

مروری بر نودولاسیون و تثبیت نیتروژن در باکتری های همزیست ریزوبیوم

شاهین مردانی نژاد

گروه علوم پایه، واحد مبارکه، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
shmardaninejad@iau.ac.ir

خلاصه

این مقاله مروری به دلیل اهمیت همزیستی لگوم ها با ریزوبیایها در همه اقلیم ها در تثبیت نیتروژن به بررسی فرایند نودولاسیون و سیگنالینگ تثبیت نیتروژن در باکتری های همزیست ریزوبیا پرداخته شد. در ریشه های گیاهان میزبان، ریزوبیا شکل گیری اندام هایی را که نودول ها نامیده می شوند، به جریان می اندازد. ژن های Nod و Nif کد کننده عمل کاهش نیتروژن در ریزوبیایها می باشند. یک سویه ریزوبیوم می تواند گونه های ویژه ای از لگوم ها را آلوده کند. فلاونوئیدهای ترشح شده توسط سلول های ریشه، ژن های Nod را در باکتری ها القا می کنند که سپس تشکیل نودول را القا می کنند. پروتئین های غشای سلول گیاهی، باکترئوئیدها را احاطه می کنند، این ساختار ها به عنوان سیمبوزوم شناخته می شوند که ممکن است باکتری های متعدد یا تنها یک باکترئوئید را شامل شوند، که در آن جا تثبیت نیتروژن اتفاق می افتد. یک گونه خاص از لگوم ممکن است به وسیله چند جنس ریزوبیایی، نودول زایی کند. یکسری از ژن ها در باکتری ها، جنبه های متفاوت فرایند نودولاسیون را کنترل می کنند. اختصاصی بودن ژن ها تعیین می کند که سویه ریزوبیوم کدام لگوم را آلوده کند. ریزوبیوم ها به طریقه ساپروفیت در خاک زندگی می کنند و بر اساس دو مکانیسم شیمیوتاکسی یا الکتروتاکسی به نزدیکی ریشه گیاه خاص می رسند. تعداد زیادی فلاون، ایزوفلاون و ترکیبات وابسته وجود دارد که در تحریک یا مهار ژن های Nod با یکدیگر تفاوت نشان می دهند. ژن های Nod A-NodB-NodC به صورت مشترک در تمام ریزوبیایها یافت می شود. ترکیبات گیاهی جایگزین (مانند تبائین ها، جاسمونات، گزانتون ها، واینلین و غیره) می توانند بیان ژن Nod را به راه بیاندازند، در نودول سنتز نیتروژناز به طور طبیعی در مدت کوتاهی پس از آزادی باکتری ها از رشته های آلودگی، انجام می شود. نودول ها بر اساس نوع تکوینشان به دو گروه نودول های محدود و نامحدود تقسیم می شوند. مریستم نودول از سلول های خارجی پوست متمایز می شود که عمر کوتاهی دارند. نودول های نامحدود مانند آلفا آلفا، نخود و شبدر ساختار بسیار متفاوتی نسبت به نودول های محدود دارند، این نودول ها استوانه ای شکل اند و از پوست یا کورتکس درونی متمایز می یابند. در نودول های نامحدود سیمبوزوم های انفرادی با باکترئوئیدها تقسیم می شوند در نتیجه باکترئوئیدهای منفرد درون یک سیمبوزوم قرار دارند.

کلمات کلیدی: تثبیت نیتروژن، نودولاسیون، ریزوبیوم، باکتری های همزیست

۱. مقدمه

همزیستی ها برای زندگی یوکاریوتی و منبع اصلی تکاملی نوظهوری، ضروری هستند. یکی از همزیستی هایی که زیاد مطالعه شده، همزیستی لگوم های گیاهی و مجموعه باکتریاهایی به نام ریزوبیا است. این دو در همزیستی تثبیت نیتروژن از اهمیت اکولوژیکی عمده که روی همه (اقلیم ها) قاره ها رخ می دهد و یک چهارم نیتروژن تثبیت شده سالانه را شامل می شود، شرکت می کنند. در این همزیستی، بیش از ۱۸۰۰۰ گونه لگوم و یک مجموعه بسط یافته از پروتوباکتری ها دخالت می کنند. ریزوبیا (که معنی آن ریزوبیوم است) در اینجا به عنوان اصطلاح جمعی که باکتری های قادر به تشکیل همزیستی تثبیت نیتروژن با لگوم ها را شامل می شود، استفاده می شود. [Puppo M and et al., 2023]. در ریشه های گیاهان میزبان، ریزوبیا شکل گیری اندام هایی را که نودول ها نامیده می شوند، به جریان می اندازد. این درون همزیست ها، N_2 را می کاهند که بعداً توسط گیاه میزبان اسیمیل می شود. گروههایی از این ژن های (Nodulation) Nod و Nif (Nitrogen fixation)، این عمل را در اغلب ریزوبیها کد می کنند.

این تنوع در همزیستی ریزوبیوم- لگوم، پرمعنی هست. برای مثال، بسیاری اختلافات فنوتیپی راجع به تعیین محل، شکل و آناتومی نودول ها و همچنین روش آلودگی و وضعیت های تمایز یابی درون همزیستی ها در طبیعت روبه رومی شوند که اغلب تحت کنترل گیاه هستند. علاوه براین، داده های اخیر نشان می دهند که استراتژی های ژنتیکی باکتریایی گوناگون منجر به همزیستی می شوند، بنابراین این ادعا را حمایت می کند که ریزوبیا ها تا حد زیادی به صورت مستقل توسعه می یابند [Masson-Boivin C. and et al., 2018].

۲. مقاله کامل

نیتروژن یک جزء ضروری برای سنتز پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و ترکیبات دیگر که حاوی نیتروژن هستند، در همه ارگانیسم های زنده هست. اتمسفر زمین در حدود ۸۰ درصد از نیتروژن دارد. اما این گاز در این شکل نمی تواند توسط اغلب موجودات زنده استفاده شود، تا زمانی که تثبیت نشده است [Mardani-Nejad and et al., 2003] این گاز در ترکیب با هیدروژن احیا شده و به آمونیاک تبدیل می شود. گیاهان سبز، از این منبع نیتروژن تثبیت شده برای ساخت پروتئین ها، استفاده می کنند [Allito, B.B and et al., 202]. میکروارگانیسم ها (تجزیه کننده ها) پروتئین ها را می شکنند و نیز ارگانیسم های مرده و یون های آمونیوم را آزاد می کنند. این دو فرایند، قسمتی از سیکل نیتروژن را تشکیل می دهند (شکل ۱-).

