

## مقایسه بیان ژن‌های ساختمانی نیتروژناز و فعالیت آنزیم‌های مرتبط با عملکرد آن در گرک‌های نخود تلقیح شده با دو گونه مزوریزوبیوم

### The comparison of structural genes expression of nitrogenase and enzymes activity related to its performance in chickpea nodules inoculated with two Mesorhizobium species

مریم نصرافشانی\*<sup>۱</sup>

۱- استادیار، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه لرستان

Nasr Esfahani M\*<sup>1</sup>

1- Assistant Professor, Biology Department, Science Faculty, Lorestan University

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Esfahani.m@lu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۵)

#### چکیده

روابط همزیستی بین نخود و جنس مزوریزوبیوم از لحاظ کارایی تثبیت همزیستی نیتروژن و نیز پتانسیل تولید محصول حائز اهمیت است. شناسایی مکانیسم‌های مولکولی و فیزیولوژیکی مسئول ایجاد اختلاف در عملکرد همزیستی در جمعیت‌های همزیست لگوم-ریزوبیوم می‌تواند برای بالا بردن پتانسیل تولید محصول از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک و اصلاح نباتات استفاده شود. در این مطالعه، کارایی همزیستی نخود با دو گونه مزوریزوبیوم (*Mesorhizobium ciceri* CP-31 و *M. mediterraneum* SWRI9) بر اساس شاخص‌های رشد مقایسه شدند. نتایج نشان داد که کارایی همزیستی در جمعیت نخود-*M. mediterraneum* SWRI9 نسبت به جمعیت همزیستی نخود-*M. ciceri* CP-31 با توجه به بیش‌تر بودن وزن خشک ساقه، ریشه، گرک‌ها و تعداد گرک‌ها به میزان قابل ملاحظه‌ای بالاتر بود. سطح بالاتر عملکرد همزیستی در جمعیت نخود-*M. mediterraneum* SWRI9 توسط سطح بیان بالاتر ژن *nifK* در این جمعیت تایید شد. به علاوه تفاوت قابل توجهی در فعالیت آنزیم‌های مرتبط با متابولیسم کربن و نیتروژن در گرک‌های هر دو جمعیت مورد بررسی مشاهده شد. فعالیت آنزیم‌های ساکارز سنتاز، UDP-گلوکز پیروفسفریلاز، ملات دهیدروژناز، فسفوانول پیرووات کربوکسیلاز و NAD-مالیک آنزیم و هم‌چنین آنزیم‌های کلیدی مسیر اکسیداتیو پنتوز فسفات (گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز و ۶-فسفوگلوکونات دهیدروژناز) در همزیستی نخود-*M. mediterraneum* SWRI9 به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. فعالیت بالاتر برای آنزیم‌های مسئول تثبیت آمونوم و سنتز آمینواسیدها (گلوتامات سنتاز، گلوتامین سنتاز، آمینواسید ترانسفراز و NAD/NADH-گلوتامات دهیدروژناز) نیز در همزیستی نخود-*M. mediterraneum* SWRI9 مشاهده شد. به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که کارایی بالاتر همزیستی نخود-*M. mediterraneum* SWRI9 با سطح بیان ژن *nifK* و فعالیت آنزیم‌های کلیدی متابولیسم کربن و نیتروژن در گرک‌ها مرتبط می‌باشد.

#### واژه‌های کلیدی

ژن *nifHDK*

متابولیسم کربن و نیتروژن

مزوریزوبیوم

نخود

نیتروژناز

همزیستی

نیتروژن یکی از عناصر غذایی ضروری برای رشد گیاه می‌باشد که به‌عنوان مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید محصول در سرتاسر جهان شناخته شده‌است. با وجود این که نیتروژن فراوان‌ترین عنصر در زمین است ولی اکثر اراضی قابل کشت دچار کمبود نیتروژن هستند (Zhao et al. 2005). تثبیت بیولوژیکی نیتروژن یک مسیر ارزان و ایمن برای فراهم کردن بخش زیادی از نیازهای نیتروژنی گیاه، انسان و دام به شمار می‌آید. به‌علاوه، این مسیر به عنوان یک روش طبیعی برای وارد کردن نیتروژن به درون بیوسفر در نظر گرفته شده‌است (Mwanamwenge et al. 1998). در راستای توجه به کشاورزی پایدار و استفاده از روش‌های دوست-دار محیط زیست، گیاهان لگوم با رابطه همزیستی با ریزوبیوم‌های مناسب می‌توانند در خاک‌های فقیر از نظر نیتروژن کشت شوند.

گیاه نخود یکی از منابع مهم غذایی در بسیاری از کشورهای گرمسیری و نیمه‌گرمسیری آسیا و آفریقا به‌شمار می‌آید. این لگوم، یک منبع غنی از پروتئین، کربوهیدرات، فیبر و مواد معدنی (فسفر، کلسیم، منگنز، آهن و روی)، اسیدهای چرب غیراشباع و بتاکاروتن می‌باشد (Gaur et al. 2012). ایران یکی از کشورهای مهم تولید کننده نخود است که از نظر سطح زیر کشت مقام چهارم را بعد از کشورهای هند، ترکیه و پاکستان داراست (Sabaghpour et al. 2006). این لگوم، بخش قابل‌ملاحظه‌ای از نیازهای نیتروژنی مورد نیاز برای رشد و تولید ماده خشک را از طریق ایجاد رابطه همزیستی با گونه‌ها یا سویه‌های ریزوبیوم تامین می‌کند. بنابراین انتخاب یک جمعیت همزیست کارآمد بین این لگوم و باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن می‌تواند از طریق بالا بردن تثبیت بیولوژیکی نیتروژن به موفقیت در پتانسیل تولید این محصول منجر شود. اهمیت رابطه همزیستی بین نخود و سویه‌های ریزوبیوم اختصاصی آن برای افزایش تولید محصول در چندین مطالعه گزارش شده‌است (Ben Romdhane et al. 2007; Ben Romdhane et al. 2008; Laranjo et al. 2014). بر اساس این گزارش‌ها، تنوع در عملکرد همزیستی این لگوم احتمالاً به واسطه تنوع در کارایی همزیستی سویه‌ها یا گونه‌های ریزوبیوم و درجه سازگاری آن‌ها با گیاه میزبان می‌باشد که پتانسیل تولید محصول را در این لگوم تحت‌تاثیر قرار می‌دهند (Laranjo et al.

2014; Laranjo et al. 2002). بنابراین، ظرفیت تثبیت‌کنندگی نیتروژن و در نتیجه تولید محصول، می‌تواند توسط تاثیر متقابل بین سویه‌های ریزوبیوم و رقم‌های لگوم تضمین شود. به این ترتیب، انتخاب کارآمدترین سویه‌ها یا گونه‌های ریزوبیوم یک استراتژی مؤثر برای بالا بردن رشد و تولید محصولات لگوم از طریق بهبود تشکیل گرهک و ظرفیت تثبیت نیتروژن می‌باشد (Bhattacharyya and Jha 2012). به‌علاوه، با توجه به این‌که تثبیت بیولوژیکی نیتروژن به تبادلات کربن و نیتروژن بین لگوم و ریزوبیوم اختصاصی آن وابسته می‌باشد، شناخت دقیق مسیرهای متابولیسمی کربن و نیتروژن که فعالیت نیتروژناز و نتیجتاً تثبیت نیتروژن را تحت‌تاثیر قرار می‌دهند، ما را در افزایش پتانسیل تولید محصول از طریق اصلاح و بهبود تثبیت بیولوژیکی نیتروژن توسط روش‌های مهندسی ژنتیک کمک خواهد کرد (Laranjo et al. 2014b; Nasr Esfahani et al. 2014).

