تعیین تنوع باکتر یهای همزیست جدا شده از گرهک ریشه گیاه یونجه در منطقه یزد.

سهیلا صنعتی زاده ۱، احمدعلی پوربابایی ۲*، محمد علی آموزگار ۳

۱. کارشناس ارشد میکروب شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی قم sohila.sanatizadeh@yahoo.com

۲. *دانشیار ، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تهرانahmadalipb@gmail.com

۳. دانشیار گروه میکروب شناسی دانشگاه تهران وبانک میکروارگانیسم هامرکز ذخایر زیستی

ahmadalipb@gmail.com نویسنده مسئول : احمد علی پوربابایی

مقدمه :

ازت یکی از مهمترین عناصر مورد نیاز گیاه است که با افزودن کودهای شمیایی و آلی به خاک و تثبیت زیستی تأمین می گردد. در تثبیت زیستی ازت در گیاهان لگومینوز، باکتری های ریزوبیومی خاکزی همزیست با این گیاهان دخالت دارند که به میزان قابل توجهی نیاز ازتی میزبان خود را تأمین می نمایند و باعث حاصلخیزی خاک نیز می شوند.بهره برداری اقتصادی از همزیستی ریزوبیوم –لگوم مستلزم تلقیح گیاه میزبان با جدایه های برتر ریزوبیومی است که توانایی گره سازی و تثبیت ازت قابل توجهی داشته باشند(۱). بیشتر ازت تثبیت شده به روش زیستی در کشاورزی توسط ریزوبیوم ها در همزیستی با لگوم ها تولید می شود.بیشتر گیاهان لگوم شامل نخودها،لوبیاها و شبدرها گره ها یا اجزای توموری شکلی روی ریشه های خود دارند. این گره ها در شرایط کمبود ازت و در نتیجه آلودگی ریشه های موئین این گیاهان با دسته ای از باکتری ها بنام ریزوبیوم ها ایجاد می شوند(۲, ۳). این عنصر یکی از اجزاء تشکیل دهنده اسیدهای نوکلئیک ، اسیدهای آمینه، پروتئین پپتیدها و کلروفیل ها ،ATPهورمون ها و آلکولوئیدهاست. ازت در بین ۱۶ عنصر اصلی مودر نیاز گیاه در جایگاه چهارم قرار دارد . تقریبا ٪۷۹ کل اتمسفر را ازت تشکیل می دهد که به شکل N_2 می باشد. این فرم ازت برای گیاهان قابل جذب می شود. اولین گزارش در خصوص سیستماتیک ریزوبیوم ها، مربوط یک جنس با ۴ گونه در سال ۱۹۸۱ بوده و در حال حاضر ۱۴ جنس و ۹۸ گونه شناسایی شده و روبه افزایش است. در کشور ایران بعلت تنوع آب و هوایی و نوع خاک احتمالا سویه های منحصر بفرد از نظر فیلوژنی و میزان کارایی همزیستی با یونجه که خاستگاه ایران می باشد وجود دارد . بین آنها *S. meliloti* و*S. medicae*در جنس های گیاهی *Melilotus Medicago*و *Trigonella* تولید گرهمی کنند قرابت بیشتری با هم دارند. گونه *S. medicae* اغلب در یونجه های یک ساله و گونه *S. meliloti* در یونجه چند ساله گره سازی و تثبیت یونجه انجام می دهند.بعلت تغییرات محیط های زراعی و آلودگی های زیست محیط قبل از تخریب مزارع یونجه لازم است سویه های بومی همزیست با یونجه جداسازی و شناسایی شوند. عدم شناسایی دقیق گونه همزیست باعث اشتباه در ارزیابی صحیح از تنوع درون جمعیتی می شود(۴).

مواد و روش ها :

روش جمع آوری نمونه از گرهک ریشه گیاه یونجه :

به منظور جداسازی گرهک از ریشه گیاه یونجه از مزارع منطقه استان یزد نمونه گیری در فصل بهار انجام گرفت . ابتدا خاک اطراف گیاه به شعاع تقریبی ۱۵ و عمق ۲۰ سانتی متر حفر گردید و به آهستگی ریشه و توده خاک اطراف آن بیرون آورده شده تا به ریشه های فرعی واجد گرهک آسیبی نرسد . سپس آنها را در ظروف یکبار مصرف تیره قرار داده و ظرف مدت ۲۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند . ریشه های جدا شده از خاک ، چندین مرتبه به آرامی با آب مقطر شستشو داده شده اند گرهک های درشت و صورتی رنگ انتخاب شده و به فاصله چند میلیمتر از اطراف گرهک با قیچی جدا گردید .پنس را بر روی شعله چرخانده و بعد از سرد شدن با آن گره را برداشته و به مدت حدود ۳۰ ثانیه در الکل ٪۹۵ قرار داده در این صورت سطح بیرونی گره تا حدودی استریل شد . به منظور تکمیل عمل استریلیزاسیون سطح گره ،به مدت ۴-۱ دقیقه (بسته به اندازه غده) گره را در محلول اسیدی کلرید جیوه گذاشته شد. با رعایت شرایط آسپتیک ، گره را با آب استریل به صورت زیر شستشو داده شد.