۲.۱ سیکل نیتروژن:

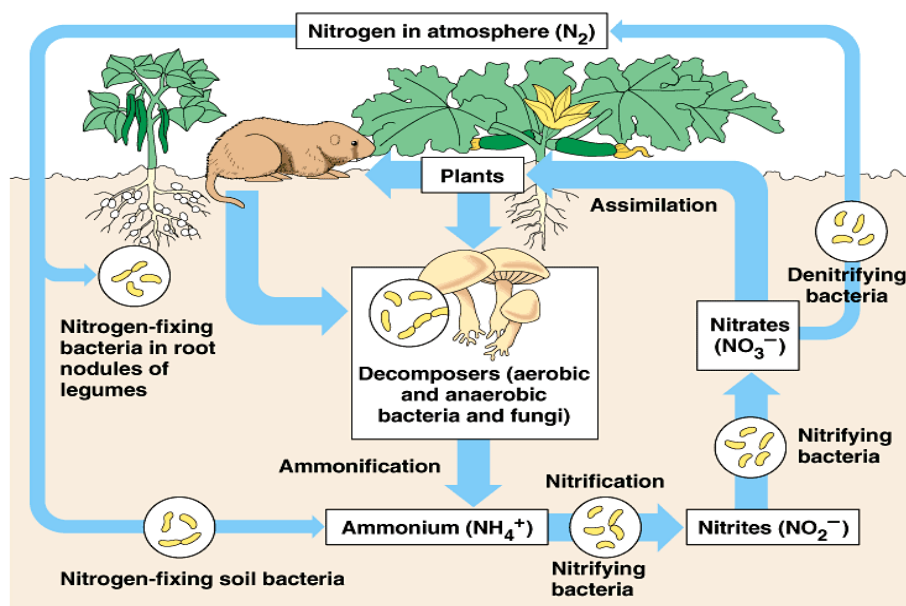
سیکل نیتروژن یک سری از فرآیندهایی است که گاز نیتروژن را به مواد آلی تبدیل می کنند و نیتروژن را به طبیعت بر می گردانند. آن یک سیکل مداوم است که توسط تجزیه کنندگان و باکتری های نیتروژن، حفظ می شود. سیکل نیتروژن می تواند به چهار مرحله تقسیم شود و میکروارگانیسم ها در همه ی این مراحل نقش ایفا می کنند [Lucinski R. and et al., 2002].

مرحله ۱. تثبیت نیتروژن: سنتز همه ترکیبات نیتروژن دار. گاز نیتروژن به اشکال دیگر که قابل استفاده برای سایر ارگانیسم ها است، تثبیت می شود. در این مرحله باکتری های تثبیت کننده نیتروژن دخالت دارند مانند ریزوبیوم و هم در شرایط هوازی و هم بی هوازی می تواند صورت گیرد.

مرحله ۲. تبدیل آمونیومی: تجزیه کنندگان، باکتری های ویژه خاک و قارچ ها، پروتئین ها را در ارگانیسم های مرده و مواد دفعی حیوانی می شکنند و یون های آمونیوم را آزاد می کنند که می تواند به دیگر ترکیبات نیتروژنی تبدیل شود. این عمل توسط تجزیه کنندگان صورت می گیرد و هم در شرایط هوازی و هم بی هوازی رخ می دهد.

مرحله ۳. نیتریفیکاسیون: نیتریفیکاسیون یک فرایند دو مرحله ای است. آمونیاک یا یون های آمونیوم، ابتدا به نیتريت و سپس به نترات اکسیده می شوند که بیشترین فرم قابل استفاده برای گیاهان هست. توسط باکتری های نیتروزوموناس و نیتروباکتر و در شرایط هوازی صورت می گیرد.

مرحله ۴. دنیتریفیکاسیون: نترات ها به گاز نیتروژن احیا می شوند، نیتروژن به هوا بر می گردد و سیکل کامل می شود توسط باکتری های دنیتریفیکا و در شرایط غیر هوازی صورت می گیرد.



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

شکل ۱- سیکل نیتروژن در طبیعت

تثبیت نیتروژن: نیتروژن به سه طریق می تواند تثبیت شود:

- ۱- تثبیت اتمسفری: که به طور خودبخود به خاطر نور اتفاق می افتد، مقدار خیلی کمی از نیتروژن جو به این روش تثبیت می شود.
- ۲- تثبیت صنعتی: که طی فرایند هابر صورت می گیرد و به انرژی بالایی نیاز است. از آن در ساختمان کودهای نیتروژنی استفاده می شود.
- ۳- تثبیت زیستی: که توسط باکتری های تثبیت کننده نیتروژن صورت می گیرد که ۶۰ درصد از گاز نیتروژن را تثبیت می کنند. از جمله باکتری های آزاد تثبیت کننده نیتروژن ازتوباکتر (هوازی) و کلستریدیوم (غیرهوازی) می باشند و از باکتری

های همزیست تثبیت کننده نیتروژن، باکتری هایی که با گیاهان لگومینوزه همزیست می شوند مانند ریزوبیوم و باکتری هایی که با گیاهان غیر لگومینوزه همزیست می شوند مانند فرانیکا را می توان نام برد.

۲-۲ اهمیت تثبیت نیتروژن در کشاورزی:

تثبیت نیتروژن توسط ریزوبیا، در کشاورزی اهمیت زیادی دارد. لگوم هایی مانند نخود، لوبیا، سویا، آلفا آلفا، عدس و شبدر، به تغذیه حیوانات تولید کننده گوشت جهان همچنین انسان ها، کمک می کنند. بازده محصول در گیاهان نودوله، به شدت بهبود می یابد. همچنین، لگوم ها می توانند در خاک های فقیر جایی که نیتروژن تثبیت شده به مقدار کافی برای حمایت انواع دیگر گیاهان وجود ندارد، به خوبی رشد کنند. پس از جمع آوری ریشه های لگوم پوسیدگی خاک در باقی می ماند، که ترکیبات نیتروژن آلی برای جذب توسط نسل بعدی گیاهان، آزاد می کند. کشاورزان سود این کود طبیعی را به وسیله چرخش محصول لگومینوزه با یک محصول غیر لگومینوزه، می گیرند [Angela Sessitsch and et al. 2013]. تثبیت نیتروژن به روش طبیعی، استفاده از کودهای شیمیایی را کاهش می دهد. این نه تنها، هزینه زیادی را کاهش می دهد، بلکه از مشکلات زیادی که به وسیله استفاده فرایند از نیتروژن تجاری و کودهای آمونیاکی مانند مردابی شدن رودخانه ها و دریاچه ها، تولید باران اسیدی و رشد بیش از اندازه زمین کشاورزی توسط محصولات غیر غذایی، جلوگیری می کند [Sessitsch A. et al., 2002].

۲-۳ ریزوبیوم:

ریزوبیوم شناخته ترین گونه ها از یک گروه باکتریایی هست که به عنوان همزیست تثبیت کننده نیتروژن عمل می کند. شش جنس از ریزوبیا به عنوان عامل مولد ندول شناسایی شده اند که عبارتند از: ریزوبیوم، برادی ریزوبیوم، سینو ریزوبیوم، آزو ریزوبیوم، آللو ریزوبیوم و مزو ریزوبیوم. این باکتری ها می توانند ریشه های گیاهان لگومینوزه را آلوده کرده و منجر به تشکیل لومپ ها (توده) یا گرهک ها شوند که در آن ها تثبیت نیتروژن اتفاق می افتد که برای گیاهان بسیار مهم هست [Sessitsch A. et al., 2002]. سیستم آنزیمی باکتریایی یک منبع دائمی (ثابت) نیتروژن برای گیاه میزان فراهم می کند و گیاه، مواد غذایی و انرژی را برای فعالیت های باکتری در اختیار آن قرار می دهد. تقریباً ۹۰ درصد لگوم ها می توانند نودوله شوند (شکل ۲-).

