بسم الله الرحمن الرحيم

١١٩٩

۸۷/۱/۱۰۴۹۴۳
۸۸/۱/۱۸

دانشگاه شهید باهنر کرمان

دانشکده علوم-گروه زیست شناسی

پایان نامه تحصیلی جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد زیست شناسی
(فیزیولوژی گیاهی)

اثر سالیسیلیک اسید بر آغشتگی و گره زائی باکتری ریزوبیوم ژاپونیکم در گیاه سویا (*Glycine max L*)

اساتید راهنما:

دکتر خسرو منوچهری کلانتری

دکتر عبدالحمید نمکی شوشتری

استاد مشاور:

دکتر ماه بانو تاتا

مؤلف:

مهدیه صادق زاده

۱۳۸۷/۱۲/۲۷

شهریور ماه ۱۳۸۷

۱۱۰۹۰۹

این پایان نامه به عنوان یکی از شرایط احراز درجه کارشناسی ارشد به

گروه زیست شناسی

دانشکده علوم

دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچگونه مدرکی به عنوان فراغت از تحصیل دوره مزبور شناخته نمیشود.

دانشجو : خانم مهدیه صادق زاده

اساتید راهنما : آقای دکتر خسرو منوچهری کلانتری

آقای دکتر عبدالحمید نمکی شوشتری

داور ۱ : آقای دکترمحمدجواد آروین

داور ۲ : سرکار خانم دکتر زهرا اسرار

داور ۳ : –

معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی یا نماینده دانشکده : آقای دکتر حسینعلی سامان

حق چاپ محفوظ و مخصوص به مؤلف است.

تقدیم به:

مادرم

و به پدرم

و به تمامی آموزگارانم

لطيفا!
چراغ دل مريداني و انس جان غريباني نه به چيزي ماني تا گويم چناني، آني كه خود گفتي و چنانكه گفتي آني.

سپاس خدای راکه لطف بیکرانش، مرا در راه کسب علم و معرفت توان بخشید
اینک وظیفه خود می دانم که از زحمات تمامی عزیزانی که که در انجام این پژوهش مرا یاری نموده اند قدردانی نمایم. صمیمانه ترین مراتب سپاس و قدر دانی خود را تقدیم به استادان گرانقدر و فرزانه جناب آقای دکتر خسرو منوچهری کلانتری و جناب آقای دکتر عبدالحمید نمکی شوشتری می نمایم.
همچنین از اساتید محترم سرکار خانم دکتر ناظری، سرکار خانم دکتر رضانژاد، سرکار خانم دکتر اسرار، سرکار خانم پورابولی، جناب آقای دکتر احمدی مقدم و جناب آقای دکتر عباس نژاد رئیس محترم گروه زیست شناسی، خانم قطب الدینی، آقای اکبری، آقای حسنی و تمامی دانشجویان مقطع دکترا تشکر و سپاسگذاری می نمایم.
هچنین از جناب آقای دکتر آروین و سرکار خانم اسرار که داوری اینجانب را تقبل کردند تشکر می نمایم.
در نهایت از دوستان و هم کلاسی های گرامیم، خانمها زهرا نوح پیشه، مهدیه بهار مقدم، سمیه عبدی راد ، روشنک طراحی، لیلا ملک پور، اعظم نوری، همچنین آقایان مجتبی رحمت بر ، ابراهیمی، صالح آزاد، زهره شیرخانی، پریا پیروز، سکینه بهرامی ، مهدیه میرشکاری و دوست و همراه گرانقدرم خانم بهاره نطنج و بقیه هم اتاقی های خوبم، همچنین از تمامی مدیران و همکاران فرهنگیم تشکر و قدر دانی می نمایم.

