[آسان داک](http://www.asandoc.com/) (www.Asandoc.com)

**آنالیز مولکولی رشد گره در حبوبات و تنظیم ذاتی آنها**

**چکیده**

حبوبات از جمله مواد غذایی بسیار مهم بوده و نیز به عنوان علوفه و محصولا زیست سوخت بکار می روند. به جز چند مورد استثناء می توان تمامی آنها را وارد ارتباط طبیعی سیمبیوتیک با باکتری های ویژه خاک تحت عنوان ریزوبیا نمود. این تعامل منجر به شکل گیری یک اندام جدید ریشه بنام گره می شود که در آن ریزوبیا موجب تبدیل گاز نیتروژن اتمسفری به اشکال نیتروژن قابل استفاده برای گیاه می شود. گیاه بطور دقیق اقدام به کنترل تعداد گره های تشکیل شده نموده و این کار را از طریق حلقه سیگنال دهی ریشه به جوانه به ریشه انجام می دهد که تنظیم ذاتی گره زایی نامیده می شود (AON). این فرآیند تنظیم مشتمل بر هورمون های پپتید، کینازهای گیرنده و متابولیت های کوچک است. امروزه با استفاده از فنون مدرن ژنتیک و ژنومیک، بسیاری از اجزای مورد نیاز برای شکل گیری گره و AON ایزوله شده است. در این تحقیق به یافته های اخیر در این مورد پرداخته و اطلاعات دقیق مدل های گره زایی و فرآیندهای AON را ارائه نموده، و کمبودهای اطلاعاتی خود را درباره این فرآیندها عنوان خواهیم نمود که هنوز بطور کامل تبیین نشده اند.

**مقدّمه**

نیتروژن بدون شک مهم ترین مادّه مغذی مورد نیاز گیاهان بوده و به عنوان یکی از اجزای الزامی تمامی اسیدهای آمینه و نوکلئیک به شمار می رود. هر چند وجود نیتروژن محدود به انواع بسیاری از خاک است و اتمسفر زمین نیز از 1/78 درصد گاز نیتروژن (N2) تشکیل یافته است، گیاهان از قابلیت استفاده از این شکل نیتروژن برخوردار نمی باشند. به منظور جبران این کاستی، کشاورزی مدرن عمدتاً متکی به کودهای نیتروژنی برای دستیابی به حداکثر بازده محصول می باشد. البته حجم بالایی از سوخت فسیلی نیز برای تولید و تحویل کودهای نیتروژنی مورد نیاز است. در واقع تثبیت صنعتی نیتروژن به تنهایی در حدود 50 درصد کاربری سوخت فسیلی را در زراعت به خود اختصاص داده است. این روند بدون شک مستلزم صرف هزینه های گزاف خواهد بود. در سال های اخیر قیمت کودهای شیمیایی نیتروژن افزایش چشمگیری در نتیجه بالا رفتن هزینه های سوخت داشته است. علاوه بر آن دی اکسید کربن (CO2) که در طول احتراق سوخت فسیلی آزاد می شود در اثرات گلخانه ای نیز نقش دارد که تجزیه کود نیتروژنی نیز چنین کاری انجام داده و اکسید نیتروز (NOx) آزاد می کند که خود به عنوان یک گاز گلخانه ای 292 بار فعال تر از دی اکسید کربن می باشد (کروتزن و همکاران، 2007). بعلاوه، استفاده از کودهای شیمیایی یک فرآیند عمدتاً ناکارآمد است و 30 تا 50 درصد کود بکار رفته نیتروژن در نتیجه آبشویی از بین می رود و مشکلات عمده محیطی همچون سرشارسازی آب آبراهه ها را به دنبال دارد (گراهام و وانس، 2003). پس می توان گفت که نیاز فزاینده به کاهش وابستگی به کوهای شیمیایی نیتروژن و در عوض بهینه سازی ورودی جایگزین نیتروژن مشهود می باشد.

**تثبیت نیتروژن و حبوبات**

تثبیت بیولوژیک نیتروژن یکی از روش های جایگزین کودهای نیتروژنی می باشد که توسط پروکاریوت ها به واسطه یک آنزیم پیچیده تحت عنوان نیتروژناز انجام شده و موجب می شود تا N2 اتمسفری به اشکالی از نیتروژن کاهش یابد که قابل استفاده توسط گیاه بوده و آمونیا از آن جمله می باشد. یک خانواده گیاهان،نیاکداران، دارای ارتباط سیمبیوتیک با باکتری ویژه خاک بنام ریبوزیا می باشد. وقتی ارتباط سیمبیوتیک برقرارمی شود، ریبوزیا موجب تثبیت اتمسفری نیتروژن شده و آن را برای دانه گیاه میزبان فراهم می آورد. چون نیتروژن فاکتور کلیدی محدود کننده برای رشد و توسعه گیاه است؛ قابلیت گیاه در وارد شدن به ارتباط سیمبیوتیک با ریبوزیای تثبیت نتیروژن موجب مزیت متمایز آنها نسبت به گونه های دیگر گیاهان می شود.

غلات و حبوبات شامل مواد غذایی مهم و نیز گونه های مختلف علوفه ای چهارپایان است که از آن جمله می توان به سویا، نخود، شبدر، نخودچی، یونجه و ماش اشاره نمود. این گروه سومین گروه بزرگ مواد غذایی و علوفه می باشد که در سطح جهانی رشد می کند. در واقع آنها 12 تا 15 درصد زمین های زراعی زیر کشت را به خود اختصاص داده و بیش از 25 درصد تولید محصول عمده جهان را از آن خود نموده اند که مشتمل بر 247 میلیون تن حبوبات دانه ای تولید شده در سال است (اتحادیه تحقیقات حبوبات دانه ای اروپا، 2007). حبوبات و غلات علاوه بر محصولات غذایی و علوفه ای چون سویا و پونگامیا پیناتا، به دلیل محتوای روغن دانه نیز توجه زیادی را به خود جلب نموده است (اسکات و همکاران، 2008).