در خاک، باکتری ها دارای زندگی آزاد و متحرک هستند و از بقایای موجودات مرده تغذیه می کنند ریزوبیای آزاد نمی تواند نیتروژن را تثبیت کند و آن ها شکل متفاوت از باکتری های پیدا شده در نودول های ریشه دارند. ساختار آن ها منظم است و به شکل میله راست دیده می شوند. در نودول های ریشه، شکل تثبیت کننده نیتروژن به صورت سلول های نامنظم به نام باکترئید حضور دارد که اغلب گریزی و ۷ شکلند. اعضای این خانواده باکتریایی قادر هستند در گیاهان دسته لگوم (بقولات) و گیاهان غیرلگوم تولید ندول نمایند که ندول ایجاد شده در اصل یک رابطه همزیستی بین گیاه میزبان و ریزوبیوم ها می باشد. ریزوبیوم باکتری است که در محیط جامد به سرعت رشد می کند. موقعیت ژن های Nif و Nod در آن، عمدتاً روی پلاسمید بوده و حوزه ی میزبانی آن محدود است. برادی ریزوبیوم در محیط جامد دارای یک تاژک قطبی است و در محیط کشت به آهستگی رشد می کند. آزوریزوبیوم در محیط جامد به سرعت رشد می کند. محل ژن های Nif و Nod در آن احتمالاً کروموزوم است و تاکنون فقط یک میزبان گیاهی برای آن تعیین شده است. در باکتری برادی ریزوبیوم، میزبان اصلی سویا است ولی در گونه های دیگر هم ندول زایی می کند. میزبان باکتری آزوریزوبیوم، گیاه سزبانا است ولی در لگومینوزاروم هم ندول می دهد. گونه های برادی ریزوبیوم عبارتند از: برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم، برادی ریزوبیوم الکائی و برادی ریزوبیوم پارسپونیا. باکتری آزوریزوبیوم فقط دارای یک گونه به نام آزوریزوبیوم کائولینودانس می باشد.

باکتری ریزوبیوم دارای گونه‌ها و زیرگونه‌های متعددی است که اکثر آنها در گیاهان لگوم ندول می‌دهند و تعداد محدودی نیز در گیاهان غیرلگوم، ندول‌زا هستند برای مثال ریزوبیوم ملی لوتی در علف گنجشک و ریزوبیوم NG-RZ34 در درختچه-ها و ریزوبیوم هوکوئی در گیاه گون ایجاد ندول می‌کنند [Sessitsh A. et al., 2002].



شکل ۲: نودول‌ها در ریشه شبدر

ریزوبیایا از نظر فیلوژنتیکی، متابولیکی و ژنتیکی متنوعند:

گرچه بیماری‌ها معمولاً توسط دسته‌ای از گروه‌های میکروبی خاص ایجاد می‌شوند، همزیستی لگوم بر باکتری‌های مختلفی از نظر فیلوژنتیکی که در دو ساب کلاس از پروتوباکتری‌ها قرار می‌گیرند، تکیه می‌کند. آنالیز مقایسه‌ای ژنوم‌های مکانس شده ریزوبیا که دارای ۶ تا ۱۲ جنس شناخته شده است، مشخصات بازگشتی متعددی را برجسته می‌کند. همه این ژنوم‌ها بزرگ‌اند و ۷-۱ رپلیکون دارند. ژنوم‌ها شدیداً تغییر پذیرند و برای یک دارایی از انتقال و ژن‌های تنظیمی کد می‌کنند، که تطبیق پذیری متابولیک مورد نیاز برای بقا در خاک را تضمین می‌کنند. ۸ تا از این ژنوم‌ها، یک هسته منحصر به فرد از ۶۴۷ ژن رایج سهمیم‌اند که اختلاف بزرگ را نشان می‌دهد که در محتوای ژنتیکی ریزوبیایا وجود دارند. این آنالیزها همچنین نشان دادند که هیچ ژنی در زمان مشابه، مشترک و ویژه برای ریزوبیا نیستند، نشان می‌دهد که استراتژی ژنتیکی سهمیم منحصر به فرد، نمی‌تواند همزیستی با لگوم‌ها را حمایت کند. بسیاری از ژن‌های همزیستی که در متابولیت، اعمال اداره‌کننده، انتقالی و مقاومت در برابر استرس، دخالت می‌کنند، همولوگ‌های نزدیکی در میکروب‌های غیر همزیست دارند، در حالی که، تعدادی از آن‌ها مانند خوشه Exo (ژن‌های اگونوپلی ساکارید دخیل در آلودگی) در باکتری *Sinorhizobium meliloti*، یک فیلوتوزیع خیلی باریک را نشان می‌دهند [Masson-Boivin C. and et al., 2009].

اختصاصی بودن میزبان‌های گیاهی برای باکتری‌های ریزوبیوم:

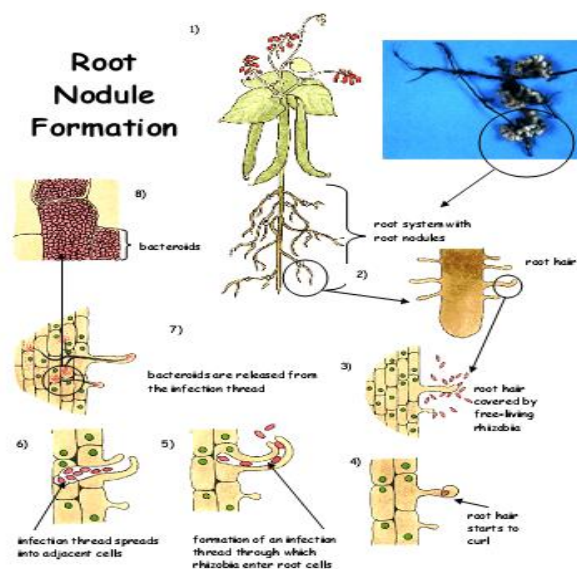
بر اساس مطالعات بارنت در سال ۱۹۸۸، مشخص شد که یک گونه خاص از لگوم ممکن است به وسیله چند جنس ریزوبیایی، ندول‌زایی کند. همچنین یک سویه ریزوبیایی ممکن است میزبان‌های زیادی از زیرفامیل‌های لگومینوزاروم را آلوده کرده و تولید ندول کند. البته هنوز هم فرایند ویژه بین میزبان خاص و ژنوتیپ باکتری همزیست، قائل می‌شود ولی اشتراکاتی نیز وجود دارد. یکسری از ژن‌ها در باکتری‌ها، جنبه‌های متفاوت فرایند نودولاسیون را کنترل می‌کنند. یک سویه ریزوبیوم می‌تواند گونه‌های ویژه‌ای از لگوم‌ها را آلوده کند، اما نه همه لگوم‌ها را مثلاً گیاه نخود میزبان *Rhizobium leguminosarum* واریته *Viciae* است، در حالی که شبدر میزبان *R. leguminosarum* واریته *trifolii* می‌باشد.

اختصاصی بودن ژن ها تعیین می کند که سویه ریزوبیوم کدام لگوم را آلوده کند. حتی ممکن است یک سویه قادر به آلوده کردن لگوم باشد اما نودول های تشکیل شده ممکن است قادر به تثبیت نیتروژن نباشند. چنین ریزوبیاهایی، غیر موثر نامیده می شوند. سویه های موثر ندول های تثبیت کننده نیتروژن را القا می کنند. موثر بودن توسط یک دسته متفاوت از ژن های تخصصی باکتری اداره می شوند [Valerie Oke and Sharon R Long., 1999].