از محلول $HgCl_2$ استفاده شد و این کار ده مرتبهتکرار شد ، به طوری که مقداری آب مقطر را درون شیشه ساعت بر روی گره ریخته شد و سپس خالی نمودیم . گره شسته شده را با پنس استریل برداشته و درون یک قطره آب استریل بر روی لام یا شیشه ساعت استریل له کردیم عمل له کردن را توسط یک میله فلزی استریل (مانند دسته لوپ) انجام دادیم. با رعایت شرایط آسپتیک ، یک لوپ از غدهٔ له شده را به لوله حاوی ۵ ml مایع سیلین استریل افزودیم و مخلوط نمودیم. مقدار ۰/۱ ml از مخلوط حاصل را بر روی هر کدام از محیطهای CYMA پخش کردیم . پلیت های تهیه شده را در دمای 34^oC به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد در این مدت جدایه ها ی رشد یافته جهت خالص سازی بر روی محیط YMAآنها را خالص نمودیم و سپس مورد بررسی های ماکروسکوپی ، میکروسکوپی ، فیزیولوژیک قرار گرفتند .

ویژگی های فیزیولوژیک :

به منظور شناسایی صفات فیزیولوژیک و بررسی محدوده تحمل نمک و بهینه رشد جدایه ها در ابتدا باکتری ها به محیط کشت مایع (Yeast Manitol Broth(YMBبا درصدهای NaCl برابر۱٪ ، ۲٪ ، ۳٪ استفاده شد . درصد نمکی که نخستین رشد ادامه دار باکتری ها در آن مشاهده شد ، به عنوان درصد بهینه ی رشد ثبت شد . جهت تعیین محدوده ی نمک ، توانایی رشد باکتری در نسبت های مختلف تا ۲۰ روز بررسی شد . ۲۰ سویه ریزوبیومی انتخاب شده غلظتهای مختلف NaCl گذاشته شد به طوری که برای هر سویه هر غلظت دوبار تکرار شد (۵) .

آزمون رشد در دماهای مختلف

در این آزمون توانایی رشد رشد باکتریها در دماهای ۳۵ ، ۴۵ ، ۴۰ ، ۲۸ ، ۵ درجه سانتی گراد بررسی شد.

آزمون رشد در pH های مختلف

محیط کشت YMA را در pHهای ۴،۵،۶،۷،۸،۹ با استفاده از دستگاه pHمتر ساخته شده و سویه های ریزوبیومی بروی آنها کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد محیط کشت از نظر کدورت (رشد سویه) مورد بررسی قرارگرفت(۵، ۶) .

تست حرکت :

در محیط مربوطه (SIM) از کلنی کشت خالص ۲۴-۱۸ ساعته با آنس استریل برداشته و مرکز محیط را سوراخ کرده و تا عمق ۱سانتی متر فرو بردیم . محیط مربوطه را در حرارت $34^{o}C$به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کرده .

ارزیابی قابلیت حل کنندگی فسفات در سویه های ریزوبیومی

به منظور بررسی توانایی انحلال فسفات توسط سویه های اینسیفر جداسازی شده با استفاده از لوپ و تحت شرایط استریل و در مجاورت شعله و در زیر هود بیولوژیک از هر باکتری در سطح محیطPVK(Pivoskay's Agar) کشت داده شد و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد(۷).میزان انحلال فسفات توسط سویه ها از راه اندازه گیری نسبت قطر هاله به قطر کلنی بعد از مدت زمان ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری بر طبق فرمول های زیر محسابه گردید(۸).پس از انجام آزمونهای مورد نظر، داده های بدست آمده در جداولی منظم شد و سپس این داده ها با نرم افزار SPSS 16 از طریق آزمون Duncan و در سطح معنا داری ۹۵٪ انجام شد. در نهایت نمودار های فاکتورهای مورد آنالیز بر اساس میانگین ± انحراف معیار با استفاده از نرم افزار اکسلرسم شدند وبر اساس آنالیز آنووا (ANOVA) انجام شده تفاوت معنا داری بین سویه های مختلف باکتری بر روی نمودار ها با حروف متفاوت نمایش داده شد(۹) .

$$\text{Solublizing efficiency (SE)} = \frac{\text{قطر هاله} \times ۱۰۰}{\text{قطر کلنی}}$$

$$\text{Solubizing index (SI)} = \frac{\text{قطر کلنی} + \text{قطر هاله}}{\text{قطر کلنی}}$$

ویژگی های بیوشیمیایی

تست٪۳ KOH جهت تأیید رنگ آمیزی ، فعالیت اکسیدازی ، فعالیت کاتالازی٪۳ برای تایید مثبت بودن باکتری انجام گرفت .

آزمون استفاده از کربوهیدارتها

مصرف و یا عدم مصرف قندهای ال آرابیتول ، گلوکونات ، دی رافینوز ، ال گزیلوز ، ملی بیوز که به صورت یک درصد تهیه شده بررسی شد .در این آزمون از محیط کشت WHITE که به صورت مایع بود استفاده شد .

