the isolated bacteria genes in this study. The sequencing obtained by using Chromas Pro software was edited and compared using blasting software in NCBI database of three strains of alpha-alpha (*Medicago sativa*) were isolated and identified. The microscopic and macroscopic studies of the bacteria were identified. Bacterium 1 was identified as Gram-negative and caused by cream and embossed colonies, the second Gram-negative bacteria, with red-colored colonies and third bacterial colony isolated from the genus Alfalfa (*Medicago sativa*) plant. Sequencing results of 16S rRNA strains isolated from the *Rhizoum* species (Sequence ID = CP 021215.1) *Sinorhizobium Meliloti* (bacter1) (overlapping percentages 97 and game chats 2 percent), the second bacterium Sequence ID = CP-000738.1)) *Sinorhizobium Medicae* (bacteria 2) (the overlap percentage of 97 and 2-percent game chats) and third bacteria (Sequence ID = DQ-145546.1) *Sinorhizobium meliloti* (overlapping percentages 04.96 and 4% game chats) were identified.

**Key words:** diversity, pathogenic bacteria, Khak, alfalfa, 16rRNA gene.