۵-۲ تشکیل نودول ریشه:

برهم کنش اولیه بین گیاه میزبان و ریزوبیای آزادی، آزاد کردن یک سری مواد شیمیایی توسط سلول های ریشه به خاک است. تعدادی از این ها رشد جمعیت باکتری را در منطقه اطراف ریشه ها (ریزوسفر) ترغیب می کنند. برهم کنش بین ترکیبات ویژه در دیواره سلول باکتریایی و سطح ریشه مسئول شناسایی صحیح گیاه میزبان توسط ریزوبیا و اتصال به تارهای کشنده ریشه است. فلاونوئیدهای ترشح شده توسط سلول های ریشه، ژن های Nod را در باکتری ها القا می کنند که سپس تشکیل نودول را القا می کنند.

کل فرایند نودولاسیون توسط ارتباطات بسیار پیچیده شیمیایی بین گیاه و باکتری، تنظیم می شوند. زمانی که باکتری به تار کشنده ریشه متصل شد، باکتری ها Nod فاکتورها را ترشح می کنند. این ها تار کشنده را تحریک می کنند که خم شوند. ریزوبیا سپس از طریق نوک تار کشنده، جایی که آن ها تشکیل یک طناب آلودگی را القا می کنند به ریشه حمله می کند. این طناب از سلول های ریشه ساخته می شود و نه باکتری، و تنها در پاسخ به آلودگی تشکیل می شود. طناب آلودگی از طریق سلول های تارکشنده رشد می کند و به درون دیگر سلول های نزدیک نفوذ می کند، اغلب با ایجاد انشعاب طناب آلودگی. باکتری ها درون شبکه توسعه یافته از مجراها (لوله ها) تکثیر می شوند و تولید Nod فاکتور را ادامه می دهند که سلول های ریشه را به تکثیر شدن و سرانجام تشکیل نودول ریشه، تحریک می کنند (شکل ۳-). هر نودول ریشه با هزاران باکتری ریزوبیوم زنده بسته می شود، که به عنوان باکترئوئید نامیده می شوند. پروتئین های غشای سلول گیاهی، باکترئوئیدها را احاطه می کنند، این ساختار ها به عنوان سیمبوزوم شناخته می شوند که ممکن است باکتری های متعدد یا تنها یک باکترئوئید را شامل شوند، که در آن جا تثبیت نیتروژن اتفاق می افتد.



شکل ۳- مراحل نودولاسیون

۶-۲ مراحل نودول زایی:

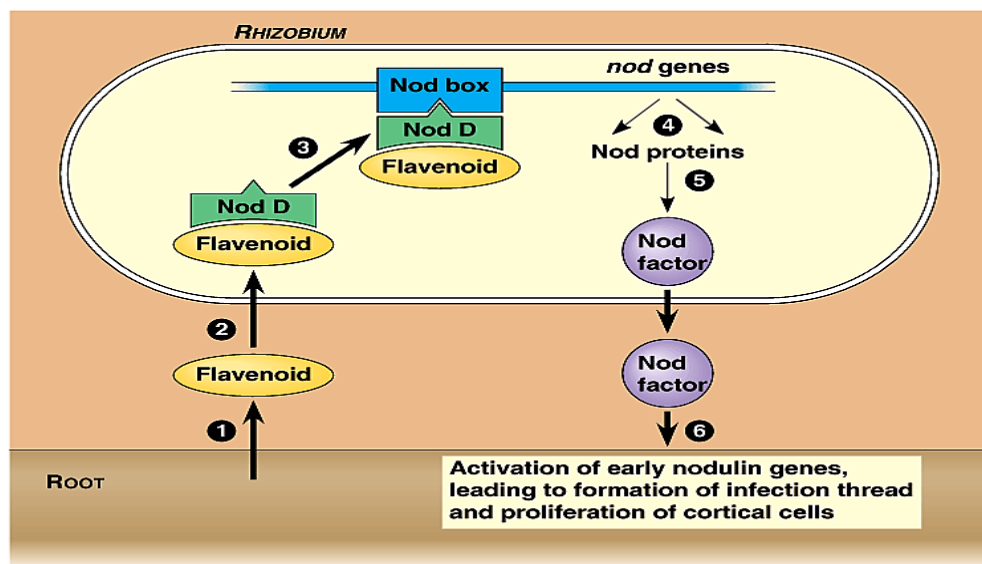
در حالت کلی فرآیند نودول زایی را می توان به مراحل تقسیم کرد که به ترتیب عبارتند از:

۱- مرحله سیگنالینگ:

ریزوبیوم ها به طریقه ساپروفیت در خاک زندگی می کنند و بر اساس دو مکانیسم به نزدیکی ریشه گیاه خاص می رسند. اولین مکانیسم شیمیوتاکسی است که در این حالت، ریزوبیوم ها به سمت ترکیبات مشخصی حرکت می کنند که این ترکیبات اغلب، پتانسیل غذایی دارند. مطالعات جدید پیشنهاد می کند که ریزوبیوم ها به سمت فلاونوئیدها گرایش نشان می دهند و این ترکیبات، بخشی از سیستم سیگنالی نودول زایی محسوب می شوند. مکانیسم دوم یا الکتروتاکسی جریانات الکتریکی درونی است که به مناطق در حال رشد در ریشه ها و تارهای کشنده و مناطق بالغ برگ وارد می شوند (شکل ۴-). حتی اگر تعداد کمی ریزوبیوم در نزدیکی ریشه میزبان حضور داشته باشد، آن ها می توانند در سطح ریشه، کلونیزه شوند. اگر تکثیر و کلونیزه شدن انجام شده و با آلودگی ریشه همراه گردد، تداخل های میکروبی - گیاهی مهمی رخ می دهد. این تداخل ها شامل مراحل زیر است:

الف - ترشحات ریشه به ویژه فلاون ها: مواد غذایی مورد نیاز ریزوبیوم ها و سایر میکروارگانیسم های خاک برای تکثیر، توسط ترشحات ریشه تأمین می شود. در طی این دوره از تکثیر، ژن های ریزوبیوم برای نودول زایی (ژن های Nod) به وسیله ترکیبات مترشحه سلول گیاهی روشن می شوند. روشن شدن این ژن ها وابسته به اختصاصات میزبانی است. البته تعداد زیادی فلاون، ایزوفلاون و ترکیبات وابسته وجود دارد که در تحریک یا مهار ژن های Nod با یکدیگر تفاوت نشان می دهند. ساختار و نحوه فعالیت ژن های Nod بسیار پیچیده است. ژن های Nod ABC به صورت مشترک در تمام ریزوبیایا یافت می شود. این ژن ها در القاء تولید نودول در گیاهان لگوم و همچنین پارسپونیا مشارکت دارند. Nod C پروتئینی را کد می کند که به غشاء سطحی باکتری ملحق شده و غنی از اسید آمینه سیستمین است. Nod A و Nod B ترکیبات با وزن مولکولی پایین را کد می کنند که باعث تحریک تقسیم سلولی در گیاه می شوند. محصولات ژن های A و B توسط پروتئین Nod C از سلول باکتری به سلول های گیاهی منتقل می گردند. ژن دیگر Nod D است که تحت تأثیر فلاون ها یا ایزوفلاون ها قرار داشته و بر اساس مطالعات انجام شده در ۱۹۸۸، ژن های Nod D یک وظیفه دوگانه دارند: وظیفه عمومی اول آن که بیان ژن Nod را فعال می کند و دیگری آن که فلاونوئیدهای مختلف را تشخیص می دهد. ریزوبیایا با دامنه میزبانی محدود، ممکن است که فقط یک کپی واحد از Nod D داشته باشند. بعضی ریزوبیایا مثل ریزوبیوم ملی لوتی دارای سه کپی از ژن Nod D هستند که در تشخیص فلاونوئیدها متفاوت بوده و ممکن است در حوزه میزبانی، تعداد نودول های تشکیل شده و زمان بین آلودگی و تولید نودول نیز اختلاف باشد.

