دانشکده کشاورزی
گروه بیوتکنولوژی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی کشاورزی- بیوتکنولوژی

عنوان:

اثرات تنوع ژنتیکی باکتریهای گره زای ریشه یونجه در استان خراسان بر اساس توالی ژن 16S rRNA.

استاد راهنما:

دکتر علی دلجو

اساتید مشاور :

دکتر غلام خداکرمیان

مهندس مجید دشتی

پژوهشگر:

حمید رفیع‌پور

پاییز ۸۹

فهرست مطالب صفحه

مقدمه ۱

۱- بررسی منابع ۵

۱-۱- پروکاریو ت‌ها ۵
۱-۱-۱- باکتری‌ها ۵
۱-۱-۲- باکتری‌های کموهتروتروف یا ارگانوتروف ۶
۱-۱-۳- باکتری‌های همزیست ۷
۱-۲- خانواده لگومینوز یا بقولات ۷
۱-۲-۱- گیاه یونجه ۸
۱-۲-۲- اهمیت یونجه ۱۰
۱-۳- باکتری‌های گره‌زای یونجه ۱۰
۱-۳-۱-تاریخچه شناسایی ریزوبیوم‌ها ۱۰
۱-۳-۲- ریزوبیوم‌ها ۱۱
۱-۴- باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاهان ۱۲
۱-۵- عنصر نیتروژن ۱۳
۱-۵-۱ عوامل موثر در تثبیت نیتروژن: ۱۳
۱-۵-۲- مروری بر نحوه تثبیت ازت توسط ریزوبیوم‌ها ۱۴
۱-۵-۳- اهمیت تثبیت بیولوژیکی نیتروژن ۱۵
۱-۶- اهمیت ریزوبیوم‌ها ۱۵
۱-۷- تنوع ژنتیکی و منشأ آن ۱۶
۱-۷-۱- ضرورت‌های شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی ریزبیوم‌ها ۱۷
۱-۸- سیستماتیک کلاسیک ریزوبیوم‌ها ۱۸
۱-۸-۱- ابزارهای جدید مولکولی: طبقه‌بندی جدید گروه ریزوبیوم‌ها ۱۹
۱-۹- خانواده RHIZOBIACEAE ۲۲
۱-۹-۱- مروری بر تعدادی از جنس‌های مهم Rhizobiaceae ۲۲
۱-۱۰- روشهای طبقه‌بندی باکتریها ۲۳
۱-۱۰-۱- شناسایی فنوتیپی ریزوبیوم‌ها ۲۳
۱-۱۰-۲- اهمیت روش‌های مولکولی طبقه‌بندی ۲۴
۱-۱۰-۳- روش‌های مولکولی طبقه‌بندی و بررسی تنوع ژنتیکی باکتری‌ها ۲۵
۱-۱۱- ریبوزوم‌ها ۲۶
۱-۱۱-۱- ژن ۱۶S rRNA ۲۷
۱-۱۱-۲- اهمیت ژن ۱۶S rRNA ۲۷

۱-۱۲- آنزیم‌های برش دهنده ۲۸
۱-۱۲-۱- چندشکلی‌های طولی قطعات حاصل از برش DNA ۲۸
۱-۱۳- توالی‌یابی ژنی ۲۹
۱-۱۴- آنالیزهای فیلوژنتیکی و تنوع ژنتیکی ۲۹
۱-۱۵- مروری بر پژوهش‌های مبتنی بر تنوع ژنتیکی ریزوبیوم‌های گیاه یونجه ۳۰
۱-۱۶- پژوهش‌های مبتنی بر ۱۶S rRNA درمورد ریزوبیوم‌ها ۳۱
۱-۱۶-۱- مطالعات مولکولی انجام شده روی ریزوبیوم‌ها در ایران ۳۳

۲- مواد و روشها ۳۸

۲-۱- نمونه‌برداری ۳۸
۲-۲- جداسازی ایزوله‌های باکتریایی ۳۹
۲-۲-۱- محیط کشت باکتری ۴۰
۲-۲-۲- استرین رفرنس ۴۰
۲-۲-۳- نگهداری ایزوله‌های باکتری ۴۰
۲-۳- تست گره‌زایی ۴۱
۲-۴- آزمون‌های شناسایی فنوتیپی ۴۱
۲-۵- استخراج DNA ژنومی ۴۲
۲-۵-۱- تعیین کمیت و کیفیت DNA ۴۳
۲-۶- بهینه‌سازی PCR برای تکثیر ۴۳
۲-۶-۱- الکتروفورز ۴۴
۲-۷- برش آنزیمی ۴۵
۲-۷-۱- ترسیم دندروگرام بر اساس الگوهای برشی ۴۵
۲-۸- توالی‌یابی محصولات PCR ۴۶
۲-۸-۱- مشاهده توالی‌ها و کروماتوگرام‌های مربوط به آنها ۴۶
۲-۸-۲- مقایسات توالی‌ها و رسم درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی ژن 16s rRNA ۴۶
۲-۹- مواد و محلول‌های مورد استفاده در مطالعات مولکولی ۴۸

۳- نتایج ۵۲

۳-۱-جداسازی ایزوله های باکتری ۵۲
۳-۲-تست گره زایی وشناسایی باکتریها ۵۲
۳-۳-تست‌های فنوتیپی ۵۲
۳-۴-استخراجDNA ۵۴

۳-۵-واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۵۵
۳-۶-نتایج برش آنزیمی ۵۵
۳-۶-۱-آنالیز نتایج PCR-RFLP ۵۷
۳-۷- توالی یابی محصولات واکنش زنجیرهای پلیمراز ۵۸
۳-۸- آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌های ۱۶Sr RNA و رسم درخت فیلوژنتیکی ۶۰
۳-۹-بحث ۷۷
۳-۹-۱ آزمایشات فنوتیپی ۷۸
۳-۹-۲- برش آنزیمی محصول PCR ۸۰
۳-۹-۳- توالی‌یابی ۸۲
نتیجه‌گیری کلی ۸۳
پیشنهادها ۸۳

