بررسی تغییرات الگوی بیان پروتئین‌ها و آیزوزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز گرهک تحت شرایط تنش خشکی در همزیستی بین نخود با سه سویه *Mesorhizobium ciceri*

مریم نصراصفهانی[1]

استادیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه لرستان؛ Esfahani.m@lu.ac.ir

دریافت: 91/11/17 و پذیرش: 92/10/24

چکیده

در این تحقیق، نقش سویه ریزوبیوم روی پتانسیل عملکرد همزیستی‌شان با گیاهان نخود (*Cicer arietinum* L.) تحت شرایط تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، سویه‌های *M. ciceri* (C-15، CP-31 و CP-36) به گیاهان نخود مایه‌زنی شده و به مدت چهار هفته در شرایط مطلوب رشد نگهداری شدند. تنش خشکی با توقف آبیاری برای 2 و 3 روز اعمال گردید. میزان تثبیت نیتروژن در شرایط تنش خشکی در سه سیستم همزیستی کاهش نشان داد، ولی میزان کاهش در گیاهان مایه‌زنی شده با سویه‌های CP-31 و CP-36 بالاتر بود. با آبیاری مجدد گیاهان تحت تنش خشکی، کاهش در میزان تثبیت نیتروژن در شرایط تنش خشکی در گیاهان مایه‌زنی شده با C-15 تا حدودی جبران شد ولی در گیاهان مایه‌زنی شده با سویه‌های CP-31 و CP-36 جبران نشد. تغییرات در الگوی بیان پروتئین‌های گره در گیاهان مایه‌زنی شده با سه سویه مورد مطالعه تحت شرایط مطلوب رشد، 2 و 3 روز تنش خشکی و گیاهان آبیاری مجدد شده بعد از 3 روز تنش خشکی توسط روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. در گره‌های مایه‌زنی شده با سویه C-15، الگوی پروتئینی در پاسخ به تنش خشکی در مقایسه با شاهد تفاوتی را نشان نداد در حالی که در گره‌های مایه‌زنی شده با سویه‌های CP-31 و CP-36 برخی نوارهای پروتئینی شناسایی شد که بیان آنها تحت تنش خشکی کاهش پیدا کرده و بعد از آبیاری مجدد بازیافت نشدند. تجزیه و تحلیل الکتروفورزی آیزوزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز در گره‌های حاصل از سه سویه مورد بررسی تفاوت معنی‌داری را تحت شرایط تنش در مقایسه با شاهد نشان ندادند. سطح فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در گره‌های آلوده شده با سویه C-15 با اعمال تنش خشکی افزایش نشان داد در حالی که در گره‌های مربوط به سویه‌های CP-31 و CP-36 کاهش پیدا کرد. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که با انتخاب یک سویه مناسب ریزوبیوم می‌توان سطح تحمل جمعیت همزیستی را به شرایط تنش خشکی افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: همزیستی، نخود، *M. ciceri*، گره، تثبیت نیتروژن، تنش خشکی، نیتروژناز

مقدمه

تثبیت نیتروژن اتمسفری در اندام‌های غده مانند حاصل از همزیستی ریزوبیوم با ریشه لگوم‌ها (گره[2])، یک مسیر مهم برای تأمین بخش عمده‌ای از نیتروژن موجود در دانه‌ها و علوفه‌های مورد استفاده در تغذیه انسان و دام به شمار می‌آید. به علاوه، تثبیت زیستی نیتروژن توسط لگوم‌ها مهمترین منبع طبیعی برای ورود

[1] نویسنده مسئول، آدرس: خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

[1] Nodule

نیتروژن به بیوسفر محسوب می‌شود به طوری که در کشت تناوبی غلات و سایر گیاهان زراعی با لگوم‌ها، بازده تولید محصول در این گیاهان به طور چشمگیر افزایش می‌یابد. بنابراین، فرآیند تثبیت زیستی نیتروژن از نظر کشاورزی، اقتصادی و زیست محیطی دارای اهمیت بوده (گرام و ونس 2003) و در بسیاری از کشورهای دارای خاک‌های فقیر از نظر نیتروژن بسیار مورد توجه است. پتانسیل تثبیت نیتروژن مولکولی تحت‌تأثیر سویه ریزوبیوم و رقم لگوم قرار می‌گیرد و در صورتی که این دو فاکتور مهم به گونه‌ای مناسب انتخاب شوند، سیستم همزیستی بالاترین کارآیی را به لحاظ تثبیت نیتروژن دارا خواهد بود (مدهبی و همکاران 2008). در مطالعات متعددی نقش سویه ریزوبیوم و رقم لگوم در افزایش ظرفیت تثبیت کنندگی سیستم همزیستی گزارش شده است (رومدان و همکاران 2007، مدهبی و همکاران 2008،).

میزان تولید محصول در لگوم‌ها تحت‌تأثیر عوامل متعددی نظیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی کاهش می‌یابد (دروون و همکاران 2001). خشکی یکی از تنش-های مهم محیطی است که رشد و میزان تولید محصول را در گیاهان به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد و تقریبا 70 درصد کاهش تولید محصول در سرتاسر جهان به تنش‌های غیرزیستی به ویژه خشکی نسبت داده شده است (چاوز و اولیوریا 2004). تأثیر بازدارنده تنش خشکی روی تثبیت زیستی نیتروژن به طور گسترده در لگوم‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است (آرس-ایگور و همکاران 2011). در چندین مطالعه تایید شده که فرآیند تثبیت نیتروژن در مقایسه با سایر پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه نظیر فتوسنتز، تثبیت نیترات و تبادلات گازی برگ نسبت به تنش خشکی حساس‌تر است (دجکون و پلانچون1991، گنزالز و همکاران 1995) و به این ترتیب با شناسایی مکانیسم‌هایی که تثبیت زیستی نیتروژن را تحت شرایط تنش خشکی کاهش می‌دهند، می‌توان سطح تحمل لگوم‌ها به شرایط خشکی را از طریق بهبود سرعت تثبیت نیتروژن با روش‌های مهندسی ژنتیک افزایش داد (شولزه 2004). البته به دلیل تنوع در پاسخ لگوم‌ها به تنش خشکی و نیز پیچیدگی عملکرد ژنتیکی آنها، یافتن راهی برای کاهش اثرات زیان‌آور القاء شده توسط تنش خشکی مشکل می‌باشد. به علاوه، برهمکنش بین گیاه و میکروهمزیست آن، شناخت سازوکارهای تحمل تنش را در سیستم‌های همزیستی پیچیده کرده است. چندین فرضیه در ارتباط با تفسیر کاهش تثبیت نیتروژن در طی شرایط تنش پیشنهاد شده است که از جمله آنها می‌توان به : 1) تنظیم از طریق کنترل جریان کربن به درون گره‌ها عمدتاً به دلیل کاهش در بیان و فعالیت آنزیم ساکاروز سنتاز (ارس – ایگور و همکاران 1999) 2) تنظیم بر اساس سطح اکسیژن داخلی در درون گره‌ها (سراج و سینکلایر 1996) و 3) تنظیم بازپس خوردی[1] نیتروژن (کینگ و پرسل 2005) اشاره نمود.

