

تنوع باکتری‌های ریزوبیومی جدا شده از گردهای ریبوزومی ریشه گیاه یونجه آلفا آلفا

16rRNA با استفاده از قطعات برشی ژن (*Medicago sativa*)

شهرزاد گلابکش^۱، شهرزاد خرم نژادیان^{۱*}، ابراهیم رجب‌زاده قطرمی^{۲و۳} و محمد رشنو^{۱و۴}



^۱ ایران، دماوند، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دماوند، دانشکده فنی، گروه محیط زیست

^۲ ایران، خرمشهر، دانشگاه علوم و فنون دریایی، دانشکده منابع طبیعی دریا، گروه شیلات

^۳ ایران، اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

^۴ ایران، اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

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

چکیده

گیاه یونجه آلفا آلفا (*Medicago sativa*), از منطقه پشمینه‌زار اندیمشک و در فصل بهار سال ۱۳۹۸ جمع آوری شد. پس از کشت همسانه‌های هر جدایه روی محیط آگار مغذی، ویژگی‌های میکروسکوپی بررسی شد. جهت بیان ژن ۱6S rDNA، باکتری‌های ایزوله شده در محیط YMA در شرایط هوایی و در دمای ۲۸–۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شدند. پرایمرهای عمومی و کامل باکتری سینوریزوبیوم بر اساس ژن ۱6S rRNA gene sequences ۱6S rRNA از سایت NCBI استخراج و در توالی یابی ژن‌های باکتری‌های جداسازی شده در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. تراویف‌های 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 یونجه آلفا 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 بر جسته، دومین باکتری گرم منفی و دارای کلنی‌های قرمز رنگ و کلنی باکتری سوم جداسده از گیاه جنس یونجه آلفا آلفا (*Medicago sativa*) صورتی بود. نتایج توالی یابی ۱6S rRNA سویه جدا شده از ریزوسفر گیاه یونجه را گونه (Sequence ID= CP Sequence ID= CP-021215.1) (باکتری ۱) (درصد همپوشانی ۹۷ و گپ‌های بازی ۲ درصد)، باکتری دوم (Sequence ID= CP-000738.1) (باکتری ۲) (درصد همپوشانی ۹۷ و گپ‌های بازی ۲ درصد) و باکتری سوم (Sequence ID= DQ-145546.1) (باکتری ۳) (درصد همپوشانی ۹۶/۰۴ و گپ‌های بازی ۴ درصد) شناسایی شد. با توجه به نقش ثبتی کنندگی 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: ۰۱۷۶۳۰۱۲۲۶، پست الکترونیکی: Khoramnejad@damavandiau.ac.ir

مقدمه

اهمیت زیادی دارند (۱). بیشتر گیاهان تیره لگوم شامل نخود، لوپیها و شدرها گردها یا اجزای غده ای شکلی روی ریشه‌های خود دارند. این گردها در شرایط کمبود

گیاهان خانواده لگومینوز شامل ۱۹۳۰۰ گونه از ۷۵۰ جنس، با تولید مقادیر بالای پروتئین و ثبت مقادیر بالای ازت به دلیل همزیستی با باکتریهای ریزوبیومی در سراسر جهان

16rRNA یک ژن باکتریایی عمومی و محافظت شده با عوامل ثبت و مشخص است. این ژن با توالی ژنی در باکتری‌های مختلف در تعیین روابط فیلوزنی 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 فیلوزنیک باکتری‌های تشییت کننده نیتروژن جدا شده از ریزوسفر گیاه مارچوبه با استفاده از 16rRNA (۶) و نیز استفاده از این ژن در مطالعه Omidi و Nasab (۲۰۱۷) در جداسازی باکتری‌های اپی‌فیت Khodakarmian Darmawati و Fuskah (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 فیلوزنی 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 تشییت نیتروژن، کاهش مصرف کودهای نیتروژن را به دنبال دارد را به موضوعی مهم تبدیل کرده است. علاوه بر این با توجه به توانایی تشییت 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 آلفا (*Medicago sativa*) است.