تثبیت بیولوژیکی نیتروژن توسط کمپلکس آنزیمی نیتروژناز کاتالیز می‌شود که از طریق یک واکنش وابسته به انرژی، نیتروژن گازی اتمسفر را به آمونیوم قابل دسترس برای گیاه تبدیل می‌کند. این آنزیم یک کمپلکس متالوآنزیمی دوجزیی می‌باشد و شامل جزء دی‌نیتروژناز ردوکتاز (جزء ۲ یا جزء پروتئین آهن نامیده می‌شود) که توسط ژن *nifH* کد می‌شود و جزء دی‌نیتروژناز (جزء ۱ یا جزء پروتئین آهن-مولیبدن نیز نامیده می‌شود) که دارای زیرواحد‌های  $\alpha$  و  $\beta$  است و به‌ترتیب توسط *nifD* و *nifK* کد می‌شوند (Halbleib and Ludden 2000). کارایی تثبیت بیولوژیکی نیتروژن با سطح بیان ژن‌های *nifD* و *nifH* مرتبط می‌باشد (Bowers et al. 2008). بنابراین این ژن‌ها به‌عنوان شناساگر برای ارزیابی تنوع بین عملکرد باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن پیشنهاد شده‌اند (Deslippe and Egger 2006; Burbano et al. 2011). در مطالعات متعددی ارتباط نزدیک بین سرعت تثبیت نیتروژن و سطح بیان ژن *nifH* گزارش شده‌است (Deslipper and Egger 2006; Burbano et al. 2011). به‌طوری‌که کاهش میزان تثبیت نیتروژن تحت شرایط نامناسب اکسیژن و یا در حضور  $\text{NH}_4^+$  به کاهش سطح بیان ژن *nifH* نسبت داده شده‌است (Severin et al. 2010).

گلدان‌های ۱/۵ لیتری حاوی ورمیکولیت اتوکلاو شده کشت شدند. گونه *M. ciceri* CP-31 از یکاردا در کشور سوریه و گونه *M. mediterraneum* SWRI9 از مؤسسه تحقیقات آب و خاک تهیه شد. گروهی از بذور کشت شده با پنج میلی‌لیتر سوسپانسیون *M. ciceri* CP-31 و گروه دیگر با پنج میلی‌لیتر سوسپانسیون *M. mediterraneum* SWRI9 تلقیح شدند. سوسپانسیون‌های ریزوبیوم مورد استفاده دارای تراکم سلولی  $10^9$  سلول در هر میلی‌لیتر بودند. تلقیح با گونه‌های ریزوبیوم مورد نظر در سه و شش روز بعد از کاشت نیز تکرار شد. گلدان‌ها برای مدت چهار هفته در شرایط کنترل شده گلخانه (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۰ درصد و نور ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) نگهداری شدند. گلدان‌ها سه روز در هفته با محلول غذایی فاقد نیتروژن ( $MgSO_4$ , 2.05 mM;  $CaCl_2$ , 3.3 mM;  $K_2SO_4$ , 1.25 mM;  $H_3BO_3$ , 4  $\mu M$ ;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.55  $\mu M$ ;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 1.55  $\mu M$ ;  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , 6.6  $\mu M$ ,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.12  $\mu M$ , FeEDTA, 40  $\mu M$ ) و در بقیه روزها با آب معمولی آبیاری شدند. چهار هفته بعد از کشت، گروهی از گیاهان برای ارزیابی شاخص‌های رشد (تعداد گرهک، وزن خشک ریشه، ساقه و گرهک) مورد استفاده قرار گرفتند و از گروه دیگر، بخش‌های مختلف (ریشه و گرهک) جداسازی شده و بعد از فریز کردن در نیتروژن مایع به منظور بررسی بیان ژن‌های *nifD*، *nifH* و *nifK* و نیز اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های مربوط به متابولیسم کربن و نیتروژن در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به منظور استخراج RNA کل، گرهک‌های جمع‌آوری شده در هاون استریل با استفاده از نیتروژن مایع پودر شدند و RNA با استفاده از RNeasy Plant Mini Kit and QIAcube system (Qiagen) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استخراج شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nano Drop Technology, wilmington, DE, USA) اندازه‌گیری شد. برای برداشتن آلودگی DNA ژنومی، مراحل حذف DNA ژنومی روی چهار میکروگرم از RNA کل مربوط به هر نمونه با استفاده از TURBO DNA-free DNase I مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سنتز cDNA با یک میکروگرم RNA فاقد DNA ژنومی با استفاده از ReverTra Ace qRRCR RT kit

فرآیند تثبیت نیتروژن به مقادیر زیادی ترکیبات احیاءکننده و ATP نیاز دارد. این انرژی توسط ترکیبات حاصل از فتوسنتز (عمدتاً در شکل ساکارز) تامین می‌شود که این ترکیبات در برگ‌ها سنتز شده و از طریق شیره آبکش به گرهک‌ها انتقال می‌یابند. قابلیت دسترسی به ترکیبات فتوسنتزی به عنوان یک فاکتور مهم کنترل کننده رشد گرهک و تثبیت نیتروژن در نظر گرفته شده است (Flemetakis et al. 2006). ساکارز انتقال یافته به درون گرهک‌ها به منظور تامین انرژی و اسکلت کربن مورد نیاز برای فرآیند تثبیت نیتروژن، تثبیت آمونیوم و خروج آمینواسیدها و دیگر ترکیبات نیتروژنی از گرهک توسط آنزیم‌های ساکارز سنتاز و آلکالین اینورتاز متابولیزه می‌شوند. هگزوزهای حاصل از شکستن ساکارز توسط آنزیم‌های گلیکولیتیک بیشتر متابولیزه می‌شود و فسفوانول پیروات را ایجاد می‌کند که توسط آنزیم‌های فسفوانول پیروات کربوکسیلاز و مالات دهیدروژناز برای تولید سوبسترای اصلی تنفس باکتریوئید (مالات) احیاء می‌شود (Schulze 2004). مطالعات مختلف نشان داده که میزان فعالیت آنزیم‌های مربوط به مسیرهای متابولیسم کربن و نیتروژن می‌تواند ظرفیت تثبیت نیتروژن را در جمعیت‌های مختلف همزیستی لگوم-ریزوبیوم تحت تاثیر قرار دهد (Chopra et al. 2002; Larrainzar et al. 2014b; Nasr Esfahani et al. 2014).

در این تحقیق، کارآیی همزیستی بین خود با دو گونه مزوریزوبیوم شامل *Mesorhizobium ciceri* CP-31 (گونه ریزوبیوم غیربومی ایران) و *M. mediterraneum* SWRI9 (گونه ریزوبیوم بومی ایران) بر اساس عوامل رشد مقایسه شد. به منظور بررسی دلایل اختلاف در عملکرد همزیستی خود با دو گونه مزوریزوبیوم مورد بررسی، سطح بیان ژن‌های ساختمانی آنزیم نیتروژناز (*nifD*، *nifH* و *nifK*) گرهک و نیز فعالیت آنزیم‌های کلیدی متابولیسم کربن و نیتروژن در گرهک‌های حاصل از دو گونه مزوریزوبیوم مورد نظر بررسی شد.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه از بذره‌های نخود رقم کابلی ILC482 تهیه شده از مؤسسه تحقیقات دیم کشور استفاده شد و آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در شش تکرار انجام شد. بذره‌های نخود در

