

Comparative Analysis of Nodulation and Gene Expression in Different Chickpea Genotypes Following Inoculation with *Mesorhizobium ciceri*

Shabnam Kokei¹, Bahman Bahramnejad^{2*} , Ghader Mirzaghaderi³

1. Ph.D. Student, Agriculture biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

2. Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

3. Professor, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

Correspondence:

Bahman Bahramnejad

Email: b.bahramnejad@uok.ac.ir

Received: 16, Apr. 2025

Accepted: 19, Nov. 2025

How to cite:

Kokei, Sh., Bahramnejad, B., & Mirzaghaderi, Gh. (2025). Comparative Analysis of Nodulation and Gene Expression in Different Chickpea Genotypes Following Inoculation with *Mesorhizobium ciceri*. *Crop Biotechnology*, 15 (1), 11-27.

(DOI: [10.30473/cb.2025.74301.2007](https://doi.org/10.30473/cb.2025.74301.2007))

ABSTRACT

In this study, nodulation capacity and physiological traits were evaluated in ten chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes following inoculation with *Mesorhizobium ciceri*. After comparing traits such as nodule number, nodule weight, total fresh weight, total dry weight, stem dry weight, root dry weight, stem length, and root length, two genotypes (Bionij and Pirooz) were selected for further investigation as the most and least efficient in symbiosis, respectively. Flavonoids play a crucial role as initial signaling molecules in the symbiotic interaction between legumes and nitrogen-fixing bacteria. Subsequently, the quantitative expression of the *Isoflavone 4'-O-methyltransferase* gene, involved in the isoflavonoid biosynthesis pathway, was assessed in the two chickpea genotypes (Bionij and Pirooz) at three time points post-inoculation (36 hours, 10 days, and 28 days) using Real-Time PCR. The results indicated a significant upregulation of this gene in both genotypes, particularly at 36 hours post-inoculation. This increase was more pronounced in the Bionij genotype. Leaf chlorophyll content and nitrogen levels in nodules and roots were measured in both treated and control plants. Data revealed that treated plants exhibited significantly higher levels of chlorophyll and nitrogen, with Bionij outperforming Pirooz in both parameters. These findings suggest that higher expression of this gene may be associated with enhanced nodulation capacity, improved symbiosis, and increased nitrogen uptake in chickpea.

KEYWORDS

Cicer arietinum L, Gene Expression, Isoflavonoid, *Mesorhizobium ciceri*, Nodulation, Symbiosis.



«مقاله پژوهشی»

بررسی مقایسه‌ای گره‌زایی و بیان ژن در ژنوتیپ‌های مختلف نخود پس از تلقیح با *Mesorhizobium ciceri*

شبنم کوکه‌ای^۱، بهمن بهرام‌نژاد^{۲*} , قادر میرزاقدری^۳

چکیده

در این پژوهش، توان گره‌زایی و صفات فیزیولوژیکی در ده رقم نخود (*Cicer arietinum*) پس از تلقیح با باکتری *Mesorhizobium ciceri* مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از مقایسه‌ی شاخص‌هایی مانند تعداد گره، وزن گره، وزن تر کل گیاه، وزن خشک - ک کل گیاه، وزن خشک س - لاقه، وزن خشک ریشه، طول ساقه، طول ریشه، دو رقم بیونیج و پیروز، به‌ترتیب به‌عنوان ژنوتیپ‌های با همزیستی قوی‌تر و ضعیف‌تر، برای بررسی‌های دقیق‌تر انتخاب شدند. فلاونوئیدها به‌عنوان مولکول‌های سیگنالی اولیه در فرآیند همزیستی لگوم‌ها با باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن نقش مهمی ایفا می‌کنند. در ادامه‌ی این پژوهش، بیان کمی ژن *Isoflavone 4'-O-methyltransferase* که در مسیر سنتز ایزوفلاونوئیدها نقش دارد، در دو رقم نخود (بیونیج و پیروز) در سه زمان مختلف پس از تلقیح (۳۶ ساعت، ۱۰ روز، و ۲۸ روز) با روش Real-Time PCR ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بیان این ژن در هر دو رقم، به‌ویژه در مرحله ۳۶ ساعت پس از تلقیح، به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. این افزایش بیان ژن در رقم بیونیج چشم‌گیرتر بود. میزان کلروفیل برگ و نیتروژن گره و ریشه در هر دو گیاه شاهد و تیمار اندازه‌گیری شد. داده‌ها نشان دادند که در گیاهان تیمار شده، میزان کلروفیل و نیتروژن به‌طور چشمگیری بالاتر از شاهد بود و رقم بیونیج، مقدار نیتروژن و کلروفیل بیش‌تری را نسبت به پیروز داشت. این یافته‌ها نشان می‌دهند که بیان بیشتر ژن مذکور می‌تواند با افزایش توان گره‌زایی، بهبود همزیستی و جذب نیتروژن در نخود مرتبط باشد.

واژه‌های کلیدی

Cicer arietinum L., *Mesorhizobium ciceri*, ایزوفلاونوئید، بیان ژن، گره‌زایی، همزیستی

۱. دانشجوی دکتری، بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۲. دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۳. استاد، گروه ژنتیک و به‌نژادی دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

نویسنده مسئول:

بهمن بهرام‌نژاد

رایانامه: b.bahramnejad@uok.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۲۸

استناد به این مقاله:

کوک‌های، شبنم؛ بهرام‌نژاد، بهمن و میرزاقدری، قادر (۱۴۰۴). بررسی مقایسه‌ای گره‌زایی و بیان ژن در ژنوتیپ‌های مختلف نخود پس از تلقیح با *Mesorhizobium ciceri* فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۵ (۱)، ۱۱-۲۷.
(DOI: [10.30473/cb.2025.74301.2007](https://doi.org/10.30473/cb.2025.74301.2007))

مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.) یکی از مهم‌ترین حبوبات غذایی جهان است و به‌عنوان منبع پروتئین در تغذیه انسان و هم‌چنین خوراک دام، مورد استفاده قرار می‌گیرد. نخود شامل دو نوع دسی و کابلی می‌باشد. نوع دسی به صورت دانه‌های نسبتاً کوچک زاویه‌دار با رنگ‌های متنوع و گاهی خال‌دار می‌باشد در حالی که نوع کابلی، دارای دانه‌هایی با اندازه بزرگتر، صاف‌تر و رنگ روشن‌تر هستند (Merga & Haji, 2019).

نخود از نظر سطح زیرکشت، همواره جزو سه حبوبات اول جهان محسوب می‌شود و در سطحی بالغ بر ۱۱ میلیون هکتار کشت می‌گردد (Yadav et al., 2007). علیرغم تشکیل رابطه‌ی همزیستی عملکردی بین نخود و گو نه‌ی *Mesorhizobium ciceri*، تثبیت نیتروژن در این گیاه، نسبت به سایر حبوبات محدود است. مطالعات نشان می‌دهد که همزیستی بین نخود و *M. ciceri* فقط نیتروژن مورد نیاز و کافی را جهت افزایش رشد گیاه تثبیت می‌نماید، و تأثیری بر غلظت نیتروژن خاک پس از برداشت ندارد و باعث افزایش غلظت نیتروژن در خاک نمی‌گردد (Gan et al., 2010). همچنین، فاکتورهایی نظیر رقابت بین سویه‌های رایزوبیوم، رطوبت، pH و کیفیت خاک می‌توانند بر این همزیستی تأثیر بگذارند (Greenlon et al., 2019). بنابراین، درک بهتر عواملی که می‌توانند کیفیت و بهره‌وری این ارتباط همزیستی را افزایش دهند، برای کشاورزی پایدار اهمیت فراوانی دارد. در میان عوامل موثر، ژنوتیپ گیاه نقش تعیین‌کننده‌ای در گره‌زایی و تثبیت نیتروژن دارد. درک تأثیر ژنوتیپ بر گره‌زایی و تثبیت نیتروژن در گیاه نخود برای به حداکثر رساندن بهره‌ی تثبیت نیتروژن و کاهش مصرف کودهای نیتروژنی حائز اهمیت است. متأسفانه، پژوهش‌های محدودی به مقایسه چندین ژنوتیپ نخود در مقیاس وسیع پرداخته‌اند (Dwivedi et al., 2015).

هدف اصلی این مطالعه، مقایسه سیستماتیک ۱۰ ژنوتیپ نخود از نظر ظرفیت گره‌زایی پس از تلقیح با *Mesorhizobium ciceri*، بررسی بیان ژن *Isoflavone 4'-O-methyltransferase* به عنوان یکی از ژن‌های مهم دخیل در مسیر همزیستی، به طور خاص در دو رقم منتخب،

می‌باشد تا ارتباط بین بیان این ژن و توانایی گره‌زایی مورد ارزیابی قرار گیرد. این پژوهش سعی دارد با ترکیب داده‌های فیزیولوژیکی و مولکولی، درک عمیق‌تری از تعامل همزیستی در نخود ارائه دهد و به شناسایی ژنوتیپ‌های برتر در نخود کمک کند.

پیشینه پژوهش

تولید و سودآوری محصول نخود هر ساله توسط طیف وسیعی از بیماری‌های ریشه، از جمله پوسیدگی ریشه فیتوفترا (PRR؛ ناشی از *Phytophthora medicaginis*) و پژمردگی فوزاریوم (FW، ناشی از *Fusarium oxysporum f.sp.ciceris*)، محدود گشته و کاهش پیدا می‌کند. اگرچه اصلاح ارقام مقاوم، یکی از راهکارهای مهم برای مقابله با این بیماری‌ها می‌باشد، اما پژوهش‌ها نشان داده‌اند که گره‌زایی و تثبیت نیتروژن در نخود به‌شدت تحت تأثیر ژنوتیپ گیاه قرار دارد (Ferguson et al., 2019). این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از افزایش فرآیندهای دفاعی عمومی گونه‌های نسبتاً مقاوم باشد که به‌طور ناخواسته، همزیستی متقابل را نیز به‌خطر می‌اندازد (Plett et al., 2016). در مطالعه‌ای، بررسی ۲۹ ژنوتیپ مختلف نخود نشان داد که تعداد گره‌ها و عملکرد تثبیت نیتروژن بین ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری از خود نشان می‌دهند برای مثال، ارقامی مانند Yorker و Moti گره‌زایی بسیار بیشتری نسبت به ژنوتیپی مانند PBA HatTrick داشتند. جالب آن‌که این تفاوت‌ها همواره با سطح مقاومت به بیماری‌های ریشه هم‌بستگی نداشتند. بنابراین بررسی عملکرد همزیستی رایزوبیومی در ژنوتیپ‌های مختلف نخود، به‌ویژه آن‌هایی که توان بالاتری در گره‌زایی دارند، برای اصلاح ارقام برتر اهمیت زیادی داشته و نیاز به بررسی بیشتر دارند (Plett et al., 2021).

