DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.8.6

مقاله پژوهشی

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

شهرزاد گلابکش[۱]، شهرزاد خرم نژادیان[۱*]، ابراهیم رجب زاده قطرمی[۱و۲] و محمد رشنو[۱و۳و۴]

[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: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

ONLINE FIRST

download date: 6/9/2024

https://www.magiran.com/p2527187

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 میکروسکپی بررسی شد. جهت بیان ژن 16S rDNA ، باکتری‌های ایزوله شده در محیط YMAدر 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 توالی یابی 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 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 جداشده از گیاه جنس یونجه آلفا آلفا (*Medicago sativa*) صورتی بود. نتایج توالی‌یابی 16S rRNA سویه جدا شده از ریزوسفر گیاه یونجه را گونه (Sequence ID= CP 021215.1) *Sinorhizobium meliloti* (باکتری۱)(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 تثبیت 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.

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

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۷۶۳۰۱۲۲۶ ، پست الکترونیکی: 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

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.8.6
مقاله پژوهشی

download date: 6/9/2024
https://www.magiran.com/p2527187

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 هوازی بوده و قادر به استفاده از منابع مختلف قند مثل پنتوزها و هگزوزها 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 تنش‌ها 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 سوش‌های ریزوبیوم همزیست با یونجه و شنبلیه 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 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 Omidi Nasab و Khodakarmian (۲۰۱۷) در جداسازی باکتری‌های اپی‌فیت یونجه نیز گزارش شده است (۱۶). Fuskhah و Darmawati (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 ریبوزومی 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 جمع آوری شد. به منظور جداسازی گرهگ‌ها، ۱۵

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.8.6
مقاله پژوهشی

download date: 6/9/2024
https://www.magiran.com/p2527187

سانتی‌متر 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 (۱۰-۵ ثانیه) و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد (۳-۲ دقیقه) انجام شد. سپس گره‌ها ۶-۵ بار با آب مقطر استریل در کنار شعله شسته و سه بار آخر کرهک‌ها 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 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 سوسپانسیون گره و محلول نمک بر روی پتری 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 جدایه ها 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 ۵-۴ نمونه تهیه گردید (۷).

الف

ب

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

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 میکروسکپی 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: خالص‌سازی DNA ژنومیک با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سینا ژن انجام شد. 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 DNA ژنومی، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymeraz 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).

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.8.6
مقاله پژوهشی

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

ردیف	آغازگر
آغازگر پیشرو (27 F)	AGAAGTTTGATCMTGGCTCAG
آغازگرمعکوس (1492R)	GGTTACCTTGTTACGACTT

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 الحاق پرایمرها به DNA 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 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

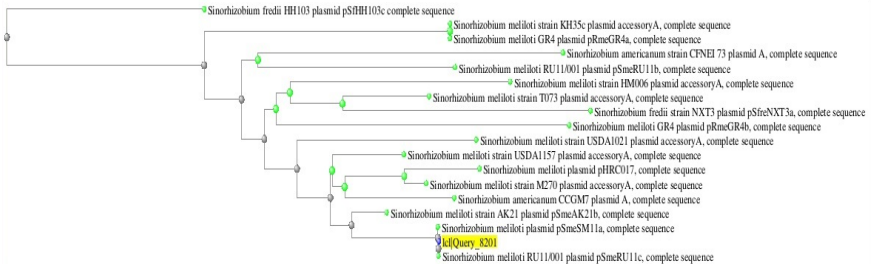
سه سویه از ریزوبیوم گیاه یونجه‌ی آلفا آلفا (*Medicago sativa*) جداسازی و شناسایی شد که همه جدایه ها مشخصات تست های بیوشیمیایی تیپیک باکتری های سینوریزوبیوم را نشان دادند. برخی از مشخصات بیوشیمیایی این باکتری‌ها در جدول ۱ آمده است.

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

	رنگ آمیزی گرم	شکل سلول	سیترات	حرکت	تولید H_2S	اکسیداز	کاتالاز
باکتری ۱	گرم منفی	باسیل	-	+	–	+	+
باکتری ۲	گرم منفی	باسیل	-	+	v	+	+
باکتری ۳	گرم منفی	باسیل	-	+	v	+	+

در بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی، باکتری شماره ۱ با ویژگی های گرم منفی و ایجاد کلنی‌های کرم رنگ و برجسته بر روی محیط کشت YMA بود (شکل ۲). نتایج توالی‌یابی 16S rRNA سویه جدا شده از ریزوسفر گیاه یونجه را گونه (Sequence ID= CP 021215.1) *Sinorhizobium meliloti* (باکتری ۱) معرفی کرد.