یکی دیگر از نتایج تنش خشکی، افزایش سطح تولید گونه‌های فعال اکسیژن[2] است که به ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو منجر می‌شود (تجرا و همکاران 2004، اپل و هیرت 2004). تنش اکسیداتیو بازدارندگی فرآیند تبیت نیتروژن اتمسفری را تحریک می‌کند (مارینو و همکاران 2006). پاسخ همزیستی به این تنش اکسیداتیو شامل تغییرات مورفولوژیکی مانند تغییر ساختمان کورتکس گره (ماتاموروس و همکاران 1999) و سازش‌های بیوشیمیایی نظیر افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در گره است (ماتاموروس و همکاران 2003، جامت و همکاران 2003، مدهبی و همکاران 2004) که خطر ناشی از آسیب اکسیداتیو را در گره‌ها کاهش می‌دهند. بدین ترتیب فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانتی نقش کلیدی در حفاظت از عملکرد گره و مکانیسم تثبیت کنندگی نیتروژن بازی می‌کنند (سانتوس و همکاران 2000).

بیان، سنتز و تجمع پروتئین‌های ویژه نظیر دهیدرین‌ها و LEA[3] در اندام‌های مختلف گیاه تحت‌تأثیر تنش‌خشکی تغییر می‌کند که این تغییرات یک بخش اساسی پاسخ گیاه به تنش خشکی محسوب می‌شود (عابدینی و همکاران 1391). نقش فیزیولوژیک پروتئین-های القاء شده توسط تنش خشکی هنوز به طور واضح شناخته نشده است اما این عقیده وجود دارد که این پروتئین‌ها باعث ایجاد تعادل و توازن در ساختار و عملکرد بیوشیمیایی گیاه شده و مقاومت گیاه به شرایط تنش را افزایش می‌دهند (جیانگ و هوانگ 2002). بدین ترتیب، مطالعه تغییر در بیان این پروتئین‌ها روشی دیگر برای شناسایی مکانیسم‌هایی است که از طریق آنها گیاهان می‌توانند به تنش‌های محیطی نظیر خشکی پاسخ دهند. مطالعه پاسخ پروتئین‌ها به تنش خشکی در چندین گونه گیاهی مانند برنج (اکواریا – زومنو و همکاران 2009، زایانگ و همکاران 2010)، ذرت (ریکاردی و همکاران 1998) و گیاه پنج انگشت (*Vitex Agnus-castus* L.) (جان و همکاران 2011) تأیید کرده است که تنش خشکی تغییرات قابل توجهی (افزایش یا کاهش) را در الگوی بیان

---

1. Feedback
2. Reactive Oxygen Species (ROS)
3. Late Embryogenesis abundant

پروتئین‌ها ایجاد می‌کند که این تغییرات با سازش‌های فیزیولوژیکی گیاه به تنش خشکی مرتبط می‌باشد. مطالعات در ارتباط با الگوی بیان پروتئین‌های گره‌ها تحت شرایط تنش خشکی و نقش آنها در بالا بردن سطح تحمل سیستم همزیستی لگوم – ریزوبیوم بسیار محدود می‌باشد (لارینزار و همکاران (2007).

گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.) یکی از مهمترین لگوم‌های کشت شده در ایران است به طوری که تقریباً 64 درصد از سطح زیر کشت لگوم‌ها در ایران به کشت نخود اختصاص دارد. این لگوم به دلیل دارا بودن 24-7 درصد پروتئین و 50-41 درصد کربوهیدرات به لحاظ غذایی با ارزش است (زالی و همکاران 2011). با توجه به وجود باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن هوا در ریشه آنها، در حاصلخیزی خاک نیز نقش مؤثری ایفا می‌کنند و از این رو کشت توأم آنها با غلات مرسوم می‌باشد. این گیاهان همچنین به صورت کود سبز به منظور تقویت و بهبود وضع فیزیکی خاک استفاده می‌شود (صباغ‌پور و همکاران 1389). تنش خشکی با تأثیر بازدارنده روی فرآیند تثبیت زیستی نیتروژن باعث کاهش در عملکرد محصول در گیاه نخود می‌شود (صباغ‌پور و همکاران 2005 و 2006). در این تحقیق تغییرات میزان تثبیت نیتروژن در مراحل اولیه تنش خشکی در همزیستی بین رقم بیونیج نخود و سه سویه *Mesorhizobium ciceri* و همچنین نقش سویه ریزوبیوم مایه زنی شده به گیاه نخود در بالا بردن سطح تحمل به شرایط تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه همچنین تغییرات در الگوی بیان پروتئین‌های گره و نیز فعالیت و بیان آیزوزیم‌های آنزیم سوپراکسیددیسموتاز گره به منظور پیدا کردن ارتباط بین این پارامترها و کارایی همزیستی[1] تحت شرایط تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت گیاهان

بذرهای گیاه نخود رقم بیونیج از مؤسسه دیم کشور تهیه گردید و بعد از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت 1% به مدت 5 دقیقه و چندین بار شستشو با آب مقطر (نصراصفهانی و مستاجران 2011)، در گلدان‌هایی از جنس پلی‌وینیل‌کلراید (PVC) با قطر 5 سانتی‌متر و حجم 0/5 لیتر حاوی مقدار یکسان شن برای نگهداشتن گیاه، کشت شدند. به منظور خنثی کردن پروتون ترشح شده از گره‌های تثبیت کننده نیتروژن و ریشه به ازای هر 6 کیلوگرم شن 0/8 گرم کربنات کلسیم به شن اضافه گردید (احمد 2007). گیاهچه‌های نخود در طی دو مرحله در روز سوم و ششم بعد از ظهورشان با سه سویه *Mesorhizobium ciceri* (C-15، CP-31 و CP-36) مایه-زنی شدند. برای عمل مایه‌زنی گیاهچه‌ها، از سوسپانسیون باکتری‌های ریزوبیومی مورد استفاده با تراکم سلولی 10^9 در هر میلی لیتر استفاده گردید. گیاهان به مدت 4 هفته در اتاقک رشد با درجه حرارت 25 °C روز/ 18 °C شب، سیکل نوری16 ساعت روز/ 8 ساعت تاریکی، 70 درصد رطوبت نسبی و تراکم نوری 360µmol m^{-2} s^{-1} نگهداری شده و هر روز با محلول غذایی فاقد نیتروژن (3.3 mM $CaCl_2$, 2.05 mM $MgSO_4.7H_2O$, 1.25 mM K_2SO_4, 0.35 mM KH_2PO_4, 4 µM H_3BO_3, 1.55 µM $ZnSO_4.7H_2O$, 1.55µM $CuSO_4.5H_2O$, 6.6 µM $MnSO_4.2H_2O$, $NaMoO_4.2H_2O$, 40 µM Fe-EDTA 0.12 µM) (وادز و همکاران 2000) آبیاری شده و محتوی رطوبتی‌شان تا نزدیک 80 درصد ظرفیت مزرعه حفظ گردید. بعد از گذشت حدوا 28 روز، آبیاری گروهی از گیاهان به مدت 2 و 3 روز متوقف گردید و به عنوان گیاهان تحت تیمار خشکی در نظر گرفته شدند. همچنین در یک گروه از گیاهان، آبیاری برای 3 روز متوقف شده و سپس به مدت 3 روز آبیاری شدند و به عنوان تیمار بازیابی شده از تنش[2] مورد بررسی قرار گرفتند. همزمان با برداشت هر گروه از تیمارها، گیاهان شاهد نیز برداشت شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد.

