Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)

48(4), Winter, 2026

10.22055/ppr.2025.48836.1788

Identification of *Rhizobium radiobacter* from Bean Roots in Lorestan Province and its Role in Improving Bean Yield Factors under Greenhouse Conditions

A. Dehghani [1], V. Amir Sardari [2], H. Mirzaei Najafgholi [*3], F. Mehdinia [4], F. Bahrami [2]

1. Assistant Professor, Plant Protection Department, Lorestan Agricultural and Resources Research and Education Center, Khoramabd, Iran
2. M. Sc. graduate, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
3. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran (mirzaei.h@lu.ac.ir)
4. Ph.D. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Received: 30 January 2025 Revised: 27 May 2025 Accepted: 6 June 2025

Abstract

Background and Objective

Legumes, particularly beans, are crucial to food security and soil health. The crops account for approximately 50% of global legume production and are fundamental in meeting the food needs of various societies. Rhizobium bacteria, known for their nitrogen-fixing abilities, serve as valuable symbionts to leguminous plants. As the primary source of biofertilizers, Rhizobium plays a vital role in nitrogen fixation, enhances soil fertility, and helps reduce dependence on chemical fertilizers. The *Rhizobium radiobacter* aids plants in resisting environmental stresses. This study aims to identify and investigate the phenotypic and genetic diversity of Rhizobium isolates, addressing the limited research on the diversity of these bacteria in the soils of the Middle Zagros region.

Materials and Methods

The bean roots were sampled during the summer flowering stage from the cities of Aleshatar, Azna, Aligudarz, Beyranshahr, and Khorramabad. The samples were transferred to the plant pathology laboratory, where the surfaces of the roots and nodes were washed, and a bacterial suspension was prepared. Subsequently, bacterial isolation was performed on the YEMA culture medium. Phenotypic, biochemical, and nutritional tests were employed to identify the bacteria accurately. Additionally, to enhance the identification accuracy, the 16S rDNA region was amplified and sequenced. Ribosomal DNA restriction enzymes were employed to study diversity at the nucleotide level. This study investigates genetic diversity and identifies superior isolates of this species concerning nitrogen supply, host enhancement, and grain yield increase in beans. Sampling was conducted from the roots of bean plants in the Middle Zagros regions. After the isolation and purification of the isolates, phenotypic-biochemical tests were performed for initial screening. Genetic diversity was determined using polymerase chain reaction (PCR), and the results were analyzed using Ntsys-pc version 2.02 software. The symbiotic efficiency of the identified isolates was investigated under greenhouse conditions using the Akhtar and Sayyad bean cultivars. A total of 14 isolates of *R. radiobacter* were identified and analyzed for their effectiveness in promoting plant growth and health.

Results

A total of 14 bacterial isolates of *R. radiobacter* were identified. The bacterial isolates of *R. radiobacter* were identified as gram-negative, oxidase-positive, and catalase-positive. These obligate aerobic organisms could grow on culture media containing 3% salt. The isolates demonstrated positive results in Tween 80 hydrolysis, esculin hydrolysis, alkalinization of Litmus Milk, levan production, and ketolactose production. However, they were negative for starch hydrolysis, gelatin hydrolysis, nitrate reduction, indole production, and fluorescent dye tests. Isolate Rb194 exhibited a 100% identity to the *R. radiobacter* species. The analysis of ARDRA using HpaII and RsaI enzymes demonstrated the genetic diversity among the isolates. During a greenhouse experiment aimed at investigating the efficiency of symbiosis with two bean cultivars, the results were as follows: for the Akhtar cultivar, isolates Rb180, Rb184, and Rb187 exhibited the highest efficiency of symbiosis, with the highest shoot dry weight attributed to isolate Rb187.

Additionally, isolates Rb182, Rb189, and Rb190 could not produce nodules. For the Sayyad cultivar, isolates Rb180 and Rb182 produced the highest shoot dry weight; notably, the symbiotic efficiency of Rb180 exceeded 100%, while isolates Rb189 and Rb190 could not produce nodules. The PCR and restriction enzyme analysis results revealed distinct bands ranging from 150 to 2000 base pairs.

Discussion

The rhizobium isolates exhibited significant phenotypic and genetic diversity. The observed differences may be attributed to various environmental factors. The differing efficiency of the isolates in symbiosis with bean plants underscores the importance of the genetic diversity of these bacteria. Genetic diversity analyses revealed substantial differences. Furthermore, the results of the variance analysis regarding the symbiotic efficiency of the isolates demonstrated significant differences in the number and weight of nodules, shoot weight, and nitrogen fixation rates. Differential phenotypic tests are proposed as a rapid and effective method for identifying *R. radiobacter*. The ARDRA technique is highlighted as a suitable tool for investigating the genetic diversity of these species. Genetic diversity directly correlates with nitrogen fixation ability, climatic conditions, and bacterial activity.

Keywords: Akhtar cultivar, Nitrogen fixation, Rhizobium, ARDRA technique

Associate editor: R. Rezaei (Ph.D.)

Citation: Dehghani, A., Amir Sardari, V., Mirzaei Najafgholi, H., Mehdinia, F. & Bahrami, F (2026). Identification of *Rhizobium radiobacter* from Bean Roots in Lorestan Province and its Role in Improving Bean Yield Factors under Greenhouse Conditions. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *48*(3), 37-52. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2025.48836.1788.

گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ٤٨، شماره ٤، زمستان ١٤٠٤

10.22055/ppr.2025.48836.1788

شناسایی باکتری *Rhizobium radiobacter* از ریشه لوبیا در استان لرستان و بررسی نقش آن در بهبود فاکتورهای عملکردی لوبیا در شرایط گلخانه

علی دهقانی[۱]، وحید امیرسرداری [۲]، حسین میرزایی‌نجفقلی*[۳]، فرشته مهدی‌نیا[۴]، فرهاد بهرامی [۲]

۱- استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی لرستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، خرم آباد، ایران
۲- دانش آموخته دوره کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان
۳- * **نویسنده مسوول**: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران (mirzaei.h@lu.ac.ir)
۴- دانشجوی دوره دکتری، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۱ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۳/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۶

چکیده

ریزوبیوم‌ها به عنوان منبع اصلی تولید کودهای زیستی، نقش حیاتی در تثبیت نیتروژن و بهبود حاصلخیزی خاک ایفا می‌کنند و به کاهش وابستگی به کودهای شیمیایی کمک کنند. گونه *Rhizobium radiobacter* به دلیل توانایی‌اش در افزایش مقاومت گیاهان به عوامل بیماری‌زا و تحمل به تنش‌های محیطی، مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است. این پژوهش به بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی جدایه‌های برتر این گونه در تأمین نیتروژن، تقویت میزبان و افزایش عملکرد دانه در لوبیا می‌پردازد. برای این منظور، نمونه‌برداری از ریشه بوته‌های لوبیا در مناطقی از زاگرس صورت گرفت. پس از جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌ها، آزمون‌های فنوتیپی-بیوشیمیایی برای غربالگری اولیه انجام شد. تنوع ژنتیکی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) تعیین و تحلیل نتایج با نرم‌افزار Ntsys-pc version 2.02 انجام شد. کارایی همزیستی جدایه‌های شناسایی شده در شرایط گلخانه بر روی ارقام لوبیا اختر و صیاد مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ١٤ جدایه *R. radiobacter* شناسایی شد. نتایج PCR و آنزیم‌های برشی نشان‌دهنده باندهای مشخصی در محدوده ۱۵۰ تا ۲۰۰۰ جفت بازی بود. تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی نشان‌دهنده تفاوت‌های قابل توجهی بود. همچنین، نتایج تجزیه واریانس کارایی همزیستی جدایه‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در تعداد و وزن گره‌ها، وزن اندام‌های هوایی و میزان تثبیت نیتروژن بود. آزمون‌های فنوتیپی افتراقی به عنوان روشی سریع و مؤثر برای شناسایی *R. radiobacter* و تکنیک ARDRA Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis به عنوان ابزاری مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی این گونه‌ها پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: رقم اختر، تثبیت نیتروژن، ریزوبیوم، تکنیک ARDRA

