

## تأثیر ژن *NARK* و تیمار نیتروژن بر رشد، و پروفایل پروتئینی برگ در تیپ موتانت سوپر گره‌زا و تیپ وحشی سویا

مهرناز مشایخی<sup>۱</sup>، سعید میرزایی<sup>۱\*</sup>، محمود ملکی<sup>۱</sup> و حسین مظفری<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> ایران، کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشگاه علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی

<sup>۲</sup> ایران، کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشگاه علوم محیطی، گروه اکولوژی

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

### چکیده

نیتروژن یکی از مهم‌ترین عناصر مورد نیاز گیاهان می‌باشد. گیاهان لگوم بدلیل دریافت این عنصر از طریق تثبیت بیولوژیک نیتروژن اتمسفر حائز اهمیت فراوان می‌باشند. در این مطالعه، تأثیر ژن *NARK* و تیمارهای نیتروژن‌دار بر رشد و پارامترهای فیزیولوژیک و همچنین تغییرات پروتئینی برگ گیاه سویا تیپ وحشی با تیپ موتانت بررسی گردید. بدین منظور، آزمایش گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به اجرا در آمد. تیمارهای آزمایش شامل دو سطح آمونیوم ( $\text{NH}_4^+$ ) و دو سطح نترات ( $\text{NO}_3^-$ ) برای سه تیپ گیاه سویا، استریل (عدم تلقیح با باکتری ریزوبیوم)، وحشی و موتانت سوپر گره‌زا بودند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمار آمونیوم به همراه نترات نسبت به سایر تیمارها بیشترین تأثیر را بر گیاهان سویا از نظر شاخص‌های رشد و صفات بیوشیمیایی گذاشته است. الکتروفورز دوبعدی نیز نشان داد که در گیاهان تیپ استریل تحت تیمار ۵ میلی‌مولار سولفات آمونیوم تنوع پروتئینی بیشتری در برگ نسبت به گیاهان تیپ وحشی تلقیح شده با باکتری ریزوبیوم (عدم دریافت نیتروژن معدنی) وجود دارد. این تنوع در پروفایل پروتئینی برگ گیاهان می‌تواند بدلیل نوع نیتروژن دریافتی گیاهان (نیتروژن معدنی/تثبیت بیولوژیک ازت) باشد. علاوه بر این، تنوع پروتئینی می‌تواند بدلیل تغییر در بیان ژن‌ها بدلیل همزیستی گیاهان تلقیح شده با باکتری ریزوبیوم باشد. سایر صفات مورد بررسی تحت تیمارها از قبیل کلروفیل *b*، کلروفیل کل، کارتنوئید، قندهای احیاکننده، بیشترین مقدار را در تیمار توأم و تیمار ۵ میلی‌مولار سولفات آمونیوم و کمترین مقدار خود را در تیمار شاهد نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: تثبیت بیولوژیک ازت، *NARK*، سویا، پروفایل پروتئینی، گره‌زایی

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۳۹۵۶۲۶۶، پست الکترونیکی: s.mirzaei@kgut.ac.ir

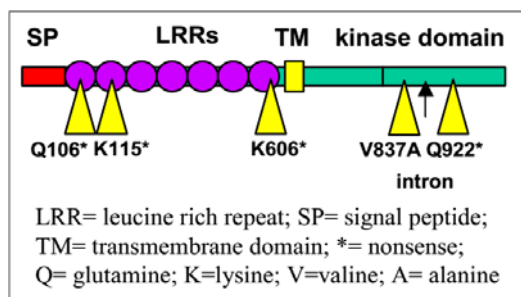
### مقدمه

گیاهان لگوم سومین خانواده بزرگ از گیاهان گلدار هستند که بسیار متنوع است و دارای ۸۰۰ جنس و ۲۰۰۰۰ گونه می‌باشد (۳۵). گیاهان این خانواده در سراسر جهان پراکنده شده‌اند و از گیاهانی با اندازه بسیار کوچک تا درختان بزرگ را شامل می‌شود (۳۵). لگوم‌ها بدلیل برقراری همزیستی با باکتری‌هایی که عموماً ریزوبیوم نامیده می‌شوند دارای اهمیت فراوان می‌باشند (۱۴). لوبیا و سویا از خانواده لگوم به ترتیب جزء اصلی محصولات گیاهی در آمریکا و آسیا می‌باشند که هر دو از ۳۰۰۰ سال پیش اهلی شده‌اند (۱۷ و ۱۸).

گیاهان لگوم سومین خانواده بزرگ از گیاهان گلدار هستند که بسیار متنوع است و دارای ۸۰۰ جنس و ۲۰۰۰۰ گونه می‌باشد (۳۵). گیاهان این خانواده در سراسر جهان پراکنده شده‌اند و از گیاهانی با اندازه بسیار کوچک تا درختان بزرگ را شامل می‌شود (۳۵). لگوم‌ها بدلیل برقراری همزیستی با باکتری‌هایی که عموماً ریزوبیوم نامیده می‌شوند دارای اهمیت فراوان می‌باشند (۱۴). لوبیا و سویا از خانواده لگوم به ترتیب جزء اصلی محصولات گیاهی در آمریکا و آسیا می‌باشند که هر دو از ۳۰۰۰ سال پیش اهلی شده‌اند (۱۷ و ۱۸).

از طریق سیستم بازخورد خودتنظیمی گره‌زایی (AON= Autoregulation of nodulation) صورت می‌گیرد. خودتنظیمی گره‌زایی شامل پیام‌رسانی دوردست بین ریشه و ساقه است، به طوریکه رخدادهای آغازین گره‌زایی حالت بازدارنده برای مراحل بعدی تشکیل گره دارد. بیشتر جهش‌یافته‌های AON که دارای فنوتیپ فراگره‌زایی یا بیش‌گره‌زایی هستند، از نظر گره‌زایی متحمل به نترات نیز هستند.

همساز کردن ژن مسئول فنوتیپ فوق‌گره‌زایی در سویا به نام *GmNARK* یا گیرنده کینازی خودکنترلی؛ در *Lotus* معروف به فراگره‌زایی و ریشه‌های غیر نرمال یا *HARI*؛ در یونجه به نام *SUNN* یا تعداد گره فوق‌العاده، نشان داد که یک پروتئین شبه‌گیرنده کینازی غنی از لوسین، نقش کلیدی را در مسیر پیام‌رسانی AON برعهده دارد. یک جهش نقطه‌ای در این ژن‌ها عامل فنوتیپ جهش‌یافته است (شکل ۱). از دست رفتن کارکرد این سیستم از طریق موتاسیون‌ها باعث شده که تشکیل گره بیش‌ازحد توسعه پیدا بکند و همچنین مورفولوژی ریشه‌های جانبی نیز تغییر نماید (۳۲).



شکل ۱- ساختار و آل‌های ژن *NARK* در سویا. جهش‌ها منجر به از دست رفتن فعالیت ژن *NARK* و در نتیجه گره‌زایی فراوان می‌شوند

(۱۹)

اگرچه رونوشت‌های *GmNARK*، *HARI* و *SUNN* در دو بافت ریشه و ساقه به صورت فعال دیده می‌شوند، آزمایش‌های پیوند زدن نشان داده است که فنوتیپ گره‌زایی توسط ساقه (بخش هوایی) گیاه کنترل می‌شود. تاکنون ماهیت پیام‌های ریشه و ساقه ناشناخته مانده است و معلوم نیست

مسلماً نیتروژن مهم‌ترین عنصر مورد نیاز گیاهان و جزء اساسی برای تمامی اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک است. اگرچه جو زمین شامل ۷۸ درصد گاز نیتروژن است اما گیاهان قادر به استفاده از این فرم نیتروژن نیستند (۱۶ و ۲۹). گیاهان نیتروژن مورد نیاز خود را به صورت نترات و آمونیوم از خاک دریافت می‌کنند (۱۰). بدون شک تثبیت بیولوژیک نیتروژن (BNF= Biological nitrogen fixation) بهترین و مهم‌ترین راهی است که خاک به طور طبیعی از نیتروژن سرشار می‌شود. در طی این فرایند بیولوژیک که توسط باکتری‌ها و به کمک سیستم آنزیمی نیتروژناز صورت می‌گیرد سالانه به طور طبیعی مقادیر زیادی نیتروژن اتمسفری به اکوسیستم‌های طبیعی وارد می‌شود که هیچ‌یک از مشکلات اقتصادی و زیست‌محیطی ناشی از مصرف نامتعادل کودهای شیمیایی نیتروژنه را به همراه ندارد (۲). از این منظر گیاهان خانواده لگوم بدلیل توانایی تثبیت بیولوژیک ازت بواسطه همزیستی با باکتری ریزوبیوم و تشکیل گره بر روی ریشه دارای اهمیت فراوان می‌باشند (۲۸ و ۲۹). مکانیسم تشکیل گره و کنترل آن در این خانواده (از جمله سویا) به خوبی مطالعه شده است و عوامل مؤثر در این پروسه شناسایی شده‌اند. سویا از جمله لگوم‌هایی است که می‌تواند بخش عمده نیتروژن مورد نیاز خود را از طریق تثبیت بیولوژیک نیتروژن تأمین نماید. در برخی مطالعات توانایی این همزیستی در تأمین نیتروژن مورد نیاز سویا تا ۹۵ درصد گزارش شده است (۲).

ژن‌های شناسایی شده درگیر در گره‌سازی لگوم‌ها از نوع گیرنده شبه‌کینازی (Receptor-like kinase) می‌باشند (۲۸). گیرنده‌های شبه‌کینازی، پروتئین‌های غشایی هستند که در سراسر گونه‌ها و سلسله‌ی گیاهان یافت شده است و در بسیاری از فرایندهای گیاهان مانند فعل‌وانفعالات پاتوژن، پذیرش هورمون، توسعه مریستم رأسی و تقسیم سلول، و گره‌سازی درگیر هستند. سویا (گیاهان لگوم) برای رسیدن به یک پایداری بین رشد و نمو و فواید تثبیت بیولوژیک ازت تعداد گره‌هایش را تنظیم می‌کند. این کنترل

جوانه‌زنی و شاخص‌های رشدی گیاه سویا دارد (۵). محققین دیگر از تکنیک پروتئومیکس برای درک مکانیسم‌های درگیر در استرس شوری، خشکی و غرقابی در گیاه سویا بکار گرفتند (۲۰ و ۳۶). بررسی عوامل مؤثر و تعیین ویژگی‌های ژن‌های مؤثر در سازوکار خودتنظیمی گره‌زایی، می‌تواند بینش درستی از فرایند گره‌زایی را فراهم نماید.

در این مطالعه به‌منظور بررسی تأثیر ژن *NARK* بر کارایی توان تثبیت ازت مولکولی توسط باکتری ریزوبیوم همزیست با سویا و همچنین مقایسه تغییرات پروتئینی و فیزیولوژی برگ گیاه سویا تیپ وحشی با تیپ موتانت در سال ۱۳۹۴ آزمایش گلخانه‌ای در دانشگاه تحصیلات تکمیلی، صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به اجرا درآمد.