اندازه‌گیری میزان تثبیت نیتروژن

اندازه‌گیری میزان تولید H_2 یک روش غیرمستقیم برای ارزیابی فعالیت تثبیت نیتروژن در گره-های لگوم است (هانت و لایزل 1993). میزان تولید H_2 توسط گره‌های ریشه از طریق روش تبادل گاز با جریان باز (Open-flow gas exchange measurement system) و توسط دستگاه آنالیز کننده H_2 (H_2 Analyzer) مدل (Model S121, Quibit systems Inc, Kingston, ON, Canada) اندازه‌گیری شد. (شولزه و همکاران 2006). در این روش ریشه‌های دارای گره به یک سیستم تخمین تبادل گاز با جریان باز متصل گردید. در این سیستم، یک جریان N_2/O_2 (80/20 v/v) به میزان 200 میلی‌لیتر در دقیقه در اختیار ریشه‌های دارای گره قرار گرفت و سپس یک نمونه از جریان گاز خروجی به میزان 100 میلی‌لیتر در دقیقه بعد از عبور از ستون پرکلرات منیزیم به منظور گرفتن رطوبت توسط دستگاه H_2 analyser آنالیز گردید. داده‌ها توسط کامپیوتر متصل به دستگاه نمایش داده شد.

[1] Symbiotic efficiency

[2] Recovered plants

آماده‌سازی عصاره گره

به منظور تهیه عصاره گره ، 0/5 گرم از گره‌های نگهداری شده در دمای 80°C- را در هاون چینی با 1/5 میلی لیتر بافر استخراج (بافر فسفات پتاسیم (pH= 7.8)، DTT (4 میلی‌مولار)، PVPP (2%)، EDTA(1 میلی‌مولار) و گلیسرول (10%)) هموژنیزه گردید. مخلوط حاصل برای مدت 40 دقیقه در 13000 دور در دقیقه در دمای 4 درجه سانتیگراد سانتریفوژ و عصارهٔ شفاف جداسازی شده از محلول در دمای 20°C- نگهداری گردید. از عصاره حاصل برای اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری و الکتروفورزی فعالیت آنزیم SOD، تخمین غلظت پروتئین‌های محلول و بررسی الگوی پروتئین‌های از طریق الکتروفورز استفاده شد. سنجش کمی پروتئین های محلول بر اساس روش برادفورد (1976) انجام گردید.

بررسی میزان کمی پروتئین‌های محلول

اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول طبق روش برادفورد (1976) انجام گرفت. در این روش، برای تهیه محلول برادفورد از ماده‌ای به نام کوماسی برلیانت بلو G250 استفاده شد. محلول برادفورد با عصاره گره کمپلکس آبی رنگ تشکیل می‌دهد که در طول موج 595 جذب دارد. برای رسم منحنی استاندارد پروتئین از آلبومین سرم گاوی[1] استفاده گردید.

بررسی الگوی پروتئین‌های گره توسط الکتروفورز

الگوی بیان پروتئین‌ها با روش الکتروفورز عمودی و با استفاده از ژل پلی‌آکریلامید (SDS-PEGE) انجام گرفت (مصطفایی 1382). به منظور الکتروفورز پروتئین‌های محلول در گره، عصاره‌های حاصل از استخراج پروتئین‌ها همراه با بافر نمونهٔ (0/92 گرم SDS، 1/8 میلی‌لیتر مرکاپتواتانل، 3/2 میلی‌لیتر گلیسرول، 0/3 گرم تریس، 2 میلی‌لیتر بروموفنل بلو (0/1%)) و مقدار لازم آب مقطر مخلوط شده و پس از جوشاندن به مدت 3 الی 5 دقیقه در آب 100 درجهٔ سانتی گراد در دمای20- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. الکتروفورز به روش SDS-PAGE (سدیم دو دسیل سولفات) انجام گرفت. در این روش ژل تحتانی (ژل جدا کننده) با غلظت 15% (آکریل‌آمید 30% + بیس- آکریل‌آمید 0/8% + بافر ژل تحتانی+ آمونیوم پرسولفات (APS) 1% + 5 تا 10 میکرولیتر TEMED + آب مقطر) و به دنبال آن ژل فوقانی (ژل متراکم کننده) با غلظت 3/75% تهیه و در بافر تانک در ولتاژ 80 الی 100 ولت پس از بارگذاری نمونه-ها، الکتروفورز انجام گرفت. قبل از تزریق عصاره‌های پروتئینی به درون چاهک‌ها، ابتدا مقدار پروتئین موجود در عصاره‌های مختلف به نحوی متوازن شد که از نظر مقدار پروتئین یکسان باشند. رنگ آمیزی ژل‌ها با استفاده از کوماسی بلوبرلیانت R250 انجام و پس از رنگ‌بری، نوارهای ظاهر شده در نمونه‌های آزمایشی با باندهای حاصل از نشانگر پروتئین مربوط به شرکت Fermentase (SM0431) با ترکیب هفت نوع پروتئین با وزن‌های مولکولی 14، 18/6، 25، 35، 45، 66 و 116 کیلودالتون مقایسه گردید.

فعالیت آنزیم SOD (EC 1. 15. 1.1) از طریق تخمین توانایی آن برای جلوگیری از احیاء نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT) طبق روش یو و رنگل (1999) ارزیابی گردید. به منظور بررسی آیزوزیم‌های SOD، نمونه‌ها روی ژل پلی‌آکریلامید غیرواسرشت 12/5% مطابق روش بیان شده توسط مارتینز و همکاران (2001) جداسازی شدند. سپس، برای آشکار شدن آیزوزیم‌ها، ژل به مدت 30 دقیقه در مخلوط واکنش شامل 100 میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات 50 میلی‌مولار (pH +7/8)، 1/13 میلی‌گرم ریبوفلاوین، 325 میلی لیتر TEMED و 10 میلی‌گرم NBT در تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از شستن، ژل به مدت 20 دقیقه تحت تابش نور سفید قرار داده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS 16.0 استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح آماری 5 درصد ($P\leq0.05$) و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

نتایج و بحث

تنش خشکی یکی از عوامل اصلی کاهش دهنده محصول در این گیاه است (صباغ‌پور و همکاران 2005). یکی از روش‌های بهبود تولید محصول تحت شرایط کم آبی، انتخاب سویه‌های همزیست مقاوم به تنش است که قادرند در مقابل شرایط نامساعد محیطی ایستادگی و مقاومت کنند. حساسیت یا مقاومت در برابر تنش کم آبی، به توانایی همزیست‌ها از نظر ژنتیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برای کاهش دادن آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو که معمولاً با تنش خشکی همراه می‌شود، مرتبط می‌باشد (مدهبی و همکاران 2004). در همزیستی بین لگوم و ریزوبیوم، سه فاکتور شامل سویه ریزوبیوم، رقم لگوم و برهمکنش بین سویه و رقم روی فرآیند همزیستی تحت شرایط تنش تأثیر دارد (مدهبی و همکاران 2008). در چندین مطالعه مشارکت بالای سویه ریزوبیوم روی شاخص‌های همزیستی (عمدتاً ظرفیت

[1] Bovine Serum Albumin (BSA)

تثبیت کنندگی نیتروژن) تحت تنش‌های سخت محیطی پیشنهاد شده است. به این ترتیب، با انتخاب سویه‌های مناسب ریزوبیوم برای همزیستی با لگوم‌ها، می‌توان تولید محصول وابسته به تثبیت زیستی نیتروژن را تحت شرایط نامساعد محیطی افزایش داد.

