ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٧
صفحه ٤٥٧ - ٤٤٥

جداسازی و شناسایی ریزوباکترهای همزیست با برخی از لگوم‌های غیر زراعی استان البرز

Isolation and identification of Rhizobacteria in a symbiotic relation with some non-cultivated legumes of Alborz province

مهیار مرزبان[١]، احمدعلی پوربابایی[*٢]، محمدعلی آموزگار[٣]، محمدرضا نقوی[٤]، علیرضا عباسی[٤]

١- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

٢- دانشیار، آزمایشگاه بیوتکنولوژی، گروه علوم و مهندسی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

٣- استاد، آزمایشگاه اکستریموفیل‌ها، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

٤- به‌ترتیب استاد، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

Marzban M[1], Pourbabaee AA[*2], Amoozegar MA[3], Naghavi MR[4], Abbasi A[4]

1- PhD Student, Department of Agricultural Biotechnology, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2- Associate Professor, Biotechnology Laboratory, Department of Soil Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3- Professor, Extremophiles Laboratory, Department of Microbiology, Faculty of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
4- Professor, Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: pourbabaei@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ٩٧/٣/١١ - تاریخ پذیرش: ٩٧/١٢/١٥)

چکیده

ریزوباکترهایی که به‌واسطه تحریک رشد و سرکوب بیماری‌ها به گیاه سود می‌رسانند ریزوباکترهای محرک رشد گیاه (PGPR) نامیده می‌شوند که باکتری‌های ریزوبیومی را نیز شامل می‌شوند. ریزوبیوم‌ها علاوه بر فراهم کردن نیتروژن، رشد سیستم ریشه گیاه را نیز ارتقا داده و جذب مواد غذایی را بهبود می‌بخشند. در پژوهش حاضر به‌منظور جداسازی و شناسایی ریزوباکترها به‌ویژه ریزوبیوم‌های همزیست با لگوم‌های غیر زراعی، از زمین‌های ١٢ نقطه استان البرز، ٢١ نمونه گیاهی جمع‌آوری شد. به‌منظور جداسازی باکتری‌ها، سری رقت از گرهک‌ها، خاک‌های ریزوسفری و ریشه‌ها تهیه شد. پس از کشت و خالص‌سازی در محیط کشت YMA، خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی سویه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مجموعاً ١٦ سویه خالص به‌دست آمد. DNA همگی آن‌ها استخراج و ژن 16S rRNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و توسط آغازگر اختصاصی تکثیر شد. سویه‌ها توسط توالی‌های این ژن و با استفاده از پایگاه داده EzTaxon شناسایی شدند. تمامی سویه‌های جدا شده در پژوهش حاضر متعلق به ١٢ گونه بودند. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ژن‌های *atpD*، *nodA* و *nifH* نیز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. درخت‌های فیلوژنتیک با استفاده از روش آماری درست‌نمایی بیشینه (ML) ساخته و فواصل تکاملی با استفاده از مدل Tamura-Nei محاسبه شدند. بر اساس نتایج به‌دست آمده از چهار سویه *Ensifer meliloti* جدا شده در این پژوهش تنها سویه Tal31 با افزایش غلظت نمک از یک درصد به دو درصد (w/v) رشد بیشتری داشت. بنابراین این سویه احتمالاً مقاوم به شوری است. برای اولین بار است که در پژوهش حاضر سویه *Rhizobium laguerreae* (Tal71) و سویه *Neorhizobium alkalisoli* (Krj1) به‌ترتیب از گرهک‌های ریشه گیاه شبدر قرمز (*Trifolium pratense*) و دغدغک البرزی (*Colutea buhsei*) جدا شده‌اند. این یافته‌ها مبین آن است که طیف میزبانی سویه‌های ریزوبیومی بیشتر از آن است که در گذشته تخمین زده می‌شد.

واژه‌های کلیدی

البرز
ریزوباکتر
ریزوبیوم
گرهک
لگوم

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.1.4]

مقدمه

باور موجود بر این است واژه لاتین *legumen* از فعل *legere* (با هم بودن) آمده و منشاء واژه لگوم (legume) می‌باشد. با این حال زبان انگلیسی این واژه را از واژه فرانسوی *légume* قرض گرفته است که اشاره به هر گونه رستنی دارد (Pratap and Kumar 2011). خانواده بقولات (Leguminosae) از بزرگ‌ترین خانواده گیاهان گلدار است که دارای ۷۵۱ جنس و ۱۹۵۰۰ گونه گیاهی می‌باشد (Christenhusz and Byng 2016). ریزوباکترهایی که با تحریک رشد و سرکوب بیماری‌ها به گیاهان سود می‌رسانند ریزوباکترهای محرک رشد گیاه (PGPR)[1] نامیده می‌شوند (Islam 2016). این ریزوباکترها در ریزوسفر بسیاری از گونه‌ها تولید کلنی کرده و اثرات مثبتی دارند، مانند افزایش رشد گیاه و کاهش حساسیت به بیماری‌هایی که توسط پاتوژن‌های قارچی، باکتریایی، ویروسی و نماتدها ایجاد می‌شود (Yang et al. 2009). ریزوباکترهای محرک رشد گیاه شامل ریزوبیوم‌های تثبیت‌کننده نیتروژن نیز می‌شوند. نمونه‌هایی از گونه‌های این ریزوباکترها *Pseudomonas* spp.، *Bacillus* spp.، *Rhizobium* spp. و ... هستند (Miransari 2014). بقولات می‌توانند گرهک‌هایی را بر روی ریشه تشکیل داده و رابطه همزیستی دوسویه‌ای را با باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن که با عنوان ریزوبیوم‌ها شناخته می‌شوند، ایجاد کنند (Quain et al. 2015; Vauclare et al. 2013). ریزوبیوم‌ها به‌واسطه توانایی‌شان در تثبیت نیتروژن در همزیستی با گیاهان لگوم مورد توجه هستند (Chang et al. 2007). ریزوبیوم‌ها ممکن است به دو حالت باکتری آزادزی در خاک یا به‌صورت باکتروئیدهای همزیست داخل گرهک‌های لگوم زندگی کنند (Quelas et al. 2013). تثبیت زیستی نیتروژن (BNF)[2] جزء مهم و اساسی سیستم‌های کشاورزی پایدار محسوب می‌شود (Sessitsch et al. 2002). تثبیت زیستی نیتروژن پس از فتوسنتز مهم‌ترین فرایند زیستی محسوب می‌شود. این فرایند تقاضای جهانی برای نیتروژن را با فراهم کردن ۱۷۵ میلیون تن نیتروژن در سال برآورده می‌کند که از این میزان ۶۵ درصد توسط کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همزیستی لگوم- ریزوبیوم ۶۰ درصد کل تثبیت زیستی نیتروژن را شامل می‌شود (Arora et al. 2012; Zou et al. 2016). ژن‌های باکتریایی گره‌زا (*nod*) که توسط فلاوونوئیدهای گیاهی القا می‌شوند، تعیین کننده تولید عوامل Nod می‌باشند. این عوامل مولکول‌های اصلی پیام‌رسان گره‌زایی محسوب می‌شوند (Laguerre et al. 2001). مطالعات بر روی ژنوم باکتروئیدهای *Sinorhizobium meliloti* و *Rhizobium leguminosarum* نشان داد که بیان ژن‌های *nod* از جمله *nodA*، پنج تا هشت روز پس از تلقیح افزایش یافت (Vercruysse et al. 2011). ریزوبیوم‌های همزیست، علاوه بر فراهم کردن نیتروژن، به‌واسطه ارتقای رشد سیستم ریشه گیاه از طریق تولید اندول استیک اسید (IAA)، جذب مواد غذایی را بهبود می‌بخشند و به‌عنوان میکروب آزادزی در ریزوسفر، فسفر و مواد معدنی گوناگون را به‌صورت محلول در می‌آورند (Bhargava et al. 2016). اکثر مطالعات مربوط به شناسایی آرایه‌ها[3] تاکنون بر روی لگوهای زراعی و یا گیاهان غیر زراعی که توسط انسان تیمار شده‌است، متمرکز بوده‌اند (Muresu et al. 2008). با وجود اهمیت ریزوبیوم‌ها برای کشاورزی و محیط زیست، مطالعات بر روی تبارشناسی و رده‌بندی ریزوبیوم‌ها نسبتاً ناچیز است (Azevedo et al. 2015). برخی گزارش‌ها از جداسازی ریزوبیوم‌ها از لگوم‌های وحشی شامل، جداسازی و شناسایی سویه‌های ریزوبیومی در همزیستی طبیعی با لگوم‌های درختچه‌ای ریاض عربستان سعودی (Shetta et al. 2011) و ارزیابی تنوع فنوتیپی جدایه‌های ریزوبیومی از لگوم‌های وحشی زیستگاه‌های نیمه خشک تیروپاتی هندوستان (Bhargava et al. 2016) هستند. توانایی ریزوبیوم‌های جدا شده از گرهک‌های لگوهای وحشی در تثبیت نیتروژن، ممکن است بسیار بهتر از ریزوبیوم‌های تاکنون شناسایی شده باشد. نیاز به کاوش در زمین‌های غیر زراعی، خاک‌های طبیعی و گیاهان وحشی گرهک‌ساز برای دانستن گوناگونی ریزوبیومی آن‌ها و کاربرد اقتصادی‌شان محسوس می‌باشد (El-Lithy et al. 2014; Bhargava et al. 2016). در همین راستا در پژوهش حاضر به‌منظور رسیدن به منابع جدیدی از مایه تلقیح، جداسازی و شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی ریزوباکترها، به‌خصوص