آزمون استفاده از اسیدهای آمینه

در این آزمون مصرف و یا عدم مصرف اسیدهای آمینه آرژنین ، آلانین ، سیستئین ، اورنیتین ، فنیل آلانین که به صورت ٪ ۰/۱ تهیه شد توسط جدایه های برتر بررسی شد . بدین ترتیب که از محیط کشت YMA استفاده شد(۱۰, ۱۱).

شناسایی ترادف 16S rRNA سویه های منتخب

۲۰ سویه منتخب ، برای شناسایی بیشتر با روش تعیین ترادف ژن 16SrRNA به کمک کیت استخراج DNA ساخت شرکت سینا ژن آنالیز شدند. به اینمنظور پس از تهیه توده زیستی سویه ها ، DNA ژنومی سلول هااستخراج شده و تکثیر ژن به کمک پرایمرهای جهانی 16S rRNAتحت واکنش زنجیره پلیمراز انجام گرفت ، محصول استخراج ژنوم و واکنش زنجیره ای پلیمراز با الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد و محصول نهایی جهت تعیین ترادف به شرکت Bionner کره ارسال شده و نتایج آن به کمک نرم افزار و پایگاه های داده فیلوژنیک تحلیل شد .

مشخصات پرایمرهای مورداستفاده درواکنش زنجیرهای پلیمرازی

قطر کلنی + قطر هاله

قطر کلنی

1)27F

AGAAGTTTGATCMTGGCTCAG

2)1492R

GGTTACCTTGTTACGACTT

تعیین ترادف ژن16SrRNAو شناسایی فیلوژنیک جدایه های منتخب

خالص سازی وتعیین ترادف محصول PCR مرحله ی قبل،ازطریق شرکت Bioneerکره انجام شـد.ترادف دریافـت شـده ازایـن شرکت بااستفادهازنرم افزارChromasProویرایش و بازخوانی شده وسپس به کمک ابزارBLASTنوکلئوتیـدبا توالیهـای ثبـت شده درپایگاهاطلاعات ژنومی Eztaxonمقایسه شدو شباهت آن به سویه های مختلف ثبت شد.

رسم درخت فیلوژنی

ارتباط فیلوژنتیکی توالی های بدست آمده با یکدیگر و دیگر سویه ها –توالی های مرتـب بدسـت آمـده حاصـل از جسـتجو- در پایگاه اطلاعاتی Genbank وEzataxon با استفاده از نرم افزار(MEGA V.5) انجام گردید(۱۱). هم راستا سازی توالی ها با اســـــتفاده از نـــــرم افـــــزار ClustaX2 انجـــــام شـــــد . در دســـــته بنـــــدی تـــــوالی هـــــا از الگـــــوی Maximumlikelihoodو Neighbourاستفاده شد(۱۲).

یافته ها

۵۰ جدایه بدست آمده از گرهک گیاه یونجه را در شرایط آسپتیک بر روی محیط کشت CYMA که حاوی رنگ قرمز کنگو بود کشت داده شده بود ، کلنی ها به خوبی رشد کرده و بعضی از سویه ها رنگ را به میزان ضعیفی جذب کرده و به رنگ صورتی کم رنگ دیده شدند(شکل ۱و۲) .

بر طبق طبقه بندی برجی (۲۰۰۴) در جنس ریزوبیوم قرار دارند . در این تحقیق ۵۰ جدایه از گرهک های یونجه یکساله *Medicago sativa* مورد شناسایی فنوتیپی قرار گرفتند که این ۵۰ جدایه را بر روی محیط کشت CYMA کشت داده و خالص سازی شدندکه از بین این پنجاه جدایه ۲۰ جدایه که از نظر ظاهری شباهت بیشتری با ریزوبیوم ها داشتند به صورت تصادفی انتخاب شده و مجددا" بر روی محیط کشت YMA برده شده و بعد از اطمینان از خلوصتحت آزمایشات مختلف بیوشیمایی برای اطمینان از گرم مفی بودن آنها (تست کاتالاز ، اکسیداز ،KOH) و رنگ آمیزی گرم قرار گرفتند . قابلیت حرکت و مصرف و یا عدم مصرف قندهای آرابیتول ، گلوکونات ، رافینوز ، گزیلوز ، ملی بیوس و اسید آمینه های آرژنین ، آلانین ، سیستئین ، اورنیتین ، فنیل آلانین که تنها بر روی جدایه های انسیفر انجام انجام شد ه است که تمام نتایج باکتری های جدا شده را در جنس سینوریزوبیوم قرار می داد که جالب توجه بوده است که بعضی از سویه ها طبق کتاب برجی مثبت بوده ولی بعضی دیگر منفی بوده که احتمال دارد سویه جدید باشد که احتیاج به تکرار تست و بررسی بیشتری از نظر مولکولی دارد .جالب توجه این بوده است که از این ۲۰ سویه برتر که برای آنها تست تحمل نمک در غلظتهای ۱٪ و ۲٪و ۳٪ گذاشته ایم بیشتر سویه ها حدود ۹۰٪ قدرت تحمل نمک را در غلظت ۳٪ را داشته اند و رشد بسیار خوبی داشتند .دلیل امر