پاسخ میزان تثبیت نیتروژن به تنش خشکی در گره‌های حاصل از همزیستی نخود با سه سویه *M.ciceri*

اندازه‌گیری میزان تثبیت نیتروژن در گره‌های مایه‌زنی شده با سویه‌های C-15، CP-31 و CP-36 تحت شرایط مطلوب رشد نشان داد که میزان تثبیت نیتروژن بسته به نوع سویه ریزوبیوم مایه‌زنی شده متفاوت بود. در همزیستی بین رقم بیونیج و سویه C-15 بیشترین میزان تثبیت نیتروژن در مقایسه با سویه‌های CP-31 و CP-36 مشاهده گردید (جدول 1). بدین ترتیب سویه‌های مختلف ریزوبیوم دارای ظرفیت متفاوت برای تثبیت نیتروژن هستند همان طور که در همزیستی بین نخود و ریزوبیوم (سوسی و همکاران 1999) و همچنین همزیستی بین ریزوبیوم و لوبیا (تجرا و همکاران 2004) نیز پیشنهاد شده بود. در مراحل اولیه اعمال تنش خشکی (بعد از توقف آبیاری برای 2 و 3 روز) میزان تثبیت نیتروژن در گره‌های حاصل از همزیستی نخود با سویه‌های C-15، CP-31 و CP-36 کاهش پیدا کرد که نشان دهنده حساسیت بالای فرآیند تثبیت نیتروژن به تنش خشکی است. معهذا، سطح کاهش تثبیت نیتروژن تحت تنش خشکی در همزیستی بین رقم بیونیج و سه سویه ریزوبیوم مایه‌زنی شده متفاوت بود. در همزیستی بین رقم بیونیج و سویه C-15، میزان تثبیت نیتروژن بعد از 2 و 3 روز توقف آبیاری به ترتیب 39 و 51 درصد در مقایسه با میزان آن در گره شاهد کاهش نشان داد و با آبیاری مجدد گیاهان نخود که برای 3 روز تحت تنش خشکی قرار داشتند، سطح کاهش یافته تثبیت نیتروژن تا 87 درصد آن در گیاه شاهد افزایش پیدا کرد. در مقابل، توقف آبیاری برای 2 و 3 روز، تثبیت نیتروژن در همزیستی نخود با سویه CP-31 را به ترتیب 75 و 84 درصد و در همزیستی نخود با سویه CP-36 به ترتیب 69 و 78 درصد نسبت به شاهد کاهش داد و با آبیاری مجدد گیاهان تحت تنش خشکی، سطح کاهش یافته تثبیت نیتروژن در این دو جمعیت همزیستی جبران نشد (جدول 1). بر اساس این نتایج، همزیستی بین رقم بیونیج با سویه C-15 که بالاترین ظرفیت تثبیت کنندگی نیتروژن را تحت شرایط مطلوب رشد نشان داد، نسبت به تنش خشکی مقاوم‌تر است. به این ترتیب می‌توان پیشنهاد کرد که سطح تحمل بالاتر فرآیند تثبیت نیتروژن به تنش خشکی در این همزیستی، نتیجه پتانسیل بالای میزان تثبیت نیتروژن تحت شرایط مطلوب رشد می‌باشد. این نتایج با گزارشات ارائه شده مبنی بر مشارکت سویه ریزوبیوم در بالا بردن سطح تحمل سیستم‌های همزیستی به شرایط تنش مطابقت دارد (مدهبی و همکاران 2004 و 2009، مناسری و همکاران 2007) فرضیه‌های متعددی در ارتباط با مکانیسم‌های دخیل در کاهش میزان تثبیت نیتروژن در مراحل اولیه اعمال تنش خشکی وجود دارد که شناخت این مکانیسم‌ها می‌تواند به بهبود تثبیت نیتروژن در شرایط تنش کمک کند. این مکانیسم‌ها شامل کاهش قابلیت دسترسی باکتروئید به سوبستراهای تنفسی (عمدتاً مالات)، کاهش نفوذپذیری اکسیژن به درون باکتروئید و کاهش انتقال محصولات حاصل از تثبیت نیتروژن و تجمع آنها در درون گره که باعث بازدارندگی تثبیت نیتروژن به صورت بازپس‌خور می‌شوند (آرس-ایگور و همکاران 2011). بین سه مکانیسم پیشنهاد شده برای تفسیر دلیل کاهش میزان تثبیت نیتروژن تحت تنش خشکی و وضعیت آب گره وابستگی وجود دارد. برخلاف تعداد زیادی از بافت‌های گیاهی، انتقال آب و ترکیبات به درون گره از طریق فلوئم انجام می‌گیرد. به این ترتیب هر فاکتوری که باعث آهسته شدن جریان فلوئم شود، تأثیر قابل ملاحظه‌ای روی فیزیولوژی گره دارد. به دلیل این که جریان فلوئم حتی به تغییرات نسبتا کم وضعیت آب برگ بسیار حساس است بنابراین جریان آب به درون گره‌ها نسبت به تغییر یافتن شرایط آب بسیار حساس است (سراج و همکاران 1999). اگرچه هر سه مکانیسم ذکر شده در بالا فاکتورهای مهم حساسیت تثبیت نیتروژن نسبت به تنش خشکی هستند ولی تأثیر بازپس-خوری نیتروژن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که با وضعیت آب گره مرتبط می‌باشد. در این مطالعه برای بررسی وضعیت آب گره، وزن تر گره مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که وزن تر گره درگیاه نخود مایه زنی شده با سویه‌های C-15، CP-31 و CP-36 در طی 2 و 3 روز توقف آبیاری به میزان معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش نشان داد ولی در گیاهانی که بعد از سه روز توقف آبیاری مجدداً آبیاری شدند، وزن تر کاهش یافته گره‌ها در طی 3 روز تنش خشکی، بعد از آبیاری مجدد به میزان آن در گره‌های شاهد برگشت پیدا کرد (جدول 2). کاهش در وزن تر گره نشان دهنده کاهش جریان فلوئم به درون گره و محدودیت در وضعیت آب گره است که باعث می‌شود جریان محصولات حاصل از تثبیت نیتروژن به خارج از گره به طور آهسته انجام گیرد و بنابراین تجمع ترکیبات نیتروژنی در درون گره اتفاق

می‌افتد که به طور بازپس‌خور باعث کاهش سرعت تثبیت نیتروژن می‌شود (کینگ و پرسل 2005).