جدول ۱-۱- طبقه‌بندی ابتدایی ریزوبیوم‌ها (بیوان، ۲۰۰۶)
۲۰ جدول ۱-۲- اسامی گونه‌ها و جنس‌های ریزوبیوم (بیوان، ۲۰۰۶)
۲۲
جدول ۲-۱- ترکیبات مورد نیاز جهت تهیه محیط کشت مخمر- مانیتول-آگار ۴۰
جدول ۲-۲- مواد مورداستفاده در واکنش زنجیرهای پلیمراز ۴۴
جدول ۲-۳- مشخصات لازم برای چرخه‌های PCR ۴۴
جدول ۲-۴- اجزاء تشکیل دهندهٔ واکنش های هضم ۴۵
جدول ۲-۵- نام استرین‌هایی که در ترسیم درخت فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار داده شدند. ۴۷
جدول ۳-۱- نام و محل جداسازی ایزوله‌ها ۵۲
جدول۳-۲-نتایج تست‌های فنوتیپی ۵۴
جدول۳-۳-نتایج تست‌های فنوتیپی (غلظت نمک، PH) ۵۴
جدول ۳-۴- توالی مشابه با ایزوله‌ها ۶۴

شکل۳-۱-نمونه‌ای از تست‌های فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

شکل۳-۲-باندهای حاصل از تکثیر ژن ۱۶ SR RNA ۵۵

شکل۳-۳-نتایج برش آنزیمی با آنزیم *CFO*I چاهک‌ها به ترتیب از چاهک شماره ۱ مارکر، Q، M13، M1، M3، M16، M22، M48، B، M32، D، M27، M38، M4، R، AH، J، RM1021 ..... ۵۶

شکل۳-۵-نتایج برش آنزیمی با آنزیم *MSP*I چاهک‌ها به ترتیب از چاهک شماره ۱ مارکر، M1، M27، M38، M16، Q، M3، M13، M22، M48، D، M4، R، M32، AH، J، B، RM1021 ..... ۵۷

شکل ۳-۷- دندوگرام رسم شده نتایج PCR-RFLP با نرم افزار NTSYS ۵۸

شکل۳-۸- بخشی از کروماتوگرام مربوط به توالی یابی S1 ..... ۵۹

شکل۳-۹-توالی خوانده شده S1 بوسیله پرایمر FD1 ..... ۵۹

شکل۳-۱۰-توالی خوانده شده S2 بوسیله پرایمر FD1 ..... ۶۰

شکل۳-۱۱-توالی خوانده شده S3 بوسیله پرایمر FD1 ..... ۶۰

شکل۳-۱۲-توالی خوانده شده S4 بوسیله پرایمر FD1 ..... ۶۰

شکل۳-۱۳- نتیجه بلاست توالی با *SINORHYZOBIUM MELILOTI* ۶۱

شکل۳-۱۴- همترازی توالی S1 سایت NCBI ۶۲

شکل۳-۱۵- همترازی توالی S2 در سایت NCBI ۶۲

شکل۳-۱۶- همترازی توالی S3 سایت NCBI ۶۳

شکل۳-۱۷- همترازی توالی S4 سایت NCBI ۶۳

شکل۳-۱۸-درخت فیلوژنتیک سویه S1 رسم شده در سایت NCBI ۶۵

شکل۳-۱۹-درخت فیلوژنتیک سویه S1 رسم شده در سایت BIBI ۶۶

شکل۳-۲۰-درخت فیلوژنتیک سویه S1 رسم شده با استفاده از نرم افزار MEGA ۶۷

شکل۳-۲۱-درخت فیلوژنتیک سویهS2 رسم شده در سایت NCBI ۶۸

شکل۳-۲۲-درخت فیلوژنتیک سویه S2 رسم شده در سایت BIBI ۶۹

شکل۳-۲۳-درخت فیلوژنتیک سویه S2 رسم شده با استفاده از نرم افزار MEGA ۷۰

شکل۳-۲۴-درخت فیلوژنتیک سویه S3 رسم شده در سایت NCBI ۷۱

شکل۳-۲۵-درخت فیلوژنتیک سویه S3 رسم شده در سایت BIBI ۷۲
شکل۳-۲۶-درخت فیلوژنتیک سویه S3 رسم شده با استفاده از نرم افزارMEGA..... ۷۳
شکل۳-۲۷-درخت فیلوژنتیک سویه S4 رسم شده در سایت NCBI..... ۷۴
شکل۳-۲۸-درخت فیلوژنتیک سویه S4 رسم شده در سایت BIBI ۷۵
شکل۳-۲۹-درخت فیلوژنتیک سویه S4 رسم شده با استفاده از نرم افزارMEGA..... ۷۶
شکل۳-۳۰-درخت فیلوژنتیک چند گانه رسم شده با استفاده از نرم افزارMEGA ۷۷

دانشگاه بوعلی سینا

مشخصات رساله/پایان نامه تحصیلی

عنوان:

تنوع ژنتیکی باکتریهای گره زای ریشه یونجه در استان خراسان بر اساس توالی ژن ۱۶ S rRNA

نام نویسنده: حمید رفیع‌پور

نام استاد: دکتر علی دلجو

نام اساتید مشاور: دکتر غلام خداکرمیان، مهندس مجید دشتی

دانشکده : کشاورزی	**گروه آموزشی: بیوتکنولوژی**	
رشته تحصیلی: مهندسی کشاورزی	**گرایش تحصیلی: بیوتکنولوژی**	**مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد**
تاریخ تصویب: ۱۳۸۸/۲/۲۱	**تاریخ دفاع: ۱۳۸۹/۷/۱۴**	**تعداد صفحات: ۹۳**