[1] Plant growth-promoting rhizobacteria
[2] Biological nitrogen fixation
[3] Taxa

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.1.4]

ریزوباکترهای ریزوبیومی همزیست با لگوم‌های غیر زراعی زمین‌های بکر استان البرز و مطالعه تبارشناسی آن‌ها هدف‌گذاری شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری در خرداد ماه ۱۳۹۶ در سه مرحله انجام گرفت. به‌منظور جداسازی گرهک‌ها از ریشه لگوم‌های غیر زراعی، ۲۱ نمونه لگوم از ۱۲ مکان در سه شهرستان استان البرز جمع‌آوری شد (جدول ۱ و شکل ۱). بر روی ریشه چندین نمونه گرهک‌ها به‌وضوح مشهود بودند و در چندین نمونه گرهک‌ها به‌وضوح دیده نمی‌شدند. در نتیجه به‌منظور جداسازی باکتری، هم از خاک و هم از گرهک‌های روی ریشه استفاده شد. به این ترتیب گرهک‌ها از روی ریشه‌های نازک جدا شده و داخل پلاستیک بر روی یخ خشک قرار داده شدند. به‌همراه آن‌ها، نمونه‌های خاک ریزوسفری ریشه نیز داخل پاکت‌های پلاستیکی یک بار مصرف زیپ‌دار، درون فلاسک‌های حاوی یخ خشک، به آزمایشگاه میکروبیولوژی کشاورزی واقع در بانک میکروارگانیسم‌های مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (http://en.ibrc.ir/page/microorganisms+bank) منتقل شدند. نمونه‌های کامل گیاهی شامل اندام‌های هوایی و ریشه نیز به‌منظور شناسایی لگوم مربوطه به بانک گیاهی مرکز مذبور تحویل داده شد.



شکل ۱- محدوده جغرافیایی و مکان‌های نمونه‌گیری شده در نقشه که توسط وب‌سایت www.gpsvisualizer.com تهیه شد. نقاط نمونه‌گیری شده با خط قرمز به یکدیگر متصل شدند.

جدول ۱- جزئیات مکان‌های جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی.

ردیف	استان	شهرستان	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	دما (°C)	تعداد نمونه	تاریخ نمونه‌گیری
۱	البرز	ساوجبلاغ	50° 53′ 27″E	35° 54′ 14″N	۲۸	۱	۹۶/۰۳/۰۸
۲	البرز	ساوجبلاغ	50° 53′ 19″E	35° 54′ 39″N	۲۹	۲	۹۶/۰۳/۰۸
۳	البرز	ساوجبلاغ	50° 52′ 03″E	35° 54′ 45″N	۲۸	۲	۹۶/۰۳/۰۸
٤	البرز	ساوجبلاغ	50° 52′ 57″E	35° 54′ 08″N	۳۱	۲	۹۶/۰۳/۰۸
٥	البرز	طالقان	50° 38′ 31″E	36° 05′ 21″N	۲۹	۱	۹۶/۰۳/۱٦
٦	البرز	طالقان	50° 32′ 37″E	36° 07′ 11٫N	۳۰	۲	۹۶/۰۳/۱٦
۷	البرز	طالقان	50° 38′ 06″E	36° 06′ 48″N	۲۹	۲	۹۶/۰۳/۱٦
۸	البرز	طالقان	50° 39′ 50″E	36° 07′ 20″N	۲۸	۲	۹۶/۰۳/۱٦
۹	البرز	طالقان	50° 42′ 56″E	36° 09′ 58″N	۲۸	۲	۹۶/۰۳/۱٦
۱۰	البرز	طالقان	50° 42′ 56″E	36° 10′ 36″N	۳۱	۱	۹۶/۰۳/۱٦
۱۱	البرز	طالقان	50° 53′ 35″E	36° 11′ 22″N	۳۵	۲	۹۶/۰۳/۱٦
۱۲	البرز	کرج	51° 20′ 37″E	36° 12′ 08″N	۲٦	۲	۹۶/۰۳/۲۵

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.1.4]

به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها و جداسازی ریزوباکترها، ابتدا گرهک‌های روی ریشه‌ها با قیچی جدا شده و ضدعفونی شدند. ضدعفونی گرهک با هیپوکلریت سدیم سه درصد به مدت سه دقیقه صورت گرفت. سپس گرهک‌ها به مدت دو دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفته و با آب‌مقطر استریل شستشو داده شدند. ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل داخل لوله‌های اپندورف ریخته شد و گرهک‌های هر ریشه (چهار تا پنج عدد) داخل یک لوله، با میله شیشه‌ای له شد (تغییر رنگ نشان‌دهنده جدا شدن و لیز گرهک‌ها بود) (De Meyer et al. 2011). به‌منظور کشت ریزوباکترهای خاک نیز ابتدا از خاک‌ها رقت‌های متوالی تهیه شد. در برخی از نمونه‌ها از قطعات خرد شده ریشه نیز رقت‌های متوالی تهیه شد.