احتمالا" سویه های مقاوم هستند. این سویه ها را از مناطق مختلف مزارع یزد جمع آوری کرده ایم که این سویه ها به علت شرایط اقلیمی و آب و هوایی و همچنین شرایط خاک در عرصه های مختلف به تدریج مقاومت به نمک در آنها ایجاد شده است البته این گزارش با یکی از گزارشات (Bergay) که مقاومت تا ٪۴/۵ نمک را برای گونه های خاصی از سینوریزوبیوم بیان می نماید مطابقت دارد . نتیجه اینکه شرایط سخت محیطی در بالا بودن ظرفیت و توان مقاومت به نمک در باکتری ها موٴثر بوده است و تجزیه و تحلیل به شوری تنوع فنوتیپی زیادی را نشان می دهد . اینسفرهای جدا شده علاوه بر مقاومت به نمک در pHحدود ۹-۴ توان رشد داشته و لذا در خاک های نمکی –اسیدی قادر به رشد و تثبیت ازت هستند. این موضوع با گزارشات هارتمن و همکاران (۱۹۹۸) مطابقت دارد و همچنین توان رشد در دماهای مختلف ۴۵-۵ بررسی شد که توان رشد سویه ها بیشتر بین ۴۰-۵ درجه سانتی گراد بود که این امر نشان دهنده این است این سویه ها تقریبا" مقاومت خوبی نسبت به شرایط اقلیمی گرم و خشک دارند و توانسته اند تا حد خوبی خود را با شرایط وفق دهند که این گزارش با یکی از گزارشات (Bergey) که رشد بهینه ریزوبیوم ها را تا ۴۰ درجه تایید می کند مطابقت دارد .در تست حرکتی که برای ۲۰ سویه برتر انجام دادیم تقریبا" ۷۰٪ بی تحرک و ۳۰٪ دیگر هم متحرک بودند که در نتیجه با وجود اینکه میدانیم سویه های ریزوبیومی دارای ۶-۱ فلاژل برای تحرک هستند و قابلیت حرکت را دارند ولی با این وجود ۷۰٪ سویه ها بی تحرکت بودند و از این قضیه اینطور برآورد می شود که همانطور که در فصل دو توضیح داده شده است بعضی از سویه ها متحرک در ۱۵-۲۵°C متحرکبوده و در حرارت ۳۷°C که حرارت مطلوب رشد آنهاست غیرمتحرکند با این وجود که برای این ابهام دو لوله همزمان تلقیح کردیم و یکی را در حرارت ۳۵°C و دیگری را در ۲۱-۲۵°C نگهداری شدند با این وجود ۷۰٪ سویه ها جوابشان منفی بود از این نتیجه اینطور تصمیم گرفته میشود که باید در دماهای دیگر هم این تست را مجددا" انجام داد با صحت اینکه می دانیم این سویه ها دارای حرکت هستند و می توانند در خاک حرکت کرده و خود را به ریشه گیاهان رسانده و تشکیل گرهک بدهند. در ارزیابی حل کنندگی فسفات در سویه هایریزوبیومی مشاهده شد که یازده سویه قابلیت حل کنندگی فسفات را داشتند که ۵ سویه اینسیفر بودند و لی بقیه سویه ها سویه های ریزوبیومی بودند که از این مشاهده نتیجه می شود که قابلیت حل کنندگی فسفات فقط منحصر به سویه های اینسیفر نیست بلکه بقیه سویه ها هم از این مزیت برخوردارند و ریزوبیوم ها به دلیل توان تثبیت نیتروژن ، افزایش فرم قابل جذب برخی عناصر و توان عوامل محرک رشد گیاه و همچنین به علت تکنولوژی تولید انبوه مایه تلقیح می توانیم به عنوان کود بیولوژیک محرک رشد گیاه استفاده کنیم .

بحث

در این تحقیق برای بررسی خصوصیات ژنتیکی جدایه های برتر از تکنیک PCR-16S rRNA در شناسایی و تفکیک گونه هی ریزوبیومی همزیست ، با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی 27Fو 1492Rخوانده شده و به شرکت Bionerکره فرستاده شده و به

