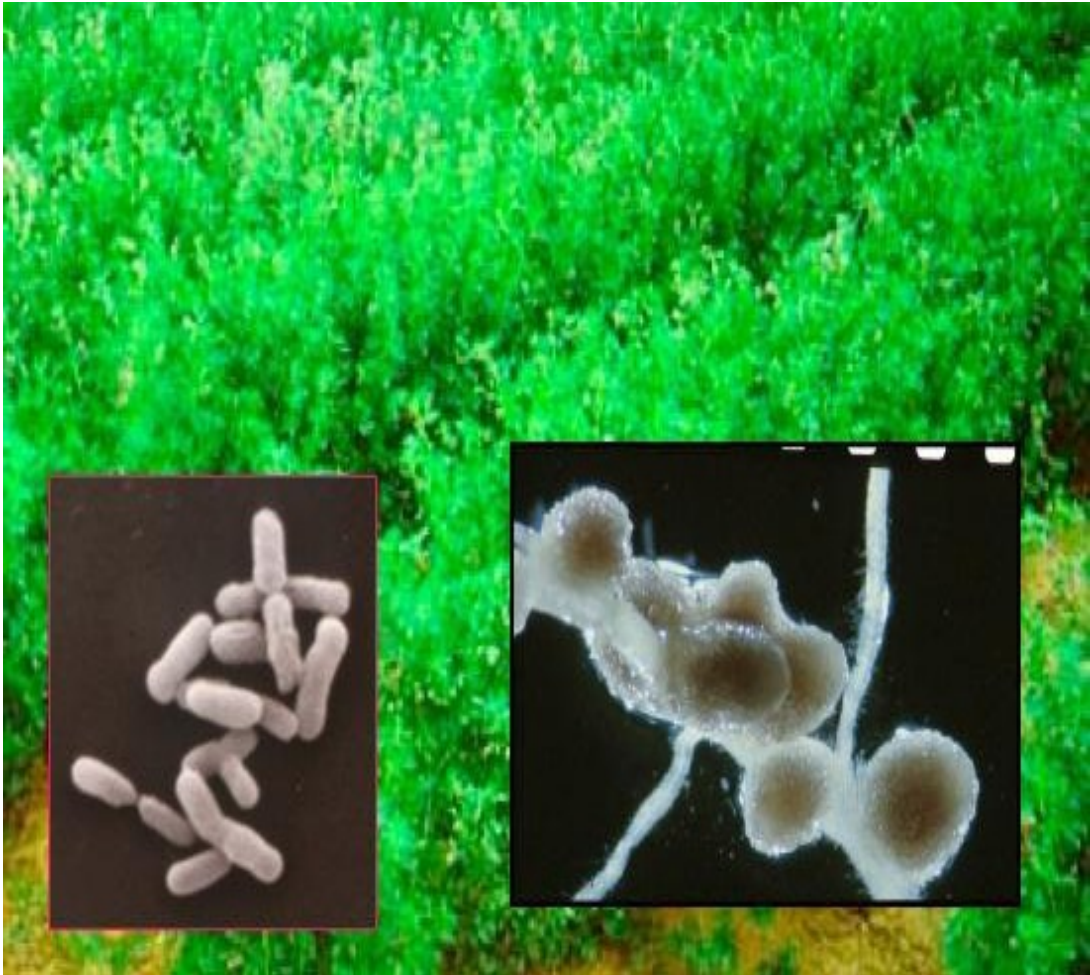


ریزوبیوم ها و فرایند تثبیت زیستی نیتروژن



تهیه و تنظیم :

مریم غزایان- مریم سبطی

محقق بخش خاک و آب مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان

بهار ۹۰

۳	مقدمه
۳	تاریخچه باکتری های ریزوبیوم
۴	ویژگیهای عمومی باکتری ریزوبیوم
۴	طبقه بندی ریزوبیوم ها
۶	گیاهان خانواده لگم
۷	اثرات همزیستی لگم - ریزوبیوم
۸	مراحل تشکیل گره در گیاهان لگم
۱۱	انواع ساختمان گره
۱۳	عوامل موثر در همزیستی لگم - ریزوبیوم
۱۸	منابع

مقدمه :

ریزوبیومها از مفیدترین باکتریهای خاکزی هستند که استفاده از آنها در سطح جهانی به عنوان یک کود بیولوژیک نیتروژنی در کشت حبوبات و گیاهان لگم علوفه ای از دیرباز معمول و متداول بوده است. همزیستی ریزوبیوم- لگم، پتانسیل بسیار بالایی جهت تثبیت نیتروژن مولکولی دارد، بطوریکه در مواردی این تثبیت بطور سالانه بالغ بر ۲۵۰ کیلوگرم در هکتار گزارش شده است (۱). با وجود اینکه بیش از یک قرن از شناخت نقش مفید ریزوبیومها در تثبیت نیتروژن مولکولی می گذرد، ولی متأسفانه در خصوص توانایی های این گروه مهم از باکتریهای خاکزی به جز در محدوده گیاهان لگم استفاده عملی زیادی نشده است. از جمله فعالیت های مفید این باکتریها که آنها را در گروه باکتریهای محرک رشد گیاه (PGPR) قرار می دهد، می توان به تولید هورمونهای محرک رشد گیاه بویژه اکسین ها، توانایی حل فسفات های آلی و معدنی، تولید یونوفورها مخصوصاً سیدروفور، اثرات مثبت روی رشد و مورفولوژی ریشه، بهبود رابطه همزیستی با گیاه لگم میزبان و تحریک ایجاد همزیستی میکوریزی اشاره کرد (۱۴ و ۱۵). تولید و استفاده از مایه تلقیح های ریزوبیومی، از متداول ترین و مؤثرترین موارد کاربردی کودهای زیستی محسوب می شود که بر این اساس همزیستی ریزوبیوم- لگم را می بایست به عنوان یک منبع اصلی تأمین نیتروژن در بیوسفر منظور نمود، زیرا در صورت اعمال مدیریت صحیح، ورود نیتروژن و مواد آلی به خاک از این طریق در حدی است که می تواند مقدار هدررفت نیتروژن همراه برداشت محصول را بخوبی جبران نماید.