تا همین اواخر، ابزارهای ژنتیکی کافی جهت درک مولکولی گره‌زایی در نخود، در دسترس نبود، اما انتشار ژنوم کامل و توالی‌یابی مجدد ۲۹ ژنوم نخود، توانست شناسایی ژن‌های مرتبط با گره‌زایی را تسهیل کند و به درک چگونگی تعامل ژن‌ها در مسیرهای مقاومت به بیماری، درک نیتروژن و انتقال کمک نماید (Roorkiwal et al., 2020). مراحل

اولیه تشکیل گره در حبوبات مدل مانند *Medicago truncatula* و *Lotus japonicus* به‌خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است (Nandety et al., 2023). در این سیستم‌ها، مدل کلی بدین صورت است که با درک رایزوبیا، متابولیت‌های ثانویه گیاهی (ترکیبات فلاوونوئیدی) ترشح شده توسط ریشه‌ی میزبان و جذب آن‌ها توسط رایزوبیا، منجر به تولید فاکتورهای Nod باکتریایی می‌شود (Gifford et al., 2018). این سیگنال‌های باکتریایی توسط گیرنده‌های شبیه به کینازی LysM^۱ گیاه میزبان، درک می‌شوند و یک آبشار سیگنالینگ در ریشه گیاه به نام مسیر سیگنالینگ همزیستی^۲ (CSSP) و مسیرهای هورمون گیاهی از جمله سیتوکینین و اکسین را القا می‌کند (Buhian & Bensmihen, 2018). وقفه در این مراحل سیگنالینگ می‌تواند کارایی گره‌زایی را کاهش دهد یا آن را به‌طور کلی متوقف نماید. حبوبات هم‌چنین دارای یک حلقه سیگنالی بازخوردی^۳ برای کنترل گره‌زایی هستند، چرا که افزایش تعداد گره‌ها ممکن است نیتروژن گیاه میزبان را بهبود بخشد، با این حال تعداد بیش از حد گره‌ها، به دلیل هزینه‌های انرژی گیاه برای تشکیل و نگهداری گره، بر سلامت گیاه تأثیر منفی می‌گذارد (Ferguson et al., 2019).

ایزوفلاوونوئیدها به‌عنوان ترکیبات فیتوکیماکال گیاهی شناخته می‌شوند. این ترکیبات، به‌ویژه ایزوفلاوونوئیدهای متیله شده، نقش مهمی در مقاومت گیاهان به استرس‌های محیطی، بیماری‌ها و آفات ایفا می‌کنند. در گیاهان لگوم مانند نخود (*Cicer arietinum*)، ایزوفلاوونوئیدها در دفاع گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و القای بیان ژن nod جهت جذب شیمیایی رایزوبیوم، نقش اساسی دارند. هم‌چنین ایزوفلاوونوئیدها به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی، برای انسان‌ها نیز مفید می‌باشند (Wang et al., 2018).

ایزوفلاون^۴-O-متیل ترانسفراز^۴ (I4'OMT) یک آنزیم از خانواده O-methyltransferases (OMTs) می‌باشد که کاتالیز انتقال گروه متیل از S-آدنوزیل-آل-

متیونین (SAM) به گروه هیدروکسی در موقعیت^۴ مولکول‌های ایزوفلاون‌ها را برعهده دارد. این واکنش، یک مرحله‌ی مهم در بیوسنتز ایزوفلاوونوئیدهای متیله شده، مانند^۴-متیوکسی ایزوفلاون‌ها (که در برخی گیاهان مانند نخود یافت می‌شوند)، است (Deavours et al., 2006). آنزیم I4'OMT دارای وزن مولکولی ۳۰ تا ۵۰ کیلو دالتون است. این آنزیم نقش مهمی در متیلاسیون ایزوفلاوونوئیدهای کلیدی مانند daidzein و genistein دارد، که این ترکیبات متیله شده به‌عنوان سیگنال‌های شیمیایی در جذب و تحریک باکتری‌های رایزوبیوم عمل می‌کنند. با ترشح این ایزوفلاوونوئیدها توسط ریشه‌های نخود، رایزوبیوم به سمت ریشه هدایت شده و باعث رشد و تکامل گره‌های ریشه‌ای می‌شود که برای تثبیت نیتروژن ضروری هستند (Silva et al., 2024). این همزیستی باعث می‌شود که گیاه نخود نیاز کمتری به استفاده از کودهای نیتروژنی سنتتیک داشته باشد. بهبود و افزایش بیان ژن I4'OMT می‌تواند باعث افزایش همزیستی موفق‌تر گیاه لگوم با رایزوبیوم، بهبود مقابله گیاه با بیماری‌ها و استرس‌های محیطی و افزایش تثبیت نیتروژن شود که در نهایت به ارتقاء عملکرد و کیفیت محصول کشاورزی می‌انجامد.

در این تحقیق، به منظور بررسی نقش ژنوتیپ نخود در تعامل با رایزوبیوم تلقیح شده و افزایش عملکرد همزیستی، ۱۰ رقم نخود تحت شرایط کنترل شده مورد مطالعه قرار گرفتند. ابتدا تأثیر ژنوتیپ‌ها بر صفات فیزیولوژیکی گیاه بررسی شد و سپس بهترین و ضعیف‌ترین رقم از نظر همزیستی با *Mesorhizobium ciceri* انتخاب و نقش بیان ژن I4'OMT و تثبیت نیتروژن در آن‌ها مورد ارزیابی دقیق‌تر قرار گرفت.

روش‌شناسی پژوهش

مطالعه بیوانفورماتیکی ژن I4'OMT در نخود

شماره دسترسی ژن I4'OMT و توالی آمینواسیدی آن در گیاه نخود با استفاده از پایگاه داده NCBI به دست آمد.

^۱ Feedback signalling loop

^۲ Isoflavone 4'-O-Methyltransferase

^۳ LysM receptor-like kinases

^۴ Common Symbiosis Signalling Pathway (CSSP)

این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی و گلخانه دانشگاه کردستان انجام گرفت. در این تحقیق باکتری *M. ciceri* از موسسه تحقیقات خاک و آب ایران تهیه گردید. به منظور تکثیر و نگهداری رایزوبیوم از محیط کشت Yeast Manitol Agar استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون رایزوبیومی به عنوان مایه تلقیح، یک کلون رشد یافته روی محیط جامد به محیط YMA فاقد آگار منتقل گردید. بعد از گذشت ۴ تا ۵ روز، سلول‌های رایزوبیوم رشد یافته و به غلظت مورد نظر برای تلقیح (10^9 سلول در هر میلی لیتر) رسیدند. برای اطمینان از رشد باکتری و تعیین غلظت مناسب جهت تلقیح، جذب سوسپانسیون رایزوبیومی در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد که حدود ۱ بود.

برای انتخاب ژنوتیپ‌ها، ده ژنوتیپ مختلف خود که تنوع ژنتیکی مناسبی داشتند (شامل ژنوتیپ‌های مورد استفاده در آزمایش گلخانه‌ای و دیگر واریته‌های مرجع) انتخاب شدند. رقم‌های مختلف خود شامل بیونج، Selq St، آرمان، گوکسو، ILC، منصور، سعید، پیروز، آنا و کاکا با باکتری *M. ciceri* تلقیح شدند و پایان دوره رشد، صفاتی مانند تعداد گره، وزن گره، وزن تر کل گیاه، وزن خشک کل گیاه، وزن خشک ساقه، وزن خشک ریشه، طول ساقه، طول ریشه، در هر گلدان اندازه‌گیری شد.

بدین منظور سطح خارجی رقم‌های مختلف بذر خود با اتانول ۷۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی شدند. پس از شست‌شو با آب مقطر، بذرهای استریل شده در سوسپانسیون باکتریایی *M. ciceri* غوطه‌ور شده و سپس در سه تکرار در گلدان‌هایی شامل خاک مزرعه، ماسه و پرلایت استریل و اتوکلا شده کشت شدند. گلدان‌ها، روزانه با محلول غذایی هوگلند فاقد نیتروژن آبیاری گردید. بعد از گذشت ۶ روز گیاهچه‌ها با سوسپانسیون رایزوبیوم تلقیح شدند. سوسپانسیون به پایه ساقه هر گیاهچه اضافه گردید. گیاهان در شرایط محیطی کنترل شده با سیکل نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۷۰٪ در طول دوره رشد در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان نگهداری شدند و در هفته ششم کشت، برداشت شده و وزن و تعداد گره‌ها در هر

از پایگاه داده (<http://pfam.xfam.org>) دامین‌های پروتئینی مربوط به توالی‌های ژن *I4'OMT* به دست آمد. از پایگاه داده (<http://ca.expasy.org/tools/protp>) (aram.html) ویژگی‌های شیمیایی پروتئین‌ها شامل نقطه ایزوالکتریک، وزن مولکولی تعیین شد.

موتیف‌های حفظ شده این توالی‌ها با استفاده از سایت موتیف (MEME, <http://meme-suite.org>) با پارامترهای حداکثر ۱۰ موتیف، طول موتیف بین ۶ تا ۵۰ نوکلئوتید، تعداد موتیف تکرار شونده در هر توالی zero یا one، شناسایی شد و مکان فیزیکی این ژن بر روی کروموزوم‌های نخود از سایت mg2c.iask.in مشخص گردید.