صورت یک طرفه خوانده شد بعد با برنامه Chorom و با استفاده از سایت Peak trace سکانسها اصلاح شده و توسط سایت Ezotaxon خوانده شد و میزان تشابه آنها با آن سویه ثبت شد .بعد از شناسایی مولکولی بیست سویه برتر متوجه شدیم که گرهک یونجه از تنوع باکتری زیادی برخوردار بوده است و شاید علت این بوده است که چون یونجه یزدی هم دارای برگ های متعدد و پهن تر است بنابراین جذب نور کافی موجب افزایش توان فتوسنتزی گیاه می شود بدین ترتیب انتقال کربوهیدرات ها به ریشه ها و گره ها موجب افزایش فعالیت باکتری تثبیت کننده نیتروژن می شود و با رشد بهتر گره ها ، وزن آنها نیز افزایش یافته و موجب تثبیت بیشتر نیترو ژن می شود. عوامل مؤثر بر روی پراکنش و پایداری باکتری های ریزوبیوم در طبیعت وجود گره بر روی ریشه گیاهان خانواده لگوم در یک منطقه دلیل بر وجود سویه ریزوبیوم است . ریزوبیوم های موجود در یک منطقه مربوط به میزبان های مشخصی است که در آن منطقه وجود دارد . با توجه به اینکه هر سویه اختصاص به میزبان دارد ممکن است سویه روی میزبان غیر اصلی ایجاد گره هم بکند ولی ازت تثبیت نگردد از مهمترین عوامل مؤثر بر غده دهی و تثبیت ازت عبارتند از درجه حرارت نور ، ترکیبات ازت خاک اسیدیته خاک ، ویتامین ها ، آب ، اکسیژن ، شوری ، عناصر غذایی مثل کلسیم ، مولیبدن ، کبالت ، پتاسیم ، آهن ، اسیدیته خاک از جمله عوامل تعیین کننده حضور یک سویه در منطقه است . از تعیین توالی سویه های جدا شده از *Medicago sativa*تا ٪۹۹/۹ و در بعضی از گونه ها تا ٪۱۰۰ شباهت بسیار زیادی به اینسیفر ملیلوتی داشتند ولی در بعضی از گونه ها به علت دارا بودن سکانسهای نویز دار شباهت آنها نزدیک به ٪۷۸ بود که نیاز به بررسی بیشتر دارند . با توجه به آزمایشات مولکولی و تعیین قطعه خاص آن 16SrRNAو قرآبت نزدیکتر با *S.meliloti* می توان اینطور نتیجه گیری کرد که باکتری جدا شده از یونجه *Meticago sativa* همان *Sinirhizobium meliloti* می باشد و همینطور سویه های اینسیفر در مزرعه حسن قرآیی شهرستان خاتم بیشتر از مزارع دیگر بود شاید به دلیل آن است که این منطقه نسبت به مزارع جاهای دیگر استان یزد درای منابع آب فراوان و همینطور خاک حاصلخیز می باشد همینطور این شهرستان قطب کشاورزی استان یزد می باشد . سه جدایه *Pseudomonas koreensis*بودند که تشکیل گرهک داده بودند . به بیان دیگر می توان گفت که مقایسه همولوژی توالی قطعه حاصل از PCR ، با آغازگرهای ۲۷Fو۱۴۹۲R، در بانک ژن برنامه Blast سایتNCBI ، مربوط بودن توالی را با ۱۶SrRNA، *Sinorhizobium meliloti* تا ٪۹۸ همولوژی به اثبات رسانده است که از توالی کامل این ژن می توان به عنوان مارکر جنس و حتی گونه خاصی در آزمایشات بعدی برای محققین استفاده کرد .

نتیجه گیری

۱- فراوانی سویه های *Ensifer meliloti*در مزارع یونجه استان یزد نسبتا بالاست

۲- سویه های ریزوبیومی مزارع یونجه توانایی تحمل شوری ۲ درصد رادارند

۳- علی رغم توانایی محدود کنندگی شوری در گره سازی، ریزوبیوم های خاک های مزارع یونجه گره ساز هستند.

۴- احتمالا وجود ژن های nod در جدایه های *Pseudomonas koriensis* موجب توانمندی گره سازی آنها می شود.

سپاسگذاری

از همکاری پرنسل محترم آزمایشگاه مجتمع تحقیقاتی شهدای جهاد دانشگاهی استان البرز که در این پژوهش از هیچ کوششی برای همکاری با اینجانب دریغ نکردند کمال تشکر و قدر دانی را دارم .

Refrence

۱

. ghorbani z. contains the muethr gene in competition and performance lgom family coexistence. Master thesis, College of agriculture, Isfahan University of technology. 2010 o;20(1):10-2.

.۲ dini aas. Principles of plantnutrition. University Publication Center. 1989;1(6):26-30.

.۳ K K. The role of phosphorus and correct placement of the increase in molecular nitrogen fixation and yield of alfalfa. Tehran:Sanaf. 2007;20(4):114-5.

.۴ Brady NC, Weil RR. The nature and properties of soils: Prentice-Hall Inc.۱۹۹۶ ;.

.۵ Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. Rhodocyclaceae fam. nov. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2005.

.۶ Matias SR, Pagano MC, Muzzi FC, Oliveira CA, Carneiro AA, Horta SN, et al. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. European Journal of Soil Biology. 2009;45(3):259-66.

.۷ Sharma S.B SE. regulation of the symbiotic genes of Rhizobium melilotiinplantarevealed by transposon Tn5-gns A.Genes Tempored, Spatial 1990;4(2):344-54.

.۸ Sharma K, Dak G, Agrawal A, Bhatnagar M, Sharma R. Effect of phosphate solubilizing bacteria on the germination of Cicer arietinum seeds and seedling growth. Journal of Herbal Medicine and Toxicology. 2007;1(1):61-3.

.۹ Yasamin.H B. .Isolution and characterization of rizhospher. Biotechnology. 2011;6(1):42-52.