مواد و روش‌ها

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

ازت و در نتیجه آلدگی ریشه‌های مؤین 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 ثبیت ازت دارند (۷، ۲۱). ریزوبیوم‌ها گروهی از باکتری‌ها هستند که قادر به تشکیل گره بر روی ریشه گیاهان خانواده بقولات می‌باشند. این باکتری‌ها هوازی بوده و قادر به استفاده از منابع مختلف قند مثل پتووزها و هگلرها به عنوان منبع کربن می‌باشند و از آمونیوم و نیترات 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 تنفس‌ها زیستی، فیزیکی و شیمیایی هستند (۱). Zhang و همکاران (۱۹۹۱) تنوع باکتری‌ها ریزوبیومی ریشه را در گره زایی گیاهان تیره لوگوم را مورد بررسی قرار دادند (۲۵). Hosseini و همکاران (۲۰۱۴) جداسازی و شناسایی سویه‌های ریزوبیوم همزیست با یونجه و شبیله را مورد بررسی قرار دادند (۱۱). Tashokri و همکاران (۲۰۱۶) صفات فنتویپی و خصوصیات محرك رشدی باکتریهای ریزوبیومی گره‌های ریشه‌ای سویا را مورد بررسی قرار دادند (۲۱).

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

منیزیم 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 سوپاپانسیون گره و محلول نمک بر روی پتربی دیش حاوی محیط کشت YMA پخش و در انکوباتور در دمای ۲۸-۲۵ درجه-ی سانتی‌گراد نگهداری شد. با مشاهده رشد کلنی باکتری در امتداد خطوط کشت، باکتری‌ها به منظور خالص سازی جدایه‌ها روی محیط کشت دیگری کشت داده شدند و طی چند مرحله خالص سازی 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).

سانسیتی متر از خاک اطراف گیاه یونجه و به عمق ۲۰ سانتی-متر 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 قرار گیری 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 کره‌گها با استفاده از اتانول ۹۵ درصد (۵-۱۰ 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 ۰/۵ گرم، سولفات



ب



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 DNA ژنومی، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم آغازگرها (پرایمر) عمومی و کامل باکتری انجام شد. آغازگرها (پرایمر) عمومی و کامل باکتری سینوریزوبیوم بر اساس ژن 16S rRNA gene sequences از سایت NCBI استخراج و در توالی یابی ژن‌های باکتری‌ها 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 H₂S، اکسیداز و کاتالاز بررسی شد (۲۰).

تکثیر قطعه 16S rDNA باکتری‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: خالص سازی DNA ژنومیک با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سینا ژن انجام شد.

واکنش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. PCR توسط ژل الکتروفورز ۱ درصد آگاراز در بافر تریس ارزیابی و تایید گردید. تراویف‌های 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 ریزوپیوم گیاه یونجه‌ی آلفا آلفا (*Medicago sativa*) جداسازی و شناسایی شد که همه جدایه‌ها مشخصات تست‌های بیوشیمیایی تیپیک باکتری‌های سینوریزوپیوم را نشان دادند. برخی از مشخصات بیوشیمیایی این باکتری‌ها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- آغازگرهای عمومی ۱۶s rRNA ۱۶s rRNA مورد استفاده در باکتری های ریبوزومی گیاه یونجه از سایت NCBI

ردیف	آغازگر
(27 F)	AGAAGTTGATCMTGGCTCAG
(1492R)	GGTTACCTTGTACGACTT

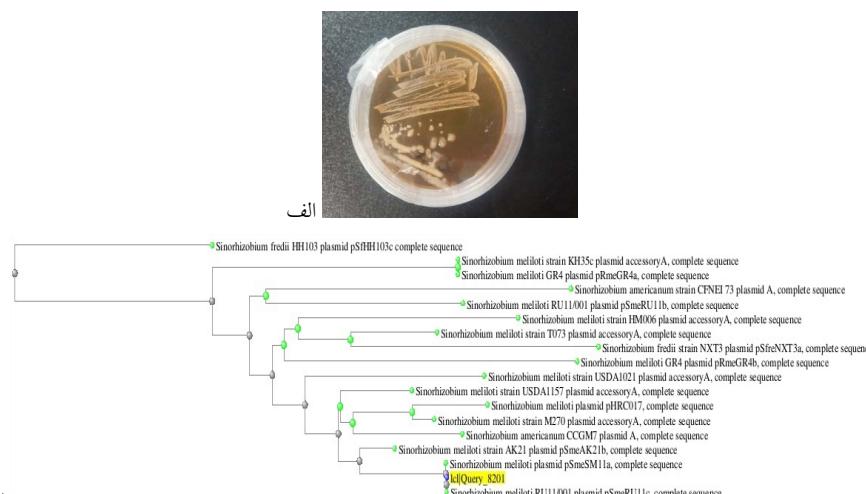
واکنش به صورت دناتوراسیون DNA به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، دناتوراسیون ثانویه در دمای ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و الحق پرایمرها به ۳۰ هدف در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و توسعه پرایمر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه در ۳۰ چرخه تکرار و در انتها ۱۰ دقیقه