### مواد و روشها

**کشت گیاهان و اعمال تیمارها:** گیاهان کاشته شده در گلدان‌ها، ابتدا به مدت یک هفته با آب مقطر آبیاری شدند، پس از یک هفته رشد گیاهان، از محلول‌های حاوی مقادیر مختلف نیترات پتاسیم (صفر و پنج میلی‌مولار) و سولفات آمونیوم (صفر و پنج میلی‌مولار) جهت تیمار استفاده گردید. محلول‌های مذکور به‌طور روز در میان با حجم ۵۰ میلی‌لیتر به گلدان‌ها اضافه گردید. قابل‌ذکر است در تمام مدت تیماردهی برای گیاهان استریل از آب مقطر و محلول‌های اتوکلاو شده استفاده گردید. پس از گذشت ۴ هفته، از نمونه‌های گیاهی جهت بررسی پارامترهای مورد نظر استفاده گردید (شکل ۲).

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار، در محیط کنترل شده گلخانه روی سه تیپ گیاه سویا شامل، رقم وحشی *Bragg* (حالت استریل و دارای ریزوبیوم) و رقم موتانت *NTS* انجام گردید. فاکتورهای

که چگونه گیرنده شبه کینازی *LRR* پیام‌رسانی دوردست را موجب می‌شود (۱۶). جهش‌یافته‌های *GmNARK*، *HAR1* و *SUNN* در شرایط عدم تلقیح ریزوبیومی، نسبت به تیپ وحشی دارای ریشه‌های کوتاه‌تر و یا تعداد ریشه‌های جانبی بیشتر هستند. عامل‌های گره‌زایی توسط گیرنده‌های کینازی نوع *LysM* در غشای پلاسمایی دریافت می‌شوند. در سویا ژن‌های *NRF1* و *NRF5* این نقش را بر عهده دارند که جهش در این‌ها یا همسانه‌های آنها در نخودفرنگی و *M. truncatula* موجب عدم گره‌زایی می‌شود (۲۲ و ۲۳). در ادامه یک گیرنده *NBS-LRR*، به نام‌های *GmNORK*، *LjNORK*، *MsSYMCK*، *MtDM12* و *PsSYM19* به ترتیب از سویا، لوتوس، یونجه، شبدر و نخود اثر نموده و موجب تحریک کانال‌های یونی غشایی، نوکلئوپروتئین‌ها و پروتئین کینازهای کالمادولین وابسته به کلسیم می‌گردند. نشانه ناشناخته ریشه‌ای *Q*، موجب پیام‌رسانی به برگ می‌شود که در اثر بیان *GmNARK* در برگ سرانجام سیگنال بازدارندگی برگی (*SDI=Shoot dreived inhibitor*) به ریشه می‌آید که اثر بازدارندگی بر گره‌زایی دارد (۱۶). تجزیه و تحلیل‌های بانک اطلاعاتی مشخص کرد که پروتئین‌های پیش‌بینی‌شده برای *GmNARK*، *HAR1*، *Sym29* و *SUNN* بسیار مشابه گیرنده شبه کینازی *LRR* آرابیدوپسیس (*CLAVATA1* (*AtCLV1*)) است، که تکثیر سلول‌های مریستمی ریشه و ساقه را کنترل می‌کند (۲۸ و ۲۹).

باتوجه به اهمیت تثبیت بیولوژیک ازت و نقش سویا در تأمین روغن خوراکی مطالعات گوناگونی برای درک عوامل مؤثر بر گره‌زایی و رشد گیاه سویا انجام شده است. سایتو و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که رشد گره بعد از گذشت ۷ ساعت از اعمال تیمار نیترات متوقف می‌شود و همین‌الگو برای رشد ریشه اصلی نیز مشاهده گردید. در حالیکه رشد ریشه‌های جانبی با اعمال تیمار نیترات افزایش یافت (۳۴). در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که نیترات کلسیم در بین نمک‌های نیتراتی بیشترین تأثیر را بر روی شاخص

**سنجش پارامترهای مورفولوژیکی گیاهان سویا:** پس از ۴ هفته از رشد، سنجش پارامترهای مورفولوژیکی انجام شد و شاخص‌هایی از قبیل طول اندام هوایی و ریشه، وزن تر اندام هوایی و ریشه، طول میان گره، سطح برگ، تعداد گره، محتوای آب نسبی برگ، موردسنجش قرار گرفت. طول ساقه، از یقه گیاه تا جوانه انتهایی و طول ریشه از یقه گیاه تا نوک ریشه اصلی برحسب سانتی‌متر (cm) با خط کش اندازه‌گیری شد. وزن تر اندام هوایی و ریشه در هر گیاه سویا تیمار شده، پس از جدا کردن اندام هوایی و ریشه از یکدیگر، با ترازوی با دقت  $0.0001$  g سنجش و برحسب گرم بر هر گیاه ارائه گردید.

**سنجش محتوای نسبی آب برگ:** برای محاسبه درصد نسبی آب بافت برگ، وزن تر برگ گیاهان اندازه‌گیری گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ ساعت در آب دیونایز قرار گرفته و وزن حالت تورگور آنها نیز اندازه‌گیری گردید. بعد نمونه‌ها در فویل آلومینیومی قرار داده شده و به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای  $70^\circ$  درجه سانتی‌گراد خشک گردید. سپس وزن خشک نمونه‌ها با ترازو اندازه‌گیری شد و درصد نسبی آب بافت برگ با استفاده از معادله زیر برحسب درصد محاسبه گردید (۳۸). با توجه به رشد ریشه گیاهان تحت تیمار در یک محیط هیدروپونیک با محلول B & D (۱۲)، محتوای آب نسبی فقط برای برگ محاسبه گردید.

معادله: محتوای نسبی آب برگ:

$100 * ( \text{وزن خشک} - \text{وزن تورگور} / \text{وزن خشک} - \text{وزن تر} ) = \text{RWC} (\%)$

**سنجش رنگیزه های فتوستتزی برگ:** پس از اعمال ۲۱ روزه تیمارها بر گیاهان رشد یافته در گلدان سنجش میزان رنگیزه های فتوستتزی در برگ به روش لیختننالر (۱۹۸۷) انجام پذیرفت (۲۶). در یک سری کاشت و تیمار مستقل،  $0.2$  گرم از برگ سوم تازه در هر گیاه سویا با  $15$  میلی‌لیتر

آزمایش شامل دو سطح  $0$  و  $5$  میلی‌مولار آمونیوم ( $\text{NH}_4^+$ ) و دو سطح  $0$  و  $5$  میلی‌مولار نیترات ( $\text{NO}_3^-$ ) بود و از گیاهچه های  $30$  روزه برای اندازه‌گیری صفات مختلف استفاده شد.



شکل ۲- نمایی از گیاهان سویای کشت‌شده در گلخانه تحت تیمارهای آزمایش

**تلقیح گیاهان آزمایش با باکتری ریزوبیوم:** پس از کشت بذور، باکتری ریزوبیوم سویه CB1809 (تهیه شده از استرالیا) در دو مرحله زمانی به گلدان‌های حاوی گیاهان غیر استریل، به منظور القای گره‌زایی ریشه‌های سویا داده شد. جهت رشد باکتری ریزوبیوم،  $0.5$  لیتر از محیط کشت (YMB=Yeast Mannitol Broth) مطابق با جدول ۱ استفاده گردید. به منظور رشد باکتری‌ها، محیط حاوی باکتری به شیکر انکوباتور (با دمای  $28^\circ$  درجه سانتی‌گراد و  $180$  دور در ثانیه) انتقال یافت. پس از گذشت ۴ روز،  $500$  میلی‌لیتر از باکتری‌های رشد کرده تا حجم  $500$  میلی‌لیتر با آب مقطر رقیق و به هر گلدان به میزان  $80$  میلی‌لیتر محلول باکتری داده شد.

جدول ۱- مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت Yeast Mannitol (YMB) Broth

| ترکیب مورد استفاده  | غلظت (g/l) |
|---|------------|
| مانیتول (Mannitol)  | ۲          |
| عصاره مخمر (Yeast extract)  | $0.5$      |
| دی پتاسیم فسفات ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )                            | $0.5$      |
| سولفات منیزیم هپتا هیدرات ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) | $0.2$      |
| کلرید سدیم (NaCl)   | $0.1$      |

**سنجش اسیدآمینه پرولین در اندام هوایی:** برای اندازه‌گیری پرولین از روش بیتس و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد (۹). ۰/۰۲ گرم از بافت فریز شده گیاه (ساقه و برگ) در ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد سولفوسالیسیلیک اسید سائیده و عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۵ g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی را با ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید خالص مخلوط کرده و یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرارگرفت سپس بلافاصله لوله‌های محتوی مخلوط در حمام یخ سرد گردید. بعد ۴ میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط اضافه گردید و لوله‌ها به خوبی تکان داده شد. با ثابت نگه‌داشتن لوله‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه دو لایه مجزا تشکیل شد. میزان جذب لایه‌ی رنگی فوقانی که حاوی تولوئن و پرولین بود در ۵۱۸ نانومتر تعیین شد و با استفاده از منحنی استاندارد پرولین، نتایج برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر محاسبه گردید.

**سنجش مقدار آمینواسید های آزاد (FAA) در اندام هوایی:** عصاره‌گیری نمونه‌ها: میزان آمینواسیدهای آزاد به روش رنگ‌سنجی و با استفاده از معرف نین هیدرین اندازه‌گیری شد (۲۱). ۰/۲ گرم بافت تازه گیاهی در ۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات سرد ۵۰ میلی‌مولار (pH = ۶/۸) سائیده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. میزان جذب محلول رویی جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و مقدار آمینواسیدهای آزاد با استفاده از منحنی استاندارد گلیسین محاسبه شد (۲۱).

