بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

بررسی تنوع ژنتیکی ریزوبیوم‌های همزیست با شبدر درایران

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

بنفشه جلال‌زاده مقدم شهری

اساتید راهنما

دکتر مسعود بهار

دکتر خورشید رزمجو

۱۳۸٤

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی خانم بنفشه جلال‌زاده مقدم شهری

تحت عنوان

بررسی تنوع ژنتیکی ریزوبیوم‌های بومی همزیست با شبدر درایران

در تاریخ ۱۳۸٤/۱۲/۱۷ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر مسعود بهار
۲- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر خورشید رزمجو
۳- استاد مشاور	مهندس محمد حسین اهتمام
٤- استاد داور	دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی
٥- استاد داور	دکتر فرشید نوربخش
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر بهرام شریف نبی

تشکر و قدر دانی

سپاس و ستایش خداوندی را که از ازل تا ابد قابل اطمینان‌ترین راهنما و بی‌منت‌ترین راهگشاست.

به انجام رسانیدن موفقیت‌آمیز این تحقیق قطعاً بدون راهنمایی، حمایت و تشویق بسیاری از عزیزان مقدور نبود. قطعاً نقش برخی از آنان آنچنان تأثیر گذار بوده‌است که مایلم یک به یک از آنها نام برده و مراتب تشکر و سپاس خود را ابراز نمایم.

از استاد بزرگوار جناب آقای دکتر مسعود بهار به خاطر رهنمودهای ارزنده شان در طی مراحل مختلف انجام و تدوین این پایان‌نامه بسیار ممنون و سپاسگذارم. همچنین از استاد ارجمند جناب آقای دکتر خورشید رزمجو که راهنمایی‌های اینجانب را بر عهده گرفتند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از جناب آقای مهندس محمدحسین اهتمام که مشاورت این پایان‌نامه را تقبل نمودند و همچنین آقایان دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی و دکتر فرشید نوربخش که با ارائه نظرات ارزشمند خود در تصحیح این پایان‌نامه مرا یاری نمودند نهایت سپاسگذاری را دارم.

یاد و خاطره محبت و همراهی همکلاسی‌های عزیزم، خانم سمیرا اکبر و آقایان مسعود احمدی، امیر رحیمی، مجید فرهودی، علی موسوی و دوست بسیار خوبم خانم مرضیه صباغ را گرامی و برای تمامی آنها از درگاه ایزد یکتا سلامتی و شادکامی آرزومندم.

بنفشه جلال‌زاده

فروردین ۱۳۸۵

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوریهای ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب ..... هشت
فهرست جدول‌ها ..... یازده
فهرست شکل‌ها ..... دوازده
چکیده فارسی ۱

فصل اول: مقدمه و بررسی منابع

۱- ۱- مقدمه ۲
۱-۲- تثبیت بیولوژیکی نیتروژن ۵
۱-۳- میکروارگانیسم‌های تثبیت کننده نیتروژن ۵
۱-۳-۱ - میکروارگانیسم‌های آزادزی تثبیت کننده نیتروژن ۵
۱-۳-۲- میکروارگانیسم‌های همزیست تثبیت کننده نیتروژن ٦
۱-۴ -گیاهان تیره نخود و اهمیت آنها ۶
۱-۵- همزیستی ۸
۱-۶- ارتباط همزیستی ریزوبیوم با گیاهان تیره نخود ۹
۱-۷- ویژگی‌های ریزوبیوم ۹
۱-۷-۱-مورفولوژی و خصوصیات رشد ۹
۱-۷-۲- رده بندی ۱۰
۱-۷-۳- فیلوژنی ۱۱
۱-۷-۴- ژنتیک ریزوبیوم‌ها ۱۲
۱-۷-۵ - نژادهای مؤثر و غیرمؤثر ۱۳
۱-۸- مراحل ایجاد گره ۱۴
۱-۸-۱ ژن‌های مسؤول گره‌سازی در باکتری ۱۵
۱-۸-۲- فلاونوئیدهای گیاهی ۱٦
۱-۸-۳ - فاکتورهای nod ۱۷
۱-۸-۴ – ژن‌های مسؤول گره‌زایی در گیاه ۱۸
۱-۹- ساختار گره ۱۹
۱-۱۰- عملکرد گره ۱۹
۱-۱۱ -بیوشیمی تثبیت ازت ۲۰
۱- ۱۲- رقابت برای گره‌زایی در ریزوبیوم‌ها ۲۱
۱-۱۳- ضرورت تعیین تنوع ۲۲
۱-۱۴ – روش‌های مختلف در بررسی تنوع میان جمعیت‌های ریزوبیوم ۲۳
۱-۱۴-۱- روش‌های فنوتیپی ۲۳
۱-۱۴-۲- روش‌های ژنوتیپی ۲٤
۱-۱۵- تکنیک RAPD ۲۵
۱-۱۶- تکنیک AFLP ۲۶
۱-۱۷- تکنیک RFLP ۲۷

۱-۱۸- تکنیک PCR-RFLP ۲۷
۱-۱۹- تکنیک rep-PCR ۲۹
۱-۲۰- تکنیک انگشت نگاری Targted PCR (TPF) ۳۴
۱-۲۰-۱- بررسی توالی ژن *nifH* ۳۵
۱-۲۰-۲- بررسی توالی ژن *recA* ۳۶