چکیده:

یونجه یکی از گیاهان لگوم است که میزان زیادی علوفه تولید می‌کند. اغلب گونه‌های یونجه توانایی قابل توجهی در تثبیت نیتروژن دارند و کیفیت مراتع را در علفزارهای طبیعی و کشت شده بهبود می‌بخشد. باکتریهای خوانواده ریزوبیاسه قادر به تثبیت اتمسفر در ریشه گیاهان لگومینوزی همچون یونجه هستند. اهداف این تحقیق تعیین تنوع ژنتیکی میان استرین‌های باکتری گره‌زای یونجه در نمونه‌های جدا شده از خاک استان خراسان، شناسایی و آنالیز فیلوژنتیکی و همچنین شناسایی فنوتیپی این باکتری‌ها بودند. شانزده استرین باکتری از گره ریشه یونجه ایزوله شدند. DNAی آنها استخراج شد و با پرایمرهای یونیورسال برای تکثیر ژن ۱۶S rRNA بکار رفتند. مقداری از محصول PCR برای هضم بوسیله چهار آنزیم *Cfo*، *Hae*III، *Msp*I و Hin*f*I محدود کننده بکار رفت. از قطعه‌هات بدست آمده از پرایمرهای RD1 و FD1 متعلق به چهار استرین برای توالی‌یابی ژن ۱۶SrRNA و بررسی‌های بیشتر انتخاب گردیدند. برای رسم دندوگرام، قطعات حاصل ازPCR-RFLP امتیازبندی شده و برای محاسبه تنوع با نرم‌افزار NTSYS-pc بکار رفتند. محصولات PCR با نرم‌افزار بلاست از پایگاه NCBI و BIBI مقایسه شدند. درخت فیلوژنی با روش نیبرجوینینگ با نرم‌افزار مگا ترسیم شد. نتایج حاصل تنوع بالای ژنتیکی و فنوتیپی در میان باکتریها را آشکار کرد. دندوگرام حاصل PCR-RFLP وجود چهار گروه متفاوت را میان باکتریهای بومی نشان داد. بر اساس آنالیز توالی‌یابی، استرین‌ها همولوژی بالایی با بعضی از استرین‌های گونه*Sinorhizobium meliloti* داشتند. این تحقیق اطلاعات شناسایی باکتری‌های گره‌زای یونجه را در استان خراسان فراهم می‌کند. نتایج حاضر تنوع ژنتیکی غنی ریزوبیوم‌ها را پیشنهاد می‌کند که می‌تواند در سطوح اقتصادی و اکوسیستمی با ارزش باشد.

واژه‌های کلیدی: ریزوبیوم، یونجه، تنوع ژنتیکی، ژن ۱۶S rRNA

مقدمه

مقدمه

نیتروژن به‌عنوان عنصر اصلی در بیومولکول‌هایی نظیر اسیدهای نوکلئیک، مولکلول‌های آدنوزین تری فسفات(ATP)، نیکوتین آمید دی نوکلئوتید(NAD)، پروتئین ها و در بسیاری از ترکیبات دیگر وجود دارد. اگرچه منبع مهم ذخیره نیتروژن در لیتوسفر می باشد اما بدلیل آزاد شدن بسیار کند و آهسته این عنصر از مواد مادری و همچنین غلظت پایین آن در مواد مادری، این منبع مهم نقش اساسی را در تغذیه گیاهان ایفا نمی کند. دومین منبع ذخیره نیتروژن، اتمسفر می باشد که حدود ۷٪ کل نیتروژن را شامل می شود. دومین منبع عظیم نیتروژن تقریبا در دسترس تمامی موجودات زنده وجود دارد ولی این منبع فقط برای تعداد محدودی از پروکاریوت‌ها قابل استفاده است. توانایی تثبیت بیولوژیکی نیتروژن توسط پروکاریوت‌ها مرهون وجود آنزیم بسیار پیچیده و مهمی به نام نیتروژناز می باشد(بیرانوند، ۱۳۸۲)

در حال حاضر بخشی از نیتروژنی جمعیت ۶ میلیارد نفری کره زمین از طریق کودهای شیمیایی تامین می شود که متاسفانه اثرات سوء ناشی از مصرف کودهای شیمیایی بر خاک، محیط و آبهای زیرزمینی و همچنین هزینه بسیار بالای تولید آنها مشکلات متعددی را بوجود آورده است(استاسی[1]، ۱۹۹۲). بنابراین استفاده از کودهای بیولوژیک ریزوبیومی در تولیدات کشاورزی برای افزایش عملکرد گیاهان لگلومینه بدلیل مزایای اقتصادی و سلامت محیط زیست طرفداران زیادی پیدا کرده است. آنچه که در تولید این مایه های تلقیحی ریزوبیومی اهمیت دارد معرفی کردن سویه های ریزوبیومی است که بتوانند اولا قسمت عمده‌ای از گره های ریشه ای را اشغال کنند و ثانیا تثبیت بیولوژیکی نیتروژن را با راندامان بالایی انجام دهند. اگر این هدف محقق شود افزایش تولید عملکرد گیاهان لگومینه که از مهمترین نتایج کاربرد این نوع کودهاست، قابل حصول خواهد بود (اصغر زاده، ۱۳۸۰). تقریبا بیش از ۸۰ سال از تکنولوژی تولید کودهای بیولوژیک ریزوبیومی می گذرد و پیشرفت های قابل توجهی در زمینه فرمولاسیون مایه های تلقیحی ایجاد شده است. اما به جرات می توان گفت که هنوز امکان استفاده از پتانسیل های موجود در باکتری‌های استفاده شده در مایه های تلقیحی به نحوه مطلوب فراهم نشده است. از دلایل عمده عدم موفقیت در رسیدن به این مهم را می توان به از بین رفتن باکتری های تلقیح شده تا زمان شروع هم زیستی، ناتوانی باکتری های تلقیح شده در رقابت با ریزوبیوم های بومی رقیب، عدم ماندگاری و پایداری کافی ژنوتیپ های فعال و کارامد مایع تلقیحی در بین دوره کشت لگوم و یا می توان به ترکیبی از عوامل اشاره کرد(تیس[2]، ۲۰۰۱).معمولا بالاترین جدایه های معرفی شده در سال اول ایجاد می شود و بعد از آن جمعیت تلقیحی معمولا سیر نزولی شدیدی پیدا می کند بویژه اگر خاک‌ها دارای ریزوبیوم‌های رقیب و موثر نیز باشند. راندمان پایین اشغال گیاه میزبان همزیست توسط جدایه-

