تحقیقات آب و خاک ایران، دوره ۴۹، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۷ (ص ۹۱۴-۹۰۷) DOI: 10.22059/ijswr.2018.244728.667781

تأثیر لوتئولین، شوری و ترشحات بذر بر بیان ژن گره‌زایی *nodA* در باکتری *Sinorhizobium meliloti* با استفاده از ارزیابی فعالیت آنزیم β-galactosidase

رقیه مردانی*[1]، کاظم پوستینی[2]، علیرضا عباسی[3]، احمدعلی پوربابایی[4]

۱. دانشجوی دکتری گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران ، کرج، ایران

۳. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۴. دانشیار گروه خاکشناسی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۱/ ۸/ ۱۳۹۶- تاریخ بازنگری: ۱/ ۱۰/ ۱۳۹۶- تاریخ تصویب: ۱۷/ ۱۰/ ۱۳۹۶)

چکیده

فلاونوئیدها نقش مهمی را به عنوان سیگنال‌های مولکولی در تشکیل گره‌ها توسط ریزوبیوم‌های همزیست بازی می‌کنند. لوتئولین یکی از مهمترین فلاونوئیدها است که توسط بذرهای در حال جوانه‌زنی یونجه ترشح می‌شود. همچنین به نظر می‌رسد سطح شوری بالا بدون حضور فلاونوئید موجب افزایش بیان ژن‌های گره‌زایی می‌شود. بنابراین، در این آزمایش تأثیر لوتئولین، ترشحات بذر و شوری بر بیان ژن گره‌زایی دو سویه حساس و مقاوم به شوری *S. meliloti* با استفاده از پلاسمید حامل پروموتور *nodA* و ژن *lacZ* از باکتری *Escherichia coli* و از طریق فعالیت آنزیم β-galactosidase مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پیش تیمار باکتریها با لوتئولین و ترشحات بذر بیان ژن *nodA* را افزایش داد که تأثیر ترشحات بذر بر بیان ژن بیشتر از لوتئولین بود. همچنین نتایج نشان داد که سطح شوری بالا ۳۰۰ mM و ۴۰۰ بدون حضور فلاونوئید منجر به بیان ژن گره‌زایی شد و در شرایطی که شوری بالا و القاکننده‌ها به طور همزمان وجود داشت، بیان ژن *nodA* بیشتر بود. به نظر می‌رسد ریزوبیوم‌ها از یک مکانیسم جایگزین برای بهبود گره‌زایی در شرایط تنش استفاده می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: القاکننده خارجی، فلاونوئید، ژن *lacZ*، پلاسمید، پروموتور *nodA*

مقدمه

همزیستی بین لگوم‌ها و ریزوبیوم‌ها برای تشکیل گره‌های تثبیت‌کننده نیتروژن ضروری است (Guasch-Vidal *et al.*, 2013). وجود این همزیستی نیاز به هماهنگی بیان ژن‌های گیاهی و باکتری دارد که این هماهنگی از طریق تبادل سیگنال‌های مولکولی انجام می‌شود (Spaink, 2000; Jones *et al.*, 2007). بررسی توالی نوکلئوتیدی نشان داده است که ژن‌های باکتریایی مسئول گره‌زایی و تثبیت نیتروژن در ریزوبیوم‌ها و سینوریزوبیوم‌ها روی مگاپلاسمید (pSym) قرار دارد (MacLean *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2007). ژن‌های گره‌زایی به سه دسته تقسیم می‌شوند: (i) ژن‌های معمول گره‌زایی *nodABC* که ژن‌های اساسی گره‌زایی هستند که این ژن‌ها در بین گونه‌های مختلف ریزوبیومی به شدت حفاظت شده هستند (Jacobs *et al.*, 1985; Debelle *et al.*, 1986). (ii) ژن‌های اختصاصی میزبان (*nodFE*، *nodH*، *nodG*، *nodPQ* و ...) که طیف میزبان و میزان[1] و تناوب[2] تشکیل گره‌ها را تعیین می‌کنند (Horvath *et al.*, 1986; Debelle *et al.*, 1986; Schwedock and Long, 1989) و (iii) یک خانواده از ژن‌های تنظیم کننده *nodD* (Spaink, 2000).

اولین سیگنال‌هایی که بین گیاه میزبان و سینوریزوبیوم همزیست مبادله می‌شود ترکیبات فلاونوئیدی هستند که توسط گیاهان تولید می‌شوند که علاوه بر وظایف دیگر، برای بیان ژن-های گره‌زایی ضروری می‌باشند (Mulligan and Long, 1985). فلاونوئیدها منجر به بیان ژن گره‌زایی *nodD* می‌شود (Chen *et al.*, 2005). پروتئین NodD که توسط ترکیبات ترشحات ریشه فعال می‌شود به اپرون‌های ژن‌های *nodABC* متصل شده و منجر به بیان آنها می‌شود (Englesberg and Wilcox, 1974). بیان ژن‌های nod منجر به بیوسنتز Nod فاکتورها (LCOs[3])

* نویسنده مسئول: rm.mardani@ut.ac.ir

1. rate
2. frequency
3. lipochitooligosaccharide

می‌شود که توسط باکتریها ترشح می‌شود و فرایند ادامه می‌یابد تا گره‌ها تشکیل شود(Jones *et al*., 2007).