**سنجش پروتئین کل در اندام هوایی:** جهت سنجش مقدار پروتئین کل از روش بردفورد (۱۹۷۶) استفاده شد (۱۱). به این منظور به لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی، ۵ میلی‌لیتر معرف بیوره افزوده و سریعاً ورتکس گردید. پس از دو دقیقه و قبل از یک ساعت جذب محلول‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۹۵

استون ۸۰ درصد به خوبی سائیده شده تا بافت برگ به خوبی با استون مخلوط گردد. پس از صاف کردن و سانتریفوژ مخلوط حاصل، جذب محلول بدست آمده بلافاصله با دستگاه اسپکترو فتومتر ۵۰ carry در طول‌موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر بدست آمد و غلظت رنگیزه‌ها برحسب میکروگرم بر گرم وزن‌تر با استفاده از معادله‌های زیر بدست آمد.

$$A_{646/8} - 2/79 A_{663/20} = chla \text{ (کلروفیل a)}$$

$$A_{663/20} - 5/1 A_{646/8} = chlb \text{ (کلروفیل b)}$$

$$Tchl = chla + chlb \text{ (کلروفیل کل)}$$

$$carotenoid \text{ (کارتنوئید)} = (1000 A_{470} - 1/8 chla - 85/02 chlb) / 198$$

**سنجش میزان قندهای احیاکننده در اندام هوایی:** برای سنجش میزان قندهای احیاکننده از روش سوموگی (۱۹۵۲) استفاده شد (۳۷). ۰/۲ گرم از اندام هوایی گیاه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در هاون چینی سائیده شد. سپس محتوای هاون به بشر کوچکی منتقل گردید و روی اجاق‌برقی حرارت داده شد. به‌محض اینکه محلول به نقطه‌جوش رسید، حرارت قطع گردیده و محتوای بشر توسط دستگاه سانتریفوژ صاف شد و عصاره گیاهی حاوی قندها به دست آمد. مقدار ۲ میلی‌لیتر از هریک از عصاره‌های تهیه شده به لوله آزمایش منتقل شد و پس از افزودن ۲ میلی‌لیتر محلول سولفات مس به آنها، سر لوله‌ها با پنبه بسته شد و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم (بن ماری) با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار دادند. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول فسفو مولیبدیک اسید به آنها اضافه و شدت جذب محلول‌ها در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکترو فتومتر تعیین شد. درنهایت با استفاده از منحنی استاندارد غلظت قندهای احیاکننده محاسبه و مقدار قندهای احیاکننده برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر ارائه گردیدند.

نامحدودی نگهداری نمود. برای استخراج پروتئین‌های موجود در رسوب لیوفیلایز شده میزان ۵۰ میکرو لیتر به ازاء هر ۱ میلی‌گرم پودر لیوفیلایز شده (۵۰ μl/mg)، محلول Lysis ( 9M Urea, 4%w/v CHAPS, 35mM, Tris, ) اضافه (1%w/v DTT, 1%v/v Ampholyte pH 3-10) اضافه شد. پس از یک ساعت ورتکس مداوم در دمای اتاق مجدداً در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ انجام گرفت. این بار مایع روئی (سوپرناتانت) برداشته و رسوب دور ریخته شد. مایع روئی در حقیقت عصاره پروتئینی است که پس از تعیین غلظت آن می‌توان از آن به‌طور مستقیم استفاده نمود.

جدول ۲- محلول شست‌و‌شو پروتئین استخراج شده (حجم ۱۰ میلی‌لیتر)

| مقدار         | ماده           |
|---------------|----------------|
| ۷۰ میلی‌گرم   | ددت (DTT)      |
| ۱۰۰ میلی‌لیتر | استون (Aceton) |

**روش‌های آنالیز آماری:** داده‌های کمی بدست آمده از این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۵) و Excel مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. جهت این امر با استفاده از آنالیز واریانس و توزیع F مقایسه میانگین‌ها در سطح معنی‌دار ۵ درصد صورت گرفت و همچنین برای مقایسه بهتر از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

## نتایج

**پارامترهای رشد و فیزیولوژیک:** نتایج کلی تجزیه واریانس نشان داد که در هر سه تیپ گیاه سویا، رقم Bragg (استریل و دارای ریزوبیوم) و موتانت NTS، رشد اندام‌های هوایی نسبت به ریشه تحت تیمارها افزایش بیشتری داشت. وزن‌تر ریشه نسبت به وزن‌تر ساقه در مرحله یک ماه پس از کشت در هر سه تیپ گیاه سویا مقدار بیشتری نشان داد (جدول ۳).

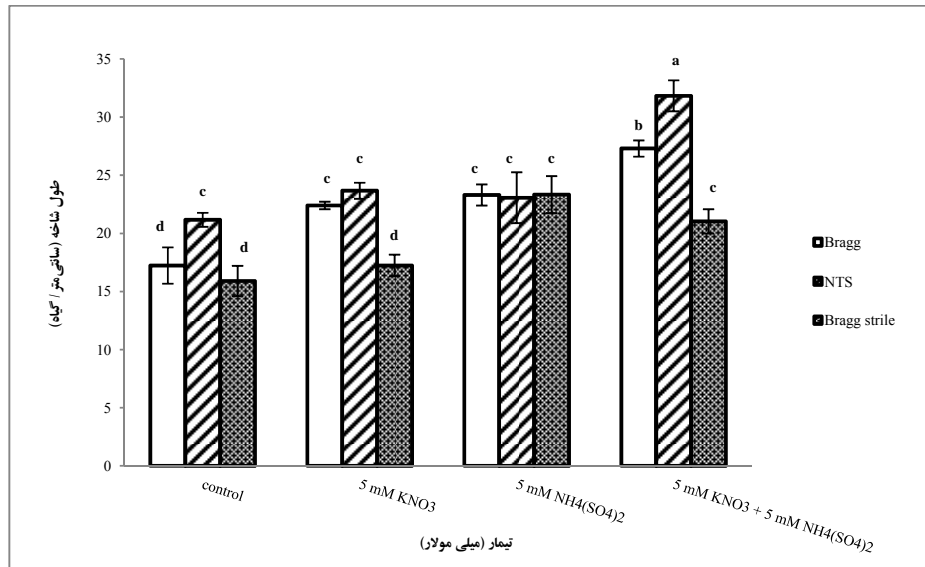
بررسی دقیق‌تر مقایسه میانگین‌های مربوط به رشد طولی اندام هوایی بیان می‌کند که کاربرد توأم نمک‌های نیترات و

نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین محاسبه و برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر محاسبه گردید.

**انجام آزمایش پروتئومیکس:** استخراج پروتئین از بافت برگ براساس روش دامروال و همکاران (۱۹۸۶) با اندکی تغییرات انجام گرفت (۱۳). ابتدا مقدار ۱ گرم از بافت گیاهی که در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد، در هاون با استفاده از ازت مایع به خوبی ساییده شد. سپس مقدار ۱۰ میلی‌لیتر محلول استون حاوی ۱۰ درصد تری کلرواستیک اسید (TCA) و ۰/۵ درصد β-مرکاپتواتانول که از قبل طبق جدول ۲ تهیه و در دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفته بود، به پودر ساییده شده اضافه شد. مخلوط در هاون مجدداً ساییده و سپس به لوله‌های سانتریفیوژ منتقل شد. مخلوط بدست آمده سپس در ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل ۲ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند تا پروتئین‌ها به‌طور کامل رسوب کنند. حضور TCA در استون سبب رسوب کامل پروتئین‌ها می‌شود. پس از اینکه پروتئین‌ها به‌طور کامل رسوب نمودند، نمونه‌ها به سانتریفیوژ منتقل شدند و در دمای ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۷۰۰۰ سانتریفیوژ انجام گرفت. در این مرحله مایع روئی به‌آرامی دور ریخته شد و به رسوب حاوی پروتئین، ۱۰ میلی‌لیتر محلول شستشوی اضافه شد (جدول ۲)، تا رسوب به‌صورت سوسپانسیون درآید. نمونه‌ها سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفته تا پروتئین‌ها به‌طور کامل رسوب نمایند. مجدداً نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. این مرحله (مرحله شستشو) دو بار دیگر به‌منظور برطرف نمودن آلودگی‌های غیر پروتئینی موجود در رسوب پروتئینی تکرار شد و در نهایت رسوب بدست آمده با استفاده از دستگاه لیوفیلایزر خشک گردید، تا بقایای استون موجود در رسوب بطور کامل حذف شود. پس از خشک نمودن رسوب می‌توان رسوب را در فریزر ۸۰- به مدت

کنترل شد. این افزایش‌ها در میزان رشد طولی نشان می‌دهد تأثیر متقابل نیترات و آمونیوم بر رشد طولی اندام هوایی به‌ویژه در موتانت NTS کاملاً معنی‌دار و چشمگیر بوده است (شکل ۳).

آمونیوم در گیاهان موتانت NTS موجب یک افزایش معنی‌دار تقریباً ۸۲ درصدی نسبت به شرایط کنترل در رقم Bragg شده است (شکل ۳). البته این تیمار توأم در رقم Bragg نیز موجب افزایش ۵۲ درصدی نسبت به شرایط



شکل ۳- مقایسه تغییرات رشد طولی اندام هوایی در گیاهان سه تیپ سویا مطالعه شده تحت تیمارهای مختلف نیتروژن‌دار در محیط کشت پرلیت در سطح معنی‌دار ۵ درصد که با استفاده از آنالیز واریانس و آزمون چند دامنه‌ای دانکن بدست آمده است. Error Bar هر نمودار تغییرات خطای استاندارد (SE) را نشان می‌دهد. حروف لاتین متفاوت نیز در بالای نمودارها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد

معنی‌دار در رقم Bragg و موتانت NTS تحت تیمار توأم حاوی مواد نیتروژن‌دار مشاهده شد (جدول ۳). بیشترین مقدار وزن‌تر هم مربوط به تیمار حاوی ۵ میلی‌مولار از هر دو ماده نیترات پتاسیم و سولفات آمونیوم بود که افزایشی در حدود ۴۶ درصد نسبت به رقم Bragg شاهد از خود نشان داد.

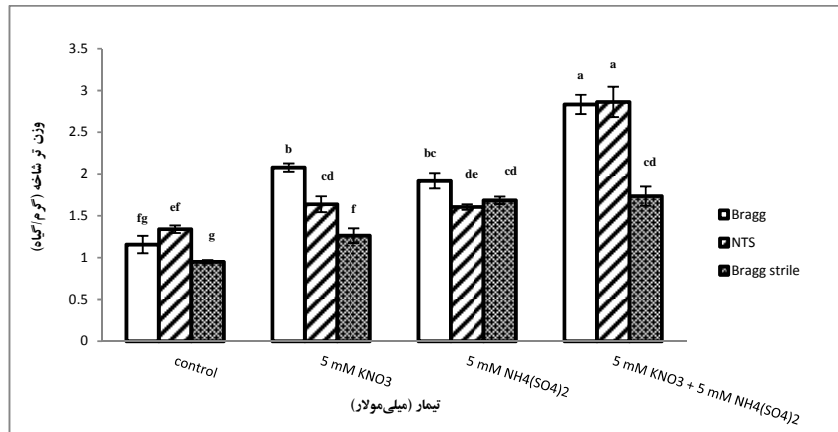
شاخص کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید در دو تیمار ۵ میلی‌مولار سولفات آمونیوم و تیمار توأم ۵ میلی‌مولار (نیترات پتاسیم، سولفات آمونیوم) بیشترین مقدار و در تیمار شاهد کمترین مقدار را دارا بودند، و همچنین میزان کلروفیل کل ارقام در مقایسه با کلروفیل b بیشتر بود (جدول ۳).