ریزوبیا به ریشه های گیاهان حبوباتی حمله نموده و موجب توسعه ساختارهای خاص ریشه بنام گره می شود. در گره، این باکتری به باکتروید تقسیم شده و کاهش N2 را به آمونیا با استفاده از کمپلکس آنزیم نیتروژناز موجب می شود، فرآیندی که عموماً به عنوان تثبیت سیمبیوتیک نیتروژن نامیده می شود. سیمبیوسیز حبوبات – ریزوبیا مهم ترین ارتباط سیمبیوتیک به لحاظ تثبیت بیولوژیکی نیتروژن است که در حدود 200 میلیون تن نیتروژن در سال تولید می کند (گراهام و وانس، 2003؛ پیپلز و همکاران، 2009). به عنوان یک عملکرد رایج زراعی می توان به کشت متناوب گونه های محصولات مختلف اشاره نمود که معمولاً یکی از آن عبارت از شبدر یا یونجه می باشد. از این رو این گونه ها اصطلاحاً مانور سبز نامیده می شود. اغلب کل گیاه بطور کامل در زمین شخمزنی می شود و بطور چشمگیری موجب ارتقای محتوای آلی و حجم خاک می شود.

**اندامزایی گره**

شکل گیری گره توسط ریشه های گیاه میزبان آغاز می شود که اقدام به ترشح اجزای فلاونوید فنولیک به ریزوسفر می نمایند (ردموند و همکاران، 1986) (تصویر 1، مرحله 1). این ترشح تا حدودی ویژگی ارتباط سیمبیوتیک را تعیین می کند چنانچه هر نوع ریزوبیا به فلاونوید ویژه واکنش نشان می دهد. اغلب گونه های ریزوبیا فقط با تعداد معدود و انتخاب شده حبوبات وارد تعامل می شوند و برخی دیگر نیز دارای طیف وسیع میزبان می باشند (پوپکه و بروگتون، 1999).

ادارک فلاونوید موجب جذب باکتری به ریشه شده و توالی ژن (گره زایی) ریزوبیای *nod* را فعال می کند که موجب تولید و تراوش لیپو –چیتو – ساکاریدهای ویژه رشته ای می شود که فاکتورهای نود نیز نامیده می شود (NF) ( کایتانو – انولزه و گرسهاف، 1991؛ دنایره و همکاران، 1996؛ اسپاینک، 2000) (تصویر 1؛ مرحله 2). به عنوان برخی موارد استثناء می توان به برخی گونه های اخیراً شناسایی شده *بردیریزوبیوم* اشاره نمود که مشتمل بر توسعه گره علیرغم عدم برخورداری از ژن های *nodABC* مورد نیاز برای بیوسنتز NF می باشد (جیراود و همکاران، 2007). در واقع NFها دارای استخوانبندی اولیگوساکاریدی واحدهای N- استیل- دی – گلوکوزامین با یک گروه اسیل چرب متصل به قند غیرکاهنده می باشد. یک عامل عمده تعیین کننده ویژگی سیمبیونت میزبان به جایگزین های متفاوت NF متصل به استخوانبندی اولیگوساکارید نسبت داده می شود (لروژ و همکاران، 1990؛ دنایره و همکاران، 1996).

وجود گونه های سازگار ریزوبیا و NF مرتبط آنها عموماً برای آغاز توسعه گره کافی است. نوک مویی در حال پیدایش ریشه هدف عمده آلودگی توسط ریزوبیا است که احتمالاً به دلیل دیواره های سلولی باریک تر و دارای ارتباط عرضی کمتر است که موجب تنظیم مجدد میکروتیوبل های موجود شده، و ترافیک وزیکول به نوک در حال رشد را تغییر داده و از این رو موجب توانمندی بهتر نفوذ متعاقب توسط ریزوبیا می شود. اتصال ریزوبیا به مویی ریشه موجب تحریک آن به دگردیسی طی 6 تا 8 ساعت می شود (یائو و وینسنت، 1969؛ بونسواری و همکاران، 1981؛ بونسواری و سولهیم، 1985) و نیز ارتقای تقسیم سلولی کورتیکال را به دنبال دارد (کالورت و همکاران، 1984؛ متیوز و همکاران، 1989) (تصویر 1، مرحله 3).

ریزوبیا دارای دو راه اصلی برای ورود به ریشه گیاه است: از طریق مویی ریشه یا شکاف های بافت اپیدرمال ریشه (توسط اولدروید و داوینز، 2008 بررسی شده است). آلودگی مویی ریشه بسیار رایج بوده و مشتمل بر شکل گیری رشته های آلوده است که عبارت از ساختارهای لوله ای متشکل از اجزای دیوار سلول گیاه هستند که به عنوان مجرایی برای باکتری به سلول های کورتیکال گیاه عمل می کند (مرور شده توسط گایج، 2004). ورود ریزوبیا از طریق نوک مویی ریشه صورت می گیرد که موجب کپسوله بندی بخش کوچکی از باکتری تقسیم کننده می شود (کالاهام و توریه، 1981؛ تورگون و بائور، 1985) (تصویر 1، مراحل 4 و 5). میکرو کلونی کپسوله بندی شده به احتمال زیاد دارای غلظت غنی NF و نیز آنزیم های تجزیه دیواره سلولی می باشد. نفوذ به دیواره سلولی میزبان ولی نه به غشای پلاسمای آن به دنبال سنتز مجدد و گوارش مجدد صورت می گیرد. این چرخه مجدد همگام با ماتریس ویسکوز خارج سلولی موجب جاسازی میکروکلونی و تداوم رشد باکتری شده و نوعی فشار رانشی ایجاد می کندکه برای راندن فشار آماس مویی ریشه مورد نیاز است. ویژگیهای دینامیکی این فرآیند منجر به شکل گیری رشته آلوده دیواره سلولی گیاه (تصویر 1، مراحل 6 و 7) و پر شدن آن با باکتری تکثیر کننده نهان در ماتریس خارج سلولی سخت شده می شود (گایج، 2004). در مویی ریشه سویا، روند آلودگی بیش از 12 ساعت بعد از تماس با ریزوبیا روی می دهد (تورگون و بائور، 1982، 1985).