ب - القاء تقسیم سلولی در میزبان: تقسیم سلولی در میزبان و در کورتکس ریشه ممکن است توسط ریزوبیایا قبل از آلودگی رخ دهد. اگر چه تقسیمات سلولی ممکن است توسط نفوذ تنظیم کننده های رشد که به وسیله ریزوبیایا تولید می شوند، تحریک شود [Xiao L.W and et al. 2018].



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

شکل ۴- مرحله سیگنالینگ در نودولاسیون

۲- اتصال باکتری به ریشه‌ها:

در این مرحله، دو فرآیند تشخیص و اتصال صورت می‌پذیرد. دو نوع ماده معمولاً در هر دو حالت فوق دخالت دارند: یکی لکترین‌ها در سطح گیاه و دیگری پلی‌ساکاریدها در سطح ریزوبیایا. لکترین‌ها که پروتئین‌های غیر کاتالیزوری تولید شده به وسیله میزبان هستند، ممکن است باقیمانده‌های کربوهیدراتی ویژه‌ای را در گونه‌ای خاص از ریزوبیا تشخیص دهند. پلی- ساکاریدهای سطحی برای آلودگی [مرحله پاتوژنی] ضروری هستند اما برای برخی مراحل تمایز ندول (مرحله همزیستی) مهارکننده هستند. پلی‌ساکاریدهای سطحی شامل EPS، LPS، CPS و بتا- ۲- گلوکان‌های حلقوی می‌باشد.

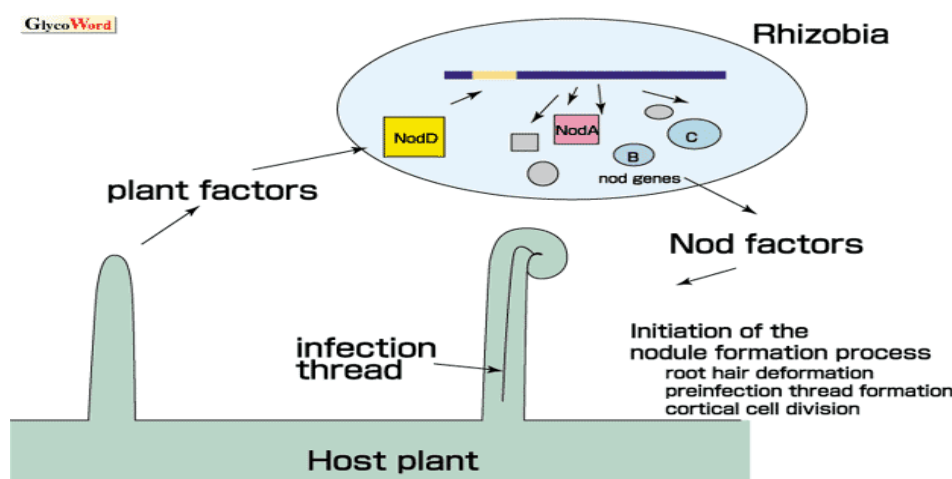
۳- حلقه‌ای شدن و انشعاب تار کشنده

مشابه پدیده اتصال، حلقه‌ای شدن با شرایط فیزیولوژیک و پلی‌ساکاریدهای سطحی در ریزوبیوم و برادی ریزوبیوم در ارتباط است. پدیده حلقه‌ای شدن تار کشنده برای آلودگی آن ضروری بوده و اختصاصی گونه نیست. این مورد پیشنهاد شده است که حلقوی شدن در اثر جهت‌گیری جدید رشد تار کشنده رخ می‌دهد که به علت حضور ریزوبیاهاست. تصویر واقعی این پدیده بر اساس جنس میزبان متفاوت است، به طوری که در سویا، خمیدگی‌های تار کشنده به سطح ریشه نزدیک هستند و این گونه تارها معمولاً منشعب نمی‌شوند، اما در بقیه گیاهان مثل نخود و شبدر، تارها در ابتدا طویل می‌شوند و سپس خمیده می‌گردند و ممکن است دچار انشعاب نیز شوند.

۴- آلودگی:

به سه طریق سلول‌ها ممکن است آلوده شوند: ۱- هر سلول منفرد در یک ندول جوان، می‌تواند توسط منشعب شدن رشته آلودگی، آلوده شود. در این حالت یک سلول به وسیله یک انشعاب از رشته آلودگی، آلوده می‌شود. ۲- تعداد معدودی از سلول‌ها، ممکن است به وسیله انشعابات رشته آلودگی، آلوده شوند. این سلول‌ها و باکتری‌های داخل آن‌ها تقسیم شده

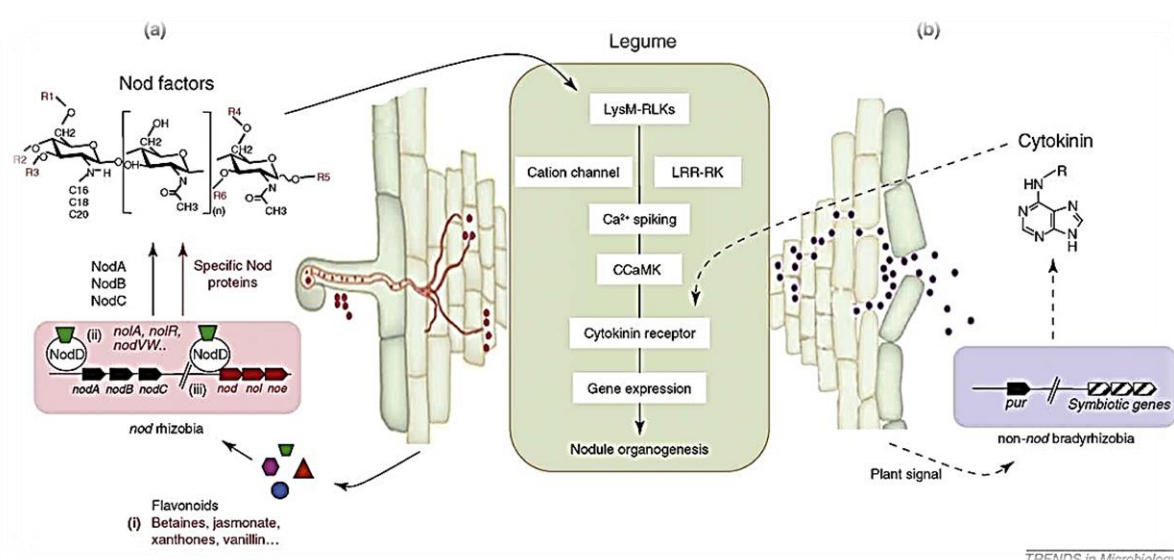
و بزرگ می‌شوند و ندول بزرگی از رشد محدود سویا ایجاد می‌کنند. ۳- یک یا تعداد معدودی سلول ممکن است به وسیله توده‌ای از سلول آلوده شوند و تکثیر یابند. آلودگی، فرایندهای چند مرحله‌ای را طراحی می‌کند که باکتری‌های ریزوسفری خارجی را به نیچ درون سلولی نهایی‌اش، می‌راند. با این وجود، همه ریزوبیایا، به یک طریق آلودگی را انجام نمی‌دهند. تعدادی به لایه‌های اپیدرمی و لایه‌های کوتیکولی نودول‌های در حال شکل‌گیری، به وسیله یک مسیر آلودگی بسیار تخصصی و مشکل و پیچیده به تار کشنده نفوذ پیدا می‌کنند. که آن‌ها شکل‌گیری را درون یک تار کشنده از یک ساختار طناب آلوده به راه می‌اندازد که این طناب طویل می‌شود، منشعب می‌شود و درون نودول در حال تشکیل، نفوذ می‌کند. در اغلب موارد، ریزوبیایا سپس در سلول‌های گیاهی از طریق یک فرایند شبه اندوسیتوز وارد می‌شوند که تا حد زیادی ناشناخته است. ریزوبیای درون سلولی توسط یک غشای پلاسمایی مشتق از گیاه که سیمبیوزوم نامیده می‌شود، احاطه می‌شود که یادآور فاگوزوم‌های پاتوژن‌های حیوانی درون سلولی هستند. نهایتاً، باکتری داخل شده (باکترئید نامیده می‌شود) باید به محیط جدیدش سازش پیدا کند تا این که تثبیت نیتروژن می‌تواند اتفاق بیفتد و یک آلودگی مداوم نودول، ایجاد می‌شود (شکل ۵-).