تغییرات میزان کارتنوئیدهای برگ‌گی تحت تیمارهای آزمایش قابل‌توجه بود (جدول ۳) به‌ویژه در موتانت NTS تحت

تأثیر تیمارها بر رشد طولی ریشه چندان قابل‌توجه نبود (جدول ۳) و فقط تیمار نیترات پتاسیم در موتانت NTS موجب افزایش ۲۰ درصدی رشد طولی ریشه نسبت به گیاهان کنترل گردید. در سایر تیمارها و ارقام مورد مطالعه تأثیر تیمارها بر این پارامتر رشد معنی‌دار نبود.

بررسی داده‌های مربوط به وزن‌تر اندام هوایی نمونه‌های تحت تیمار در شکل ۴ بیان می‌کند که بیشترین مقادیر مربوط به تیمار توأم نیترات و آمونیوم مربوط به رقم Bragg و موتانت NTS می‌باشد. میزان افزایش وزن‌تر این ارقام نسبت به شاهد Bragg در حدود ۱/۵ برابر است که بسیار قابل‌توجه و معنی‌دار بود. لازم به ذکر است که کاربرد تیمار جداگانه حاوی نیترات یا آمونیوم در موتانت NTS تأثیر معنی‌داری بر وزن‌تر اندام هوایی نداشته است. در مورد تغییرات وزن‌تر ریشه هم باید گفت که اثر متقابل

تیمار توأم دو ماده گفته شده که یک افزایش تقریبی چهار برابری نسبت به شاهد مشاهده شد و در دو رقم دیگر نیز افزایش در میزان کارتنوئیدها نیز نسبت به شرایط کنترل معنی‌دار بود.



شکل ۴- مقایسه تغییرات وزن تر ساقه در گیاهان سه تیپ سویا مطالعه شده تحت تیمارهای مختلف نیتروژن‌دار در محیط کشت پرلیت در سطح معنی‌دار ۱ درصد که با استفاده از آنالیز واریانس و آزمون چند دامنه‌ای دانکن بدست آمده است. Error Bar هر نمودار تغییرات خطای استاندارد (SE) را نشان می‌دهد. حروف لاتین متفاوت نیز در بالای نمودارها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس پس از نرمال‌سازی داده‌ها در سطح معنی‌دار  $\alpha = 0.05$  و  $\alpha = 0.01$  (صفات مورفولوژیک)

| میانگین مربعات       |                     |                     |             |                     |                     |                      |                     |            |                     |
|----------------------|---------------------|---------------------|-------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|------------|---------------------|
| محتوای نسبی آب       | سطح برگ             | تعداد گره           | وزن تر ریشه | وزن تر ساقه         | میان گره            | طول ریشه             | طول اندام هوایی     | درجه آزادی | منابع تغییرات       |
| ۲۳۳/۵۵۸**            | ۵۷۹/۸**             | ۹۹۹۳/۹**            | ۷/۳۶۲**     | ۱/۱۳۷**             | ۵/۱۰۵**             | ۱۲۶/۷۵**             | ۹۳/۳۳۹**            | ۲          | رقم                 |
| ۱۸۳/۵۸۲*             | ۲۰۴۷/۵**            | ۱۲۷۰/۸۰۴**          | ۲/۱۳۵**     | ۳/۵۲۲**             | ۱/۸۵۹*              | ۲۰۵/۴۴**             | ۹۴/۸۳۸**            | ۱          | نیترات              |
| ۵۴۵/۷۶۳**            | ۱۴۷۵/۸**            | ۴۴۰۲/۵**            | ۰/۵۴۵**     | ۴/۴۵۲**             | ۵/۱۸۳**             | ۳۶ <sup>ns</sup>     | ۲۶۰/۲۸**            | ۱          | آمونیم              |
| ۷۱/۴۹۳ <sup>ns</sup> | ۷۵۹/۸۱**            | ۵۵۲/۲۷**            | ۱/۱۸۱**     | ۰/۴۵۸**             | ۰/۱۸۴ <sup>ns</sup> | ۲۴/۷۴ <sup>ns</sup>  | ۳۲/۰۹۴**            | ۲          | رقم* نیترات         |
| ۵۴۱/۲۶۶**            | ۲۶/۲۹ <sup>ns</sup> | ۲۴۸۶/۲**            | ۰/۸۴۷**     | ۰/۰۲۲ <sup>ns</sup> | ۰/۰۹۹ <sup>ns</sup> | ۲۰/۹۶۳ <sup>ns</sup> | ۰/۲۸ <sup>ns</sup>  | ۲          | رقم* آمونیم         |
| ۱۷۰/۹۶۱*             | ۲/۵۰۷ <sup>ns</sup> | ۷/۲۰۹ <sup>ns</sup> | ۰/۳۷۸*      | ۰/۱۱۸*              | ۰/۰۲۱ <sup>ns</sup> | ۱۰۴/۰۴*              | ۰/۵۳۸ <sup>ns</sup> | ۱          | نیترات* آمونیم      |
| ۱۲۲/۱۰۶**            | ۴۲۴/۲۵*             | ۱۹۳/۳۶*             | ۰/۴۰۶**     | ۰/۳۱**              | ۰/۰۲۳ <sup>ns</sup> | ۸/۲۴۳ <sup>ns</sup>  | ۱۹/۹۱۹*             | ۲          | رقم* نیترات* آمونیم |
| ۴۰/۲۱۴               | ۱۰۸/۲۵              | ۴۵/۰۸۱              | ۰/۰۷۱       | ۰/۰۲۶               | ۰/۰۲۹۶              | ۱۵/۳۷                | ۴/۳۶۶               | ۲۴         | خطا                 |

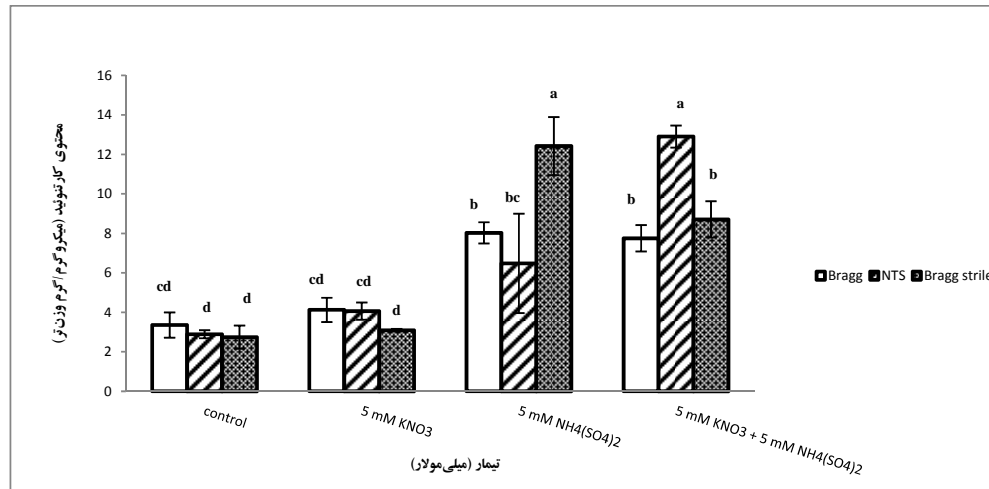
ادامه جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس پس از نرمال‌سازی داده‌ها در سطح معنی‌دار  $\alpha = 0.05$  و  $\alpha = 0.01$  (صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی)

| میانگین مربعات      |                     |                     |                     |                     |                     |                      |                      |            |                     |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|------------|---------------------|
| پرو لین             | آمینو اسید های آزاد | پروتئین کل          | قندهای احیا کننده   | کارتونوئید          | کلروفیل کل          | کلروفیل b            | کلروفیل a            | درجه آزادی | منابع تغییرات       |
| ۰/۰۹۷*              | ۰/۱۴۴*              | ۰/۰۴۹**             | ۰/۰۸ <sup>ns</sup>  | ۲/۹۳ <sup>ns</sup>  | ۲۸/۲۸ <sup>ns</sup> | ۱/۴۷۴ <sup>ns</sup>  | ۲۶/۰۶۳ <sup>ns</sup> | ۲          | رقم                 |
| ۰/۰۱۳ <sup>ns</sup> | ۰/۰۷۸ <sup>ns</sup> | ۰/۰۱۸ <sup>ns</sup> | ۱/۵۲۸**             | ۵/۳۶۱ <sup>ns</sup> | ۲۱/۴۸ <sup>ns</sup> | ۱۰/۱۰۵ <sup>ns</sup> | ۶۱/۰۵ <sup>ns</sup>  | ۱          | نیترات              |
| ۰/۰۸۲ <sup>ns</sup> | ۱/۰۳۹**             | ۰/۰۸۷**             | ۰/۳۵۹ <sup>ns</sup> | ۳۱۱/۳۶۱**           | ۹۶۹۶۰**             | ۴۴۵/۵۵**             | ۵۹۶۴/۶**             | ۱          | آمونیم              |
| ۰/۲۸۱**             | ۰/۰۰۳ <sup>ns</sup> | ۰/۰۸۱**             | ۰/۲۶۱ <sup>ns</sup> | ۲۱/۶۲۶**            | ۱۱۶/۶ <sup>ns</sup> | ۴/۳۶۱ <sup>ns</sup>  | ۹۹/۶۹ <sup>ns</sup>  | ۲          | رقم* نیترات         |
| ۰/۰۰۸ <sup>ns</sup> | ۰/۲۹۷**             | ۰/۰۱۶ <sup>ns</sup> | ۰/۱۴۴ <sup>ns</sup> | ۹/۲۵۸ <sup>ns</sup> | ۵۳/۲۹ <sup>ns</sup> | ۱/۶۱۸ <sup>ns</sup>  | ۴۰/۷۴ <sup>ns</sup>  | ۲          | رقم* آمونیم         |
| ۰/۰۰۸ <sup>ns</sup> | ۰/۰۵۶ <sup>ns</sup> | ۰/۰۱۸ <sup>ns</sup> | ۰/۰۱۳ <sup>ns</sup> | ۰/۰۰۵ <sup>ns</sup> | ۳۱/۳۵ <sup>ns</sup> | ۲۳/۷۹۳*              | ۰/۵۲۱ <sup>ns</sup>  | ۱          | نیترات* آمونیم      |
| ۰/۰۴۸ <sup>ns</sup> | ۰/۳۴۹**             | ۰/۰۷۶**             | ۰/۶۸۶**             | ۱۵/۷۵۸*             | ۳۴/۴۲ <sup>ns</sup> | ۴/۱۸۴ <sup>ns</sup>  | ۴۰/۱۲ <sup>ns</sup>  | ۲          | رقم* نیترات* آمونیم |
| ۰/۰۲                | ۰/۰۳۴               | ۰/۰۰۷               | ۰/۰۹۵               | ۳/۰۱                | ۴۹/۲۹               | ۴/۷۸۸                | ۳۰/۰۸۶               | ۲۳         | خطا                 |



است در مقایسه میانگین کارت‌نویدها، تأثیر تیمار حاوی آمونیوم تنها با تیمار توأم هر دو ماده تأکید شود که قبلاً انجام شده است. تیمار نیترات تنها بر محتوای کارت‌نویدها تأثیر معنی‌دار نداشته است (شکل ۵).

