تثبيت النايتروجين تكافليا Nitrogen fixation

النايتروجين العامل الرئيسي المحدد لإنتاجية المحاصيل ويمثل النايتروجين 1—2% من مجموع المساحة الكلية للنبات وقد تصل النسبة من 4—6% ويأتي في المرتبة الرابعة من حيث الكمية المطلوبة لإنتاج المحصول من بين العناصر الأساسية الستة عشر يشكل النايتروجين 79% من الهواء الجوي ، وهذا يمثل 77000 طن من النتروجين فوق مساحة كل هكتار من الارض . الا ان النايتروجين الجوي لا يكون جاهزا للنبات قبل ان يحول إلى صور أو اشكال أخرى. كما وتحتوي الترب الرسوبية والصخور على كمية كبيرة من النايتروجين أكثر مما هو موجود في الهواء الجوي وهذا أيضا غير جاهز للنبات قبل ان يتحول بواسطة التجوبة ويكون النايتروجين الجاهز للنبات في حالة ايونات النترات "N أو الأمونيا NH4 ان فعالية تثبيت النايتروجين بواسطة احياء مختلفة ضروري لتوازن النايتروجين في الكرة الأرضية لأن الأشكال المثبتة معرضة للفقد بصورة مستمرة بعملية عكس النترجة denitrifioation والغسل Leaching. اعتمدت الزراعة دائما على النيتروجين المثبت بواسطه الاحياء للإنتاج الزراعي وتتكافل البكتيريا التابعة للجنس الرايزوبيوم مع نباتات العائلة البقولية لتثبيت النيتروجين وهذا التكافل يعد اهم حالات تثبيت النيتروجين حيويا.

تتميز النباتات البقولية بأنها:

1 - ذاتية التغذية بالنسبة للنايتروجين والكاربون (التعايش بين البكتريا والنباتات لا يتطلب نايتروجين في وسط النمو).
2 - تضيف البقوليات نايتروجين إلى المحاصيل التي تعقبها في النظام الزراعي المنتج.

تكوين العقد Nodule formation

تتكون مستعمرات سلالات البكتريا المناسبة على شعيرات جذور النباتات البقولية تحدث الإصابة وتتكون العقد الجذرية كما يلي :

1 - تشويه الشعيره الجذرية (حصول التواء Curling أو تفرع) ومن المحتمل أن هذا استجابه إلى حامض الأندول استيك اسد (IAA) الذي تحفز البكتريا انتاجه.

2 - اختراق الشعيرات الجذرية وتكوين خيط الإصابة الذي ينقل البكتريا إلى خلايا القشرة وقد يتفرع لخيط ليصيب أكثر من خلية.

3 - اطلاق البكتريا في خلايا القشرة.

4 - انقسام خلايا القشرة الداخلية لانقسامات سريعة لتكوين انسجة العقد.

5 - توسع خلايا القشرة الداخلية المصابة واستمرار الخلايا البكتيرية بالانقسام وبذلك تكون البكتريا في فجوات وبعدد 2—8 بكتيريا تسمى بكتيرويد Bacteroids وتكون البكتيرويدات محاطة بغشاء بلازمي ثم يبدأ تكوين صبغة حمراء غنية بالحديد تسمى همغلوبين البقول Leghemoglobins وتساعد هذه الصبغة في نقل الأوكسجين إلى داخل العقد. تتكون صبغة هيمغلوبين البقول من نوعين من البروتين يحتويان على الحديد بنسب مختلفة.

تبدأ عملية تثبيت النايتروجين مباشرة بعد تكوين هذه الصبغة (همغلوبين البقولي) ويتكون داخل العقدة الجذرية. ينقل النظام الوعائي السكريات والماء والعناصر المعدنية إلى البكتيرويدات وينقل النايتروجين المثبت كأحماض أمينية إلى أجزاء النبات المختلفة كما تعمل العقد على توفير بيئة ملائمة للبكتيريا منها توفر الأوكسجين وحماية انزيم النايتروجينيز Nitrogenase.