به نظر می‌رسد تعامل بین *nodD* و فلاونوئیدها خاص[1] باشد. برای مثال، لوتئولین (30,40,5,7-tetrahydoxyflavone) ویژه القای ژن‌های nod در *Sinorhizobium meliloti* (Peck *et al*., 2006)، ناریجنین (5,7,40-trihy-droxyflavanone) القاکننده ژن‌های nod در *Sinorhizobium leguminosarum* bv. viciae (Zaat *et al*., 1988) و 7,40-dihydroxyflavone فعال‌کننده ژن‌های nod در *S. leguminosarum* bv. trifolii و *Bradyrhizobium* sp. می‌باشند (Zaat *et al*., 1988, 1989).

شواهدی وجود دارد که استفاده از القاکننده‌های خارجی بیان ژن‌های nod در سینوریزبیوم‌ها و درنتیجه گره‌زایی را در برخی از گونه‌های لگوم‌ها، افزایش می‌دهد. برای مثال، استفاده از لوتئولین منجر به افزایش گره‌زایی در یونجه شد (Kapulnik *et al*., 1987). پیش‌تیمار *Bradyrhizobium japonicum* با جنستین گره‌زایی و عملکرد دانه را در سویا (*Glycine max*) (Zhang and Smith, 1996) و تلقیح *S. leguminosarum* با هسپرتین و نارینجنین گره‌زایی و تجمع ماده خشک در نخود و عدس افزایش دادند (Begum *et al*. 2001). افزایش گره‌زایی لوبیا توسط *Sinorhizobium etli* یا *Sinorhizobium tropici* با استفاده از کورستین[2] مشاهده شد (Hungria and Phillips, 1993). همچنین، Abd-Alla (2011) نشان داد که استفاده از ایزوفلاونوئیدها در محلول غذایی به طور معنی‌داری گره زایی در لوبیا را افزایش می‌دهد.

همچنین، تحقیقات نشان داده است که تولید Nod فاکتورها به شدت تحت تأثیر محیط رشد باکتری قرار می‌گیرد. این حقیقت که عوامل محیطی بر تولید Nod فاکتورها توسط ریزوبیوم‌ها تأثیر می‌گذارد برای اولین بار توسط Laeremans and Vanderleyden (1998) گزارش شد. در شرایط تنش مانند اسیدیته یا شوری بالا وقتی *S. tropici* CIAT899 تحت تأثیر فلاونوئید اپی‌جنین قرار گرفت Nod فاکتورهای متفاوت بیشتر با غلظت‌های بالاتری نسبت به شرایط عادی تولید شد (Moron *et al*., 2005; Estevez *et al*., 2009). در آزمایش دیگری شوری بالا بدون استفاده از فلاونوئیدها، منجر به بیان ژن nod شد. Nod فاکتورهای تولید شده تحت شرایط تنش NaCl در غیاب فلاونوئید از لحاظ بیولوژیکی فعال بودند به طوری که در شرایط نرمال بدون تنش روی ریشه لوبیا شبه گره ایجاد کردند (Guasch-Vidal *et al*., 2013). در مقایسه با مسیر کلاسیک تولید Nod فاکتور توسط فلاونوئیدها، این مکانیسم جایگزین تولید Nod فاکتورها ممکن است در شرایط تنش مهم باشد (Guasch-Vidal et. al., 2013).

بنابراین هدف از این آزمایش بررسی تأثیر شوری و القاکننده‌های خارجی لوتئولین و ترشحات بذر بر بیان ژن گره‌زایی سینوریزوبیوم (*S. meliloti*) بود. برای این منظور از پلاسمید حاوی P_{nodA} –*lacZ* استفاده شد؛ که در آن پروموتور *nodA* در بالادست ژن بدون پروموتور *lacZ* قرار دارد. ژن lacZ از باکتری اشرشیاکولی تهیه می‌شود که آنزیم β-galactosidase را کد می‌کند، این آنزیم لاکتوز را به گلوکز و گالاکتوز تجزیه می‌کند. برای انجام آزمایش پلاسمید باید وارد باکتریهای ریزوبیوم شود که برای آن از روش‌های *Escherichia coli* (Ditta *et al*., 1980) الکتروپوریشن (Gard *et al*., 1999; Vincze and Bowra, 2006) و freeze-thaw (Hayashi *et al*., 2000) استفاده می‌شود که در این آزمایش از روش الکتروپوریشن استفاده شد. الکتروپوریشن یک روش سریع، ساده با کارایی بالا است که در این روش از میدان الکتریکی با شدت بالا در یک مدت کوتاه استفاده می‌شود که منجر به نفوذپذیری قابل برگشت در غشای سلول می‌شود تا ورود ماکرومولکولهایی مانند پلاسمید را تسهیل کند (Garg *et al*., 1999).