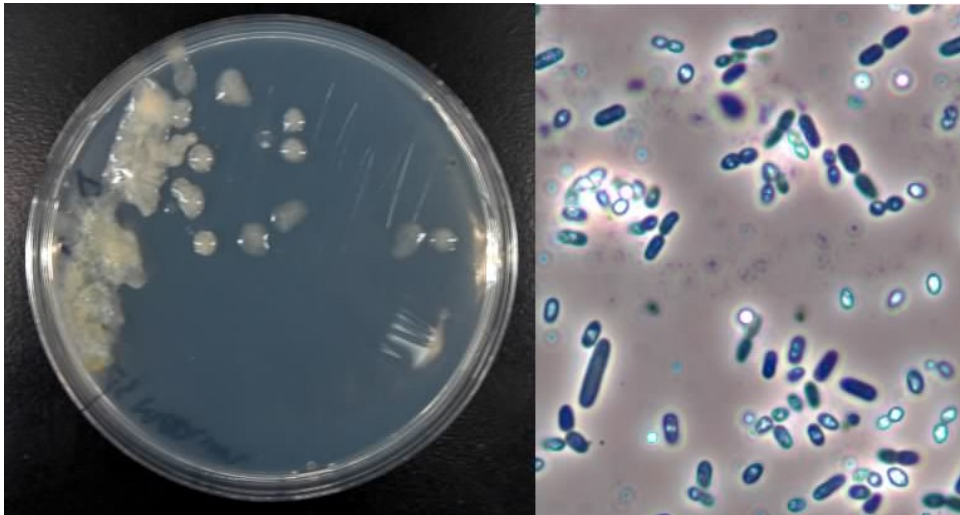
تاریخچه باکتری های ریزوبیوم :

برای نخستین بار در سال ۱۸۸۶ هلریگل و ویلفارث به وجود باکتریایی در گره های ریشه ای لگومها و نقش آنها در تثبیت نیتروژن پی بردند سپس بیجرینک در سال ۱۸۸۸ باکتریهای موجود در گره این گیاهان را جداسازی کرده و پس از خالص سازی آن را *Bacillus Redisiqula* نامید. عنوان باکتری ریزوبیوم اولین بار در سال ۱۸۸۹ توسط محققى به نام فرانک پیشنهاد شد (۴ و ۱۱) که در سال ۱۹۲۶ با قرار دادن این میکروارگانيسم ها در گروه باکتریهای تک سلولی حقیقی، نام عمومی *Rhizobium* تایید و پذیرفته شد (۷ و ۱۱). در سال ۱۹۸۲ جوردن، این باکتریها را بر اساس سرعت رشد و تکثیر به دو جنس تند رشد به نام ریزوبیوم و کند رشد بنام بردی ریزوبیوم تفکیک نمود و در سال ۱۹۸۸ دریفوس و همکاران، جنس سومی را تحت عنوان آزوریزوبیوم به این مجموعه اضافه

کردند که توانایی ایجاد گره در ریشه و ساقه گیاه میزبان را داشتند. با مطالعه و بررسی بیشتر گیاهان خانواده لگم، جنس های جدیدی از این باکتری با نامهای مختلف پیشنهاد شد (۷).

ویژگیهای عمومی باکتری ریزوبیوم:

ریزوبیوم ها از لحاظ ظاهری باکتری هایی میله ای شکل به طول ۳-۱/۲ و به عرض ۰/۹-۰/۵ میکرون می باشند ولی در شرایط مختلف رشد ممکن است به شکل های دیگری نیز دیده شوند. حرارت مناسب برای رشد و تکثیر آنها ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد و pH بهینه ۶ تا ۷ است. هر چند ممکن است در بعضی جدایه ها حد بهینه حرارت و pH کاملاً متفاوت باشد اما این باکتری ها قادرند برای مدتی طولانی در خاک به صورت ساپروفیت و غیرهمزیست زندگی کنند که با شروع مرحله رویش گیاه میزبان به سمت ریشه گیاه جلب می شوند. اگر چه برخی از ریزوبیوم ها با میزبانهای متعددی رابطه همزیستی برقرار می کنند و بیش از یک گونه ریزوبیوم ممکن است با یک گیاه در ارتباط باشد لیکن این باکتری ها دارای میزبان اختصاصی هستند (۸ و ۹). در کتاب راهنمای طبقه بندی برگی (۱۹۹۴) باکتریهای خانواده ریزوبیاسه باکتری هایی هتروتروف، هوازی، گرم منفی، میله ای، بدون اسپور و متحرک با یک تاژک قطبی یا ۲ الی ۶ تاژک پیرامونی معرفی شده اند (۸) که بر پایه ویژگیهای فیلوژنیک در شاخه پروتئوباکترها، زیرشاخه آلفا، راسته رایزوبیال و در خانواده های مختلف قرار می گیرند.



شکل ۱: کلنی ریزوبیوم در زیر میکروسکپ و بر روی محیط کشت

طبقه بندی ریزوبیوم ها:

در راهنمای طبقه بندی برگی جنس باکتری های ریزوبیوم به گونه های زیر تقسیم می شود:

Rhizobium leguminosarum: برای این گونه برحسب نوع گیاهان میزبان سه بیوار تعیین شده است.

بیوار ویسیه: قادر به ایجاد گره روی ریشه های نخود، باقلا، خللر و عدس است.

بیوار تریفولی: قادر به ایجاد گره روی ریشه انواع گونه های شبدر است

بیوار فازنولی: قادر به ایجاد گره روی ریشه انواع لوبیا است.

Rhizobium troppeis: قادر به ایجاد گره روی گیاهانی مانند لوبیا، لوستا و لوکوسفالاست.

Rhizobium ekeli: قادر به ایجاد گره روی فازنولوس ولگاریس است

جنس *Sinorhizobium*: برای این جنس ۴ گونه مختلف معرفی شده است:

S. meliloti: میزبان آن گیاهان جنس مدیکاگو (انواع یونجه)، میلیوتوس و تریگونلاست.

S. feredi: قادر به ایجاد گره بر روی ریشه های لوبیا چشم بلبلی و لپه هندی است.

S. saheli: قادر به ایجاد گره روی ریشه های تعدادی از لگم های درختی و درختچه ای است.

S. tranega: قادر به ایجاد گره روی ریشه های تعدادی از لگم های درختی و درختچه ای

است.

جنس *Mesorhizobium*: گونه های معرفی شده برای این جنس به شرح زیر هستند:

M. lotti: قادر به ایجاد گره روی ریشه گیاهانی از جنس لوتوس، لوپینوس و آیتیلیس است.

M. hokatoe: قادر به ایجاد گره روی گون است.

M. hokatoe: قادر به ایجاد گره روی ریشه نخود است.

M. tianshaner: این گونه در همزیستی با گونه های مختلف، از جمله سویا، در چین گزارش

شده ولی تأیید آن به بررسی های ژنتیکی بیش تری نیاز دارد.

M. medetranium: این گونه قادر به ایجاد گره روی نخود است ولی از نظر ژنتیکی با گونه

M. ciceri تفاوت دارد.

یک جنس نامگذری نشده: ریزوبیوم هایی که با انواع *Galega* همزیستی دارند و قبلاً به عنوان

گونه ای از جنس *R. galega* شناخته شده اند به دلیل قرابت بسیار نزدیک با جنس

Agrobacterium فعلاً از جنس ریزوبیوم مجزا شده اند ولی نامگذاری آنها نیاز به بررسی های

گسترده ای دارد.