همچنین یک افزایش مشابه نیز در رقم Bragg استریل هم در تیمار آمونیوم رخ داد. این مقایسه‌ها ثابت می‌کند تأثیر تیمارهای آزمایش مانند تیمار توأم حاوی هر دو ماده نیترات و آمونیوم قابل توجه بوده است (جدول ۳).



شکل ۵- مقایسه تغییرات کارت‌نویس در گیاهان سه تیپ سویا مطالعه شده تحت تیمارهای مختلف نیتروژن‌دار در محیط کشت پرلیت در سطح معنی‌دار ۵ درصد که با استفاده از آنالیز واریانس و آزمون چند دامنه‌ای دانکن بدست آمده است. Error Bar هر نمودار تغییرات خطای استاندارد (SE) را نشان می‌دهد. حروف لاتین متفاوت نیز در بالای نمودارها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد.

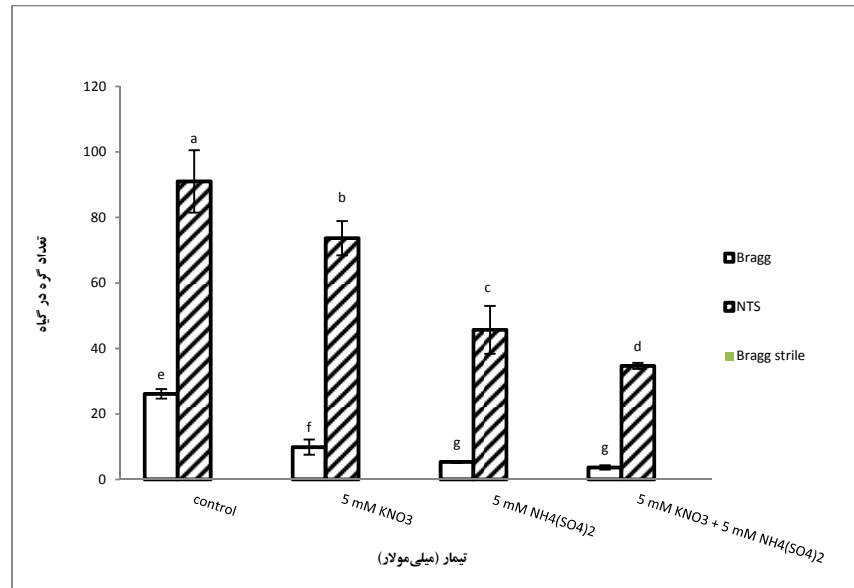
اسیدآمین‌های آزاد در هر سه تیپ در دو تیمار توأم و ۵ میلی‌مولار سولفات آمونیوم بیشترین مقدار و در تیمار شاهد کمترین مقدار را دارا بود. به‌طور کلی اکثر صفات بررسی شده تحت تیمارها، بیشترین مقدار را در تیمار توأم و تیمار ۵ میلی‌مولار سولفات آمونیوم و کمترین مقدار خود را در تیمار شاهد نشان دادند (جدول ۳).

علاوه بر این، نتایج نشان داد قندهای احیاکننده تحت تیمار سولفات آمونیوم افزایش بیشتری در مقایسه با تیمار نیترات پتاسیم داشتند. بیشترین مقدار پروتئین کل در دو تیمار توأم و ۵ میلی‌مولار سولفات آمونیوم مربوط به تیپ گیاه سویا دارای ریزوبیوم و کمترین مقدار در تیمار شاهد مربوط به Bragg استریل بود (جدول ۳).

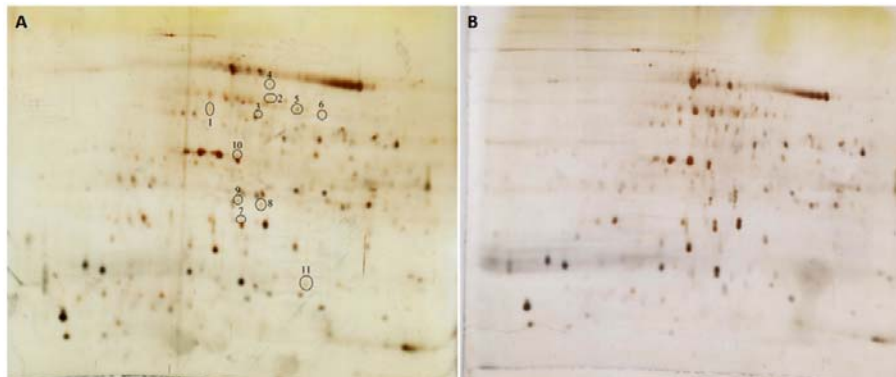
**پروفایل پروتئینی:** نتایج حاصل از الکتروفورز دوبعدی دو نمونه تیپ وحشی سویا تلقیح شده با باکتری ریزوبیوم تحت تیمار شاهد (B0) و تیپ وحشی سویا تحت شرایط استریل بدون تلقیح شدن با باکتری ریزوبیوم تحت تیمار ۵ میلی‌مولار آمونیوم (BS5) در شکل ۷ نشان داده شده است. در نمونه‌های الکتروفورز شده بطور میانگین ۲۰۲ لکه پروتئینی مشاهده گردید. در ژل الکتروفورز شده نمونه B0 تعداد ۴۱ لکه پروتئینی در pH:4-5، ۱۱۸ لکه در pH:5-6 و ۳۵ لکه در pH:6-7 دیده شد.

داده‌های حاصل از شمارش گره‌ها نیز نشان داد که تیمار توأم نیترات و آمونیوم در دو رقم Bragg و NTS منجر به کاهش چشمگیر در تعداد گره‌ها گردید (جدول ۳) و این میزان کاهش معنی‌دار به ترتیب برای دورق ۱۳/۸ و ۳۸ درصد بود (شکل ۶).

مقدار اسیدآمین‌ه پرولین در Bragg استریل و در تیمار ۵ میلی‌مولار نیترات پتاسیم حداکثر و همچنین دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به بقیه تیمارها بود. کمترین مقدار این اسیدآمین‌ه در NTS در تیمار توأم مشاهده شد. شاخص



شکل ۶- مقایسه تغییرات تعداد گره در ریشه گیاهان سه تیمپ سویا مطالعه شده تحت تیمارهای مختلف نیتروژن‌دار در محیط کشت پرلیت در سطح معنی‌دار ۵ درصد که با استفاده از آنالیز واریانس و آزمون چند دامنه‌ای دانکن بدست آمده است. Error Bar هر نمودار تغییرات خطای استاندارد (SE) را نشان می‌دهد. حروف لاتین متفاوت نیز در بالای نمودارها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد.



شکل ۷- الگو بیان پروتئینی در برگ سویا. A: الگو بیان پروتئین برگ تحت تیمار B0 (عدم دریافت نیتروژن معدنی)، B: الگو بیان پروتئین برگ تحت تیمار BS5 (دریافت ۵ میلی‌مولار  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ ) هستند. لکه‌های پاسخ‌دهنده با شماره مشخص شده‌اند.

در سال ۱۳۹۰ نشان دادند که، با افزایش غلظت  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  افزایش معنی‌داری در میزان پروتئین کل اندام هوایی و اسیدآمینوهای آزاد گیاه نخود دیده می‌شود. به طوری که کمترین مقدار پروتئین (۰/۴۵) در گروه تیماری با غلظت صفر  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  و بیشترین مقدار پروتئین (۰/۵۳) در گروه تیماری با غلظت ۴۰ میلی‌مول بر لیتر  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  مشاهده شد (۱). نتایج این پژوهش نیز نشان داد که، گیاهان BS5 تحت تیمار ۵ میلی‌مولار  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  پروتئین بیشتر و

همچنین از مجموع لکه‌های پروتئینی دیده شده در ژل BS5، تعداد ۷۲ لکه در pH:4-5، ۹۸ لکه در pH:5-6 و ۴۱ لکه پروتئینی نیز در pH:6-7 مشاهده شد. به طور کلی در هر دو ژل الکتروفورز شده B0 و BS5 تعداد لکه‌های پروتئینی تفکیک شده به ترتیب در pH:4-<pH:5-6 و pH:6-7<5 قرار داشتند. نتایج دو نمونه الکتروفورز شده B0 و BS5 نشان می‌دهد که تعداد لکه‌های پروتئینی تفکیک شده در pH های متفاوت در ژل مربوط به نمونه BS5 نسبت به نمونه B0 بیشتر است. موسوی و همکاران

متنوع‌تری در برگ خود نسبت به گیاهان B0 تحت تیمار شاهد (عدم دریافت نیتروژن معدنی) نشان دادند.

با مقایسه کیفی دو ژل بدست آمده در شرایط تلقیح شده با باکتری ریزوبیوم (B0) و تیمار با پنج میلی‌مولار آمونیوم (BS5) حداقل ۱۱ لکه شناسایی شدند که ۹ لکه بیان آنها در شرایط B5 آنقدر کم بود که بر روی ژل قابل مشاهده نبودند و می‌توان گفت فقط در شرایط B0 بیان شدند و ۲

لکه هم فقط در شرایط B5 بیان شدند (جدول ۴). هرچند که آنالیز پروتئومیکس به صورت تکرار دار صورت نگرفته است، با این حال می‌توان می‌توان نتیجه گرفت که در صورتی که الکتروفورز دوبعدی به صورت کمی صورت پذیرد و داده‌ها به صورت کمی درآیند، قطعاً نتایج بسیار خوبی حاصل خواهد شد.