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲- ۱- نمونه‌برداری ۳۸
۲- ۲- کشت گلخانه‌ای ۳۹
۲- ۳- جداسازی ریزوبیوم‌ها از گره‌های ریشه ۴۰
۲- ۴- کشت مجدد باکتری‌های فریز شده ۴۲
۲- ۵- عملیات استخراج DNA ۴۲
۲- ۵- ۱- استخراج DNA به روش کولن و همکاران ٤٢
۲- ۵- ۲- استخراج DNA به روش SDS (روش مرکاپتواتانل) ٤٣
۲- ۵- ۳- روش جوشاندن ٤٤
۲- ۶- اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA ۴۴
۲- ۶- ۱- روش اسپکتروفتومتری ٤٤
۲- ۶- ۲- روش الکتروفورز ژل آگارز ٤٥
۲- ۷- انجام واکنش‌های PCR ۴۵
۲- ۸- مواد مورد نیاز برای انجام واکنش‌های PCR ۴۶
۲- ۸- ۱- آغازگرها ٤٦
۲- ۸- ۲- مخلوط نوکلئوتیدی ٤٦
۲- ۸- ۳- محلول پایه کلرید منیزیم ٤٦
۲- ۸- ۴- آنزیم *Taq* DNA polymerase ٤٦
۲- ۹- تنظیم شرایط واکنش PCR ۴۶
۲- ۱۰- تنظیم شرایط PCR در تکنیک BOX-PCR ۴۷
۲-۱۱- الکتروفورز بر روی ژل TBE آگارز ۴۸
۲-۱۲- الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریلامید توالی یاب ۴۹
۲-۱۲-۱- آماده کردن شیشه‌ها ٤٩
۲- ۱۲- ۲- تهیه ژل پلی‌اکریل آمید۶٪ ٤٩
۲- ۱۲- ۳- الکتروفورز مقدماتی ٤٩
۲- ۱۲- ۴- واسرشت‌سازی نمونه‌ها ۵۰
۲- ۱۲- ۵- الکتروفورز محصولات واسرشت شده ۵۰
۲- ۱۲- ۶- رنگ‌آمیزی ژل ۵۰
۱- مرحله تثبیت ۵۰
۲- مرحله رنگ‌آمیزی ۵۰
۳- مرحله ظهور باندها ۵۰
۴- مرحله توقف ۵۰

۵- مرحله شستشو ۵۱
۲- ۱۳- PCR-RFLP ژن *recA* ۵۱
۲- ۱۳- ۱- تهیه ژل اکریل‌آمید ۸٪ ۵۳
۲- ۱۳- ۲- تهیه نمونه‌ها جهت بارگذاری ۵۳
۲- ۱۳- ۳- رنگ‌آمیزی ژل ۵۳
۲- ۱۴- آزمون‌های مقایسه قدرت رقابت و پایداری ۵۳
۲- ۱۴- ۱- آزمون تولید ملانین ۵٤
۲- ۱۴- ۲- آزمون حساسیت به شوری ۵٤
۲-۱۵- ردیابی ژن‌های *moc* در جدایه‌های ریزوبیومی شبدر ۵۵

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- مقایسه رشد گونه‌های مختلف شبدر و نحوه گره‌سازی ۵۸
۳-۲- خالص سازی باکتری‌های ریزوبیوم بر روی محیط کشت ۶۱
۳-۳- استخراج DNA ۶۲
۳- ۳- ۱- روش کولن و همکاران ٦۲
۳- ۳- ۲- روش مرکاپتواتانل ٦۲
۳- ۳- ۳- روش جوشاندن ٦۲
۳-۴- بهینه سازی شرایط تکثیر با استفاده از آغازگر BOXAIR ۶۴
۳-۵- بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از آغازگر BOXAIR ۶۵
۳-۶- مقایسه کلی جدایه‌های همزیست با گونه‌های مختلف شبدر در خاک مناطق جغرافیایی متفاوت ۷۰
۳-۷- تجزیه داده‌ها ۷۵
۳-۸- استفاده از PCR-RFLP بر روی ژن *recA* ۸۱
۳-۹- آزمون تولید ملانین و حساسیت به شوری ۸۴
۳- ۱۰- ردیابی ژن‌های *moc* در جدایه‌های ریزوبیومی شبدر ۸۵

فصل چهارم: نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادها

۴-۱- نتیجه‌گیری ۸۸
۴-۲- پیشنهادها ۹۰

پیوست ۹۲
منابع ۹۶
چکیده انگلیسی ۱۰۸

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲- ۱- اطلاعات مربوط به مناطق جمع آوری نمونه خاک ۳۹
جدول ۲-۲- مواد مورد نیاز برای تهیه محلول پایه با آغازگر BOXAIR..... ۴۷
جدول ۲-۳- زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف *PCR* با آغازگر BOXAIR..... ۴۸
جدول ۲-۴- مواد مورد نیاز برای واکنش تکثیر ژن *recA* ۵۱
جدول ۲-۵- زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف PCR با آغازگرهای recA1/recA2..... ۵۲
جدول ۲-۶- مواد مورد نیاز برای واکنش تکثیر ژن *moc* ۵۵
جدول ۲-۷- زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف PCR با آغازگرهای mocDEF/mocDER ۵۶
جدول ۳- ۱- اطلاعات مربوط به تعداد، اندازه و رنگ گره‌ها ۶۰
جدول ۳-۲- مقادیر شاخص فراوانی نژادی و غالبیت نژادی ریزوبیومهای جدا شده در ۲۱ تیمار گونه
شبدر- منطقه جغرافیایی ۶۶
جدول ۳-۳- مشخصات و مقدار شاخص غالبیت نژادی ۲۳ نژاد شناسایی شده در این تحقیق ۷۲
جدول ۳-۴- جدول ماتریس تشابه ۲۲ نژاد ریزوبیوم شناسایی شده، بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش
UPGMA ۷۶
جدول ۳-۵- اطلاعات مربوط به حساسیت به درجات مختلف شوری ۸۵