جنس *Bradyrhizobium*: شامل ۴ گونه به شرح زیر است:

B. japonicum: شامل تمام سویه هایی است که به طور مؤثری روی ریشه های سویا ایجاد

گره می کنند ولی از نظر ژنتیکی با سایر گونه های همزیست با سویا متفاوتند.

B. elcani: این گروه نیز همزیست با سویاست ولی تفاوت های فنوتیپی و ژنتیکی مشخصی با گونه بردی ریزوبیوم ژاپنیکوم دارد.

B. liaoningense: شامل سوبه های فوق العاده کند رشد همزیست با سویاست.

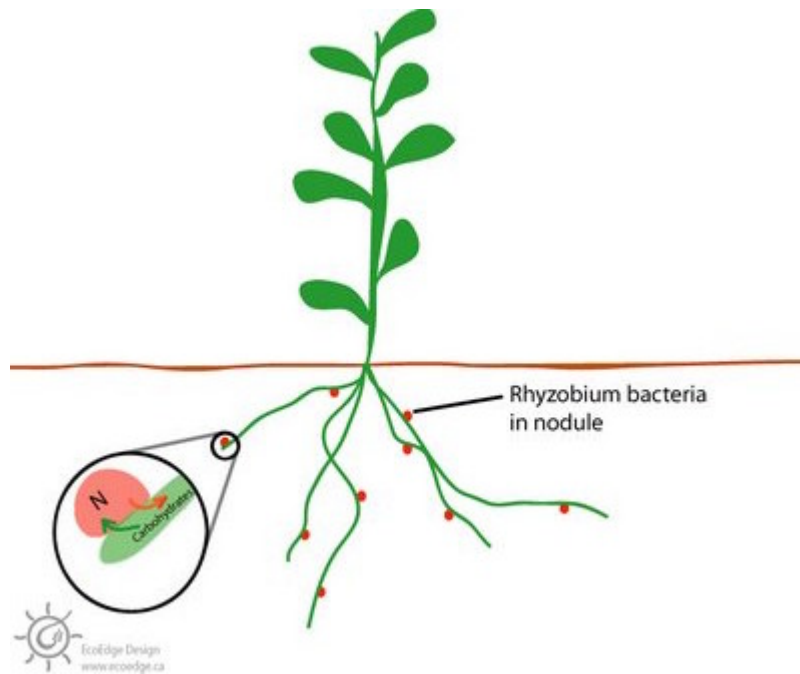
دیگر *Bradyrhizobium* ها: شامل تمام بردی ریزوبیوم هایی می باشند که قادر به تولید گره بر روی ریشه سویا نیستند و با انواعی از گیاهان دیگر همزیستی دارند که تعیین گونه اختصاصی برای آنها نیازمند مطالعات بیش تری است.

جنس *Azorhizobium*: گونه های این جنس قادر به تشکیل گره های تثبیت کننده نیتروژن روی ریشه و ساقه گیاهان میزبان هستند. تنها گونه نامگذاری شده این جنس آزوریزوبیوم کولینودنیس است که قادر به ایجاد گره روی ریشه و ساقه گیاه سسبانا روستراتاست. از نظر سرعت رشد باکتری *Rhizobium* و *Azorhizobium* تندرشد هستند که پس از رشد سبب اسیدی شدن محیط می شوند.

گیاهان خانواده لگم:

از زمان یونانیان و رومیان کشت و استفاده از لگم ها برای افزایش حاصلخیزی خاک فعالیت معمول بشمار می رفت. گیاهان این خانواده شامل ۱۶۰۰۰ تا ۱۹۰۰۰ گونه هستند که در ۷۵۰ جنس مختلف طبقه بندی شده اند. لگم ها در ۳ زیر خانواده اصلی میموزوئیده، پاپلونوئیده و سنرالپینوئیده قرار می گیرند. اغلب لگم های دانه ای از جمله سویا، باقلا و لوبیا متعلق به زیرخانواده پاپلونوئیده هستند و گیاهان زیر خانواده سنرالپینوئیده و میموزوئیده اکثراً در مناطق گرم و حاره ای پراکنده اند (۱۳) بطوریکه تنها ۷ جنس از زیرخانواده اولی و ۱ جنس از زیرخانواده دومی در مناطق حاره نمی باشند. اغلب جنس ها و گونه های لگم مربوط به مناطق استوایی هستند و زیست خوانهای اجداد آنها احتمالاً بر روی خاکهای آبخویی شده جنگل های بارانی استوایی بوده که لگم های مناطق شبه استوایی و مناطق معتدله از آنها به وجود آمده اند.

لگم ها گیاهان دولپه ای هستند که با باکتریهای ریزوبیومی رابطه همزیستی برقرار می کنند. طبق برآوردهای موجود بیش از نصف نیتروژنی که تثبیت می شود مربوط به کشت و فعالیت لگم ها در تولیدات کشاورزی است به طوری که این مقدار بدست آمده تقریباً دو برابر میزان نیتروژن اضافه شده به خاک به شکل کود است (۴). امروزه کشت و تولید بیش از ۱۰۰ نوع گیاه لگم با ارزش در کشاورزی با سطح زیرکشتی در حدود $10^6 \times 250$ هکتار، بخش عمده ای از فرایند تثبیت زیستی نیتروژن را در طبیعت به عهده می گیرند (۲).



شکل ۲: تشکیل گره های ریشه ای در گیاه میزبان

اثرات همزیستی لگم- ریزوبیوم:

سیستم همزیستی در لگم ها و باکتری های ریزوبیومی بزرگترین و مهمترین سیستم تثبیت کننده نیتروژن در زمین های زراعی است. در این نوع رابطه همزیستی، گیاه میزبان به عنوان ماکروسمبیونت و باکتری ریزوبیومی به عنوان میکروسمبیونت با اعمال تغییرات ساختمانی و فیزیولوژیکی خاص قادر می شوند در شرایط هوازی، نیتروژن اتمسفری را به فرم قابل استفاده گیاه میزبان تثبیت نمایند (۴). تثبیت نیتروژن به روش همزیستی با گیاهان لگم، بیشترین نهاده نیتروژن را به اکوسیستم های طبیعی عرضه می نماید. مقدار نیتروژن تثبیت شده توسط این نوع همزیستی سالانه حدود ۹۰ میلیون تن برآورد شده که تقریباً ۵۰ درصد کل نیتروژن تثبیت شده در سیستم بیولوژیکی و در مقیاس جهانی است. در زمین های کشاورزی این مقدار حدود ۷۰ درصد کل تثبیت نیتروژن می باشد که مقدار نیتروژن تثبیت شده برحسب گونه، واریته گیاه، سویه باکتری، شرایط خاک، اقلیم و عملیات زراعی کاملاً متغیر است ولی در شرایط مناسب مقدار نیتروژن تثبیت شده به روش زیستی می تواند حدود ۲۵ کیلوگرم در هکتار در سال تخمین زده شود (۱ و ۲). بوسن گالت در مطالعات مزرعه ای خود در سال های ۱۸۳۷ تا ۱۸۴۲ به اهمیت لگم ها در افزایش نیتروژن خاک اشاره کرده است که اهمیت گره های ریشه ای در تثبیت نیتروژن در سال ۱۸۸۶ توسط هلریگل و ویلفارث بیان شده است البته تا مدت های مدیدی تصور می شد که همزیستی باکتریهای ریزوبیوم و بردی ریزوبیوم منحصر به گیاهان خانواده لگم است ولی در سال ۱۹۷۳ بیجرینک کشف کرد باکتری از جنس *Bradyrhizobium* قادر به ایجاد گره و تثبیت نیتروژن در گیاهی چوبی و نهاندانه و غیرلگم بنام پارسپونیاست. این گیاه که نام