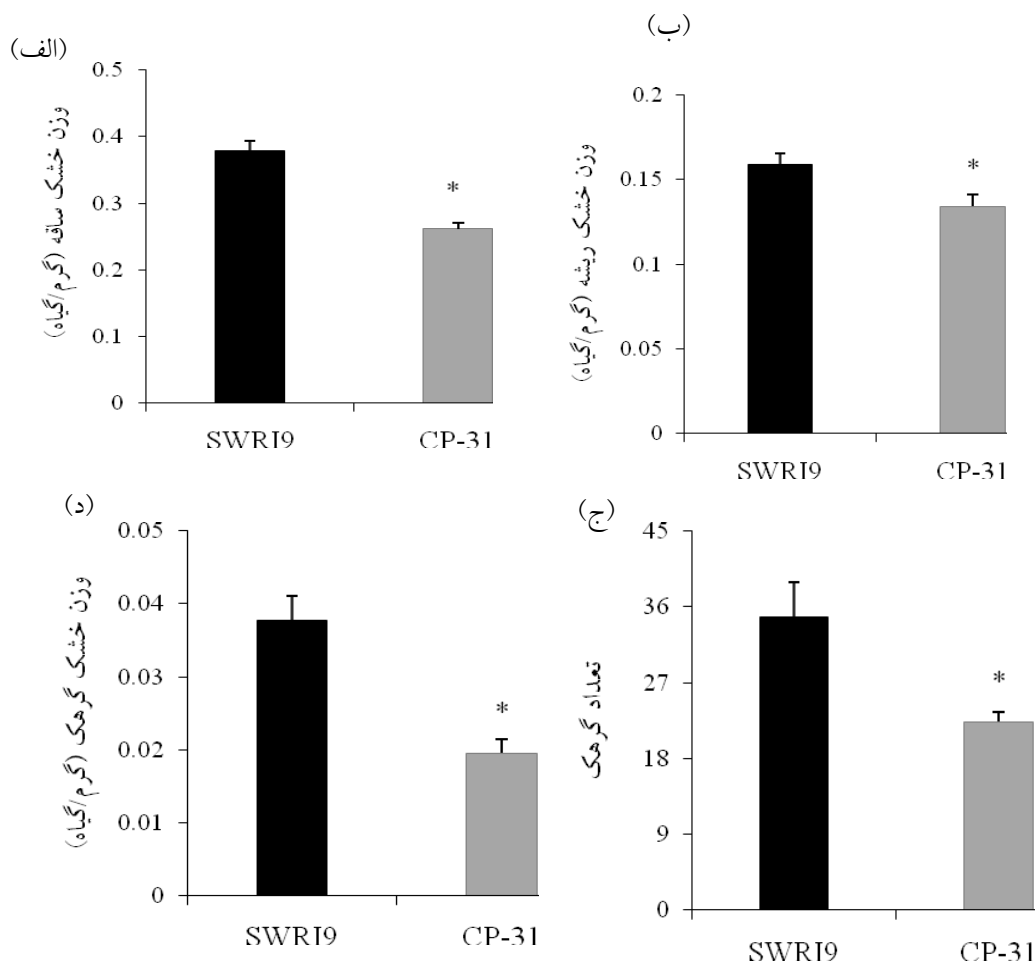
به‌منظور استخراج عصاره آنزیمی، ۲۰۰ میلی‌گرم بافت گرھک با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل ۵۰ میلی‌مولار MOPS (۴- مورفولین پروپان سولفونیک اسید)، ۱۰ میلی‌مولار ۲- مرکاپتواتانول، یک میلی‌مولار EDTA، پنج میلی‌مولار  $MgCl_2$ ، پنج درصد PVP، ۱۰ درصد گلیسرول و یک میلی‌مولار PMSF (فنیل متیل سولفونیل فلوراید) در هاون سرد، ساییده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰۰۰۰g در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. عصاره حاصل برای اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی و سنجش پروتئین کل استفاده شد (Nasr Esfahani et al. 2014b). فعالیت آنزیم‌های فسفونول پیروات کربوکسیلاز (PEPC)، ملات دهیدروژناز (MDH)، NADH-گلوتامات دهیدروژناز، گلوتامات سنتاز (NADH-GOGAT)، آمینواسید ترانسفراز (AAT)، بر اساس کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر به‌واسطه اکسیداسیون NAD(P)H و فعالیت ایزوسیترات دهیدروژناز (NADP-ICDH)، ساکارز سنتاز (SS)، آلکالین اینورتاز (AI)، گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز (G6PDH)، ۶-فسفوگلوکونات دهیدروژناز (6PGDH)، UDP-گلوکز پیروفسفریلاز (UD-GPP) و NAD-گلوتامات دهیدروژناز (NAD-GDH) بر اساس افزایش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر به‌واسطه تولید NAD(P)H اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم گلوتامین سنتاز (GS) بر اساس میزان تولید ۷- گلوتامیل هیدروکسامات در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *nifH* و *nifD* توسط نرم‌افزار Primer3 طراحی شد و آغازگرهای مربوط به 16S rRNA به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد (جدول ۱). واکنش PCR در زمان واقعی با استفاده از دستگاه (MX3000P system Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) با کیت سایبرگرین Thundebird™SYBR®qPCR Mix (Toyobo, Japan) طبق دستورالعمل پیشنهادی شرکت انجام شد. هر واکنش در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر دارای ۰/۴ میکرومولار برای هر کدام از آغازگرها انجام شد. شرایط دمایی و زمانی برای تکثیر قطعات مورد نظر شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و ۳۳ چرخه به صورت واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای *nifH* دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای *nifK*، دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای *nifK* و دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد برای 16S rRNA به مدت ۳۰ ثانیه، طولی شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و سرانجام یک مرحله طولی شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه صورت گرفت. منحنی ذوب بعد از آخرین چرخه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اجرا شد. منحنی ذوب با برنامه دمایی ۰/۵ درجه سانتی‌گراد در هر چرخه بین دمای ۶۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد رسم شد. پس از دریافت داده‌های خام به‌صورت Ct (Threshold cycle)، داده‌ها توسط روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

جدول ۱- جفت آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن‌های *nifK*، *nifD*، *nifH* و 16S rRNA

ژن	توالی (۵'→۳')	آغازگر	اندازه تکثیر شده (bp)
<i>nifH</i>	F: CATCCTCAAATATGCCCATTC	۲۱	۲۴۵
	R: GTGGATCTTCTCGGCCAGAG	۲۰	
<i>nifD</i>	F: GCATACTGCTTGAGGAGATAG	۲۱	۲۷۴
	R: TTGGCAATGACCTTTTCGGTC	۲۱	
<i>nifK</i>	F: AGTCATGTCGACGGCTATGAC	۲۱	۲۰۷
	R: ATCGAACTGGTCAGAGGCATC	۲۱	
16S rRNA	F: TACTGACGCTGAGGTGCGAAAG	۲۲	۲۱۲
	R: AAACCACATGCTCCACCGCTTG	۲۲	



شکل ۱- مقایسه شاخص‌های رشد در همزیستی بین نخود با *M. mediterraneum* SWRI9 یا *M. ciceri* CP-31 (الف) وزن خشک ساقه، (ب) وزن خشک ریشه، (ج) تعداد گرهک و (د) وزن خشک گرهک. مقادیر میانگین شش تکرار  $\pm$  SE می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش آزمون T-test و در سطح حداقل اختلاف معنی‌دار پنج درصد انجام شده است. \* بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

(یک میلی‌مولار)، ساکارز (۱۰۰ میلی‌مولار) و دو واحد از آنزیم-های هگزوکیناز، فسفوگلوکزایزومراز و گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز؛ برای آنزیم AAT: NADH (دو میلی‌مولار)، آسپارتیک اسید (۱۰ میلی‌مولار)،  $\alpha$ -کتوگلوئارات (یک میلی‌مولار)، پیریدوکسال فسفات (سه میکرومولار) و ۳/۶ واحد ملات دهیدروژناز (González et al. 1995)، برای آنزیم MDH: NADH (۰/۲ میلی‌مولار) و اگزوالوستیک اسید (یک میلی‌مولار)؛ برای آنزیم UDP-GPP: کلرید منیزیم (چهار میلی‌مولار)، NAD (یک میلی‌مولار)،  $15 \mu\text{M}$  گلوکز ۱ و ۶-دی‌فسفات (۱۵ میکرومولار)، پیروفسفات (۱۰ میلی‌مولار)، UDP-گلوکز (دو میلی‌مولار)، ۱/۹ واحد فسفوگلوکوموتاز، ۰/۸ واحد گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز

ترکیب بافر واکنش مورد استفاده برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PEPC شامل NADH (۰/۲ میلی‌مولار)، فسفوانول پیروات (دو میلی‌مولار)، بی‌کربنات سدیم (دو میلی‌مولار) و ۳/۶ واحد آنزیم ملات دهیدروژناز؛ برای آنزیم GS: کلرید منیزیم (۲۰ میلی‌مولار)، هیدروکسی آمین (۲۵ میلی‌مولار)، گلوتامات (۱۰۰ میلی‌مولار) و ATP (۱۰۰ میلی‌مولار)؛ برای آنزیم SS: کلرید منیزیم (پنج میلی‌مولار)، ساکارز (۱۰۰ میلی‌مولار)، پیروفسفات (یک میلی‌مولار)، گلوکز ۱ و ۶-دی‌فسفات (۲۰ میکرومولار)، NAD (یک میلی‌مولار)، ۲ واحد از آنزیم‌های UDP-گلوکز پیروفسفریلاز، فسفوگلوکوموتاز و گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز؛ برای آنزیم AI: کلرید منیزیم (پنج میلی‌مولار)، NAD (یک میلی‌مولار)، ATP