جدول ۴- مشخصات لکه‌هایی که به صورت کیفی به‌عنوان لکه‌های پاسخ‌دهنده به شرایط تیمار ۵ میلی‌مولار آمونیوم شناسایی شده‌اند

| شماره لکه | وزن مولکولی بدست آمده | نقطه ایزو الکتریک بدست آمده | شرایط B0 | شرایط B5 |
|-----------|-----------------------|-----------------------------|----------|----------|
| ۱         | ۴۵                    | ۵/۳۹                        | +        |          |
| ۲         | ۴۸                    | ۵/۷۸                        | +        |          |
| ۳         | ۴۴                    | ۵/۷۰                        | +        |          |
| ۴         | ۵۲                    | ۵/۷۹                        | +        |          |
| ۵         | ۴۶                    | ۵/۹۶                        |          | +        |
| ۶         | ۴۶                    | ۶/۰۹                        | +        |          |
| ۷         | ۲۶                    | ۵/۶۲                        | +        |          |
| ۸         | ۲۸                    | ۵/۷۵                        | +        |          |
| ۹         | ۲۹                    | ۵/۶۳                        |          | +        |
| ۱۰        | ۳۶                    | ۵/۵۸                        | +        |          |
| ۱۱        | ۲۰                    | ۶/۰۲                        | +        |          |

## بحث و نتیجه‌گیری

**پارامترهای رشد:** نیتروژن یکی از مهمترین عوامل محدودکننده تولید محصولات زراعی است. میانگین مقدار نیتروژن در ماده خشک گیاهان ۱-۲ درصد و گاهی به ۴-۶ درصد نیز می‌رسد. نیتروژن در بین ۱۶ عنصر مورد نیاز گیاهان از نظر اهمیت در جای چهارم قرار دارد. می‌توان گفت هیچ جایی نیست که در آن کمبود نیتروژن وجود نداشته باشد به‌جز در مورد گیاهان لگومینوز عکس‌العمل گیاهان نسبت به کودهای نیتروژنه بیش از هر ماده غذایی دیگری است (۳۰ و ۳۱). سویا می‌تواند از هر دو روش: تثبیت بیولوژیکی نیتروژن در گره‌های ریشه و جذب نیتروژن معدنی از خاک برای نیاز نیتروژنی نسبتاً بالای خود استفاده کند. سویا از جمله لگوم

هایی است که برای تولید محصول احتیاج به مقادیر فراوانی نیتروژن دارد. اگر سیستم همزیستی در این گیاه به کارایی بالایی رسانده شود، سویا به کود نیتروژنه پاسخ مثبت نشان نمی‌دهد. کاربرد بیش‌ازحد ترکیبات نیتروژنه بخصوص آمونیوم در گیاهان خانواده لگومینه، از جمله سویا به‌عنوان مهارکننده قوی گره‌زایی، رشد و تثبیت نیتروژن شناخته شده است (۳۰ و ۳۳).

بیشتر گیاهان اغلب نیتروژن را از محلول خاک به صورت یون نترات معدنی ( $\text{NO}_3$ ) و در موارد کمتری به صورت یون آمونیوم ( $\text{NH}_4$ ) جذب می‌کنند، این موضوع به سبب اکسایش میکروبی آمونیوم در خاک و همچنین اثرات ترکیبی اسیدی شدن ناحیه ریشه است، که بدلیل تجمع بیش‌ازحد کاتیون‌ها نسبت به آنیون‌ها در طول جذب آمونیوم و نیز اثرات سمی آمونیوم آزاد در بافت گیاه

تیمار ۳۰ میلی‌مولار بیومس گیاهی، نرخ فتوسنتز خالص و هدایت روزنه‌ای بسیار مشابه بود بازمانی که گیاهان با محدودیت نیتروژن مواجه بودند (۴۰).

باتوجه به مقایسه میانگین بین تیمارهای نوع و میزان ترکیبات نیتروژن‌دار و سطوح تلقیح، در بین گیاهان سویا از نظر تعداد گره اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده گردید. در هر چهار تیمار نیتروژن‌دار، تعداد گره بر روی ریشه‌های گیاهان استریل تیپ وحشی سویا که با باکتری ریزوبیوم تلقیح نشده بودند، صفر بود. در مورد دو تیپ دیگر سویا یعنی موتانت NTS و Bragg که با باکتری ریزوبیوم تلقیح شدند، نتایج تجزیه واریانس نشان داد که، بین تیمارها و همچنین تیپ‌های سویا در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد. از میان چهار تیمار بیشترین تعداد گره سطح ریشه را گیاهان تحت تیمار شاهد دارا بودند. زمانی که گیاهان سویا منبع نیتروژنی خارجی دریافت کردند، از تعداد گره‌های سطح ریشه آنها کاسته شد و به وزن گره و طول ریشه‌شان افزوده گردید. همچنین نتایج نشان داد که تیمار آمونیوم تعداد گره را بیشتر از کودهای نیترات تحت تأثیر خود قرار داده است، چرا که در تیمارهای آمونیوم و توأم کمترین تعداد گره مشاهده گردید. از بین دو رقم سویا، رقم موتانت NTS نیز در مقایسه با تیپ وحشی تلقیح شده با ریزوبیوم، بیشترین تعداد گره را بر سطح ریشه خود داشتند.

گزارش شده است که در غلظت‌های کم، نیتروژن از طریق تحریک تشکیل گره، تحریک فعالیت نیتروژناز و افزایش رشد گیاه بر تثبیت نیتروژن اثر تشدیدکنندگی دارد. افزودن مقدار زیاد نیتروژن باعث کاهش نفوذ باکتری به تارهای کشته ریشه، کاهش تعداد و توده گره، و کاهش فعالیت تثبیت نیتروژن ریشه‌های گره‌دار و مقدار نیتروژن کل تثبیت شده در سویا و لپه هندی می‌گردد. اما درجه بازدارندگی به فرم ترکیبات نیتروژنه، جنس، رقم، سوش باکتری ریزوبیوم،

می‌باشد. پس در گیاه  $\text{NO}_3$  قبل از ورود به داخل آمینواسیدها، پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های نیتروژنی به  $\text{NH}_4$  احیا می‌شود (۸). فرم نیتروژن که توسط گیاه استفاده می‌شود، همبستگی به بارندگی و pH خاک دارد. در خاک‌های اسیدی جذب  $(\text{NH}_4)$  مطلوب بوده و جذب  $\text{NO}_3$  کاهش می‌یابد (۲). در مطالعه‌ای مشخص گردید که غلظت بالای نیترات برای رشد و توسعه گره‌زایی، رشد ریشه‌های اولیه، ریشه‌های جانبی و همچنین تثبیت نیتروژن یک عامل محدودکننده است (۲۷). در این پژوهش بررسی نتایج حاصل از سنجش پارامترهای رشد، شامل رشد طولی، وزن‌تر ساقه، سطح برگ و طول میان گره نشان داد که به‌طور کلی تیمار توأم سولفات آمونیوم همراه با نیترات پتاسیم موجب افزایش معنی‌دار پارامترهای رشدی همچون رشد طولی ساقه، سطح برگ و طول میان گره نسبت به شاهد گردید. نتایج حاصل از تجزیه واریانس رشد طولی اندام هوایی نشان داد که گیاهان رقم موتانت NTS، تحت تیمار توأم حداکثر رشد اندام هوایی را دارا بودند، این افزایش رشد نسبت به گیاهان تیپ شاهد خودشان و دو تیمار دیگر در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. همچنین رقم موتانت NTS در تیمار آمونیوم همراه با نیترات بیشترین طول میان گره‌ها را نسبت به شاهد و گیاهان تحت سایر تیمارها به خود اختصاص داد، که این افزایش طول باعث معنی‌دار شدن این پارامتر در سطح ۵ درصد شد. کاربرد توأم نیترات و آمونیوم موجب بهبود و افزایش چشمگیر شاخص سطح برگ گردید و سطح برگ در رقم Bragg دارای ریزوبیوم را به  $81/33$  سانتی‌متر مربع رساند که این میزان از حد شاهد  $36/66$  بطور قابل‌ملاحظه‌ای بیشتر می‌باشد.

مطالعه اثرات دو تیمار ۵ و ۳۰ میلی‌مولار سولفات آمونیوم در گیاه سویا پس از تلقیح با باکتری ریزوبیوم نشان داد کاربرد تیمار ۵ میلی‌مولار سولفات آمونیوم در مقایسه با شاهد به‌طور قابل‌توجهی باعث افزایش پارامترهای رشد از قبیل رشد اندام هوایی وزن‌تر ساقه و سطح برگ شد و در

فصل، شدت نور، درجه حرارت و شرایط تغذیه گره‌ها بستگی دارد (۱۵).

نتایج قلی‌زاده و همکاران در سال ۱۳۸۶ نشان دادند که، وجود بالاترین وزن گره و تعداد گره در روی ریشه یونجه‌هایی که با محلول غذایی محتوی ۱ میلی‌مول نترات پتاسیم و ۱ میلی‌مول فسفات آمونیوم رشد نمودند نیاز گیاه یونجه را به مقدار کمی از مکمل نیتروژن معدنی در اوایل رشد گیاه تأیید می‌کند (۷). دلایل و مکانیسم‌های چگونگی بازدارندگی اثر کودهای نیتروژنه از مدتها پیش مورد مطالعه قرار گرفته است نرسیدن محصول فتوستتز به گره‌ها باعث عدم تشکیل گره در روی ریشه می‌شود، زیرا کربوهیدرات حاصل همراه نیتروژن معدنی قبل از به کار رفتن در تشکیل گره به مصرف رشد گیاه می‌رسد (۷). در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که در گیاه سویا اختلاف معنی‌داری بین فرم نیتروژن به صورت آمونیوم یا نترات در انتقال مواد فتوستتزی به گره‌ها وجود ندارد. این مسئله نشان می‌دهد که هر دو منبع نیتروژنی می‌توانند به طور تقریباً یکسان جریان انرژی را به گره‌ها کاهش دهند اما نترات اثر بیشتری بر روی فعالیت آنزیم نیتروژناز دارد. از طرف دیگر، آمونیوم به احتمال زیاد تأثیر بیشتری را بر روی تشکیل گره داشته باشد. از نقطه نظر ژنتیکی، مسیر اصلی کنترل گره‌زایی تحت عنوان خود تنظیمی گره‌زایی یا AON خوانده می‌شود که شامل پیام‌رسانی بین ریشه و ساقه است (۲۷).

مطالعات نشان داده است، در ارقام وحشی سویا، هنگامی که ریشه سویا به باکتری برادی ریزوبیوم آلوده می‌شود، سیگنال‌هایی در ریشه سنتز می‌شود و پیام‌های ریشه‌ای ناشی از تحریک ریزوبیومی منجر به فعال شدن گیرنده شبه کینازی غنی از LRR در شاخه می‌شود که این گیرنده به نوبه خود یک بازدارنده گره را در ساقه تولید می‌کند. به عبارت ساده‌تر، نشانه ناشناخته ریشه‌ای Q، موجب پیام‌رسانی برگ می‌شود که در اثر بیان GmNARK در برگ سرانجام

علامت بازدارندگی برگ (SDI) به ریشه می‌آید که اثر بازدارندگی بر گره‌زایی دارد و تعداد گره در ریشه را تنظیم می‌کند (۱۶).

تاکنون ماهیت پیام‌های ریشه و ساقه شناخته نشده است و معلوم نیست که چگونه گیرنده شبه کینازی LRR پیام‌رسانی دوردست را موجب می‌شود بررسی‌های زیادی با روش ژنتیک مستقیم جهت شناسایی ژن‌های درگیر در گره‌زایی انجام شده است. در سویا ژن‌های *NRF1* و *NRF5* این نقش را بر عهده دارند، که جهش در این‌ها موجب عدم گره‌زایی می‌شود (۱۶، ۲۲ و ۲۳).