سابق آن ترماست از خانواده اولماسه و گیاهی حاره ای است (۳). مقدار نیتروژن تثبیت شده در این سیستم در حدود ۲۰۰ تا ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار در سال برآورد شده است. محققان با توجه به وجود این موارد استثنایی امیدوارند با کمک بهره گیری از روشهای مهندسی ژنتیک بتوانند این سیستم بیولوژیکی را در بین گیاهان غیرلگم دیگر نیز گسترش دهند و در بخشهای مختلف کشاورزی و جنگلداری مورد استفاده قرار دهند.



شکل ۳: ایجاد گره و تثبیت نیتروژن در گیاهی غیرلگم

مراحل تشکیل گره در گیاهان لگم

اسپرنت (۱۹۹۰) شرح کاملی از مراحل تشکیل گره در لگم های گیاهانی مثل سویا، شبدر، یونجه ونخود سبز را ارائه داده است. به طوریکه چارچوب ارائه شده برای بعضی دیگر از گیاهان مانند بادام زمینی به گونه دیگری است (۱۱) که به اختصار به شرح آن می پردازیم:

۱- مرحله تکثیر باکتری در ریزوسفر و اشغال ریشه : باکتری ریزوبیوم می تواند در خاک زندگی ساپروفیتی و یا آزاد داشته باشد ولی برای تشکیل گره در ریشه، ریزوبیوم باید به طریقی به سمت ریشه گیاه جذب شود که مکانیسم آن به شکل جذب شیمیایی و یا الکتریکی است. در جذب شیمیایی ترشح مواد جاذب توسط ریشه های گیاه میزبان برای ریزوبیوم ها موثر است به طوری که ممکن است موادی مانند اسیدهای آمینه، قندها و اسیدهای کربوکسیلیک ترشح شوند که به جز ریزوبیوم ها برای سایر ریز موجودات خاکزی نیز جاذب هستند ولی گاهی اوقات مواد ترشح شده کاملاً اختصاصی است به طور مثال در نخود موادی مثل هوموسرین که یک اسید آمینه اختصاصی است ترشح می شود که برای باکتری همزیست با نخود یعنی ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسه منبع کربن و نیتروژن محسوب می شود. با ترشح این مواد ریزوبیوم ها در ریزوسفر گیاه میزبان تکثیر شده و در این حین ژنهای مسبب

گره در ریزوبیوم ها با بعضی مواد ترشحي ریشه ها که اخيراً روی فلاونوئیدها تأکید شده است القا می شوند و معمولاً فلاونوئیدها برای ریزوبیوم های هر گیاه کاملاً اختصاصی هستند مثلاً فلاونوئید ترشح شده از سویا به دایدزن معروف است.

فرآوردهٔ ژن های *nod*، مواد لیپوالیگوساکاریدی خاصی به نام فاکتورهای *nod* هستند که ساختمان شیمیایی اختصاصی بر حسب نوع گیاه میزبان دارند. با تولید و ترشح این مواد تغییر شکل تارهای کشنده و تقسیم های سلولی اولیه برای تشکیل گره آغاز می شود.

۲- مرحله اتصال ریزوبیوم به ریشه : اتصال ریزوبیوم به ریشه گیاه میزبان مرحله ای اختصاصی است و معمولاً توسط ترکیبات خاصی که از سوی دو طرف همزیست انتشار می یابد امکان پذیر می شود. موادی که گیاه میزبان ترشح می کند از ترکیبات لکتین بوده و نوع خاصی از پروتئین های گیاهی است در صورتی که مواد ترشح شده توسط باکتری انواعی از پلی ساکاریدهای سطحی (EPS)، مواد لیپوپلی ساکاریدی (LPS) پلی ساکاریدهای کپسولی (CPS) و یا *B 1-2 glucans* و *Cyclic* می باشد این مواد معمولاً دارای جایگاه های خاصی برای ترکیب با لکتین های گیاهی هستند و سبب اتصال ریزوبیوم به سطح ریشه گیاه می شوند (۱۱ و ۱۲).

۳- خمیدگی و انشعاب تارهای کشنده : بسیاری از محققان بروز تغییرات مورفولوژیک در تارهای کشنده ریشه گیاه را به دلیل ترشح فاکتورهای نود (*nod*) توسط ریزوبیوم ها دانسته اند. ظاهراً عصایی شدن پیش نیازی برای آلودگی است و حالت اختصاصی ندارد، ولی نحوهٔ خمیدگی اختصاصی بوده و برای میزبانهای مختلف کاملاً متفاوت است. مثلاً در سویا خمیدگی تار کشنده در سطح ریشه ایجاد شده و بدون انشعاب است ولی در شبدر و نخود معمولاً تارهای کشنده قبل از خمیدگی طویل شده و ممکن است حالت اشعابی نیز پیدا کنند.

۴- آلودگی ریشه : معمولاً آلودگی ریشه های گیاه میزبان به سه شکل متفاوت انجام می شود که عبارتند از : آلودگی از طریق تارهای کشنده، زخم ها و شیارهای روی ریشه و در نهایت از طریق سلول های پوست ریشه.

آلودگی از طریق تارهای کشنده در مورد اکثر لگم ها مثل سویا فرآیند عمده آلودگی است. در این فرآیند کالاهام و توری بیان داشته اند که باکتری در فضای خمیدگی تار کشنده و در مجاورت با متابولیسم ریشه قرار می گیرد و میزبان در این نقطه با حرکت سریع سیتوپلاسمی سبب داخل شدن باکتری به سلول می شود و به طور موضعی هضم مواد پکتینی با فرآیندهای آنزیمی انجام می شود. پس از نفوذ باکتری به درون تار کشنده، باکتری ریزوبیوم توسط دیواره سلولی جدیدی محصور می شود که منشأ آن قسمتی از خود باکتری و یا گلیکوپروتئین های گیاهی است که به این ترتیب ساختمان لوله ای شکلی به نام رشته آلودگی به وجود می آید.