چکیده:
در این تحقیق، تاثیر سالیسیلیک اسید بر روی رشد و تثبیت زیست شناختی ازت دریک رقم سویا گونه سحر، با استفاده از دو سوش متفاوت از باکتری ریزوبیوم ژاپونیکم تلقیح شده در کنار ریشه گیاه، مورد بررسی قرار گرفت. این سوش‌ها شامل.یک.سوش.بدون پلاسمید و یک سوش حاوی پلاسمید بودند. این آزمایش در محیط کشت پرلیت و آبیاری گلدان ها با محلول غذائی FP (فاقد نیتروژن) انجام شد. گیاهان پس از حدود ۵۰ روز برداشت شدند و تعداد گره های فعال، طول اندام هوائی، وزن تر و خشک گیاه کامل، میزان قندهای احیاءکننده ریشه، میزان پروتئین کل ریشه و بخش هوائی، میزان کل کلروفیل، کاروتنوئید، آنتوسیانین و میزان آسکوربات، دهیدروآسکوربات و آسکوربات کل ریشه گیاه و میزان اتیلن حاصل از احیای استیلن اندازه گیری شد. آنالیز داده ها نشان داد که از نظر گره زائی، بین تیمار های صفر، ۱ و ۵ میلی مولار سالیسیلات در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری وجود نداشت. از نظر طول اندام هوائی، وزن تر و خشک، میزان کل کلروفیل، کاروتنوئید، آنتوسیانین، میزان قندهای احیا کننده ریشه، میزان پروتئین ریشه و قسمت های هوائی و همچنین میزان آسکوربات، دهیدروآسکوربات و آسکوربات کل بین تیمار های صفر، ۱ و ۵ میلی مولار سالیسیلات در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری وجود داشت. همچنین گیاهان تلقیح شده با سوش دارای پلاسمید (W.T(pSRK9، بیشترین میزان گره زائی، طول اندام هوائی، وزن تر و خشک گیاه کامل، میزان کل کلروفیل، میزان قندهای احیاءکننده ریشه، میزان پروتئین کل و نیز میزان اتیلن حاصل از احیای استیلن را نسبت به گیاهان تلقیح شده با سوش بدون پلاسمید نشان دادند. این گیاه بیشترین میزان پروتئین کل ریشه و قسمت هوائی در تیمار ۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید و تلقیح شده با سوش دارای پلاسمید رانشان داد. افزایش میزان کلروفیل، کاروتنوئید، میزان پروتئین، قند و آسکوربات ریشه در اثر متقابل سالیسیلات و باکتری در بررسی های انجام شده نشان دهنده افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و حمایت از دستگاه فتوسنتزی در گیاه بوده است. بنابراین با توجه به این که سویا تلقیح شده با سوش باکتریائی دارای پلاسمید (W.T(pSRK9، علاوه بر تولید بیشتر گره، کلروفیل کل، طول اندام هوائی، وزن تر و خشک دارای بالاترین میزان اتیلن حاصل از احیای استیلن بوده است. می توان از همزیستی این گیاه با سوش دارای پلاسمید در برنامه های اصلاحی استفاده کرد. همچنین با توجه به نقش دفاعی سالیسیلات و همچنین این واقعیت که سالیسیلات بر روی میزان کلروفیل و کاروتنوئید گیاه سویا اثر افزایشی داشته و باعث رشد بالاتر قسمت هوائی و ریشه شده است. می توان با در نظر گرفتن دوزهای مناسب سالیسیلات گیاهانی با قدرت فتوسنتزی بهترو نیز توان دفاعی بالاتر به عمل آورد.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۱- فصل اول (مقدمه)