تتضاعف عدد الصبغات او الكروموسومات في منطقة إصابة البكتريا للجذور وتتصف خلايا النبات في المنطقة الوسطية للعقد بخاصية غريبة وهي امتلاكها ضعف عدد

الصبغيات(الكروموسومات) المميز للنبات العائل. توجد اختلافات كبيرة بين أنواع النباتات البقولية في شكل العقد الجذرية حيث يكون شكل عقد البرسيم الأحمر والأبيض صولجانيه وفصية التركيب أو العقد الجذرية في الجت فتكون أكثر طولا وتفرعا. بينما العقد الجذرية لفول الصويا واللوبيا وفستق الحقل بأنها كروية الشكل. كما توجد اختلافات كبيرة في حجم العقد الجذرية بين الأنواع البقولية حيث تتراوح قطرها من بضع ملليمترات إلى ما يقارب حجم كرة التنس.

تحتوي الأنواع ذات الجذور الليفية على عدد أكبر من العقد من الأنواع ذات الجذور الوتدية. وعادة تحوي النباتات ذات العقد الجذرية الكبيرة على عدد أقل من العقد ، بينما تحوي النباتات ذات العقد الصغيرة على عدد أكبر من العقد الجذرية .

سلالات الرايبزوبيم

تختلف سلالات أنواع الرايزوبيم كثيرا في تخصصها حسب النوع البقولي وطبيعة تكوين العقد الجذرية في الصنف وفعالية انزيم النايتروجينيز وقد تختلف بعض السلالات في تثبيت النايتروجين حتى بين أصناف النوع الواحد. وقد يعود سبب عدم فعالية السلالة إلى قلة إصابة الجذور أو انخفاض فعالية انزيم النايتروجينيز و انخفاض كفاءته. تعد بعض سلالات japonicum نظريا بانها أكثر كفاءة من سلالات الرايزوبيم الأخرى، وذلك بسبب قدرتها على إعادة توليد الهيدروجين بأنزيم النايتروجينيز لتوليد ATP. ولا تدخل الالكترونات المنتجة في الدوره مرة أخرى لانتاج الهيدروجين وبدلا من ذلك يتم اختزال النايتروجين (N2) إلى امونيوم (NH4) وهو الناتج النهائي المطلوب.

جدول الاسم العلمي للنبات والاسم العلمي للسلالة البكتيرية

المحصول	الاسم العلمي للنبات	الاسم العلمي للبكتريا Rhizobium
فستق الحقل	*Arachis hypogea*	*R. Japonicum*
فول الصويا	*Glycine max*	
الحمص	*Cicer arietinum*	*R. Leguminosarum*
الباقلاء	*Vicia faba*	
العدس	*Lens esculenta*	
الهرطمان	*Lathyrus SP.*	
البزاليا	*Pisum Sativum*	
الفاصوليا	*Phaseolus Vulgaris*	*R. Phaseoli*
الجت	*Medicago Sativa*	*R. Meliloti*
البرسيم	*Trifolium SP*	*R. trifolii*
الترمس	*Lupine SP.*	*R. Lupini*

العوامل المؤثرة على تثبيت النايتروجين

العوامل الوراثية:-

أهم العوامل الوراثية الأساسية التي تؤثر على تثبيت النايتروجين:

1- معقد انزيم النايتروجينيز

يحوي على نوعين من البروتين: معقد حديد بروتيني protein Fe وهو الأصغر حيث يبلغ وزنه الجزيئي من ()()5,0()—()()7,()()7 ومعقد البروتين حديد موليبدينم —protein Mo fe وهو الأكبر وزنه الجزيئى 200,000—220,000. يعتقد بأن النايتروجين يرتبط أولا ببروتين حديد موليبدينم عند اختزاله إلى أمونيا ويرتبط ATP Mg ببروتين الحديد.

2 - المختزلات Reductans:—

يعد تحويل النايتروجين الجوي (N2) من حالة غازية إلى (NH4) عملية اختزال تستعمل فيها مركبات (ATP ,NADAPH) والتي تختزل خلال الفيرودوكسين أو الفلافودوكسين في عملية الأكسدة الفسفورية.

3- صبغة الليكهيموكلوبين Leghemoglobin (هيموكلوبين بقولي):-

يتواجد الهيموكلوبين البقولي في انسجة العقد الجذرية للبقوليات فقط ولا يتواجد في أنظمة تثبيت النايتروجين الأخرى.

هناك علاقة ارتباط عالية بين فعالية النايتروجينيز وتثبيت النايتروجين مع محتوى العقد من صبغة الليكهيموكلوبين وعندما يكون لون الصبغة (احمر أو أخضر) فان ذلك يدل على كفاءة وفعالية انزيم النايتروجينيز. ويدل وجود اللون (الاصفر او الجوزي) على شيخوخة العقد الجذرية ان أهمية الفسيولوجية لدور صبغة الليكهيموكلوبين غير معروفة الا ان العقدة تحتاجها في نقل الأوكسجين لتجهيز التنفس وانتاج الATP.