.۱۰ White L. The Taxonomy of the Crown-gall Organism Agrobaterium tumefaciens and Its Relationship to Rhizobia and Other Agrobacteria. Microbiology. 1972;72(3):565-74.

.11 KumarS N, M,DudleyJ,Tamura,K.MEGA. Abiologist centric Software for evolutionary analysis of DNA and protein Sequences. Brief Bioinform. 1989;4(2):299-306.

.١٢ Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular biology and evolution. 1987;4(4):406-25.

Determination of variety of symbiotic bacteria that are isoisolated from alfalfa's root noudule in yazd province

Sohila sanatizadeh[1],Ahmad Ali porbabaee[2],Mohamd Ali amozega

1.Master of Science in Microbiology, Islamic Azad University Qom.
sohila.sanatizadeh@yahoo.com

2.* Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology Tehran University.

ahmadalipb@gmail.com

3. Associate Professor, Department of Microbiology microorganisms Bank Center Tehran University and biological reserves.

Corresponding Author: Ahmad Ali Babai, Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology Tehran University. ahmadalipb@gmail.com

Abstract

Purpose of the study Alfaalfa is a permanent legumes which is widely planted around the world for animal nutrition and is a main source of green fertilizer . This plant is a rare grass that can establish a helpful and nitrogen fixing coexistence with terrestrial – gram negative bacteria of Sinorhizobium . The main purpose of study is phenotypic and genotypic identifaction of Rhizobium strain that are isolated from alfalfa's nodule in Yazd province and also find phylogenetic relations of different isolations.

Materials and method

In this study,after isolated of 50 nodule from alfalfa's root in fields of Yazd province in spring, 20 bacteria strain that are isolated from nodule were identified regarding their phenotypic traits (microscopic and macroscopic morphology,biological and physiological traits) and molecular methods using 16SrRNA primer,PCR and sequencing.

Findings

Regarding the molecular tests determining its special piece(16SrRNA) and its nearness to so Meliloti , and after determining the sequence Medicago Sativa and 100% similar to *Ensifer meliloti*, it can be found that Medicago Sativa , which is a bacteria isolated from alfalfa's , is the same as *Sinorhizobium Meliloti* . The degree of similarity of three *Pseudomonas Koreensis* is isolations that had made a noudule was 99% but this doesn't prove that they also fix the nitrogen. Comparing hemology of sequence of resulting piece of 16SrRNA PCR *Sinorhizobium meliloti* to 98% has proved that it can be used as a suitable marker of this species in the next experiments.

Results

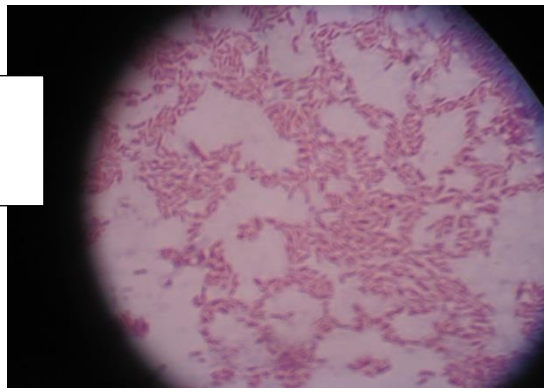
Frequency of *Ensifer meliloti* strains is relatively high in alfalfa in Yazd province and probably the nod genes in *Pseudomonas Koreensis* isolations cause their ability in nodulation.

Key words:

Genotype,Phenotype,Rhizobium, Noudule, Ensifer meliloti

شکل ۱ – باکتری جدا شده CYMA بر روی

شکل۲ – (میکروسکوپی) گرم منفی ، باسیل وکوکوباسیل



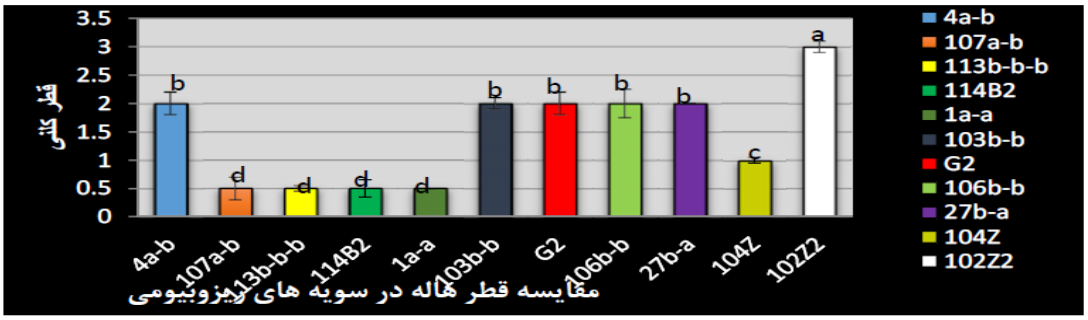
ارزیابی انحلال فسفات در سویه های ریزوبیومی