شکل ۵- اثر Nod فاکتورها در تشکیل طناب آلودگی

در مواردی همچون همزیست‌های مدیکاگو و لگوم‌های دیگر از گروه Galeoid، تمایز یابی باکترئید غیر قابل برگشت هست و باکتری درون همزیست در پیری نودول، زنده نمی‌ماند. در موارد استثناء، هیچ دخول باکترئیدی ریزوبیایی وجود ندارد و تثبیت نیتروژن در رشته‌های آلودگی اتفاق می‌افتد. آلودگی نودول در اغلب ریزوبیایا به وسیله ی پلی ساکاریدها، نمایان می‌شود. اول، NFs برای آلودگی مورد نیازند، یا برای آغاز طناب آلودگی.

دوم، مولکول‌های کلیدی در آلودگی لگوم، پلی ساکاریدهای سطحی هستند از جمله اگزوسولار (EPS) کپسولار (KPS) و لیپوپلی ساکاریدها (LPS). لاین‌های متعددی از مدرک نشان می‌دهد که این ترکیبات جلوگیری می‌کنند، یا بر علیه محافظت می‌کنند، واکنش‌های دفاعی گیاه به وسیله ی باکتری‌های ایلیسته به جریان می‌افتد، یا توسط شرکت یک حفاظت ساختاری (مانند واکنش بر علیه ROS) یا یک عمل سیگنالیگ [Mardani-Nejad 2022 and 2023]. ROS اشاره به رادیکال‌های اکسیژن دارد [Khademi and Mardaninejad, 2015] مقایسات ژنومی نشان می‌دهند که ژنتیک آلودگی در بین ریزوبیایا فرق می‌کند [Masson-Boivin C. and et al., 2009].



شکل ۶: استراتژی های نودولاسیون در ریزوبیا.

ریزوبیوم تشکیل نودول ها را در لگوم ها با استفاده از هر دوی فرایند های وابسته به NF (a) و یا مستقل از NF (b) القا می کند. در استراتژی وابسته به NF (a)، سیگنال های وابسته گیاهی خانواده فلاونوئید، توسط پروتئین های تنظیمی Nod D باکتریای دریافت می شوند که سنتز (از طریق ژن های نودولاسیون) NFs لیپوپلی ساکاریدی را القا می کنند که ارگانوژنر نودول را به راه می اندازند. تعدادی از مراحل این فرایند (با رنگ قرمز در شکل نشان داده شده) موضوعی برای تغییر هستند:

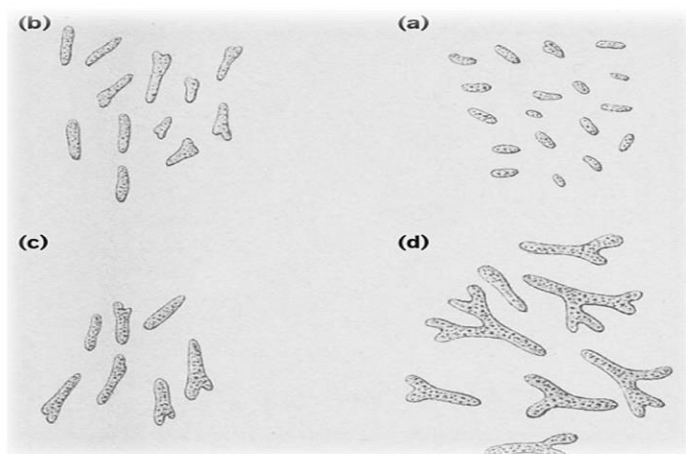
(i) ترکیبات گیاهی جایگزین (مانند تبائین ها، جاسمونات، گزانتون ها، واینلین و غیره) می توانند بیان ژن Nod را به راه بیاندارند، اما این ترکیبات عموماً در غلظت های بالاتر از (ایزو) فلاونوئیدها عمل می کنند.
(ii) در کنار Nod D، تنظیم کننده های اضافی می توانند بیان ژن های Nod مانند NOIR یا NOIA و سیستم دو جزئی NODV / NODW را تحریک کنند.

(iii) سنتز اسکلت Nod فاکتور توسط ژن های NodABC کنترل می شود. دریافت NF ها توسط گیاه چندین پاسخ همزیستی را در ریشه گیاه به راه می اندازد، مانند جریان های یونی، آبشار کلسیمی، تغییر شکل تار کشنده ریشه، تقسیم کورتیکول سلولی و تشکیل طناب آلودگی که باکتری ها را به پریموردیوم در حال تشکیل هدایت می کند. چندین جزء مسیر سیگنالینگ که منجر به تشکیل نودول می شود شناسایی شده اند: رسپتورهای NF (که به موتیف های لیزین خانواده رسپتور کیناز مانند LysM-RLKs تعلق دارند)، یک کانال کاتیونی، یک رسپتور کیناز غنی از لوسین (LRR-RK)، یک پروتئین کیناز وابسته به کلسیم/کالمودولین (CcaMK)، یک رسپتور سیتوکینین، و فاکتورهای ترجمه ای متعدد

۵- ایجاد باکترئوئید و تمایز:

مرحله ی تمایز باکتری های ریزوبیوم به باکترئوئیدها ابتدا در سال ۱۸۸۸ توسط Beijerinck مطرح شد که در این حالت از شکل میله ای به شکل سلول های Y شکل در می آید (شکل ۷). در مرحله ی ایجاد باکترئوئید، باکتری ها به باکترئوئید تمایز می یابند، اما همواره در داخل وزیکول هایی قرار دارند که به وسیله غشاء اطراف باکترئوئیدها (PBM) احاطه

می‌شود. کمی غلظت O_2 و غلظت بالای K^+ ممکن است با تمایز باکتری‌ها همراه باشند [Palansooriya, and et al., 2020].



شکل ۷: تغییرات مورفولوژی در طی تمایز باکتری‌ها

ریزوبیایا در این حالت باید بتوانند میزبان را تحریک به تولید پروتئین نودولین کنند که برای سنتز PBM ضروری است. PBM همچنین یک ساختار حقیقی همزیستی است که اجزائی را از هر دو همزیست (گیاه و باکتری) دارا می‌باشد. باکتری‌ها از طریق طناب آلودگی به میزبان می‌رسد و وارد سیتوپلاسم سلول های گیاه می‌شود، در یک پروسه ای شبیه به اندوسیتوز [Valerie Oke and Sharon R Long., 1999].