به‌منظور اندازه‌گیری pH، از خاک‌های ریزوسفر عصاره یک به یک تهیه شد. به این منظور ۲۰۰ گرم خاک به اضافه ۲۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر به مدت ۳۰ دقیقه به‌هم زده شدند. مخلوط حاصل از کاغذ صافی رد شد تا به تدریج محلول صاف که حاوی عصاره خاک است جمع‌آوری شود. سپس pH عصاره‌های یک به یک خاک توسط دستگاه pH متر ثبت شد. جهت کشت، جداسازی و خالص‌سازی سویه‌ها، در ابتدا محیط YMA[1] حاوی رنگ قرمز کنگو آماده شد. از آنجایی که در پژوهش حاضر اولویت با جداسازی باکتری‌های گرهک‌ساز بود از محیط YMA استفاده شد. محیط YMA برای جداسازی گونه‌های *Rhizobium* و *Azorhizobium* مناسب است (Atlas 2010). ۳۰ میکرولیتر از عصاره گرهک‌ها، رقت‌های متوالی خاک و ریشه بر روی هر پلیت حاوی محیط کشت در حدود ٤٨ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۲۸°C کشت شدند. به‌منظور خالص‌سازی جدایه‌ها تک کلنی‌هایی که ظاهری آبدار، محدب و گنبدی شکل[2] داشتند مجدداً بازکشت شدند.

صفات مورفولوژیکی کلنی‌ها مانند اندازه، رنگ، شکل، شفافیت، موکلوئید بودن و الگوی رشد بررسی و ثبت شد. به‌منظور مشاهده باکتری‌ها زیر میکروسکوپ، نسبت به تهیه لام و رنگ‌آمیزی گرم (Beveridge 2001) اقدام شد. لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰× و با استفاده از روغن ایمرسیون مشاهده شدند. حرکت باکتری‌ها نیز توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد. به‌منظور تایید رنگ‌آمیزی گرم، آزمون KOH با استفاده از محلول KOH سه درصد صورت گرفت. به این منظور تک کلنی باکتری توسط لوپ از روی پتری برداشته و به مدت یک دقیقه بر روی لام تمیز با محلول KOH همزده شد. آهسته لوپ از سطح لام جدا شد. اگر سوسپانسیون باکتری به‌صورت کشدار ظاهر شود، باکتری گرم منفی است (Islam et al. 2016). آزمون اکسیداز برای تعیین وجود آنزیم پراکسیداز در سویه‌ها باکتریایی توسط دیسک‌های آزمون اکسیداز (Merck, Germany) صورت گرفت. تغییر رنگ دیسک از سفید به بنفش در اثر تماس با کلنی نشان دهنده واکنش مثبت بود. آزمون کاتالاز به‌منظور بررسی وجود آنزیم کاتالاز در کلنی‌های باکتری انجام گرفت. به این منظور یک قطره از پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۳۰ درصد در سطح لام قرار داده و مقدار کمی از کلنی باکتری در آن حل شد. اگر حباب‌های گاز آزاد شوند، نشان‌دهنده حضور آنزیم کاتالاز در باکتری و شکسته شدن پراکسید هیدروژن به مولکول‌های آب و اکسیژن بود (Al-Judy and Majeed 2013). توانایی رشد سویه‌ها در دماهای مختلف توسط پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد و گرمخانه‌گذاری در دماهای ۲۸°C، ۳٤°C و ٤۰°C مورد ارزیابی قرار گرفتند. محدوده رشد سویه‌ها در pHهای گوناگون برای pHهای چهارتا نه مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای آزمون تحمل نمک، رشد سویه‌ها در حضور نمک مورد بررسی قرار گرفت. جهت سنجش محدوده‌ی رشد سویه‌ها از محیط کشت YMB[3] که حاوی درصدهای مختلف NaCl بودند (یک درصد و دو درصد (w/v)) استفاده شد. میزان جذب نوری سوسپانسیون باکتری پس از ٤٨ ساعت توسط اسپکتروفتومتر فرابنفش (Shimadzu, Japan) در طول موج ٦۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

به‌منظور استخراج DNA باکتری‌ها، DNA ژنومی همه سویه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC, Iran) مطابق با پروتوکل سازنده استخراج و کیفیت DNA استخراج شده توسط الکتروفورز PowerPac™ (Bio-Rad, USA) بر روی ژل آگارز یک درصد تایید شد.

[1] Yeast Mannitol Agar
[2] Convex and pulvinate
[3] Yeast Mannitol Broth

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.1.4]

عکس‌برداری از ژل‌ها با استفاده از تابش فرابنفش توسط دستگاه ترانسلومیناتور GelDoc (Syngene, UK) و نرم‌افزار GeneSnap v.7.12.06 (Syngene, UK) انجام گرفت. کمیت DNA استخراج شده نیز توسط دستگاه اسپکتوفتومتری نانودراپ (Picodrop, USA) سنجش شد.

در این پژوهش کلیه واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای ژن‌های 16S rRNA، *atpD*، *nodA* و *nifH* با دستگاه ترموسایکلر MyCycler™ (Bio-Rad, USA) انجام گرفت. کلیه آغازگرها توسط شرکت Microsynth سوییس ساخته شد (جدول ۲). کلیه واکنش‌ها ۳۵ چرخه بودند که با یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه چهار دقیقه‌ای در دمای ۹۵°C شروع شدند. شرایط واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز به این ترتیب می‌باشد؛ ۱- ژن 16S rRNA: ۹۴°C به مدت ٤٥ ثانیه، ۵۹°C به مدت ٤٥ ثانیه و ۷۲°C به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه به‌همراه ۱۰ دقیقه گسترش نهایی در دمای ۷۲°C. ۲- ژن *atpD*: ۹٤°C به مدت ٤٥ ثانیه، ۵۵°C به مدت ٤٥ ثانیه و ۷۲°C به مدت یک دقیقه به‌همراه هفت دقیقه گسترش نهایی در دمای ۷۲°C. ۳- ژن *nifH*: ۹٤°C به مدت ٤٥ ثانیه، ۵۷°C به مدت ٤٥ ثانیه و ۷۲°C به مدت یک دقیقه به‌همراه هفت دقیقه گسترش نهایی در دمای ۷۲°C. ٤- ژن *nodA*: ۹٤°C به مدت ٤٥ ثانیه، ۵۵°C به مدت ٤٥ ثانیه و ۷۲°C به مدت یک دقیقه به‌همراه هفت دقیقه گسترش نهایی در دمای ۷۲°C. محصولات به‌دست آمده توسط کیت خالص‌سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز High Pure (Merck, Germany) خالص شدند. تمام محصولات خالص شده PCR جهت تعیین ترادف از طریق شرکت توپاژ ژن کاوش به شرکت Microsynth سوییس ارسال شدند. توالی‌یابی با استفاده از روش سنگر صورت گرفت. کلیه توالی‌های دریافت شده توسط نرم‌افزار ChromasPro v.1.7.4 مورد بررسی و ویرایش قرار گرفتند. به‌منظور شناسایی مولکولی سویه‌ها، توالی‌های پسرو و پیشرو ژن 16S rRNA توسط نرم‌افزار ChromasPro v.1.7.4 سرهم‌بندی[1] شدند. توالی‌های سرهم‌بندی شده ژن *16S rRNA* در پایگاه داده EzTaxon (https://www.ezbiocloud.net) (Kim et al. 2012) با توالی‌های ثبت شده و موجود در پایگاه مذکور مقایسه شدند. سویه‌ای که بیشترین تشابه را با سویه مورد نظر داشت به‌عنوان مرجع شناسایی سویه جدا شده قرار گرفت.

توالی‌های سایر ژن‌ها توسط ابزار nucleotide blast در پایگاه داده NCBI با توالی‌های موجود در پایگاه مذکور مقایسه شدند. سپس کلیه توالی‌های به‌دست آمده از طریق ابزار BankIt در پایگاه داده NCBI ثبت و برای آن‌ها شماره دسترسی دریافت شد (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt) (جدول ۳). جاهایی که در جدول شماره دسترسی آورده نشده به این معنی است که محصول PCR برای آن ژن به‌دست نیامد.