به طوری که در همزیستی نخود با *M. mediterraneum* SWRI9 تعداد گرهک بیش تری در مقایسه با *M. ciceri* CP-31 روی ریشه تشکیل شد که با بالاتر بودن قابل ملاحظه وزن خشک گرهک در این جمعیت همزیستی همراه بود (شکل ۱- ج و د). در برخی تحقیقات ارتباط مستقیم بین وزن خشک گرهک و میزان تثبیت نیتروژن گزارش شده است (Laguerre et al. 2007). به این ترتیب بیش تر بودن وزن خشک گرهک در همزیستی نخود با *M. mediterraneum* SWRI9 نشان دهنده میزان بالاتر تثبیت نیتروژن و همچنین بالاتر بودن کارایی همزیستی در این جمعیت همزیست است. این نتایج با وزن خشک بالاتر ریشه و ساقه نیز تایید شد. این نتایج تایید می کند که کارایی همزیستی بین لگوم و ریزوبیوم بسته به نوع گونه یا سویه ریزوبیوم مورد استفاده تغییر می کند (Rangin et al. 2008; Terpolilli et al. 2008; Oono and Denison 2010). در مطالعات انجام شده روی *M. truncatula* A17 (Larrainzar et al. 2014) و نخود (Mhadhbi et al. 2008; Nasr Esfahani et al. 2014b) نیز نشان داده شده که نوع سویه ریزوبیوم استفاده شده ظرفیت تثبیت کنندگی نیتروژن در درون گرهک و همچنین میزان رشد گیاه را تحت تاثیر قرار می دهد. براساس این نتایج می توان پیشنهاد کرد که غربال کردن سویه ها یا گونه های ریزوبیوم کارآمد از نظر تثبیت نیتروژن و همچنین شناسایی مکانیسم های مولکولی و فیزیولوژیکی که عملکرد بالا در روابط همزیستی بین لگوم و گونه ها یا سویه های ریزوبیوم را حمایت می کنند، به بالا بردن پتانسیل تولید محصول در لگوم ها از طریق مهندسی ژنتیک و دستکاری های ژنتیکی کمک خواهند کرد. در ریزوبیوم های تثبیت کننده نیتروژن، بررسی سطح بیان ژن های *nifD*، *nifH* و *nifK* به عنوان یک شناساگر خوب برای ارزیابی وضعیت تثبیت کنندگی نیتروژن پیشنهاد شده است (Zehr et al. 2003). در گزارش های متعددی نشان داده شده که ارتباط نزدیکی بین میزان فعالیت آنزیم نیتروژناز و سطح بیان ژن *nifH* در موجودات تثبیت کننده نیتروژن وجود دارد (Deslippe and Egger, 2006; Burbano et al. 2011). به علاوه، *nifH* به طور گسترده برای تخمین تنوع در باکتری های تثبیت کننده نیتروژن استفاده شده است (Severin et al. 2010). در گزارش دیگری بیان شده که سطح بیان ژن *nifK* با میزان فعالیت آنزیم نیتروژناز و در

(Gordon and Kessler 1990)؛ برای آنزیم GOGAT: NADH (۰/۱ میلی مولار)،  $\alpha$ -کتوگلو تارات (۲/۵ میلی مولار)، گلو تامین (۱۰ میلی مولار)؛ برای آنزیم NAD-GDH: NADH (۰/۱ میلی - مولار)،  $\alpha$ -کتوگلو تارات (۲/۵ میلی مولار)، سولفات آمونیوم (۲۰۰ میلی مولار)؛ برای آنزیم NADH-GDH: NAD (۰/۵ میلی مولار)، گلو تامات (۵۰ میلی مولار) (Groat and Vance 1981)؛ برای آنزیم G6PDH: کلرید منیزیم (۱۰ میلی مولار)،  $\text{NADP}^+$  (۰/۵ میلی مولار)، گلوکز-۶-فسفات (۲/۵ میلی مولار) و  $\text{NADP}^+$  (۰/۳ واحد -۶ فسفوگلو کونات دهیدروژناز؛ برای آنزیم 6PGDH: کلرید منیزیم (۱۰ میلی مولار)،  $\text{NADP}^+$  (۰/۵ میلی مولار)، فسفوگلو کونات (۲/۵ میلی مولار) (Copeland et al. 1989)؛ برای آنزیم NAD-ME: کلرید منگنز (دو میلی مولار)، مالات (یک میلی مولار)،  $\text{NADP}^+$  (۰/۴ میلی مولار) (Le Roux et al. 2008) و برای آنزیم  $\text{NADP}^+$ -ICDH:  $\text{NADP}^+$  (۰/۵ میلی مولار)، کلرید منیزیم (پنج میلی مولار) و ایزوسیترات (یک میلی مولار) (Marino et al. 2007) بود. مقدار پروتئین کل توسط روش برادفورد (Bradford 1976) ارزیابی گردید.

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ صورت گرفت و مقایسات میانگین از طریق آزمون T-test در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

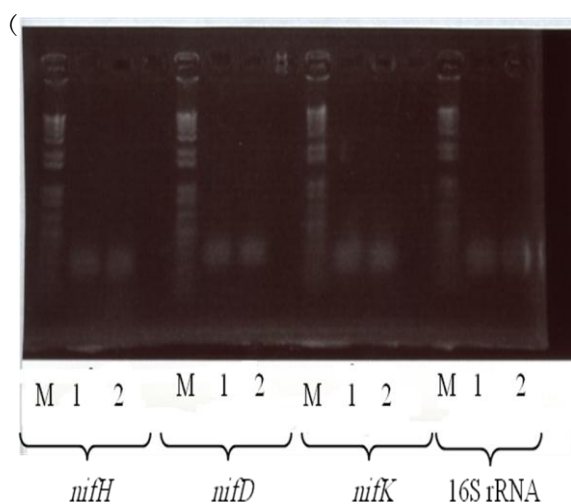
### نتایج و بحث

در این مطالعه، عملکرد همزیستی نخود با دو گونه مزوریزوبیوم شامل *M. mediterraneum* SWRI9 و *M. ciceri* CP-31 بررسی قرار گرفت. کارایی همزیستی بین لگوم و ریزوبیوم معمولاً با مقایسه پارامترهای رشد ارزیابی می شود (Larrainzar et al. 2014). به این ترتیب، در این تحقیق عملکرد همزیستی نخود با دو گونه مزوریزوبیوم مورد نظر بر اساس پارامترهای رشدشان (تعداد گرهک و وزن خشک ریشه، ساقه و گرهک) مورد مقایسه قرار گرفت (شکل ۱). نتایج نشان داد که در همزیستی بین نخود با *M. mediterraneum* SWRI9 وزن خشک ساقه و ریشه در مقایسه با *M. ciceri* CP-31 به ترتیب ۴۴/۸ و ۱۷/۹ درصد بالاتر بود (شکل ۱-الف و ب). به علاوه، تعداد گرهک تشکیل شده روی ریشه نیز بسته به نوع گونه مزوریزوبیوم استفاده شده متفاوت بود

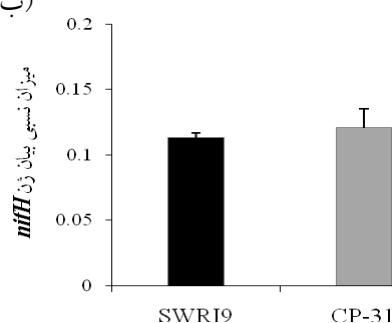
گرهک‌های مربوط به *M. mediterraneum* SWRI9 در مقایسه با میزان بیان این ژن در گرهک‌های حاصل از همزیستی بین نخود با *M. ciceri* CP-31 به میزان قابل ملاحظه‌ای بالاتر بود (شکل ۲). به این ترتیب، سطح بیان بالاتر ژن *nifK* در گرهک‌های حاصل از *M. mediterraneum* SWRI9 نشان دهنده ظرفیت بالاتر تثبیت کنندگی نیتروژن در گرهک‌های حاصل از این گونه مزوریزوبیوم است. این نتایج، عملکرد بالاتر همزیستی که با ارزیابی فاکتورهای رشد تخمین زده شدند را در این جمعیت همزیستی تایید می‌کند. نتایج این مطالعه نشان داد که فعالیت آنزیم‌های SS و UDP-GPP در گرهک‌های حاصل از *M. mediterraneum* SWRI9 در مقایسه با *M. ciceri* CP-31 به ترتیب ۶۷/۵ و ۷۳/۴ درصد بالاتر بودند (شکل ۳- الف و ج).