این احتمال وجود دارد که حمله ریزوبیا هنوز قادر به تولید NF باشد که طی توالی فازی *NodC::LacZ* نشان داده شده و موجب تحریک افزایش همیشگی NF می شود که فعالسازی میتوتیکی سلول های کورتیکال را در ریشه به دنبال دارد. این روند در نهایت منجر به توسعه پری موردیوم گره می شود (تصویر 1، مرحله 8). موقعیت اصلی تقسیمات سلولی و از این رو پری موردیوم توسط گرادیان موقعیتی برای هورمونهایی چون اتیلن کنترل می شود (هیدسترا و همکاران، 1997؛ لوهار و همکاران، 2009). از این رو اغلب گره ها نزدیک به سلول های رادیال آوند چوبی رشد می کنند که به دور از آوند آبکشی صورت می گیرد. رگه آلوده در مویی ریشه به کورتکس ریشه رشد نموده و نیز شامل سلول های حاصل از تقسیمات جدید می شود. باکتری از بخش نزدیک به نوک رگه آلودگی در یک قطره آلوده در سیتوپلاسم سلول میزبان آزاد می شود. طی پروسه ای شبیه اندوسیتوسیز، باکتری تحت احاطه یک غشای حاصل از گیاه درمی آید که غشای پری باکتروید نامیده شده و به عنوان سیمبیوزوم شناخته می شود (اودواردی و دی، 1997).

باکتری نهان در غشاء همچنان به تقسیم در سلول های میزبان ادامه می دهد که قبل از تمایز آنها به باکتریود و آغاز تثبیت نیتروژنی صورت می گیرد (روث و استیسی، 1989). تبدیل N2 اتمسفری به آمونیا توسط باکتریود صورت گرفته و متعاقباً وارد گیاه شده که به دنبال تبدیل آن به گلوتامین توسط سینتاز گلوتامین صورت می گیرد. تبدیل بیشتر گلوتامین به گلوتامیت توسط سنتز گلوتامیت صورت می گیرد. تبدیل سریع آمونیا نوعی گرادیان متفاوت تولید می کند که به عنوان عامل اصلی صدور از باکتروید شناخته می شود (اودواردی و دی، 1997). بافت های آوندی و بافت های مرکزی متشکل از سلول های مورد هجوم واقع شده و غیر آن می باشد، که در کورتکس وجود دارد (نیوکومب و همکاران، 1979؛ کالورت و همکاران، 1984) (تصویر 1؛ مراحل 9 و 10). مابین بخش داخلی گره و سلول های گیاه مجاور ، گیاه و باکتریود اقدام به تبادل مواد مغذی ضروری می کنند. انتقال انفعالی حاصل از پتانسیل غشایی از بین غشای پری باکتریود موجب تسهیل جذب مواد مغذی به سیمبوزیوم می شود (اوداواردی و دی، 1997). این مکانیسم ها موجب هضم فتوسینتات به گره برای باکتریود شده و صدور اجزای متعدد همچون نیتروژن تثبیت شده را به ریشه به دنبال دارد (برای مثال گلوتامین).

**تصویر 1.** مراحل رشد و توسعه گره های نامشخص و مشخص حبوبات

مراحل نشان داده شده در تصویر عبارت از مراحل توسعه گره های نخود (نامشخص؛ سمت چپ) و سویا (مشخص؛ سمت راست) می باشد. مویی در حال پیدایش ریشه اجزای فلاونویدی ترشح می کند که موجب جذب ریزوبیای سازگار شده و آنها را به تولید فاکتورهای نود تهییج می نماید. مویی ریشه تغییر شکل داده و یک توده ایجاد می کند که در آن انتراپی ریزوبیا انجام می شود. ساختارهای رگه آلوده موجب آغاز توانمندی توده در ورود ریزوبیا به گیاه می نماید. لایه های بیشتر سلولی بعداً تقسیم شده و منجر به شکل گیری پریموردیوم گره می شود. رگه های آلوده بسوی این پریموردیوم پیشروی نموده و موجب رهاسازی ریزوبیا در قطرات آلوده می شود که در آن تمایز آنها به باکتریود تثبیت نیتروژن صورت می گیرد. در بالای پریموردیوم گره های نامشخص، یک مریستم توسعه می یابد که بطور مستمر موجب افزایش سلول های جدید می شود. همگام با تکامل این سلول های جدید، بسیاری از آنها متعاقباً آلوده می شود که منجر به نواحی فزاینده تهاجم ریزوبیا و تمایز به گره می شود. در مقابل، گره های مشخص موجب توسعه مریستم پایدار نشده و از این رو سلول های مورد تهاجم قرار گرفته آنها همگی در فاز مشابه توسعه قرار می گیرند. مراحل متعدد توسعه، انواع بافت و نواحی گره زایی برچسب گذاری شده است.