درخت فیلوژنتیک برای ژن *16S rRNA* سویه‌هایی که در پژوهش حاضر جداسازی شدند به‌همراه سویه شاخص مرجع آن‌ها که از NCBI GenBank به‌دست آمد (جدول ٤)، با استفاده از الگوریتم هم‌ردیفی ClustalW و توسط نرم‌افزار MEGA6 کشیده شد (Tamura et al. 2013). دندوگرام با استفاده از روش آماری درست‌نمایی بیشینه (ML)[2] ساخته شد. اطمینان به گره‌ها با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ[3] تخمین زده شد. فواصل تکاملی با استفاده از مدل Tamura-Nei محاسبه شد (Tamura and Nei 1993).

[1] assemble
[2] Maximum likelihood
[3] bootstrap

جدول ۲- مشخصات آغازگرها

ژن‌ها	آغازگرها (′۳→′۵)		منابع
16S rRNA	F: 27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (20)	(Willems et al. 2001)
	R: 1492R	TACGGTTACCTTGTTACGACTT (22)	
nodA	F: nodA-1	TGCRGTGGAARNTRNNCTGGGAAA (24)	(Haukka et al. 1998)
	R: nodA-2	GGNCCGTCRTCRAAWGTCARGTA (23)	
nifH	F: nifHF	TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA (23)	(Laguerre et al. 2001)
	R: nifHI	AGCATGTCYTCSAGYTCNTCCA (22)	
atpD	F: 255F	GCTSGGCCGCATCMTSAACGTC (22)	(Shamseldin et al. 2008)
	R: 782R	GCCGACACTTCMGAACCNGCCTG (23)	

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.1.4]

جدول ۳- شماره دسترسی‌های به‌دست آمده از پایگاه داده NCBI.

ردیف	سویه	شماره دسترسی ژن 16S rRNA	شماره دسترسی ژن *atpD*	شماره دسترسی ژن *nodA*	شماره دسترسی ژن *nifH*
۱	Sav1	MH045723	MG581357	MG604333	MG581356
۲	Sav1S	MG461568	MG581358	N/A	N/A
۳	Sav42	MH201175	N/A	N/A	N/A
٤	Tal21	MG461619	MG581359	N/A	N/A
٥	Tal22	MH000694	N/A	N/A	N/A
٦	Tal31	MG461663	MG581360	MG604335	MG604334
۷	Tal32	MG493251	N/A	N/A	N/A
۸	Tal41	MH000695	N/A	N/A	N/A
۹	Tal42	MG461613	MG604336	MG604340	MG604339
۱۰	Tal51	MG597060	N/A	N/A	N/A
۱۱	Tal52	MH000684	MG604342	MG604344	MG604343
۱۲	Tal6	MG571576	N/A	N/A	N/A
۱۳	Tal62	MG738270	N/A	N/A	N/A
۱٤	Tal71	MG786535	MG604337	MG604341	MG604338
۱٥	Tal72	MH001397	N/A	N/A	N/A
۱٦	Krj1	MG432239	MG495132	N/A	N/A

جدول ٤- سویه‌های شاخص مرجع انتخاب شده از NCBI و شماره دسترسی GenBank آن‌ها

ردیف	16S rRNA	سویه‌های شاخص مرجع
۱	X67222.2	*S. meliloti* (LMG 6133)
۲	NR_026059.1	*R. giardinii* (H152)
۳	NR_027199.1	*A. nitroguajacolicus* (G2-1)
٤	AY785325.1	*P. ifriqiyense* (STM 370)
٥	NZ_CAPJ01000550.1	*X. translucens* (DSM 18974)
٦	CP007597.1	*S. rhizophila* (DSM 14405)
۷	KM359785.1	*M. proteolyticum* (RZ36)
۸	ADBY01000001.1	*S. odorifera* (DSM 4582)
۹	AY427832.1	*P. xylanilyticus* (XIL14)
۱۰	JN558651.2	*R. laguerreae* (FB206)
۱۱	MRDL01000029.1	*R. leguminosarum* (USDA 2370)
۱۲	AJ853891.1	*E. ludwigii* (EN-119)
۱۳	EU074168.1	*N. alkalisoli* (CCBAU 01393)

به‌منظور تجزیه و تحلیل توالی‌های چند جایگاه (MLSA)[1]، درخت‌های فیلوژنتیک برای ژن‌های 16S rRNA-*atpD* و 16S rRNA-*atpD-nodA-nifH* سویه‌های ریزوبیومی نیز توسط نرم‌افزار MEGA6 کشیده شدند. الگوریتم هم‌ردیفی و روش آماری مشابه دندوگرام 16S rRNA بودند.

[1] Multilocus Sequence Analysis

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.1.4]

نتایج

تمامی ۲۱ نمونه گیاهی، شامل اندام‌های هوایی (ساقه، برگ و گل) به‌همراه ریشه توسط متخصصان بانک گیاهی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، از طریق خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی شدند (http://en.ibrc.ir/page/plant+bank). نمونه‌های گیاهی در بانک مذکور نگه‌داری شد و شماره IBRC به آن‌ها تعلق گرفت (جدول ۵).

بازه pH عصاره خاک‌های ریزوسفری بین ٦/٦٨ و ٨/٩ متغیر بود که به‌ترتیب به خاک‌های ریزوسفری خلر زرد و یونجه تاجی تعلق داشتند.

در مجموع ١٦ سویه خالص باکتریایی از گرهک‌ها و رقت‌های متوالی خاک‌های ریزوسفری و ریشه جدا شدند. نام‌هایی که برای این سویه‌ها انتخاب شد شامل: Sav1, Sav1S, Sav42, Tal21, Tal22, Tal31, Tal32, Tal41, Tal42, Tal51, Tal52, Tal6, Tal62, Tal71, Tal72, Krj1 بودند (سویه‌های جدا شده از شهرستان طالقان با حروف Tal، شهرستان ساوجبلاغ با حروف Sav و شهرستان کرج با حروف Krj مشخص شدند). مشخصات مورفولوژیکی آن‌ها بررسی و آزمون‌های حرکت، KOH، کاتالاز و اکسیداز بر روی این سویه‌ها انجام شد (جدول ٦). آزمون بررسی محدوده رشد سویه‌ها در pHهای مختلف نشان داد که کلیه سویه‌ها می‌توانند در محدود pH پنج تا نه رشد کنند. اما سویه‌های Sav1S، Tal31، Tal42، Tal52 و Krj1 قادر به رشد در pH = ٤ نبودند. مطالعه محدوده رشد سویه‌ها در دماهای گوناگون نشان داد که کلیه سویه‌ها قادر به رشد در دمای ٢٨°C و ٣٤°C بودند. اما سویه‌های Sav1S، Sav42، Tal21، Tal32، Tal6، Tal71 و Krj1 قادر به رشد در دمای ٤٠°C نبودند. آزمون رشد در غلظت‌های نمک مختلف (NaCl یک درصد و دو درصد (w/v)) به‌منظور بررسی تحمل سویه‌ها به شوری صورت گرفت. نتایج نشان داد که رشد کلیه سویه‌ها به‌جز Tal71، در حضور NaCl یک درصد و دو درصد (w/v) مثبت بود.