۶- عملکرد نیتروژناز:

در ندول های سویا و نخود، سنتز نیتروژناز به طور طبیعی در مدت کوتاهی پس از آزادی باکتری ها از رشته های آلودگی، انجام می‌شود. بریل و پائو در سال ۱۹۸۲ نشان دادند که mRNA های مربوط به نیتروژناز ممکن است حتی زودتر از موعد فوق قابل شناسایی باشند. تقریباً در همین زمان، لگ هموگلوبین، در سلول های گیاه میزبان تولید می‌شود که به ندول های فعال یک رنگ صورتی مشخص می‌دهد. هموگلوبین می‌تواند جریان اکسیژن را در غلظتی پایین نگاه دارد.

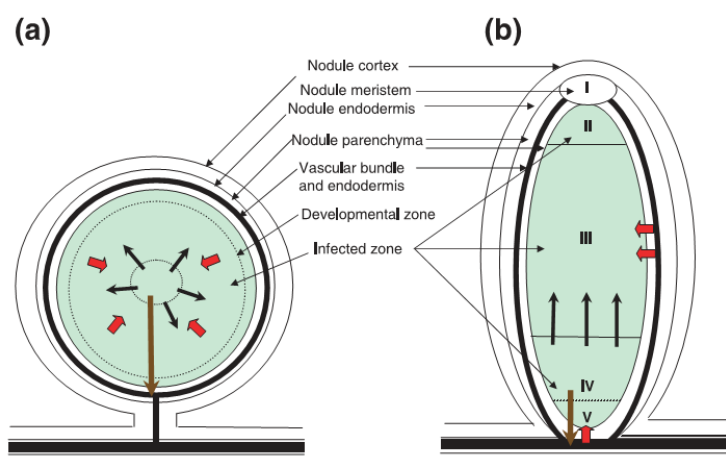
۷-۲ انواع نودول ها:

نودول ها بر اساس نوع تکوینشان به دو گروه نودول های محدود (Determinate) و نودول های نامحدود (Indeterminate) تقسیم می‌شوند. برخلاف نودول های نامحدود که یک مریستم راسی پایا دارند که اغلب باعث تشکیل یک ساختار نودولی منشعب می‌شود، نودول های محدود هیچ مریستم پایایی ندارند و بنابراین شکل و ساختار متفاوت تری نسبت به نودول های نامحدود دارند (شکل ۸). نودول های محدود مانند سویا از سلول های پوست یا کورتکس درونی منشا می‌گیرند اما تقسیم سلولی در 10d پس از آلودگی متوقف می‌شود. یک گرادیان شعاعی تکوین با شروع پیری در مرکز و گسترش آن به بیرون وجود دارد. در واقع مریستم نودول از سلول های خارجی پوست متمایز می‌شود که عمر کوتاهی دارند و تقسیم سلول ۳-۵ هفته بعد از آلودگی متوقف می‌شود. وقتی نودول پیر شد نودول های جدید در بخش های تازه نمو یافته ریشه تشکیل می‌شود.

باکتری که در سیمبوزوم ها به سر می برد هم در مورد نودول های محدود و هم نودول های نامحدود می تواند زمانی که ارگان ها پیر می شوند، به حالت آزادی دربیاید [Puppo and et al., 2005]. نودول های نامحدود مانند آلفا، نخود و شبدر ساختار بسیار متفاوتی نسبت به نودول های محدود دارند؛ این نودول ها استوانه ای شکل اند و از پوست یا کورتکس درونی تمایز می یابند. در این نودول ها تقسیم سلول ابتدا به صورت آنتی کلینال در پوست درونی و به دنبال آن تقسیمات پری کلینال در آندودرم و دایره محیط انجام می شود و در نتیجه این تقسیمات مریستم و پرموردیوم نودول ایجاد می شود. سیستم آوندی این نودول ها نسبت به نودول های محدود کمتر منشعب شده است. در نودول های نامحدود سیمبوزوم های انفرادی با باکتریوئیدها تقسیم می شوند در نتیجه باکتریوئیدهای منفرد درون یک سیمبوزوم قرار دارند.

در نودول های نامحدود ۵ منطقه می توان تشخیص داد:

منطقه I: شامل سلول های مریستمی کوچکی که دائماً تقسیم می شوند و فاقد باکتری همزیست می باشند.
منطقه II: شامل منطقه آلودگی است و باکتری برای تشکیل سیمبوزوم آن جا را تسخیر کرده است.
منطقه III: باکتری ها در سیمبوزوم ها جای می گیرند و توانایی تثبیت نیتروژن اتمسفری را دارند.
منطقه IV: در خلال مراحل اولیه تمایزیابی نمو، نودول وجود ندارد. وقتی نودول نمو یافت تا هنگام پیری گیاه مستمراً بزرگتر می شود. پیری در منطقه IV نشانه این است که مشارکت همزیستی از بین رفته است.
منطقه V: باکتری ذاتاً آزادی است و مشخصات فراساختاری سیمبوزوم را نشان نمی دهد (شکل ۸).
انواع بافت های زیر در مورد هر دوی نودول ها از پیرامون به سمت مرکز قابل تشخیص هستند: یک کورتکس نودولی خارجی، یک اندودرم، یک کورتکس داخلی و ناحیه مرکزی که باکتری در آن جا به سر می برد. تغییرات متابولیکی بین نودول و ارگان های دیگر گیاه توسط حضور دستجات آوندی قرار گرفته در درون پارانشیم نودولی که به سیستم آوندی ریشه متصل هست، تضمین می شود [Puppo M and et al., 2023].



شکل ۸: نودول های نامحدود و محدود

۸-۲ ویژگی های مورفولوژیکی نودول ها:

در مشاهده یک نودول ریشه بریده، رنگ نودول صورتی /قرمز هست که به خاطر حضور لگ هموگلوبین فراوان است. هرچه نودولی قرمز باشد، فعالیت آن بیشتر است. هنگامی که نودول ها جوانند و هنوز تثبیت نیتروژن انجام نمی دهند، آن ها سفید یا خاکستری رنگند. نودول های لگوم که به مدت طولانی تثبیت نیتروژن را انجام ندهند، سبز می شوند و ممکن است توسط گیاه دور انداخته شوند. این ممکن است در نتیجه یک سویه ریزوبیوم ناکارآمد یا فقر مواد غذایی گیاه باشد. در حالی که درختچه های لگومینوزه نودول های چوبی و چند ساله دارند، نودول های گونه های یکساله ی سریع رشد، عمر کوتاهی در مقایسه با ریشه هایی که از آن ها منشا گرفته اند، دارند. ظرفیت تثبیت نیتروژن در نودول ها در اوایل زندگی نودول اوج می گیرد و وقتی عمر نودول به ۵-۳ هفته رسید تثبیت N_2 کاهش می یابد؛ در حالی که پیری برگ و مرگ سلول بستگی به نمو بافت آوندی دارد [Puppo et al., 2005].