دبیر تخصصی: دکتر رسول رضائی

مقدمه

حبوبات، به ویژه لوبیا، نه تنها به عنوان منابع غنی پروتئین گیاهی شناخته می‌شوند، بلکه نقش حیاتی در امنیت غذایی و حفظ سلامت خاک‌های زراعی ایفا می‌کنند (Blair et al., 2009). حبوبات به عنوان یکی از اجزای کلیدی سبد غذایی در تأمین نیازهای غذایی جوامع مختلف نقش دارند (Messina, 2014). در این میان، باکتری‌های ریزوبیوم (*Rhizobium* spp.) با توانایی شگفت‌انگیز خود در تثبیت نیتروژن مولکولی، به عنوان همزیست‌های ارزشمندی با گیاهان لگومی شناخته می‌شوند. این باکتری‌ها با ایجاد گره در ریشه‌های گیاهان، حدود ۸۰ درصد نیتروژن تثبیت شده را تأمین می‌کنند (Liu et al., 2011). این فرآیند نه تنها موجب افزایش نیتروژن مورد نیاز برای سنتز پروتئین و سایر ترکیبات آلی گیاه می‌شود، بلکه نیاز به مصرف کودهای شیمیایی را کاهش می‌دهد و بدین ترتیب به توسعه پایدار کشاورزی کمک می‌کند (Mishra et al., 2006).

استفاده از این باکتری‌ها به عنوان کود زیستی در کشاورزی به طور فزاینده‌ای مورد توجه قرار گرفته و تحقیقات در زمینه تنوع ژنتیکی آن‌ها در کشورهای مختلف، نشان‌دهنده اهمیت این موجودات در بهبود عملکرد زراعی و افزایش تولید است (Ashraf et al., 2006; Mabrouk & Belhadj, 2010). وجود تنوع ژنتیکی این باکتری با استفاده از انواع نشانگرهای مولکولی در مناطق مختلف دنیا گزارش شده است (Asadi Rahmani et al., 2011). در تحقیقی که برای شناسایی باکتری‌های عامل ایجاد گره در ریشه حبوبات انجام گرفت، مشخص شد که بالای ۶۰ درصد باکتری‌های همزیست با تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای میان جدایه‌ها، مربوط به گونه *R. radiobacter* است (Kumar et al., 2018). در تحقیقی خصوصیات فنوتیپی-بیوشیمیایی و تنوع ژنتیکی ریزوبیوم‌های سویا مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که این سویه‌ها سبب افزایش فاکتورهای رشدی و افزایش تعداد گره در سویا می‌شوند (Jonasson et al., 2002).

با توجه به اهمیت ریزوبیوم‌ها در تثبیت نیتروژن و تأثیر آن‌ها بر اکوسیستم‌های زراعی، و همچنین وجود مطالعات محدود در زمینه تنوع این باکتری‌ها در خاک‌های منطقه زاگرس، مطالعه حاضر با هدف شناسایی و بررسی تنوع فنوتیپی-بیوشیمیایی و ژنتیکی جدایه‌های جنس *Rhizobium* انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی

ریشه‌های بوته‌های لوبیا از شهرهای الشتر، ازنا، الیگودرز، بیرانشهر و خرم‌آباد در مرحله گلدهی جمع‌آوری گردید. همچنین پس از شست‌وشو و ضدعفونی سطحی ریشه و گره-ها با هیپوکلرید سدیم نیم درصد تجاری مطابق روش Mila et al. (2004) سوسپانسیون باکتریایی تهیه گردید. سپس روی محیط‌کشت اختصاصی عصاره مخمر مانیتول آگار YEMA حاوی رنگ قرمز کنگو[1] کشت و تشتک‌های پتری درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت، پرگنه‌های محدب و گنبدی شکلی به رنگ صورتی کم رنگ ظاهر شدند. بعد از خالص‌سازی این سویه‌ها روی محیط‌کشت NA، آزمون‌های فنوتیپی-بیوشیمیایی و تغذیه‌ای انجام شد (Liu et al., 2017).

آزمون‌های فنوتیپی

آزمون‌های فنوتیپی-بیوشیمیایی و تغذیه‌ای شامل آزمون-های گرم، اکسیداز، O/F، کاتالاز، رشد در ۳۵ درجه سلسیوس، تحمل نمک طعام ۳ درصد، هیدرولیز توئین ۸۰، هیدرولیز آسکولین و نشاسته، تولید ایندول، احیای نیترات، تولید لوان، کتولاکتوز، تولید رنگ فلورسنت، قلیایی کردن شیر لیتموس، رشد روی محیط D1M1 و A1، تولید H2S از سیستئین، متیل رد، فسفاتاز، استفاده از منابع کربنی شامل گلوکز، فروکتوز، مالتوز، رامنوز، زایلوز، سوربیتول، مانوز، گلیسرول، آرابینوز، سیترات، مالونات و اسیدهای آمینه والین، لیزین، ال-آرژنینی، ال تارتارات، دی تارتارات، ال پرولین، دی آلانین، ال سرین و گلوتامات انجام گرفت (Kovacs,

[1] Congo red

1956; Dye, 1969; Suslow et al., 1982; Schaad et al., 2001).

جداسازی DNA ژنومی

برای جداسازی DNA از سلول‌های باکتریایی از کشت ۲۴ ساعته، سوسپانسیون باکتری با جمعیت حدود (OD: 0.07) 10^7 CFU/ml در میکرو تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری تهیه شد (Maniatis et al., 1982). میکروتیوب‌ها به مدت هفت دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۳ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ و سپس رونشین در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. از این نمونه‌ها به عنوان DNA الگو در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) استفاده شد. کیفیت DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد تایید شد (Kumar et al., 2018).

شناسایی مولکولی باکتری‌ها با استفاده از تکثیر ناحیه ژنومی 16S rDNA

پس از بررسی خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی گونه‌های باکتری، ۱۴ جدایه به عنوان نماینده انتخاب و برای تشخیص نهایی آن‌ها از آزمون PCR با آغازگرهای عمومی 27F(AGAGTTTGATCTGGCTCAG) و 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) ناحیه rDNA 16S و سپس تعیین توالی قطعه تکثیرشده استفاده گردید (Frank et al., 2008).

آزمون PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر (10X) ، ۲/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی مولار از مخلوط dNTP، ۱/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۱/۵ واحد آنزیم تک پلیمراز (شرکت سیناژن، ایران) و ۱۰ پیکومول از هر آغازگر انجام گرفت. از دستگاه ترموسایکلر Techne, Genius FGEN02TP, (USA) به منظور انجام واکنش PCR استفاده شد. پس از تکثیر ژن مورد نظر و ارزیابی کیفیت آن روی ژل آگارز یک درصد، محصول PCR برای توالی یابی به شرکت پیشگام ارسال گردید. توالی ویرایش و نتیجه توالی یابی در پایگاه دادهای NCBI ارزیابی شد (Mirzaei Najafgholi et al., 2023). درخت تبارزایی جدایه باکتریایی جدا شده از خاک ریزوسفر لوبیا براساس تجزیه و تحلیل توالی ژن 16S rDNA توسط نرم‌افزار MEGA7 به روش Neighbor-joining با bootstrap ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد (Glickmann & Dessaux, 1995).

بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از آنزیم‌های برشی *Rsa*I و *Hpa*II

به منظور بررسی تنوع در سطح نوکلئوتیدی از آنزیم‌های محدودگر DNA استفاده شد. پس از تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA توسط آغازگرهای عمومی 27F و 1492R، از آنزیم‌های برشی *Hpa*II و *Rsa*I به ترتیب با ناحیه برشی، -`5 C↓CGG-3` و `5-GGC↑C-3` و `5-GT↓ AC-3` و `3-CA↑TG-5` استفاده شد. غلظت و حجم مواد برای یک واکنش، برای هریک از آنزیم‌های *Rsa*I و *Hpa*II شامل پنج میکرولیتر بافر 10X، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR و ۰/۱۵ میکرولیتر آنزیم برشی بود که با آب به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. لوله‌ها به مدت دو ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت تا برش ناحیه ژنی انجام شود. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس برای غیرفعال کردن آنزیم‌ها قرار داده شد. محصول حاصل در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید (Kumar et al., 2018).