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

کاتالاز	اکسیداز	H ₂ S	تولید	حرکت	سپتات	شكل سلول	رنگ آمیزی گرم	
+	+	-	+	-	باسیل	گرم منفی	باکتری ۱	
+	+	V	+	-	باسیل	گرم منفی	باکتری ۲	
+	+	V	+	-	باسیل	گرم منفی	باکتری ۳	

توالی‌یابی ۱۶S rRNA ۱۶S سویه جدا شده از ریزوپیوم گیاه یونجه را گونه (Sequence ID= CP 021215.1) با ویژگی‌های گرم منفی و ایجاد کلنی‌های کرم رنگ و بر جسته بر روی محیط کشت YMA بود (شکل ۲). نتایج

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



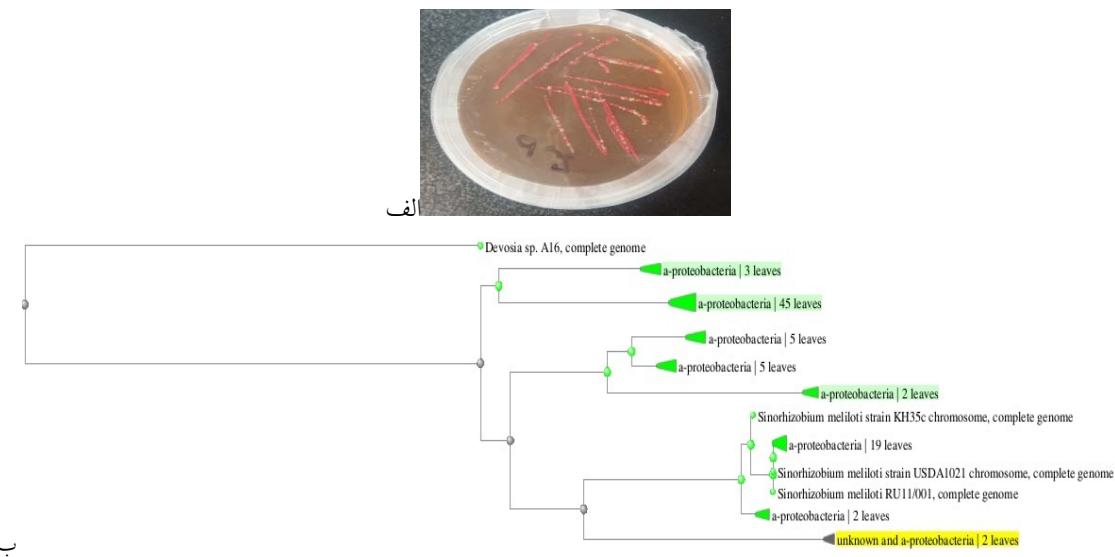
شکل ۲- باکتری ریزوپیومی شماره ۱ الف- کلنی باکتری، ب- درخت فیلوزنی

باکتری، ج- توالی ژنی

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

همتازی 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.

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

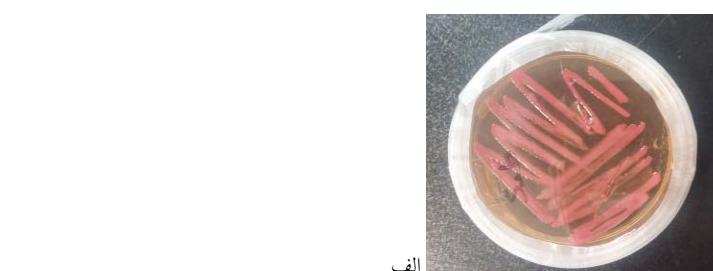


شکل ۳- باکتری ریزوپیومی شماره ۲ (*Sinorhizobium meliloti* (Sequence ID= CP-000738.1) (باکتری، ب-درخت فیلوجنی توالی ژنی

ب

شکل ۴- باکتری ریزوپیومی شماره ۳ (*Sinorhizobium meliloti* (Sequence ID= DQ-145546.1) (باکتری، ب-درخت فیلوجنی