جدول ۵- نام نمونه‌ها به‌همراه شماره IBRC آن‌ها

ردیف	استان	شهرستان	نام فارسی	نام علمی	شماره IBRC
١	البرز	ساوجبلاغ	یونجه زراعی	*Medicago sativa*	در دست انجام
٢	البرز	ساوجبلاغ	یونجه	*Medicago radiate*	در دست انجام
			شنبلیله تک گل	*Trigonella monantha*	در دست انجام
٣	البرز	ساوجبلاغ	گون	*Astragalus sp.*	در دست انجام
			یونجه زراعی	*Medicago sativa*	در دست انجام
٤	البرز	ساوجبلاغ	شنبلیله تک گل	*Trigonella monantha*	در دست انجام
			گون	*Astragalus tribuloides*	در دست انجام
٥	البرز	طالقان	خارشتر	*Alhagi maurorum*	P1012985
٦	البرز	طالقان	شیرین بیان	*Glycyrrhiza glabra*	P1012983
			تلخ بیان	*Sophora alopecuroides*	P1012984
٧	البرز	طالقان	یونجه زرد	*Melilotus sp.*	P1012980
			نخود وحشی	*Cicer sp.*	P1012981
٨	البرز	طالقان	گون	*Astragalus sp.*	P1012986
			آهوماش	*Lotus sp.*	P1012987
٩	البرز	طالقان	یونجه تاجی	*Coronilla varia*	P1012991
			یونجه زراعی	*Medicago sativa*	P1012997
١٠	البرز	طالقان	اسپرس	*Onobrychis sativa*	P1012990
١١	البرز	طالقان	شبدر قرمز	*Trifolium pratense*	P1012988
			خلر زرد	*Lathyrus pratensis*	P1012989
١٢	البرز	کرج	دغدغک البرزی	*Colutea buhsei*	P1012998
			یونجه باغی زرد	*Coronilla orientalis*	P1012999

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.1.4]

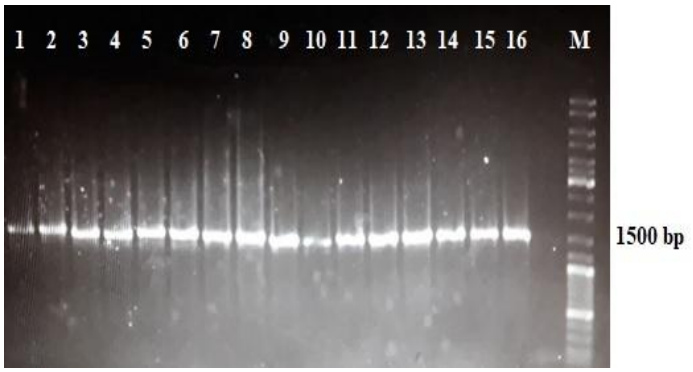
جدول ٦- مورفولوژی کلنی‌ها و آزمون بیوشیمیایی سویه‌ها

ردیف	سویه	مورفولوژی کلنی	آزمون حرکت	رنگ‌آمیزی گرم	آزمون KOH	آزمون کاتالاز	آزمون اکسیداز
١	Sav1	موکوئید	+	-	+	+	+
٢	Sav1S	موکوئید	+	-	+	+	+
٣	Sav42	محدب	-	+	-	+	+
٤	Tal21	محدب	+	-	+	+	+
٥	Tal22	موکوئید	+	-	+	+	-
٦	Tal31	موکوئید	+	-	+	+	+
٧	Tal32	زرد	+	-	+	+	+
٨	Tal41	دایره‌ای	-	+	-	+	-
٩	Tal42	موکوئید	+	-	+	+	+
١٠	Tal51	سفید، ریز	+	-	+	+	-
١١	Tal52	موکوئید	+	-	+	+	+
١٢	Tal6	زرد، محدب	-	+	-	+	-
١٣	Tal62	دایره‌ای	-	+	-	+	-
١٤	Tal71	سفید، محدب	-	-	+	+	+
١٥	Tal72	بی رنگ	+	-	+	+	-
١٦	Krj1	گنبدی شکل	+	-	+	+	+

سویه‌های Sav42، Tal21، Tal22،Tal31، Tal32، Tal41، Tal51، Tal6، Tal62 و Tal72 با افزایش غلظت نمک از یک درصد به دو درصد رشد بیشتری داشتند.

به‌منظور شناسایی مولکولی سویه‌ها از توالی‌های سرهم‌بندی شده ژن *16S rRNA* و پایگاه داده EzTaxon استفاده شد (شکل ٢). مشخصات ١٦ سویه شناسایی شده در پژوهش حاضر در جدول ٧ آمده است.

برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی ژن *16S rRNA*، از توالی سرهم‌بندی شده ژن *16S rRNA* که ابزار قدرتمندی برای مطالعه گوناگونی و تبارشناسی سویه‌های باکتری است (El-Zanaty et al. 2014) استفاده شد (شکل ٣ الف). تجزیه و تحلیل روابط فیلوژنتیک بر مبنای درخت ترسیم شده نشان داد که تقریباً تمامی سویه‌های جدا شده با سویه شاخص مرجع خود در یک گروه قرار گرفتند که نشان دهنده شناسایی درست سویه‌های مذکور است. سویه Tal32 (*S. rhizophila*) تنها سویه‌ای بود که با سویه مرجع خود در یک گروه قرار نگرفت. سویه مرجع *S. rhizophila* (DSM 14405) در کنار سویه مرجع *R. leguminosarum* با اطمینان بالا (BS=٪١٠٠) در یک گروه قرار گرفت. اما سویه Tal32 (*S. rhizophila*) جداسازی شده از ریزوسفر نخود وحشی با سویه‌های *X. translucens* با اطمینان بالا (BS=٪٩٩) یک خوشه را تشکیل دادند. *S. rhizophila* به خانواده Xanthomonadaceae تعلق دارد. سویه‌های *Ensifer*، *Rhizobium*، *Pararhizobium*، *Neorhizobium* و *Phyllobacterium* که همگی جزو ریزوبیوم‌ها هستند با اطمینان بالا (BS=٪٩٦) در یک خوشه قرار گرفتند. سویه‌های گرم مثبت نیز خوشه‌ای جداگانه را به خود اختصاص دادند.