با استفاده از نرم افزار Ntsys version 2.02e (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) فاصله یا شباهت ژنتیکی جدایه‌ها رسم گردید. برای بررسی واقعی میان گروه‌ها از روش داده‌های غیروزنی (Unweighted Group method using Arithemtic average) وضریب تشابه تطابق (Simple matching) استفاده گردید. ویژگی‌های ژنوتیپی به صورت کدهای یک برای حضور باند و صفر برای عدم وجود باند برای این نرم افزار تعریف گردید (Jiménez-Fernández et al., 2011). بر پایه ویژگی‌های ژنتیکی تعریف شده، دندروگرام مربوط به ۱۴ جدایه مورد بررسی قرار گرفت. درصد تشابه بین جدایه‌های موجود درگروه‌ها بر اساس تمامی ویژگی‌های موجود در این پژوهش محاسبه گردید.

بررسی کارایی همزیستی *R. radiobacter* در شرایط گلخانه

آزمایش گلخانه‌ای در گلدان‌های یک کیلوگرمی شامل خاک، کوکوپیت و ماسه بادی به نسبت ۱:۱:۲ در گلخانه مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان انجام شد. در این آزمایش دو رقم لوبیا قرمز و ۱۴ سویه ریزوبیوم جدا شده ازگره‌های ریشه لوبیا استفاده شد. سویه‌ها در محیط مایع مانیتول مخمر کشت داده شدند (Blair et al., 2009). پس از ضدعفونی بذرها، در هرگلدان چهار عدد بذر لوبیا مایه زنی شده با سویه باکتری مورد نظر با جمعیت 10^8 CFU/ml (OD: 0.1) کاشته شد. برای هر سویه سه گلدان به عنوان سه تکرار در نظر گرفته شد. همچنین یک تیمارمایه زنی نشده شاهد و یک تیمارمایه زنی نشده دریافت کننده نیتروژن (۷۰ میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم) در نظر گرفته شد. تعداد گیاهان هر گلدان پس از یک هفته در مرحله دو برگی به دو گیاه کاهش یافته و هر هفته با محلول غذایی عاری از نیتروژن بر حسب نیاز آبی گیاه لوبیا آبیاری شدند (Ciancio et al., 2016).

پس از ۴۵ روز برداشت و وزن خشک اندام‌های هوایی، تعداد گره‌ها روی ریشه و وزن خشک گره‌ها اندازه‌گیری شد. میانگین وزن خشک اندام هوایی (X) برای محاسبه شاخص کارایی استفاده شد (Avis et al., 2004).

شاخص کارایی همزیستی[1] طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$S.E. = 100 \times \frac{X_I - X_C}{X_N - X_C})$$

Xi: وزن خشک اندام هوایی در گیاهان مایه زنی شده.

Xc: گیاهان شاهد مایه زنی نشده .

XN: گیاهان دریافت کننده نیتروژن به میزان ۷۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک .

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و در قالب طرح‌های فاکتوریل و کاملا تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین داده ها به روش LSD در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

نتایج

جداسازی و شناسایی جدایه‌های باکتریایی *R. radiobacter*

در مجموع ۱۴ جدایه گرم منفی، اکسیداز و کاتالاز مثبت، هوازی اجباری با توانایی رشد در نمک سه درصد و دمای ۳۷ درجه سلسیوس جداسازی گردید. جدایه‌ها در آزمون‌های هیدرولیز توین ۸۰، هیدرولیز اسکولین، قلیایی کردن شیرلیتموس، تولید لوان و کتولاکتوز مثبت ولی در آزمون‌های هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین، احیای نیترات، تولید ایندول، رنگ فلورسنت منفی بودند. مشخصات جدایه‌ها و نتایج خصوصیات فنوتیپی-بیوشیمیایی و تغذیه‌ای در جدول یک و دو آمده است (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- جدایه‌های باکتریایی *R. radiobacter* همزیست با ریشه لوبیا

Table 1. Bacterial isolates of *R. radiobacter* symbiotic with bean roots

Isolate	Genus and species name	Sampling area	Isolate code
Rb176	*R. radiobacter*	Aleshtar	CCSM_B011403
Rb178	*R. radiobacter*	Aleshtar	CCSM_B011410
Rb179	*R. radiobacter*	Aleshtar	CCSM_B011424
Rb182	*R. radiobacter*	Azna	CCSM_B011280
Rb183	*R. radiobacter*	Azna	CCSM_B011418
Rb184	*R. radiobacter*	Azna	CCSM_B011412
Rb185	*R. radiobacter*	Azna	CCSM_B011416
Rb187	*R. radiobacter*	Beyranshahr	CCSM_B011413
Rb189	*R. radiobacter*	Beyranshahr	CCSM_B011417
Rb190	*R. radiobacter*	Khoramabad	CCSM_B011421
Rb191	*R. radiobacter*	Khoramabad	CCSM_B011426
Rb192	*R. radiobacter*	Khoramabad	CCSM_B011419
Rb193	*R. radiobacter*	Azna	CCSM_B011425
Rb194	*R. radiobacter*	Beyranshahr	CCSM_B011427

[1] Symbiotic Effectiveness (S.E.)

جدول ۲- خصوصیات فنوتیپی-بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی *R. radiobacter* همزیست با ریشه لوبیا

Table 2. Phenotypic-biochemical characteristics of *R. radiobacter* bacterial isolates symbiotic with bean roots

Test	Reaction	Test	Reaction	Test	Reaction
Use of malonate	-	Ketolactose production	+	Gram	-
Citrate	-	H2S production from cystine	-	Oxidase	+
Valine	-	Methyl red	-	Growth at temperature C0-35	+
L- tartrate	14.2 A	Litmus milk	Alkaline	Catalase	+
D-Tartrate	+	Nitrate reduction	-	Squalene hydrolysis	+
L-Serine	64A	Production of Luvan	+	Phosphatase	-
L-Proline	+	Indole production	-	Fluorescent paint production	-
Lysine	-	Growth on D1M culture medium	+	Starch hydrolysis	-
L-arginine	-	Growth on A1 culture medium	+	Tween 80 hydrolysis	+
D-alanine	-	Glucose	+	Gelatin hydrolysis	-
Salt tolerance 3%	+	Sorbitol	+	Fructose	+
Xylose	+	Glycerol	+	Mannose	+
Arabinose	+	Rhamnose	+	Maltose	+

+: دارا بودن آنزیم مورد آزمایش یا توانایی استفاده از ترکیب مورد استفاده

-: عدم وجود آنزیم مورد آزمایش یا عدم توانایی استفاده از ترکیب مورد استفاده

به منظور بررسی صحت تکثیر محصول ناحیه ژنی 16S rDNA در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل یک درصد آگارز، باند حدود ۱۵۰۰ جفت بازی مشاهده گردید (شکل ۱) (Kumar et al., 2018).

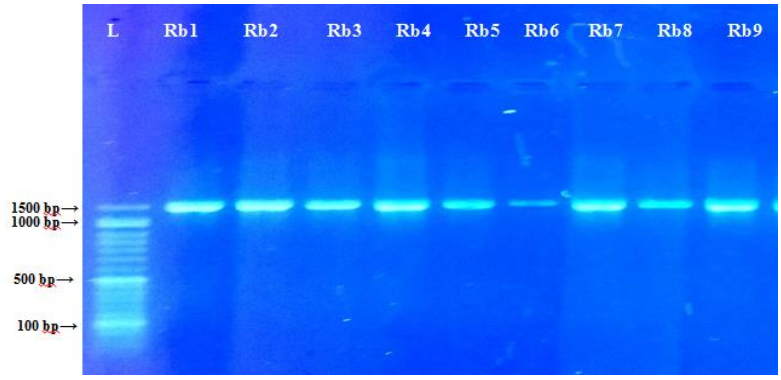
آنالیز 16S rDNA و تعیین توالی نمونه

به منظور شناسایی دقیق‌تر و بررسی ژنتیکی جدایه‌های جمع‌آوری شده تعیین توالی قسمتی از ناحیه 16S rDNA انجام شد. جدایه Rb194 به عنوان نماینده انتخاب و پس از تعیین توالی و همردیف سازی با جدایه های موجود در NCBI مورد مقایسه قرار گرفت و درصد تشابه آن‌ها مشخص گردید. نتیجه نهایی بلاست توالی به دست آمده نشان داد که جدایه Rb194 دارای تشابه به میزان ۱۰۰ درصد با گونه *R. radiobacter* با شماره دسترسی PQ409352 در پایگاه داده NCBI بود (شکل ۲).