تأثیر تنش خشکی روی الگوی بیان پروتئین‌های گره

الگوی بیان بسیاری از پروتئین‌ها در پاسخ به کاهش آب تغییر می‌کند که از جمله این پروتئین‌ها می‌توان به پروتئین‌های دخیل در مسیرهای سیگنالی تنش، پروتئین‌های مخصوص سم‌زدایی تنش اکسیداتیو و پروتئین‌هایی با اعمال غیر مستقیم مربوط به تنش اشاره نمود. به طور کلی، پاسخ‌های گیاه به تنش برای بقاء هوموستازی، سم‌زدایی مواد مضر و بازگشت رشد است (حاج حیدری و همکاران 2005). بدین ترتیب، گیاهان برای مقابله با کاهش آسیب‌های ناشی از تنش خشکی ممکن است الگوی بیان ژن‌ها و میزان پروتئین‌های درون سلولی بافت‌های‌شان را تغییر دهند (کانلایا و همکاران 2005). در چندین سال گذشته، علی‌رغم این که بررسی تغییرات در الگوی بیان پروتئین‌ها تحت شرایط تنش خشکی بسیار مورد توجه بوده ولی هنوز نقش اکثر پروتئین‌ها در ارتباط با تحمل تنش خشکی ناشناخته باقی مانده است (جیناگ و هوانگ 2002). در تحقیقات مختلف تعدادی از پروتئین‌های القاء شده توسط تنش خشکی شناسایی شده که این امر بازتابی از پیچیدگی پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاهان در برابر تنش خشکی می‌باشد (کوتاپالی و همکاران 2009، زایانگ و همکاران 2010). گزارشات در ارتباط با تغییر بیان پروتئین‌های گره تحت شرایط تنش خشکی بسیار محدود است. نتایج این تحقیق نشان داد که الگوی بیان پروتئین‌ها در گره‌های گیاه نخود مایه زنی شده با سویه‌های C-15، CP-31 و CP-36 تحت شرایط مطلوب رشد تفاوتی را با یکدیگر نشان ندادند (شکل 1). بررسی میزان پروتئین‌های محلول و الگوی بیان پروتئین‌ها در گره‌های حاصل از سویه‌های C-15، CP-31 و CP-36 تحت 2 و 3 روز اعمال تنش خشکی نشان داد که اگرچه الگوی بیان پروتئین‌ها در گره‌های سه سویه مورد بررسی در مقایسه با الگوی آنها در گره‌های شاهد تغییرات معنی‌داری را نشان داد (شکل 2) ولی در میزان کل پروتئین‌های محلول گره تفاوتی بین شاهد و گیاهان تحت تنش خشکی مشاهده نشد.

تغییرات الگوی پروتئین‌های گره در همزیستی بین نخود با سویه‌های C-15، CP-31 و CP-36 تحت شرایط تنش خشکی بسته به نوع سویه ریزوبیوم متفاوت بود. در همزیستی نخود با سویه C-15 الگوی بیان پروتئین‌های گره تحت 2 و 3 روز تنش خشکی تفاوت معنی‌داری را با گره‌های شاهد نشان نداد. الگوی پروتئینی در گره‌های حاصل از مایه زنی نخود با سویه CP-31 یک کاهش در پروتئین‌های 45 و 33 کیلودالتون بعد توقف آبیاری برای 3 روز نشان دادند که این کاهش بعد از آبیاری مجدد جبران نشد. از طرف دیگر، اعمال تنش خشکی برای 2 و 3 روز باعث کاهش در تراکم پروتئین-هایی با وزن مولکولی تقریباً 13 کیلودالتون در مقایسه تراکم این پروتئین‌ها در گره‌های شاهد شد به نحوی که بعد از آبیاری مجدد گره‌های تحت تنش خشکی، کاهش در بیان این پروتئین‌ها ترمیم نشد. بررسی الگوی پروتئینی در گره‌های حاصل از همزیستی نخود با سویه CP-36 نشان داد که با توقف آبیاری برای 2 و 3 روز، تراکم در تعداد زیادتری از پروتئین‌ها با وزن مولکولی مختلف تغییر پیدا می‌کند به نحوی که شدت بیان پروتئین‌های با وزن مولکولی 46، 43، 35، 32، 13 و 14 کیلودالتون در مقایسه با بیان این پروتئین‌ها در گره شاهد کاهش نشان داد (شکل 2).

لارینزار و همکاران (2007) در یک مطالعه روی گره‌های حاصل از همزیستی *Medicago truncatula* و *Sinorhizobium meliloti* نشان دادند که میزان فعالیت ظاهری نیتروژناز تحت تنش خشکی به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا می‌کند که این کاهش با تغییرات در بیان برخی پروتئین‌های گره نظیر متیونین سنتاز، ساکاروز سنتاز، آسپاراژین سنتاز و لگ‌هموگلوبین درشرایط تنش خشکی همراه می‌باشد. این محققین پیشنهاد کردند که کاهش فعالیت نیتروژناز تحت تنش خشکی با کاهش فعالیت این پروتئین‌ها مرتبط می‌باشد. بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان پیشنهاد کرد که بازداشته شدن شدیدتر در میزان فرآیند تثبیت نیتروژن در گره‌های حاصل از مایه زنی گیاه نخود با سویه‌های CP-31 و CP-36 در مقایسه با سویه C-15 در طی 2 و 3 روز توقف آبیاری با کاهش در بیان برخی پروتئین‌ها در این سویه‌ها مرتبط می‌باشد. این پروتئین‌ها احتمالاً در مسیر متابولیسم کربن (مانند ساکاروز سنتاز)، متابولیسم نیتروژن (آسپاراژین سنتاز) و فراهم‌سازی اکسیژن برای گره (لگ‌هموگلوبین) نقش اساسی دارند.

تأثیر تنش خشکی روی فعالیت و آیزوزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز در گره‌های تحت تنش خشکی

تنش‌های محیطی مانند خشکی تولید مقادیر زیادی گونه‌های فعال اکسیژن را در سلول‌های گیاهی القاء می‌کند که به ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو منجر می‌گردد (اپل و هیرت 2004) و توسط تجمع پراکسیدهای لیپیدی، پروتئین‌های اکسید شده یا بازهای تغییر یافته DNA شناسایی می‌شوند. در چندین مطالعه بیان شده است که

کاهش میزان تثبیت نیتروژن در شرایط تنش خشکی به واسطه تنش اکسیداتیو می‌باشد (مارینو و همکاران 2006، بکانا و همکاران 2000). آسیب اکسیداتیو القاء شده توسط تنش خشکی، نتیجه به هم ریختن مکانیسم دفاع آنتی-اکسیدانت عمدتا آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد طوری که کاهش فعالیت این آنزیم‌ها با آسیب به تمامیت ساختمانی غشاءها و تأثیر روی غلظت لگ‌هموگلوبین همراه می‌شود. بدین ترتیب در چندین مطالعه تنش اکسیداتیو به عنوان یکی از عوامل بازدارنده تثبیت زیستی نیتروژن در گره‌ها پیشنهاد شده است (مارینو و همکاران 2006 و 2007).