نتیجه سرعت تثبیت نیتروژن مرتبط می‌باشد ( Nasr Esfahani et al. 2014a). در این مطالعه به منظور تایید عملکرد بالاتر فرآیند تثبیت نیتروژن در گرهک‌های حاصل از *M. mediterraneum* SWRI9 در مقایسه با *M. ciceri* CP-31، سطح بیان ژن‌های ساختمانی آنزیم نیتروژناز (*nifD*، *nifH* و *nifK*) در دو جمعیت همزیستی مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا حضور ژن‌های مورد نظر در گرهک‌های هر دو جمعیت همزیستی، توسط روش الکتروفورز تایید شد (شکل ۲) و سپس اختلاف در سطح بیان این ژن‌ها در دو جمعیت همزیستی توسط روش PCR در زمان واقعی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطح بیان ژن‌های *nifD* و *nifH* در گرهک‌های حاصل از دو گونه مزوریزوبیوم مورد بررسی تفاوت معنی‌داری نداشت ولی سطح بیان ژن *nifK* در

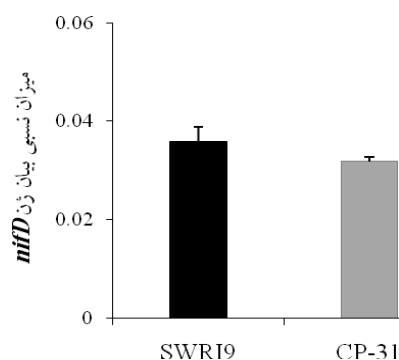
(الف)



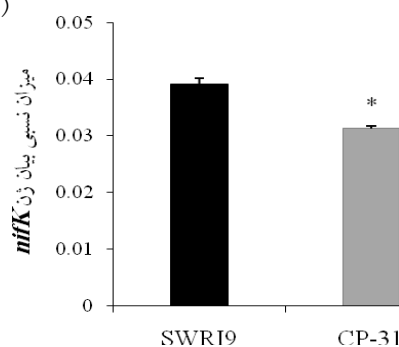
(ب)



(ج)



(د)



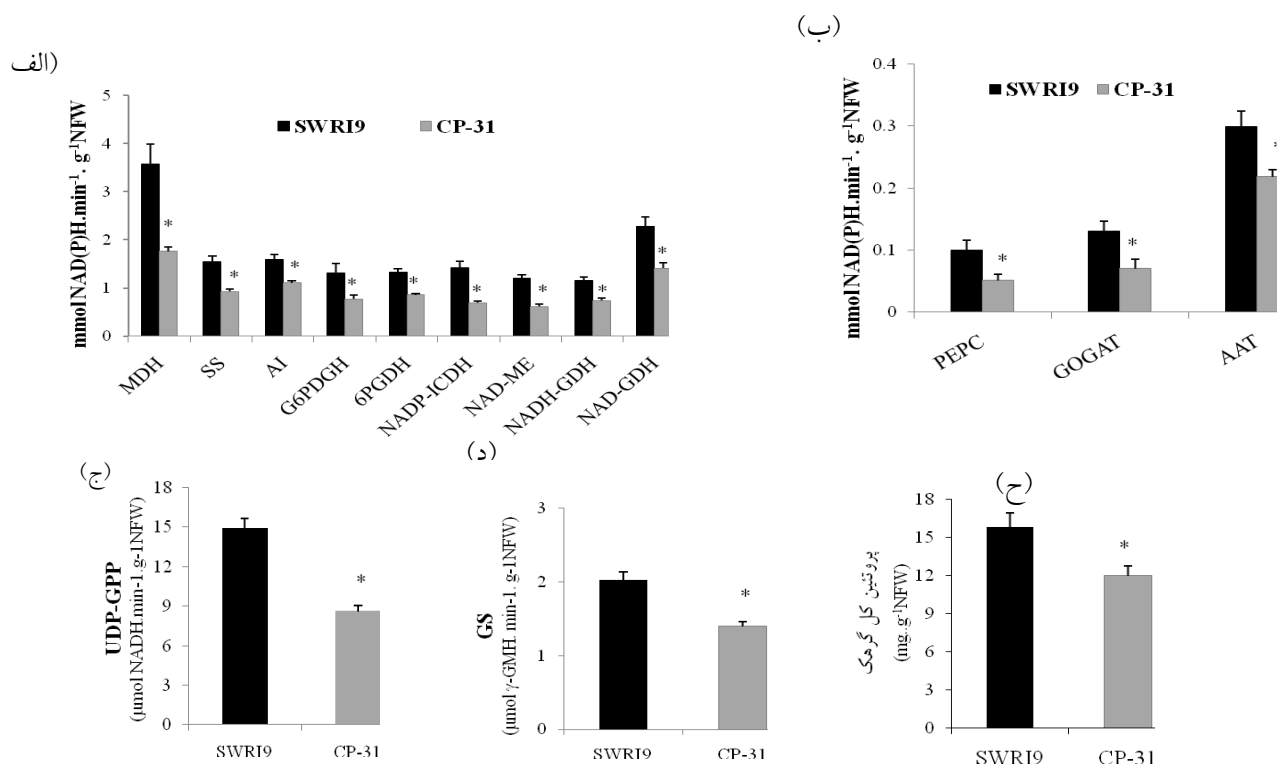
شکل ۲- الف) نمونه ژل آگارز ژل برای ژن‌های *nifH*، *nifD*، *nifK* و 16S rRNA، ب-د) مقایسه بیان ژن‌های *nifH*، *nifD*، *nifK* و *nifH*، *nifD*، *nifK* و 16S rRNA در گرهک‌های حاصل از همزیستی بین نخود با *M. mediterraneum* SWRI9 (۱) یا *M. ciceri* CP-31 (۲). مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  SE می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش آزمون T-test و در سطح حداقل اختلاف معنی‌دار پنج درصد انجام شده است. سایز مارکر: ۱ kb اندازه باندها  $nifH = 245$ ،  $nifD = 274$ ،  $nifK = 207$  و 16S rRNA = 212 \* بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

نیتروژن گرھک نقش ندارد به دلیل این که متابولیسم ساکارز توسط AI به ATP بیش‌تری نیاز دارد که با شرایط میکروهوای داخل گرھک سازگار نیست ( Nasr, Welham et al. 2009; Esfahani et al. 2014b).

هگزوزفسفات‌های حاصل از شکسته شدن ساکارز توسط آنزیم‌های PEPC و MDH متابولیزه می‌شوند و سوبستراهایی تنفسی باکتریوئیدها و همچنین اسکلت کربن مورد نیاز برای تثبیت آمونیوم حاصل از فعالیت آنزیم نیتروژناز را فراهم می‌کنند (Schulze 2004). به‌علاوه، فعالیت متوالی آنزیم‌های PEPC، MDH و NAD-ME نقش مهمی در فراهم کردن پیروات برای چرخه تری کربوکسیلیک اسید باکتریوئید بازی می‌کنند. به این ترتیب، با توجه به این که آنزیم نیتروژناز نیاز به مقادیر زیادی انرژی برای تثبیت نیتروژن دارد، فعالیت بالای این سه آنزیم در گرھک‌ها تأمین مقادیر کافی انرژی را برای فعالیت آنزیم نیتروژناز تضمین می‌کند (Le Roux et al. 2006). نتایج این مطالعه نشان داد که فعالیت PEPC، MDH و NAD-ME در گرھک‌های مربوط به همزیستی نخود با *M. mediterraneum* به ترتیب ۹۴/۹، ۱۰۲/۳ و ۹۵/۷ درصد در مقایسه با فعالیت این آنزیم‌ها در گرھک‌های *M. ciceri* CP-31 بالاتر بودند (شکل ۳-الف و ب) که احتمالاً به فراهم‌سازی بیش‌تر سوبسترای کربن (عمدتاً به شکل ملات) و انرژی برای متابولیسم باکتریوئید منجر می‌شود. مطالعات دیگری نشان داده که کاهش در سطح بیان و فعالیت آنزیم PEPC به کاهش سرعت تثبیت نیتروژن و عملکرد همزیستی منتج می‌شود (Nomura et al. 2006; Fischinger and Schulz 2010). همچنین افزایش در بیان MDH فعالیت اختصاصی گرھک را افزایش می‌دهد (Le Roux et al. 2014). بخشی از هگزوزفسفات‌های حاصل از شکسته شدن توسط مسیر اکسیداتیو پنتوز فسفات بیش‌تر متابولیزه شده و ترکیبات احیاء کننده (NADPH) مورد نیاز برای فعالیت آنزیم نیتروژناز و فرآیند تثبیت نیتروژن را فراهم می‌کند. در گزارش‌های متعددی نشان داده شده که یک رابطه مستقیم بین فعالیت آنزیم نیتروژناز و کارایی همزیستی با فعالیت آنزیم‌های کلیدی این مسیر شامل G6PDH و 6PGDH وجود دارد، به‌طوری که در گرھک‌های دارای سرعت