**پارامترهای فیزیولوژی:** مطالعات قبلی نشان داده است که تأمین نیتروژن بهینه می‌تواند رشد گیاه را تحریک کند (۴ و ۶). حدود ۷۰ درصد از نیتروژن برگ گیاهان در کلروپلاست وجود دارد و بیشتر برای دستگاه‌های فتوستتزی استفاده می‌شود. تأمین نیتروژن برای عملکرد دستگاه فتوستتز کننده خیلی مهم است. تجربیات نشان داده است که تأمین کردن ۵ میلی‌مولار از  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)$  به سویا تلقیح شده با ریزوبیوم حداکثر محتوای رنگدانه‌های فتوستتزی (کلروفیل)، نرخ فتوستتز خالص، هدایت روزنه‌ای، بهره‌وری کربوکسیلاسیون همراه با حداقل کربن، حداکثر بهره‌وری فتوشیمیایی از فتوسیستم II و زیست توده را در مقایسه با گیاهان شاهد در پی داشته است، به طوری که افزایش مختلف محتوای کلروفیل a و b منجر به تفاوت در نسبت کلروفیل a/b در بین تیمارها شد. برای گیاهان رشد یافته تحت تیمار ۵ میلی‌مولار آمونیوم کلروفیل (a+b) در تمامی تکرارها بسیار بالا بود، نسبت به زمانی که گیاهان نیتروژن اضافی دریافت کرده بودند. همچنین ۶،۴۲ و ۶۰ درصد افزایش در فتوستتز خالص و کربوکسیلاسیون به ترتیب در برگ‌های سویا تحت این تیمار در مقایسه با گیاهان شاهد وجود داشت (۴۰). آزمایشات ما نیز بیانگر این موضوع بود که دو تیمار سولفات آمونیوم+نترات و آمونیوم نسبت به تیمار ۵ میلی‌مولار نترات و شاهد

گیاهان سویا در دو تیمار توأم و سولفات آمونیوم کمترین مقدار پرولین را داشتند، چرا که در این دو تیمار به دلیل اسیدی بودن محیط اطراف ریشه، جذب سولفات آمونیوم و یا نیتروژن احیا شده توسط گیاهان راحت بود و با تنش ازت مواجه نبودند. این شاخص در تیمارهای شاهد و نیترات پتاسیم بیشترین میزان خود را در برگ گیاهان سویا نشان داد. کمترین مقدار این اسیدآمین در NTS در تیمار توأم مشاهده شد.

مطالعه‌ای بر روی سه گونه اسفناج، نخود و آفتابگردان نشان داد که افزایش پروتئین کل در تیمار آمونیاکی، در اسفناج ۵۰ درصد و در نخود و آفتابگردان ۲۰ درصد بیش از تیمار نیتراتی بوده است و با افزایش غلظت نیترات آمونیوم محتوای پروتئین نیز بالا رفت (۲۵). نتایج حاصل از بررسی ما در گیاه سویا با گزارش‌های بالا مطابقت می‌کند. گیاهان تیپ Bragg دارای ریزوبیوم در تیمار آمونیوم همراه با نیترات در مقایسه با گیاهان تحت تیمارهای دیگر برگ‌هایی با مقدار پروتئین کل بیشتری داشتند. موتانت NTS از نظر این شاخص همچون گیاهان Bragg دارای ریزوبیوم، برگ‌هایی با پروتئین کل بالایی داشتند که این میزان از پروتئین طی تیمار آمونیوم حاصل شد. در تیمار توأم گیاهان NTS نسبت به تیمار آمونیوم و نیترات میزان پروتئین کمتری را دارا بودند، اگرچه برگ‌ها دارای پروتئین می‌باشند ولی در برگ ذخیره نمی‌شود و احتمالاً پروتئین از برگ‌ها به سایر بافته‌ای گیاهی منتقل می‌شود. همچنین گفته می‌شود که پروتئین کل با اسیدآمین‌ها های آزاد رابطه عکس دارد، به طوری که هر جا میزان پروتئین کل اندام هوایی پایین باشد میزان اسیدآمین‌ها های آزاد بیشتر خواهد بود.

**پروفایل پروتئینی:** دامنه بررسی‌ها در علم پروتئومیکس وسعت زیادی دارد که از مهم‌ترین آن‌ها شناخت پروتئین‌ها، بررسی کمی آنها در سلول‌ها، بافت‌ها و مایعات زیست‌شناختی، سنجش تغییرات در بیان پروتئین‌ها

بیشترین تأثیر را از نظر رنگیزه‌های گیاهی و محتوای کلروفیل a و b بر گیاهان سویا گذاشته است. به طوریکه هر سه تیپ از گیاهان سویا حداقل میزان کلروفیل a و b، کلروفیل کل و کارتنوئید را در تیمارهای شاهد و نیترات و حداکثر میزان این پارامتر را در دو تیمار دیگر یعنی تیمار آمونیوم و توأم داشتند.

**پارامترهای بیوشیمیایی:** Ahmad Khan در سال ۲۰۱۴

نشان داد که، ریزوبیوم در هنگام تنش‌های غیر زیستی با تولید ترکیباتی همچون انواع هورمون‌ها و ویتامین‌ها، ترکیبات اسمولیت مثل گلاسیسین بتائین، تولید ACC-دآمیناز جهت جلوگیری از سنتز اتیلن و تولید آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی در هنگام شرایط تنشی بسیار سخت در کاهش شرایط تنش برای گیاهان مؤثر است (۲۴). در واقع این باکتری‌ها در هنگام شرایط تنشی سبب القای دفاع گیاه و ایجاد مقاومت در گیاه می‌شوند. از جمله مکانیسم‌های مقاومت سیستمیک القایی می‌توان به تولید آنزیم ACC-دآمیناز اشاره کرد. این آنزیم با تجزیه ACC از تولید هورمون اتیلن جلوگیری می‌کند در نتیجه اثرات اتیلن که موجب رشد ضعیف ریشه و کاهش توانایی آن در اکتساب آب و مواد غذایی می‌شود را کاهش می‌دهد. تولید هورمون‌هایی مثل آبسیزیک اسید که موجب بسته شدن روزنه‌ها می‌شود و آنتی‌اکسیدانت‌هایی مثل سوپراکسیددیسموتاز که تحت شرایط تنشی خیلی شدید باعث مهار رادیکال‌های آزاد می‌شوند از جمله مکانیسم‌های دیگر به کاررفته توسط این باکتری‌ها هستند. از جمله مکانیسم‌های دیگر می‌توان به تولید ترکیبات اسمولیت مثل پرولین و گلاسیسین بتائین اشاره کرد که چنین ترکیباتی در هنگام تنش‌ها منجر به ایجاد تعادل اسمزی در گیاه می‌شود. در گیاهان شاهد این تحقیق که نیتروژن دریافت نکرده بودند (تنش دیده‌اند) این اسیدآمین‌ها بیشترین مقدار را نشان داد (۲۴).

تلقیح شده با باکتری ریزوبیوم تغییری که در بیان ژن‌ها به دلیل همزیستی ایجاد شده است، دلیل این تفاوت در تنوع پروتئینی باشد.

**نتیجه‌گیری کلی اثر نیتрат، آمونیوم، تثبیت بیولوژیک و موتانت NTS:** بقولات با ایجاد همزیستی با باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و تولید گره در ریشه سبب تثبیت نیتروژن مولکولی می‌شوند. گیاهان سویا می‌توانند از هر دو روش تثبیت بیولوژیک نیتروژن و جذب نیتروژن معدنی از خاک، نیتروژن مورد نیاز خود را تأمین کنند. بیشتر گیاهان می‌توانند نیترات، آمونیوم، اوره و اسیدهای آمینه را به‌عنوان منبع نیتروژن جذب و تثبیت نمایند، اما جذب شکل خاصی از نیتروژن از گونه‌ای به گونه دیگر فرق می‌کند. بیشتر گیاهان زراعی مخلوطی از آمونیوم و نیترات را ترجیح می‌دهند و نسبت بالاتری از آمونیوم به نیترات را از محلول خاک جذب می‌نمایند (۳). به‌طور کلی در اکثر پارامترهای بررسی شده (طول اندام هوایی، وزن تر ساقه و ریشه، سطح برگ، میان گره، رنگیزه‌های گیاهی، پروتئین کل، اسید آمینه‌های آزاد)، تیمار آمونیوم همراه با نیترات نسبت به سایر تیمارها بیشترین تأثیر را بر گیاهان سویا گذاشته است. علاوه بر این تأثیر تثبیت بیولوژیک ازت بر روی پارامتر رشد اندام هوایی، پارامترهای فیزیولوژی و بیوشیمیایی قابل ملاحظه است. در اکثر صفات مورد مطالعه تحت تیمارها، در تیپ NTS که در ژن NARK عامل کنترل‌کننده گره‌زایی نقص دارد و منجر به تشکیل انبوه گره بر روی ریشه می‌شود، تفاوت معنی‌دار دیده می‌شود. در گیاهان کنترل که هیچ‌گونه منبع نیتروژنی معدنی را دریافت نکردند، مشاهده می‌شود که رشد اندام هوایی در تیپ Bragg و NTS بهبود یافته و این افزایش در NTS در مقایسه با Bragg استریل معنی‌دار است.

در سلول‌های بیمار در مقابل سلول‌های طبیعی، توصیف تغییرات پس از ترجمه، مطالعه بر همکنش‌های پروتئین-پروتئین، تعیین موقعیت، شناسایی عملکرد سلولی در سطح پروتئین‌ها، شناسایی ژن‌های ناشناخته به کمک پروتئین‌ها و بسیاری از کاربردها و جوانب دیگر است. در روش الکتروفورز دوبعدی، در بعد اول الکتروفورز، پروتئین‌ها براساس نقطه ایزوالکتریک‌شان به صورت خطی جدا می‌شوند و در بعد دوم، مولکول‌ها با ۹۰ درجه تفاوت نسبت به بعد اول براساس وزن مولکولی‌شان جدا می‌شوند. شدت تحرک پروتئین‌ها در نزدیکی نقطه ایزو الکتریک برای هر پروتئین ثابت است و به‌شدت بار الکتریک مولکول در نزدیکی نقطه ایزوالکتریک آن بستگی دارد. ضریب انتشار پروتئین‌ها معمولاً تناسب معکوس با اندازه آنها دارد، هرچه اندازه مولکول بزرگتر باشد، ضریب انتشار آن کمتر خواهد بود. پروتئین‌ها مولکول‌های چند یونی هستند که بار خالص آنها وابسته به pH محیط اطراف است، این مواد آمفوتری هریک در pH خاصی فاقد بار الکتریک هستند و هرچه میزان تغییرات pH نسبت به تغییرات مسافت کمتر باشد، قابلیت تفکیک پروتئین‌ها نیز بهتر می‌شود (۳۹).