1- Stacey
2- Theis

های معرفی شده در واقع نمایانگر عدم شناخت کافی محققین از مسایلی است که پیرامون این موضوع وجود دارد.تنوع زیستی، ساختار جمعیت، توزیع جغرافیایی و سازگاری‌های اکولوژیکی باکتری‌های ریزوبیومی از جمله مواردی هستند که مطالعه از اهمیت و ضرورت خاصی برخوردار است. این موضع زمانی اهمیت فوق العاده پیدا می کند که بخواهیم پاسخ باکتری‌های ریزوبیومی بومی خاک در برابر مایه های تلقیحی معرفی شده به خاک را دریابیم. برای این منظور شناخت تنوع ژنتیکی و همچنین کارایی تثبیت بیولوژیکی نیتروژن باکتری‌های ریزوبیومی بومی خاک از اهمیت ویژه ایی برخوردار است. متاسفانه تاکنون مطالعات بسیار کمی در این زمینه در ایران انجام شده است(خاوازی، ۱۳۸۲). امروزه با فراهم شدن امکانات مطالعه تنوع ژنتیکی باکتری‌ها با بکار گیری تکنیک های ژنتیک مولکولی می توان تاثیر عوامل محیطی را بر تنوع باکتری‌های ریزوبیومی بومی خاک‌ها مطالعه کرد و پیامدهای ناشی از عملیات زراعی و استراتژی‌های مدیریتی خاص را روی شاخص‌های تنوع بررسی کرد(برومفیلد[1]وهمکاران، ۱۹۹۸). استفاده از مارکرهای مولکولی موجود در ریبونوکلئیک اسیدهای ریبوزومی، مطالعات دقیق فیلوژنی این باکتریها را مقدور ساخته است(لودویگ[2] و همکاران، ۲۰۰۴). دلیل این انتخاب را در محتوای اطلاعاتی بالا، طبیعت حفاظت شده و انتشار جهانی آنها می توان یافت(لان[3] و همکاران، ۱۹۸۵). در سال‌های اخیر شناسایی باکتری‌ها بر اساس متدهای مولکولی، بویژه توالی یابی ژنهای ۱۶S rRNA، ابزار بسیار مهمی برای مطالعه و شناسایی جمعیت های باکتری بوده است. مقایسه توالی نوکلئوتیدی زیر واحد کوچک ریبوزومی می تواند برای طبقه بندی ایزوله ها در سطح گونه و بالاتر بکار رود(سایلیا[4]، ۱۹۹۶؛ هوییز[5]، ۱۹۸۷).

از آنجایی که یونجه یکی از مهمترین گیاهان زراعی علوفه ای در ایران است و نقش عمده ایی در تغذیه دام و تولید پروتئین دارد و بر طبق آمارهای زراعی سال ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۱ وزارت جهاد کشاورزی بالغ بر ۵۳۷۲۸۷ هکتار از اراضی در ایران به این گیاه زراعی اختصاص داده شده است.

در این تحقیق تنوع ژنتیکی باکتریهای همزیست یونجه(سینوریزوبیوم) در استان خراسان بزرگ با مقایسه توالی ژنهای ۱۶S rRNA مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است تا با شناخت این ویژگی بسیار مهم جمعیتی بتوانیم مبنای تحقیقات بهتری را برای مطالعات بعدی در این زمینه فراهم سازیم.

1- Bromfield
2- Lane
3 - Ludwig
4 - Cilia
5 - Woese

فصل اول:

بررسی منابع

۱- بررسی منابع

۱-۱- پروکاریو ت‌ها

پروکاریوت در زبان یونانی به معنای "پیش از هسته" است ودر زیست‌شناسی به سازواره‌هایی اطلاق می گردد که هسته و اندامک‌های غشاءدار ندارند.

پروکاریوت‌ها میوز و پروتئین هسته‌ای (هیستون)و حرکت آمیبی ندارند. همه تک سلولی هستندولی در موارد خاصی مانند *Myxobacteria* در مراحلی از چرخه سلولی خود به صورت چند سلولی ظاهر می‌شوند. اندازه آنها از ۰/۲تا ۷۵۰ میکرومتر متغیر است اما اغلب بین ۱ تا ۱۰ میکرو متر می باشند. پروکاریوت‌ها یک کروموزوم دارندو تولید مثل آنها از طرق غیر جنسی ومعمولا به‌وسیله تقسیم دو تایی و جوانه زدن صورت می پذیرد (کمبل[1]، ۲۰۰۳).

پروکاریوت‌ها ۲ تا ۳ بیلیون سال قبل از یوکاریوت‌ها در کره خاکی به‌وجود آمده‌اند وبه دو دستهٔ‌آرکی باکترها و باکتریها تقسیم می‌شوند که از لحاظ ساختار شبیه به هم هستند؛ اما *rRNA*متفاوتی دارند (انجمن میکروبیولوژی آمریکا، ۱۹۹۴).