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱- گره‌های ایجاد شده بر روی ریشه‌های شبدرقرمز ۶۱
شکل ۳-۲- استخراج *DNA* جدایه‌های ریزوبیومی شبدر به روش مرکاپتواتانل ۶۳
شکل ۳-۳- استخراج *DNA* جدایه‌های ریزوبیومی شبدر به روش کولن ۶۳
شکل۳-۴- الگوی باندی *DNA* تکثیر شده تعدادی از ایزوله های ریزوبیومی شبدربا استفاد از *DMSO* ۶۴
شکل ۳-۵- مقایسه الگوی *DNA* تکثیریافته ایزوله های ریزوبیومی شبدر با آغازگر *BOXAIR*. ۶۹
شکل ۳-۶- مقایسه الگوی *DNA* تکثیریافته ایزوله های ریزوبیومی شبدر با آغازگر *BOXAIR* ۶۹
شکل۳-۷- مقایسه ا لگوی *DNA* تکثیریافته با آغازگر *BOXAIR* جدایه‌های ریزوبیومی مربوط به سه گونه مختلف شبدر در خاک های مختلف ۷۰
شکل ۳-۸- مقایسه لگوی *DNA* تکثیریافته با آغازگر *BOXAIR* جدایه‌های ریزوبیومی مربوط به سه گونه مختلف شبدر در خاک‌های مختلف ۷۰
شکل ۳-۹- الگوی انگشت نگاری ۳۱ جدایه منتخب بر روی ژل توالی یاب ۷۱
شکل ۳-۱۰- الگوی انگشت نگاری ۲۲ نژاد ریزوبیومی شناسایی شده از گونه‌های شبدر ۷۷
شکل ۳-۱۱- دندروگرام حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی ۲۲ نژاد شناسایی شده با استفاده از آغازگر *BOXAIR* ۷۷
شکل ۳-۱۲- توالی تکثیر شده ژن recA در نژادهای ریزوبیومی مورد بررسی ۸۲
شکل۳-۱۳-برش آنزیمی قسمتی از ژن recA با استفاده از آنزیم Taq*I* ۸۳
شکل۳-۱۴- برش آنزیمی قسمتی از ژن recA با استفاده از آنزیم HpaII ۸۴
شکل۳-۱۵- توالی تکثیر شده ژن moc در نمونه شاهد مثبت و نمونه‌های مربوط به جدایه‌های ریزوبیومی شبدر ..۸۶

چکیده

به منظور بررسی روابط ژنتیکی جمعیت جدایه‌های Rhizobium leguminosarum *bv.* trifolii همزیست با گونه‌های مختلف شبدر در خاک مناطق جغرافیایی مختلف، نمونه‌های خاک از هفت منطقه کشور شامل استان‌های لرستان، اصفهان، خراسان، همدان، کرمانشاه، کردستان و آذربایجان غربی جمع‌آوری گردید و بذور سه گونه شبدر مصری، شبدر ایرانی و شبدر قرمز در خاک مناطق مذکور کاشته شد. به این ترتیب ۲۱ گلدان با ترکیبات مختلف خاک-گونه گیاهی به منظور بررسی رابطه متقابل نژاد ریزوبیوم-گونه شبدر و منطقه جغرافیایی آماده گردید و در گلخانه نگهداری شد. پس از رشد گیاهان و تشکیل گره در ریشه‌ها، جدای‌های ریزوبیوم همزیست از این گره‌ها جداسازی و خالص شد که شامل ۴۲۰ جدایه برای کل تیمارهای شبدر-منطقه بود. تنوع ژنتیکی جدایه‌های ریزوبیومی همزیست سه گونه شبدر در خاک هفت منطقه مذکور و رابطه متقابل خاک منطقه، گونه شبدر میزبان و ریزوبیوم همزیست با استفاده از روش انگشت‌نگاری *rep-PCR* با استفاده از آغازگر *BoxAIR* در طی سه مرحله بررسی گردید. در مرحله اول، تنوع ژنتیکی جدایه‌های بدست‌آمده از خاک هر منطقه ، در مرحله بعدی اختلاف الگوی *DNA* جدایه‌های مربوط به سه گونه مختلف شبدر در یک خاک مشخص مطالعه شد و در نهایت نیز ایزوله‌های جدا شده از گونه‌های مختلف، در مقایسه دوبه‌دوی خاک‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد و فراوانی جدایه‌های مورد بررسی، در هر یک از این مراحل به کمک دو شاخص فراوانی نژادی (*Strain richness*) و غالبیت نژادی (*Strain dominance*) تعیین گردید. از میان ۲۱ تیمار مختلف مورد بررسی، تیمار خاک نطنز-شبدر ایرانی با شاخص فراوانی برابر با ۰/۶۲ بیشترین تنوع را نشان داد. همچنین نمونه خاک مربوط به استان کرمانشاه با فراوانی نژادی ۰/۳۳ دارای فراوان‌ترین تیپ نژادی و خاک لرستان با فراوانی نژادی ۰/۱۲ دارای کمترین فراوانی نژادی در میان هفت خاک مورد بررسی شناخته شد. مقدار فراوانی نژادی برای سه گونه شبدر قرمز، شبدر ایرانی و شبدر مصری نیز به ترتیب برابر با ۰/۳، ۰/۲۸ و ۰/۲۳ به‌دست آمد. در این تحقیق از میان ۱۵۲ ایزوله مورد بررسی، ۲۳ نژاد مختلف در ارتباط با سه گونه شبدر در خاک‌های تحت مطالعه شناسایی شد. در میان نژادهای شناسایی شده، نژاد شماره ۹ با شاخص فراوانی ۰/۱۶ دارای بالاترین غالبیت نژادی بود. با استفاده از داده‌های حاصل از انگشت‌نگاری مبتنی بر *Box-PCR*، فواصل ژنتیکی نژادهای شناسایی شده با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش *UPGMA* در نرم‌افزار *NTSYS 2.0* بررسی شد. اگر چه مقایسه الگوهای انگشت نگاری تنوع بالایی را میان جدایه‌های مورد بررسی نشان داد، اما مقایسه ضرایب تشابه به‌دست آمده و دندوگرام مربوطه، رابطه خاصی را میان نژاد باکتری، نوع گونه شبدر و خاک منطقه نشان نداد. به منظور تعیین روابط فیلوژنی شناسایی شده در این تحقیق از تکنیک *PCR-RFLP* بروی ژن recA استفاده گردید. نتایج به‌دست آمده تفاوتی را میان نژادهای مورد مطالعه نشان نداد. آزمون‌های تولید ملانین و مقاومت به شوری به منظور بررسی قدرت رقابت نژادهای شناسایی شده نشان داد که هیچ یک از جدایه‌ها دارای توانایی تولید ملانین نبوده و نسبت به درجات بالای شوری مقاوم نمی‌باشند. همچنین ۲۳ نژاد شناسایی شده در این تحقیق به منظور ردیابی ژن‌های تجزیه کننده ریزوبین(moc) استفاده از آغازگرهای *mocDEF/mocDER* بررسی گردیدند. نتایج این آزمون نیز نشان داد که هیچ‌یک از جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش ژن‌های تولید و تجزیه ریزوبین را ندارند و دارای قدرت رقابتی قابل توجهی نسبت به سایر جدایه‌ها نمی‌باشند.