۱-۱- اهمیت ازت در گیاهان..... ۲

۱-۲- مکانیسم تثبیت ازت..... ۲

۱-۳- تثبیت بیولوژیکی ازت..... ۳

۱-۴- توانائی تثبیت ازت در باکتری های همزیست و غیرهمزیست..... ۳

۱-۵- باکتری های همزیست..... ۳

۱-۵-۱- باکتری های همزیست با گیاهان لگومینوز..... ۳

۱-۵-۲- باکتری های همزیست با گیاهان غیرلگومینوز..... ۴

۱-۵-۳- باکتری های آزادزی تثبیت کننده ازت..... ۵

۱-۶- میزبان های اختصاصی گونه های مختلف ریزوبیوم..... ۵

۱-۶-۱- مراحل همزیستی باکتری(ریزوبیوم)-لگوم..... ۶

۱-۶-۱-۱- مرحله تشخیص و اتصال ریزوبیوم..... ۶

۱-۶-۱-۲- آغشتگی و تشکیل گرهک..... ۷

۱-۶-۱-۳- تشکیل باکتروئیدها..... ۸

۱-۷- ژن های موثر در تثبیت ازت..... ۹

۱-۷-۱- ژن های نیف..... ۹

۱-۷-۲- ژن های فیکس..... ۹

۱-۷-۳- ژن های نود..... ۱۰

۱-۸- تثبیت ازت از دیدگاه بیوشیمیائی..... ۱۲

۱-۹- عوامل تاثیر گذار بر باکتری های تثبیت کننده ازت..... ۱۲

۱-۹-۱- خشکی..... ۱۳

۱-۹-۲- شوری ۱۴

۱-۹-۳- دما..... ۱۴

۱-۹-۴- pH..... ۱۵

۱-۹-۵- تاثیر عوامل محیطی دیگر..... ۱۵

۱-۱۰- سالیسیلیک اسید..... ۱۵

۱-۱۰-۱- سالیسیلیک اسید در دفاع پاتوژنی..... ۱۷

۱-۱۰-۲- مکانیسم تولید SAR در گیاهان..... ۱۸
۱-۱۰-۲-۱- آنالوگ های سنتزی SA جهت القاء SAR..... ۱۹
۱-۱۰-۲-۲- راه بیوسنتزی SA..... ۲۰
۱-۱۰-۳- پروتئین های باند شده به SA..... ۲۱
۱-۱۰-۴- نقش مرتبط SA با دیگر تنظیم کننده ها..... ۲۲
۱-۱۰-۵- نقش سالیسیلات در گره زائی..... ۲۳
۱-۱۱- معرفی گیاه مورد آزمایش..... ۲۶
۱-۱۲- موضوعات مورد بررسی..... ۲۶
۲- فصل دوم (مواد و روش ها)
۲-۱- مقدمه..... ۲۹
۲-۱-۱- چگونگی تهیه محیط کشت Ty..... ۲۹
۲-۱-۲- سترون کردن محیط کشت باکتری ها..... ۲۹
۲-۱-۳- شمارش باکتری ها..... ۳۰
۲-۱-۴- شمارش با استفاده از رقیق سازی محیط مایع..... ۳۱
۲-۲- کشت گیاه در گلدان..... ۳۱
۲-۲-۱- نحوه سترون کردن و کاشت بذرها..... ۳۲
۲-۲-۲- شرایط کشت بذر..... ۳۲
۲-۲-۳- آلوده نمودن ریشه گیاهان..... ۳۳
۲-۲-۴- تهیه محیط کشت مایع میکروبی..... ۳۳
۲-۲-۵- آبیاری گلدان ها و اعمال تیمارها..... ۳۴
۲-۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری..... ۳۴
۲-۳- بررسی های انجام شده در مورد اثرات سالیسیلیک اسید بر روی سیستم تثبیت ازت ریزوبیوم ژاپونیکم در گیاه سویا..... ۳۶
۲-۴- اندازه گیری صفات مورفولوژیکی گیاه..... ۳۶
۲-۴-۱- اندازه گیری تعداد گره فعال..... ۳۷
۲-۴-۲- اندازه گیری طول اندام هوائی و ریشه..... ۳۷
۲-۴-۳- اندازه گیری وزن خشک و وزن تر ریشه و اندام هوائی..... ۳۷
۲-۵- مطالعات صفات بیوشیمیائی..... ۳۸
۲-۵-۱- اندازه گیری مقدار رنگیزه های گیاه..... ۳۸