۱-۱-۱- باکتری‌ها

باکتری‌ها ارگانیسمهای تک‌سلولی هستند که اکثرا به صورت آزاد زندگی می‌کنند و دارای اطلاعات ژنتیکی و تولید انرژی و سیستمهای بیوسنتتیک لازم برای رشد و تولید مثل خود می‌باشند. باکتری‌ها متنوع‌ترین میکروارگانیسم‌ها هستند که شامل گروه‌های زیادی می‌باشند و تعداد کمی در انسان جانوران و سایر موجودات بیماریزا بوده و بطور کلی بدون فعالیت آنها حیات بر روی زمین مختل می‌گردد. باکتری‌ها (به غیر از میکوپلاسماها) دارای دیواره سلولی هستند(فردریکسون[2] و همکاران، ۲۰۰۴).

تخمین های انجام شده تنها ۱ تا۱۰ درصد گونه های باکتریایی را شناسایی‌شده و بقیه را ناشناخته و یا مطالعه‌نشده می‌دانند (کندی[3]،۱۹۹۹).

1- Campbell
2- Fredrickson
1- kennedy

باکتری‌ها با وجود اندازه‌های بسیار کوچکی که دارند، به‌میزان [۴] ۱۰ سلول در هر گرم از خاک یافت شده‌اند (زاک[۱] و همکاران، ۱۹۹۴). جمعیت‌های باکتریایی بسیار متنوعند و به نظر می‌رسد بیشترین تنوع را در مقایسه با سایر موجودات داشته باشند. تنوع باکتری‌ها اطلاعاتی درباره فرایند هستی و تکامل فراهم می‌کند. با کمک داده‌های توالیrRNA[۲] یا DNA می‌توان به رابطه تکاملی بین موجودات پی‌برد. باکتری‌ها به مسئله تعرض انسان به محیط زیست مانند مسائلی که در کشاورزی، آلودگی‌های زیستی و سایر استرس‌ها ایجاد می‌شود، حساسیت نشان می‌دهند (کندی،۱۹۹۹). اکثر باکتری‌ها دارای DNA حلقوی اند که اندازه آنها از ۱۶۰۰۰۰ جفت باز در باکتری‌های همزیست مانند ریزوبیوم ها تا ۱۲۲۰۰۰۰۰ در باکتر ی‌های خاکزی مانند سورانژیوم متفاوت است(ناکاباچی[۳] و همکاران، ۲۰۰۶). از آنجائیکه اندازه معمولی ژنوم در پروکاریوت‌ها بسیار بزرگتر از اندازه سلول باکتری است، ژنوم پروکاریوت‌ها به میزان زیادی پیچ خورده و بصورت فراپیچیده[۴] درآمده است. (امتیازی و کریمی، ۱۳۸۰).

باکتری‌ها هاپلویید هستند یعنی از هرکروموزوم یک کپی دارند و بنابراین وقوع هر نوع جهشی حالت غالب دارد و بلا فاصله در فنوتیپ نمایان می گردد. باکتری‌ها علاوه بر کروموزوم حلقوی ممکن است دارای قطعات خارج کروموزومی به نام پلاسمید و همچنین ترانسپوزون ها که اغلب بین پلاسمید و کروموزوم در حرکت هستند، باشند (ارجمند و همکاران، ۱۳۸۸).

۱-۱-۲- باکتری‌های کموهتروتروف یا ارگانوتروف

باکتری‌ها بر اساس اینکه انرژی و کربن موردنیاز خود را از چه منبعی بدست می‌آورند به گروه‌های زیر تقسیم می‌شوند: باکتری‌های فتوتروف که از نور استفاده می‌کنند. باکتری‌های کموتروف یا شیمی‌پرور که انرژی یاخته‌ای خود را از راه واکنش‌های بیوشیمیایی بدست می-آورند. هریک از گروه‌های بالا نیز به دو گروه تقسیم می‌شوند: باکتری‌های اتوتروف یا لیتوتروف که از دی‌اکسید کربن بعنوان منبع کربن بهره می‌گیرند و باکتری‌های هتروتروف یا ارگانوتروف که از مواد آلی استفاده می‌کنند. از میان کموتروف‌ها باکتری‌هایی که انرژی را از اکسیداسیون عناصر کانی بدست می‌آورند کمولیتوتروف‌ها و آنهایی که انرژی را از راه اکسیداسیون کربن آلی بدست می‌آورند کموارگانوتروف نامیده شده‌اند (صفری سنجانی، ۱۳۸۲).

1 - Zak
3- Ribosomal RNA
3- Nakabachi
5- Supercoil

هتروتروف‌های حقیقی انرژی و کربن ساختمانی را از مواد آلی می‌گیرند. این باکتری‌ها زندگی ساپروفیتی آزاد یا انگلی دارند. گروهی از آنها بیماریزای گیاهی یا جانوری هستند. آن‌ها در زندگی ساپروفیتی مواد آلی ساده را جذب می‌کنند. از این باکتری‌ها یکی از گروه‌هایی که در خاک کارایی ویژه‌ای دارد گروه چهارم در تقسیم‌بندی برگی است. باکتری‌های این گروه گرم‌منفی، میله‌ای یا کوکسی، هوازی تا کم‌هوازی هستند که گوناگونی ریخت‌شناسی و فیزیولوژیک بسیاری دارند. آن‌ها برای بدست آوردن انرژی در اکسیداسیون مواد از اکسیژن بهره می‌گیرند. بیشتر آنها در هوای آزاد با ۲۱ درصد اکسیژن رشد می‌کنند، ولی کم‌هوازی‌ها نمی توانند بخوبی در چنین شرایطی رشد کنند. جنس ریزوبیوم در این گروه قرار دارد (صفری سنجانی، ۱۳۸۲).