مواد و روش‌ها

بررسی بیان ژن *nodA* سینوریزوبیوم تحت تاثیر لوتئولین، ترشحات بذر و شوری با استفاده از روش β-galactosidase (Miller, 1972) انجام شد. در این روش از پلاسمید pMPA221 (تهیه شده از دانشگاه Maria Curie-Skłodowska لهستان دکتر Anna Skorupska) که حاوی *PnodA–lacZ* (پروموتور ژن گره‌زایی A و ژن بدون پروموتور *lacZ* از باکتری اشرشیاکولی) است، استفاده شد. *lacZ* آنزیم β-galactosidase را کد می‌کند، این آنزیم لاکتوز را به گلوکز و گالاکتوز تجزیه می‌کند.

برای انجام آزمایش ابتدا پلاسمید باید وارد باکتریهای سینوریزوبیوم می‌شد که این کار با استفاده از الکتروپوریشن انجام شد. در این روش به ۹۰µl (تقریبا ۵×۱۰^{۸}) باکتری مستعد سینوریزوبیوم (Garg *et al*., 1999)، ۵µl (تقریباً ۵۰ng) از پلاسمید اضافه شد و ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. باکتری‌ها با استفاده از دستگاه الکتروپوریشن در ۱۸۰۰V، ۲۰۰Ω و ۵۰µF الکتروپوریت شدند (پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست فناوری). سپس ۲۴ ساعت در محیط YEM در شیکر در دمای ۲۸ درجه‌سانتیگراد قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت باکتریها به

1. specific
2. quercetin

محیط جامد YMA که حاوی تتراسایکلین (پلاسمید مقاوم به تتراسایکلین می‌باشد) بود منتقل شد. بعد از دو تا سه روز کلونی‌ها به محیط تازه منتقل شدند. باکتری‌های حاوی پلاسمید در این روش مورد استفاده قرار گرفت.

سینوریزوبیوم دارای پلاسمید در YEM حاوی تتراسایکلین در ۲۸ درجه سانتیگراد در شیکر به مدت ۳ تا ۵ روز رشد داده شدند تا OD_{620} آنها به ۰/۴ رسید سپس با استفاده از محیط رشد تازه OD_{620} آنها به ۰/۱ رسانده شد. باکتریها در تیوبها توزیع شدند و مقداری لوتئولین (Sigma Aldrich, L9283) به آنها اضافه شد که غلظت نهایی این القاکننده در فالکونها ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰μM بود. محلول لوتئولین با اتانول تهیه شد. شاهد فاقد القاکننده بود و از اتانول به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در آزمایش‌های شوری مقداری NaCl به تیوبها اضافه شد که شوری‌های ۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ میلی‌مولار به دست آمد و در تیمارهای مربوط به ترشحات بذر مقداری از محلول ترشحات بذر به تیوبها اضافه شد که غلظت‌های نهایی ۰، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۴۰ و ۵۰ درصد به دست آمد. در تیمارهای همزمان شوری و لوتئولین یا شوری و ترشحات بذر، در تیوب‌ها هر دو تیمار شوری و لوتئولین یا شوری و ترشحات بذر اعمال شد. در این تیمارها در تیوبهایی که حاوی غلظت‌های مختلف شوری بودند، ترشحات بذر یا لوتئولین اعمال شدند. با توجه به نتایج اولیه از ترشحات بذر ۵۰٪ و لوتئولین ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار، به دلیل اینکه بیشترین تأثیر را داشتند، به ترتیب در باکتری‌های مقاوم و حساس به شوری استفاده شد. سپس، تیوبها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر قرار داده شد. سپس آزمایش فعالیت β–galactosidase انجام شد. تا انجام آزمایش باکتریها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

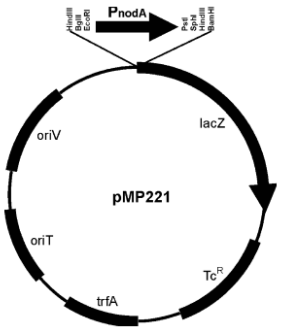
این روش، بیان ژن‌های nod (ژن‌های گره‌زایی) در اثر القاکننده‌ها را به شکل غیرمستقیم توسط مقدار فعالیت آنزیم β–galactosidase اندازه می‌گیرد. به طور خلاصه، ۰/۵ml از باکتری‌ها با بافر Z به ۱ml رسانده شد (بافر Z: $Na_2HPO_4.7H_2O$ ۱۶/۱ گرم، $NaH_2PO_4.H_2O$ ۵/۵ گرم، KCl ۰/۷۵ گرم، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۲۴۵ گرم، β-mercaptoethanol ۲/۷ گرم در ۵۰۰ml آب با PH ۷/۰)، ۴۰µl تولوئن اضافه شد و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس ۰/۲ml ONPG (O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) در غلظت $4mgml^{-1}$ اضافه شد. ONPG شبه لاکتوز است که توسط این آنزیم تجزیه می‌شود و رنگ زرد تولید می‌کند. باکتری‌ها دوباره در بن‌ماری گذاشته شد تا رنگ آنها تغییر کند (رنگ زرد). طبق یک آزمایش مقدماتی که در زمانهای مختلف از ۱۵ دقیقه تا ۲۴ ساعت انجام شد بهترین زمان برای این آزمایش یک ساعت بود که با نتیجه آزمایش Stachel *et al.* (1985) مطابقت داشت. بعد از یک ساعت، واکنش توسط Na_2CO_3 یک مولار متوقف شد. سپس در ۷۲۰۰ g به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شد و باکتری‌ها حذف شد سپس با اسپکتروفتومتر OD_{420} آنها خوانده شد. در کوویت دیگر ۰/۵ml از باکتری‌ها با بافر Z به ۱ml رسانده شد و OD_{600} آن خوانده شد. این آزمایش سه بار در سه تکرار انجام شد. فعالیت β –galactosidase با استفاده از رابطه ۱ در واحد میلر (Miller units) اندازه‌گیری شد. (رابطه ۱)