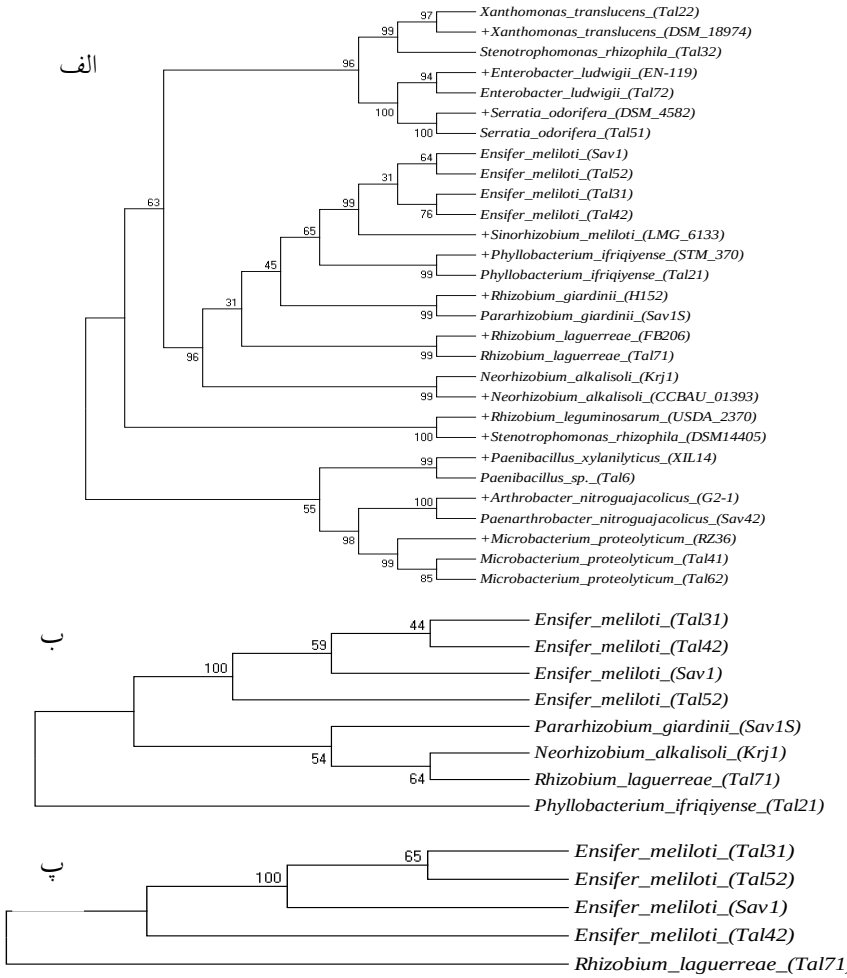
شکل ٢- محصول PCR حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA بر روی ژل آگارز. ١) سویه Sav1، ٢) سویه Sav1S، ٣) سویه Sav42، ٤) سویه Tal21، ٥) سویه Tal22، ٦) سویه Tal31، ٧) سویه Tal32، ٨) سویه Tal41، ٩) سویه Tal42، ١٠) سویه Tal51، ١١) سویه Tal52، ١٢) سویه Tal6، ١٣) سویه Tal62، ١٤) سویه Tal71، ١٥) سویه Tal72، ١٦) سویه Krj1.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.1.4]

جدول ۷- شناسایی سویه‌ها بر مبنی توالی‌های سرهم‌بندی شده ژن *16S rRNA* و مقایسه با توالی سویه‌های موجود در پایگاه داده EzTaxon

ردیف	سویه	شهرستان	منبع	نام فارسی میزبان	نام علمی میزبان	نزدیک‌ترین سویه در پایگاه داده	طول قطعه ژن	درصد تشابه	شماره IBRC
۱	Sav1	ساوجبلاغ	گرهک	یونجه زراعی	*Medicago sativa*	*Ensifer meliloti*	۱۳۳٦	۹۹/۹۳	در دست انجام
۲	Sav1S	ساوجبلاغ	ریزوسفر	یونجه زراعی	*Medicago sativa*	*Pararhizobium giardinii*	۱۳۳۰	۹۹/۷۰	M 11194
۳	Sav42	ساوجبلاغ	ریزوسفر	گون	*Astragalus tribuloides*	*Paenarthrobacter nitroguajacolicus*	۱۳٦٤	۱۰۰	در دست انجام
٤	Tal21	طالقان	گرهک	شیرین بیان	*Glycyrrhiza glabra*	*Phyllobacterium ifriqiyense*	۱۳۱۸	۱۰۰	M 11198
٥	Tal22	طالقان	ریزوسفر	تلخ بیان	*Sophora alopecuroides*	*Xanthomonas translucens*	۱٤٤۷	۹۹/۹۳	در دست انجام
٦	Tal31	طالقان	گرهک	یونجه زرد	*Melilotus* sp.	*Ensifer meliloti*	۱۳٤۸	۹۹/۸٥	M 11199
۷	Tal32	طالقان	ریزوسفر	نخود وحشی	*Cicer* sp.	*Stenotrophomonas rhizophila*	۱٤۱۰	۹۹/۷۲	M 11201
۸	Tal41	طالقان	ریشه	گون	*Astragalus* sp.	*Microbacterium proteolyticum*	۱۲٥۰	۹۸/۸۸	در دست انجام
۹	Tal42	طالقان	گرهک	آهوماش	*Lotus* sp.	*Ensifer meliloti*	۱۳۲۱	۹۹/۱٦	M 11200
۱۰	Tal51	طالقان	ریشه	یونجه تاجی	*Coronilla varia*	*Serratia odorifera*	۱٤۰٤	۱۰۰	در دست انجام
۱۱	Tal52	طالقان	گرهک	یونجه زراعی	*Medicago sativa*	*Ensifer meliloti*	۱۳۲٦	۹۹/۹۲	M 11221
۱۲	Tal6	طالقان	ریزوسفر	اسپرس	*Onobrychis* sativa	*Paenibacillus* sp.	۱٤۱۳	۹۸/٥۸	در دست انجام
۱۳	Tal62	طالقان	ریزوسفر	اسپرس	*Onobrychis* sativa	*Microbacterium proteolyticum*	۱٤٤٤	۹۹/۹٤	در دست انجام
۱٤	Tal71	طالقان	گرهک	شبدر قرمز	*Trifolium pratense*	*Rhizobium laguerreae*	۱۳۸۱	۹۹/۹۳	M 11211
۱٥	Tal72	طالقان	ریزوسفر	خلر زرد	*Lathyrus pratensis*	*Enterobacter ludwigii*	۱٤۲٥	۹۹/٥۱	در دست انجام
۱٦	Krj1	کرج	گرهک	دغدغک البرزی	*Colutea buhsei*	*Neorhizobium alkalisoli*	۱۳۲۲	۹۹/٦۹	M 11193

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.1.4]



شکل ۳- دندوگرام‌های فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA6. دندوگرام‌ها با استفاده از الگوریتم هم‌ردیفی ClustalW و روش آماری درست‌نمایی بیشینه ساخته شدند. اطمینان به گره‌ها با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ تخمین زده شد. الف) درخت فیلوژنتیکی برای ژن *16S rRNA* سویه‌هایی که در این تحقیق جداسازی شدند به همراه سویه شاخص مرجع‌شان که از NCBI GenBank به‌دست آمد و با علامت (+) قبل از نام‌شان مشخص شدند. ب) درخت فیلوژنتیکی برای ژن‌های 16S rRNA-atpD. پ) درخت فیلوژنتیکی برای ژن‌های 16S rRNA-atpD-nodA-nifH.

دندوگرام فیلوژنتیکی تجزیه و تحلیل توالی‌های چند جایگاه برای ژن‌های به‌هم پیوسته *16S rRNA-atpD* و *16S rRNA-atpD-nodA-nifH* نیز با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 ترسیم شدند (شکل ۳ ب و پ). درخت فیلوژنتیکی برای ژن‌های به‌هم پیوسته 16S rRNA-*atpD* تنها برای ریزوبیوم‌ها ترسیم شد. سویه Tal21 (*P. ifriqiyense*) که از گرهک‌های ریشه شیرین بیان جدا شد، جزو راسته Rhizobiales بوده اما جزو خانواده Rhizobiaceae محسوب نمی‌شود. این سویه در درخت فیلوژنتیکی برای ژن‌های به‌هم پیوسته *16S rRNA-atpD*، شاخه‌ای جداگانه را به خود اختصاص داد و فاصله ژنتیکی آن با سایر ریزوبیوم‌های متعلق به خانواده Rhizobiaceae نسبت به درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده برای ژن *16S rRNA* افزایش پیدا کرد. درخت فیلوژنتیکی برای ژن‌های به‌هم پیوسته 16S rRNA-*atpD-nodA-nifH* نشان داد که سویه‌های Sav1، Tal31 و Tal52 در یک خوشه و سویه Tal42 با فاصله تکاملی بیشتر در شاخه‌ای مجزا قرار گرفت. فاصله ژنوتیپی بین سویه Tal42 و سه سویه دیگر *E. meliloti* نمی‌تواند بر اثر فاصله جغرافیایی باشد، چون همگی از استان البرز جداسازی شدند، بلکه ممکن است ناشی از این باشد که سویه Tal42 از گرهک‌های ریشه گیاه آهوماش جدا شده اما سه سویه دیگر *E. meliloti* همگی از گرهک‌های ریشه یونجه جدا شدند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.1.4]