برای پیش‌بینی ساختارهای اگزون-اینترون از سایت Gene structure display server استفاده شد. همچنین با استفاده از سایت www.sbg.bio.ic.ac.uk ساختار و شکل سه بعدی ژن مدنظر تعیین گردید.

آنالیز بیان ژن *I4'OMT* دخیل در مسیر سنتز فلاوونوئیدها با استفاده از داده‌های RNA-seq

داده‌های RNA-seq مربوط به پروژه PRJNA214031 انجام گرفته در ریشه و گره گیاه نخود با استفاده از نرم‌افزار [sra toolkit](http://sratoolkit.ncbi.nlm.nih.gov/) از سایت NCBI دانلود شد. این مجموعه شامل ۵ نمونه از ریشه و گره نخود در شرایط مختلف (شاهد، تلقیح‌شده در مراحل مختلف رشد) است. ماتریس‌های شمارش بیان ژن برای بافت‌ها و مراحل رشدی و در پاسخ به گره‌زایی، با استفاده از ابزارهایی چون Hisat2 و Htseq در لینوکس به دست آمد که در آن تنظیمات به صورت: stranded=no--mode= intersection--t exon nonempty تعریف شد. نتایج حاصل با استفاده از بسته‌های DESeq2 نرمال شد و با استفاده از بسته‌های به صورت گرافیکی به نمایش درآمد. برای تجزیه و تحلیل بیان افتراقی ژن *I4'OMT* log2 fold change ریشه نخود تلقیح‌شده با *Mesorhizobium ciceri* و ریشه‌ی شاهد (تلقیح نشده) محاسبه شد. با استفاده از Benjamini-Hochberg FDR، p-values تصحیح گردید.

مواد گیاهی و شرایط رشد

در سطح (۵ در صد) صورت گرفت. برای رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده شد.

تهیه اسلاید میکروسکوپی

گره‌ها با تیغ استریل در مقیاس میلی‌متری برش عرضی و طولی داده شد. قطعات برش داده شده در هیپوکلرید سدیم یک درصد به مدت ۳ دقیقه قرار داده شد. بعد از گذشت مدت زمان مد نظر، هیپوکلرید سدیم دور ریخته شده و قطعات برش خورده با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس چند قطره رنگ متیل گرین به نمونه‌ها اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه در رنگ، نگه داشته شدند. نمونه‌ها با آب شستشو داده شده و در زیر میکروسکوپ نوری مدل OLYMPUS (BX52) مشاهده و بررسی شدند.

بررسی بیان ژن *I4'OMT*

بذر رقم‌های کاندید (بیونج و پیروز)، بعد از ضدعفونی و تلقیح با *M. ciceri* به خاک منتقل شد. از ریشه‌های آلوده، در بازه‌های زمانی 6HPI، 10DPI و 28 DPI نمونه‌گیری انجام گرفت. از تیمار شاهد نیز نمونه‌گیری به عمل آمد. ریشه‌های آلوده نشده (بدون گره) به عنوان بافت کنترل استفاده شد (Jahan et al., 2020). RNA کل با استفاده از روش استخراج LiCl (Choudhary et al., 2009). آن‌جا که RNA استخراج شده ممکن است دارای آلودگی DNA باشد، قبل از انجام Quantitative real time PCR از آنزیم DNase استفاده گردید. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت و پس از استخراج RNA، cDNA سنتز شد. برای بررسی بیان *I4'OMT* دخیل در مسیر سنتز فلاوونوئیدها، از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده براساس قسمت‌های کد کننده ژن (CDS) استفاده شد. طراحی آغازگرها به کمک نرم افزار تحت وب Primer3plus انجام گرفت. از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد (جدول ۱). بیان کمی ژن‌ها به روش RT-PCR و با استفاده از مسترمیکس Fast SYBR Green بررسی شد (Kant et al., 2016). برنامه‌ی حرارتی طبق جدول (۲) به دستگاه داده شد. میزان تغییرات بیان ژن‌ها، با استفاده از فرمول ($2^{-\Delta\Delta CT}$) محاسبه گردید. کل آزمایش رشد گیاه و تیمار با باکتری *M. ciceri* سه بار

گیاه شمارش گردید. سپس بخش‌های ساقه، ریشه و جدا شدند و برای اندازه‌گیری وزن خشک، به مدت ۷۲ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و خشک شدند. وزن خشک نمونه‌ها اندازه‌گیری شد و بر مبنای صفات اندازه‌گیری شده (تعداد گره)، یک رقم نخود با بهترین همزیستی و یک رقم نخود با کم‌ترین میزان همزیستی با باکتری مزورایزوبیوم انتخاب و برای انجام مرحله دوم آزمایش استفاده گردید.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و تجزیه واریانس‌ها با استفاده از ANOVA در سطح یک درصد ($P \leq 0.01$) انجام گرفت.

در مرحله دوم آزمایش، دو رقم نخود انتخاب‌شده از مرحله اول آزمایش با مزورایزوبیوم تلقیح شد. به مدت ۶ هفته در شرایط کنترل شده که در بالا اشاره شد، کشت داده شدند. در زمان‌های ۳۶ ساعت، ۱۰ روز و ۲۸ روز پس از تلقیح، از ریشه و گره نخود نمونه‌برداری شد و در ازت مایع منجمد و برای مطالعات بیشتر به فریز -۸۰ منتقل گردیدند.

اندازه‌گیری میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی

برای سنجش میزان کلروفیل و کارتنوئید از روش Lichtenthaler (۱۹۸۹) استفاده شد. میزان کلروفیل‌ها و کارتنوئید توسط طیف سنج نوری در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳، ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. میزان کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b، کارتنوئید بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ محاسبه گردید (Lichtenthaler, 1987). آنالیز داده‌ها و مقایسات آماری توسط نرم افزار SAS انجام شد و رسم نمودارها به وسیله Excel 2019 انجام شد.

اندازه‌گیری میزان پروتئین

برای اندازه‌گیری مقدار کل پروتئین ریشه‌ی دو رقم بیونج و پیروز (بافت گره به عنوان تیمار و ریشه آلوده نشده به عنوان کنترل)، از روش کج‌لدار استفاده شد (Ballard & Charman, 2000). جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SAS استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون Lsd

برای تولید سه تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکی انجام گرفت.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده

Table 1. Primers used in this study

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)	طول قطعه تکثیرشده (جفت باز)
IF4A-F	ATCTTTGAAACTCCACCTTCT	۶۱	۱۱۸
IF4A-R	TTCTCCTTCTCCACCTTCTTG		
GAPDH-F	TGTCTCAGTTGTTGACCTTACAG	۶۰.۱	۱۵۸
GAPDH-R	CGACTTCATTGGTGATACTAGGT		

جدول ۲. چرخه دمایی واکنش Real time PCR

Table 2. Reaction temperature cycle in Real time PCR

تعداد چرخه	مرحله	زمان	دما (°C)
۱	واسرشت اولیه	۳ دقیقه	۹۵
۴۰	واسرشت سازی	۲۰ ثانیه	۹۵
	اتصال	۳۰ ثانیه	۶۲-۵۹
	گسترش	۱۵ ثانیه	۷۲
۱	ذوب	۵ دقیقه	۹۵-۷۰

یافته های پژوهش

بیوانفورماتیک

در شکل (۱-A)، دمین های آنزیم نشان داده شده است. این آنزیم از دو دمین Dimerisation و Methyltransf_2 تشکیل شده است. دمین Dimerisation، در موقعیت ۳۱-۷۹ قرار گرفته است. این دمین در ناحیه N ترمینال تعدادی از آنزیم های O-methyltransferase گیاهی یافت می شود و موجب دایمر شدن این پروتئین ها می شود. دمین Methyltransf_2، در موقعیت ۱۲۴-۳۵۲ قرار داشته و در آنزیم های O-methyltransferase ها وجود دارد که برخی از آنها از S-adenosyl methionine به عنوان سوسترای خود استفاده می کنند. شکل (۱-B)، نشان دهنده موتیف های محافظت شده در توالی آنزیم I4'OMT است. موتیف های محافظت شده شناسایی شده بر اساس پایگاه های داده PROSITE و InterPro عبارتند از: otif 1: PS00079

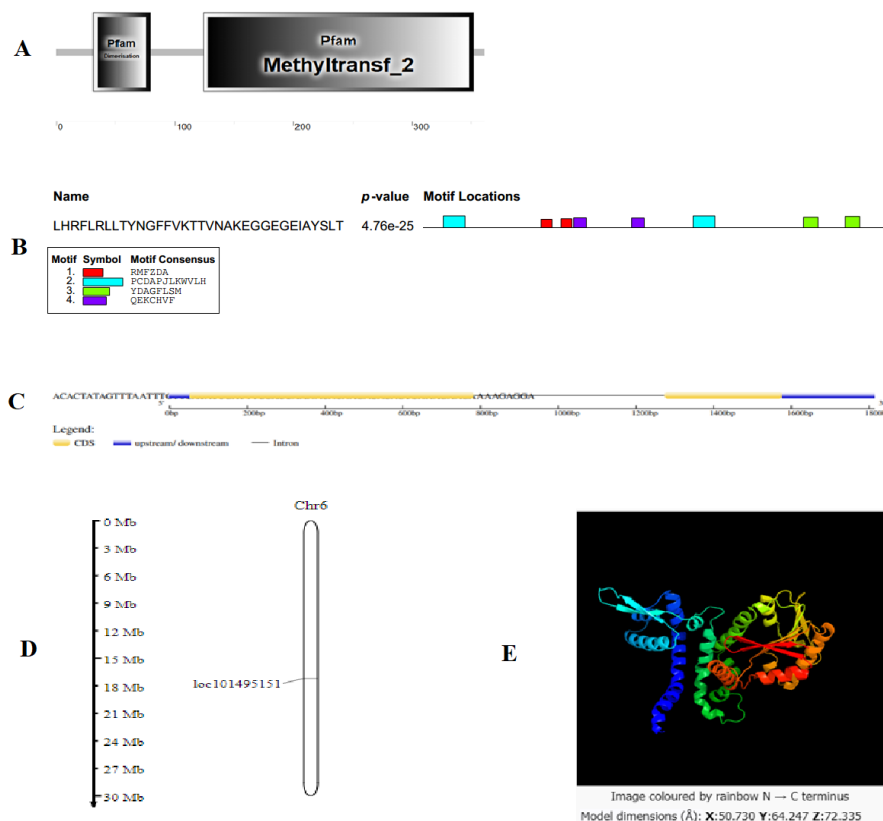
Motif 2: (Methyltransferase domain) IPR000618 (S-adenosyl-L-(methionine-dependent methyltransferase). این موتیف ها در فرآیند اتصال به سوسترها نقش دارند و ممکن است در عملکرد و پایداری ساختاری این ژن تاثیرگذار باشند. شکل (۱-C)، نواحی کد کننده و اینترون های ژن I4'OMT نشان می دهد. این ژن دارای دو اگزون و یک اینترون می باشد. قسمت های آبی رنگ بیانگر نواحی بالادست و پایین دست ژن مدنظر هستند.