بنابراین کارایی بالاتر تثبیت نیتروژن در همزیستی نخود- *M. mediterraneum* SWRI9 با فعالیت بالاتر آنزیم‌های SS و UDP-GPP و در نتیجه ظرفیت بالاتر تشکیل ملات (سوبسترای تنفسی باکتریوئید) در این گرھک‌ها مرتبط می‌باشد. این نتایج اهمیت شکسته شدن ساکارز از طریق مسیر SS و UDP-GPP در تنظیم متابولیسم کربن گرھک و فعالیت تثبیت نیتروژن را تایید کرد. نتایج مشابهی در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده‌است (Larrainzar et al. 2014; Nasr Esfahani et al. 2014b). گزارش‌های متعددی نشان داده شده که یک ارتباط نزدیک بین عملکرد همزیستی و همچنین سرعت تثبیت نیتروژن با متابولیسم کربن گرھک وجود دارد (Suliman and Schulze 2010; Suliman et al. 2013; Nasr Esfahani et al. 2014b). ظرفیت تثبیت کنندگی نیتروژن در جمعیت‌های همزیستی به تأمین کافی سوبستراهای کربن (عمدتاً در شکل ملات) برای تنفس باکتریوئید وابسته است که توسط متابولیسم ساکارز فراهم می‌شود. تولید هگزوزها از طریق شکسته شدن ساکارز، اولین مرحله متابولیسم کربن در گرھک‌های تثبیت کننده نیتروژن است و به عنوان مرحله کلیدی در تنظیم فعالیت نیتروژناز و همچنین ظرفیت تثبیت نیتروژن عمل می‌کند. ساکارز توسط مسیر SS و UDP-GPP یا مسیر AI متابولیزه می‌شود (Vance, 2008). در چندین مطالعه، میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم SS توسط روش‌های موتاسیون (Horst et al. 2007) یا آنتی‌سنس (Baier et al. 2007) تغییر داده شد و پیشنهاد شد که گرھک‌ها برای ایجاد و حفظ یک همزیستی کارآمد از نظر تثبیت نیتروژن به سطح کافی از فعالیت SS نیاز دارند و به این ترتیب گیاهان دارای سطح پایینی از فعالیت SS قادر به تثبیت نیتروژن نیستند. به‌علاوه در مطالعات دیگر نشان داده شده که کاهش فعالیت آنزیم SS در پاسخ به تنش‌های محیطی مانند خشکی و شوری به‌طور همزمان با کاهش تثبیت نیتروژن اتفاق می‌افتد (Arrese-Igor et al. 2011). فعالیت آنزیم AI در گرھک‌های حاصل از همزیستی نخود با *M. mediterraneum* SWRI9 در مقایسه با جمعیت همزیستی دیگر به طور معنی‌داری بالاتر بود (شکل ۳-الف). به هر حال، در گزارش‌های متعددی بیان شده که این آنزیم نمی‌تواند مسئول تأمین سوبستراهای تنفسی متابولیسم باکتریوئید باشد و بنابراین در تنظیم فعالیت تثبیت





شکل ۳- مقایسه فعالیت آنزیم‌های متابولیسم کربن و نیتروژن گرھک در همزیستی بین خود با *M. mediterraneum* SWRI9 یا *M. ciceri* CP-31 (الف) ملات دهیدروژناز (MDH)، ساکارز سنتاز (SS)، آلکالین اینورتاز (AI)، گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز (G6PDH)، ۶-فسفوگلوکونات دهیدروژناز (6PGDH)، NAD-ایزوسیترات دهیدروژناز (NADP-ICDH)، NAD-مالیک آنزیم (NAD-ME)، NAD/NADH گلوتامات دهیدروژناز (NAD/NADH-GDH) فسفوانول پیروات کربوکسیلاز (PEPC)، گلوتامات سنتاز (GOGAT)، AAT: آمینوآسید ترانسفراز (AAT) ج) UDP-گلوکز پیروفسفریلاز (UDP-GPP) (د) گلوتامین سنتاز (GS) پروتئین کل گرھک. مقادیر میانگین شش تکرار  $\pm$  SE می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش آزمون T-test در سطح احتمال پنج درصد انجام شده‌است. \* بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

بالای تثبیت نیتروژن فعالیت آنزیم‌های G6PDH و 6PGDH بالاتر است (Galvez et al. 2005; Chopra et al. 2002). مقایسه فعالیت آنزیم‌های G6PDH و 6PGDH در گرھک‌های حاصل از *M. mediterraneum* SWRI9 و *M. ciceri* CP-31 نشان داد که فعالیت این آنزیم‌ها در گرھک‌های حاصل از *M. mediterraneum* با SWRI9 عملکرد بالاتر همزیستی در مقایسه با فعالیت‌شان در گرھک‌های حاصل از *M. ciceri* CP-31 به ترتیب ۷۰/۸ و ۵۵/۴ درصد بالاتر بود (شکل ۳-الف). از آنجاکه آمونیوم تولید شده در طی فرآیند تثبیت نیتروژن اتمسفری بسیار سمی است بنابراین  $\text{NH}_4^+$  باید سریعاً به آمینواسیدهایی مانند گلوتامین و گلوتامات تثبیت شود (Plaxton and Podestá 2006). مسیر گلوتامین سنتاز-گلوتامات سنتاز بودن اسکلت کربن مرتبط می‌باشد (Barsch et al. 2006; GS/GOGAT) به‌عنوان مهم‌ترین مسیر تثبیت آمونیوم در سلول-های گیاهی ذکر شده‌است. میزان فعالیت آنزیم‌های مرتبط با سنتز آمینواسیدها در گرھک‌های ریشه به سطح تولید  $\text{NH}_4^+$  در طی تثبیت نیتروژن اتمسفری وابستگی دارد به‌طوری‌که تولید بالای آمونیوم به‌واسطه فعالیت بالای آنزیم نیتروژناز باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های مسئول تثبیت  $\text{NH}_4^+$  می‌شود. به‌علاوه، اختلاف در متابولیسم کربن گرھک و در نتیجه ظرفیت متفاوت تولید انرژی و اسیدهای آلی به‌عنوان سوبستراهای تنفسی باکتریوئید در جمعیت‌های مختلف همزیستی باعث ایجاد اختلاف در فعالیت بیوستری آمینواسیدها می‌شود. بنابراین تثبیت  $\text{NH}_4^+$  حاصل از فعالیت آنزیم نیتروژناز با کارایی متابولیسم کربن گرھک و فراهم بودن اسکلت کربن مرتبط می‌باشد (Barsch et al. 2006; GS/GOGAT)

بالای تثبیت نیتروژن فعالیت آنزیم‌های G6PDH و 6PGDH بالاتر است (Galvez et al. 2005; Chopra et al. 2002). مقایسه فعالیت آنزیم‌های G6PDH و 6PGDH در گرھک‌های حاصل از *M. mediterraneum* SWRI9 و *M. ciceri* CP-31 نشان داد که فعالیت این آنزیم‌ها در گرھک‌های حاصل از *M. mediterraneum* با SWRI9 عملکرد بالاتر همزیستی در مقایسه با فعالیت‌شان در گرھک‌های حاصل از *M. ciceri* CP-31 به ترتیب ۷۰/۸ و ۵۵/۴ درصد بالاتر بود (شکل ۳-الف).

از آنجاکه آمونیوم تولید شده در طی فرآیند تثبیت نیتروژن اتمسفری بسیار سمی است بنابراین  $\text{NH}_4^+$  باید سریعاً به آمینواسیدهایی مانند گلوتامین و گلوتامات تثبیت شود (Plaxton and Podestá 2006). مسیر گلوتامین سنتاز-گلوتامات سنتاز

نشان داد که این افزایش با بالاتر بودن کارایی همزیستی در این جمعیت همزیستی مرتبط می‌باشد (شکل ۳-الف).