لنتیسل

ناحیه ثابت n

کران لایه سلول

لایه اسکلرویدال

رگه آلوده

اپیدرمیز

استیل

اندودرمیز

کورتکس

ناحیه ثابت N

مریستم

باکترید

تکامل گره غیرثابت

تهاجم مستمر ریزوبیا و اشباع گره

تهاجم ریزوبیا به گره و تمایز باکتروید

پشروی رگه آلوده در کورتکس داخلی

پیشروی رگه آلوده در کورتکس بیرونی

تقسیم سلولی و رگه آلوده

تقسیم سلولی کورتیکال

مشخص

نامشخص

ترشح فلاونوید و پیدایش مویی ریشه

اتصال ریزوبیا و NF

**ساختارهای مشخص و نامشخص گره**

دو نوع عمده مورفولوژیکی گره ها در حبوبات وجود دارد: مشخص و نامشخص (جدول 1 و تصویر 1). نوع گره توسط گیاه میزبان تعیین می شود. تفاوت های موجود بین دو نوع گره عبارت از مکان تقسیمات اولیه و درونی سلول، نگهداری یک ناحیه مریستامتیک و شکل گره های تکامل یافته است (نیوکومب و همکاران، 1979؛ گروسهاف و دلوز، 1986؛ رالف و گرسهاف، 1988). در گره های نامشخص اولین تقسیمات سلولی بصورت تاقدیسی در کورتکس درونی صورت می گیرد و به دنبال آن تقسیمات برون کژینه ای در اندودرمی و پیش چرخه صورت می گیرد (تصویر 1؛ مراحل 4 و5). این تقسیمات جمعاً منجر به شکل گیری پریموردیای گره می شود. گره های نامشخص دارای مریستم پایدارتر می باشند که منجر به گره های استوانه ای شکل شده و از آن جمله می توان به گره های یونجه، شبدر، نخود و مدیکاگو ترونکاتولا اشاره نمود (بوند، 1948؛ لیبنگا و هیکز، 1973؛ نیوکومب، 1976؛ نیوکومب و همکاران، 1979). مریستم رأس بطور مستمر موجب تولید سلول های جدید می شود که توسط باکتری آلوده می شوند. در سطح تکامل، گره های نامشخص حاوی جمعیت ناهمگون باکتریود تثبیت نیتروژن در نتیجه استمرار تقسیم سلولی می باشد که موجب افزایش گرادیان مراحل توسعه به موازات تداوم توسعه گره می شود (تصویر 1). این گره ها همچنین دارای سیستم های آوندی متفاوت و با انشعاب کمتر نسبت به گره های مشخص می باشند.

گره های مشخص از سوی دیگر معمولاً کروی بوده، فاقد یک مریستم پایدار بوده و گرادیان بارز توسعه از خود نشان نمی دهند (جدول 1 و تصویر 1) (نیوکمب و همکاران، 1979؛ تورگون و بائر، 1982؛ کالورت و همکاران، 1984؛ متیوز و همکاران، 1989). اولین تقسیم سلولی گره مشخص معمولاً بصورت زیر اپیدرمی در کورتکس خارجی صورت می گیرد. البته استثنائاتی نیز وجود دارد که از آن جمله می توان به گره های *Lotus japonicas* اشاره نمود که دارای تقسیمات سلولی زیر اپیدرمال اولیه نمی باشد (وپریز و همکاران، 2000). به هنگام تکامل، گره های مشخص حاوی جمعیت نسبتاً همگون باکتریودهای تثبیت نیتروژن می باشند و تمایز سلول های آلوده بصورت متقارن روی داده و به دنبال آن پیرشدگی روی می دهد. این گره ها به مدت چند هفته عمر می کنند. وقتی گره های قدیمی دچار پیرشدگی می شود، گره های جدید روی بخش های اخیراً توسعه یافته ریشه پدیدار می شود (رولف و گروسهاف، 1988).

تعیین و شناسایی نقش ژن *cochleata* در گره های مشخص و دارای مریستم کمتر جالب توجه خواهد بود چنانچه در شناسایی مریستم گره های نامشخص نیز نقش دارند و موجب فنوتیپ هومئوتیک و ساختارهای هیبریدی ریشه – گره در نخود می شود (فرگوسن و رید، 2005). همچنین در گره های مشخص نوعی عدسک تشکیل می شود که ساختارهای آن برای ارتقای تبادل گاز عمل می کند (تصویر 1؛ مرحله 10). حبوباتی که گره های مشخص را تشکیل می دهند بصورت غالب از گونه های گرمسیری و نیمه گرمسیری هستند که از آن جمله می توان به سویا، پونگامیا و لوبیا اشاره نمود و البته شامل گونه های دیگری نیز چون ال.ژاپونیکوس می باشد.

**جدول 1.** تفاوت های عمده بین انواع نامشخص و مشخص گره

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | نامشخص | مشخص |
| محل آغاز تقسیم سلولی | کورتکس درونی ریشه بعد از قطب آوند چوبی | کورتکس بیرونی یا میانی بعد از آوند چوبی |
| نوع مریستم | مریستم پایدار | فاقد مریستم پایدار |
| شکل عادی گره | استوانه ای / انشعاب یافته | کروی |
| رگه آلوده | وسیع | کم عرض |
| سلول های آلوده | دارای واکوئل گسترده | واکوئل کمینه |
| شکل عمده باکتری | بزرگ، انشعاب دار، پایایی کم، یک مورد به ازای سیمبوزیوم | اندازه عادی سنبه، پایایی بالا، متعدد به ازای سیمبوزیوم |
| ناحیه جغرافیایی خاستگاه گیاه | نواحی معتدل | نیمه گرمسیری و گرمسیری |
| نمونه | مدیکاگو، شبدر و نخود | سویا، لوبیا، پونگامیا پیناتا و لوتوس |