۲-۵-۱-۱- سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئید برگ.....۳۸
۲-۵-۱-۲- سنجش میزان آنتوسیانین ها در برگ.....۳۹
۲-۵-۲- سنجش مقدار قند های احیاء کننده.....۳۹
۲-۵-۲-۱- تهیه عصاره گیاهی.....۴۰
۲-۵-۲-۲- تهیه محلول های مورد نیاز.....۴۰
۲-۵-۲-۳- طریقه استفاده از این محلول ها در سنجش میزان قندها.....۴۱
۲-۵-۲-۴- رسم منحنی استاندارد.....۴۱
۲-۵-۳- سنجش مقدارپروتئین.....۴۲
۲-۵-۳-۱- تهیه معرف بیوره.....۴۲
۲-۵-۳-۲- رسم منحنی استاندارد.....۴۳
۲-۵-۴- سنجش مقدارآسکوربیک اسید و دی هیدروآسکوربیک اسید.....۴۳
۲-۵-۴-۱- تهیه محلول های مورد نیاز.....۴۳
۲-۵-۴-۲- روش اندازه گیری آسکوربیک اسید.....۴۴
۲-۵-۴-۳- روش اندازه گیری دی هیدروآسکوربیک اسید.....۴۵
۲-۵-۴-۴- رسم منحنی استاندارد.....۴۶
۲-۵-۵- اندازه گیری میزان اتیلن تولید شده در نتیجه احیای استیلن.....۴۷

۳- فصل سوم (نتایج)

۳-۱-نتایج حاصل از اثر غلظت های مختلف سالیسیلات و باکتری بر برخی پارامتر های مورفولوژیکی و بیو شیمیائی در گیاه سویا.....۵۳
۳-۱-۱- تعداد گره های فعال.....۵۳
۳-۱-۲- طول اندام هوائی.....۵۴
۳-۱-۳- وزن تر اندام هوائی.....۵۴
۳-۱-۴- وزن خشک اندام هوائی.....۵۵
۳-۱-۵- وزن تر ریشه.....۵۵
۳-۱-۶- وزن خشک ریشه.....۵۶
۳-۱-۷- میزان کلروفیل a.....۵۷
۳-۱-۸- میزان کلروفیل b.....۵۷
۳-۱-۹- میزان کلروفیل کل.....۵۸
۳-۱-۱۰- میزان کاروتنوئید.....۵۸

۳-۱-۱۱- میزان آنتوسیانین ۵۹
۳-۱-۱۲- میزان قند های احیاء کننده ریشه ۵۹
۳-۱-۱۳- میزان قند های احیاء کننده بخش هوائی ۶۰
۳-۱-۱۴- میزان پروتئین اندام هوائی ۶۰
۳-۱-۱۵- میزان پروتئین ریشه ۶۱
۳-۱-۱۶- میزان آسکوربات ریشه ۶۲
۳-۱-۱۷- میزان دی هیدروآسکوربات ریشه ۶۲
۳-۱-۱۸- میزان آسکوربات کل ریشه ۶۳
۳-۱-۱۹- میزان اتیلن حاصل از احیای استیلن توسط گره های ریشه سویا ۶۳
٤- فصل چهارم (بحث و تفسیر)
۴-۱-بحث..... ۸۴
۴-۲- نتیجه گیری کلی..... ۹۴
۴-۳-پیشنهادات..... ۹۵
ضمائم..... ۹۷
منابع..... ۱۱۸

فصل اول
مقدمه

۱-۱- اهمیت ازت در گیاهان :

ازت به عنوان یک عنصر مهم در ساختمان بسیاری از ترکیبات موجود در سلول های گیاهی مطرح است. این عنصر در ساختار اسید های آمینه و نوکلئوتیدها وارد می شود. بنابراین عدم دسترسی به ازت برای گیاهان زراعی از عوامل مهم محدود کننده تولیدات کشاورزی است [۳۸].

با وجود این که ازت ۷۸ درصد از حجم هوا را تشکیل می دهد اما ازت مولکولی (N_2) قابل استفاده برای گیاهان عالی نمی باشد. زیرا استفاده از ازت اتمسفر مستلزم شکستن پیوند سه گانه بین اتمهای آن است، چون گیاهان عالی به طور مستقیم و به تنهائی توان انجام این واکنش را ندارند، شکسته شدن این پیوند در مکانیسمی به نام تثبیت بیولوژیکی ازت انجام می شود تا ازت مولکولی به صورت نیترات و یا آمونیاک برای گیاهان قابل استفاده گردد [۲۶ و ۳۸].