الف



ب

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

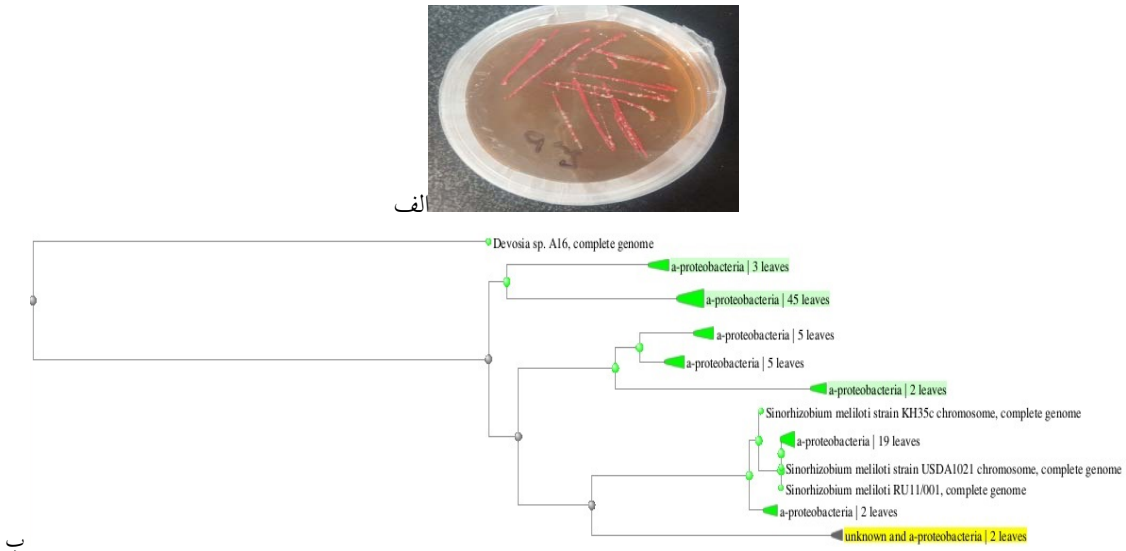
download date: 6/9/2024
https://www.magiran.com/p2527187

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.8.6
مقاله پژوهشی

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

کلنی باکتری شماره ۳ جداشده از گیاه جنس یونجه آلفا آلفا (*Medicago sativa*) صورتی بود. باکتری (Sequence *Sinorhizobium meliloti* (ID= DQ-145546.1 شناسایی 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.



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

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

download date: 6/9/2024
https://www.magiran.com/p2527187

مقاله پژوهشی DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.8.6

download date: 6/9/2024
https://www.magiran.com/p2527187

Sinorhizobium meliloti plasmid pSmeSM11a, complete sequence

Sequence ID: DQ145546.1 Length: 144170 Number of Matches: 1

Range 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       ATGGCTGATGAGCGCTCCAAAGGTTCATACACCTATCCCAACACGTCGGACGATCCAGAC  60
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  141793  ATGGCTGATGAGCGCTCCAAAGGTTCATACACCTATCCCAACACGTCGGACGATCCAGAC  141852

Query  61      CGGACGAACGTTCTGAAAAAC--ATGGGGAATTGAAACCCATTCCGAGCTGCGCGTGAAA  118
               ||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  141853  CGGACGAACGTTCTGAAAAACAGATGGGGAATTGAAACCCATTCCGAGCTGCGCGTGAAA  141912

Query  119     GAGTATCGCGCGACCGCGGTGCGGATGCAGGAAATCGCTGAAGGAGACGGCCCGCAAGGC  178
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  141913  GAGTATCGCGCGACCGCGGTGCGGATGCAGGAAATCGCTGAAGGAGACGGCCCGCAAGGC  141972

Query  179     AATTTCGACAAAGCCCACCTGAAG--GATTCACGGTTACATTTTTCAGGATGTGTACGAA  236
               ||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  141973  AATTTCGACAAAGCCCACCTGAAGGCGATTCACGGTTACATTTTTCAGGATGTGTACGAA  142032

Query  237     TGGGCCGGTCATACGCGCAACGAAAG--CCGTCGTTGAGGGTCAGCGCGTAGAGCCGATC  294
               ||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  142033  TGGGCCGGTCATACGCGCAACGAAAGTCCCGTCGTTGAGGGTCAGCGCGTAGAGCCGATC  142092

Query  295     GGCGGCCTCTCTAAGGGCGGCACGTCCTTCCTGCCCGGCTCGCGCATAGAAATGGGTCTG  354
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  142093  GGCGGCCTCTCTAAGGGCGGCACGTCCTTCCTGCCCGGCTCGCGCATAGAAATGGGTCTG  142152