**ادارک فاکتور نود Nod**

از یک روش غالب ژنتیکی برای آشکار نمودن مکانیسم ادارک NF استفاده می شود. مدل موجود دو کیناز شبیه گیرنده (RLK) را پیش بینی می کند که در سلول های اپیدرمال قرار داشته و در پیوند فاکتور نود نقش دارند: در ال. ژاپونیکوس LjNFR1 و LjNFR5، در پی . ساتیووم PsSYM2A و PsSYM10، در M.truncatula MtLYK3/MtLYK4 و MtNFP، و در سویای GmNFR1 α/β و GmNFR5α/β (تصویر 2؛ لیمپنز و همکاران، 2003؛ مادسن و همکاران، 2003؛ رادوتوی و همکاران، 2003؛ آریقی و همکاران، 2006؛ ایندراسامونار، 2007؛ ایندارسامونار و همکاران، 2009). این گیرنده های NF متشکل از یک حوزه کیناز داخل سلولی، یک حوزه تراغشایی و یک بخش خارج سلولی دارای حوزه های LysM است. این حوزه ها در آنزیم های تجزیه دیواره سلولی متداول بوده و موجب پیوند به پپتیدوگلیکان ها می شود که همانند NFs دارای باقیمانده های N – استیل گلوکوزامین می باشند (استین و همکاران، 2003). هر چند این عوامل در یوکاریوت وجود دارد، ولی چندان معمول نمی باشند. وجود حوزه های LysM همراه با تراغشاء و حوزه کیناز منحصر به گیاهان است (گوچ، 2003). جالب اینجاست که LjNFR1/PsSYM2A/MtLYK3/MtLYK4/GmNFR1*α*/*β* دارای یک حوزه عادی سرین/ترونین است در حالیکه LjNFR5/PsSYM10/MtNFP/GmNFR5α/β فاقد حلقه فعالسازی می باشد (لیمپنز و همکاران، 2003؛ مادسن و همکاران، 2003؛ رادوتیو و همکاران، 2003؛ ایندراسومونار، 2007؛ ایندراسومونار و همکاران، 2009) که در آن محل فسفریلاسیون غالباً در کینازهای پروتئین یوکاریوت قرار دارد (هوسه و کوریان، 2002). فقدان حلقه فعالسازی در یک حوزه کیناز حاکی از آن است که دو LysM RLKs ممکن است در یک گیرنده هترودیمری اجتماع یابد که همراه با عملکرد حوزه فعال کیناز در تراجایی سیگنال پایین دست می باشد (لیمپنز و همکاران، 2003؛ مادسن و همکاران، 2003؛ رادوتیو و همکاران، 2003). البته تعامل بین این دو RLKs و سایر اجزای تراجایی سیگنال هنوز کاملاً شناخته شده نمی باشد.

یک RLK دیگر موجود در سیگنال دهی NF دارای تکرار غنی لئوسین (LRR) و حوزه های کیناز سرین/تئورین می باشد (تصویر 2؛ اندر و همکاران، 2002؛ استراک و همکاران، 2002؛ میترا و همکاران، 2004؛ کاپوئن و همکاران، 2005؛ ایندراسومانار، 2007) که در غشای پلاسما و غشای رگه آلوده قرار گرفته (لیمپنز و همکاران، 2005) و پیش بینی می شود که هم در ادارک NF و هم تراجایی سیگنال پایین دست نقش داشته باشد چرا که برای واکنش های اولیه و قابل شناسایی مویی ریشه مورد نیاز می باشد (اندر و همکاران، 2002؛ استراک و همکاران، 2002). فعالسازی LysM RLKs به عنوان پیش شرط فعالسازی این LRR RLK قلمداد می شود. در واقع هر دو گیرنده باید در ادارک مولکول های سیگنال میکروبی نقش داشته باشد، ولی هنوز معلوم نیست که چگونه LRR RLK موجب تلفیق سیگنال های قارچی و باکتریایی شده است. البته هنوز معلوم نیست که آیا این روند بطور مستقیم از طریق شکل گیری هتروکمپلکس ها صورت گرفته یا بطور غیرمستقیم از طریق سیگنال های ثانویه انجام می شود. بسته به واکنش های پایین دست، LysM RLKs می تواند نقش ویژه ای در فرود سیگنال دهی NF داشته باشد (در ادامه توضیح داده می شود) در حالیکه LRR RLK عملکرد بیشتری در آغاز رویدادهای عفونی باکتریایی خواهد داشت (تصویر 2).

**تصویر 2.** وقایع مولکولی مربوط به مراحل اولیه گره زایی

ریشه حبوبات از طریق ترشح فلاونوید در ریزوسفر اقدام به گره زایی می کند. این روند موجب جذب ریزوبیای سازگار به ریشه شده و آنها را به تولید فاکتورهای نود (NF) تحریک می کند و ادارک آن در اپیدرمی توسط یک تکرار غنی از لئوسین شبیه کیناز صورت می گیرد که آغاز کننده تعدادی از وقایع پایین دست موجود در آلودگی باکتری است. همزمان NF نیز از سوی دو LysM RLKs درک می شود که منجر به توالی سیگنال دهی NF ، تقسیمات سلولی کورتیکال/پیش چرخه و وقایع آلودگی باکتریایی می شود. یک سیگنال پویا نیز موجب رله ادارک NF از سوی اپیدرمی به کورتکس می شود که در آن آغازگر تقسیمات سلولی خواهد بود که موجب افزایش پریموردیای گره می شود. میزان بسیاری از هورمون های دیگر نیز به شدت تحت کنترل اندامزایی کلی گره قرار داشته و در تنظیم آغاز و توسعه گره نقش دارد.



فلاونوید

تقسیم سلولی

توالی گره

توالی گره

کانالهای کاتیون

آلودگی باکتری

نوکلئوپورین

ریزوبیا

کورتکس /پیش چرخه

اپیدرمیز

**زنجیره سیگنال دهی فاکتور نود**

ادارک فاکتور نود موجب آغاز زنجیره پله ای تراجایی سیگنال پایین دست می شود (تصویر 2). این روند شامل پروتئین های کانال یونی جا گرفته در غشای هسته و رمزنویسی شده می باشد (آنه و همکاران، 2004؛ ایمایزومی-آنراکو و همکاران، 2005؛ ریلی و همکاران، 2007).