شکل (۱-D)، بیانگر محل قرارگیری ژن I4'OMT در کروموزوم می باشد. نتایج نشان می دهد که ژن مذکور روی کروموزوم شماره شش گیاه نخود قرار گرفته است. با استفاده از سرور Phyre2.2 ساختار و شکل سه بعدی ژن مدنظر تعیین گردید. شکل (۱-E)، مدل سه بعدی پروتئین I4'OMT را نشان می دهد و ساختار فضایی آن را مشخص کرده است. در این مدل، ساختار پروتئین به طور واضح نمایان است و نواحی مختلف آن با رنگ های مختلف مشخص شده اند. این ساختار فضایی به درک بهتر

مقدار هیدروپاسیتی نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که این پروتئین تمایل بیشتری به هیدروفیلیک بودن دارد (یعنی بیشتر در محیط‌های آبی پایدار است).

نحوه‌ی عملکرد پروتئین در فرآیندهای بیولوژیکی کمک می‌کند.

در جدول (۳)، ویژگی‌های شیمیایی پروتئین شامل طول اسیدآمینه، وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک و



شکل ۱. آنالیز بیوانفورماتیکی ژن و پروتئین *Isoflavone 4'-O-methyltransferase* در نخود.

(A) دمین‌های آنزیم *I4'OMT*; (B) موتیف‌های آنزیم *I4'OMT*; (C) ساختار ژن *I4'OMT*; (D) جایگاه ژن *I4'OMT* روی کروموزوم‌ها، (E) ساختار فضایی و سه بعدی پیش‌بینی‌شده پروتئین.

Figure 1. Bioinformatic analysis of the *Isoflavone 4'-O-methyltransferase (I4'OMT)* gene and protein in chickpea.

A) Enzyme domains of *I4'OMT*; B) Conserved motifs of *I4'OMT*; C) Gene structure of *I4'OMT*; D) Chromosomal location of the *I4'OMT* gene; E) Predicted three-dimensional structure of the *I4'OMT* protein.

جدول ۳. ویژگی شیمیایی پروتئین *Isoflavone 4'-O-methyltransferase* در نخود

Table 3. Physicochemical properties of the *Isoflavone 4'-O-methyltransferase (I4'OMT)* protein in chickpea.

Protein ID	GeneID:	Gene name	AA length	MW(kDa)	pI	Gravity c
XP_004505107	101495151	isoflavone 4'-O-methyltransferase	361	40353.07	5.38	-0.225

Heatmap بیان ژن‌های مختلف در گیاه نخود را نشان می‌دهد که در شرایط تیمار با باکتری ریزوبیوم و در مقایسه با گیاه شاهد ارزیابی شده است. نتایج نشان می‌دهد که بیان ژن *I4'OMT* در گیاه نخود تیمار شده با

تجزیه و تحلیل بیان ژن *I4'OMT* با استفاده از داده‌های RNA-seq

نتایج حاصل از آنالیز *insilico* بیان ژن *I4'OMT* در شکل (۲) نشان داده شده است. شکل ۲ نقشه‌ی

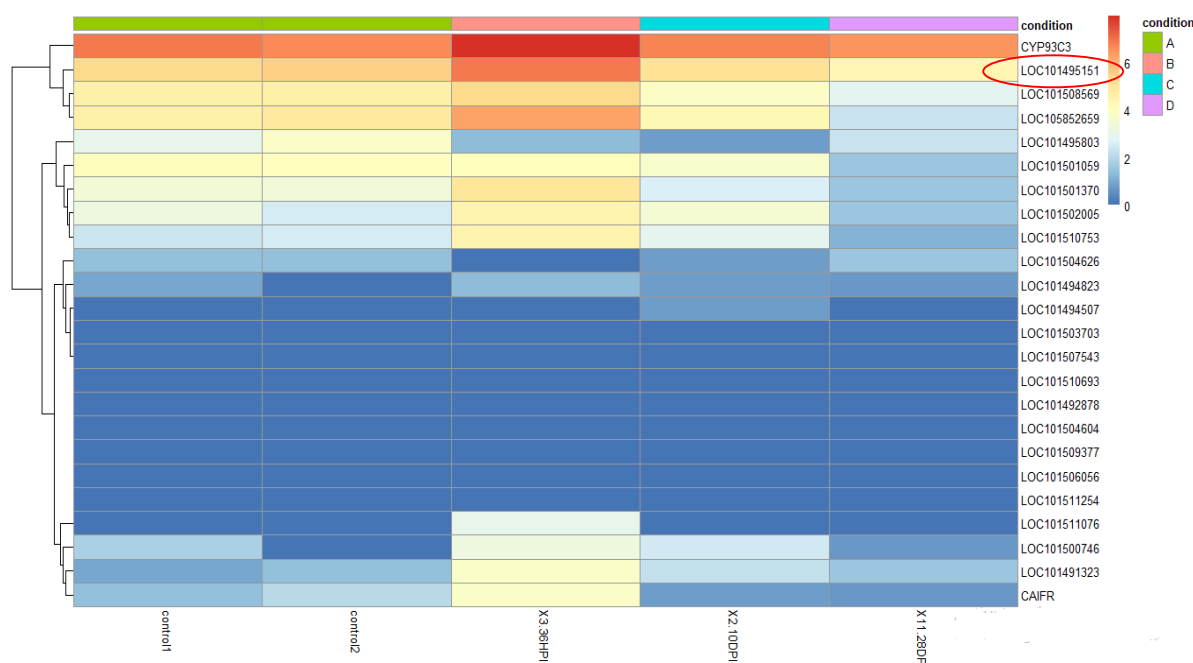
نشان می‌دهند (3C). هرچه سلول‌ها به سمت مرستم نزدیک‌تر شوند، کوچک‌تر خواهند شد تا زمانی که دیگر سلول‌های منفرد دیگر قابل تشخیص نباشند. سلول‌های ناحیه‌ی Infection zone به‌دلیل کوچک‌تر بودن اندازه‌هایشان، بیشتر رنگ آمیزی شده و در تصویر میکروسکوپ نوری، متراکم‌تر به نظر می‌رسند. وجود باکتری در فضاهای داخل سلولی ریشه، نشان می‌دهد که باکتری‌ها با موفقیت توانسته‌اند به سلول‌های گره وارد شوند.

صفات فیزیولوژیکی اندازه‌گیری شده

در این مطالعه، اختلافات میانگین‌های صفات مختلف در ارقام مختلف با استفاده از ANOVA در سطح یک درصد ($P \leq 0.01$) انجام گرفت و از حروف برای نشان دادن معنی‌داری اختلافات استفاده شده است. مقایسه‌ی مقادیر میانگین تعداد گره، وزن گره، وزن تر کل گیاه، وزن خشک کل گیاه، وزن خشک ساقه، وزن خشک ریشه، طول ساقه، طول ریشه در رقم‌های نخود تلقیح شده با *M. ciceri* نشان داد که این میانگین‌ها در تمام رقم‌های نخود مورد بررسی در سطح ۱٪ متفاوت است (جدول ۴).