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

۱- ۱- مقدمه

نیتروژن مهمترین عنصر غذایی برای گیاه محسوب می‌شود. . میانگین مقدار نیتروژن در ماده خشک گیاهان ۲-۱ درصد بوده و گاهی به ۶-۴ درصد نیز می رسد. تامین نیتروژن برای زشد گیاه از طریق کودهای شیمیایی مستلزم صرف هزینه زیاد بوده وهمچنین موجب آلودگی آب‌های زیرزمینی می شود و لذا در برخی مناطق کشاورزی جهان این ماده اصلی‌ترین عامل محدودکننده تولید محصولات زراعی می باشد. در رابطه با کل مقدار ازت مورد نیاز برای تولید محصولات زراعی، ازت میان ۱۶ عنصر اصلی در مکان چهارم قرار دارد .در حالی‌که نزدیک به ۷۹٪ اتمسفر را گاز نیتروژن تشکیل می دهد، متأسفانه ازت در حالت گازی تقریبا بدون استفاده بوده و برای گیاهان غیرقابل دسترس می باشد. ترکیبات ازته تنها به صورت ترکیبی و یونی برای گیاهان عالی قابل‌استفاده می باشند[۳]. کشاورزی برای تولید محصولات همواره به ازت تولید شده توسط موجودات تثبیت کننده ازت متکی بوده است. این سیستم‌های تثبیت ازت دارای مزایای دو جانبه اقتصادی و زیست

محیطی هستند و در کشاورزی پایدار سبب کاهش مصرف کودهای شیمیایی و افزایش مواد آلی داخل خاک می شوند [۱]. در این میان همزیستی باکتری های تثبیت کننده نیتروژن موسوم به ریزوبیوم در ارتباط با گیاهان خانواده لگومینوز بیش از سایر سیستم های بیولوژیکی تثبیت‌کننده ازت اهمیت داشته و همواره از لحاظ اقتصادی و زیست محیطی در برنامه های کشاورزی پایدار مورد توجه قرار گرفته است [۷۰]. سالانه در دنیا، حدود ۱۷۵ میلیون تن در هکتار نیتروژن مولکولی تثبیت می شود که ۴۰٪ این مقدار یعنی حدود ۷۰ میلیون تن مربوط به لگوم‌ها می باشد [۱]. کشت گیاهان لگوم از طریق تثبیت بیولوژیکی نیتروژن در همزیستی لگوم- ریزوبیوم به حاصلخیزی خاک کمک کرده و آب‌های زیرزمینی را از خطر آلودگی نیتراتی ناشی از مصرف بی رویه کود های نیتروژنی محافظت می کند [۳۲و۴۷]. تثبیت بیولوژیکی نیتروژن توسط لگوم‌ها انعطاف‌پذیری بیشتری نسبت به استفاده از کودهای شیمیایی نیتراته داشته و قادر است نیتروژن آلی را در خاک به آرامی در اختیار گونه‌های غیر لگومی قرار دهد [۷۰].

امروزه در بسیاری کشورها، ریزوبیوم‌ها به عنوان مایه تلقیح گیاهان خانواده لگومینوز مورد استفاده قرار می گیرند. مواد تلقیحی با کیفیت بالا از طریق تامین ازت مورد نیاز گیاهان سهم زیادی در پیشبرد استراتژی های اقتصادی در سیستم‌های زراعی داشته‌ست. با استفاده از این مواد تلقیحی، محصولات کشاورزی متعددی به نواحی جغرافیایی جدیدی در دنیا معرفی شده اند. به عنوان مثال کشت و کار سویا، که بومی چین می باشد، در ایالت متحده امریکا وابستگی زیادی به تلقیح مصنوعی توسط باکتری *Bradyrhizobium japonicum* دارد. همچنین کشت گیاه لوتوس اروپایی[۱] به عنوان یک لگوم علوفه‌ای در نیوزیلند و نخود آسیایی[۲] به عنوان یک لگوم دانه‌ای در استرالیا، از طریق معرفی ریزوبیوم‌های همزیست مؤثر به خاک این نواحی امکان‌پذیر گشته‌است [۵۶].