4- ال ATP:—

يعد مركب (بايردين نيوكلوتايد Pyridine nucleotide ضروري لان المركبات الأخرى لا تحل محله وان المركب المساعد له هو MgATP.

5- الوقاية من الأوكسجين:-

يحتاج تكوين العقدة الجذرية واغلب الاحياء المثبته للنايتروجين إلى الاوكسجين فهو يعد مثبط لفعالية انزيم النايتروجينيز وهو يحجب مناطق ارتباط النايتروجين على معقد البروتين حديد موليبدينم و(!-MgATP على معقد البروتين الحديدي. في معظم الأحيان يكون تثبيت الـN على أقصاه عند جهد الاوكسجين منخفض (0,2—0,8 ضغط جوي).

العوامل البيئية التي تؤثر على تثبيت النايتروجين

1-نسبة الكاربون إلى النايتروجين C/N2:-

يؤدي وجود النتروجين الجاهز في التربة إلى تثبيط تكون العقد الجذرية وتثبيت النتروجين فى النباتات البقولية. بينما تؤدي الأمونيا إلى تقليل تثبيت النتروجين بدرجة كبيرة من البقوليات كما ان توفر النتروجين بنسبة قليلة يؤدي إلى تشجيع نمو النبات لحين اعتمادها على نفسها في توفير النتروجين .

2- العناصر المعدنية

تعد العناصر المعدنية ضرورية للأحياء المثبتة للنيتروجين كضرورتها للنباتات الاخرى. ويجب العناية والاهتمام بالترب الفقيرة وخاصه ذات المحتوى المنخفض من المولبيدنيم و الحديد والكبريت بسبب ان هذه العناصر تدخل في تكوين انزيم النيتروجينيز كما تزداد فعاليه انزيم النيتروجينيز للعناصر الكبرى الاخرى. ايضا يعتبر السماد البوتاسي والفوسفاتي جيد لنمو النباتات البقولية و تثبيت النيتروجين كذلك يعتبر عنصر النحاس ضروري لتكوين العقد الجذرية ربما بسبب دوره في نظام السيتوكروم والتنفس التاكسدي.

3- المبيدات

تؤدي معامله البذور بالمبيدات وخاصه مبيدات الفطريات الزئبقية الى تقليل عدد الاحياء المثبتة للنيتروجين وعدد العقد الجذرية.

4- العوامل الجوية

تؤدي درجات الحرارة والجفاف المنخفضة الى تقليل النيتروجين الى الصفر ويعود التأثير اساسا الى تقليل تكوين العقد الجذرية بدلا من تقليل فعالية النيتروجينيز. اما بالنسبة الى الرطوبة ايضا تؤثر على تثبيت النيتروجين وبصوره عامه تؤدي الرطوبة الزائدة او الغمر بالماء الى تقليل تثبيت النيتروجين ربما بسبب تقليل تنفس الجذور وانتاج ATP وتتأثر فعالية انزيم النيتروجينيز بقله المحتوى الرطوبي اكثر من تأثرها بالعجز بالماء.

5- حموضة التربة (pH) والكالسيوم

يكون تأثير (pH) على تثبيت النيتروجين مباشر او غير مباشر حيث ان الحساسية لحموضة التربة ينعكس اثرها على كل من العائل المتكافل والميكروب المتكافل. بينما تتكون العقد في معظم النباتات البقوليه تحت ظروف يكون فيها مدى الرقم الهيدروجيني اضيق من ذلك الخاص بنمو النباتات وعادة تصبح التربة الحامضية خاليه من الرايزوبيم وان الإصابة لا تحدث في الكثير من البقوليات ذات الأهمية الاقتصادية عند (PH) اقل من خمسه تقريبا. كما ان العقد المتكونة في التراب الحامضية تكون عاده في سلالات بكتيريا غير فعاله. يعد الكالسيوم الضروري لنمو النبات ومرستيم العقدة وان حاجة المحصول البقولي للكالسيوم اقل بكثير من حاجه تثبيت النيتروجين التكافلي وخاصه البكتيريا المتكافلة مع البقوليات في المناطق المعتدله وبدون الكالسيوم يكون نمو شاذ واجهاض لمرستيمات العقدة. 3