یک دقیقه بعد از بکارگیری NF، شارهای Ca2+ با هجوم سریع یون های آن نشان داده شده و سپس شار قطبیت زدائی غشای CI- و K+ در مویی ریشه روی می دهد (فله و همکاران، 1999). نوسان غلظت سیتوزولی Ca2+ که به عنوان اسپایک نمودن شناخته می شود در سلول های مشابه روی داده که چند دقیقه بعد از القای شار Ca2+ صورت می گیرد (تقریباً 10 دقیقه بعد از بکارگیری NF؛ ویس و همکاران، 2000؛ والکر و همکاران، 2000). پروتئین های کانال یون و نوکلئوپرین ها برای این وقابع اسپایک مورد نیاز بوده و مطالعت ساختاری نشان داده است که CCaMK برای ادارک سیگنال های اسپایک Ca2+ عمل می کند. نوسان ها و اسپایک های مشابه نیز در تراجایی وقایع سیگنال دهی بعد از پیوند لیگاند نقش دارد (دولمتش، 1988؛ لی و همکاران، 1988؛ آلن و همکاران، 2001) که نشان از احتمال وقوع اثرات مشابه به دنبال ادارک NF است. ادارک NF همچنین موجب تغییرشکل مویی ریشه و تغییرات استین سیتواسکلتون مویش ریشه میشود که برای پیچش و پیشروی آن ضرورت دارد (کاردناز و همکاران، 1998؛ دی رویجتر و همکاران، 1998).

جهش های صورت گرفته در رمزنویسی برای NF LRR RLK، کانال های فرضی یون یا نوکلئوپرین موجب براندازی اسپایک Ca2+ شده و تداوم توسعه گره مستمر را به دنبال دارد؛ هر چند شارهای Ca2+ و تغییرشکل مویی ریشه استمرار می یابد (آنه و همکاران، 2004؛ ایمایزومی – آنراکو و همکاران، 2005؛ کاناموری و همکاران، 2006؛ میوا و همکاران، 2006؛ ساتیو و همکاران، 2007). در مقابل جهش های CCaMK تاثیری روی شار Ca2+ و اسپایک آن نداشته و البته همچنان موجب بلوکه شدن توسعه مستمر گره می شود (لوی و همکاران، 2004؛ میوا و همکاران، 2006). این روند نشان می دهد که NF LRR RLK، کانال های یون، و نوکلئوپرین عامل پایین دست ادارک NF بوده، ولی اسپایک Ca2+ بصورت بالادست می باشد، در حالیکه CCaMK بصورت پایین دست اسپایک Ca2+ عمل می کند (تصویر 2).

فاکتورهای متعدد تراجایی پایین دست فعال شده CCaMK می باشد که شامل مجرای سیگنال دهی گره زایی NSP1، NSP2، Ets2 و شهود گره می باشد و نیز در مورد جهش های nsp1 و nsp2 دارای واکنش عادی Ca2+ صدق می کند که به هنگام فرآوری با NFs روی می دهد؛ هر چند آنها قادر به آغاز تراجایی ژن های اولیه گره زایی در ایپدرمی نمی باشند (کاتویرا و همکاران، 2000؛ اولدروید و لانگ، 2003). در سلولهای اپیدرمال، NSP1 و NSP2 بصورت مشترک با CCaMk در نوکلئوس جای می گیرند که نشان از آن دارد که NSP1 و NSP2 به احتمال زیاد بعد از اسپایک فعال شده و پایین دست مستقیم CCaMK است. بعلاوه ERN1 و NSP1 موجب پیوند ارتقای ENOD11 در سلول های اپیدرمال می شود که در آن پیوند NSP1 به ENOD مستلزم NSP2 می باشد (آندریانکاجا و همکاران، 2007؛ هیرسچ و همکاران، 2009). مطالعات هیرسچ و همکاران (2009) نشان داده است که علاوه بر پیوند به ENOD11، پیوند NSP1 به ترویج دهنده ERN1 و NIN برای توالی آنها ضرورت دارد. این روند نشان می دهد که NSP1، NSP2، ERN1 و NIN همگی به منظور تنظیم توالی ENODs در اپیدرمی فعالیت می کند (تصویر 2).

مطالعات صورت گرفته در مورد ژنتیک و تعامل پروتئین – پروتئین موجب شناسایی اجزای پروتئین شده که با CCaMK تعامل داشته و برای سیگنال دهی NF و توسعه گره الزامی می باشند که به عنوان پروتئین تعاملی DM13 (MtIPD3) و LjCYCLOPS شناخته می شود (مسینز و همکاران، 2007؛ یانو و همکاران، 2008). طبق پیش بینی این پروتئین ها از طریق حوزه مارپیچ حوزه C وارد تعامل شده و موجب تراجایی سیگنال اسپایک کلسیم و تنظیم توالی NSP1 می شوند (اسمیت و همکاران، 2005).

مولفه های سیگنال دهی دارای عملکرد موازی با زنجیره پلّه ای سیگنال دهی NF بوده و برای وقایع آلودگی باکتری که از طریق فعالسازی NF LRR RLK آغاز می شوند ضرورت دارند (تصویر 2). یکی از چنین مولفه هایی ردوکتاز 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA در M.truncatula است که به احتمال زیاد در بیوسنتز فیتوهورمون های بدست آمده از ایزوپرنوید نقش دارد که سیتوکینین و براسیونتروید از آن جمله است (کوی و همکاران، 2007). هر چند نقش دقیق HMGR در توسعه گره هنوز مشخص نیست. پروتئین تعاملی SymRK مربوط به ال.ژاپونیکوس و رشد قطبی ریزوبیوم M.truncatula نیز وارد تعامل با LRR RLK می شود، LjSIP1 یک فاکتور تراجایی قابل پیوند به ترویج دهنده NIN برای تنظیم آلودگی باکتریایی می باشد (زو و همکاران، 2008)، MtRPG یک پروتئین مارپیچ است که در نوکلئوس قرار داشته و برای آلودگی باکتریایی ضرورت داشته، در هدایت رشد قطبی رگه های آلوده نقش دارد (آریگی و همکاران، 2009). هر چند در این مورد نیز همچون MtHMGR باید اطلاعات بسیاری بدست آید که در مورد چگونگی عملکرد LjSIP1 و MtRPG در گیاه است.