انگشت نگاری DNA با استفاده از آنزیم های برشی *Rsa*I و *Hpa*II

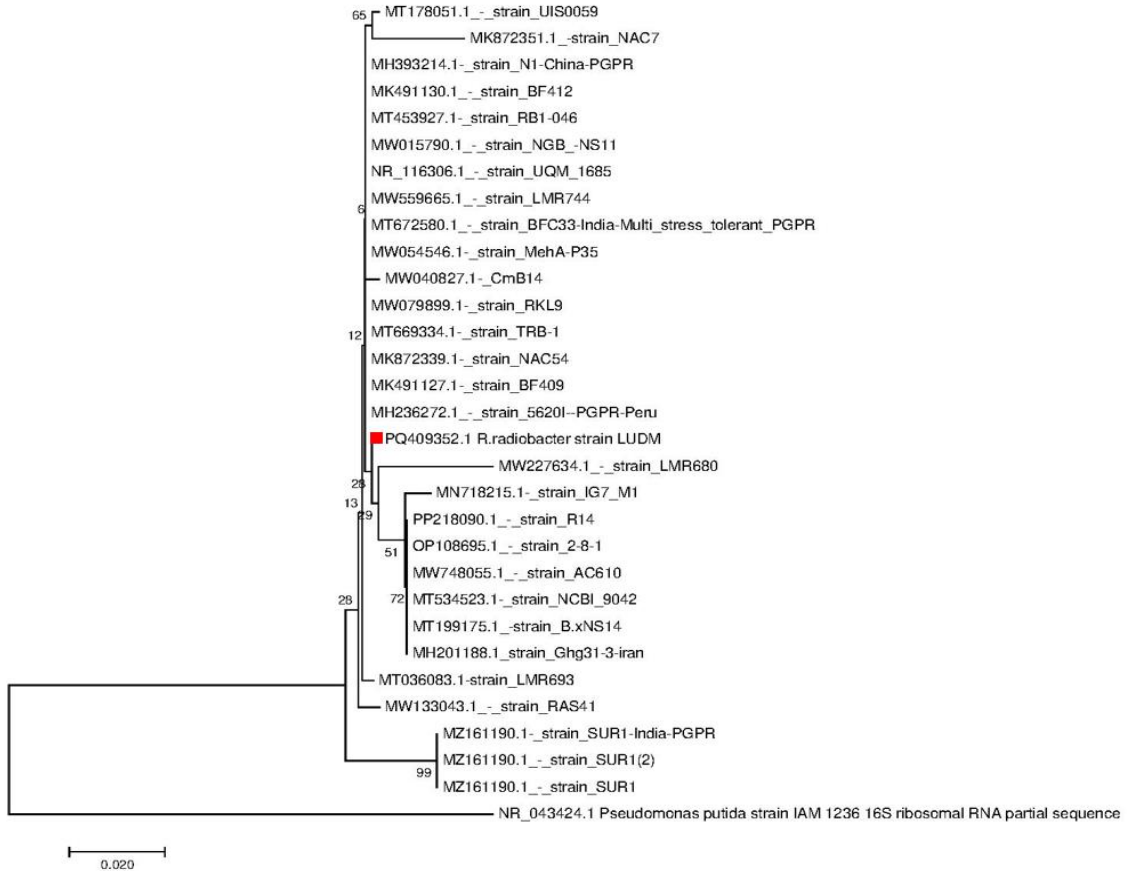
بر اساس آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی، ۱۴ سویه از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده به عنوان باکتری *R. radiobacter* شناسایی و انتخاب شدند. سپس DNA ژنومی آن‌ها با استفاده از آنزیم‌های برشی *Hpa*II و *Rsa*I هضم شد. بر اساس نقوش الکتروفورزی محصولات با استفاده از تکنیک ARDRA و با استفاده از آغازگر *Hpa*II مجموعا هشت باند مشخص در محدوده‌ی ۱۵۰ تا ۱۵۰۰ جفت بازی تکثیر شد (شکل ۳). با توجه به دندروگرام رسم شده و مقایسه نقوش قطعات DNA تکثیر شده از سطح تشابه ۷۶ درصد

تنوع ژنتیکی به خوبی قابل رویت بود و بصورت استاندارد در سطح تشابه ۸۸ درصد به چهار گروه تقسیم بندی شدند (شکل ۵). گروه اول از لحاظ ژنتیکی شباهت بیش‌تری با سویه‌های گروه دوم داشتند و شامل سویه‌های منطقه الشتر بود. گروه دوم که بیش‌ترین تعداد سویه‌ها را داراست از سویه‌های مربوط به منطقه ازنا و یک سویه از خرم‌آباد تشکیل شد. گروه سوم شباهت ژنتیکی بالایی با سویه‌های گروه چهارم دارد و شامل دو سویه از منطقه بیرانشهر و گروه چهارم شامل دو سویه از منطقه خرم‌آباد و یک جدایه مربوط به منطقه بیرانشهر بود.



شکل ۱- باند DNA مربوط به تکثیر ناحیه 16S rDNA جدایه‌های باکتری های جدا شده از گره‌های ریشه بوته‌های لوبیا در ژل آگارز یک درصد (مارکر ۵۰ تا ۱۵۰۰ جفت بازی شرکت سیناکلون)

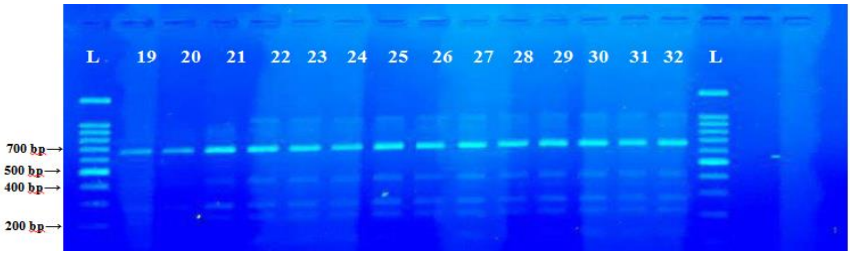
Figure 1. DNA bands corresponding to the amplification of the 16S rDNA region of bacterial isolates obtained from the root nodules of bean plants in a 1% agarose gel



شکل۲. درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های *R. radiobacter* بر اساس هم‌ردیفی توالی‌های ناحیه‌ی ژنی 16S rDNA با مقادیر بوت استرپ ۱۰۰۰ تکرار در نقطه‌ی انشعاب ترسیم شده است. جدایه منتخب در این پژوهش از استان لرستان با نشان مربع مشخص شده است.

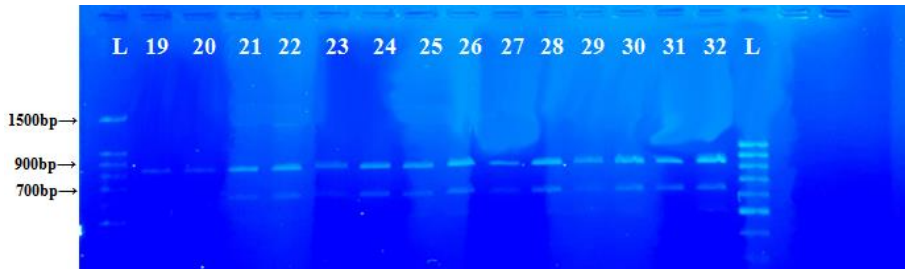
Figure 2. Phylogenetic tree constructed from a Neighbor-joining analysis based on a concatenated alignment from 16S rDNA sequences from *R. radiobacter* isolates with 1000 bootstrap replicates at the branch points. The representative isolate from Lorestan Province marked with a square symbol.