۱-۲- مکانیسم تثبیت ازت:

تبدیل ازت مولکولی به اشکال دیگر آن نظیر نیترات یا آمونیاک را تثبیت ازت می نامند. این فرایند در غالب فرایند های طبیعی و مصنوعی قابل انجام است. در شرایط مصنوعی در دما و فشار بالا (۲۰۰درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰اتمسفر) ازت مولکولی با هیدروژن ترکیب شده و آمونیاک تولید می شود.

فرایند های طبیعی سهم بیشتری در تثبیت ازت دارند به طوری که ۹۰٪ تثبیت ازت توسط میکروارگانیسم ها واز طریق فرایندی که تثبیت بیولوژیکی ازت[1] نامیده می شود، انجام می گردد [۲۶].

[1] Biological nitrogen fixation

۱-۳- تثبیت بیولوژیکی ازت:

تثبیت بیولوژیکی ازت نقش بسیار مهمی در صرفه جویی در مصرف کودهای ازته در کشاورزی دارد. بر طبق گزارشات بدست آمده در اکثر خاکهای زراعی جهان، کمبود ازت قابل استفاده برای گیاهان وجود دارد که این کمبود را در سطح جهانی نمی توان تنها با مصرف کود های شیمیایی و تجاری جبران کرد [۲۶ و۳۸].

۱-٤- توانایی تثبیت ازت در باکتری های همزیست و غیر همزیست :

باکتری های تثبیت کننده ازت به دو دسته همزیست وآزادزی تقسیم می شوند. این باکتری ها قادرند با گیاهان لگومینوز[1] و گیاهان غیرلگومینوز و جلبک ها همزیستی ایجاد کنند [۱۳]. تثبیت ازت به روش همزیستی توسط باکتری های مختلفی صورت می گیرد که شرح آن در مطالب بعدی آمده است.

۱-۵- باکتری های همزیست

۱-۵-۱- باکتری های همزیست با گیاهان لگومینوز:

همه گره های تشکیل شده بر روی ریشه گیاهان لگومینوز توسط باکتری های خانواده ریزوبیا[2] تشکیل می شوند[۱]. باکتری های خانواده ریزوبیا را به جنس‌های ریزوبیوم[3]، برادی ریزوبیوم[4]، آزوریزوبیوم[5]، سینوریزوبیوم[6] و فتوریزوبیوم[7] تقسیم می کنند.

---

[1] *Leguminose*
[2] *Rhizobia*
[3] *Rhizobium*
[4] *Bradyrhizobium*
[5] *Azorhizobium*
[6] *Sinorhizobium*
[7] *Photorhizobium*

جنس های ریزوبیوم و برادی ریزوبیوم از جمله انواع اصلی باکتری های مولد گره در گیاهان لگومینوز به شمار می روند. گیاهان خانواده لگومینوز را به سه زیر خانواده فاباسیئیده[۱]، میموزوئیده[۲] و کازال پینوئیده[۳] طبقه بندی می کنند که تشکیل گره در زیر خانواده های میموزوئیده و فاباسیئیده بیشتر است [۳ و ۲۶].

جنس های مختلف خانواده ریزوبیاسه می توانند از جهات مختلفی از جمله نوع میزبان، رشد در شرایط محیطی مختلف مثل pH و دما و نیاز های مختلف به مواد محرک رشد و یا عناصر معدنی دیگر متفاوت باشد [۱۳، ۲۲ و ۲۶].

۱-۵-۲- باکتری های همزیست با گیاهان غیرلگومینوز:

انواع دیگر، سیانوباکترها هستند که از جمله آنها می توان نوستوک[۴]، آنابنا[۵] و کالوتریکس[۶] را نام برد همچنین گزارش شده است که باسیلوس[۷] و کلابسیلا[۸] نیز تثبیت ازت راانجام می دهند [۳ و ۱۳].