باکتری



ب

شکل ۴- باکتری ریزوپیومی شماره ۳ (*Sinorhizobium meliloti* (Sequence ID= DQ-145546.1) (باکتری، ب-درخت فیلوجنی

باکتری

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

Score 1109 bits(600)	Expect 0.0	Identities 643/660(97%)	Gaps 17/660(2%)	Strand Plus/Plus
Query 1	ATGGCTGATGAGCGCTCCAAAAGGTCTATACACCTTCCAAACAGTCGGACGATCCAGAC	60		
Sbjct 141793	ATGGCTGATGAGCGCTCCAAAAGGTCTATACACCTTCCAAACAGTCGGACGATCCAGAC	141852		
Query 61	CGGACGAAACGTTCTGAAAAAAC - - ATGGGAATTGAAACCCATTCCGAGCTGCCCGTGAAA	118		
Sbjct 141853	CGGACGAAACGTTCTGAAAAAACAGATGGGAATTGAAACCCATTCCGAGCTGCCCGTGAAA	141912		
Query 119	GAGTATCGCGCAGCCGGATCGAGGAATCGTGAAGGAGACGCCCGCAAGGC	178		
Sbjct 141913	GAGTATCGCGCAGCCGGATCGAGGAATCGTGAAGGAGACGCCCGCAAGGC	141972		
Query 179	AATTCGACAAGGCCACCTGAAGG -- GATTACCGTTACATTTTCAAGGATGTGTACGAA	236		
Sbjct 141973	AATTCGACAAGGCCACCTGAAGGCGATTACCGTTACATTTTCAAGGATGTGTACGAA	142032		
Query 237	TGGGCCGTATACGCCAACGAAAG - - CGCTGTTGAGGGTCAGCCGCTAGAGCCGATC	294		
Sbjct 142033	TGGGCCGTATACGCCAACGAAAGTCCGGTGTGAGGGTCAGCCGCTAGAGCCGATC	142092		
Query 295	GGGGCCTCTTAAGGGCGCACGCCCTCTCGCCGGCTGCCCATAGAAATGGGCTG	354		
Sbjct 142093	GGGGCCTCTTAAGGGCGCACGCCCTCTCGCCGGCTGCCCATAGAAATGGGCTG	142152		
Query 355	GACGAGGGCGCTGAAGCCGATCCGAGA - - CGCAGGCCCTTCCGAATGCAACGCCCTGAGGAG	412		
Sbjct 142153	GACGAGGGCGCTGAAGCCGATCCGAGA - - CGCAGGCCCTTCCGAATGCAACGCCCTGAGGAG	142212		

باکری شماره ۱ (Sinorhizobium meliloti (Sequence ID= CP 021215.1))

(درصد همپوشانی ۹۷ و گپ های بازی ۲ درصد)

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

Score 442 bits(239)	Expect 4e-120	Identities 259/267(97%)	Gaps 8/267(2%)	Strand Plus/Plus
Query 1	ATGGCCAATACAACCTGGCGAAAAAGCGACCCGAAAGATCGCACGCCGTACCGCAGTG	60		
Sbjct 135	ATGGCCAATACAACCTGGCGAAAAAGCGACCCGAAAGATCGCACGCCGTACCGCAGTG	194		
Query 61	AACAAGGCC - - CGTTCGCGTGTGCTAACTCTGTCGCCAAGGTGAAAGAGGGCAGTC	118		
Sbjct 195	AACAAGGCCCTGCTGGCTGTGCTAACTCTGTCGCCAAGGTGAAAGAGGGCAGTC	254		
Query 119	TCCGGCGATCAGGCAGTCGA - - CGCCGCCCTGAAGGCA - - GCAGCCGGAGCTGATGCGT	174		
Sbjct 255	TCCGGCGATCAGGCAGTCGAAGGCCCTGAGGGCAGCCGAGCTGATGCGT	314		
Query 175	GCCGCTACCAAAGGGCTGATGATTCAACACGCCGTGCGTAAGGTTTCCGCGCTGGG	234		
Sbjct 315	GCCGCTACCAAAGGGCTGATGATTCAACACGCCGTGCGTAAGGTTTCCGCGCTGGG	374		
Query 235	CAGCGTGTGAAAAGCT - - CGGCCCTAA	259		
Sbjct 375	CAGCGTGTGAAAAGCTTTCCGGCTAA	401		

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

(درصد همپوشانی ۹۷ و گپ های بازی ۲ درصد)