$$\beta\text{–galactosidase activity (Miller units)}= \frac{(OD_{420}\times 1000)}{(OD_{600}\times T\times V)}$$

که در آن:

T: زمان واکنش (دقیقه) در این آزمایش یک ساعت بود.

V: حجم محیط باکتری‌ها (میلی‌لیتر) می‌باشد.



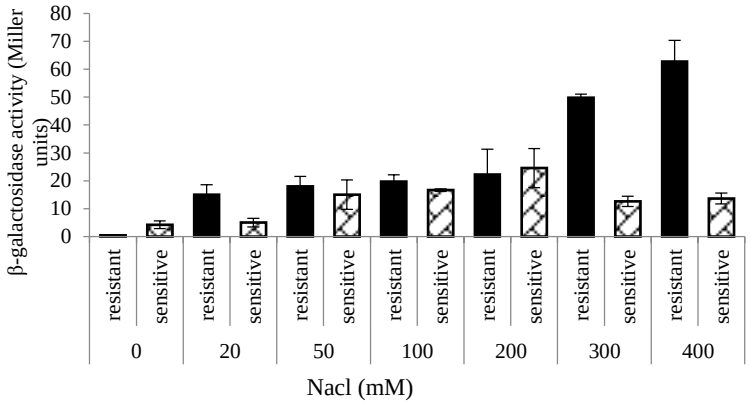
شکل ۱. نقشه ژنتیکی پلاسمید pMPA221

برای تهیه ترشحات بذر یونجه بعد از ضدعفونی کردن بذرها، در فلاسک برای هر گرم بذر ۲ تا ۳ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد، سپس در شیکر (۱۲۰ rpm) در دمای ۲۲-۲۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند سپس ترشحات جمع شدند و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Tambalo *et al.*, 2013). همچنین در این آزمایش از دو سویه سینوریزوبیوم حساس و مقاوم به شوری (تهیه شده از گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران جناب آقای دکتر پوربابایی) استفاده شد که انتخاب این دو سویه طی آزمایش مقدماتی شوری از بین چندین سویه *S. meliloti* انجام شد. در این آزمایش به محیط رشد باکتری‌ها YMA، شوری‌های مختلف از ۱۰ تا ۷۰ دسی-زیمنس بر متر شوری اعمال شد، باکتری حساس در شوری ۳۰dS/m قادر به رشد نبود و باکتری مقاوم تا شوری ۷۰dS/m نیز قادر به رشد بود.

نتایج و بحث

تأثیر شوری بر بیان ژن *nodA*

با توجه به شکل (۲) سطوح پایین شوری تأثیر منفی بر بیان ژن *nodA* داشت. ولی تأثیر شوری ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار بر بیان این ژن در سویه مقاوم به شوری مثبت بود ولی در سویه حساس این تأثیر وجود نداشت که شاید به دلیل حساسیت آن به شوری باشد. نتایج این آزمایش با نتایج آزمایش‌ها Guasch-Vidal *et al* (2013)، Estevez *et al* (2009) و Del Cerro *et al* (2017) مطابقت داشت. در این، آزمایش‌ها بر روی باکتری *S. tropici* سویه CIAT899 که توانایی همزیستی با چندین لگوم را دارد، در شوری ۳۰۰mM NaCl تحقیق شده است، رشد این باکتری در شوری بالاتر از ۳۰۰mM بازداشته شد. یکی از دلایل انتخاب این باکتری وسیع بودن طیف میزبانی آن است که در نتیجه می‌تواند Nod فاکتورهای متفاوت زیادی تولید کند. تنش‌های محیطی به طور وسیعی Nod فاکتورهای تولید شده توسط این باکتری را تعیین می‌کنند که هم بر مقدار و هم بر ساختار این مولکول‌های سیگنال تأثیر می‌گذارند. شوری ۳۰۰mM در باکتری S. tropici CIAT899 منجر به افزایش مقدار Nod فاکتورها شد و همچنین، تعداد Nod فاکتورهای بیشتری در شرایط شوری توسط باکتری سنتز شد به طوری که در شرایط شوری تعداد ۴۶ Nod فاکتور مشاهده شد ولی در شرایط عادی این تعداد ۲۹ بود (Guasch-Vidal *et al*., 2013; Estevez *et al*., 2009)