براساس نتایج این آزمایش گیاهان سویا استریل بدون تلقیح شدن با باکتری ریزوبیوم، تحت تیمار ۵ میلی‌مولار  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  در مقایسه با گیاهان سویا تلقیح شده با باکتری ریزوبیوم (عدم دریافت نیتروژن معدنی)، تنوع پروتئینی بیشتری در برگ خود نشان دادند. این تنوع پروتئینی بیشتر می‌تواند به دلیل در دسترس بودن میزان کافی نیتروژن در این گیاهان در مقایسه با گیاهانی که منبع نیتروژنی آنها فقط از طریق گره‌زایی بوده است، باشد و یا اینکه به دلیل نوع منبع نیتروژنی معدنی (سولفات آمونیوم) باشد. علاوه بر این، این احتمال نیز داده می‌شود در گیاهان

## منابع

و امیدی، م.، ۱۳۸۸. جداسازی ژن (*GmNARK*) ناقل کلسیم و

۱- ایزدی دربندی، ع.، کینکما، م.، گرشوف، پ.، یزدی صمدی، ب.،

با استفاده از نمک‌های نیتراتی بر شاخص‌های جوانه‌زنی گیاهیچه‌های سویا (*Glycine max* L.) نشریه تحقیقات بذر، دوره ۷ شماره ۲۵، صفحات ۲۲-۱۱.

۶- عمواقایی، ر.، و ولی‌وند، م.، ۱۳۹۳. اثر مدت‌زمان سرمادهی، غلظت، نوع و زمان تیمار مواد ازته بر جوانه‌زنی و رشد دانه رست کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima* Mozaff.). مجله پژوهش‌های گیاهی، جلد ۲۷، شماره ۳، صفحات ۴۶۵-۴۷۷.

۷- قلی‌زاده، م.، گالشی، س.، لطیفی، ن.، و زینلی، ا.، تأثیر میزان و نوع کود نیتروژن بر تثبیت بیولوژیک نیتروژن در گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۴(۵)، صفحات ۸۷-۹۵.

۸- ملکوتی، م. ج.، و ریاضی‌همدانی، س. ع.، ۱۳۷۰. کودها و حاصلخیزی خاک (ترجمه)، مرکز نشر دانشگاهی تهران، ۸۰۰ صفحه.

بررسی الگوی بیانی آن در سویا. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، دوره ۱، شماره ۱، صفحات ۴۹-۶۱.

۲- پیرولی بیرانوند، ن.، صالح راستین، ن.، آفریده، ح.، و ثاقب، ن.، ۱۳۸۲. مطالعه توان برخی سویه‌های باکتری برادی ریزوبیوم ژاینیکوم در تأمین نیتروژن مورد نیاز ارقام سویا، مجله علوم کشاورزی ایران، شماره ۱، صفحات ۹۷-۱۰۴.

۳- پیرولی بیرانوند، ن.، ۱۳۸۷. بررسی اثرات متقابل رقم گیاه و سویه باکتری روی توان تثبیت نیتروژن سویا در خاکهای مختلف، پایان‌نامه فوق‌لیسانس خاکشناسی، دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی کرج.

۴- سید شریفی، ر.، و حیدری سیاه‌خلکی، م. ص.، ۱۳۹۴. تأثیر کودهای بیولوژیک بر شاخص‌های رشدی و سهم فرایند انتقال مجدد ماده خشک در عملکرد دانه گندم، مجله پژوهش‌های گیاهی جلد ۲۸، شماره ۲، صفحات ۳۲۶-۳۴۳.

۵- عبدلی، م.، و رسایی، ب.، اثر هیدروپرایمینگ و اسموپرایمینگ

9- Bates, L. S., Waldren, R. P., and Teare, I. D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies., *Plant and soil*, 1, 39, PP: 205-7.

10- Blumenthal, J. M., and Russelle, M. P., 1996. Subsoil nitrate uptake and symbiotic dinitrogen fixation by alfalfa, *Agron*, 88, PP: 909-915.

11- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 7(72), PP: 248-54.

12- Broughton, W. J., and Dilworth, M. J., 1971. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans, *Biochemical journal*, 125, PP: 1075-1080.

13- Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M., and Thiellement, H., 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 1(7), PP: 52-4.

14- De Ron, A. M., Cubero, J. I., Singh, S. P., and Aguilar, O. M., 2013. Cultivated legume species. *International journal of agronomy*, PP: 1-2.

15- Eaglesham, A. R., Hassouna, S., and Seegers, R., 1983. Fertilizer-N effects on N<sub>2</sub> fixation by cowpea and soybean, *Agronomy Journal*, 75, PP: 61-6.

16- Ferguson, B. J., et al. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation, *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, PP: 61-76.

17- Graham, P. H., and Vance, C. P., 2000. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, 65, PP: 93-106.

18- Graham, P. H., and Vance, C. P., 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, 1(131), PP: 872-7

19- Gresshoff, P. M., 1993. Discovery and expression analysis of nodulation genes in soybean. *Plant Breeding Reviews*, 11, PP: 275-318.

20- Hosain, Z., and Komatsu, S., 2014. Potentiality of soybean proteomics in untying the mechanism of flood and drought stress tolerance, *Proteome*, 2, PP: 107-127.

21- Hwang, M. N., and Ederer, G. M., 1975. Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci, *Journal of Clinical Microbiology*, 1(1), PP: 114-5.

22- Indrasumunar, A., Kereszt, A., Searle, I., Miyagi, M., Li, D., Nguyen, C. D. T., Men, A., Carroll, B. J., and Gresshoff, P. M., 2010. Inactivation of duplicated Nod Factor Receptor 5 (NFR5) genes in recessive loss-of-function non-nodulation mutants of allotetraploid soybean (*Glycine max* L. Merr.), *Plant and Cell Physiology*, 51, PP: 201-214.



- 23- Indrasumunar, A., Searle, I., Lin, M. H., Kereszt, A., Men, A., Carroll, B. J., and Gresshoff, P. M., 2011. Nodulation factor receptor kinase 1 $\alpha$  controls nodule organ number in soybean (*Glycinemax* L. Merr). *The Plant Journal*, 65, PP: 39-50.
- 24- Khan, A. A., Khan, I., and Khan, M., 2012. Response of black gram (*Phaseolus mungo* L.) to sulphur dioxide, *J of Sci and Tech*, 7, PP: 23-27.
- 25- Kindscher, K., 1992. Medicinal wild plants of the prairie, An ethnobotanical guide, University Press of Kansas, United States of America, 1, PP: 96-125.
- 26- Lichtenthaler, H. K., 1987. Chlorophylls and carotenoids, pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods in enzymology*, 31(148), PP: 350-82.
- 27- Liu, K., 2012. Soybeans: chemistry, technology, and utilization. Chapman and Hall, Singapore, 1, PP: 1-5.
- 28- Mirzaei, S., Batley, J., Meksem, K., Ferguson, B. J., and Gresshoff, P. M., 2017. Neodiversification of homeologous CLAVATA1-like receptor kinase genes in soybean leads to distinct developmental outcomes. *Scientific reports*, 7, 8878 p.
- 29- Mirzaei, S., Jacqueline, B., Brett, J. F., and Gresshoff, P. M., 2014. Transcriptome profiling of the shoot and root tips of S562L, a soybean GmCLAVATA1A mutant. *Atlas Journal of Biology* 3, PP: 183-205.
- 30- Ohyama, T., Ito, S., Nagumo, Y., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Takahashi, Y., and Sato, T., 2010. Symbiotic nitrogen fixation and its assimilation in soybean, *Research Signpost: Kerala, India*, PP: 175-203.
- 31- Ohyama, T., Fujikake, H., Yashima, H., Sueyoshi, K., Ohtake, N., Ishii, S., Tanabata, S., Ishikawa, S., Fujimaki, S., Sato, T., Nishiwaki, T., 2011. Effect of nitrate on nodulation and nitrogen fixation of soybean. *INTECH*, PP: 333-364.
- 32- Oldroyd, G. E., and Downie, J. A., 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes, *Annu. Rev. Plant Biol*, 2(59), PP: 519-46.
- 33- Puritch, G. S., and Barker, A. V., 1967 Structure and function of tomato leaf chloroplasts during ammonium toxicity. *Plant Physiology*, 1(42), PP: 1229-1238.
- 34- Saito, A., et al., 2014. Effect of nitrate on nodule and root growth of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *International Journal of molecular sciences*, 15, PP: 4464-4480.
- 35- Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., Berger, J., Greene, S. L., Nelson, M. N., Besharat, N., and Vymyslický, T., 2015. Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1(34), PP: 43-104.
- 36- Sobhanian, H., Razavizadeh, R., Nanjo, Y., Ehsanpour, A. A., Rastegar, Jazii, F., Motamed, N., and Komatsu, S., 2010. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyle and roots under salt stress. *Proteome science*, 8, 19 p.
- 37- Somogyi M., 1952. Notes on sugar determination. *Journal of biological chemistry*, 195:19-23.
- 38- Türkan, İ., Bor, M., Özdemir, F., and Koca, H., 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L., subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 31(168), PP: 223-31.
- 39- Westbrook, J. A., Yan, J. X., Wait, R., Welson, S. Y., and Dunn, M. J., 2001. Zooming-in on the proteome: Very narrow-range immobilised pH gradients reveal more protein species and isoforms. *Electrophoresis*, 1(22), PP: 2865-71.
- 40- Zhou, X. J., Liang, Y., Chen, H., Shen, S. H., and Jing, Y. X., 2006. Effects of rhizobia inoculation and nitrogen fertilization on photosynthetic physiology of soybean. *Photosynthetica*, 1(44), PP: 530-535.

## The effects of *NARK* gene and nitrogen on growth and leaf protein profile of wild-type and supernodulation mutant of soybean

Mashayekhi M.<sup>1</sup>, Mirzaei S.<sup>1</sup>, Maleki M.<sup>1</sup> and Mozafari H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Biothecnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Dept. of Ecology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

### Abstract

Nitrogen is one of the most important elements required by plants. Legume crops are of great significance because they can use nitrogen from the atmosphere through biological nitrogen fixation. In the current study, effects of *NARK* gene and different nitrogen treatments on growth, physiological parameters and protein profile of soybean leaf of supernodulation mutant and wild-type were investigated. For this, a factorial experiment in a completely randomized design with three replications was conducted under greenhouse conditions. Experiment factors included two levels of ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) and two levels of nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) for three types of soybean (sterile, wild-type and supernodulating mutant). Results of variance analysis revealed that the treatment of ammonium plus nitrate in comparison with other treatments had the greatest effect on soybean plants in terms of morphological and biochemical parameters. Two-dimensional electrophoresis also showed that sterile plants under 5mM ammonium sulfate treatment had higher protein variation in leaf compared with the soybean wild-type plants inoculated with rhizobia (non-recipient of mineral nitrogen). This variation in the leaf protein profile of plants could be due to type of nitrogen they receive (mineral nitrogen/biological nitrogen fixation). In addition, the protein variation could be due to alteration in genes expression because of symbiosis in inoculated plants with rhizobia. Traits such as chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoids, and reduced sugar content, had the highest amount under the ammonium plus nitrate and 5mM ammonium treatments and the lowest amount in control plants.

**Key words:** Biological nitrogen fixation, *NARK*, Soybean, protein profile, nodulation