در این مطالعه فعالیت و الگوی بیان آیزوزیم-های آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) که نقش کلیدی در حفاظت از فرآیند تثبیت نیتروژن در مقابل تنش اکسیداتیو بازی می‌کند (روبیو و همکاران 2002) مورد بررسی قرار گرفت (جدول 3). نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم SOD در گره‌های حاصل از همزیستی رقم بیونیج با سویه C-15 در طی 2 و 3 روز توقف آبیاری در مقایسه با میزان فعالیت آن در گره‌های شاهد به ترتیب 31 و 20 درصد افزایش نشان داد که این افزایش در سطح 5 درصد از نظر آماری معنی‌دار بود. با آبیاری مجدد گیاهان تحت 3 روز تنش خشکی، سطح افزایش یافته فعالیت این آنزیم به سطح فعالیت آن در گره شاهد برگشت پیدا کرد. در گیاه نخود مایه زنی شده با سویه CP-31، فعالیت آنزیم SOD گره بعد از 2 روز توقف آبیاری در مقایسه با شاهد 46 درصد افزایش نشان داد ولی با تشدید تنش خشکی (توقف آبیاری برای 3 روز) فعالیت SOD کاهش (تقریباً 22 درصد) نشان داد و با آبیار مجدد گره‌های تحت تنش خشکی فعالیت SOD تا سطح فعالیت آن در گره شاهد افزایش پیدا کرد. فعالیت SOD در گره‌های تشکیل شده از همزیستی نخود با سویه CP-36 بعد از 2 و 3 روز تتنش خشکی کاهش معنی‌دار را در مقایسه با فعالیت آن در گره شاهد نشان داد (به ترتیب 7 و 15 درصد) ولی بعد از آبیاری مجدد گره‌های تحت تنش خشکی به سطح شاهد برگشت پیدا کرد. بر اساس این نتایج می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اگرچه کاهش در میزان فعالیت آنزیم SOD در همزیستی نخود با سویه‌های CP-31 و CP-36 و به دنبال آن تنش اکسیداتیو می‌تواند باعث کاهش میزان تثبیت نیتروژن در مراحل اولیه اعمال تنش خشکی شود ولی مشاهده شد که فعالیت آنزیم SOD در گره‌های آبیاری مجدد شده تا سطح شاهد افزایش پیدا کرد علی‌رغم این که، نتایج مربوط به اندازه‌گیری میزان تثبیت نیتروژن نشان داد که در این دو سیستم همزیستی کاهش میزان تثبیت نیتروژن در گره‌های تحت تنش خشکی با آبیاری مجدد شده جبران نشد و میزان تثبیت نیتروژن حتی بعد از برطرف کردن تنش همچنان در مقایسه با شاهد پایین‌تر بود (جدول3). بدین ترتیب می‌توان پیشنهاد کرد که تنش اکسیداتیو تنها فاکتور دخیل در بازدارندگی سرعت تثبیت نیتروژن در مراحل اولیه تنش خشکی در سیستم‌های همزیستی مورد مطالعه نیست و عوامل متعددی در این بازدارندگی نقش دارند. آنزیم ساکاروز سنتاز یک آنزیم کلیدی دخیل در حفظ سرعت تثبیت نیتروژن است که توسط طیف گسترده‌ای از تنش‌ها مانند شوری، خشکی، نیترات و ریزش برگ تحت‌تأثیر قرار می‌گیرد (لارینزار و همکاران 2007). از طرف دیگر، با آشکار-سازی فعالیت SOD روی ژل الکتروفورز، سه آیزوزیم در همزیستی بین نخود با سه سویه مورد بررسی شناسایی شدند که تنش خشکی میزان بیان این آیزوزیم‌ها را تحت‌تأثیر قرار نداد (شکل 3).

بر اساس نتایج این مطالعه، پتانسیل عملکرد همزیستی به نوع سویه ریزوبیوم مایه‌زنی شده وابسته است و سیستم‌های همزیستی که دارای پتانسیل بالاتری برای تثبیت نیتروژن هستند ظرفیت بالاتری برای تحمل شرایط تنش نیز دارند. بدین ترتیب، سطح تحمل به تنش سیستم‌های همزیستی را می‌توان با انتخاب سویه‌های مناسب ریزوبیوم بالا برد.

جدول 1- تأثیر تنش خشکی روی میزان تبیت نیتروژن(میکرومول نیتروژن تثبیت شده در ساعت در گیاه) درگره‌های حاصل از همزیستی نخود با سویه‌های ریزوبیوم C-15، CP-31 و CP-36.

تیمارها	سویه‌های *Mesorhizobium ciceri*		
	C-15	CP-31	CP-36
C2	1/34 [a]	0/58 [de]	0/54 [e]
D2	0/81 [c]	0/14 [hi]	0/207 [gh]
C3	1/37 [a]	0/63 [de]	0/55 [e]
D3	0/67 [d]	0/098 [i]	0/118 [hi]
CR	0/79 [a]	0/606 [de]	0/625 [de]
DR	0/85 [b]	0/276 [fg]	0/318 [f]

در هر ستون حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح 5 درصد با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن می‌باشد.D2 : توقف آبیاری برای 2 روز، C2: شاهد مربوط به تیمار D2، D3: توقف آبیاری برای 3 روز، C3: شاهد مربوط به تیمار D3، DR: آبیاری مجدد بعد از اعمال تنش خشکی برای 3 روز، CR: شاهد مربوط به تیمار DR.

جدول 2- تأثیر تنش خشکی روی وزن تر گره‌های حاصل از همزیستی نخود با سویه‌های ریزوبیوم C-15، CP-31 و CP-36.

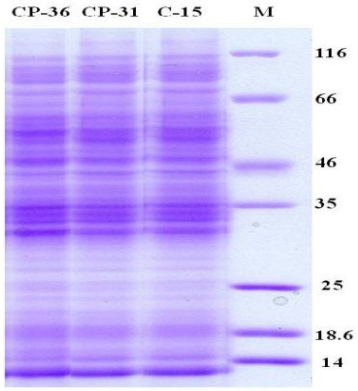
سویه ریزوبیوم	تیمار					
	C2	D2	C3	D3	CR	DR
C-15	0/687[g]	0/577 [h]	0/70[ef]	0/49 [i]	0/78 [bc]	0/76 [cd]
CP-31	0/93 [a]	0/69 [g]	0/93 [a]	0/56 [h]	0/80[b]	0/78 [bc]
Cs P-36	0/77[c]	0/44 [j]	0/76 [cd]	0/38 [k]	0/71 [de]	0/73 [ef]

در هر ستون حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح 5 درصد با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن می‌باشد. D2: توقف آبیاری برای 2 روز، C2: شاهد مربوط به تیمار D2، D3: توقف آبیاری برای 3 روز، C3: شاهد مربوط به تیمار D3، DR: آبیاری مجدد بعد از اعمال تنش خشکی برای 3 روز، CR: شاهد مربوط به تیمار DR

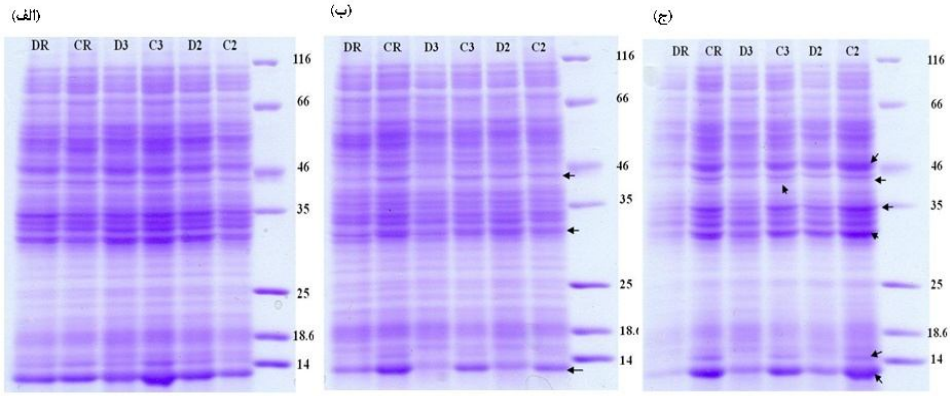
جدول 3- تأثیر تنش خشکی روی فعالیت سوپراکسیددیسموتاز (واحد فعالیت آنزیم در هر گرم وزن تر گره) در گره‌های حاصل از همزیستی نخود (رقم بیونیج) با سویه‌های C-15، CP-31 و CP-36.