از آنجا که  $\alpha$ -کتوگلو تارات اسکلت کربن مورد نیاز برای تثبیت  $\text{NH}_4^+$  را فراهم می‌کند بنابراین  $\alpha$ -کتوگلو تارات یک تنظیم‌کننده مهم متابولیسم کربن و نیتروژن در گیاهان عالی است که میزان آن با تثبیت آمونیوم، سنتز آمینواسیدها و متابولیسم کربن مرتبط می‌باشد. آنزیم  $\text{NADP}^+$ -ICDH با تأمین کافی  $\alpha$ -کتوگلو تارات برای تثبیت آمونیوم، سرعت تثبیت آمونیوم را در حد مناسب حفظ می‌کند بنابراین افزایش در تولید آمونیوم به واسطه سرعت بالای تثبیت نیتروژن باعث تقاضای بیش‌تر برای  $\alpha$ -کتوگلو تارات و در نتیجه فعالیت بالاتر  $\text{NADP}^+$ -ICDH می‌شود. به علاوه، این آنزیم بخشی از ترکیبات احیاء‌کننده مورد نیاز برای فعالیت آنزیم نیتروژناز را فراهم می‌کند (Setián et al. 2014). در این مطالعه، تفاوت در فعالیت آنزیم  $\text{NADP}^+$ -ICDH گرهک بین دو جمعیت همزیست مشاهده شد به نحوی که در گرهک‌های حاصل از *M. mediterraneum* SWRI9 میزان فعالیت این آنزیم در مقایسه با *M. ciceri* CP-31 بیش‌تر بود. فعالیت بالاتر این آنزیم در گرهک‌های *M. mediterraneum* SWRI9 احتمالاً به واسطه تقاضای بیش‌تر برای  $\alpha$ -کتوگلو تارات به منظور تثبیت آمونیوم است. این نتایج با عملکرد بالاتر همزیستی و نیز سرعت تثبیت نیتروژن در همزیستی بین نخود و *M. mediterraneum* SWRI9 مطابقت دارد همان‌طور که در این جمعیت همزیستی پارامترهای رشد و سطح بیان ژن *nifK* در مقایسه با جمعیت دوم بالاتر بود (شکل ۳-الف). به‌طور کلی نتایج این مطالعه حاکی از آن است که کارایی همزیستی بر اساس شاخص‌های رشد، در همزیستی نخود با *M. mediterraneum* SWRI9 در مقایسه با *M. ciceri* CP-31 بالاتر بود که این اختلاف در عملکرد همزیستی با اختلاف در سطح بیان ژن *nifK* و نیز با تفاوت در متابولیسم کربن و نیتروژن گرهک مرتبط می‌باشد.

(Sulieman and Schulze 2010). در مطالعه‌ای با استفاده از روش‌های موتاسیون، باکتریوئیدهای ناکارآمد در تثبیت نیتروژن اتمسفری ایجاد کردند و نشان دادند که در این باکتریوئیدها سطح اکثر آمینواسیدهای گرهک به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کرد و آن را به کاهش در میزان آمونیوم تولید شده طی فرآیند تثبیت نیتروژن و هم‌چنین کاهش در فعالیت آنزیم‌های مسئول متابولیسم نیتروژن (GOGAT، GS و AAT) نسبت دادند (Barsch et al. 2006). نتایج این مطالعه نشان داد که فعالیت آنزیم‌های AAT، GOGAT و GS در دو جمعیت همزیست تفاوت معنی‌داری دارد به طوری که فعالیت این آنزیم‌ها در گرهک‌های حاصل از همزیستی نخود با *M. mediterraneum* SWRI9 به ترتیب ۱/۳۷، ۱/۸ و ۱/۴ برابر فعالیت‌شان در گرهک‌های حاصل از همزیستی نخود با *M. ciceri* CP-31 بودند (شکل ۳-الف، ب و د). بر اساس این نتایج می‌توان بیان کرد که فعالیت بالای این آنزیم‌ها در گرهک‌های *M. mediterraneum* SWRI9 به عملکرد بالاتر همزیستی و احتمالاً سرعت بالاتر تثبیت نیتروژن در این جمعیت همزیست مربوط است.

اگرچه مسیر گلو تامین سنتتاز-گلو تامات سنتاز مسیر اصلی برای تثبیت  $\text{NH}_4^+$  است ولی  $\text{NH}_4^+$  می‌تواند بسته به شرایط محیط از مسیرهای دیگر مانند فعالیت  $\text{NADH}$ -گلو تامات دهیدروژناز نیز تثبیت شود که این آنزیم آمیناسیون قابل برگشت  $\alpha$ -کتوگلو تارات به گلو تامات را کاتالیز می‌کند. آنزیم  $\text{NAD}$ -گلو تامات دهیدروژناز با دامیناسیون گلو تامات، آمونیوم و اسکلت کربن ( $\alpha$ -کتوگلو تارات) را به‌ویژه در شرایط کمبود اسکلت کربن در درون گرهک فراهم می‌کند (Setián et al. 2014). فعالیت آنزیم‌های  $\text{NAD-GDH}$  و  $\text{NADH-GDH}$  در گرهک‌های حاصل از *M. mediterraneum* SWRI9 به ترتیب ۶۲/۳ و ۵۶/۲ درصد نسبت به فعالیت این آنزیم‌ها در گرهک‌های *M. ciceri* CP-31 افزایش

#### منابع

Arrese-Igor C, González EM, Marino D, Ladrera R, Larrainzar E, Gil-Quintana E (2011) Physiological responses of legume nodules to drought. *Plant Stress* 5: 24-31.

Baier MC, Barsch A, Küster H, Hohnjec N (2007) Antisense repression of the *Medicago truncatula* nodule-enhanced sucrose synthase leads to a handicapped nitrogen fixation mirrored by specific alterations in the symbiotic

- transcriptome and metabolome. *Plant Physiology* 145: 1600-1618.
- Barsch A, Tellström V, Patschkowski T, Küster H, Niehaus K (2006) Metabolite profiles of nodulated alfalfa plants indicate that distinct stages of nodule organogenesis are accompanied by global physiological adaptations. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 998-1013.
- Ben Romdhane S, Tajini F, Trabelsi M, Aouani M, Mhamdi R (2007) Competition for nodule formation between introduced strains of *Mesorhizobium ciceri* and the native populations of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) in Tunisia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1195-1201.
- Ben Romdhane S, Aouani ME, Trabelsi M, De Lajudie P, Mhamdi R (2008) Selection of high nitrogen-fixing rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) for semi-arid Tunisia. *Journal of Agronomy and Crop Science* 194: 413-420.
- Bhattacharyya P, Jha D (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1327-1350.
- Bowers T, Reid N, Lloyd-Jones G (2008) Composition of *nifH* in a wastewater treatment system reliant on N<sub>2</sub> fixation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 811-818.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Burbano CS, Liu Y, Rösner KL, Reis VM, Caballero-Mellado J, Reinhold-Hurek B, Hurek . (2011) Predominant *nifH* transcript phylotypes related to *Rhizobium* rosetiformans in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. *Environmental Microbiology Reports* 3: 383-389.
- Chopra J, Kaur N, Gupta A (2002) A comparative developmental pattern of enzymes of carbon metabolism and pentose phosphate pathway in mungbean and lentil nodules. *Acta Physiologiae Plantarum* 24: 67-72.
- Copeland L, Vella J, Hong Z (1989) Enzymes of carbohydrate metabolism in soybean nodules. *Phytochemistry* 28: 57-61.
- Deslippe J, Egger K (2006) Molecular diversity of *nifH* genes from bacteria associated with high arctic dwarf Shrubs. *Microbial Ecology* 51: 516-525.
- Fischinger SA, Schulze J (2010) The importance of nodule CO<sub>2</sub> fixation for the efficiency of symbiotic nitrogen fixation in pea at vegetative growth and during pod formation. *Journal of experimental botany* 61: 2281-2291.
- Flemetakis E, Efroze R, Ott T, Stedel C, Aivalakis G, Udvardi M, Katinakis P (2006) Spatial and temporal organization of sucrose metabolism in *Lotus japonicus* nitrogen-fixing nodules suggests a role for the elusive alkaline/neutral invertase. *Plant Molecular Biology* 62: 53-69.
- Gálvez L, González EM, Arrese-Igor C (2005) Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. *Journal of Experimental Botany* 56: 2551-2561.
- Gaur PM, Jukanti AK, Varshney RK (2012) Impact of genomic technologies on chickpea breeding strategies. *Agronomy* 2: 199-221.
- González EM, Gordon AJ, James CL, Arrese-Igor C (1995) The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *Journal of Experimental Botany* 46: 1515-1523.
- Gordon AJ, Kessler W (1990) Defoliation-induced stress in nodules of white clover: II. immunological and enzymic measurements of key proteins. *Journal of Experimental Botany* 41: 1255-1262.
- Groat RG, Vance CP (1981) Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) : development patterns and response to applied nitrogen. *Plant Physiology* 67: 1198-1203.
- Halbleib CM, Ludden PW (2000) Regulation of biological nitrogen fixation. *The Journal of Nutrition* 130: 1081-1084.
- Horst I, Welham T, Kelly S, Kaneko T, Sato S, Tabata S, Parniske M, Wang TL (2007) *TILLING* mutants of *Lotus japonicus* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase. *Plant Physiology* 144: 806-820.
- Laguette G, Depret G, Bourion V, Duc G (2007) *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae genotypes interact with pea plants in developmental responses of nodules, roots and shoots. *New Phytologist* 176: 680-690.
- Laranjo M, Branco C, Soares R, Alho L, Carvalho M, Oliveira S (2002) Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint. *Journal of Applied Microbiology* 92: 1043-1050.
- Laranjo M, Alexandre A, Oliveira S (2014) Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological Research* 169: 2-17.
- Larrainzar E, Gil-Quintana E, Seminario A, Arrese-Igor C, González EM (2014) Nodule carbohydrate catabolism is enhanced in the *Medicago truncatula* A17-*Sinorhizobium medicae* WSM419 symbiosis. *Frontiers in Microbiology* 5: 447.
- Le Roux M, Phiri E, Khan W, Sakiroglu M, Valentine A, Khan S (2014) Expression of novel cytosolic malate dehydrogenases (cMDH) in *Lupinus angustifolius* nodules during phosphorus starvation. *Journal of Plant Physiology* 171: 1609-1618.
- Le Roux MR, Khan S, Valentine AJ (2008) Organic acid accumulation may inhibit N<sub>2</sub> fixation in phosphorus-stressed lupin nodules. *New Phytologist* 177: 956-964.
- Le Roux MR, Ward CL, Botha FC, Valentine AJ (2006) Routes of pyruvate synthesis in phosphorus-deficient lupin roots and nodules. *New Phytologist* 169:399-408
- Marino D, Frendo P, Ladrera R, Zabalza A, Puppo A, Arrese-Igor C, González EM (2007) Nitrogen fixation control under drought stress. Localized or systemic? *Plant Physiology* 143: 1968-1974.
- Mhadhbi H, Jebara M, Zitoun A, Limam F, Aouani M (2008) Symbiotic effectiveness and response to mannitol-mediated osmotic stress of various chickpea-rhizobia