۹-۲ نتیجه گیری

مطالعات جدید پیشنهاد می کند که ریزوبیوم ها به سمت فلاونوئیدها گرایش نشان می دهند و این ترکیبات، بخشی از سیستم سیگنالی ندول زایی محسوب می شوند. بخش دیگر جریانات الکتریکی درونی است که به مناطق در حال رشد در ریشه ها و تارهای کشنده و مناطق بالغ برگ وارد می شوند.، ژن های ریزوبیوم برای ندول زایی (ژن های Nod) به وسیله ترکیبات مترشح سلول گیاهی روشن می شوند. ساختار و نحوه فعالیت ژن های Nod بسیار پیچیده است. ژن های القاء کننده تولید ندول در گیاهان لگوم مانند Nod C پروتئینی را کد می کند که به غشاء سطحی باکتری ملحق شده و غنی از اسید آمینه سیستمین است، از طرفی Nod A و Nod B ترکیبات با وزن مولکولی پایین را کد می کنند که باعث تحریک تقسیم سلولی در گیاه می شوند. محصولات ژن های B و Nod A توسط پروتئین Nod C از سلول باکتری به سلول های گیاهی منتقل می گردند. آلودگی نودول در اغلب ریزوبیوها به وسیله ی پلی ساکاریدها، نمایان می شود. مولکول های کلیدی در آلودگی لگوم، پلی ساکاریدهای سطحی هستند از جمله اگزوسلولار. سنتز اسکلت Nod فاکتور توسط ژن های NodABC کنترل می شود. دریافت NF ها توسط گیاه چندین پاسخ همزیستی را در ریشه گیاه به راه می اندازد، مانند جریان های یونی، آبشار کلسیمی. لذا بررسی هر چه بیشتر عوامل موثر بر فرایند سیگنالینگ نودولاسیون بخصوص شناخت ژن های موثر در این فرایند نق مهمی در شناخت بهتر تثبیت نیتروژن خواهد داشت که در این مقاله سعی شد به برخی مطالعات در این زمینه اشاره شود.



مراجع

1. Puppo, M. Valluru, M.K., Croset, M. Ceresa, D. Iuliani, M. Khan, A, Wicinski, J. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Pantano F, Ottewell PD, Clézardin, P. [2023], "*MiR-662 is associated with metastatic relapse in early-stage breast cancer and promotes metastasis by stimulating cancer cell stemness*", Br J Cancer, 129(5):754-771.
2. Masson-Boivin, C. Sachs, J.L. [2018], "*Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia-the roots of a success story*", Curr Opin Plant Biol, 44:7-15.
3. Mardani-Nejad, SH. Kholdebarin, B. Sadat, Y. Moradshahi, A. Vazipour, M. [2003], "*Vegetative behavior change and the amount of essential oil of lavender (Lavandula officinalis) in response to different amounts of ammonium nitrate*", Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 19:16-35.
4. Allito, B. B. Nana, E.M. and Vincent, L. [2020], "*Legume-Rhizobium Strain Specificity Enhances Nutrition and Nitrogen Fixation in Faba Bean (Vicia faba L.)*", Agronomy 10, 6: 826.
5. Lucinski, R. Polyn, W. and Ratajczak, L. [2002], "*Nitrate Reduction and Nitrogen Fixation in Symbiotic Association Rhizobium-Legumes*", Acta Biochimica Polonica, 49(2): 537-546.
6. Sessitsch, A. Kuffner, M. Petra, K. Vangronsveld, J. Walter W. [2013], "*The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils*", Soil Biology and Biochemistry, 60: 182-194.
7. Sessitsch A. Howieson, J.G., Perret X., Antoun H. and Martínez-Romero E. [2002] "*Advances in Rhizobium Research*". Critical Reviews in Plant Sciences, 21(4):323-378.
8. Masson-Boivin, C. Giraud, E. Perret, X. and Batut J. [2009], "*Establishing Nitrogen-Fixing Symbiosis With legumes: How many Rhizobium Recipes*", Trends in Microbiology, 17(10): 458-466.
9. Valerie, O and Sharon, R. L. [1999], "*Bacteroid Formation in the Rhizobium-Legume Symbiosis*", Current Opinion in Microbiology, 2:641-646.
10. Kumuduni, N. Palansooriya, S. Shaheen, M. Season, S. [2020], "*Soil amendments for immobilization of potentially toxic elements in contaminated soils*", A Critical Review, Environment International, 134: 105046.



11. Xiao, L.W. Wen J. C. Xue, Y.F. [2018], "*Rhizobia inhabiting Nodules and rhizosphere soils of alfalfa: A strong selection of facultative microsymbionts*", Soil Biology and Biochemistry, 116, 340-350.
12. Mardani-Nejad, Sh. [2023], " *Vinca rosea seeds rich in lipid peroxidation inhibitors*", Seventh International Conference on Interdisciplinary Studies in Food industry and Nutrition Science of Iran.
13. Mardani-Nejad, Sh. [2023], "*Evaluation of phenolic, flavonoid content and antioxidant capacity of the leaves, flowers, seeds and essential oil of Lavandula officinalis in comparison with synthetic antioxidants*", Journal of Medicinal Herbs, 13(2): 29-38.
14. Khademi, S. Mardaninezhad, Sh. [2015], "*Evaluation of The Antioxidant Activity of Some Rosaceae Plants as An Alternative to The Synthetic Antioxidants in Food Industry*", Journal Of Food Technology and Nutrition, 12(2) :33-40.
15. Puppo, A. Groten, K. Bastian, F. Carzaniga, R. Soussi, M. Lucas, M. M. [2005], "*Legume Nodule Senescence: Roles for Redox and Hormone Signalling in the Orchestration of the Natural Aging Process*", New Phytologist, 165: 683–701.



A Review of Nodulation and Nitrogen Fixation in Rhizobium Symbiotic Bacteria

Shahin Mardani-Nejad

Department of Sciences, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Shmardaninejad@iau.ac.ir

Abstract

This review article examines the process of nodulation and nitrogen fixation signaling in rhizobium symbiotic bacteria due to the importance of the symbiosis of legumes with rhizobia in all climates in nitrogen fixation. In the roots of host plants, rhizobia initiate the formation of organs called nodules. The Nod and Nif genes encode the nitrogen-reducing function of rhizobia. A single strain of rhizobium can infect specific legume species. Flavonoids secreted by root cells induce Nod genes in bacteria, which then induce nodule formation. Plant cell membrane proteins surround the bacteroids, these structures known as symbioses, which may contain multiple bacteria or a single bacteroid, where nitrogen fixation occurs. A particular legume species may be nodulated by more than one rhizobia genera. A series of genes in the bacteria control different aspects of the nodulation process. The specificity of the genes determines which strain of rhizobia infects which legume. Rhizobia live saprophytically in the soil and approach the roots of a particular plant by either chemotaxis or electrotaxis. There are a large number of flavones, isoflavones, and related compounds that differ in their ability to stimulate or inhibit the Nod genes. The Nod A-Nod B-Nod C genes are found in common among all rhizobia. Alternative plant compounds (such as Thebaines, Jasmonates, Xanthones, Vanillin, etc.) can induce the expression of the Nod gene, in which nitrogenase synthesis occurs naturally in nodules shortly after the bacteria are released from the infection threads. Nodules are divided into two groups based on their type of development: restricted and indeterminate nodules. The nodule meristem is distinguished from the outer skin cells, which are short-lived. Indeterminate nodules such as Alfalfa, Pea, and Clover have a very different structure than restricted nodules, they are cylindrical and distinct from the inner skin or cortex. In indeterminate nodules, individual symbioses divide with bacteroids, resulting in individual bacteroids within a symbiosome.

Keywords: Nitrogen fixation, Nodulation, Rhizobium, Symbiotic bacteria