فرآیند آلودگی از طریق زخم ها و شکاف های روی ریشه بیشتر در مورد گیاهانی از خانواده لگومینوز مثل بادام زمینی دیده می شود که در آنها شروع آلودگی از محل شکاف های ایجاد شده برای خروج ریشه های فرعی است.

فرآیند آلودگی در گیاهان چوبی از خانواده لگومینوز که معمولاً تارهای کشنده تولید نمی کنند و آلودگی از طریق زخم ها هم نمی باشد مثل گیاه سیموزا اسکابرا به طور عمده از طریق نفوذ از بین سلول های اپیدرمی ریشه های جوان صورت می گیرد (۱۱).

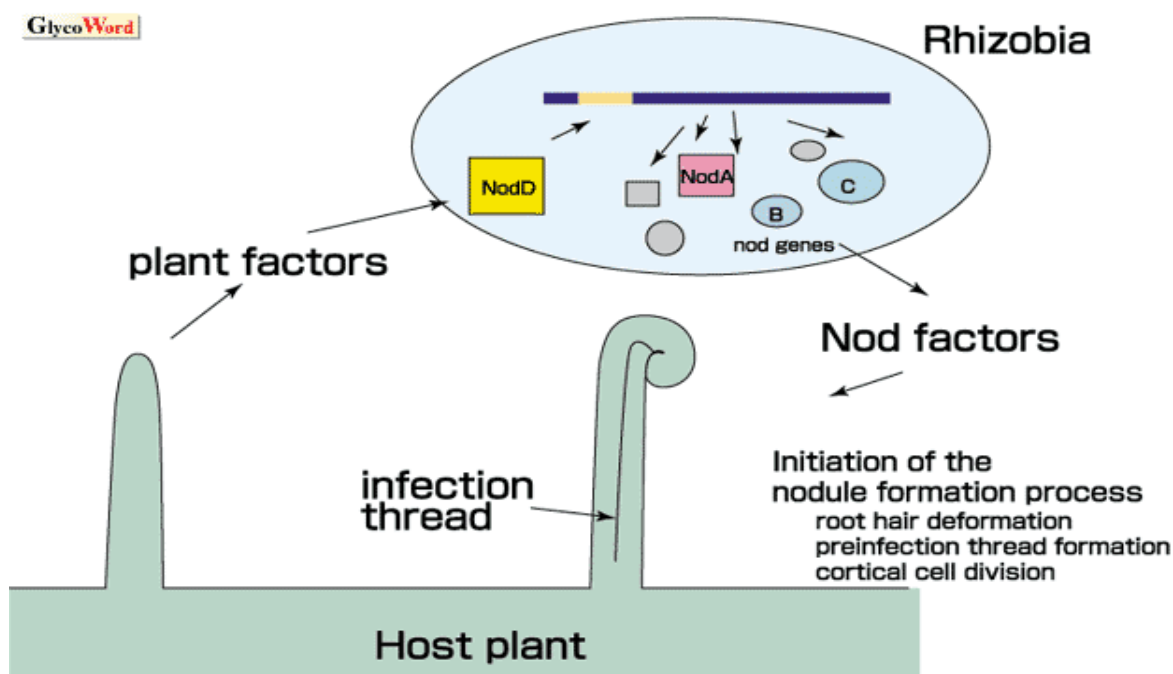
۵ - تشکیل گره : غالباً شروع تقسیم سلولی نتیجه آلودگی نیست بلکه در گیاهانی مثل سویا و یونجه تقسیمات ابتدایی سلولی قبل از آلودگی تارهای کشنده انجام می شود. برای آلوده شدن سلول های گیاهی به باکتری و تبدیل آنها به گره سه حالت وجود دارد:

در حالت اول معمولاً هر سلول منفرد در یک گره جوان با یک رشته مجزا از نوار آلودگی تلقیح می شود که در این حالت ممکن است بعضی سلولها آلوده نشده و بدون باکتری نیز باقی بمانند این الگو در گره هایی با رشد نامحدود مثل گره های یونجه و شبدر دیده می شود اما در الگوی دوم تعداد محدودی از سلولها ممکن است توسط رشته هایی از نوار آلودگی آلوده شوند سپس این سلول ها و باکتری های همراه آنها تقسیم شده و تشکیل گره هایی با رشد محدود مثلاً در گره های سویا را دهند. در نوع سوم یک یا بیش تر سلولها ممکن است به وسیله توده ای از باکتری ها که در واقع یک نوار آلودگی سازمان یافته به نام زوئوگلو می باشند آلوده شوند. تعدادی از این سلولها از بین می روند ولی بقیه سلول های آلوده شده با تقسیمات پی در پی ، گره را به وجود می آورند. در این حالت نوار آلودگی وجود ندارد و تشکیل آن در واقع مرحله ای اساسی در تشکیل گره نیست. این نوع آلودگی در گیاهانی مثل بادام زمینی، استایلوسانتز و آشینومن دیده می شود. ویژگی عمده ای که در گره های لگوم تغییر ناپذیر است سیستم آوندی پیرامونی در گره است که در گیاهان اکتینوریزی یا در گره های پاراسپونیا دیده نمی شود (۱۱).

۶ - آزاد شدن باکتری از نوار آلودگی : در این مرحله باکتری ها پس از جدا شدن از نوار آلودگی و رها شدن در سلول میزبان درون غشای باکترئیدی (PBM) محصور می شوند و تغییراتی در هردو طرف همزیست ایجاد می شود که در مورد باکتری می توان به تغییر فرم باکتری به باکترئید، سنتز پلی ساکاریدهای کپسولی (CPS) و تولید آنتی ژن سطحی خاصی که در حالت آزاد ریزویوم وجود ندارد اشاره کرد. در گیاه میزبان ، معمولاً در این مرحله است که ساخت ترکیبات پروتئینی بنام نودولین که در تولید گره اختصاصی هستند و در ساخت غشای باکترئیدی نیز نقش دارند شروع می شود. به نظر می رسد غشای باکترئیدی نقش اساسی در کنترل مبادله متابولیت ها بین دو طرف همزیست دارد. فرآیند آزاد شدن باکتری از نوار آلودگی در پاراسپونیا انجام نمی شود و فاریا و همکارانش (۱۹۸۷)

نشان دادند که این عمل حداقل در ۱۲ جنس از لگم ها که در زیرخانواده سزالپینوئیده هستند انجام نمی شود و گفته می شود که این عمل بستگی به ژنوتیپ گیاه دارد چون دیده شده است که یک سویه خاص ریزوبیوم در بعضی گیاهان قادر و در بعضی دیگر ناتوان در خروج از نوار آلودگی بوده است (۱۱).