۱-۱-۳- باکتری‌های همزیست

میکروبیولوژیست‌ها واژه سیمبیوزیس[1] را در مواقعی که دو جاندار یک واحد همزیستی می-سازند، بکار می‌برند. در این اندام دو جاندار چنان بهم می‌آمیزند که بیشتر به ریخت یک جاندار دیده می‌شوند. این واحد همزیست برتری‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک بسیاری دارد. پیدایش همزیستی بردباری جانداران را در برابر دشواری‌های اکولوژیک بالا می‌برد. اکولوژیست‌ها از واژه موچوالیستیک سیمبیوزیس در موارد همزیستی دوطرفه استفاده می‌کنند که در آن هر دو جاندار از با هم بودن بهره‌مند می‌شوند. از جمله بهترین همزیستی‌هایی که در جهان شناسایی شده است، همزیستی گیاهان و ریزوبیوم‌ها در لگوم‌هاست (صفری سنجانی، ۱۳۸۲).

۱-۲- خانواده لگومینوز یا بقولات

گیاهان خانواده لگومینوز (*Legominosae*) یکی از منابع مهم پروتئین و تولید انرژی برای انسان می باشند . حبوبات بعد از گندم و برنج مهمترین محصولات کشاورزی هستند که به مصرف تغذیه مردم جهان بخصوص مردم کشورهای در حال توسعه می رسند.حبوبات با داشتن ۴۰-۱۷ درصد پروتئین ، نقش مهمی در تامین مواد پروتئینی و تولید کالری مورد نیاز انسان دارند. مقدار پروتئین موجود در بذر حبوبات ۲ تا ۳ برابر بیشتر از پروتئین موجود در دانه غلات ، و ۱۰ تا ۲۰ برابر بیشتر از پروتئین موجود در گیاهان غده‌ای و نشاسته‌ای است(رستگار، ۱۳۸۴)

فاباسه[2] یا لگومینوز سومین خانواده بزرگ گیاهان گلدار است که دارای حدوداً ۶۵۰ جنس و بیش از ۱۸۰۰۰ گونه می‌باشند. اعضای این خانواده گسترش جهانی دارند، به‌طوری‌که از درختان مناطق گرمسیری تا علوفه‌های یکساله کوچک، در جمعیت‌های گوناگون گیاهی غالبیت دارند. بسیاری از لگوم‌های علوفه‌ای برای اصلاح زمین و مقاصد کشاورزی در زمین‌های نامرغوب انتخاب خوبی هستند؛ زیرا سازگاری قابل‌قبولی به شرایط سرما، خشکی، شوری و

1- Symbiosis
2 - Fabaceace

خاک‌های غیرحاصلخیز دارند (سافرونووا و همکاران، ۲۰۰۳). در گیاهان این تیره تخمدان از یک برچه تشکیل شده است که میوه را تشکیل می‌دهد و با دو شکاف باز می‌شود. این نوع میوه را نیام یا لگوم می‌نامند که از مشخصات مهم این گیاهان است. سایر اختصاصاتی که مشاهده می‌شوند، ثابت نیستند و بر حسب جنس و گونه گیاه تغییر می‌کنند. برای سهولت مطالعه و به-علت اختلافاتی از جمله طرز گل دادن این خانواده به سه زیرتیره گل ارغوان، گل ابریشم و پروانه آسا[1] تقسیم می‌شود (خوش گفتار، ۱۳۸۱). این گیاهان در سیستم‌های کشاورزی برای تهیه کودزیستی، چرا و علوفه خشک، هیزم و موارد دیگر نیز استفاده می‌شوند. در ریشه اغلب این گیاهان گره‌هایی وجود دارد که موجب تثبیت ازت هوا در خاک می‌شود و در نتیجه برای افزایش ازت و تقویت حاصلخیزی خاک کشت می‌گردند (کولاکارنی[2] و نایوتییال[3]، ۱۹۹۹). گیاهان لگومینوز اغلب به عنوان غذای دام اهمیت زیادی دارند. یونجه و شبدر در مناطق بسیاری کشت می‌شوند و نه تنها مقادیر بالای پروتئین، بلکه مواد متنوع بیولوژیکی مانند ویتامین‌ها، املاح و... را دارا می‌باشند (هرناندز[4]، ۲۰۰۵).

۱-۲-۱- گیاه یونجه

زیرتیره پروانه‌آسا شامل ۳۵۰ جنس و ده هزار گونه است که حائز اهمیت کشاورزی بوده، بیشتر در نواحی معتدل و سرد می‌رویند. گیاهان این تیره از روی خصوصیات برگ به سه طایفه پیچکداران، شانه برگیان و سه‌برگچه‌ای‌ها تقسیم می‌شوند که در طایفه سه‌برگچه‌ای‌ها برگ‌ها از سه برگچه تشکیل می‌شوند و مهمترین گونه‌های آن عبارتند از: یونجه، شبدر و شنبلیله (خوش‌گفتار، ۱۳۸۰).