حضور جمعیت های ریزوبیومی بومی غیر مؤثر در خاک‌ها که قادر به ایجاد گره بر روی گیاهان میزبان می‌باشند مانع مهمی در برابر گره‌زائی نژادهای تلقیحی معرفی شده می‌باشد [۵۱]. بنابراین اولین مرحله در تولید هر مایه تلقیحی ریزوبیومی اطمینان از سازگاری ریزوبیوم موثر با میزبان خود می‌باشد

از میان گیاهان علوفه‌ای متعلق به خوانواده بقولات گیاه شبدر به لحاظ ارزش کمی و کیفی علوفه جایگاه ویژه-ای در کشاورزی جهان دارد[۹۹] رابطه همزیستی شبدر با باکتریهای تثبیت کننده ازت و

۱- European lotus corniulatus

۲- Asian cicer arietinum

ارزش غذایی این گیاه آن را به یکی از گیاهان مهم در کشاورزی اکولوژیکی نواحی سردسیر تبدیل نموده است [۷۹].علاوه بر آن شبدر دارای سازگاری وسیعی در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری می‌باشد [۸۱].تحقیقات نشان می‌دهند که تنوع و درجه اختصاصی بودن بالائی از نظر کارآئی و یا عدم کارآئی فرایند تثبیت ازت میان ریزوبیوم‌های همزیست، و گونه‌های مختلف شبدر وجود دارد[۷۹ و۸۱].

مطالعات مختلف صورت گرفته در بررسی تنوع جمعیت‌های طبیعی ریزوبیومهای همزیست با شبدر، نشان می‌دهند که این ریزوبیوم‌ها گروههای بسیار متنوعی را تشکیل می‌دهند[۸۵ و ۷۹]، که از لحاظ الگوی تلقیح متقابل و همچنین محتوای ژنتیکی تنوع نشان می‌دهند [۸۵].

وینسنت[۹۲]. در سال ۱۹۷۰، ۱۲گروه موثررا در ارتباط متقابل شبدر- ریزوبیوم تعیین نمود.. انتخاب صحیح ریزمبیوم همزیست با لگوم، مشخص نمودن کارآمدی آنها از نظر تثبیت ازت و تعیین روابط ژنتیکی میزبان و ریزوبیوم و بررسی تنوع جمعیت های مختلف به منظور انتخاب نژادهایی که بالاترین پتانسیل را از نظر گره زائی و تثبیت نیتروژن داشته باشند، از الویت‌های مهم تحقیقات مربوط به همزیستی ریزوبیوم- لگوم می‌باشد.

چون رابطه میان ریزوبیوم و گیاه میزبان کاملاً اختصاصی بوده و گونه های مختلف لگوم برای جذب نژاد برتر و گره سازی تفاوت‌های فراوان نشان می دهند، آگاهی از این مطلب که چه گونه‌هایی از انواع لگوم در اقلیم‌های متفاوت از کدام نوع ریزوبیوم برای همزیستی سود می برند، از اهمیت بالائی برخوردار می باشد. با شناخت ساختار و تنوع جمعیت‌های ریزوبیوم‌های بومی خاک ، این امکان به وجود خواهد آمد که استراتژی‌های مدیریتی در پیش گرفته شود تا رقابت برای گره-زایی را به نفع نژادهای موثر تلقیحی بهبود بخشد.

مطالعه روابط همزیستی میان ریزوبیوم و میزبان گیاهی، نشان خواهد داد که کدام سوش‌های ریزوبیومی با کدام گونه‌های گیاهی و در چه اقلیم‌هایی سازگاری بیشتری دارند تا شاید بتوان با تغییر کشت گونه میزبان در یک منطقه جغرافیایی حداکثر استفاده از تثبیت بیولوژیکی مولکولی را نصیب زارعین نمود. از این رو در این بررسی سعی خواهد شد ضمن جداسازی ریزوبیوم‌های همزیست با گونه-های مختلف شبدر در نواحی مختلف شبدرخیز ایران، به شناسائی و معرفی سویه‌های همزیست ریزوبیوم با گونه‌های مختلف شبدر اقدام نمود.

۱-۲- تثبیت بیولوژیکی نیتروژن

در جو زمین نیتروژن به اشکال متفاوتی وجود دارد. ۷۸٪ حجم هوای اتمسفر را نیتروژن مولکولی (N_2) تشکیل می‌دهد. استفاده از نیتروژن اتمسفر، مستلزم شکستن پیوند سه گانه بین اتم‌های آن می‌باشد که گیاهان عالی به‌تنهایی توان انجام این واکنش را ندارند و لازم است اشکال نیتراته و آمونیاکی نیتروژن در اختیار گیاه قرار گیرد. تبدیل نیتروژن مولکولی به اشکال دیگر آ ن نظیر نیترات یا آمونیاک را تثبیت ازت می گویند [۲].