- associations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 1027-1035.
- Mwanamwenge J, Loss SP, Siddique KHM, Cocks PS (1998) Growth, seed yield and water use of faba bean (*Vicia faba* L.) in a short-season Mediterranean-type environment. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38: 171-180.
- Nasr Esfahani M, Sulieman S, Schulze J, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP (2014a) Mechanisms of physiological adjustment of N<sub>2</sub> fixation in *Cicer arietinum* L. (chickpea) during early stages of water deficit: single or multi-factor controls. *Plant Journal* 79: 964-980.
- Nasr Esfahani M, Sulieman S, Schulze J, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP (2014b) Approaches for enhancement of N<sub>2</sub> fixation efficiency of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under limiting nitrogen conditions. *Plant Biotechnology Journal* 12: 387-397.
- Nomura M, Mai HT, Fujii M, Hata S, Izui K, Tajima S (2006) Phosphoenolpyruvate carboxylase plays a crucial role in limiting nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant and Cell Physiology* 47: 613-621.
- Oono R, Denison RF (2010) Comparing symbiotic efficiency between swollen versus nonswollen rhizobial bacteroids. *Plant Physiology* 154: 1541-1548.
- Plaxton WC, Podestá FE (2006) The functional organization and control of plant respiration. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 159-198.
- Rangin C, Brunel B, Cleyet-Marel JC, Perrineau MM, Béna G (2008) Effects of *Medicago truncatula* genetic diversity, rhizobial competition, and strain effectiveness on the diversity of a natural *Sinorhizobium* species community. *Applied and Environmental Microbiology* 74:5653-5661
- Sabaghpour SH, Mahmodi AB, Saeed A, Kamel M, Malhotra RS (2006) Study on chickpea rought tolerance lines under dryland condition of Iran. *Indian Journal of Crop Science* 1: 70-73
- Schulze J, (2004) How are nitrogen fixation rates regulated in legumes? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167: 125-137.
- Setién I, Vega-Mas I, Celestino N, Calleja-Cervantes ME, González-Murua C, Estavillo JM, González-Moro MB (2014) Root phosphoenolpyruvate carboxylase and NAD-malic enzymes activity increase the ammonium-assimilating capacity in tomato. *Journal of Plant Physiology* 171:49-63
- Severin I, Acinas SG, Stal LJ (2010) Diversity of nitrogen-fixing bacteria in cyanobacterial mats. *FEMS Microbiology Ecology* 73: 514-525.
- Sulieman S, Schulze J (2010) Phloem-derived  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) is involved in upregulating nodule N<sub>2</sub> fixation efficiency in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Cell and Environment* 33: 2162-2172.
- Sulieman S, Ha CV, Schulze J, Tran LSP (2013) Growth and nodulation of symbiotic *Medicago truncatula* at different levels of phosphorus availability. *Journal of Experimental Botany* 64: 2701-2712.
- Terpolilli JJ, O'Hara GW, Tiwari RP, Dilworth MJ, Howieson JG (2008) The model legume *Medicago truncatula* A17 is poorly matched for N<sub>2</sub> fixation with the sequenced microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* 1021. *New Phytologist* 179: 62-66.
- Vance CP (2008) Carbon and nitrogen metabolism in legume nodules. In: Dilworth M, James E, Sprent J, Newton W (Eds) *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*, Springer Netherlands, pp. 293-320.
- Welham T, Pike J, Horst I, Flietakis E, Katinakis P, Kaneko T, Sato S, Tabata S, Perry J, Parniske M, Wang TL (2009) A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany* 60: 3353-3365.
- Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF (2003) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology* 5: 539-554.
- Zhao D, Reddy KR, Kakani VG, Reddy VR (2005) Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum. *European Journal of Agronomy* 22: 391-403.

## The comparison of structural genes expression of nitrogenase and enzymes activity related to its performance in chickpea nodules inoculated with two *Mesorhizobium* species

Nasr Esfahani M <sup>\*1</sup>

1. Assistant Professor, Biology Department, Science Faculty, Lorestan University

\* Corresponding Author, Email: Esfahani.m@lu.ac.ir

### ABSTRACT

The symbiotic relationships between chickpea and Mesorhizobia are important for nitrogen symbiotic fixation and also yield potential. The precise identification of physiological and molecular mechanisms involved in contrasting responses in symbiotic effectiveness of symbiotic associations will be used to enhance productivity through genetic engineering and breeding methods. In this study, symbiotic efficiency of chickpea with two *Mesorhizobium* species (*Mesorhizobium ciceri* CP-31 and *M. mediterraneum* SWRI9) were compared based on their growth traits. According to the results, symbiotic efficiency in chickpea- *M. mediterraneum* SWRI9 symbiosis was higher than chickpea- *M. ciceri* CP-31 symbiosis because higher content of shoot, root and nodule dry weight and also nodule number in this symbiotic association. This result was confirmed by higher expression level of *nifK* in chickpea- *M. mediterraneum* SWRI9 symbiosis. In addition, a noticeable difference in activity of enzymes related to carbon and nitrogen metabolism was observed in nodules of both symbiotic associations. The activity of sucrose synthase, UDP-glucose pyrophosphorylase, malate dehydrogenase, phosphoenol pyruvate carboxylase and NAD-malic enzyme and also key enzymes of oxidative pentose phosphate pathway (glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase) was higher in chickpea- *M. mediterraneum* SWRI9 symbiosis. A higher activity for enzymes responsible for ammonium assimilation and amino acid biosynthesis (glutamate synthetase, glutamine synthetase, amino acid transpherase and NAD/NADH glutamate dehydrogenase) was observed in nodules of chickpea- *M. mediterraneum* SWRI9 symbiosis. Collectively, higher symbiotic efficiency of chickpea- *M. mediterraneum* SWRI9 symbiosis may be associated with higher expression of *nifK* and also the activity of the key enzymes related to the nodule carbon and nitrogen metabolism.

### Key Words

*nifHDK* gene, Carbon and nitrogen metabolism, *Mesorhizobium*, chickpea, nitrogenase, symbiosis