بحث

همان‌گونه که قبلاً اشاره شد این احتمال وجود دارد که توانایی تثبیت نیتروژن توسط ریزوبیوم‌های جدا شده از گرهک‌های لگوهای وحشی بهتر از ریزوبیوم‌های جدا شده از لگوم‌های زراعی یا لگوم‌های وحشی باشد که در زمین‌های زراعی رشد می‌کنند. لگوم‌های مختلف نمونه‌برداری شده در پژوهش حاضر به لحاظ وجود گره بر روی ریشه متفاوت بودند. ریشه برخی از آن‌ها فاقد گره و برخی دارای گره بودند. عوامل متعددی می‌توانند منجر به‌عدم تشکیل گره گردند. شوری می‌تواند مراحل اولیه همزیستی بین باکتری ریزوبیوم و گیاه میزبان شامل تبادل سیگنال‌های مولکولی (ترکیبات القاکننده‌های ژن‌های تولید گره) را بازداری کند (Ghasem et al. 2012). عموماً تشکیل گره به اسیدیته خاک نسبت به سایر جنبه‌های رشد گیاه حساس‌تر است. گزارش شده که در pH پایین خاک تشکیل گره ۹۰ درصد کاهش یافته و وزن خشک گره‌ها ۵۰ درصد کاهش می‌یابد (Ferguson et al. 2013).نتایج حاصل از جداسازی و شناسایی ریزوباکترهای همزیست با لگوم‌های غیر زراعی استان البرز نشان داد که کلیه باکتری‌هایی جدا شده از گرهک‌ها ریزوبیوم بودند. به‌طور کلی پنج گونه ریزوبیومی در این تحقیق جداسازی شد که چهار گونه از گرهک (*E. meliloti*، *P. ifriqiyense*، *R. laguerreae* و *N. alkalisoli*) و یک گونه (*P. giardinii*) از ریزوسفر جدا شد. نتایج نشان می‌دهد که احتمال جدا کردن ریزوبیوم‌ها از ریزوسفر بسیار پائین‌تر از احتمال جداسازی آن‌ها از گرهک‌ها است. بسیاری از منابع ریزوبیوم‌ها را باکتری‌هایی با میزبان اختصاصی[1] می‌دانند تاکید بر این است که عوامل Nod تولید شده توسط ژن‌های *nod*، که از جنس لیپو-کیتوالیگوساکارید[2] هستند، میزبان‌های به‌خصوصی را شناسایی کرده و آلوده می‌کنند (Maróti and Kondorosi 2014; Rao et al. 1996; Staehelin et al. 1995). برخی یافته‌ها نشان می‌دهد که ریزوبیوم‌ها میزبان‌های متنوع‌تری نیز دارند. به‌عنوان مثال برای اولین بار در سال ۲۰۰۹، ۱۱ سویه از گرهک‌های ریشه *Lotus* بومی جزایر قناری جدا شدند که متعلق به جنس *Ensifer* بودند (جنسی که هرگز در گذشته به‌عنوان همزیست *Lotus* معرفی نشده بود). این جدایه‌ها توانستند در *L. lancerottensis*، *L. corniculatus* و *L. japonicus* گره ایجاد کنند (León-Barrios 2009). در پژوهش حاضر نیز چهار سویه *E. meliloti* از گرهک‌های سه گونه مختلف لگوم جداسازی شدند (گرهک‌های یونجه زراعی (*M. sativa*)، یونجه زرد (*Melilotus* sp.) و آهوماش (*Lotus* sp.)). نکته جالب توجه آن است که سویه‌های جدا شده از میزبان‌های متفاوت، صفات متنوعی را از خود بروز دادند. به‌عنوان مثال تنها یکی از سویه‌های *E. meliloti* (Sav1) قادر به رشد در pH چهار بود اما بقیه سویه‌های *E. meliloti* (Tal31، Tal42، Tal52) چنین توانایی نداشتند. در مورد آزمون تحمل نمک نیز سویهTal31 تنها سویه متعلق به خانواده Rhizobiaceae بود که با افزایش غلظت نمک از یک درصد و دو درصد رشد بیشتری داشت. بنابراین احتمالاً این سویه که از گرهک‌های یونجه زرد جدا شده متحمل به شوری[3] است. به‌طور کلی ریزوباکترهای همزیست ریزوبیومی و غیر ریزوبیومی جدا شده، به لحاظ صفات فنوتیپیک ماکروسکوپی و میکروسکوپی و سایر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مانند تحمل به نمک، دما، pH و ... متفاوت بودند. سویه *R. laguerreae* در سال ۲۰۱٤ به‌عنوان گونه جدید معرفی و از گرهک‌های باقلا (*Vicia faba*) (Saïdi et al. 2014) و سپس در سال ۲۰۱۷ این باکتری از گرهک‌های عدس (*Lens culinaris*) جدا شد (Taha et al. 2018). در پژوهش حاضر برای اولین بار است که این گونه باکتریایی (سویه Tal71) از گرهک‌های گیاه شبدر قرمز (*T. pratense*) جدا شد. گونه *R. alkalisoli* برای اولین بار در سال ۲۰۰٦ از گرهک‌های ریشه گیاه نخود درختی (*Caragana intermedia*) جداسازی شد و معرفی شد (Lu et al. 2009) و در سال ۲۰۱۵ به‌عنوان جنس جدید *Neorhizobium* نام‌گذاری شد (Mousavi et al. 2014). برای اولین بار است که گونه مذکور در پژوهش حاضر (سویه Krj1) از گرهک‌های ریشه دغدغک البرزی (*C. buhsei*) جداسازی شد. پیش از این گزارشی از جداسازی سویه‌های ریزوبیومی از گرهک‌های ریشه دغدغک البرزی در دست نیست. سویه Tal6 جدا شده از ریزوسفر اسپرس (*O. sativa*) که به‌عنوان *Paenibacillus* sp. شناسایی شد، احتمالاً به‌واسطه داشتن توالی مناسب و تشابه پایین با نزدیک‌ترین گونه

[1] Host-specific
[2] Lipo-chitooligosaccharide (LCO)
[3] Halotolerant

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.1.4]

در پایگاه داده EzTaxon، گونه‌ای جدید بوده و باید تحقیقات بیشتری بر روی آن صورت گیرد. از اختلاف ژنتیکی مشاهده شده بین سویه‌های مختلف *E. meliloti* جداشده از گونه‌های مختلف میزبان، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ممکن است ژنوتیپ‌های مختلف سویه‌های یک گونه واحد باکتری، در نوع گونه میزبانی که آلوده می‌کنند نقش دارد. یافته‌های این پژوهش مبین آن است که هنوز میزبان بسیاری از سویه‌های ریزوبیومی به‌طور کامل مشخص نشده و بسیاری از ریزوبیوم‌ها میزبان‌های کاملاً اختصاصی نداشته و طیف میزبان‌هایشان بیش‌تر از تعدادی است که در گذشته تصور می‌شد. بنابراین ضرورت کار بر روی گونه‌های لگومی بیش‌تر، به‌خصوص لگوم‌های غیر زراعی، به‌منظور درک دامنه میزبانی آن‌ها برای سویه‌های ریزوبیومی و رسیدن به منابع جدیدی از مایه تلقیح برای لگوم‌های زراعی هم‌چنان احساس می‌شود.