فرآیندهای طبیعی بیشترین سهم را در تثبیت ازت برعهده دارند. ۱۰٪ از کل نیتروژنی که به روش طبیعی تثبیت می‌شود ناشی از رعد و برق است. ۹۰٪ باقیمانده تثبیت ازت، به روش طبیعی و توسط میکروارگانیسم‌ها و از طریق فرآیندی که اصطلاحاً تثبیت بیولوژیکی نیتروژن[۳] نامیده می‌شود صورت می گیرد. از نقطه نظر کشاورزی تثبیت بیولوژیکی نیتروژن اهمیت زیادی دارد و منبع مهمی برای تأمین ازت خاک محسوب می‌شود، چرا که نیاز گیاهان زراعی صرفاً از طریق کودهای شیمیایی تأمین نمی گردد[۲].

فرآیند تثبیت ازت به روش زیستی بسیار پیچیده بوده و تحت کنترل فاکتورهای ژنتیکی گیاه میزبان و همزیست داخلی صورت می گیرد [۸۸ و ۷۰]. همچنین برخی عوامل از قبیل مواد غذائی، نوع خاک و شرایط آب و هوایی برایجاد و کارآئی این ارتباط تأثیر می گذارند [۱۰۰ و ۸۸].

۱-۳- میکروارگانیسم‌های تثبیت کننده نیتروژن

۱-۳-۱ –میکروارگانیسم‌های آزادزی تثبیت کننده نیتروژن

برخی میکروارگانیسم‌های آزادزی قادرند بدون وابستگی به سایر موجودات، نیتروژن مولکولی را تثبیت نماید. این میکروارگانیسم‌ها به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند:

۱- باکتری‌های غیرهمزیست تثبیت‌کننده که شامل باکتریهای هوازی اجباری متعلق به جنس‌های *Azotobacter*، *Beijerinckia*، *Deoxia*، *Archromobacter*، *Mycobacterium*، *Arthrobacter*، *Bacillus* و باکتریهای هوازی اختیاری شامل جنس‌های *Aerobacter*، *Klebisella*، *Pseudomonas* و همچنین باکتریهای تثبیت‌کننده‌غیرهوازی متعلق‌به جنس‌های *Clostridium*، *Chlorobium*، *Chromatium*، *Rhodomicrobium*، *Rhodopseudomonuas* و *Methanobacterium* می‌باشند [۷۷].

۱-Biological nitrogen fixation

۲- جلبک‌های سبز-آبی آزادزی که متعلق به رده‌های *Nostocales*، *Stigonematales* و جنس‌های *Anabaena*، *Anabaenopsis*، *Aulosira*، *Chlorogloea*، *Cylindrospernum*، *Nostoc*، *Calothrix*، *cytonema*، *Tolypothrix*، *Fischerella*، *Haplosiphon*، *Mastigocladu*، *Stigonema* و *Westiellopsis* می‌باشند [۷۷].

۱-۳-۲- میکروارگانیسم‌های همزیست تثبیت‌کننده نیتروژن

برخی میکروارگانیسم‌ها قادرند به صورت همزیست با برخی گیاهان، قارچ ها و یا سایر موجودات نیتروژن هوا را تثبیت نمایند. این میکروارگانیسم‌ها نیز به دو گروه قابل تقسیم می‌باشند:

۱- جلبک‌های سبز-آبی همزیست[۴] که در ارتباط با قارچ‌ها، سرخس‌ها، و برخی گیاهان گلدار قادر به تثبیت نیتروژن اتمسفری می‌باشند. مثال بارز این گروه از موجودات، ارتباط همزیستی جلبک سبز-آبی نوستوک[۵] و یا کالوتریکس[۶] با قارچ‌ها و تشکیل گلسنگ بر روی خاک‌ها، صخره‌ها و نوک درختان می‌باشد [۷۷].

۲- باکتری‌های تثبیت کننده همزیست ریشه یا ریزوبیوم‌ها که قادر به برقراری ارتباط و تثبیت نیتروژن در گره‌های ریشه گیاهان خانواده لگومنیوز می‌باشند. این باکتری‌ها بر روی ریشه و یا ساقه میزبان‌های خود تشکیل اندام‌های خاصی به نام گره می‌نمایند که در آن نیتروژن اتمسفری احیا شده و به صورت قابل استفاده برای گیاه در می‌آید [۴۴ و ۷۷، ۸۸، ۷۰].

۱-۴ -گیاهان تیره نخود و اهمیت آنها

گیاهان تیره نخود متعلق به خانواده legominoseae بوده و از لحاظ گیاهشناسی به سه زیر خانواده اصلی *Ceasalpinoideae*، *Minnosoideae* و *Papilionideae* تقسیم می‌شوند [۷۸]. منشأ گیاهان لگوم و نحوه تکامل رابطه همزیستی میان این گیاهان با باکتری‌های تثبیت کننده ازت به طور کامل شناخته نشده است. شواهد فسیل شناسی به جا مانده از این گیاهان زمان دقیق پیدایش لگومینوزها را نشان نمی دهد. این گیاهان احتمالاً از مناطق گرمسیری نیمه مرطوب، نیمه گرمسیری یا گرم منشأ گرفته اند. نوع خاکی که در آن اولین لگوم های همزیست ظهور کرده اند نیز به درستی مشخص نمی باشد. احتمالاً

۱-Symbiotic blue- green algae

۲-Nostoc

۳-Calothrix

باکتری های تثبیت کننده ازت قبل از این که تحت شرایط کمبود مواد غذائی حیاتی در خاک به صورت همزیست درآیند، تثبیت کننده های آزادزی نیتروژن بوده اند. تصور می شود ریزوبیوم های همزیست با گیاه لوبیا چشم بلبلی Cowpea اجداد باکتری های کنونی همزیست با جنس های جدید خانواده لگومینوز باشند [۷۸].