فاکتورهای دیگری نیز در توسعه گره نقش دارند که مشتمل بر LjCERBERUS، فاکتور 1 واکنش اتیلن و فاکتور واکنش اتیلن مورد نیاز برای تمایز گره می باشد (اسامیزو و همکاران، 2008؛ ورنی و همکاران، 2008غ یانو و همکاران، 2009). لازم به ذکر است که LjERF1 و MtEFD عبارت از فاکتورهای تراجایی است درحالیکه LjCERBERUS یک پروتئین باکس U می باشد. تمامی آنها در نوکلئوس قرار داشته و در آلودگی باکتریایی نقش دارند (تصویر 2). هر چند نقش دقیق آنها در اندامزایی گره هنوز بطور کامل مشخص نشده است.

**واکنش های اپیدرمال و کورتیکال در طول مراحل اولیه گره زایی**

انواع متعدد سلولی و لایه های آن باید اقدام به همگام سازی توسعه خود به منظور دستیابی به اندامزایی گره نمایند. در واقع به دنبال ادارک NF در اپیدرمی، واکنش های سریع آن در ریشه داخلی شناسایی میشود. ترتیب های سیتواسکلتی نیز در سلول های پیش چرخه M.truncatula طی 16 ساعت مایه کوبی ریزوبیا شناسایی شده و توالی ENOD40 در سلول های کورتیکال شبدر سفید طی 24 ساعت از مایه کوبی ریزوبیا مشخص شده است (متیوز و همکاران، 2000). به منظور دست یافتن به چنین واکنش های سریعیدر ریشه داخلی بعد از درمعرض گذاری ریشه خارجی در برابر ریزوبیا/NF برخی اشکال ارتباطات سیگنال دهی لازم به نظر می رسد.

عملکردهای گیرنده سیتوکینین در کورتکس ریشه وجود داشته و برای تقسیمات سلولی لازم است (تصویر 2). این گیرنده دارای حوزه کیناز هیستیدین می باشد (گونزالز-ریزو و همکاران، 2006؛ تیرچین و همکاران، 2007). دستیابی به جهش های عملکردی در Ljhk1 منجر به گره زایی آنی فنوتیپ در نتیجه تقسیمات کنترل شده سلولی می شود که در کورتکس ریشه صورت می گیرد. مطالعات دیگر نیز نشان داده است که فروتنظیم یا تضعیف عملکرد این گیرنده سیتوکینین منجر به کاهش چشمگیر تعداد گره حاصل از عدم توانایی گیاه در تشکیل پریموردیای گره می شود (گونزالز – ریزو و همکاران، 2006؛ مورای و همکاران، 2007). آلودگی ریزوبیا هنوز هم صورت می گیرد ولی رگه های آلوده قابلیت جهت یابی خود را از دست داده و بجای رشد بسوی کورتکس ریشه بصورت درهم پراکنده می شوند (مورای و همکاران، 2007). این روند نشان می دهد که آلودگی باکتری نیاز به شکل گیری پریموردیای گره یا گیرنده سیتوکینین ندارد، بلکه هر دو مورد متعاقباً برای هدایت رشد رگه مورد نیاز خواهد بود.

چنانچه قبلاً نیز گفتیم تضعیف عملکردی جهش های Mtdmi3 نشان از فنوتیپ غیر گرهی در نتیجه نیاز به فعالیت CCaMK در اپیدرمی دارد. هر چند همانند گیرنده سیتوکینین، دستیابی به عملکرد جهش های CCaMK منجر به گره زایی آنی در نتیجه تقسیمات کنترل شده سلولی می شود که در کورتکس روی میدهد (گلیسون و همکاران، 2006؛ تریچینی و همکاران، 2006). این جهش همچنین موجب توالی اپیدرمی ENOD11 در یک الگوی مشابه گیاهان مایه کوبی شده با ریزوبیای سازگار می شود (گلیسون و همکاران، 2006). از این رو CCaMK برای وقایع روی داده در هم ایپدرمیز و هم کورتکس ضرورت دارد و شامل مسیرهای کاملاً متفاوت است (تصویر2).

همچنین NSP1 و NSP2 که در پایین دست CCaMK در اپیدرمی به عنوان بخشی از مسیر سیگنال دهی NF عمل می کند برای تقسیم سلولی در کورتکس ریشه ضرورت دارد (تصویر 2؛ هکمن و همکاران، 2006). مطالعات صورت گرفته با استفاده از جهش های CCaMK و گیرنده سیتوکینین نشان داده است که فنوتیپ گره زایی آنی آنها در فقدان نسخه های عملکردی NSP1 یا NSP2 ملغی شده است (گلیسون و همکاران، 2006؛ تیریچینی و همکاران، 2007). پس نه تنها NSP1 و NSP2 بصورت پایین دست CCaMK در اپیدرمیز عمل می کنند بلکه در پایین دست CCaMK و گیرنده سیتوکینین کورتکس نیز نقش دارند.