سویه ریزوبیوم	تیمار					
	C2	D2	C3	D3	CR	DR
C-15	۴/۲۶ [g]	۵/۵۹[de]	۴/۸ [f]	۵/۸ [cd]	۵/۲۵ [e]	۵/۴ [de]
CP-31	۴/۴۲ [fg]	۶/۴۷ [b]	۷/۰۲ [a]	۵/۴۳ [de]	۶/۹۲ [a]	۶/۴۷ [b]
CP-36	۴/۶۳ [fg]	۴/۳ [g]	۶/۳ [b]	۵/۳۷ [e]	۶/۱۵ [bc]	۶/۴۳ [b]

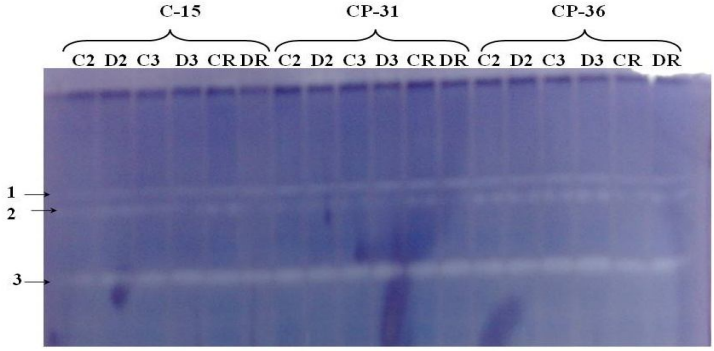
در هر ستون حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح 5 درصد با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن می‌باشدD2 : توقف آبیاری برای 2 روز، C2: شاهد مربوط به تیمار D2، D3: توقف آبیاری برای 3 روز، C3: شاهد مربوط به تیمار D3، DR: آبیاری مجدد بعد از اعمال تنش خشکی برای 3 روز، CR: شاهد مربوط به تیمار DR



شکل 1- بررسی الگوهای پروتئینی در گره‌های حاصل از مایه زنی نخود با سویه‌های *Mesorhizobium ciceri* (C-15، CP-31 و CP-36 در شرایط مطلوب رشد. M: مارکر



شکل 2- تأثیر تیمارهای مختلف تنش خشکی و آبیاری مجدد بعد از اعمال تنش خشکی بر باندهای الکتروفورزی پروتئین‌ها در گره‌های حاصل از مایه زنی نخود با سویه‌های *Mesorhizobium ciceri*: C-15 (الف)، CP-31 (ب) و CP-36 (ج)، D2: توقف آبیاری برای 2 روز، C2: شاهد مربوط به تیمار D2، D3: توقف آبیاری برای 3 روز، C3: شاهد مربوط به تیمار D3، DR: آبیاری مجدد بعد از اعمال تنش خشکی برای 3 روز، CR: شاهد مربوط به تیمار DR



شکل 3- تأثیر تیمارهای مختلف تنش خشکی و آبیاری مجدد بعد از اعمال تنش خشکی بر آیزوزیم‌ها SOD در گره‌های حاصل از مایه زنی نخود با سویه‌های *Mesorhizobium ciceri*: C-15، CP-31 و CP-36. D2: توقف آبیاری برای 2 روز، C2: شاهد مربوط به تیمار D2، D3: توقف آبیاری برای 3 روز، C3: شاهد مربوط به تیمار D3، DR: آبیاری مجدد بعد از اعمال تنش خشکی برای 3 روز، CR: شاهد مربوط به تیمار DR، 1، 2 و 3 نشان دهنده آیزوزیم‌های مختلف آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد.

فهرست منابع:

1. صباغ‌پور، س. ح. صفی‌خانی، م. پزشکپور پ. جهانگیری، ع. سرپرست ر. کرمی، ا. پورسیاه بیدی، م. شهریاری د. محمودی، ف. کشاورز، ک. 1389. آزاد، رقم جدید نخود زراعی برای مناطق معتدل و نیمه گرمسیری در شرایط دیم. به-نژادی نهال و بذر. شماره 2، جلد 1-26، 395-393.
2. صباغ‌پور، س. ح.، پزشکپور، پ.، سرپرست، ر.، سعید، آ.، صفی‌خانی، م.، جهانگیری، ع.، کرمی، آ.، پورسیاه بیدی، م.، شهریاری، د.، محمودی، ف.، کشاورز، ک. (1389) مطالعه پایداری عملکرد دانه در ژنوتیپ‌های نخود (*Cicer arietinum* L.) در کشت پاییزه در شرایط دیم. مجله به‌نژادی نهال و بذر. شماره 2، جلد 1-26، 191-173
3. عابدینی، ر.، شهبازی، م.، پیشکام‌راد، ر.، ابراهیمی، آ. 1391. بررسی بیان خانواده ژنی دهیدرین‌ها در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل جو وحشی و زراعی در شرایط تنش خشکی. زیست گیاهی. 11: 46-39
4. Ahmed, M.M. 2007. Nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.*)* and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at various phosphorus supply levels. Goettingen, Georg-August-University Goettingen, PhD thesis
5. Apel, K. and H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol. 55: 373-399.
6. Arrese-Igor C., E.M. Gonzalez, A.J. Gordon, F.R. Minchin, L. Galvez, M. Royuela, P.M. Cabrerizo, and P.M. Aparicio-Tejo. 1999. Sucrose synthase and nodule nitrogen fixation under drought and other environmental stresses. Symbiosis. 27: 189–212
7. Arrese-Igor, C., E.M. Gonzalez, D. Marino, R. Ladrera, E. Larrainzar, and E. Gil-Quintana. 2011. Physiological Responses of legume nodules to drought. Plant Stress. 5(1): 24-31
8. Becana, M., Dalton, D. A., Moran, J. F., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M. A. and Rubio, M. C. 2000. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. Physiol. Plant. 109: 372–381
9. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilising the principal of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248–254
10. Chaves, M.M. and Oliveira, M.M. 2004, Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. J. Exp. Bot. 55: 2365-2384
11. Djekoun, A., and C. Planchon**.** 1991. Water status effect on dinitrogen fixation and photosynthesis in soybean. Agro. J. 83:316-22.
12. Drevon, J.J., C. Abdelly, N. Amarger, M.E. Aouani, J. Aurag, H. Gherbi, M. Jebara, C. Lluch, H. Payre, Schump, O. Soussi, M. Sifi, and M. Trabelsi. 2001. An interdisciplinary research strategy to improve symbiotic nitrogen fixation and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in salinised areas of the Mediterranean basin. J. Biotechnol. 91:257–268
13. Echevarria-Zomeno, S., D. Ariza, I. Jorge, C. Lenz, A. Del Campo, J.V. Jorrin, and R.M. Navarro. 2009. Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery. J. Plant Physiol. 166: 233-245.
14. Esfahani MN, Mostajeran A. 2011. Rhizobial strain involvement in symbiosis efficiency of chickpea-rhizobia under drought stress: plant growth, nitrogen fixation and antioxidant enzyme activities. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 1075-1083
15. Jiang Y., and Huang, B. 2002. Protein alternations in tall fescue in response to drought stress and abscisic acid. Crop Sci. 42: 202-207
16. Gonzalez, E. M., Gordon, A. J., James, C. L. and Arrese-Igor, C. 1995. The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. J. Exp. Bot. 46: 1515–1523