شکل ۲. تأثیر شوری بر بیان ژن *nodA*، *S. meliloti*. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد

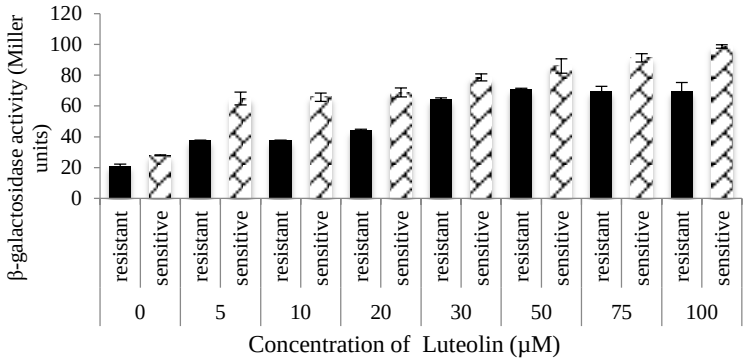
تأثیر لوتئولین بر بیان ژن گره‌زایی *S. meliloti*

فعالیت β –galactosidase نشان داد که لوتئولین بیان ژن گره-زایی را در هر دو سویه تحریک کرد. بیان ژن nod در هر سویه تحت تأثیر غلظت لوتئولین قرار گرفت. به طوری که در سویه مقاوم به شوری فعالیت القایی لوتئولین با افزایش غلظت، افزایش یافت و بیشترین فعالیت آن در غلظت ۵۰μM بود و سپس ثابت ماند؛ اما در سویه حساس به شوری با افزایش غلظت لوتئولین فعالیت القایی آن نیز افزایش یافت. آزمایش‌های متعدد نشان داده است که استفاده از القاکننده خارجی منجر به افزایش بیان ژن‌های گره‌زایی می‌شود (Maj *et al*., 2010; Mabood and Smith 2005; Pérez-Montaño *et al*., 2011). به نظر می-رسد تأثیر القاکننده‌ها بر ژن‌های nod خاص هر سویه است و تأثیر متفاوت بر سویه‌ها دارند که ممکن است در رقابتی بودن سویه‌ها تأثیر بگذارد (Maj *et al*., 2010). لوتئولین یکی از مهمترین فلاونوئیدهای یونجه در بیان ژن nod می‌باشد که از بذرهای در حال جوانه‌زنی ترشح می‌شود و در ترشحات ریشه یونجه وجود ندارد. در طول ۴ ساعت اول آبنوشی، فعالیت کل بیان ژن توسط بذرها ۱۰۰ برابر بیشتر از بیان ژن توسط ریشه‌ها از گیاهچه‌های ۷۲ ساعته بود (Hartwig *et al*., 1990). Kapulnik *et al* (1987) وقتی لوتئولین به ریزوسفر اضافه کرد، افزایش معنی‌داری را در گره‌زایی، تثبیت نیتروژن و رشد گیاهچه یونجه مشاهده کرد. در این آزمایش نسبت شاخساره/ریشه برای صفر و ۱۰μM لوتئولین به ترتیب ۲/۴۱ و ۲/۴۵ بود (Kapulnik *et al*., 1987).

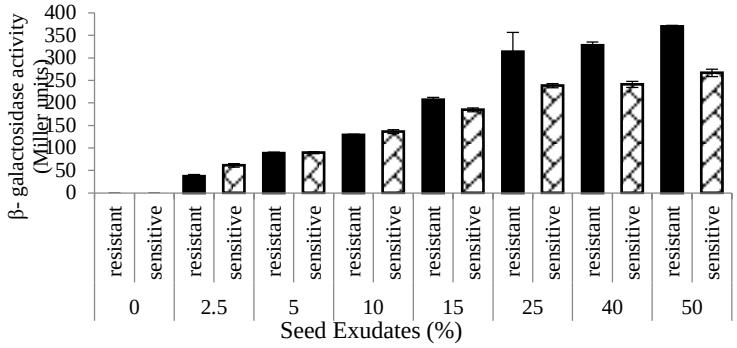
تأثیر ترشحات بذر بر بیان ژن گره زایی *nodA*

ترشحات بذر نیز تأثیر مثبت بر بیان ژن گره‌زایی داشت که با افزایش غلظت ترشحات بذر بیان ژن در هر دو سویه افزایش یافت (شکل ۴). تأثیر تحریک‌کنندگی ترشحات بذر توسط محققین گزارش شده است. Maj *et al* (2010) از ترشحات بذر گیاهان مختلف مانند ماشک، لوبیا، شبدر و نخود بر فعالیت پروموتور *nodA* استفاده کرد و Kojima et.al (2012)، ترشحات ریشه و بذر گیاه*Lotus Corniculatus* را برای اندازه‌گیری بیان ژن در شرایط مختلف محیطی به کار برد. همچنین نتایج نشان داد که تأثیر القاکنندگی ترشحات بذر بیشتر از لوتئولین می-

باشد که با نتایج Maj *et al* (2010) مطابقت داشت که بیان کرد استفاده از ترشحات گیاهی برای فعال کردن سینوریزوبیوم‌ها اقتصادی‌تر از فلاونوئیدهای سنتتیک است حتی اگر آنها مخلوطی از القاکننده‌ها و بازدارنده‌ها باشند.