Query  355     GACGAGGCGCTGAAGCCGATCCGAGA--CGCAGGCCTTTCGCAATGCAACGCCTGAGGAG  412
               ||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  142153  GACGAGGCGCTGAAGCCGATCCGAGATCCGCAGGCCTTTCGCAATGCAACGCCTGAGGAG  142212
```

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

(درصد همپوشانی ۹۷ و گپ های بازی ۲ درصد)

Sinorhizobium medicae WSM419, complete genome

Sequence ID: CP000738.1 Length: 3781904 Number of Matches: 1

Range 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    ATGGCCAATACAACTTCGGCGAAAAAGGCGACCCGCAAGATCGCACGCCGTACCGCAGTG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  135  ATGGCCAATACAACTTCGGCGAAAAAGGCGACCCGCAAGATCGCACGCCGTACCGCAGTG  194

Query  61   AACAAGGCCC--CGTTCGCGTGTTCGTAACTTCGTCCGCAAGGTCGAAGAGGCGATCGCT  118
            ||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  195  AACAAGGCCCGTCGTTCGCGTGTTCGTAACTTCGTCCGCAAGGTCGAAGAGGCGATCGCT  254

Query  119  TCCGGCGATCAGGCAGTCGCA--CGCCGCCCTGAAGGCA--GCAGCCGGAGCTGATGCGT  174
            ||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||
Sbjct  255  TCCGGCGATCAGGCAGTCGCAGCCGCCGCCCTGAAGGCAGCGCAGCCGGAGCTGATGCGT  314

Query  175  GCCGCTACCAAAGGCGTGATGCATTCCAACACGGCGTCGCGTAAGGTTTCGCGCCTGGCG  234
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  315  GCCGCTACCAAAGGCGTGATGCATTCCAACACGGCGTCGCGTAAGGTTTCGCGCCTGGCG  374

Query  235  CAGCGTGTGAAAAGCCT--CGGCCTAA  259
            |||||||||||||||||  ||||||||
Sbjct  375  CAGCGTGTGAAAAGCCTTTCGGCCTAA  401
```

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

(درصد همپوشانی ۹۷ و گپ های بازی ۲ درصد)

Sinorhizobium meliloti RU11/001 plasmid pSmeRU11c, complete sequence

Sequence ID: CP021215.1 Length: 144210 Number of Matches: 1

Range 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--TCTGGGACTTGCTCTGGCAATA----TGCTTGTGGGGCTC  54
              ||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||    ||||||||||||||
Sbjct  38472  ATGGAACCTCTTATTCTCCGTCTGGGACTTGCTCTGGCAATAGGTTTGCTTGTGGGGCTC  38531

Query  55     GAGCGTGGATGGCG---AAGGGAAGCGCCGGCAGGCAGCCGCACGGCAGGCATCCGCACT  111
              ||||||||||||||   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  38532  GAGCGTGGATGGCGCGAAAGGGAAGCGCCGGCAGGCAGCCGCACGGCAGGCATCCGCACT  38591