۷ - مرحله شروع تثبیت نیتروژن : در گره های گیاهانی چون سویا و نخود ، ساخت آنزیم نیتروژناز معمولاً در فاصله بسیار کوتاهی پس از آزاد شدن باکتری از نوار آلودگی آغاز می شود. تقریباً در همین زمان ساخت ماده لگ هموگلوبین توسط سلول های گیاهی شروع می شود که به گره های فعال، رنگ صورتی می بخشد. این ماده کنترل کننده جریان دائمی O_2 با فشار کم به طرف آنزیم نیتروژناز می باشد. فشار کم اکسیژن همچنین برای فرآیندهایی مثل سنتز نیتروژناز و برقراری سیستم انتقال آمونیم در باکتریوئیدها لازم است. در *Rhizobium* و *Bradyrhizobium* ساخت و عمل نیتروژناز معمولاً همزمان با بازداشتن فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز (GS) است تا باکتریوئیدها قادر به احیای N_2 - NH_4^+ بوده و نتوانند NH_4^+ را مصرف و تبدیل به ترکیبات آلی کنند و ماده حاصله نیز بتواند در گیاه میزبان مصرف شود.



شکل ۴: مراحل اولیه آلودگی ریشه گیاه میزبان به باکتری

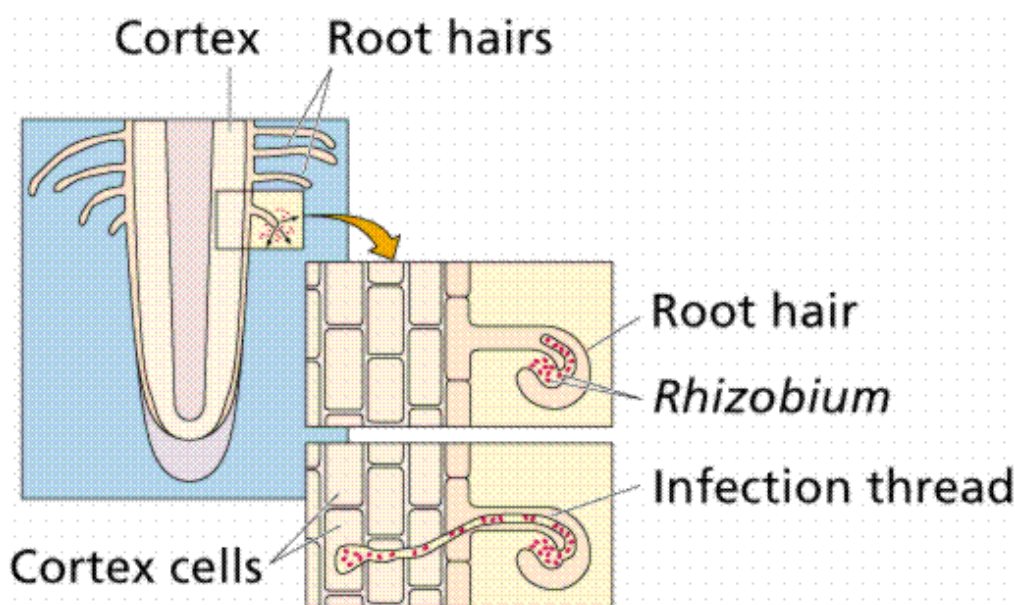
انواع ساختمان گره :

معمولاً گره های ریشه ای ایجاد شده در گیاهان لگم دارای ۲ شکل مشخص هستند.

۱ - گره هایی با رشد نامحدود: در این نوع گره ها انتقال نیتروژن تثبیت شده بلافاصله پس از تشکیل گره شروع می شود ولی رشد گره و آلوده شدن سلول های جدید می تواند در طول فصل رویشی و در گیاهان چندساله تا سالها بعد ادامه پیدا کند. گره های شبدر و یونجه از این نوع می باشند.

۲ - گره هایی با رشد محدود: در گره های با رشد محدود ابتدا نیتروژن تثبیت شده صرف رشد گره شده و پس از اینکه رشد آنها به حد کافی رسید به گیاه میزبان منتقل می شود. از این نوع می توان به گره های سویا اشاره کرد. بخش های زیر در ساختمان گره های تشکیل شده قابل تشخیص است (۷ و ۱۱):

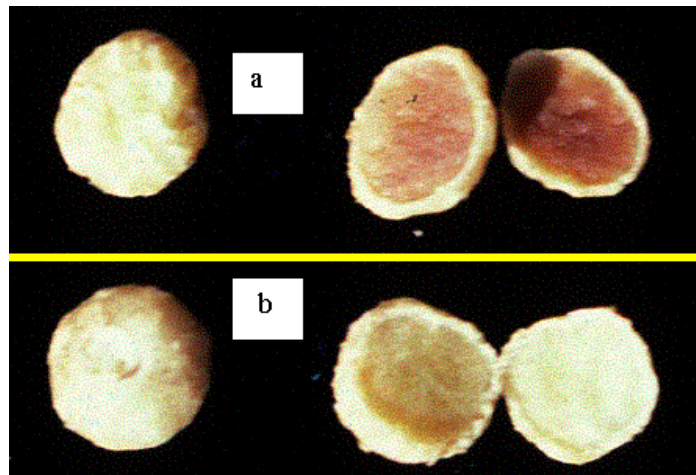
۱ - ناحیه پوست گره یا منطقه کورتکس: معمولاً متشکل از ۴۱۰ ردیف سلولی است که عاری از باکتری ریزوبیوم هستند. این ناحیه متراکم تر از کورتکس ریشه بوده و دارای سلول های کوچکتری می باشند. آوندهای گره که در کناره های آن هستند کار حمل شیره پرورده به گره و انتقال نیتروژن تثبیت شده به بخش هوایی گیاه را انجام می دهند. در گره های اکتینوریزی و یا گره های گیاه پاراسپونیا ناحیه آوندی در مرکز گره است.



شکل ۵: نحوه وارد شدن باکتری و آلوده شدن سلول های ریشه گیاه

۲ - ناحیه مرکزی: این ناحیه محل اصلی تثبیت نیتروژن بوده و سلول های باکتری همراه با سلولهای غیر آلوده در کنار یکدیگر قرار می گیرند معمولاً سلول های آلوده به باکتری درشت تر بوده و باکتریها توسط دیواره باکتریایی محصور شده اند که معمولاً ماده لگ هموگلوبین بین این دیواره و باکتریها قرار می گیرد.

۳- ناحیه مریستمی: موقعیت و اندازه منطقه مریستمی به گیاه میزبان بستگی دارد و تعیین کننده شکل و اندازه گره است. مثلاً در یونجه و شبدر مریستم انتهایی است و سبب طولیل شدن گره می شود در حالیکه در *Lupinus* به صورت جانبی بوده و با رشد افقی دور ریشه قرار می گیرد. گره های گرد مثل سویا از انواع با رشد محدود و فاقد مریستم می باشند.