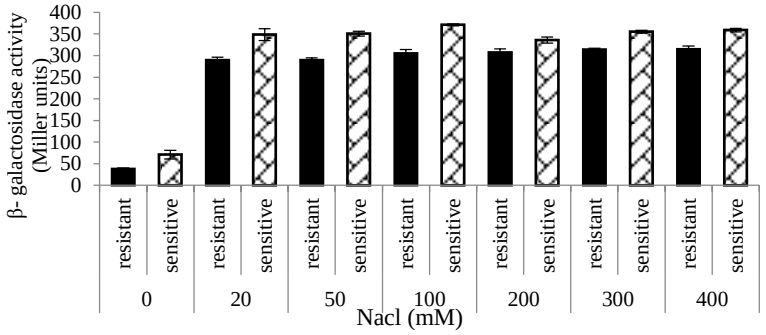


شکل ۳. تأثیر لوتئولین بر بیان ژن *nodA*، *S. meliloti*. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد.



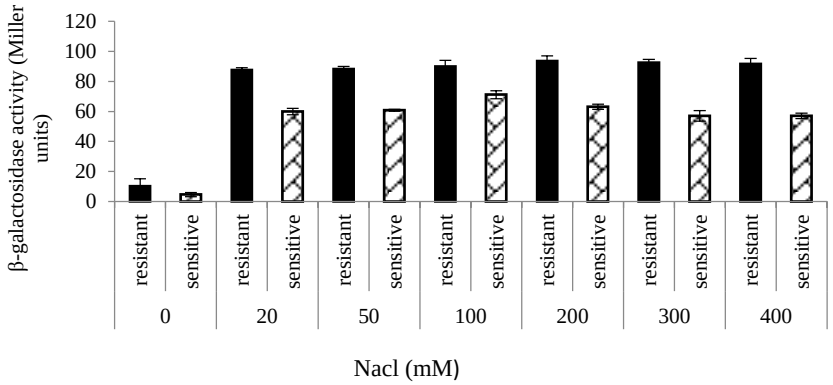
شکل ۴. تأثیر ترشحات بذر بر بیان ژن *nodA*، *S. meliloti*. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد

تأثیر ترشحات بذر و شوری بر بیان ژن گره زایی *nodA*



شکل ۵. تأثیر ترشحات بذر و شوری بر بیان ژن *nodA*، *S. meliloti*. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد.

تأثیر لوتئولین و شوری بر بیان ژن گره زایی *nodA*



شکل ۶- تأثیر لوتئولین و شوری بر بیان ژن *nodA*، *S. meliloti*. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد.

در این آزمایش با توجه به نتایج اولیه از ترشحات بذر ۵۰٪ و لوتئولین ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار به ترتیب در باکتریهای مقاوم و حساس به شوری استفاده شد. چنانچه که نتایج نشان می‌دهد ترشحات بذر و لوتئولین بیان ژن گره‌زایی را در شرایط شوری افزایش داد که با نتایج Guasch-Vidal *et al* (2013)، Estevez *et al* (2009) مطابقت داشت (شکل‌های ۵ و ۶). در شرایط شوری نیز تأثیر ترشحات بذر بیشتر از لوتئولین بود. همچنین، این دو القاکننده بیان ژن nod سینوریزوبیوم حساس به شوری را در شوری بالا که تأثیر منفی بر بیان ژن (شکل ۲) داشت، افزایش دادند (شکل‌های ۵ و ۶).

فلاونوئیدها در غلظت پایین عمل می‌کنند و استفاده از ریزوبیوم‌های فعال شده با فلاونوئیدها به عنوان کودهای زیستی توجیه اقتصادی دارد (Maj *et al*., 2010). پیش فعال کردن سویه‌ها ممکن است رقابت آنها را در محیط خاک افزایش دهد (Zhang and Smith, 1996). مشاهده شد که پیش فعال کردن *B. japonicum* منجر به افزایش تعداد و وزن گره‌های سویا (۳۰٪)، مقدار تثبیت نیتروژن (۳۵٪) و عملکرد (۱۰- ۴۰٪) شد (Zhang and Smith, 2002). به همین ترتیب، در نخود و عدس به کارگیری *R. leguminosarum* تیمار شده با هسپرتین گره-زایی و تولید بیوماس را افزایش داد (Begum *et al*., 2001). افزایش بیان ژن‌های nod بستگی به سویه دارد در آزمایشی که توسط Maj *et al* (2010) انجام شد پیش تیمار سویه‌های *R. leguminosarum* bv. trifolii با ترشحات شبدر در ۹ سویه از ۱۸ سویه رشد شاخساره و تعداد گره را افزایش داد؛ بنابراین، در بسیاری از موارد ممکن است استفاده از القاکننده‌های خارجی از لحاظ آماری تأثیر معناداری نداشته باشد. ولی با توجه به هزینه-های اقتصادی و محیطی که استفاده از کودهای نیتروژنی در کشاورزی دارد، بهبود کارایی تلقیح لگوم‌ها بسیار مهم به نظر می‌رسد (Maj *et al*., 2010).