نقوش الکتروفورزی محصولات حاصل از کاربرد آنزیم برشی *RsaI* مورد بررسی قرار گرفتند، در مجموع شش باند در اندازه‌های ۵۵۰ تا ۲۰۰۰ جفت بازی تکثیر شد (شکل ۴). مقایسه نقوش قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از تکنیک ARDRA نشان داد که سویه‌ها در سطح تشابه ۷۸ درصد در دو گروه قرار گرفتند. با توجه به دندروگرام حاصله اکثر سویه‌ها در یک گروه قرار گرفتند و چهار سویه دیگر گروه جداگانه‌ای تشکیل دادند (شکل ۵). با مقایسه‌ای که در سطح تشابه ۸۹ درصد بعمل آمد سویه‌ها به سه گروه تقسیم بندی شدند. گروه اول شامل جدایه‌های منطقه الشتر، گروه دوم که بیش‌ترین تعداد جدایه را دارا می‌باشد شامل جدایه‌های مناطق مختلف از جمله خرم‌آباد، بیرانشهر و ازنا می‌باشد. گروه سوم نیز شامل جدایه‌های مربوط به منطقه ازنا می‌باشد.



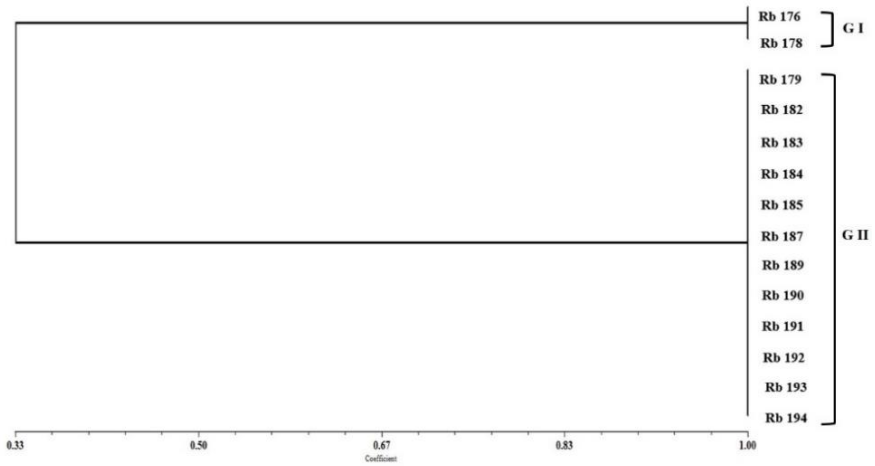
شکل ۳- نتایج الکتروفورز تکنیک ARDRA جدایه‌های *R. radiobacter* به وسیله آنزیم *Hpa*II روی ژل آگارز دو درصد. L نشانگر وزنی 100 bp DNA Ladder است.

Figure 3. Results of ARDRA electrophoresis of R. *radiobacter* isolates using the *Hpa*II enzyme on a 2% agarose gel at 100 V. L is the 100 bp DNA Ladder marker.



شکل -Error! No text of specified style in document. **نتایج الکتروفورز تکنیک ARDRA جدایه‌های *R. radiobacter* به وسیله آنزیم *RsaI* روی ژل آگارز دو درصد. L نشانگر وزنی 100 bp DNA Ladder است.**

Figure 4. Results of ARDRA electrophoresis of R. *radiobacter* isolates using the *Rsa*I enzyme on a 2% agarose gel at 100 V. L is the 100 bp DNA Ladder marker.



شکل۵- دندروگرام جدایه‌های *R. radiobacter* بر اساس آنزیم‌های برشی *HpaII* و *RsaI*

Figure 5. Dendrogram of R. radiobacter isolates based on the restriction enzymes RsaI and HpaII.

کارایی هم‌زیستی جدایه‌های مختلف ریزوبیوم در شرایط گلخانه

در این پژوهش کارایی همزیستی ۱۴ جدایه ریزوبیوم با دو رقم لوبیا قرمز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج کارایی همزیستی ریزوبیوم‌ها با لوبیا قرمز رقم اختر نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد از نظر هم‌زیستی بین این جدایه‌ها وجود دارد (جدول۳). بیش‌ترین هم‌زیستی مربوط به سه جدایه Rb180، Rb184 و Rb187 به ترتیب با کارایی ۸۰/۵۶ ، ۸۰ و ۸۸/۸۹ و وزن خشک اندام هوایی ۲/۲۱، ۲/۰۳ و ۲/۴۱ گرم در گلدان بود. جدایه‌های Rb182، Rb189 و Rb190 قادر به تولید گره نبودند و جدایه Rb182 فاقد کارایی و توان همزیستی با ریشه لوبیا قرمز رقم اختر بودند. بالاترین کارایی همزیستی و بیش‌ترین وزن خشک اندام هوایی و تعداد گره در این آزمایش متعلق به جدایه Rb187 بود.

در خصوص نتایج توان هم‌زیستی جدایه‌های ریزوبیومی با لوبیا قرمز رقم صیاد نیز تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد از نظر هم‌زیستی بین این جدایه‌ها وجود داشت (جدول۴). بالاترین وزن خشک اندام هوایی و تعداد گره در این آزمایش متعلق به جدایه‌های Rb180 و Rb182 بود که به ترتیب کارایی هم‌زیستی ۱۲۸/۷و ۸۹/۴۷ درصد از خود نشان دادند. تولید گره در تیمار جدایه‌های Rb189 و Rb190 مشاهده نشد و در جدایه Rb189 کارایی همزیستی صفر بود. در مجموع با توجه به نتایج آزمون کارایی هم‌زیستی دو رقم لوبیا قرمز اختر و صیاد، بیش‌ترین میانگین کارایی هم‌زیستی و بالای ۱۰۰ درصد مربوط به جدایه‌های Rb180 بود.

جدول ۳- کارایی همزیستی جدایه‌های مختلف ریزوبیومی با لوبیا رقم اختر

Table 3. Efficiency of symbiotic association of different rhizobial isolates with bean cultivar Akhtar

Symbiotic efficiency٪	Number of nodes n.pot	Dry weight of knot mg.pot^{-1}	Dry weight of aerial parts g.pot^{-1}	Isolate
51.39 c-f	7.3 c-g	37c–g	1.96 c-g	Rb179
80.56 b-d	31 a	100 a	2.21 a-e	Rb180
67.5 b-e	b-g۱۲ /۳	52 a–g	1.87 b-f	Rb181
0 g	0 g	0 g	1.21 gh	Rb182
31.11 ef	2.6 g	21 e–g	1.71 f-h	Rb183
80 b-d	20.3 a-e	73 a–e	2.03 a–e	Rb184
30.28 ef	8 c-g	45 b–g	1.54 f–h	Rb185
88.89 a-c	19 a-f	71 a–d	2.41 a–d	Rb187
66.39 b-e	0 g	0 g	2.19 b–f	Rb189
58.06 b-e	0 g	0 g	2.01 b–g	Rb190
59.72 b-e	5.6 d-g	38 c-g	2.2 b–f	Rb191
41.67 d-f	13.3 b-g	57 a-f	1.78 e–h	Rb192
40.83 d-f	3.6 fg	25 d-g	1.74 e–h	Rb193
57.78 b-e	9.3 c-g	47 a-g	1.97 b–g	Rb194
			2.45 ab	+ N
			1.25 h	_ N

- Means that share at least one common Latin letter do not have a significant difference at the 5% level.

- +N: Non-inoculated and received 70 mg/kg of nitrogen; -N: Non-inoculated and without nitrogen fertilizer.

جدول ٤- کارایی همزیستی جدایه‌های مختلف ریزوبیومی با لوبیا قرمز رقم صیاد

Table 4. Efficiency of symbiotic association of different rhizobial isolates with red bean cultivar Sayyad.