شکل ۶: مقایسه گره های فعال و غیر فعال (a) گره های صورتی فعال ، b گره های غیر فعال سبز متمایل به قهوه ای)

عوامل موثر در همزیستی لگم - ریزوبیوم :

تمام عواملی که فتوسنتز گیاه ، زندگی و بقای باکتریهای ریزوبیومی را در خاک تحت تاثیر خود قرار می دهند بر همزیستی بین گیاهان لگم و ریزوبیوم ها موثرند که به اختصار می توان این موارد را در سه دسته عوامل بیولوژیکی ، محیطی و تغذیه ای بررسی کرد (۹ و ۱۶). از نقطه نظر بیولوژیکی ، شرایط ژنتیکی گیاه میزبان و میکروارگانسیم همزیست در ایجاد رابطه همزیستی بین دو موجود زنده و انجام فرایند تثبیت نیتروژن تاثیر دارد . عوامل محیطی و تغذیه ای نیز هر یک با اثر گذاری در مواد ساخته شده طی فرایند فتوسنتز ، تثبیت نیتروژن را تحت تاثیر قرار می دهند که از مهمترین این عوامل می توان به موارد زیر اشاره کرد :

۱- درجه حرارت : درجه حرارت خاک اثر مستقیمی روی گره بندی و فعالیت گره ها دارد ولی درجه حرارت هوا ممکن است به طور غیرمستقیم با اثر گذاری بر فرایند فتوسنتز گیاه در گره بندی و تثبیت نیتروژن نیز تاثیر گذارد . وبر و میلر (۱۹۷۲) با مطالعه بر روی *B. japonicum* دریافتند حرارت خاک ممکن است روی برقراری همزیستی بین دو جزء اصلی همزیست تاثیر بگذارد . درجه حرارت بالای خاک بر جوانه زنی و زیست ریز جانداران خاک از جمله ریزوبیوم اثری منفی دارد ، اگرچه مارشال (۱۹۶۴) گزارش کرد که ریزوبیوم ها می توانند تا مدتی در حرارت بیش تر از ۷۰ درجه سانتیگراد هم زنده بمانند . البته دوام و بقای این باکتری ها در خاکهای سنگین و رسی و دارای مواد آلی بیش تر است (۶ و ۱۰) . به طور کلی مقاومت باکتریها به درجه حرارت بالا در خاک خشک بیش

تر از خاک خیس است. درجه حرارت پایین سبب کاهش رشد گیاه، گره بندی و در نهایت مقدار تثبیت نیتروژن را به شدت کاهش می دهد. به طور کلی درجه حرارت بهینه برای رشد و تثبیت نیتروژن بین گونه های مختلف گیاهان لگم نیز متفاوت بوده که این تفاوت به سازگاری گیاه و محیط رشد آن مربوط می شود. (۱۱ و ۷)

۲- خشکی: کمبود رطوبت تاثیر مهمی در رشد گیاه، گره بندی و به دنبال آن تثبیت نیتروژن دارد. پان کرس و اسپرنت (۱۹۷۵) تاثیر خشکی روی تثبیت نیتروژن را از طریق کاهش فعالیت تنفسی گره ها عنوان کرده اند، در حالیکه مین چین و بیت (۱۹۷۵) این تاثیر را از طریق کاهش انتقال نیتروژن تثبیت شده از گره ها به سلول میزبان و محققان دیگر کاهش فتوسنتز در اثر خشکی را عامل مهمی در کاهش تثبیت نیتروژن دانسته اند. مطالعات نشان داده که در میان لگم ها، سویا از جمله گیاهانی است که حساسیت بیش تری نسبت به خشکی دارد، به طوریکه در بعضی آزمایشات انجام شده، تنش های خشکی سبب کاهش مقدار محصول به حدود صفر شده است (۱۱). در لگم های دیگر مانند نخود گاوی به دلیل داشتن سیستم ریشه ای عمیق نسبت به خشکی مقاوم تر می باشند. خشکی همچنین بر روی جمعیت باکتری ریزوبیوم تاثیر گذاشته و آن را کاهش می دهد. بوش بی و مارشال (۱۹۷۷) عنوان کرده اند که بردی ریزوبیوم ها نسبت به ریزوبیوم ها در کوتاه مدت در برابر خشکی مقاوم ترند ولی سایر محققان چنین رابطه ای را بین خشکی و سویه های تندرشد و کندرشد پیدا نکرده اند (۵ و ۱۱).

۳- غرقاب: غرقاب شکلی از حالت های رطوبتی خاک است که در برقراری همزیستی و حیات دو جزء اصلی همزیست اهمیت دارد. اگر در خاک های غرقاب مواد آلی زیادی وجود داشته باشد، اکسیژن مولکولی به سرعت کاهش پیدا کرده و حالت بی هوازی ایجاد می شود و این در حالی است که ریزوبیوم یک باکتری هوازی بوده و در شرایط غرقاب زندگی آن مختل می شود. البته محققانی مثل دانیل و همکاران (۱۹۸۲) گزارش کرده اند که بعضی از سویه های *rhizobium* B و R. *meliloti* قادر به احیای تنفسی نترات بودند، بنابراین می توانستند در شرایط بی هوازی زندگی کنند. مشکل ناشی از غرقاب خاک و تاثیر آن روی همزیستی مخصوصاً در تناوب زراعی لگم ها با برنج اهمیت بسیاری می یابد. در خاک های غرقاب علاوه بر این که تنفس ریشه های لگم مختل می شود ممکن است غلظت عناصری مانند آهن و منگنز به حدی بالا رود که برای گیاه و باکتری ریزوبیوم سمی شود که در این حالت اثر مخربی روی همزیستی و تثبیت نیتروژن خواهد گذاشت (۶ و ۷).

۴- واکنش خاک: pH اسیدی سبب کاهش رشد و تکثیر ریزوبیوم ها و همچنین افزایش سویه های غیرفعال و کاهش فرایند آلودگی می شود. مشکل دیگری که از pH اسیدی ناشی می شود شامل تغییرات شیمیایی در خاک است که می توان به بالا رفتن غلظت عناصری چون آلومینیوم، آهن و

منگنز در محلول خاک اشاره کرد که حتی گاهی تا مقادیر سمی هم می رسند. از طرفی ممکن است در این شرایط مقدار عناصر فسفر، مولیبدن و کلسیم کاهش یابد، که سبب کاهش رشد گیاه و در نتیجه کاهش گره بندی و تثبیت نیتروژن می شود. وینسنت (۱۹۶۵) با مطالعه بر روی گونه های ریزوبیوم نتیجه گرفت که *R. meliloti* حساس به pH اسیدی، *R. tripholi* دارای حساسیت کمتر و *B. japonicum* مقاوم به pH اسیدی است. آندریوز (۱۹۷۶) دریافت گیاهانی که از نظر منبع نیتروژنی متکی به نیتروژن معدنی هستند که نسبت به pH حساس تر از گیاهانی می باشند که تغذیه نیتروژنی آنها از راه تثبیت بیولوژیک است. در میان لگم های دانه ای نخود گاوی و بادام زمینی نسبت به pH اسیدی مقاوم تر از سویا و لوبیا هستند (۷ و ۱۱).