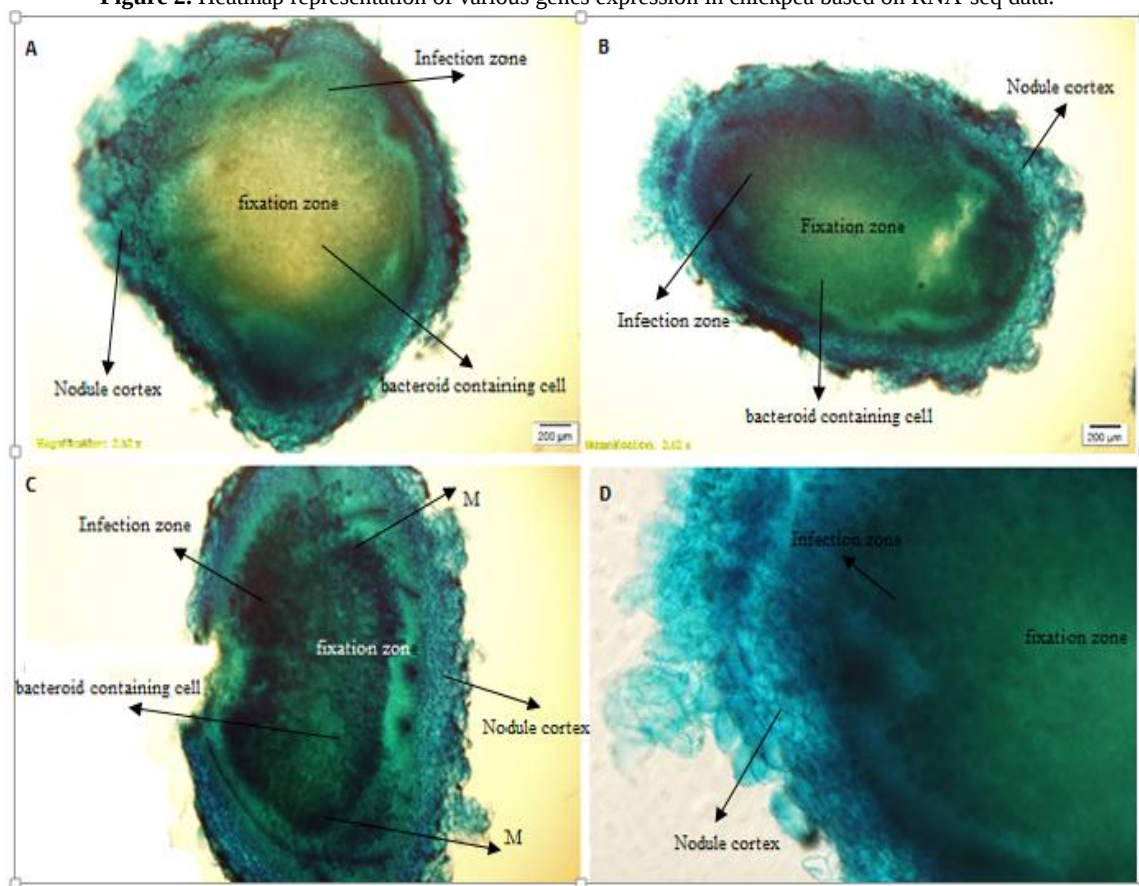
باکتری رایزوبیوم ۳۶ ساعت پس از تلقیح به‌طور قابل توجهی نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته است. ولی در زمان‌های ۲۸ و ۱۰ روز پس از تلقیح، تغییر معناداری نسبت به گیاه شاهد (کنترل) نشان نداده است. این تغییرات در نقشه Heatmap با رنگ‌های تیره‌تر که نمایانگر افزایش بیان ژن‌ها هستند، قابل مشاهده است. غلظت کم نیتروژن خاک باعث افزایش بیان و تجمع تعدادی از ایزوفلاونوئیدها مانند daidzein و genistein در خاک می‌شود که به‌عنوان مولکول‌های سیگنالی و جاذب باکتری خاکزی رایزوبیوم عمل می‌کنند. این افزایش بیان ژن *I4'OMT* در ساعات اولیه تلقیح با باکتری رایزوبیوم می‌تواند نشان‌دهنده برهمکنش مثبت گیاه نخود با رایزوبیوم باشد و اطلاعات بیشتری را در مورد مکانیزم‌های همزیستی این دو فراهم می‌کند.

شکل (۳)، تصویر میکروسکوپی نوری از یک برش بافت گره رنگ آمیزی شده با متیل گرین، را نشان می‌دهد. متیل گرین هسته و لیگنین دیواره سلولی را رنگ آمیزی می‌نماید. در شکل 3A, 3B, 3C, 3D، حلقه‌ی باکتریوئیدی در سلول‌های رنگ آمیزی شده در ناحیه تثبیت نیتروژن (Fixation zone) مشاهده می‌شود. گره‌ها یک مرستم دوتایی (m) را در جهات مخالف



شکل ۲. نقشه Heatmap بیان ژن‌های مختلف در گیاه نخود رسم شده با استفاده از داده‌های RNA-seq

Figure 2. Heatmap representation of various genes expression in chickpea based on RNA-seq data.



شکل ۳. تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ نوری از سلول‌های رنگ آمیزی شده با متیل گرین. سلول‌های منفرد حاوی باکتریوئید (ba) را می‌توان با حلقه‌های تیره داخل سلول‌ها، جایی که سلول‌های *M. ciceri* انباشته می‌شوند، تشخیص داد.

Figure 3. Light microscopy images of cells stained with methyl green. Individual cells containing bacterioids (ba) can be identified by dark rings within the cells, indicating the accumulation sites of *Mesorhizobium ciceri* cells.

آرمان با میانگین ۳۱۰۸,۶۹۷ کم‌ترین وزن را دارد. در صفت وزن خشک کل گیاه (میلی گرم)، رقم سعید با میانگین ۲۷۳۵,۷۵۹ بیش‌ترین وزن خشک کل را داشت و اختلاف معنی‌داری با ارقام دیگر نشان داد. در وزن خشک ساقه و برگ (میلی گرم)، رقم سعید با میانگین ۱۱۲۶,۹۳۱ بیش‌ترین وزن خشک و آرمان با میانگین ۲۵۸ کم‌ترین وزن خشک را نشان داد. در وزن خشک ریشه (میلی گرم)، رقم سعید و کاکا با میانگین‌های مشابه بیش‌ترین وزن خشک ریشه را داشتند. در صفت طول ساقه گیاه (سانتی‌متر)، رقم selq st با میانگین ۳۲ بیش‌ترین طول ساقه را داشت و رقم کاکا و پیروز کم‌ترین طول ساقه را نشان دادند و

در صفت تعداد گره‌ها در هر گیاه، رقم بیونج دارای بیش‌ترین تعداد گره‌ها با میانگین ۱۲۰ می‌باشد و اختلاف معنی‌داری با سایر ارقام دارد. ارقام پیروز و آرمان به ترتیب با میانگین‌های ۳۹ و ۴۲,۶۶۳، کم‌ترین تعداد گره‌ها را نشان دادند. در صفت وزن کل گره‌ها در هر بوته، رقم بیونج با میانگین ۱۸۰۷,۳۳۳ میلی گرم بیش‌ترین وزن را داشت که اختلاف معنی‌داری با ارقام دیگر داشت. در حالی که رقم پیروز با میانگین ۵۸۲,۳۹۳ کم‌ترین وزن گره‌ها را دارا می‌باشد. در صفت وزن کل تازه گیاه (میلی گرم)، رقم سعید با میانگین ۹۴۲۴,۵۵۴ دارای بیش‌ترین وزن کل تازه است و اختلاف معنی‌داری با ارقام دیگر دارد. در مقابل، رقم

از آن جایی که این دو رقم مذکور پایه کوتاه می‌باشند، (سانتی‌متر)، رقم بیونج و سعید با میانگین‌های مشابه این نتایج قابل توجه است. در طول ریشه گیاه جدول ۴. میانگین تعداد گره، وزن گره، وزن تر کل گیاه، وزن خشک کل گیاه، وزن خشک ریشه، طول ساقه، طول ریشه در رقم‌های نخود تلقیح شده با *M. ciceri* در سطح یک درصد ($P \leq 0.01$).

Table 4. Mean values of nodule number, nodule weight, total fresh weight, total dry weight, shoot dry weight, root dry weight, shoot length, and root length in chickpea cultivars inoculated with *Mesorhizobium ciceri*, with significance at the 1% level ($P \leq 0.01$).

Cultivar	Nodule number/plant	Nodule weight (mg FW)	Total Fresh Weight (mg FW/plant)	Total Dry Weight (mg DM/plant)	Shoot weight (mg DM/plant)	Root weight (mg DM/plant)	Shoot Length/Plant (cm)	Root Length/Plant (cm)
Bionij	120 a	1807.333 a	6170 bc	1402.641 bc	391.333 b	937 abc	26 bc	29 bc
Selq St	105.67 b	1761.352 a	7729 ab	1917.367 ab	847.801 ab	969.617 abc	32 a	36 a
Mansoor	90 c	1354 b	7786.412 ab	2137 ab	823 ab	1241.745 ab	26.974 bc	34.208 a
Saeed	89.65 c	1361 b	9424.554 a	2735.759 a	1126.931 a	1539.625 a	23 cd	36.423 a
ILC	88 cd	1178.667 b	6628 b	1593 bc	598.302 ab	931.377 abc	20 de	32.333ab
Kaka	78 de	1238.325 b	8468.876 ab	2278 ab	792.32 ab	1422.441 a	16 f	32 ab
Ana	74.547 e	888 c	7021 abc	2580 abc	1075.635 a	1417.601 a	21 de	32.036 ab
Goksoo	61 f	767.487 d	5316 cd	1132.771 cd	373.666 b	707 abc	28.84 ab	34.119 a
Arman	42.663 g	639.128 d	3108.697 de	720.143 de	258 b	416 bc	17.568 ef	26.096 cd
Pirooz	39 g	582.393 d	2617.221 e	665.678 de	370.885 b	258.203 a	15 f	21.607 d

میانگین‌های مربوط به هر صفت در رقم‌های مختلف که دارای حروف مشترک می‌باشند، در سطح احتمال یک درصد، تفاوت معناداری ندارند.

Means sharing the same letter for each trait among different cultivars are not significantly different at the 1% probability level.

درصد نیتروژن گره و ریشه شاهد

بررسی به دست آمده از مقایسات میانگین درصد نیتروژن گره در دو رقم بیونج و پیروز تحت تأثیر تیمار با باکتری رایزوبیوم نشان داد که رقم بیونج به طور معناداری نیتروژن بیشتری را نسبت به رقم پیروز جذب و تثبیت کرده است. همان طور که در نمودار Boxplot مشخص است، میانگین و میانه درصد نیتروژن در رقم بیونج بیشتر از پیروز بوده و دامنه تغییرات نیز وسیع تر است (نمودار ۲). در نمودار تعاملی (نمودار ۲) نیز مشاهده می‌شود که تأثیر تیمار رایزوبیوم بر افزایش نیتروژن در هر دو رقم مثبت بوده، اما شدت پاسخ در رقم بیونج بسیار بالاتر بوده است. در مقابل، در شرایط شاهد (بدون تیمار)، هر دو رقم درصد نیتروژن پایینی داشتند که نشان دهنده تأثیر مستقیم تلقیح بر فرآیند تثبیت زیستی نیتروژن است.

نتایج تحلیل واریانس (ANOVA) نشان داد که هم نوع رقم (Cultivar) و هم تیمار با باکتری رایزوبیوم (Treatment) اثر معنی داری در سطح $P < 0.01$ بر درصد نیتروژن گره داشتند. همچنین، اثر متقابل رقم $\times$ تیمار (Cultivar $\times$ Treatment) نیز معنی دار بود، که نشان دهنده پاسخ متفاوت ارقام به تیمار است (جدول ۵).