بسیاری از ریزوبیوم‌ها قادر به تحمل شوری از ۱۰۰ mM تا ۶۰۰ هستند (Bernard *et al*., 1986). آزمایش‌ها نشان داد که کاتیون Na^+ عامل اصلی در افزایش بیان ژن nod و بیوسنتز Nod فاکتورها است. ولی غلظت بالای پتاسیم یا کلرید این تأثیر را نداشت. در آزمایشی، در شرایط شوری بالا تعداد ۴۶ Nod فاکتور دیده شد در حالی که در شرایط طبیعی تعداد ۲۹ Nod فاکتور بود که از این تعداد فقط ۱۵ Nod فاکتور در هر دو شرایط مشابه بود (Estevez et.al., 2009).

افزایش تولید Nod فاکتورهای *S. tropici* CIAT899 در شرایط تنش NaCl و در غیاب فلاونوئید توسط ژن‌هایی که روی پلاسمید pSym قرار دارند تنظیم می‌شود، همچنین مشاهده شد که *nodD1* برای بیان ژن‌های nod نیاز نمی‌باشد پروتئینی مشابه NodD در بیان ژن‌ها دخیل است که هنوز شناسایی نشده است؛ بنابراین، در شرایط شوری بالا بیان ژن nod مستقل از فلاونوئیدها است (Guasch-Vidal et.al., 2013).

جالب است که یک استثنا هم پیدا شده است که در برخی باکتریهای فتوسنتزکننده *Bradyrhizobium* ژن‌های *nodABC* وجود ندارد، ژن‌هایی که کد کننده آنزیم‌هایی هستند که در تولید Nod فاکتورها نقش دارند، بنابراین، این نشان دهنده وجود مسیر دیگری با سیگنال‌های متفاوت در القای گره ریشه می‌باشد (Giraud *et al*., 2007; Masson-Boivin *et al*., 2009).

بنابراین، به نظر می‌رسد تأثیر تنش بر بیان ژن‌های گره-زایی و تولید nod فاکتورها می‌تواند به عنوان یک مسیر احتمالی که توسط سینوریزوبیوم استفاده می‌شود تا گره‌زایی را تحت شرایط شور بهبود دهد در نظر گرفته شود (Mor´on *et al*. 2005).

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر هوشنگ علیزاده هیئت علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران به خاطر راهنمایی‌های علمی ارزنده‌شان نهایت تشکر و قدردانی ابراز می‌گردد.

REFERENCES

Begum, A. A., Leibovitch, S., Migner, P. and Zhang, F. (2001). Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of Rhizobium leguminosarum increased pea (Pisum sativum L.) and lentil (Lens culinaris L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1537–1543

Bernard, T., Pocard, J. A., Perroud, B. and Le Rudulier, D. (1986). Variations in response of salt stressed Rhizobium strains to betaines. *Archivws of Microbiology*, 143, 359–364.

Cerro, P. D., Pérez-Montaño, F., Gil-Serrano, A., López-Baena, F. J., Megías, M., Hungria, M., and Ollero, F. J. (2017). The Rhizobium tropici CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a lavonoidindependent manner. *Scientific RepoRts*, 7, 1-10.

Chen, H. C., Feng, J., Hou, B. H., Li, F. Q., Li, Q. and Hong, G. F. (2005). Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. *Nucleic Acid Research*, 33, 2540 – 8.

Debelle, F., Rosenberg, C., Vasse, J., Maillet, F., Martinez, E. and Denarie, J. (1986). Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (nod) genetic loci of *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 168, 1075 – 86.

Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D. R. (1980). Broad host range cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 77, 7347–7351.

Estevez, J., Soria-Díaz, M. E., Fernández de Córdoba, F., Morón, B., Manyani, H., Gil, A., Thomas-Oathes, J., van Brussel, A. A. N., Dardanelli, M. S., Sousa, C. and Megías, M. (2009). Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na+stress. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiology Letters*, 293, 220-231.

Gard, B., Dogra, R. C. and Sharma, P. K. (1999). High-efficiency transformation of *Rhizobium leguminosarum* by electroporation. *ApplIied and Environment Microbiology*, 65, 2802–2804.

Garg, B., Dogra, R. C. and Shama, P. K. (1999). High-efficiency transformation of *Rhizobium leguminosarum* by electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2802 – 4.

Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J. C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W. L., Chang, W.S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Verméglio, A., Médigue, C. and Sadowsky, M. (2007). Legumes symbioses: Absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*, 316, 1307-1312.

Guasch-Vidal, B., Estévez, J., Dardanelli, M. S., Soria-Díaz, M. E., Fernández de Córdoba, F., Balog, .I. A., Manyani, H., Gil-Serrano, A., Thoma-Oates, J., Hensbergen, P. J., Deelder, A. M., Megías, M. and van Brussel, A. A. N. 2013. High NaCl concentrations induce the *nod* genes of Rhizobium tropici CIAT899 in the absence of flavonoid inducers. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(4), 451-460.