6- ثاني اوكسيد الكاربون

يحتوي عادة جو بكتريا تثبيت النيتروجين على تركيز اعلى من ثنائي اوكسيد الكربون وتركيز اقل من الاوكسجين قياس بالهواء الجوي ، وتتطلب الرايزوبيوم في الاوساط النقية وجود ثاني اوكسيد الكربون في الوسط لأجل النمو المثالي حيث انه تركيز 4% من ثاني اوكسيد الكربون

قد شجع على زياده تثبيت النيتروجين. هذا وتؤدي الظروف الملائمة الجيدة لنمو الجذور والتنفس الى انتفاء الحاجه لإضافة ثاني اوكسيد الكربون كما ان معروف بأن الرايزوبيا قادر على تثبيت بعض ثاني اوكسيد الكربون ربما بانزيم الكربوكسيليز.

المعاملة باللقاح البكتيري Inoculation

الهدف من معاملة البذور او التربة باللقاح البكتيري توفير مجتمع كافي من سلالات الرايزوبيم الفعالة لتكوين مستعمرات بكتيرية لاصابة جذور النباتات البقولية وتكون اللقاحات البكتيرية اما بهيئة سائل او باودر . وعادة يحتوي اللقاح التجاري على سلالات منتخبة من البكتريا الحية . هذا واذا وجدت رايزوبيم معينة بشكل مستوطن وباعداد كبيرة في التربة في منطقة معينة فانها قد تتغلب (تطغى) على السلالات الجديدة المضافة . ويمكن الحصول علىنتائج افضل باضافة جرعات كثيرة من اللقاح البكتيري مثل اضافة اللقاح الحبيبي على خطوط الزراعة . الا ان زيادة كمية اللقاح المضاف بمقدار 25 مرة على بذور فول الصويا لم تؤدي الا الى زيادة مقدارها 5 % من السلالات الجديدة في العقد الجذرية لفول الصويا . وعند زراعة محصول بقولي في ارض لم يسبق ان زرعت بهذا المحصول من قبل يفضل معاملة البذور باللقاح المناسب لاجل ضمان تكوين العقد الجذرية لتثبيت النايتروجين .

هندسة جينات تثبيت النتروجين

في الفترة الاخيرة دخلت حياة الانسان العديد من التقنيات الحديثة ومنها الهندسة الوراثية engineering Genetic او كل ما يتعلق بالتقنية الحياتيةBiotechnology والهندسة الوراثية هي عبارة عن اتجاه جديد في علم البايولوجيا تبلور وتطور خلال السنوات الاخيرة عندما حقق العلماء اكتشافا بعيدالاثر فتح افاقا واسعة لعلم الهندسة الوراثية وذلك من خلال تطوير طريقة تسمح بادخال جينات غريبة الى بكتريا معينة لتنتج ما تنتجه الخلايا الطبيعية في جسم الانسان من مواد .

هناك افاقا واسعة دخلت علم الهندسة الوراثية في مجال النبات و يركز علماء وراثة النبات في الوقت الحاضر دراساتهم وبحوثهم على زيادة الانتاج دون تكاليف باهظة وعلى تحسين نوعية هذا الانتاج بانتاج سلالات لا تحتاج للاسمدة الباهظة التكاليف ولها القدرة على مقاومة الامراض والحشرات وكذلك الجفاف والظروف البيئية الاخرى غير الملائمة لنمو المحصول .تعالج الهندسة الوراثية عملية نقل الجينات التي تتمتع بميزات غير عادية في نبات ما الى نبات آخر هو بحاجة لهذه الميزات واستنادا لمثل هذه النتيجة فقد سعى مهندسوا الوراثة لتطوير نباتات ذات انتاجية عالية ومحتوى بروتين عال كما ونوعا وذات نسب بروتين عالية ضرورية للانسان ونباتات جديدة تنتج ثمارا متنوعة ،ويعتقد بان الزراعة خلال الفترات القادمة ستكون بصورة مختلفة عما هي عليه الان فقد تظهر نباتات باشكال جديدة لم تكن مألوفة . ويمكن القول بانه كلما زادت معرفة الانسان بكيمياء وتركيب ووظيفة DNA يظهر للوجود المزيد من من الطرق العملية للتعامل مع المواد الوراثية في الخلايا الحية وعلى الاخص الخلايا الجرثومية وخلايا الانسان والنبات والحيوان . اذ اصبح بالامكان ومن خلال الهندسة الوراثية دمج قطع مختارة من DNA تعود لخلايا مختلفة بغية انتاج انواع