Symbiotic ٪ efficiency	Number of nodes n.pot	Dry weight of knot mg.pot^{-1}	Dry weight of aerial parts g.pot^{-1}	Isolate
47.72 e-g	5.3 ef	24 ef-h	1.59 d-h	Rb179
128.77 a	29.6 a	103 a	2.32 a	Rb180
70.53 b-f	4 ef	18 ef-h	1.75 a-g	Rb181
47.37 e-g	5.3 ef	27 d-h	1.76 d-h	Rb182
40 e-g	8 ef	39 d-g	1.73 e-h	Rb183
89.47 a-e	23.3 a-c	86 ab	1.85 a-f	Rb184
58.25 d-g	10.6 c-f	51 b-e	1.74 c-h	Rb185
61.40 d-g	15 b-e	89 ab	2.01 b-h	Rb187
0 h	0 f	0 h	1.14 gh	Rb189
22.1 fg	0 f	0 h	1.44 gh	Rb190
49.83 d-g	4.3 ef	19 ef-h	1.65 d-h	Rb191
62.46 d-g	3.3 ef	16 ef-h	1.77 b-g	Rb192
43.51 e-g	12.6 c-f	43 d-g	1.59 d-h	Rb193
65.96 c-g	14.3 b-f	41 d-g	1.85 b-g	Rb194
			2.13 a-e	+ N
			1.18 h	_ N

- Means that share at least one common Latin letter do not have a significant difference at the 5% level.

- +N: Non-inoculated and received 70 mg/kg of nitrogen; -N: Non-inoculated and without nitrogen fertilizer.

بحث

در این پژوهش، جدایه‌های ریزوبیوم جدا شده از ریشه لوبیا در برخی از مناطق زاگرس از نظر ویژگی‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که این جدایه‌ها دارای تنوع فنوتیپی و ژنتیکی هستند که می‌تواند در رابطه با همزیستی باکتری و گیاه عملکردهای متفاوتی ایجاد کند. جدایه‌های ریزوبیوم از نظر واکنش‌های بیوشیمیایی و فنوتیپی با دیگر پژوهش‌ها تفاوت داشتند. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از تأثیر عوامل محیطی مانند خاک، ارتفاع منطقه و آب و هوا بر جمعیت‌های ریزوبیوم و تنوع ژنتیکی آن‌ها باشد (Vinuesa et al., 1998; Wolde-meskel et al., 2005; Youseif et al., 2014). مقایسه نقوش قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از تکنیک ARDRA نشان داد که سویه‌ها در سطح تشابه ۷۸ درصد در دو گروه قرار گرفتند. با توجه به دندروگرام حاصله اکثر سویه‌ها در یک گروه قرار گرفتند و چهار سویه دیگر گروه جداگانه‌ای تشکیل دادند. با مقایسه‌ای که در سطح تشابه ۸۹ درصد بعمل آمد سویه‌ها به سه گروه تقسیم بندی شدند. این نتایج با مطالعاتی همسوست که از این تکنیک برای تفکیک ژنتیکی ریزوبیوم‌ها استفاده کرده‌اند. به طور مثال، گروه اول شامل جدایه‌های منطقه الشتر، گروه دوم جدایه‌های مناطق خرم‌آباد، بیرانشهر و ازنا، و گروه سوم مربوط به جدایه‌های ازنا بود. این الگو نشان دهنده تأثیرپذیری تنوع ژنتیکی از عوامل جغرافیایی است، مشابه یافته‌های پژوهش‌های دیگر که ارتباط بین پراکنش جغرافیایی و تنوع ژنتیکی ریزوبیوم‌ها را تأیید می‌کنند (Ribeiro et al., 2013; Ozede Igiehon & Babalola, 2018). جدایه‌های ریزوبیوم مناطق زاگرس (مانند الشتر، خرم‌آباد و ازنا) از نظر ژنتیکی و فنوتیپی به‌طور معناداری متفاوت بودند و براساس ARDRA در سه گروه مجزا طبقه‌بندی شدند. این تفاوت‌ها با شرایط محیطی خاص هر منطقه (خاک، ارتفاع و اقلیم) مرتبط دانسته شدند.

مطالعاتی مانند Vinuesa et al. (1998) و Ribeiro et al. (2013) نیز تنوع ژنتیکی ریزوبیوم‌ها را در مناطق مختلف گزارش کرده‌اند، اما تمرکز آن‌ها معمولاً بر روی تأثیر عوامل خاکی (مانند pH و شوری) یا کشت‌های تک‌محصولی بوده است. یکی از مطمئن‌ترین راه‌های مقایسه تفاوت‌ها و شباهت‌های

ژنتیکی در سطح نوکلئوتیدی استفاده از آنزیم‌های محدودگر در روشی مبتنی بر چندشکلی ایجاد شده در DNA ریبوزومی توسط آنزیم‌های محدودگر به نام روش آنالیز محدودگر DNA ریبوزومی تکثیری ARDRA است. با استفاده از تکنیک ARDRAو آنزیم‌های برشی، تنوع ژنتیکی جدایه‌ها مشخص شد که نشان‌دهنده ارتباط تکامل توالی ژنومی و تعیین تنوع ژنتیکی با مناطق اقلیمی و جغرافیایی است (Weir et al., 2004). این تنوع ژنتیکی می‌تواند ناشی از سازگاری باکتری‌ها با شرایط محیطی خاص هر منطقه باشد (Clarridge, 2004; Ribeiro et al., 2013).

نتایج کارایی همزیستی ریزوبیوم‌ها با لوبیا قرمز رقم اختر نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد از نظر همزیستی بین این جدایه‌ها وجود دارد. بیش‌ترین همزیستی مربوط به سه جدایه Rb180، Rb184 و Rb187 به ترتیب با کارایی ۸۰/۵۶ ، ۸۰ و ۸۸/۸۹ و وزن خشک اندام هوایی ۲/۲۱، ۲/۰۳ و ۲/۴۱ گرم در گلدان بود. جدایه‌های Rb182، Rb189 وRb190 قادر به تولید گره نبودند و جدایه Rb182 فاقد کارایی و توان همزیستی با ریشه لوبیا قرمز رقم اختر بودند. بالاترین کارایی همزیستی و بیش‌ترین وزن خشک اندام هوایی و تعداد گره در این آزمایش متعلق به جدایه Rb187 بود. در خصوص نتایج توان هم‌زیستی جدایه‌های ریزوبیومی با لوبیا قرمز رقم صیاد نیز تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد از نظر هم‌زیستی بین این جدایه‌ها وجود داشت. بالاترین وزن خشک اندام هوایی و تعداد گره در این آزمایش متعلق به جدایه‌های Rb180و Rb182 بود که به ترتیب کارایی هم‌زیستی۱۲۸/۷و ۸۹/۴۷درصد از خود نشان دادند. تولید گره در تیمار جدایه‌های Rb189 و Rb190 مشاهده نشد و در جدایه Rb189 کارایی همزیستی صفر بود. در مجموع با توجه به نتایج آزمون کارایی هم‌زیستی دو رقم لوبیا قرمز اختر و صیاد، بیش‌ترین میانگین کارایی هم‌زیستی و بالای ۱۰۰ درصد مربوط به جدایه‌های Rb180 بود. جدایه‌های ریزوبیوم مناطق الشتر و بیرانشهر بیش‌ترین عملکرد همزیستی و تولید وزن خشک اندام‌های هوایی و تعداد گره در مقایسه با سایر جدایه‌ها داشتند. این تنوع در گره‌زایی ریشه‌ها ممکن است در اثر پیام‌های متفاوت ناشی از مواد مترشحه از سوی باکتری‌ها نظیر فلاونوئیدها باشد که موجب تحرک و جذب شیمیایی باکتری‌ها به گیاه میزبان می‌شود (Willems, 2006; Esmaili & Maarefat, 2015; Mousavi, 2016). همچنین تثبیت نیتروژن در گره‌ها بستگی به ارسال مواد کربوهیدراتی از بخش هوایی گیاه به ریشه دارد، بنابراین با افزایش اندام فتوسنتز کننده، تثبیت نیتروژن نیز بیشتر می‌شود. از نظر کارایی همزیستی، جدایه‌های Rb180 و Rb187عملکرد برتری در افزایش وزن خشک اندام هوایی و تعداد گره در لوبیا قرمز رقم اختر و صیاد نشان دادند، در حالی که برخی جدایه‌ها مانند Rb189 و Rb190 فاقد توانایی گره‌زایی بودند. این عدم تولید گره ممکن است ناشی از نقص در ژن‌های سمبیوتیک مانند ژن *nodC* یا تولید ناکافی ترکیبات فلاونوئید باشد. در پژوهش Willems (2006) و Mousavi (2016) همبستگی مثبت بین وزن خشک اندام هوایی و تثبیت نیتروژن مشاهده گردید. اما هیچ ارتباطی بین این دو ویژگی با تعداد گره مشاهده نشد. این پژوهش نشان داد که زیست‌توده گیاهی شاخص دقیق‌تری برای ارزیابی کارایی همزیستی است، نتیجه‌ای که توسط Velazquez et al., (2005) و Youseif et al., (2014) تأیید شده است.