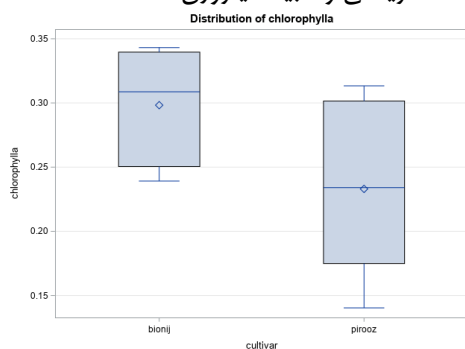
نتایج حاصل از اندازه گیری میزان رنگدانه های فتوسنتزی

توزیع داده های مربوط به چهار شاخص فتوسنتزی کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید برای دو رقم بیونج و پیروز، در قالب چهار نمودار boxplot بررسی شده است (نمودار ۱).

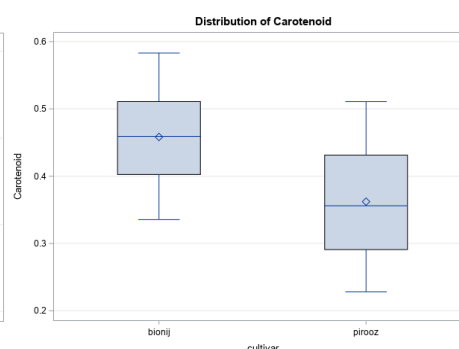
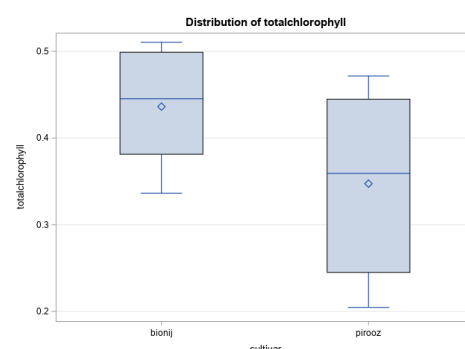
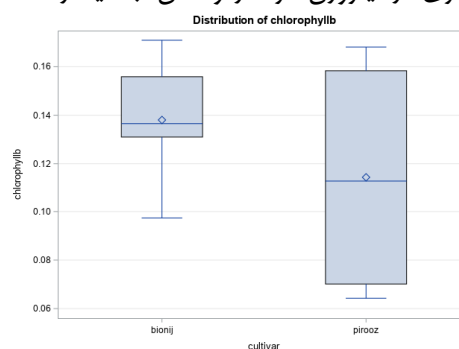
بررسی میانگین مقادیر شاخص های فتوسنتزی شامل کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید در دو رقم مورد مطالعه بیونج پیروز نشان داد که تیمار با باکتری رایزوبیوم منجر به افزایش این پارامترها در هر دو رقم شده است. با این حال، میزان این افزایش در رقم بیونج نسبت به پیروز به طور معناداری بیشتر بود.

به طور کلی، مقدار کلروفیل a و کلروفیل کل در رقم بیونج به طور چشمگیری نسبت به رقم پیروز بیشتر می‌باشد، که بیانگر عملکرد بهتر این رقم در شرایط همزیستی با باکتری رایزوبیوم می‌باشد. همچنین مقدار کارتنوئید نیز در رقم بیونج بیشتر بوده که نشان دهنده افزایش توانایی آنتی اکسیدانی و سازگاری نوری آن است.

رایزوبیوم نشان داد، که حاکی از توان بالاتر این رقم در همزیستی و تثبیت نیتروژن است.

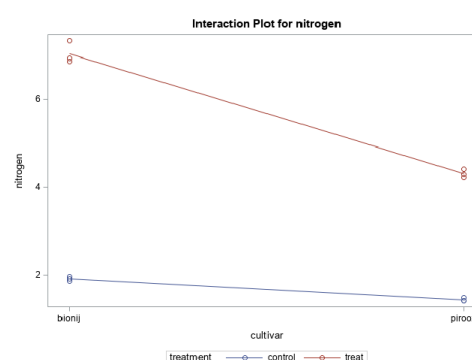
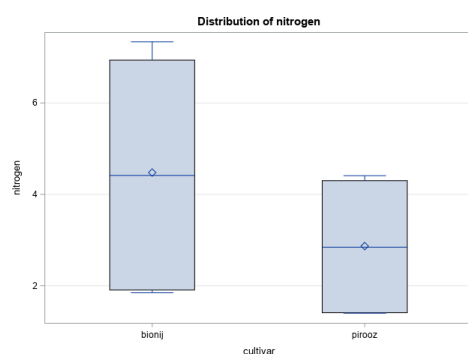


به‌طور مشخص، رقم بیونج در مقایسه با پیروز، افزایش بیشتری در نیتروژن گره در واکنش به تیمار



نمودار ۱. نمودار boxplot مربوط به مقایسه میانگین شاخص‌های کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در دو رقم گیاهی بیونج و پیروز تحت تیمار با رایزوبیوم سطح احتمال ۵ درصد ($P \leq 0.05$).

Figure 1. Boxplot diagram comparing the mean values of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, and carotenoid indices in two chickpea cultivars, Bionij and Pirooz, under *Rhizobium* treatment, with significance at the 5% probability level ($P \leq 0.05$).



نمودار ۲. مقایسه میانگین درصد نیتروژن در گره ریشه دو رقم نخود (بیونج و پیروز) تحت تأثیر تیمار با باکتری رایزوبیوم و شاهد (بدون تیمار). اختلاف میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بوده است.

Figure 2. Comparison of the mean percentage of nitrogen in root nodules of two chickpea cultivars (Bionij and Pirooz) under *Rhizobium* treatment and control (untreated). Differences between means are significant at the 5% probability level ($P \leq 0.05$).

جدول ۵. نتایج تجزیه واریانس (ANOVA) اثر رقم، تیمار رایزوبیوم و برهم‌کنش آن‌ها بر درصد نیتروژن گره‌های ریشه در دو رقم نخود.

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) results for the effects of cultivar, *Rhizobium* treatment, and their interaction on the percentage of nitrogen in root nodules of two chickpea cultivars.

Source	df	Type I SS	Mean Square	F Value	P-Value	Significance
cultivar	1	7.77630000	7.77630000	399.47	<.0001	**

Treatment	1	48.32053333	48.32053333	2482.22	<.0001	**
cultivar*treatment	1	3.83070000	3.83070000	196.78	<.0001	**

***: indicates significance at the 1% probability level ($P \leq 0.01$).

** نشان دهنده معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد است.

به شدت افزایش یافته است (بیش از ۸ برابر نسبت به شاهد). این افزایش زود هنگام، احتمالاً بیانگر پاسخ سریع و مؤثر ریشه به حضور باکتری است که می تواند باعث شروع موفقیت آمیز مسیر همزیستی شود. در زمان ۱۰ و ۲۸ روز پس از تلقیح، بیان ژن در بیونج کاهش یافته، که می تواند نشان دهنده پایان فاز اولیه سیگنالینگ و آغاز تثبیت رابطه همزیستی باشد.

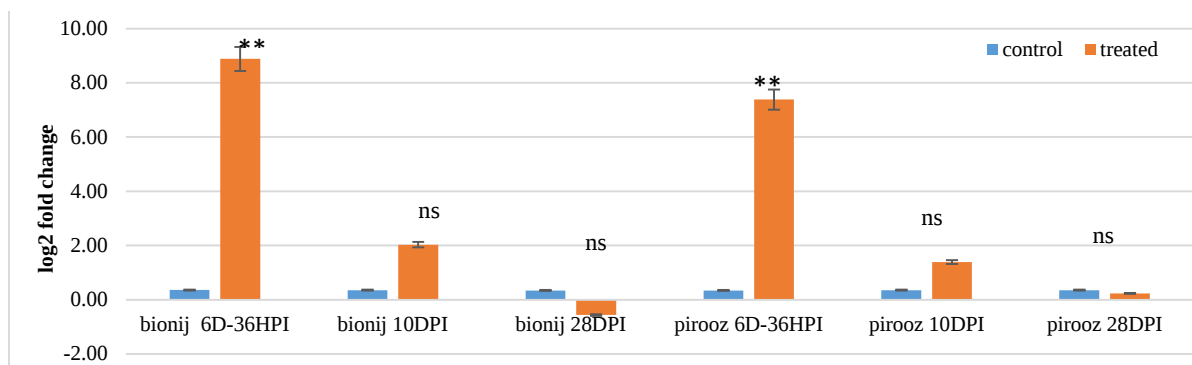
همچنین در رقم پیروز، که کمترین تعداد گره را داشت، افزایش بیان در ۳۶ ساعت پس از تلقیح مشاهده شد ولی این افزایش بیان نسبت به رقم بیونج کمتر بود (حدود ۵٫۳ برابر نسبت به شاهد). این تفاوت ممکن است بیانگر پاسخ سیگنالی ضعیف تر یا تأخیر در تعامل اولیه با رازوبیوم باشد. همچنین در زمان های ۱۴ و ۲۸ روز، بیان ژن در پیروز به مراتب پایین تر از بیونج باقی مانده است که ممکن است با کارایی کمتر در گره زایی در ارتباط باشد. به دلیل عدم تفاوت بیان ژن *I4'OMT* در بین گیاهان شاهد ارقام بیونج و پیروز، فولد چینج صفر به دست آمد و در نمودار صفر نشان داده شده است.

افزایش قابل توجه بیان ژن *I4'OMT* در مرحله اولیه (36HPI) در رقم بیونج با توان گره زایی بالاتر، به وضوح بیانگر نقش مهم این ژن در شروع تعامل همزیستی با رازوبیوم و در نتیجه افزایش نیتروژن تثبیت شده و رشد گیاه است. در مقابل، کاهش نسبی سطح بیان این ژن در رقم پیروز می تواند یکی از دلایل عملکرد ضعیف تر در گره زایی باشد.