از باکتری های همزیست با گیاهان غیر لگومینوز باکتری فرانکیا[۹] است که متعلق به رده اکتینومیست[۱۰]ها می باشد (ارتباط بین اکتینومیست ها با میزبان هایشان ارتباطات اکتینوریزال نامیده می شود)[۱۱] که با توسکا و سنجد همزیست می شود [۳].

---

[1] *Fabaceoideae*
[2] *Mimosoideae*
[3] *Caesalpinioideae*
[4] *Nostoc*
[5] *Anabaena*
[6] *Calothrix*
[7] *Bacillus*
[8] *Klebsiella*
[9] *Frankia*
[10] *Actinomycete*

از انواع دیگر این نوع باکتری ها جنس آزوسپریلیوم[1] را می توان نام برد که با برخی از گونه های علفی منطقه گرمسیری همزیست است. همچنین سیانو باکتر آنابنا که با سرخس آزولا[2] همزیستی برقرار می کند. اطلاعات در مورد همزیستی باکتری ها با گیاهان غیر لگومینوز ناچیز است [۳ و ۵].

۱-۵-۳- باکتری های آزادزی تثبیت کننده ازت:

باکتری های آزاد زی که قادر به تثبیت ازت هستند می توانند هوازی، اختیاری ویا بی هوازی باشند. از انواع باکتری های هوازی می توان ازتوباکتر[3]، بی‌ژرنیکا[4] و دراکسیا[5] را نام برد و از انواع غیر هوازی می توان کلستریدیوم[6] و متانوکوکوس[7] که از نوع غیر فتوسنتزکننده و رودوسپیریلیوم[8] و کروماتیوم[9] که از نوع فتوسنتزکننده اند را نام برد [۱۳].

۱-۶- میزبان های اختصاصی گونه های مختلف ریزوبیوم :

انواع مختلف ریزوبیوم از جمله ریزوبیوم لگومینوزاروم[10] که خاص گونه های نخود، عدس، باقلا و نخود فرنگی می باشد و باکتری ریزوبیوم تریفولی[11] و فازئولی[12] که به ترتیب در شبدر و لوبیا ایجاد گرهک می کنند.

---

[1] *Azospirillum*
[2] *Azolla*
[3] *Azotobacter Clostridium*
[4] *Beijerinckia*
[5] *Deraxia*
[6] *Clostridium*
[7] *Methanococcus*
[8] *Rhodospirillum*
[9] *Chromatium*
[10] *R.legominosarom*
[11] *R.trifolli*
[12] *R.PHaseoli*

باکتری ریزوبیوم ملیلوتی[1] که خاص گیاه یونجه و نوع ریزوبیوم ژاپونیکم[2] که در سویا مسئول تشکیل گرهک و تثبیت ازت هستند [۳ و۱۳].

۱-٦-۱- مراحل همزیستی باکتری(ریزوبیوم)-لگوم:

۱-٦-۱-۱- مرحله تشخیص و اتصال ریزوبیوم

ارتباط همزیستی بین باکتری های تثبیت کننده ازت و ریشه های گیاه معمولا از طریق ساختارهای چند سلولی به نام گره ها انجام می شود [۱۴].

بهترین مشخصه ارتباط همزیستی، تشکیل گره روی ریشه های لگومیان است. این گره ها توسط ریشه های گیاه میزبان آلوده به باکتری تثبیت کننده ازت که از نوع گرم منفی و جنس ریزوبیوم می باشد تولید می شوند [۳۲ و ۶۸].

ریزوبیوم ها از ترکیبات فلاوونوئیدی آزاد شده توسط ریشه گیاهان استفاده می کنند و به عنوان تنظیم کننده های واقعی ژن های دخیل در تشکیل گره (ژن های گره زایی[3]) به کار می روند [۱۳].