یونجه معمولی *medicago sativa* مهمترین گیاه علوفه ای جهان و اولین گیاه علوفه ای اهلی شده است. مبدا اصلی آنرا را ایران می دانند که نام Herba media به معنی ماد بدین لحاظ به این گیاه اطلاق می شودکه در زمان حمله خشایارشاه از ایران به یونان برده شد و از آنجا به سایر نقاط جهان راه یافت. یونجه گیاهی روز بلند دارای انواع گونه های چندساله و یکساله می باشد. ریشه ها قوی و عمودی و طویل دارای انشعابات جانبی زیاد است و در شرایط مناسب گاهی تا عمق ۷متر به طورعمودی در خاک نفوذ می کند غده های باکتری روی ریشه های ظریف به وجود می آید. ساقه مربعی ،سبز و پوشیده از کرک است برگ‌ها به صورت سه برگچه ای و متناوب قرارگرفته که برگچه ها سبز تیره ، تخم مرغی شکل و برگچه وسطی دارای دمبرگ کوتاه وبرگچه های کناری فاقد دمبرگ ، دارای دوگوشوارک در زاویه بین دمبرگ و ساقه می باشد، اندازه سطح برگ یونجه متغیر بوده و به شرایط اکولوژیکی ، مرحله فنولوژیکی ، زمان برداشت، تعدادچین های قبلی ، رقم و سن گیاه بستگی دارد. آرایش گل خوشه ای

2- Papilionacees
3- Kulkarn
4- Nautiyal
5- Hernandez

است ،کاسه گل شامل ۵کاسبرگ متصل و جام گل نیز شامل ۵ قطعه است،رنگ گلها ارغوانی یا بنفش با رگه های تیره است ارقام گل سفید و زرد نیز دارد (شکل ۱-۱). پرچم ها ۱۰عدد هستند که ۹ تا به هم متصل شده و مادگی را احاطه می کند. میوه به صورت غلافی است که چند پیچ دارد ، نیام دارای چندین بذر است بذرها دارای سطح نسبتا صاف و کم وبیش قلوه ای شکل و معمولا زرد و یا مایل به قهوه‌ای است. یونجه دارای اکوتیپ‌های همدانی، رنجر، کدی، سیمرجنسک، یزدی، بمی، بغدادی، نیک شهری، مائوپا و یونجه درختی می باشد(رستگار، ۱۳۸۴).

از نظر گیاهشناسی یونجه را می‌توان به ترتیب زیر رده‌بندی کرد (خوش‌گفتار، ۱۳۸۰):

شاخه پیدازادان (*Phanerogames*)
زیر شاخه نهاندانگان (*Angiospermes*)
رده دولپه‌ای‌ها (*Dicotyledons*)
زیررده جداگلبرگ (*Dialypetales*)
راسته رسال (*Rosales*)
تیره بقولات (*Legominosae*)
زیرتیره پروانه‌آسا (*Papilionaceae*)
طایفه سه برگچه‌ای‌ها (*Trifoliales*)
جنس یونجه (*medicago*)
گونه یونجه معمولی(*medicago sativa*)

۱-۲-۲- اهمیت یونجه

یونجه به عنوان یک منبع سرشار پروتئین، ویتامین ها ومواد معدنی، مهمترین گونه علوفه دام در ایران است. این گیاه به علت کیفیت مطلوب ، خوش‌خوراکی ، پروتئین بالا و مواد معدنی مختلف از قبیل کلسیم و انواع ویتامین های مختلف به خصوصA و C از اهمیت خاصی برخوردار است. یونجه با تثبیت ازت خاک بر حاصلخیزی خاک می افزاید و عمری بین ۴ تا ۲۰ سال دارد که معمولا عمر مفید آن ۷ سال است. یونجه در میان اهالی مناطق مختلف، مصارف دارویی متعددی نیز دارد از نظر طب قدیم ایران گرم است، البته تازه آن گرم و تر و خشک شده آن گرم و خشک است. یونجه دو برابر اسفناج آهن دارد بنابراین خونساز است و برای کسانیکه به کم خونی مبتلا هستند مفید بوده، همچنین یونجه از نظر اینکه دارای بسیاری از مواد معدنی می‌باشد شیره آن برای بچه‌هایی که در حال رشد هستند و استخوان بندی محکمی ندارند بسیار مفید است. یونجه را در داروخانه ها و فروشگاه‌های گیاهان دارویی و یا برخی از داروخانه ها بصورت پودر ، کپسول و قرص بفروش می رسانند(رستگار، ۱۳۸۴) .

۱-۳- باکتری‌های گره‌زای یونجه

معمول‌ترین باکتری همزیست گیاه یونجه گونه *Sinorhizobium meliloti* بوده که بیشترین پتانسیل تثبیت نیتروژن را دارا است. نژادهای مختلف باکتری‌های سریع الرشد *Sinorhizobium meliloti* قادرندگونه‌های مختلف یونجه، شنبلیله و شبدر شیرین را تلقیح نموده و در تشکیل گره‌های تثبیت کننده ازت مؤثر باشند(زاخایا[1] ، ۲۰۰۱).

باکتری‌ها میله ای، گرم منفی، بدون اسپور، متحرک بوسیله یک تاژک قطبی و ۲ تا ۶ تاژک محیطی و هوازی هستند. دمای مطلوب رشد آنها ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد وpH مناسب ۶-۷ می باشد. باکتری از نوع سریع الرشد بوده وکلنی ها بر روی محیط کشت اختصاصی(Yeast Extract Manitol Agar) مدور، محدب، سفید، شفاف، بر آمده، لعابدار، به رنگ سفید مایل به خاکستری و یا کرم رنگ بوده و قطر آنها بعد از ۳ الی ۵ روز و در دمای مناسب ۲-۴ میلی متر خواهد بود(دشتی، ۱۳۸۰)

۱-۳-۱-تاریخچه شناسایی ریزوبیوم‌ها

با توجه به عدم وجود فسیل باکتریایی، تاریخ گذاری اختصاصی برای همزیستی مشکل است اما بر مبنای شواهد تکاملی در ژن‌ها می توان در مورد چگونگی پیدایش وتکامل آنها قضاوت نمود. مطالعات انجام شده در این زمینه حاکی از آن است که ریزوبیوم‌هایی با رشد سریع مانند (*Rhyzobium sp.* و*Sinorhyzobium sp.*) حدود ۲۰۰تا ۳۰۰میلیون سال قبل از هم تفکیک شدند، در حالی که انشقاق بین ریزوبیوم‌های سریع الرشد و برادی ریزوبیوم‌های

1- Zakhia

کند رشد حدود ۵۰۰ میلیون سال قبل رخ داده است. این زمان‌ها قبل از جدا شدن دو لپه ای-ها و تک لپه ای‌ها (۱۷۱-۱۵۶میلیون سال قبل) ونیز جدا شدن براسیکا ها و لگوم‌ها (۱۲۵-۱۳۶ میلیون سال قبل) بود. بنابراین ریزوبیوم‌ها قبل از ظهور نهاندانگان انشقاق یافتند(هیرش[1] و همکاران، ۲۰۰۱).