Query  112    TACGGTATTTCCGGTCTGCTTGGAGGGATAGTGGCC---CTGTCCGACGCACAGCGCAGC  168
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||   ||||||||||||||||||||||
Sbjct  38592  TACGGTATTTCCGGTCTGCTTGGAGGGATAGTGGCCGCACTGTCCGACGCACAGCGCAGC  38651
```

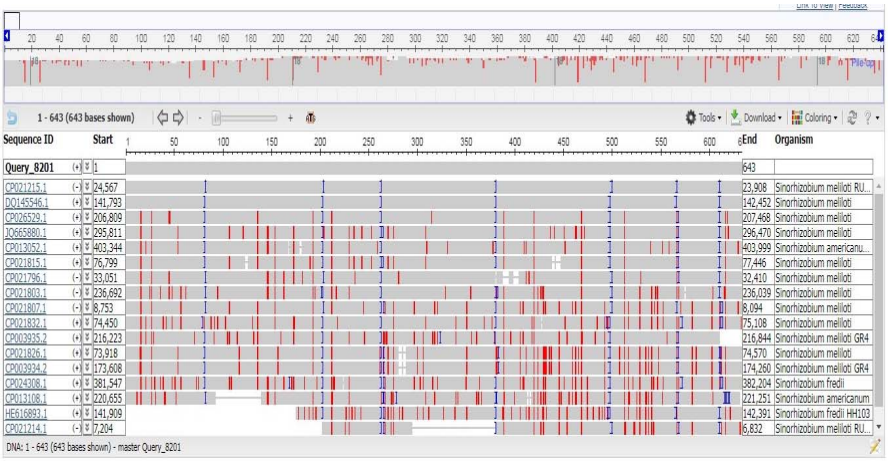
باکتری شماره ۳ (Sequence ID= DQ-145546.1) *Sinorhizobium meliloti*

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

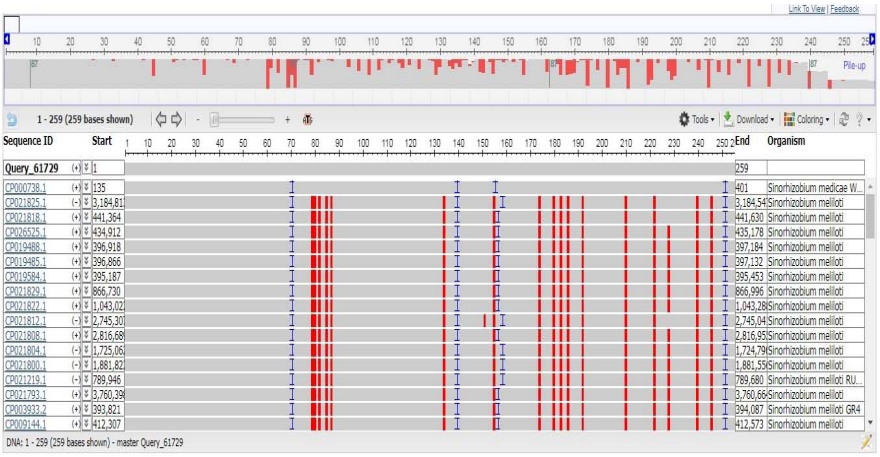
شکل ۵- هم‌ترازی جفت بازی ژن‌های باکتری‌های ریزوبیومی

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.8.6
مقاله پژوهشی

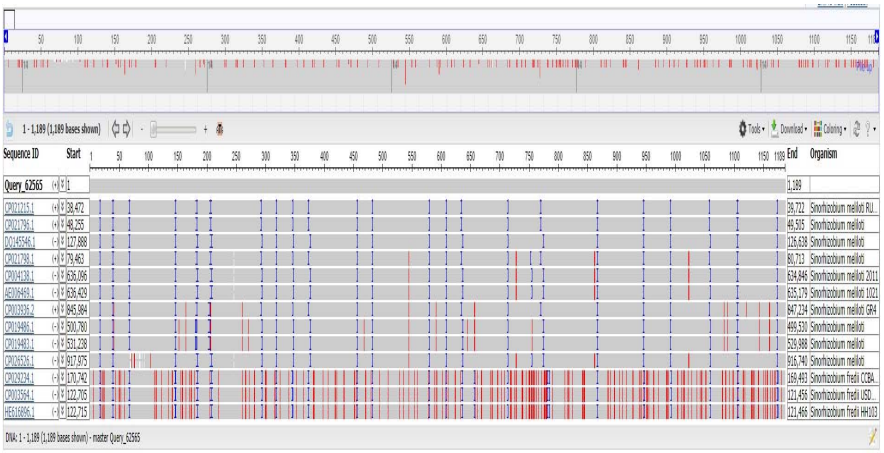
همترازی چندبازی با انواع ژن‌های موجود در بانک ژنی و مطابقت با نوع باکتری‌های مشابه براساس تطابق جفت بازهای آنها برای ۳ باکتری جدا شده در شکل ۶ نشان داده شده است.



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

download date: 6/9/2024
https://www.magiran.com/p2527187

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.8.6
مقاله پژوهشی

download date: 6/9/2024
https://www.magiran.com/p2527187

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 کننده‌ی 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 ارتبط باکتری‌های همزیست و میزبان آن‌ها استفاده می‌شوند. توالی ژنوم نژادهایی از نودول‌های ریزوبیومی سیمبیوتیک همانند *E. meliloti* 1021 (۸)، Rlv 3841 (۲۴)، *M. loti* MAFF303099 (۱۳) یا *Bradyrhizobium diazoefficiens* 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 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 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 rigidula* 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 شنبلیله 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 ریبوزومی 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* (باکتری۱)،باکتری دوم *Sinorhizobium medicae*

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.8.6
مقاله پژوهشی

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

تقدیر و تشکر

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., 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 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., 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

https://www.magiran.com/p2527187 download date: 6/9/2024

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.8.6
مقاله پژوهشی

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 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., 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. Isolution 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., Haeper, 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.

https://www.magiran.com/p2527187 download date: 6/9/2024

مقاله پژوهشی
DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.3.8.6

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]

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

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

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

[4] **Cellular and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences Ahvaz, I.R. of Iran**

download date: 6/9/2024
https://www.magiran.com/p2527187

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.