گزارش شده است که جنس های مختلف خانواده ریزوبیاسه[4] میزبان های متفاوتی دارند [۱ و ۳]. برای مثال سویا میزبان اختصاصی گونه ای از ریزوبیوم به نام ریزوبیوم ژاپونیکم و یونجه میزبان ریزوبیوم ملیلوتی می باشد [۳۲ و ۲۲].

---

[1] *R.meliloti*
[2] *R.japonicum*
[3] *nod* genes
[4] *Rhizobiaceae*

ریزوبیوم ها به طور آزاد در خاک زندگی می کنند و قادرند میزبان اختصاصی خود را تشخیص دهند. اولین قدم در ایجاد ارتباط همزیستی مهاجرت باکتری ها به محیط اطراف ریشه ها می باشد. این حرکت شیمیائی بوده و به واسطه فلاوونوئید[1] های ترشح شده توسط ریشه گیاه میزبان انجام می گردد [۴۱].

به نظر می رسد درسویا، ریزوبیومها موادی راترشح می کنند که سبب تحریک سلول های اپیدرمی ریشه می شوند(فاکتورهای تقسیم سلولی) و آنها را به تقسیم سلولی وادار می کنند.

اخیرا گفته شده سیتوکینین[2] ها همان فاکتور های تقسیم سلولی هستند که از ریزوبیوم ها ترشح شده و تقسیم سلولی را تحریک می کنند [۶۶ و ۶۹].

آزمایشات مختلف ثابت می کند که در مرحله شناخت متقابل لگوم - باکتری لکتین[3]ها از گیاه و پلی ساکاریدهای سطحی[4] از باکتری ها دخالت دارند. از جمله پلی ساکارید های سطحی که در سویا در تشخیص و اتصال به لکتین اهمیت دارد پلی ساکارید اکسترا سلولار[5] و پلی ساکارید کپسولار[6] می باشد [۴۹].

بر طبق گزارشات بد ست آمده، بیشترین و یا همه لکتین سویا که به ریزوبیوم ژاپونیکم متصل می شود در واقع به ماده کپسولار اطراف باکتری متصل می شود (پلی ساکارید کپسولار). هرگونه تغییر در قسمت کپسولار اطراف باکتری منجر به تغییر در مرحله شناخت لگوم- باکتری می شود[۴۹ و ۵۷].

[1] Flavonoid
[2] Cytokinin
[3] Lectin
[4] Exopolysaccharid
[5] Extracellular polysaccharid
[6] Capcular polysaccharide

نتایج نشان داده اند رسپتور لکتین کپسولار در فرایند شناسائی ریزوبیا در مراحل معینی از رشد بسیار حائز اهمیت است [۴۹].

۱-۶-۱-۲-آغشتگی و تشکیل گرهک

بعد از آن که ریزوبیوم ها به تارهای کشنده اتصال یافتند تارهای کشنده در پاسخ به موادی که توسط باکتری ها تولید می شوند (فاکتور های نود[1]) با یک رشد غیر طبیعی ایجاد خمش می کنند و حلقه ای را ایجاد می کنند که باکتری را در خود جای می دهند [۴۲].

با از بین رفتن دیواره تارهای کشنده آلودگی گسترش یافته و وزیکول های دستگاه گلژی رشته سرایت[2] را تشکیل می دهند. رشته سرایت به انتهای سلول رسیده و غشای آن با غشای سلول تار کشنده ترکیب می شود. ریزوبیوم ها در داخل آپوپلاست رها می شوند و با نفوذ به غشای پلاسمائی سلول های زیر اپیدرمی رشته جدید سرایت تشکیل می شود [۲۲ و ۴۲].