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

Score 1910 bits(1034)	Expect 0.0	Identities 1189/1251(95%)	Gaps 62/1251(4%)	Strand Plus/Plus
Query 1	ATGGAACCTTATTCTC - - TCTGGACTTGTCTGGCAATA - - TGTTGTGGGCTC	54		
Sbjct 38472	ATGGAACCTTATTCTCGCTGGACTTGTCTGGCAATA - - TGTTGTGGGCTC	38531		
Query 55	GAGCGTGGATGGG - - AAGGGAAAGCCGGCAGGCAGCCACGGCAGGCATCCGACT	111		
Sbjct 38532	GAGCGTGGATGGCAGGCAGGGCAGGCACGGCAGGCAGGCATCCGACT	38591		
Query 112	TACGGTATTCCGGTCTGGAGGGATACTGGC - - CTGTCGACGCACAGCGCAGC	168		
Sbjct 38592	TACGGTATTCCGGTCTGGAGGGATACTGGC - - CTGTCGACGCACAGCGCAGC	38651		

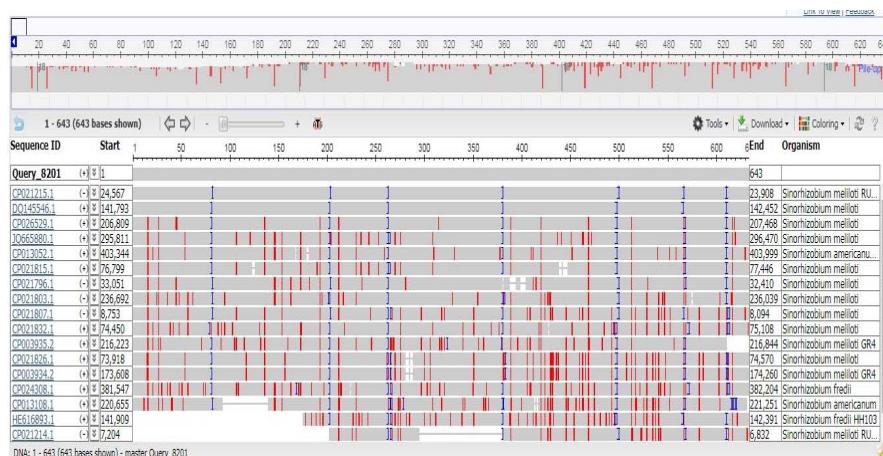
باکری شماره ۳ (Sinorhizobium meliloti (Sequence ID= DQ-145546.1))

(درصد همپوشانی ۹۶/۰۴ و گپ های بازی ۴ درصد)

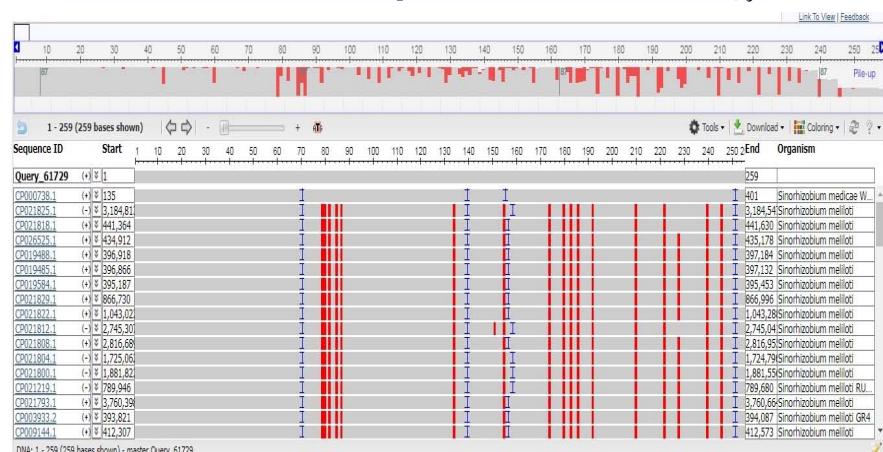
شکل ۵- هم ترازی جفت بازی ژن‌های باکتری‌های ریزوبیومی

بازهای آنها برای ۳ باکتری جدا شده در شکل ۶ نشان داده شده است.