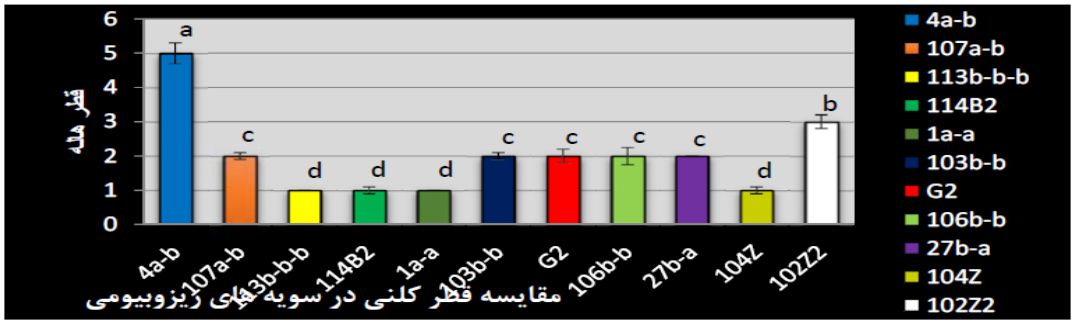
ردیف	نام سویه	قطر کلنی (mm)	قطر هاله (mm)	SI	SE	pH
۱	۴a-b	۲	۵	۳/۵	۲۵۰	۶/۵-۷
۲	۱۰۷a-b	۰/۵	۲	۵	۴۰۰	۶/۵-۷
۳	۱۱۳b-b-b	۰/۵	۱	۳	۲۰۰	۶/۵-۷
۴	$۱۱۴B_۲$	۰/۵	۱	۳	۲۰۰	۶/۵-۷
۵	۱a-a	۰/۵	۱	۳	۲۰۰	۶/۵-۷
۶	۱۰۳b-b	۲	۲	۲	۱۰۰	۶/۵-۷
۷	$G_۲$	۲	۲	۲	۱۰۰	۶/۵-۷
۸	۱۰۶b-b	۲	۲	۲	۱۰۰	۶/۵-۷
۹	۲۷b-a	۲	۲	۲	۱۰۰	۶/۵-۷
۱۰	۱۰۴Z	۱	۱	۲	۱۰۰	۶/۵-۷
۱۱	$۱۰۲Z_۲$	۳	۳	۲	۱۰۰	۶/۵-۷