۵- عناصر غذایی: لگم ها همانند سایر گیاهان سبز نیاز به عناصر غذایی ماکرو (پرمصرف) و میکرو (کم مصرف) دارند. از جمله عناصر غذایی که نقش مهمی در گره بندی و تثبیت نیتروژن دارند می توان به بر، کبالت، مس، آهن، مولیبدن، نیکل، سلنیم و روی اشاره کرد که به اختصار در مورد نقش عمده آنها بحث می شود. بر به طور عمده در تقسیمات سلولی گره نقش دارد و کبالت هم در ساختمان ویتامین B₁₂ که مورد نیاز باکتری است سهم عمده ای دارد ولی نقش مس تقریباً در لگم ها ناشناخته مانده است. آهن در ساختار پروتئینی آنزیم نیتروژناز و لگک هموگلوبین از اجزای اساسی محسوب می شود. مولیبدن در جزء دوم آنزیم نیتروژناز یا پروتئین دارای آهن و مولیبدن، نیکل در فعالیت آنزیم اوره آز لگوم ها و هیدروژناز جذبی ریزوبیوم، سلنیم در هیدروژناز جذبی و روی نیز احتمالاً در سنتز لگک هموگلوبین نقش عمده ای دارند. در میان عناصر پرمصرف نقش فسفر در رشد، گره بندی و تثبیت نیتروژن به اثبات رسیده است که علاوه بر آن در سنتز ATP نیز مشارکت دارد. همچنین عنصر کلسیم نیز در اتصال اولیه به ریشه لگم ها موثر است (۷ و ۱۱).

۶- شوری: فعالیت گره ها ممکن است به چند طریق تحت تاثیر شوری قرار گیرد. شوری خاک سبب کاهش گره بندی و در نتیجه کاهش مقدار تثبیت نیتروژن می شود. در شوری زیاد آب گره ها تحت اثر قانون اسمز از آنها خارج و در نتیجه فعالیت گره ها مختل می شود. زهران و اسپرنت (۱۹۸۶) بیان کردند که نمک کلرید سدیم (Na Cl) سبب کاهش کلنی زاسیون ریشه و عصبایی شدن تارکشنده می شود و مقدار تارهای کشنده آلوده را به حدود ۳۰ درصد کاهش می دهد. سینگلتون و بهلول (۱۹۸۴) نشان دادند که گره بندی سویا در $EC = 8 \text{ ds/m}$ به طور کامل متوقف می شود. از طرفی نوع گیاه لگم و ژنوتیپ های مختلف آنها نیز از نظر حساسیت به شوری کاملاً متفاوتند. به طور مثال در سویا به دلیل عدم جذب یون کلر مقاومت بیشتری به شوری دارد. به هر حال شوری با تاثیر بر هر دو جزء موثر در فرایند همزیستی موجب کاهش میزان تثبیت بیولوژیکی نیتروژن می گردد که علاوه بر تاثیر بر فیزیولوژی همزیستی ممکن است تنش روی تعداد و اندازه گره ها نیز تاثیر بگذارد (۷ و ۱۱).



شکل ۷: تاثیر عوامل محیطی نامناسب بر اندازه گره های تشکیل شده در ریشه گیاه میزبان

شکل فوق تشکیل گره در ریشه های سویا را نشان می دهد که گره های سمت چپ تصویر در مقایسه با گره های مقابل آن کوچکتر و غیر موثر دیده می شوند و وجود این اختلاف در گره بندی ناشی از تفاوت شرایط محیطی است که بر تشکیل گره اثر گذاشته اند .



شکل ۸: تاثیر شرایط مناسب بر گره بندی ریشه میزبان

۷- اثر نیترات : مدت‌هاست که نقش نیتروژن معدنی در ممانعت و یا تاخیر گره بندی و تثبیت نیتروژن مشخص شده ولی مکانیسم تاثیر آن به درستی شناخته نشده است . از این نظر که نیترات بیش تر بر روی گیاه میزبان اثر دارد و یا این که روی باکتری ریزوبیوم موثرتر است هنوز بین محققان اتفاق نظری وجود ندارد . عده ای معتقدند که چون جذب و تحلیل نیترات نیازمند مصرف مواد کربنه آلی است لذا با کاربرد نیترات ، به دلیل رقابت ایجاد شده بین دو فرایند جذب و تحلیل نیتروژن معدنی و تثبیت نیتروژن ، مقدار تثبیت کاهش پیدا می کند (۵، ۷ و ۱۱).

منابع :

۱- خاوازی، کاظم، م. ج، ملکوتی، ۱۳۸۰. ضرورت تولید صنعتی کودهای بیولوژیک در کشور، مجموعه مقالات، نشر آموزش کشاورزی.

۲- ملکوتی، م. ۱۳۷۸. کشاورزی پایدار و افزایش عملکرد با بهینه سازی مصرف کود در ایران، چاپ دوم، نشر آموزش کشاورزی.

۳- نوربخش، ف و کریمیان، ا. ۱۳۷۶. حاصلخیزی خاک. انتشارات غزل.

۴- علی اصغرزاده، ع. ۱۳۷۶. میکروبیولوژی و بیوشیمی خاک. انتشارات دانشگاه تبریز.

5 – FAO Soils Bulletin .1982. Application of nitrogen fixing systems in soil management . No: 49.Rome.

6 – Gibson .A.H and Harper .J.E .1985. Nitrate effect on nodulation of soybean by *bradyrhizobium japonicum* .crop science .25 :492-501.

7 – Giller .K.E and Wilson .K.J .1991. Nitrogen fixation in tropical cropping systems .C.A.B . International UK.

8 – Krieg .N.R and Holt .J.C.1984. Bergeys manual of systematic bacteriology .Volume 1.

9– Lowendorf .H.S.1980. Factors affecting survival of *Rhizobium* in soil .Adv.Microb.Ecol.4:87-124.

10– Somasegaran, P. and Hoben, H. J. 1994. Hand book for Rhizobia methods in legume-*Rhizobium* Technology. Springer-Verlag. New York. U. S. A.

11 – Sprent J.I and Sprent .P.1990. Nitrogen fixing organisms pure and applied aspect. Chapman and Hall.

12– Stacy .G.1992. Biology nitrogen fixation. Chapman and Hall.

13 – Subba Rao. N.S.1982.Advances in agricultural Microbiology .Oxford and IBH publishing Co. New Delhi.

14 - Vessey,K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*. 255: 571-586.

15 - Van K, C.H., M. Havtley;, 2000, Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation. *Field Crops Research*, 65: 165-181.

16 – Werner D.1991. *Symbiosis of plant and Microbes*. Chapman and Hall.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.