نتایج بررسی بیان کمی ژن *I4'OMT* در گیاه نخود تحت تیمار *Mesorhizobium ciceri* با استفاده از ریل تایم

ژن *I4'OMT* در مسیر سنتز فلاوونوئیدها نقش دارد. این ترکیبات در جذب و شناسایی باکتری رازوبیوم و القای ژن های nod مؤثرند و همچنین به عنوان سیگنال های کلیدی در آغاز گره زایی عمل می کنند. به منظور بررسی بیان ژن *I4'OMT* در دو رقم بیونج و پیروز، در سه بازه زمانی پس از تلقیح با باکتری رازوبیوم، آزمایش Real-Time PCR انجام گرفت. زمان های مورد بررسی شامل ۳۶ ساعت پس از تلقیح (36HPI) در گیاهچه های شش روزه، ۱۰ روز (14DPI) و ۲۸ روز (28DPI) پس از تلقیح بودند. به منظور نرمال سازی داده ها، از ژن مرجع GAPDH استفاده شد و محاسبه fold change بیان ژن به روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ صورت گرفت. در این مطالعه، بازه زمانی ۲۸ روز به دلیل استفاده از داده های بیوانفورماتیکی پروژه PRJNA214031 انتخاب شده است که شامل بازه های زمانی طولانی تر می باشد. این انتخاب به منظور همسویی و تأیید نتایج بیوانفورماتیکی با داده های آزمایشگاهی انجام شده است تا تغییرات بیان ژن در فازهای مختلف تعامل همزیستی به طور جامع تر بررسی شود. لذا، استفاده از بازه ۲۸ روز مکمل مطالعات قبلی با بازه های کوتاه تر است و به درک بهتر روندهای بیان ژن کمک می کند.

بر اساس نتایج به دست آمده (شکل ۴)، در رقم بیونج، که در نتایج قبلی بیشترین تعداد گره را در بین ده رقم مورد بررسی داشت، بیان ژن در زمان ۳۶ ساعت پس از تلقیح



شکل ۴. بیان نسبی ژن در بافت ریشه شاهد و ریشه تلقیح شده با باکتری رایزوبیوم در دو رقم بیونج و پیروز.
Figure 4. Relative gene expression in root tissues of control and *Rhizobium*-inoculated plants in two chickpea cultivars, Bionij and Pirooz.

خاک می‌تواند بیان پپتیدهای CLE را در ریشه حبوبات القا کند و مسیر AON را تحریک نماید و در نتیجه گره‌زایی سرکوب گردد (Murray et al., 2017). تفاوت در حساسیت ژنوتیپ‌های مختلف نخود نسبت به نیتروژن موجود در خاک، می‌تواند اختلاف در تعداد گره‌ها را توضیح دهد.

در تحقیق ما، نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تیمار با باکتری رایزوبیوم موجب افزایش معنادار در میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در رقم بیونج نسبت به پیروز گردید. به طور کلی، رقم بیونج در تمامی پارامترهای فتوسنتزی مورد بررسی عملکرد بهتری از خود نشان داد و می‌تواند گزینه مناسبی در استفاده هم‌زیستی با باکتری رایزوبیوم باشد. دلیل علمی این تفاوت‌ها را می‌توان به افزایش ظرفیت تثبیت نیتروژن از طریق گره‌زایی بهتر در رقم بیونج نسبت داد. رایزوبیوم‌ها با تشکیل گره‌های ریشه‌ای در گیاهان لگوم نقش کلیدی در تأمین نیتروژن مورد نیاز دارند. نیتروژن یکی از عناصر ضروری برای سنتز کلروفیل است. بنابراین، افزایش تعداد و کارایی گره‌ها باعث دسترسی بیشتر گیاه به نیتروژن و در نتیجه سنتز بیشتر کلروفیل و رنگدانه‌های نوری می‌شود. نتایج به دست آمده با مطالعات پیشین نیز هم‌خوانی دارد که نشان داده‌اند هم‌زیستی مؤثر با رایزوبیوم موجب افزایش کلروفیل و بهبود فتوسنتز در گیاهان لگوم می‌شود (Mfilinge et al., 2014). به این ترتیب، رقم بیونج در شرایط هم‌زیستی با باکتری رایزوبیوم کارایی فتوسنتزی بالاتری از خود نشان داده و

بحث

تثبیت بیولوژیکی نیتروژن توسط رایزوبیا در محصولات لگوم نظیر نخود، برای تغذیه گیاه و کاهش مصرف کودهای نیتروژن دار، مهم می‌باشد. در مطالعه‌ی ما، مجدداً تأیید می‌شود که میزان تشکیل گره ریشه، هم به ژنوتیپ گیاه و هم به شرایط محیطی آن بستگی دارد. در این مطالعه نشان داده می‌شود که گره‌زایی وابسته به ژنوتیپ، در بین ۱۰ ژنوتیپ نخود با هم‌دیگرم تفاوت است و تعداد گره‌ها با صفات رشد گیاهی مانند وزن تر، وزن خشک، طول ساقه و ریشه مرتبط است.

تحقیقات به خوبی ثابت کرده است که محیط خاک بر جمعیت‌های رایزوبیوم تأثیر می‌گذارد (Greenlon et al., 2019). بنابراین، ما مطالعات مبتنی بر ژنوتیپ را در یک محیط خاک استریل انجام دادیم تا عوامل رقابتی بالقوه کنترل گردد. این آزمایش‌ها نشان داد که همه ژنوتیپ‌های گیاهی پاسخ یکسانی به باکترهای همزیست در خاک ندارند. در میان ده ژنوتیپ آزمایش‌شده، تعداد گره‌ها به طور قابل توجهی با هم تفاوت داشتند. در مطالعات قبلی، تفاوت‌های خاص ژنوتیپ، در گره‌زایی و تثبیت نیتروژن، در تعداد محدودی از ژنوتیپ‌های نخود گزارش شده بود ($n < 7$) (Abi-Ghanem et al., 2012).

درک وضعیت نیتروژن توسط گیاه میزبان، به تعدادی از سیستم‌های سنسوری و مسیره‌های سیگنالینگ بستگی دارد که به نوبه خود بر مسیره‌های لازم برای گره‌زایی تأثیر می‌گذارد (Gent & Forde, 2017). به عنوان مثال، وجود سطوح بالای نیترات در

بنابراین، افزایش اولیه بیان *I4'OMT* ممکن است نشان‌دهنده‌ی پاسخ دفاعی اولیه گیاه باشد که پس از شناسایی ریزوبیوم به‌عنوان همزیست، کاهش می‌یابد و مسیرهای همزیستی فعال می‌شوند (Wu et al., 2024). به منظور تأیید نتایج حاصل از آنالیز بیان ژن *I4'OMT* با شناسه ژنی (LOC101495151)، الگوی بیان این ژن در داده‌های ترنسکرپتومی و به‌صورت نقشه حرارتی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی heatmap نشان داد که این ژن در هر سه زمان پس از تلقیح با ریزوبیوم (۳۶ ساعت، ۱۰ روز، و ۲۸ روز) در مقایسه با نمونه‌های شاهد (control) دارای بیان بالاتری بود. بیشترین سطح بیان مربوط به زمان ۳۶ ساعت پس از تلقیح بود که به تدریج در زمان‌های ۱۰ و ۲۸ روز کاهش یافت.

نتایج حاصل از تحلیل real-time PCR بیان ژن، نشان داد که در پاسخ به تلقیح با باکتری *Rhizobium*، بیان ژن *I4'OMT* به طور معنی‌داری در هر دو رقم مورد مطالعه (بیونج و پیروز)، در زمان ۳۶ ساعت پس از تلقیح، افزایش یافت. و به تدریج در زمان‌های بعدی کاهش یافت (همخوانی بین داده‌های مولکولی و ترنسکرپتومی). این ژن که در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها نقش دارد، در شرایط شاهد (فاقد تلقیح) بیان ناچیزی داشت. این یافته‌ها با مطالعات پیشین هماهنگ است، چرا که در نبود باکتری همزیست، گیاه نیازی به تولید سیگنال‌های شیمیایی (نظیر فلاونوئیدها) برای آغاز تعامل همزیستی ندارد (Subramanian et al., 2006). افزایش بیان این ژن در زمان‌های ابتدایی پس از تلقیح، می‌تواند نشان‌دهنده‌ی فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ برای جذب باکتری و القای ژن‌های nod باشد. از سوی دیگر، این بیان اولیه ممکن است بخشی از پاسخ دفاعی اولیه گیاه به حضور باکتری نیز تلقی شود، چرا که *Rhizobium* در ابتدا توسط سیستم ایمنی گیاه به عنوان یک موجود خارجی شناسایی می‌شود (Gao et al., 2022). اما با گذر زمان، این پاسخ تنظیم شده و تعامل همزیستی شکل می‌گیرد.

گزینه مناسبی برای استفاده در سیستم‌های زراعی زیست‌پایه خواهد بود.

مطالعات نشان داده است که تلقیح هم‌زمان گیاه *Vigna unguiculata* با ریزوبیوم و قارچ‌های میکوریزا باعث افزایش معناداری در محتوای کلروفیل a، b و کل کلروفیل می‌شود (Arumugam et al., 2010). در تحقیقی دیگر، تلقیح بذر *Phaseolus vulgaris* L. با سویه‌های مختلف ریزوبیوم باعث افزایش محتوای کلروفیل و درصد پروتئین در ارقام مختلف شد (Sara et al., 2013).

این مقالات و تحقیق حاضر نشان می‌دهند که تلقیح با ریزوبیوم می‌تواند به‌طور معناداری محتوای کلروفیل را در گیاهان لگوم افزایش دهد، که احتمالاً به دلیل بهبود تثبیت نیتروژن و افزایش دسترسی به این عنصر ضروری برای سنتز کلروفیل است.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری پروتئین در گره گیاه تیمار شده با ریزوبیوم و ریشه‌های گیاه شاهد، حاکی از آن است که رقم بیونج دارای پاسخ‌پذیری بالاتری نسبت به همزیستی با ریزوبیوم بوده که می‌تواند ناشی از تفاوت‌های بیان ژن‌های دخیل در توانایی تشکیل گره یا انتقال نیتروژن از گره به اندام‌های هوایی باشد. رابطه مثبت بین میزان نیتروژن و میزان کلروفیل نیز در نتایج به‌دست آمده می‌تواند به دلیل وابستگی مستقیم سنتز کلروفیل به نیتروژن می‌باشد.