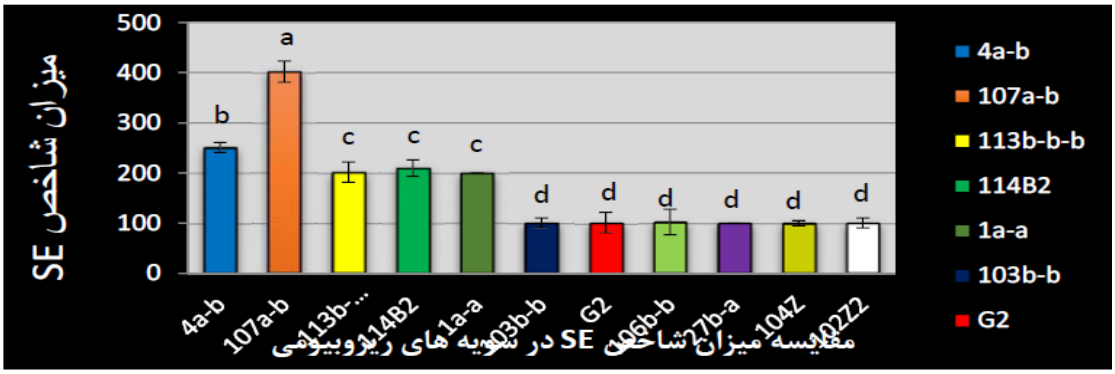
نزدیک ترین سویه ثبت شده به هر ترادف

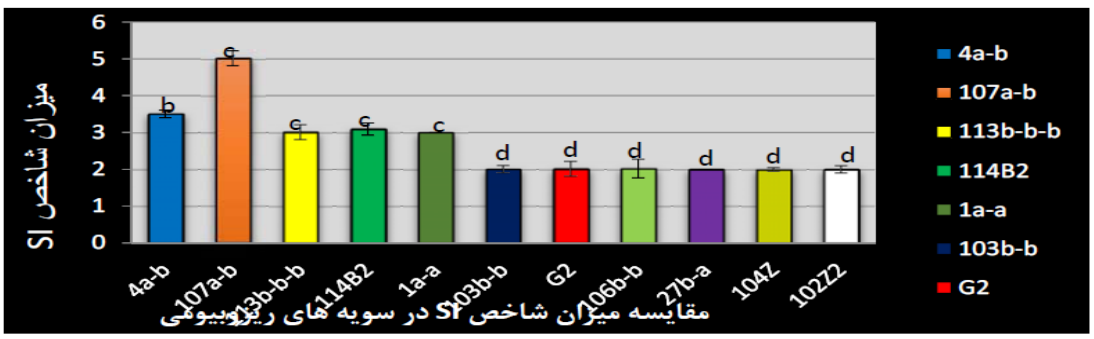
ردیف	سویه	سویه نزدیک	میزان شباهت
۱	*Stenotr phomonus*	*Stenotrophomonas panacihumi*	۹۷/۱۰٪
۲	*Ensifer meliloti*	*Ensifer numidicus*	۱۰۰٪
۳	*Pseudomonas Koreensis*	*Pseudomonas parafulva*	۹۷/۵۷٪
۴	*Cartobacterium plantarum*	*Pantoea agglomerans*	۹۷/۹۷٪
۵	*Rhizobium radiobacter*	*Rhizobium legominosarum*	۹۷/۸۶٪
۶	*Ensifer meliloti*	*Ensifer numidicus*	۹۹/۷۰٪
۷	*Ensifer arboris*	*Ensifer psoralea*	۹۱/۹۱٪
۸	*Pseudomonas koreensis*	*Pseudomonas parafluva*	۷۸/۷۸٪
۹	*Rhizobium pusense*	*Rhizobium radiobacter*	۹۰/۳۰٪
۱۰	*Ensifer meliloti*	*Ensifer numidicus*	۹۹/۸۹٪
۱۱	*Ensifer meliloti*	*Ensifer numdicus*	۱۰۰٪
۱۲	*Ensifer meliloti*	*Ensifer numidicus*	۹۹/۶۸٪
۱۳	*Pseudomonas koreensis*	***Pseudomonas parafluva***	۹۹/۶۶٪
۱۴	*Ensifer meliloti*	*Ensifer numidicus*	۱۰۰٪
۱۵	*Rhizobium pusense*	*Rhizobium radiobacter*	۹۸/۱۴٪
۱۶	*Ensifer kummerowiae*	*Chelativorans multitrophicus*	۹۵/۹۷٪
۱۷	*Candidatus rhizobium*	*Rhizobium leguminosarum*	۹۹/۵۸٪
۱۸	*Ensifer meliloti*	*Ensifer numidicus*	۹۷/۸۰٪
۱۹	*Paracoccus halophilus*	Loktanella rosea	۶۹/۶۲٪
۲۰	*Ensifer adhaerenes*	*Ensifer arboris*	۸۷/۱۸٪

تجزیه و تحلیل آماری قابلیت حل کنندگی فسفات در سویه های



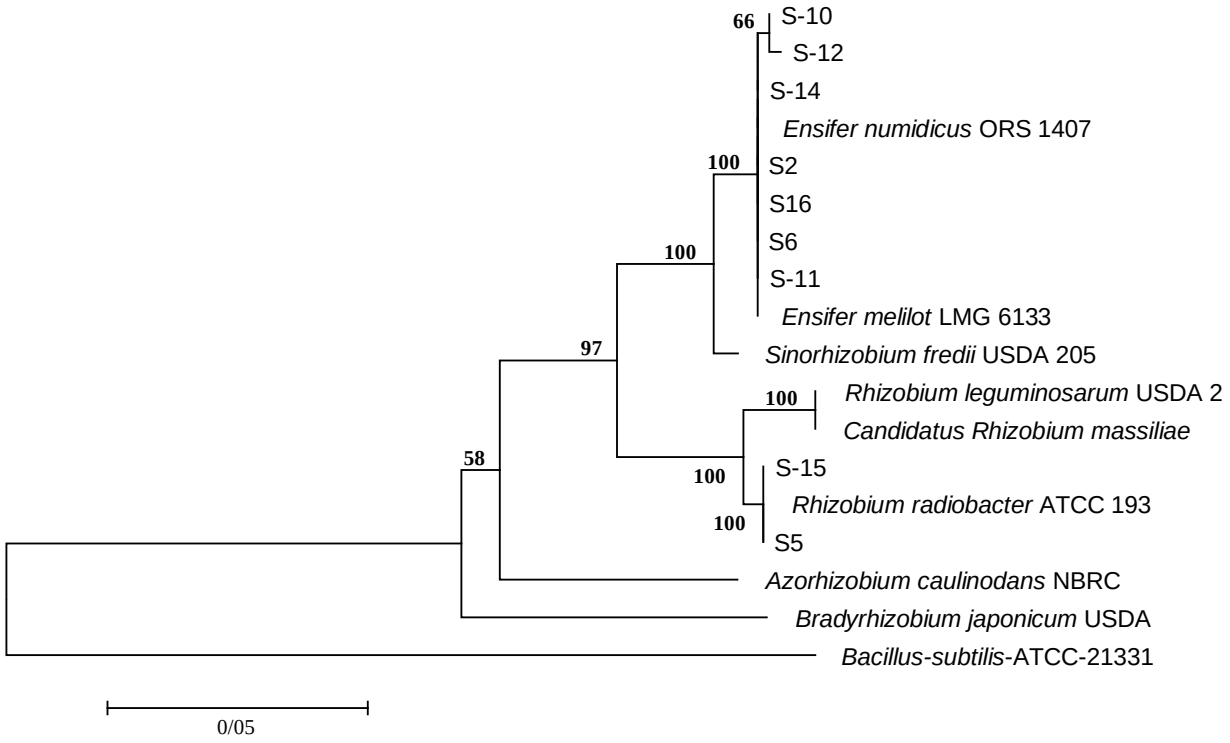






رسم درخت فیلوژنیک جدایه های منتخب

آلفا باکتر



گاما باکتر