جديدة من الاحياء او تغيير وظائف الاحياء ، من خلال ادخال جينات مرغوب بها من DNA نبات ثم مضاعفتها باستعمال بلازميد (هو عبارة عن DNA حلقي يستخدم في نقل الجينات) . ان البكتريا لحد الان تعتبر من الاجهزة المهمة في هذهالعملية اذ تحتوي خلية البكتريا على بلازميدات Plasmids

يمكن استخدامها كانظمة نقل لقطع DNA الغريبة التي اختيرت على اساس قدرتها على نقل الشفرة الوراثية المطلوبة . والبلازميدات هي قطع من DNA موجودة في الخلايا البكتيريعلى شكل حلقي تنقسم على نفسها بصورة منفردة من كروموسوم الخلية وتستخدمانزيمات خاصة لفتح حلقة البلازميد ومن ثم تدخل اليه قطعة الـ DNA الغريبة وما ينتج من هذه العملية (البلازميد المركب) يعاد ادخاله ثانية الى البكتريا الام والتي بدورها تنمى وتكثر في مزارع خاصة معدة لانتاج المادة المطلوبة على نطاق كبير.

اصبحت فكرة نقل جينات تثبيت النتروجين الجوي من المحاصيل البقولية الى محاصيل حقلية اخرى وخاصة محاصيل الحبوب تشغل بال الباحثين وخاصة الذين يعملون في حقل الهندسة الوراثية . وتعتمد المحاصيل البقولية في تصنيع النتروجين على وجود العقد الجذرية في جذورها وبوجود البكتريا التعايشية جنس رايزوبيم Rhizobium في هذه العقد التي تعمل عل شكل مصانع لانتاج النتروجين المأخوذ من الجو (غاز النتروجين) وتحويله الى اشكال جاهزة للنبات ، ان هذه العملية تعد من الامثلة التقليدية للحياة التعايشية البايولوجية التي تمثل تبادل المنفعة بين نوعين من الكائنات الحية حيث تدخل البكتريا الموجودة في التربة الى النباتات البقولية عن طريق الشعيرات الجذرية مستفيدة من الطاقة الناتجة عن عملية التمثيل الضوئي في الاجزاء الخضراء والتي تعود الى الجذور عن طريق النسغ النازل ثم تحول هذه الطاقة بواسطة الانزيمات الموجودة الى امونيوم ومن ثم تتحول الى ما يشبه السماد النتروجيني التجاري المستخدم من قبل
المزارعين . وبالنظر لاهمية هذه العملية البايولوجية فقد جرت محاولات لنقل العقد البكتيرية من المحاصيل البقولية الى محاصيل الحبوب (الحنطة والشعير والذرة الصفراءوالذرة البيضاء وغيرها) والاساس النظري لهذه العملية يعود الى الاستفادة من الهندسة الوراثية حيث ان عملية تثبيت النتروجين الجوي تتحكم بها مجموعة منالجينات تسمى جينات تثبيت النتروجين (nif) Nitrogen fixation genes وظيفتها انتاج مواد محفزة للسيطرة على العناصر الضرورية لتثبيت النتروجين .

اما النباتات التي لاتحتوي على جينات تثبيت النتروجين (nif) فبالامكان ان تحصل عليها بصورة مباشرة من خلايا عدة انواع من البكتريا التعايشية . وبالفعل فقد تم الحصول على بكتريا هجينة لها القدرة على تثبيت النتروجين ويعد هذا بحد ذاته من الاحداث العلمية المهمة جدا . لقد تمت هذه المحاولات من خلال

استخدام البلازميدات ، وهذا شجع الباحثين عن طريق الهندسة الوراثية لجعل بعض النباتات قادرة على انتاج سلالات نباتية قادرة على تكوين العقد الجذرية الخاصة بها .

ان التطور الحاصل في الوراثة وكذلك دراسة وراثة البكتريا جنس رايزوبيمRhizobium يؤكد النتائج المشجعة للاستفادة من هذه البكتريا قي مجالات تثبيت النتروجين ولمحاصيل حقلية مختلفة غير مثبته للنتروجين اصلا وذلك عن طريق هندسة الجينات بهدف زيادة انتاجية هذه المحاصيل وتقليل نفقات الانتاج وخاصة بالنسبة للاسمدة الكيمياوية التجارية التي تستهلك الكثير من الطاقة فضلا عن عملية نقلها وتفريغها وخزنها