هنگامی که گیاه برای اولین بار با باکتری ریزوبیوم مواجه می‌شود، ممکن است یک پاسخ دفاعی اولیه غیرتخصصی به نام ایمنی القاشده توسط الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب‌ها (PAMP-Triggered Immunity یا PTI) را فعال کند. در این مرحله، گیرنده‌های سطحی گیاه، الگوهای مولکولی عمومی باکتری مانند فلاژلین را شناسایی کرده و پاسخ‌های دفاعی را فعال می‌کنند (Liu et al., 2022).

افزایش اولیه بیان ژن *Isoflavone 4'-O-methyltransferase* پس از مواجهه با ریزوبیوم می‌تواند بخشی از این پاسخ دفاعی اولیه باشد. با این حال، در تعاملات همزیستی، گیاه به‌سرعت این پاسخ دفاعی را تعدیل می‌کند تا همزیستی مؤثر با باکتری برقرار شود.

نتیجه‌گیری و پیشنهادات

نتایج این پژوهش نشان داد که بیان ژن *Isoflavone 4'-O-methyltransferase* به‌ویژه در مرحله اولیه پس از تلقیح (۳۶ ساعت) به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و این افزایش در رقم بیونج نسبت به رقم پیروز چشمگیرتر بود. این بیان بالا با عملکرد بهتر بیونج در گره‌زایی و میزان بالاتر کلروفیل و نیتروژن برگ همبستگی داشت که نشان‌دهنده توان همزیستی مؤثرتر این رقم با ریزوبیوم است. از سوی دیگر، کاهش تدریجی بیان ژن در زمان‌های بعدی می‌تواند نشان‌دهنده کاهش نیاز به سیگنال‌دهی

منابع

- nitrogen fixation in grain legumes. *Advances in agronomy*, 129, 1-116.
- Ferguson, B.J., Mens, C., Hastwell, A.H., Zhang, M., Su, H., Jones, C.H., Chu, X., & Gresshoff, P.M. (2019). Legume nodulation, the host controls the party. *Plant, cell & environment*, 42, 41-51.
- Gan, Y., Johnston, A.M., Knight, J.D., McDonald, C., & Stevenson, C. (2010). Nitrogen dynamics of chickpea, Effects of cultivar choice, N fertilization, Rhizobium inoculation, and cropping systems. *Canadian Journal of Plant Science*, 90, 655-666.
- Gao, Y., Selee, B., Schnabel, E.L., Poehlman, W.L., Chavan, S.A., Frugoli, J.A., & Feltus, F.A. (2022). time series transcriptome analysis in *Medicago truncatula* shoot and root tissue during early nodulation. *Frontiers in plant science*, 13, 861639.
- Gent, L., & Forde, B.G. 2017. How do plants sense their nitrogen status? *Journal of Experimental Botany*, 68, 2531-2539.
- Gifford, I., Battenberg, K., Vaniya, A., Wilson, A., Tian, L., Fiehn, O., & Berry, A.M. (2018). Distinctive patterns of flavonoid biosynthesis in roots and nodules of *Datisca glomerata* and *Medicago* spp. revealed by metabolomic and gene expression profiles. *Frontiers in plant science*, 9, 1463.
- Greenlon, A., Chang, P.L., Damtew, Z.M., Muleta, A., Carrasquilla-Garcia, N., Kim, D., Nguyen, H.P., Suryawanshi, V., Krieg, C.P., & Yadav, S.K. (2019). Global-level population genomics reveals differential effects of geography and phylogeny on horizontal gene transfer in soil bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, 15200-15209.
- Jahan, M.S., Tahir, M.I., Inam-Ul-Haq, M., Shahzad, U., & Calica, P. (2020). Characterization of
- Abi-Ghanem, R., Carpenter-Boggs, L., Smith, J.L., & Vandemark, G.J. (2012). Nitrogen fixation by US and middle eastern chickpeas with commercial and wild middle eastern inocula. *International Scholarly Research Notices*, 981842.
- Arumugam, R., Rajasekaran, S., & Nagarajan, S. (2010). Response of Arbuscular mycorrhizal fungi and Rhizobium inoculation on growth and chlorophyll content of *Vigna unguiculata* (L) Walp Var. Pusa 151. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 14.
- Ballard, R., & Charman, N. (2000). Nodulation and growth of pasture legumes with naturalised soil rhizobia. 1. Annual *Medicago* spp. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 40, 939-948.
- Buhian, W.P., & Bensmihen, S. (2018). Mini-review, nod factor regulation of phytohormone signaling and homeostasis during rhizobia-legume symbiosis. *Frontiers in plant science*, 9, 1247.
- Choudhary, S., Sethy, N.K., Shokeen, B., & Bhatia, S. (2009). Development of chickpea EST-SSR markers and analysis of allelic variation across related species. *Theoretical and Applied Genetics*, 118, 591-608.
- Deavours, B.E., Liu, C.-J., Naoumkina, M.A., Tang, Y., Farag, M.A., Sumner, L.W., Noel, J.P., & Dixon, R.A. (2006). Functional analysis of members of the isoflavone and isoflavanone O-methyltransferase enzyme families from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology*, 62, 715-733.
- Dwivedi, S.L., Sahrawat, K.L., Upadhyaya, H.D., Mengoni, A., Galardini, M., Bazzicalupo, M., Biondi, E.G., Hungria, M., Kaschuk, G., & Blair, M.W. (2015). Advances in host plant and rhizobium genomics to enhance symbiotic

فلاونوئیدی پس از برقراری همزیستی اولیه باشد. همچنین، ارتباط مثبت بین افزایش بیان این ژن و بهبود وضعیت نیتروژنی و فتوسنتزی گیاه بر اهمیت آن در فرایند همزیستی و انتخاب ارقام با کارایی بالاتر تأکید دارد. بر این اساس، ژن مذکور می‌تواند به عنوان شاخصی مؤثر در اصلاح و به‌نژادی ارقام نخود مورد استفاده قرار گیرد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

- Genes Involved in the Autoregulation of Nodulation in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Engineering, Environment and Agriculture Research*, 2, 48-62.
- Kant, C., Pradhan, S., & Bhatia, S. (2016). Dissecting the root nodule transcriptome of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *PLoS One*, 11, e0157908.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids, pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods in enzymology*. Elsevier, pp. 350-382.
- Liu, Y., Fernie, A.R., & Tohge, T. (2022). Diversification of chemical structures of methoxylated flavonoids and genes encoding flavonoid-O-methyltransferases. *Plants*, 11, 564.
- Merga, B., & Haji, J. (2019). Economic importance of chickpea, Production, value, and world trade. *Cogent Food & Agriculture*, 5, 1615718.
- Mfilinge, A., Mtei, K., & Ndakidemi, P. (2014). Effect of Rhizobium inoculation and supplementation with phosphorus and potassium on growth and total leaf chlorophyll (Chl) content of bush bean *Phaseolus vulgaris* L. *Agricultural Sciences*, 5, 1413-1426.
- Murray, J.D., Liu, C.-W., Chen, Y., & Miller, A.J. 2017. Nitrogen sensing in legumes. *Journal of Experimental Botany*, 68, 1919-1926.
- Nandety, R.S., Wen, J., & Mysore, K.S. (2023). *Medicago truncatula* resources to study legume biology and symbiotic nitrogen fixation. *Fundamental Research*, 3, 219-224.
- Plett, J.M., Plett, K.L., Bithell, S.L., Mitchell, C., Moore, K., Powell, J.R., & Anderson, I.C. (2016). Improved Phytophthora resistance in commercial chickpea (*Cicer arietinum*) varieties negatively impacts symbiotic gene signalling and symbiotic potential in some varieties. *Plant, cell & environment*, 39, 1858.
- Plett, K.L., Bithell, S.L., Dando, A., & Plett, J.M. (2021). Chickpea shows genotype-specific nodulation responses across soil nitrogen environment and root disease resistance categories. *BMC Plant Biology*, 21, 310.
- Roorkiwal, M., Bharadwaj, C., Barmukh, R., Dixit, G.P., Thudi, M., Gaur, P.M., Chaturvedi, S.K., Fikre, A., Hamwieh, A., & Kumar, S. (2020). Integrating genomics for chickpea improvement, achievements and opportunities. *Theoretical and Applied Genetics*, 133, 1703-1720.
- Sara, S., Morad, M., & Reza, C.M. (2013). Effects of seed inoculation by Rhizobium strains on chlorophyll content and protein percentage in common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.).
- Silva, V.M., Lui, A.C.W., de Carvalho, M.R., Namorato, F.A., Fei, Z., dos Reis, A.R., Liu, J., Vatamaniuk, O.K., & Li, L. (2024). The selenium-promoted daidzein production contributes to its induced nodulation in soybean plants. *Environmental and Experimental Botany*, 218, 105591.
- Subramanian, S., Stacey, G., & Yu, O. (2006). Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and Bradyrhizobium japonicum. *The Plant Journal*, 48, 261-273.
- Wang, Q., Liu, J., & Zhu, H. (2018). Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions. *Frontiers in plant science*, 9, 313.
- Wu, W., Zhuang, Y., Chen, D., Ruan, Y., Li, F., Jackson, K., Liu, C.W., East, A., Wen, J., & Tatsis, E. (2024). Methylated chalcones are required for rhizobial nod gene induction in the *Medicago truncatula* rhizosphere. *New Phytologist*, 242, 2195-2206.
- Yadav, S.S., Redden, R., Chen, W., & Sharma, B. 2007. *Chickpea Breeding and Management*. CABI