نقش گیاهان تیره نخود در بهبود و افزایش حاصلخیزی خاک از قرن‌ها پیش شناخته شده و تاریخچه کاربرد این گیاهان در سیستم‌های تناوب زراعی به عنوان کود سبز به زمان روم باستان برمی گردد [۵۷]. با این حال اثبات علمی سودمندی لگوم‌ها در رابطه با تأمین نیازهای ازتی خاک در نیمه دوم قرن نوزدهم توسط بوسینگولت[۷]، هلریگل[۸] و ویلفارت[۹] صورت گرفت [۵۶ و ۷۸].

گیاهان تیره نخود قادر به برقراری رابطه همزیستی با باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن، متعلق به خانواده ریزوبیاسه می‌باشند. در این رابطه، باکتری گیاه را وادار به تولید اندام‌های جدیدی بر روی ریشه یا ساقه می‌نماید که گره نامیده می‌شوند [۵۷]. در داخل گره نیتروژن اتمسفری احیا شده و در اختیار گیاه قرار می گیرد [۵۷ و ۷۰]. تمام اعضای خانواده لگومینوز بر روی سیستم ریشه خود دارای گره نمی باشند و برخی گونه های درختی فاقد گره های تثبیت کننده ازت هستند [۷۸]. گره‌های ریشه گیاهان تیره نخود بزرگترین و تنهاترین منبع نیتروژن آلی در چرخه جهانی نیتروژن می‌باشند [۵۷ و ۷۰] و انواع گوناگون گیاهان لگوم در هر هکتار ۲۰۰ تا ۳۰۰ کیلوگرم نیتروژن را تثبیت می‌نمایند [۷۰]. برخی گیاهان لگومینوز مانند شبدر ۱۳۰ کیلوگرم در هکتار و گیاه لوبیا چشم بلبلی ۱۲۶-۲۶ کیلوگرم در هکتار نیتروژن تثبیت شده را در محیط ریشه تامین می کنند [۷۷].

شبدر (*Trifolium spp*) از گیاهان علوفه ای مهم متعلق به خانواده لگومینوز می‌باشد. جنس تریفولیوم شامل حداقل ۲۴۰ گونه می‌باشد که از لحاظ مورفولوژی، زیستگاه و اکولوژی متفاوت اند [۹۹].

متداول ترین گونه‌های شبدر که به صورت تجارتی کشت می‌شوند، عبارت از شبدر سفید *T.repense*، شبدرقرمز *T.incarnatum*، شبدر آکسیک *T.hybridum*، شبدر کریمسون *T.incarnatum*،

۱- Bousingault
۲-Hellriegel
۳-Wilfarth

شبدر ایرانی *T.resupinatum*، شبدر برسیم *T.alexanderinum*، شبدر توت فرنگی *T.fragiferum*، شبدر کورا *T.ambigum* و شبدر *T. dubium* می باشند [۸۱].

شبدر دارای سیستم ریشه ای قوی بوده که با کمک باکتری‌های ریزوبیوم به حاصلخیزی خاک و بهبود زهکشی آن کمک می‌کند. علاوه بر تأثیر در بهبود کیفیت خاک، شبدر در سراسر دنیا در تأمین علوفه، کاه کود سبز و علوفه سیلو شده و همچنین عسل نقش دارد [۸۱].

۱-۵- همزیستی

واژه همزیستی نخستین بار توسط آنتون دباری[۱۰] در سال ۱۸۷۹ مطرح شد [۸۳]. تعریف وی از همزیستی بسیار کلی بود، به طوری که روابط متقابل، پارازیتیسم[۱۱] و همسفرگی[۱۲] را نیز شامل می‌شد. امروزه همزیستی به رابطه فیزیکی نزدیک و دو طرفه بین دو موجود اطلاق می‌شود، به طوری‌که هر دو موجود از این ارتباط سود ببرند [۸۳].

برای ایجاد یک رابطه همزیستی داخلی یا پارازیتی موفق، لازم است که میکروارگانیسم مورد نظر با میزبان تماس یافته و به پیکره آن وارد گردد. سپس با استفاده از مواد غذائی بافت‌های بدن میزبان به رشد و تولیدمثل پرداخته و همزمان از دفاع، مقاومت و تولید مثل میزبان جلوگیری نموده و میزبان‌های جدید را آلوده سازد.

از ریزوبیوم‌ها به عنوان پاتوژن‌های همزیست[۷۴] و یا پارازیت‌های پروکاریوتی گیاهان لگومینوز [۴۳] نام برده می‌شود. توانایی این میکروارگانیسم‌ها در ایجاد حساسیت فوق العاده و تولید برخی سموم آنها را به پاتوژن‌ها شبیه می‌سازد از طرف دیگر، رابطه نزدیک این باکتری‌ها با گیاه، تأمین مواد غذائی مورد نیاز آن و تأثیر سازنده آنها در رشد گیاه بر وجود روابط متقابل همزیستی گواهی دارد[۸۳].

۱-٦- ارتباط همزیستی ریزوبیوم با گیاهان تیره نخود

رابطه همزیستی ریزوبیوم - لگوم از مهم‌ترین و متکامل‌ترین روابط میان یک گیاه و یک میکروب می‌باشد. در این رابطه هر دو شریک قادرند به صورت مستقل از یکدیگر رشد کنند. گیاه به عنوان یک

۱-Anton de Barry

۲- Parasitism

۳- Commensalism

فتوتروف[۱۳] دارای کربن و فاقد نیتروژن و ریزوبیوم به عنوان یک هتروتروف[۱۴] فاقد کربن اما تثبیت کننده نیتروژن محسوب می شود. همزیستی بین این دو شریک، از طریق در اختیار قرار دادن نیتروژن احیا شده که عامل حیاتی و محدودکننده در تغذیه گیاه است، گیاه را نسبت به نیتروژن اتوتروف می‌سازد [۸۸].