سپاسگزاری

هزینه تجهیزات این طرح از بودجه مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) مطابق قرارداد شماره ۹۵/۳۳/۹۳۵/ص تأمین شده‌است.

منابع

Al-Judy NJ and Majeed RE (2013) Morphological, Biochemical and Molecular Characterization of Ten Rhizobial Bacteria Isolates. Iraqi Journal of Science 54:280-287.

Arora P, Yadav R, Dilbaghi N, Chaudhury A (2012) Biological Nitrogen Fixation: Host-*Rhizobium* Interaction. Frontiers on Recent Developments in Plant Science 1:39-59.

Azevedo H, Lopes F, Silla P, Hungria M (2015) A database for the taxonomic and phylogenetic identification of the genus *Bradyrhizobium* using multilocus sequence analysis. BMC Genomics 16:1-11.

Beveridge TJ (2001) Use of the Gram stain in microbiology. Biotechnic and Histochemistry 76:111-118.

Bhargava Y, Murthy JSR, Kumar TVR, Rao, MN (2016) Phenotypic, Stress Tolerance and Plant Growth Promoting Characteristics of Rhizobial Isolates from Selected Wild Legumes of Semiarid Region, Tirupati, India. Advances in Microbiology 6:1-12.

Chang WS, Franck WL, Cytryn E, Jeong S, Joshi T, Emerich DW (2007) An oligonucleotide microarray resource for transcriptional profiling of *Bradyrhizobium japonicum*. Molecular Plant-Microbe Interactions 20:1298-1307.

Christenhusz MJ and Byng JW (2016) The number of known plants species in the world and its annual increase. Phytotaxa 261:201-217.

De Meyer SE, Van Hoorde K, Vekeman B, Braeckman T, Willems A (2011) Genetic diversity of rhizobia associated with indigenous legumes in different regions of Flanders (Belgium). Soil Biology and Biochemistry 43:2384-2396.

El-Lithy M, El-Batanony N, Moreno S, Bedmar E (2014) A selected rhizobial strain isolated from wild-grown *Medicago monspeliaca* improves productivity of non-specific host *Trifolium alexandrinum*. Applied Soil Ecology 73:134-139.

Ferguson B, Lin MH, Gresshoff PM (2013) Regulation of legume nodulation by acidic growth conditions. Plant Signaling and Behavior 8:e23426.

Ghasem F, Poustini K, Besharati H, Mohammadi VA, Abooei Mehrizi F, Goettfert M (2012) Pre-incubation of *Sinorhizobium meliloti* with luteolin, methyl jasmonate and genistein affecting alfalfa (*Medicago sativa* L.) growth, nodulation and nitrogen fixation under salt stress conditions. Journal of Agricultural Science and Technology 14:1255-1264.

Haukka K, Lindström K, Young JPW (1998) Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* Genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. Applied and Environmental Microbiology 64:419-426.

Islam S, Akanda AM, Prova A, Islam MT, Hossain MM (2016) Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. Frontiers in Microbiology 6:1360.

Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin 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.

León-Barrios M, Lorite MJ, Donate-Correa J, Sanjuán J (2009) *Ensifer meliloti* bv. *lancerottense* establishes nitrogen-fixing symbiosis with Lotus endemic to the Canary Islands and shows distinctive symbiotic genotypes and host range. Systematic and Applied Microbiology 32:413-420.

Lu YL, Chen WF, Han LL, Wang ET, Chen WX (2009) *Rhizobium alkalisoli* sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59:3006-3011.

Maróti G and Kondorosi É (2014) Nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? Frontiers in Microbiology 5:326

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.1.4]

Miransari M (2014) Plant growth promoting rhizobacteria. Journal of Plant Nutrition 37:2227-2235.
Mousavi SA, Österman J, Wahlberg N, Nesme X, Lavire C, Vial L (2014) Phylogeny of the *Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. Systematic and Applied Microbiology 37:208-215.
Muresu R, Polone E, Sulas L, Baldan B, Tondello A, Delogu G, Cappuccinelli P, Alberghini S, Benhizia Y, Benhizia H, Benguedouar A, Mori B, Calamassi R, Dazzo FB, Squartini A (2008) Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. FEMS Microbiology Ecology 63:383-400.
Pratap A, Kumar J (2011) History, origin and evolution. Biology and Breeding of Food Legumes 1-18.
Quain MD, Makgopa ME, Cooper JW, Kunert KJ, Foyer CH (2015) Ectopic phytocystatin expression increases nodule numbers and influences the responses of soybean (*Glycine max*) to nitrogen deficiency. Phytochemistry 112:179-187.
Quelas JI, Mongiardini EJ, Pérez-Giménez J, Parisi G, Lodeiro, AR (2013) Analysis of two polyhydroxyalkanoate synthases in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. Journal of Bacteriology 195:3145-3155.
Rao J, Cooper J, Everaert E, De Cooman L (1996) Assimilation of nod gene inducer 14 C-naringenin and the incorporation of labelled carbon atoms into the acyl side chain of a host-specific Nod factor produced by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Current Issues in Symbiotic Nitrogen Fixation 63-67.
Saïdi S, Ramírez-Bahena MH, Santillana N, Zúñiga D, Álvarez-Martínez E, Peix A (2014) *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64:242-247.
Sessitsch A, Howieson J, Perret X, Antoun H, Martinez-Romero, E (2002) Advances in *Rhizobium* research. Critical Reviews in Plant Sciences 21:323-378.
Shamseldin A, Sadowsky MJ, El-Saadami M, Sun C (2008) Molecular biodiversity and identification of free living *Rhizobium* strains from diverse Egyptian soils as assessed by direct isolation without trap hosts. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences 4:541-549.
Shetta N, Al-Shaharani T, Abdel-Aal M (2011) Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences 10:410-418.
Staehelin C, Schultze M, Kondorosi É, Kondorosi Á (1995) Lipo-chitooligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium meliloti* induce their rapid degradation by the host plant alfalfa. Plant Physiology 108:1607-1614.
Taha K, El Attar I, Dekkiche S, Aurag J, Béna G (2018) *Rhizobium laguerreae* is the main nitrogen-fixing symbiont of cultivated lentil (*Lens culinaris*) in Morocco. Systematic and Applied Microbiology 41:113-121.
Tamura K and Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution 10:512-526.
Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30:2725-2729.
Vauclare P, Bligny R, Gout E, Widmer F (2013) An overview of the metabolic differences between *Bradyrhizobium japonicum* 110 bacteria and differentiated bacteroids from soybean (*Glycine max*) root nodules: an in vitro 13C-and 31P-nuclear magnetic resonance spectroscopy study. FEMS Microbiology Letters 343: 49-56.
Vercruysse M, Fauvart M, Beullens S, Braeken K, Cloots L, Engelen K, Marchal K, Michiels J (2011) A comparative transcriptome analysis of *Rhizobium etli* bacteroids: specific gene expression during symbiotic nongrowth. Molecular Plant-Microbe Interactions 24:1553-1561.
Willems A, Coopman R, Gillis M (2001) Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51:111-117.
Yang J, Kloepper JW, Ryu CM (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends in Plant Science 14:1-4.
Zou L, Chen YX, Penttinen P, Lan Q, Wang K, Liu M, Peng D, Zhang X, Chen Q, Zhao K (2016) Genetic Diversity and Symbiotic Efficiency of Nodulating Rhizobia Isolated from Root Nodules of Faba Bean in One Field. PLoS One 11:e0167804.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.1.4]