Hartwig, U. A., Maxwell, C. A., Joseph, C. M. and Phillips, D. A. (1990). Chrysoeriol and Luteolin Released from Alfalfa Seeds Induce nod Gene sinRhizobium meliloti. *Plant Physiology*, 92, 116-122.

Hayashi, M., Maeda, Y., Hashimoto, Y. and Murooka, Y. (2000). Efficient transformation of *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei* and *Rhizobium* species. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 89, 550–553.

Horvath, B., Kondorosi, E., John, M., Schmidt. J., Torok. I. and Gyorgypal, Z. (1986). Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfafa. *Cell*, 46, 335–43.

Jacobs, T. W., Egelhoff, T. T. and Long, S. R. (1985). Physical and genetic map of a *Rhizobium meliloti* nodulation gene region and nucleotide sequence of nodC. *Journal of Bacteriology*, 162, 469–76.

Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E. and Walker, G. C. (2007). How symbionts invade plants: the Sinorhizobium Medicago model. *Nature*, 5, 619–33.

Kojima, K., Ybkoyama, T., Ohkama-Ohtsu, H. M. N., Saengkerdsub, S., Itakura, M., Mitsui, H., Minamisawa, K. and Arima, Y. (2012). Exploration of natural nod gene inducers for Mesorhizobium loti in seed and root exudates of Lotus Corniculatus. *Soil Microorganisrns*, 66(1), 12-21.

Laeremans, T. and Vanderleyden, J. (1998). Review: Infection and nodulation signaling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 787-808.

Mabood, F. and Smith, D. L. (2005). Pre-incubation of *Bradyrhizobium japonicum* with jasmonates accelerates nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) at optimal and suboptimal root zone temperatures. *Physiologia Plantarum*, 125, 311–323.

MacLean, A. M., Finan, T. M. and Sadowsky, M. J. (2007). Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. *Plant Physiology*, 144, 615 – 22.

Maj, D., Wielbo, J., Marek-Kozaczuk, M. and Skorupska, A. (2010). Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiological Research*, 165, 50- 60.

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, 458-466.

Miller, J. H. (1972). Experiment in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor.

Moron, B., Soria-Díaz, M. E., Ault, J., Verroios, G., Noreen, S., Rodríguez-Navarro, D. N., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J., Megías, M. and Sousa, C. (2005). Low pH changes the profile of nodulation factors produced by Rhizobium tropici CIAT899. Chemical Biology, 12, 1029–1040.

Mulligan, J. T. and Long, S. R. (1985). Induction of *Rhizobium meliloti* nodC expression by plant exudate requires nodD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 82, 6609 – 13.

Pérez-Montaño, F., Guasch-Vidal, B., González-Barroso, S., López-Baena, F. J. and Cubo, T. (2011). Nodulation-gene-inducing flavonoids increase overall production of autoinducers and expression of *N*-acyl homoserine lactone synthesis genes in rhizobia. *Research in Microbiology*, 162, 715–723.

Schwedock, J. and Long, S. R. (1989). Nucleotide sequence and protein products of two new nodulation genes of *Rhizobium meliloti*, nodP and nodQ. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2, 181–94.

Spaink, H. P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Reveiw Microbiology*, 54, 25 – 288.

Stachel, S. E., An, G., Flores, C. and Nesterl, W. E. (1985). A Tn3 lacZ transposon for the randomgeneration of β-galactosidase gene fusions: application to the analysis of gene expression in Agrobacterium. *The EMBO Journal*, 4(4),.891-898.

Tambalo, D. D., Vanderlinde, E. M., Robinson, S., Halmillawewa, A., Hynes, M. F. and Yost, C. K. (2013). Legume seed exudates and *Physcomitrella patens* extracts influences warming behavior in *Rhizobium leguminosarum. Canandian Journal of Microbiology*, 60, 15–24.

Vincze, E. and Bowra, S. (2006). Transformation of Rhizobia with Broad-Host-Range Plasmids by Using a Freeze-Thaw Method. *Applied and Environmental Microbiology*, 5, 2290–2293.

Zaat, S. A.,Wijffelman, C. A., MuldersI, H. M., vanBrusse. L. A. A. N. and Lugtenberg, B. J. J. (1988). Root exudates of various host plants of *Rhizobium leguminosarum* contain different sets of inducers of Rhizobium nodulation genes. *Plant Physiology*, 86, 1298–303.

Zaat, S. A., Schripsema, J., Wijffelman, C. A., vanBrussel, A. A. N.and Lugtenberg, B. J. J. (1989). Analysis of the major inducers of the Rhizobium nodA promoter from Viciasativa root exudate and the iractivity with defferent nodD genes. *Plant Molecular Biology*, 13, 175–88.

Zhang, F. and Smith, D. L. (1996). Inoculation of soybean (*Glycine max.* (L.) Merr.) with genistein-preincubated *Bradyrhizo-bium japonicum* or genistein directly applied into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season condition. *Plant and Soil*, 179, 233–41.

Zhang, F. and Smith, D. L. 2002. Interorganismal signaling in suboptimum nvironments: the legume–rhizobia symbiosis. *Advances in Agronomy*, 76, 125 – 61.