روابط متقابل لگوم ها و ریزوبیوم‌ها نیازمند اتصال ویژه باکتری به سطح سلول گیاهی، جذب باکتری به داخل ریشه گیاه و مهمتر از همه زنده ماندن و همانندسازی فعال باکتری در غشای ا طراف سیمبیوزوم[۱۵] می‌باشد [۸۸]. رابطه همزیستی بین دو شریک از طریق تبادلات مولکولی که در ناحیه ریزوسفر رخ می‌دهد صورت می گیرد [۸۳].

ژنوم لگوم‌ها چندین برابر از ژنوم ریزوبیوم ها بزرگتر می‌باشد و با اینکه تفاوت‌های آشکاری میان این دو مشاهده می‌شود، هر دو شریک دارای سیستم های پیچیده ای برای برقراری رابطه همزیستی در جهت تأمین نیازهای دوجانبه می‌باشند [۱۴].

۱-۷- ویژگی‌های ریزوبیوم

۱-۷-۱-مورفولوژی و خصوصیات رشد

ریزوبیوم‌های همزیست با شبدر، باکتری‌های هوازی، گرم منفی و میله ای شکل هستند که تولید اسپور نمی کنند. این باکتری‌ها متحرک هستند و به کمک تاژک‌های پیرامونی حرکت می‌نمایند. رشد این باکتری‌ها سریع است و بهترین رشد را در دمای۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی گراد نشان می‌دهند. اما برخی نژادها قادرند در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد نیز رشد نمایند [۸۱]. این باکتری‌ها طیف وسیعی از هیدرات‌های کربن را می‌توانند مورد استفاده قرار دهند ولی اکثر نژادها برای رشد به ویتامین های بیوتین، تیامین و پانتونات کلسیم در محیط رشد نیازمندند. مخمر یا سایر عصاره‌های گیاهی در اکثر موارد برای تأمین این مواد در محیط رشد استفاده می‌شوند. محیط رشد متداول برای این باکتری‌ها YEMA[۱۶] می‌باشد.

---

۱. Prototroph
۲- Heterotroph
۳- Symbiosome

۱- Yeast extract monitol agar

در محیط کشت جامد کلونی‌های این باکتری در طی ٤ الی ٥ روز تشکیل می‌شوند. کلنی این باکتری‌ها لعابی شکل و شفاف است اما با گذشت زمان سفید و کدر می‌شود. ریزوبیوم‌های شبدر در مایع تورنسل تولید یک واکنش آلکالینی نموده و ناحیه سرمی عمیقی ایجاد می‌کنند. باکتریوئیدها گلابی شکل، متورم و دارای واکوئل می‌باشند [۸۱].

۱-۷-۲- رده بندی

اولین بار فرد[۱۷] [۲۲ و ۸۳] در سال ۱۹۳۲ تنوع تاکسونومیکی باکتری‌های ایجاد کننده گره‌های ریشه را تعیین نمود و براساس میزان رشد آنها را طبقه بندی نمود. به این ترتیب ریزوبیوم‌هایی که بعدا تحت نام *Rhizobium* و *Sinorhizobium* نامیده شدند بعنوان ریزوبیوم_های سریع رشد و ریزوبیوم‌هایی مانند *Bradyrhizobium* نیز بعنوان ریزوبیوم‌های کند رشد معروف شدند.

همچنان‌که منابع تنوع بیشتری در سراسر دنیا تحت بررسی قرار می‌گیرند، نژادهائی با ویژگی‌های منحصر به فرد پدید می‌آیند و در نتیجه طبقه بندی ریزوبیوم‌ها را دستخوش تغییرات زیادی می‌نمایند. بنابراین معیارهایی که برای شناسایی و طبقه بندی ریزوبیوم‌ها در نظر گرفته می‌شوند همواره نیازمند ارزیابی مجدد می‌باشند [۸۳].فرضیه تلقیح تقاطعی[۱۸] که گونه‌های گیاهی را براساس ریزوبیوم همزیست آنها مشخص می‌کند، مدتها در طبقه بندی ریزوبیوم‌ها مورد استفاده قرار گرفته است [۷۰]. در حال حاضر به دلیل این‌که تداخلات و همپوشانی‌های زیادی در دامنه‌های میزبانی دیده می‌شود، این روش اعتبار خود را از دست داده است [۵۰]. ولی هنوز در بسیاری از موارد از این روش نیز استفاده می‌نمایند.

روش‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی از قبیل تفاوت در پروفیل پلاسمیدی[۱۹]، هیبریداسیون DNA-DNA[۲۰]، آنالیز اسیدهای چرب، تکنیک‌های RFLP[۲۱] و RAPD-PCR[۲۲] و همچنین روش‌های سرولوژیکی، خصوصا استفاده از آنتی‌بادی‌های فلورسنت در شناسائی و طبقه بندی باکتری‌ها به‌کار رفته اند [۴۹]. هر روش با توجه به سهولت کاربرد، تکرارپذیری، نیاز به امکانات و درجه تفکیک سطوح

۲-Fred

۳- Cross inoculation

۱- Plasmid profile

۲- DNA- DNA hybridization

۳- Restriction Fragment Length Polymorphism

۴- Random Amplified Polymorphic DNA