17. Grahamm, P.H., and C.P.Vance. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. Plant Physiol. 131:872–877
18. Hajheidari, M., M. Abdollahian-Noghabi, H. Askari, M. Heidari, S.Y. Sadeghian, E.S. Ober, and G. Hosseini Salekdeh. 2005. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. Proteomics 5: 950-960
19. Hunt, S. and D. B. Layzell. 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. Annu Rev Plant Physiol. Plant Mo1. Biol. 44: 483-511
20. Jamet, A., S. Sigaud, G. van de Sype, A. Puppo, and D. Herouart. 2003. Expression of the bacterial catalase genes during Sinorhizobium meliloti-*Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process. Mol. Plant Microbe Interact. 16: 217–225
21. Kanlaya, K.N., D. Sakda, W. Chaisiri, B. Sumontip, K. Manit, and T. Piyada. 2005. Protein profiles in response to salt stress in leaf sheaths of rice seedlings. Science Asia 31: 403-408.
22. King, C.A., and L.C. Purcell. 2005. Inhibition of N_2 fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. Plant Physiol. 137: 1389–1396
23. Kottapulli, K.R., R. Rakwal, J. Shibato, G. Burow, D. Tissue, J. Burke, N. Puppala and M. Payton.2009. Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three constrasting peanut genotypes. Plant Cell and Environmental, 32: 380-407
24. Larrainzar, E., S. Wienkoop, R. Ladrera, W. Weckwerth, C. Arrese-Igor, and E.M. Gonzalez. 2007. *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. Plant Physiol. 144: 1495–1507
25. Marino, D., P. Frendo, R. Ladrera, A. Zabalza, A. Puppo, C. Arrese-Igor, and E.M. González. 2007. Nitrogen fixation control under drought stress. Localized or systemic? Plant Physiol. 143: 1968-1974
26. Marino D., E.M. Gonzalez, P. Frendo, A. Puppo, and C. Arresse-Igor. 2007. NADPH recycling systems in oxidative stressed pea nodules: key role for the $NADP^+$-dependent isocitrate dehydrogenase. Planta. 225: 413-421.
27. Martinez, C.A., M.E. Loureiro, M.A. Olive, and M. Maestri. 2001. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tubersum* subjected to oxidative and water stress. Plant Sci. 160: 505-515.
28. Matamoros, M.A., L.M. Baird, P.R. Escuredo, D.A. Dalton, F.R. Minchin, I. Iturbe-Ormaetxe, M.C. Rubio, J.F. Moran, A.J. Gordon, and M. Becana. 1999. Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. Plant Physiol. 121: 97–111
29. Matamoros, M.A., D.A. Dalton, J. Ramos, M.R. Clemente, M.V.C. Rubio, and M. Becana. 2003. Biochemistry and molecular biology of antioxidant in the rhizobia-legume symbiosis. Plant Physiol. 133: 499-509
30. Mhadhbi, H., M. Jebara, F. Limam, and M.E. Aouani. 2004. Rhizobial strain involvement in plant growth, nodule protein composition and antioxidant enzyme activities of chickpea–rhizobia symbioses: modulation by salt stress. Plant Physiol. Biochem. 42: 717–722
31. Mhadhbi, H., M. Jebara, A. Zitoun, F. Limam, and M.E. Aouani. 2008. Symbiotic effectiveness and response to mannitol mediated osmotic stress of various chickpea-rhizobia associations. World J. Microbiol. Biotechnol. 24: 1027–1035
32. Mnasri B., E. Aouani and R. Mhamdi. 2007. Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under water deficiency. Soil Biol. Biochem. 39: 1744–1750
33. Riccardi, F., P. Gazeau, D. De Vienne, and M. Zivy. 1998. Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Plant Physiol. 117: 1253-1263
34. Romdhame, S. B., Tajini, F., Trabelsi, M., Aouani, M. E. and Mhamdi, R. 2007. Competition for nodule formation between introduced strains of *Mesorhizobium ciceri* and

the native populations of rhizobia nodulationg chickpea (*Cicer arietinum*) in Tunisia. World J. Microbiol. Biotechnol. 23: 1195-1201

35. Rubio, M. C., Gonzalez, E. M., Minchin, F. R., Webb, K. J., Arrese-Igor, C., Ramos, J. and Becana, M. 2002. Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. Physiol. Plant. 115: 531–540
36. Sabaghpour, S.H., R.S. Malhotra, and T. Banai. 2005. Registration of 'Hashem' Kabuli Chickpea. Crop Sci. 45: 2651
37. Sabaghpour, S.H., Mahmodi A.A., Saeed A., Kamel M., Malhotra R.S. (2006) Study on chickpea drought tolerance lines under dryland condition of Iran. *Indian J. Crop Sci.* 1(1-2): 70-73.
38. Santos R., Herouart D., Puppo A. and Touati D. 2000. Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in Rhizobium–legume symbiosis. Mol Microbiol 38:750–759
39. Schulze, J. 2004. How are nitrogen fixation rates regulated in legumes? J. Plant Nutr. Soil Sci. 167: 125–137
40. Schulze, J., G. Temple, S.J. Temple, H. Beschow, and C.P. Vance. 2006. Nitrogen fixation by white lupin under phosphorus deficiency. Ann. Bot. 98: 731–740
41. Serraj, R., and T.R. Sinclair. 1996. Processes contributing to N_2-fixation insensitivity to drought in the soybean cultivar Jackson. Crop Sci. 36: 961–968
42. Serraj, R., T.R. Sinclair, and L.C. Purcell. 1999. Symbiotic N_2 fixation response to drought. J. Exp. Bot. 50: 143–155
43. Soussi, M., C. Lluch, and A. Ocana. 1999. Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars under salt stress. J. Exp. Bot. 50: 1701–1708
44. Tejera, N.A., R. Campos, J. Sanjuan, and C. Lluch. 2004. Nitrogenase and antioxidant enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici* isogenic strains with varying tolerance to salt stress. J. Plant physiol. 161: 329–338
45. Vadez, V., T.R. Sinclair, and R. Serraj. 2000. Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N_2 fixation in soybean. Physiol. Plant. 110: 215–223
46. Yu, Q. and Z. Rengel. 1999. Micronutrient deficiency influences plant growth and activities of superoxide dismutase in narrow-leafed lupins. Ann. Bot. 83: 175-182
47. Xiong, J., B. Fu, H. Xu, and Y. Li. 2010. Proteomic analysis of PEG-simulated drought stress responsive proteins of rice leaves using a pyramiding rice line at the seedling stage. Botanical Studies, 51: 137-145
48. Zali, H., Farahadfar E. and Sabaghpour S. H. 2011. Non-parametric analysis of phenotypic stability in chickpea (Cicer arietinum L.) genotypes in Iran. Crop Breeding Journal. 1(1): 89-101