۱-۶-۱-۳-تشکیل باکتروئیدها[3]:

در مراحل آخر هنگامی که باکتری ها به سلول های تخصصی شده کورتکس می رسند با فرایند اندوسیتوز وارد سیتوپلاسم سلول های گیاه میزبان می شوند. در این زمان اطراف باکتری ها را پوشش پلی ساکاریدی خاصی (غشای پری باکتروئید[4]) احاطه کرده است. این پوشش از وزیکول های گلژی میزبان منشا گرفته و در اثر تحریک ریزوبیوم ها ایجاد می شود. پائین بودن غلظت اکسیژن و بالا بودن غلظت پتاسیم به وقوع این تمایز ارتباط دارند. به زودی باکتری ها به تقسیم شدن خاتمه داده و ضمن بزرگ شدن به اندامک های درون

[1] Nod factor
[2] Infection thread
[3] Bacteroids
[4] Peribacteroid membrane

همزیست تثبیت کننده ازت که باکتروئید نامیده می شوند تمایز می یابند. سنتز لگ هموگلوبین نیز در ضمن این تغییرات صورت می گیرد که برای محافظت از آنزیم نیتروژناز در مقابل اکسیژن می باشد. اندکی بعد از تشکیل باکتروئید ها و تقریبا همزمان با سنتز لگ هموگلوبین ژن های سنتز نیتروژناز در باکتری فعال می شوند [۳ و ۱۰].

۱-۷- ژن های موثر در تثبیت ازت

در عمل تثبیت ازت ژن های مختلفی دخالت دارند از جمله ژن های باکتریائی درگیر در همزیستی می توان به ژن های نیف[1]، فیکس[2] و نود[3] اشاره کرد.

۱-۷-۱- ژن های نیف:

ژن های دخیل در تثبیت ازت که در مرحله آخر تشکیل گره فعالیت دارند ژن های نیف نام دارند. ژن های نیف در هر دو شکل تثبیت کننده های همزیست و آزادزی ازت یافت می شوند این ژن ها واجد ژن های ساختاری به تعداد ژن های تنظیم کننده در فرایند تثبیت ازت هستند.

آنزیم نیتروژناز فعال کننده واکنش تثبیت کننده ازت است که خود از دو پروتئین کمپلکس تشکیل شده است. ژن نیف H زیر واحد پروتئین آهن دار نیتروزناز را کد می کند در حالی که ژن نیف D و K به ترتیب زیر واحد های a و b پروتئین MoFe نیتروزناز را کد می کند [۳ و ۲۲].

[1] nif genes
[2] fix genes
[3] nod genes

۱-۷-۲- ژن های فیکس

ژن های فیکس فقط در تثبیت کننده های ازت مشاهده می شوند جهش در این ژن ها توانائی تثبیت ازت را از بین می برد. از انواع ژن های فیکس می توان به انواع A، B، C، J، L و X اشاره کرد.

ژن های فیکس نوع L و نوع J به عنوان تنظیم کننده های ژن های مربوط به همزیستی در تثبیت ازت به کار می روند (ژن های *nif* و *fix*).

ژن های فیکس نوع L و J ژن نیف A را فعال می کنند که در این صورت فعالیت ژن های نیف HDK و ژن های فیکس ABCX آغاز می شود. [۲۲].

یکی از وظایف احتمالی برای ژن های فیکس بیوسنتز هم است δ- آمینو لولینیک اسید[1] (ALA) پیش ماده ای برای هم است جهش های انجام شده درریزوبیوم درساخت ALA باعث تولید گره هائی می شود که توانائی تثبیت ازت را ندارند. ژن های فیکس را ژن های مسئول تنظیم اکسیژن نیز می دانند [۳ و ۲۷].

۱-۷-۳- ژن های نود

همان طور که بیان شد گره روی ریشه های لگومیان در واقع ارگانی است که توسط ریزوبیا القاء می شود ریزوبیا ماده ای به نام فاکتور نود ترشح می کنند که در طول مراحل اولیه نمو گره ژن های گیاهی به طور خاصی توسط این فاکتور القاء می شوند این ژن های گره زا را نود (*nod*) نامیده اند.

گزارش شده که ژن نود در مرحله اولیه تشکیل گره بیان می شود این ژن علاوه بر فاکتور نود توسط سیتوکینین نیز القاء می شود. بیان این ژن حتی قبل از اولین تقسیم سلولی غشائی انجام می شود.

[1] δ-Amino levolinioc acid