سازگاری سویه‌های بومی مانند Rb180 با شرایط محلی زاگرس، عملکرد برتر این جدایه‌ها را نسبت به سویه‌های تجاری توضیح می‌دهد. این یافته با پژوهش‌های Wolde-Meskel et al., (2005)همسو است که برتری سویه‌های بومی را در تثبیت نیتروژن گزارش کرده‌اند. همچنین تفاوت عملکرد جدایه‌ها در دو رقم لوبیا (اختر و صیاد) نشان می‌دهد که ژنتیک گیاه میزبان نقش کلیدی در کارایی همزیستی ایفا می‌کند، موضوعی که در مطالعاتی مانند Asadi Rahmani et al., (2011)مورد تأکید قرار گرفته است. نوآوری روشی این پژوهش در ترکیب تکنیک‌های مولکولی (ARDRA) با آزمون‌های همزیستی دوسطحی (در دو رقم لوبیا) و تمرکز بر ریزاقلیم‌های محلی مانند تفاوت بین الشتر و خرم‌آباد نهفته است. این رویکرد چندبُعدی، امکان شناسایی دقیق‌تر سویه‌های بومی با پتانسیل کود بیولوژیک را فراهم کرده است. در حالی که بسیاری از مطالعات پیشین مانند Vinuesa et al., (1998) تنها بر بُعد مولکولی یا فیزیولوژیک متمرکز بودند. تفاوت در عملکرد جدایه‌های مناطق الشتر و بیرانشهر احتمالاً ناشی از سازگاری بلندمدت این

سویه‌ها با شرایط خاک و آب وهوای خاص این مناطق است. مشابه این یافته‌ها در مطالعه ریزوبیوم‌های لوبیا در مراکش گزارش شده است، جایی که سویه‌های بومی در مقایسه با سویه‌های تجاری برتری داشتند. در مقایسه با پژوهش‌های مشابه Sogut (2006) که افزایش ۸/۶ درصدی عملکرد سویا را با مایه‌زنی ریزوبیوم گزارش کرد، جدایه‌های این مطالعه مانند Rb187 کارایی همزیستی بالای ۸۸/۸۹ درصد نشان دادند که احتمالاً ناشی از سازگاری تکاملی با شرایط ویژه زاگرس است. همچنین، نتایج این پژوهش با مطالعاتی مانند Moazzenpour et al., (2018) که اثرات مثبت ریزوبیوم بر رنگیزه‌های فتوسنتزی لوبیا چشم‌بلبلی تحت تنش نیکل را نشان دادند، هماهنگی دارد و بر اهمیت سویه‌های مقاوم به تنش تأکید می‌کند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که جدایه Rb180 مربوط به منطقه الشتر در کشت لوبیا نسبت به جدایه‌های سایر مناطق برتری داشت. در حالی که جدایه‌های Rb189 و Rb190 هیچ گونه گره در هر دو رقم لوبیا تولید نکردند (Mousavi, 2016). بین میزان نیتروژن تثبیت شده با وزن اندام‌های هوایی همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت. اما بین صفات وزن خشک گره و تعداد گره با میزان تثبیت نیتروژن همبستگی مشاهده نشد (Velazquez et al., 2005). وزن اندام‌های هوایی معیار مناسب‌تری برای میزان تثبیت نیتروژن است و جدایه‌های با بیش‌ترین وزن خشک هوایی، کارایی همزیستی بالایی دارند (Vinuesa et al., 1998; Wold-Meskel et al., 2005; Youseif et al., 2014). در مجموع، نتایج نشان داد که جدایه‌های Rb180 و Rb184 در مقایسه با سایر جدایه‌ها و تیمار شاهد، برتری داشتند و می‌توانند در شرایط مزرعه‌ای جهت افزایش عملکرد لوبیا مورد استفاده قرار گیرند (Asadi Rahmani et al., 2011). همچنین بررسی تنوع موجود در بین جمعیت‌های باکتری ریزوبیوم در شرایط مزرعه ضروری به نظر می‌رسد. تنوع ژنتیکی و عملکرد متفاوت جدایه‌های ریزوبیوم در این پژوهش، اهمیت غربالگری سویه‌های بومی را برای دستیابی به نژادهای کارآمد برجسته می‌کند. استفاده از تکنیک‌های ترکیبی (مولکولی و فیزیولوژیک) و ارزیابی عملکرد در شرایط مزرعه‌ای، گام بعدی برای تأیید کاربرد عملی این جدایه‌هاست. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد جدایه‌های ریزوبیوم جدا شده از ریشه لوبیا در مناطق زاگرس از تنوع فنوتیپی و ژنتیکی قابل توجهی برخوردارند. این تنوع با استفاده از تکنیک‌های مولکولی مانند ARDRA و ارزیابی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی شد و ارتباط معناداری با عوامل محیطی مانند خاک، ارتفاع و شرایط اقلیمی مناطق نمونه‌برداری نشان داد. نتایج این پژوهش با نتایج بسیاری از پژوهش‌های مشابه همسو است و یافته‌های آن از نظر وجود تنوع ژنتیکی و فنوتیپی در جمعیت‌های ریزوبیوم و نیز تأثیر این تنوع بر کارایی همزیستی با گیاه لوبیا مورد تأیید قرار گرفته است.

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که هم در سطح ژنوتیپ‌های لوبیا و هم در جمعیت‌های ریزوبیوم، تنوع ژنتیکی بالایی وجود دارد و این تنوع می‌تواند بر ویژگی‌های فیزیولوژیک، عملکرد گیاه و کارایی تثبیت نیتروژن اثرگذار باشد. برای مثال، پژوهشی که بر روی ۳۰ ژنوتیپ لوبیا در شرایط مختلف آبیاری انجام شد، نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی برای اکثر صفات وجود دارد و این تنوع بر عملکرد دانه و سایر صفات مورفولوژیک اثرگذار است (Youseif et al., 2014). این یافته‌ها با نتایج پژوهش حاضر که تنوع ژنتیکی و فنوتیپی جدایه‌های ریزوبیوم را در مناطق مختلف زاگرس گزارش کرده، همخوانی دارد. همچنین، پژوهش‌های پیشین تأکید کرده‌اند که تفاوت‌های مشاهده‌شده در کارایی همزیستی و تثبیت نیتروژن می‌تواند ناشی از سازگاری سویه‌های ریزوبیوم با شرایط محیطی مناطق مختلف باشد و این موضوع در پژوهش حاضر نیز به وضوح دیده شد. به طور خاص، تفاوت عملکرد جدایه‌های مناطق الشتر و بیرانشهر با سایر مناطق، مشابه گزارش‌هایی است که نشان داده‌اند سویه‌های بومی هر منطقه معمولاً کارایی بالاتری نسبت به سویه‌های غیر بومی دارند (Youseif et al., 2014). تفاوت‌های اصلی این پژوهش با مطالعات پیشین در تمرکز بر ریزاقلیم‌های محلی، ارتباط تنوع ژنتیکی با ارتفاع، و ارزیابی همزمان عملکرد در دو رقم لوبیا است. این یافته‌ها نشان می‌دهند که انتخاب سویه‌های بومی حتی در مقیاس‌های جغرافیایی کوچک‌تر نیز می‌تواند بهینه‌سازی همزیستی ریزوبیوم-لوبیا را بهبود بخشد. این پژوهش نشان

می‌دهد که انتخاب سویه‌های بومی براساس تنوع ژنتیکی و سازگاری محلی، راهکاری مؤثر برای بهبود تثبیت نیتروژن در لوبیا است. تفاوت‌های مشاهده شده در کارایی جدایه‌ها با پژوهش‌های پیشین، عمدتاً ناشی از تأثیر عوامل ریزاقلیمی و رقم گیاه میزبان است. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، بیان ژن‌های سمبیوتیک در جدایه‌های برتر بررسی شود تا مکانیسم‌های مولکولی پشت این تفاوت‌ها شفاف‌تر گردد.