اولین بار در سال ۱۸۸۸ هلریگل[2] و ویلفارت[3] به وجود باکتری‌ها در ریشه لگوم‌ها و نقش آنها در تثبیت ازت اشاره کردند. متعاقب آن بیجرنیک[4] در سال ۱۸۹۰ اولین فردی بود که باکتری را از گره های ریشه جدا کرد، اما نامگذاری آن به *Bacillus radicola* و تاکسونومی این همزیستها در حدود ۳۰ سال مورد مشاجره بود(صفری سنجانی، ۱۳۸۲). از آن زمان طبقه بندی باکتری‌ها ی خانواده ریزوبیوم بر اساس اطلاعات علمی روز تغییرات زیادی پیدا کرده است.

مبنای همزیستی بین ریزوبیوم‌ها با ریشه گیاهان لگوم، تبادلات بیوشیمیایی بین گیاه وباکتری است. گونه‌های باکتریایی گوناگون که متعلق به *proteobacteria* -α و راسته *Rhizobiales*هستند، می توانند در همزیستی با گیاهان خانواده لگوم به کار گرفته شوند. این باکتری‌ها بر اساس این رفتار همزیستی، مجموعا *Rhizobia* نامیده می شوند و ظرفیت منحصر به فردی برای تحریک تشکیل گره های ریشه در گیاه میزبان با تولید مولکول‌های علامتی مخصوص که فاکتورهای گره‌ای نامیده می شوند، دارند(اسپاینک[5] و همکاران، ۱۹۹۸).

تاکنون پروکاریوت‌های زیادی شناسایی شده‌اند که می‌توانند از ازت مولکولی استفاده کنند. همه آنها در سلسله *Prokaryotes* جای دارند و چون می‌توانند از ازت مولکولی زیستگاه خود بهره‌گیری کنند، به آنها دی‌آزوتروف می‌گویند. باکتری‌های ریزوبیوم جزء گروه ارگانوتروف‌های آزادزی و هوازی هستند (صفری سنجانی، ۱۳۸۲).

۱-۳-۲- ریزوبیوم‌ها

ریزوبیوم‌ها به طور کلاسیک به عنوان باکتری‌های همزیست که قادر به تهاجم به بافت‌های گره‌ای شکل ریشه و ساقه گیاهان لگومینوز هستند، یعنی جایی که تثبیت نیتروژن را انجام می‌دهند، تعریف شده‌اند (سگال و جوهری، ۲۰۰۳). باکتری‌های ریزوبیوم در راسته

1- Hirsch
2-Hellriegel
3-Wilfarth
4-beijerinck
5-Spaink

پروتئوباکتر[۱]ها و در رده آلفاپروتئوباکتر[۲]ها قرار دارند که دارای شش خانواده در راسته ریزوبیوم‌ها هستند. سلسله مراتب زیر این تقسیم‌بندی‌ها را نشان می‌دهد (گاریتی[۳]، ۲۰۰۴).

Rhizobiales
Rhizobiaceae
Rhizobium
Sinorhizobium
Brucellaceae
Ochrobactrum
Phyllobacteriaceae
Phyllobacterium
Mesorhizobium
Bradyrhizobiaceae
Bradyrhizobium
Hyphomicrobiaceae
Azorhizobium
Devosia
Methylobacteriaceae
Methylobacterium
Burkholderiales
Burkholderiaceae
Burkholderia
Cupriavidus
Oxalobacteraceae
Herbaspirillum

سه گونه از ریزوبیوم‌ها در دو خانواده از بتاپروتئوباکتری[۴]ها و همگی در راسته *Burkholderials* قرار دارند. با وجود اینکه هنوز تایید نگردیده، اما غده‌زایی تعدادی از گاماپروتئوباکتر[۵]ها بر ریشه لگوم‌ها بعید بنظر نمی‌رسد (بنهیزیا[۶]، ۲۰۰۴).

۱-۴- باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاهان

بعضی از ریز جانداران موجود در ریزوسفر با مکانیزم های مختلفی باعث تغییرات فیزیولوژِیک و مورفولوژیک در گیاه شده که مجموعه این تغییرات روی رشد, تغذیه و سلامت آن اثر مثبت می گذارد. به طور کلی این دسته از ریز جانداران تحت عنوان کلی باکتری های محرک رشد گیاه نامیده می‌شوند. این اصطلاح ابتدا برای باکتری‌های گروه سودوموناس فلورسنت وضع گردید. امروزه اصطلاح PGPR در معنای وسیعتری به کار رفته و برای برخی دیگر از باکتری‌های فعال ریزوسفری که تأثیر مشخصی در افزایش رشد گیاه نشان داده اند؛ مانند آزوسپیریلیوم ازتو باکتر, باکتری پتاسیومی , فسفو باکتری‌ها و ...نیز به کار می رود.

2-Proteobacteria
3- Alphaproteobacteria
4-Garrity
1- Betaproteobacteria
2- Gammaproteobacteria
3- Benhizia