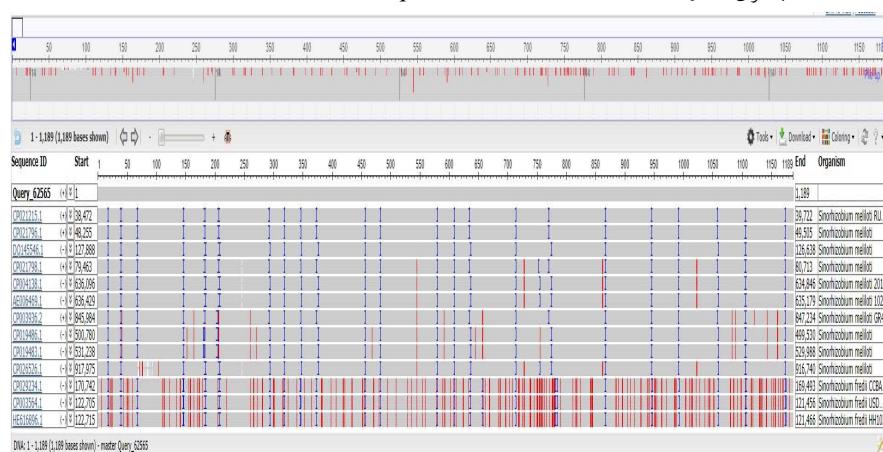
همترازی چندباری با انواع ژن‌های موجود در بانک ژنی و مطابقت با نوع باکتری‌های مشابه براساس تطابق جفت



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



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



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

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

باکتری‌های ریزوبیومی سریع الرشد 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* در جداسازی ریزوبیوم‌های یونجه استان Norooz Nejad و *M. sativa* در همدان (۱۲) و *M. rigidula* 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 شببیله در بیرون 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 رابطه 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 ریبوزومی به شرایط محیطی، می‌توان از باکتری‌های شناسایی به شکلی اختصاصی برای افزایش ثبت نیتروژن و کاهش استفاده از کودهای شیمیایی در زمین‌های کشاورزی خوزستان استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

بعد از نمونه‌برداری و جداسازی گرهک‌های 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* (*Sinorhizobium medicae* (باکتری ۱)، باکتری ۲ و *Sinorhizobium meliloti* (باکتری ۳)) بودند.

بحث

در بسیاری از نقاط دنیا گونه‌های مختلف باکتری ریزوبیومی از گونه‌های مختلف یونجه به جهت استفاده‌ی تجاری در ثبت ازت جداسازی شده‌اند. ریزوبیوم از خانواده ریزوبیاسه، مشهورترین باکتری آندوفیت طبیعی لگوم و تثبیت کننده نیتروژن مولکولی است که جز گروهی از باکتری‌ها با نام ریزوباکتری‌ها محرك رشد گیاه محسوب می‌شود (۴، ۱۰). از طرفی این روزها، مسیرهای رتبه‌ی برای تعریف و درک سیستم‌های رتبه‌ی ارتباط باکتری‌های همزیست و میزان آن‌ها استفاده می‌شوند. توالی ژنوم نژادهایی از ندولهای ریزوبیومی سیمیوتیک *M. loti* (۲۴)، *E. meliloti* 1021 (۸)، *Bradyrhizobium diazoefficiens* MAFF303099 (۱۳) یا *USDA110^T* (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 ۱۴۴۱۷۰-۳۷۸۱۹۰۴ جفت باز در جدایه‌های باکتری‌ایی شد. براساس میزان تشابه باکتری‌ها با توالی ژن-های ثبت شده در NCBI، باکتری‌های شناسایی شده از *Sinorhizobium* و شامل دو گونه (۱)، *Sinorhizobium medicae* و *Sinorhizobium meliloti* 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

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

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

شد.

منابع

- 1- Andrewa, M., Andrewa, M. 2017. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. International Journal of Molecular Sciences. 18: 705- 744.
- 2- Beck, D.P., Matheron, 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., Jumior, 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, Baltimor 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 Igom 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 fenuliye 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., Uchiimi, 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., Reisizadeh, 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 Nagalingam1, T.V., Nithya1, D., Gayathri1, A.S., Sagarika1, 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 Motagh, 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., Delvoye, 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 Rizospher. *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., Haeper, R., Karsisto, M., Lindstrom, K. 1991. Diversit 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.¹, Khoramnezhadian Sh.^{1*}, Rajabzadeh Ghatromi E.^{1,2} and Rashno M.^{1,3,4}

¹Dept. of Environment, Damavand Branch, Islamic Azad University, Damavand, I.R. of Iran.

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

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

⁴Cellular 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.