سپاس‌گزاری

نگارندگان این مقاله از همکاری صمیمانه بخش تحقیقات بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب کشور و مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان که در اجرای این پروژوه نهایت همکاری را داشته اند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

REFERENCES

Avis, J. C. (2004). Molecular markers, natural history and evolution. Sinauer associates inc publishers, massachusetts, *The Sunderlands, 541,* 321- 367.

Asadi Rahmani, H., Rasanen, L. A., Afshari, M., & Lindstrom, K. (2011). Genetic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in soils of Iran. *Applied Soil Ecology, 48,* 287-293. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.04.010

Ashraf, M., Ahmad, M., & Bakush, H. M. (2006). Efficacy of *Rhizobium* strains for groundnut inoculation under rainfed conditions. *Pakistan Journal of Agriculture Science, 43,* 122-125.

Blair, M.W., Astudillo, C., Grusak, M.A., Graham, R. & Beebe, S. E. (2009). Inheritance of seed iron and zinc concentrations in common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Molecular Breeding, 23,* 197-207. https://doi.org/10.1007/s11032-008-9225-z

Ciancio, A., Pieterse, C. M. G. & Mercado-Blanco, J. (2016). Editorial: Harnessing useful rhizosphere microorganisms for pathogen and pest biocontrol. *Frontiers in Microbiology, 7,* 16-20. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01935

Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Review, 17,* 840–862. doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004

Dye, D. W. (1969). A taxonomic study of the genus *Erwinia* .II. The *carotovora* group's New Zealand *Journal of Science, 12,* 81-97.

Esmaili, M., & Maarefat, A. (2015). Identification of soil inhabiting bacteria in Qazvin province vineyards and investigation of their inhibitory effect on Rhizobium vitis, the causal agent of grape root and crown gall. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 38(1*), 79-90.

Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology, 74,* 2461-2470. doi: 10.1128/AEM.02272-07

Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 793–796.

Jiménez-Fernández, D., Navas-Cortés, J. A., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R. M., & Landa, B. B. (2011). Molecular and pathogenic characterization of *Fusarium redolens*, a new

causal agent of *Fusarium* yellows in chickpea. *Plant Disease, 95,* 860-870. https://doi.org/10.1094/PDIS-12-10-0946

Jonasson, J., Olofsson, M., & Monstein, H. J. (2002). Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rRNA fragments. *Journal of Pathology, Microbiology & Immunology, 110,* 263-272.

Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature, 178,* 703-712.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution, 35,* 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096

Liu, Y., Wu, L., Baddeley, J. A. & Watson C. A. (2011). Models of biological nitrogen fixation of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development, 31,* 155–172. doi: 10.1051/agro/2010008

Liu, H., Carvalhais, L. C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P. G., Pieterse, C. M. and Schenk, P. M. (2017). Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria.

Frontiers in Microbiology, 8, 25-52. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02552

Mabrouk, Y., & Belhadj, O. (2010). The potential use of *Rhizobium-Legum* symbiosis for enhancing plant growth and management of plant disease. *Microbes for legum improvement*. New York, *Springer Wien, 240,* 112- 129. https://doi.org/10.1007/978-3-211-99753-6_20

Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. (1982). Molecular cloning, A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York., 1659,* 1176-1186.

Messina, V. (2014). Nutritional and health benefits of dried beans. American society for nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition, 512,* 437- 442. doi:10.3945/ajcn.113.071472

Mila, A. L., Carriquiry A. L. & Yang, X. B. (2004). Logistic regression modeling of prevalence of soybean *sclerotinia* stem rot in the northcentral region of the United States. *Journal of Phytopathology, 94,* 102-110. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.1.102

Mirzaei Najafgholi, H., Hasanvand, E., Pakbaz, S., & Rouhani, N. (2023). Investigating effective factors in improving plant growth by native phosphate-dissolving bacteria isolated from wheat. *Journal of Genetic Resources, 145,* 71-82. doi:10.22080/jgr.2023.25663.1364

Moazzenpour, N., Yahyaabadi, S., & Doudi, M. (2018) Three-Rhizobia Screening On the amount of photosynthetic pigments of The Cowpea (Vigna Unguiculata) Plant Which Was Under Nickel Stress. *Journal of Modern Cellular and Molecular Biotechnology, 9 (33)*, 49-60. http://ncmbjpiau.ir/article-1-1163-fa.html

Mousavi, S. A. (2016). Revised taxonomy of the family *Rhizobiaceae*, and phylogeny of *mesorhizobia* nodulating *Glycyrrhiza* spp. Academic dissertation, department of food and environmental sciences. *University of Helsinki Finland. 231,* 34- 46. http://hdl.handle.net/10138/162736

Mishra, R. P. N., Singh, R. K., Jaiswal, H. K., Kumar, V., & Maurya, S. (2006). *Rhizobium* mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa L.*). *Current Microbiology, 52,* 383–389. doi: 10.1007/s00284-005-0296-3

Ozede Igiehon, N., & Babalola, O. O. (2018). Rhizosphere microbiome modulators: contributions of nitrogen fixing bacteria towards sustainable agriculture. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 15,* 574-599. doi: 10.3390/ijerph15040574

Ribeiro, S., Crawford, M., Singh, E., & Dennis, P. (2013). Novel Rhizobium lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Research in Microbiology, 164,* 740-748. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.05.002

Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edit. New York: *American Phytopathology Society Press, 5,* 309-315.

Sogut, T. 2006. Rhizobium inoculation improves yield and nitrogen accumulation in soybean (Glycine max L.) cultivars better than fertilizer. New *Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 34,* 115-120.

Suslow, T. V., Schorth, M. N. & Isaka, M. (1982). Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology, 72,* 917-918.

Youseif, S. H., Abd El-Megeed, F. H., Ageez, A., Cocking, E, C. & Saleh, S.A. (2014). Polygenetic multilocus sequence analysis of native rhizobia nodulating *faba bean* (*Vicia faba L.*) in Egypt. *Systematic and Applied Microbiology, 37,* 560-569.

Velazquez, A., Cocking, E, C. & Saleh, S.A. (2005). The coexistence of symbiosis and pathogenesity-determining genes in *Rhizobium rhizogenes* strains enables them to induce nodules and tumors or hairy roots in plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions, 18,* 1325-1332. doi: 10.1094/MPMI-18-1325

Vinuesa, P., Rademaker, J., De Bruijn, F, J. & Werner, D. (1998). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the canary islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rRNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rRNA sequencing. *Applied and Envirnmental Microbiology, 64,* 2096–2104.

Weir, B. S., Turner, S. J., Silvester, W. B., Park, D. C., & Young, J. M. (2004). Unexpectedly diverse *Mesorhizobium* strains and *Rhizobium leguminosarum* nodulate native legume genera of New Zealand, while introduced legume weeds are nodulated by *Bradyrhizobium* species. Applied and Environmental Microbiology, 70, 5980–5987.

Willems, A. (2006). The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and soil,* 287, 3-14. doi.org/10.1007/s11104-006-9058-7

Wolde-meskel, E., Terefework, Z., Frostegard, A., & Lindstrom, K. (2005). Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from agroforestry legume species in southern Ethiopia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 8,* 1439–1452. doi: 10.1099/ijs.0.63534-0

© 2026 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.