یک فاکتور دیگر رونویسی، MIN، نیز در سلول های اپیدرمال و کورتیکال نقش دارد. گیاهان جهشی نین دارای پیچش مضاعف ریشه بوده و آلودگی ریزوبیا را در اپیدرمی بلوکه می کنند (شوسر و همکاران، 1999). در کورتکس گیاهان جهشی نین قادر به آغاز تقسیمات سلولی و شکل گیری متعاقب پریموردیوم گره نمی باشند. علاوه بر آن عملکرد نین برای توسعه گره در CCaMK ضرورت داشته و جهش های گره آنی گیرنده سیتوکینین نیز چنین بوده و گفته می شود که نین به دنبال فعالسازی CCaMK و گیرنده سیتوکیننی فعال می شود (تریچینی و همکاران، 2006، 2007؛ مارش و همکاران، 2007). این ویژگیهای مشابه موارد مشاهده شده در جهش های nsp است. هر چند بر خلاف جهش های nsp، جهش های نین نشان از توالی بیشتر ENDO11 در امتداد اپیدرمی ریشه دارد. از این رو نین به عنوان تنظیم کننده منفی سیگنال دهی NF برای تنظیم توالی فضایی ENOD11 در اپیدرمی ریشه عمل می کند (مارش و همکاران، 2007). علاوه بر آن توالی نین در نتیجه سیتوکینین یا NF حاصل شده و بیش از پیش از این ایده پشتیبانی می کند که نین بصورت مثبت موجب تنظیم تقسیم سلولی می شود. هر چند عملکرد دقیق نین در سطح مولکولی باید مشخص شود.

اینکه گیرنده سیتوکینین برای توسعه گره ضرورت دارد حاکی از این واقعیت است که هورمون گیاهف سیتوکینین، یک مولفه کلیدی اندامزایی گره می باشد. در واقع به نظر می رسد که سیتوکینی می تواند یک گره متحرک باشد که موجب ارتباطات گیرندگی اپیدرمال NF را در ریشه درونی فراهم می آورد (تصویر 2). همچنین ABA عموماً به عنوان تنظیم کننده منفی توسعه گره در نظر گرفته شده و به نظر می رسد که هم در اپیدرمیز و هم کورتکس نقش دارد (دینگ و همکاران، 2008؛ بیسواز و همکاران، 2009). هورمون های گیاهی دیگر نیز در توسعه گره نقش دارند که از آن جمله می توان به تنظیم کننده های مثبت چون اوکسین، براسینوستروئید و تنظیم کننده های منفی چون گونه های واکنشی اکسیژن (ROS)، جاسمونیک اسید (JA) و اتیلن اشاره نمود (فرگوسن و متیوز، 2003؛ فرگوسن و همکاران، 2005؛ سان و همکاران، 2006؛ کینکما و گرسهاف، 2008؛ متیوز، 2008). هر چند در مورد بسیاری از این سیگنال ها، نقش مستقیم در گره زایی باید بطور کامل مشخص شود و عملکرد آنها در فرآیندهای غیرمستقیم همچون تقسیم سلولی، تمایز و نگهداری نهفته است.

**فرآیند تنظیم ذاتی گره زایی**

تعدادی از فاکتورهای دیگر بیرونی و درونی وجود دارد که به عنوان تنظیم کننده منفی گره زایی عمل میکند. جهش های ناتوان از سنتز یا درک این فاکتورها نشان از افزایش تعداد گره ها دارد. بسیاری از این فاکتورها در تنظیم ذاتی مسیر گره زایی مشتمل بر سیگنال دهی طولانی ریشه به جوانه نقش دارند (تصویر 3). آغاز AON در طول توسعه گره از طریق سنتز سیگنال بدست آمده از ریشه بنام Q صورت می گیرد. تحقیقات اخیر نشان داده است که Q به احتمال زیاد یک پپتید مربوط به CLAVATA3/ESR (CLE) است. آزمایش های پیوندزنی (دلوز و همکاران، 1986) نشان داده است که Q بعد از مایه کوبی با ریزوبیا به جوانه می رود که در آنجا توسط یک AON LRR RLK دارای حوزه کیناز سرین/تریونین ادارک می شود (کروسل و همکاران، 2002؛ نیشی مورا و همکاران، 2002 الف؛ سیارل و همکاران، 2003؛ شانبل و همکاران، 2005). این AON LRR RLK مشابه بسیاری از گیرنده های کیناز دیگر در گیاهان و حیوانات بوده و بطور ویژه در فیلوم توالی می یابد. هنوز مشخص نیست که آیا عملکردهای آن مستقل بوده و یا در قالب بخشی از همودیمر یا هترودیمر با گیرنده دیگر کیناز صورت می گیرد که برای دریافت سیگنال Q می باشد (تصویر 4 الف).

**تصویر 3.** تنظیم ریزوبیا و نیترات گره زایی از طریق تنظیم خودکار گره زایی (AON)

گیاه دارای مکانیسم های تنظیمی درون ساختاری برای کنترل تعداد گره زایی می باشد. ریزوبیا بطور سیستماتیک اقدام به تنظیم گره زایی از طریق آغاز نمودن تولید یک سیگنال تحریک کننده AON می نماید که Q نامیده می شود، و در برخی مراحل در طول تقسیم سلولی روی می دهد. همچنین نیترات موجب تولید یک مولکول سیگنال Q می شود که قادر به انگیزش فعالیت AON است. شواهد اخیر حاکی از آن است که مولکول های سیگنال Q بسیار مشابه پپتیدهای مربوط به ClAVATA3/ESR (CLE) می باشند، Q بدست آمده از ریبوزیا طی مسافت طولانی به برگ انتقال داده می شود و در آنجا Q ناشی از نیترات بصورت موضعی در ریشه عمل می کند. جالب اینجاست به نظر می رسد که تکرار مشابه کیناز شبیه گیرنده و غنی از لئوسین در دریافت Q ناشی از ریبوزیا در برگ نقش داشته و Q ناشی از نیترات در ریشه چنین وضعیتی دارد. ادارک مولکول های Q منجر به تولید یک فاکتور بازدارنده می شود که گره زایی بیشتر را در ریشه فرو می نشاند.



تقسیم سلولی

گرهزایی اولیه

فاکتور نود

نیترات

ریزوبیا

فلاونوید

توسعه بیشتر گره

سیگنال کوتاه

سیتوکینین

ریزوسفر

کورتکس و پیش چرخه ریشه

اپیدرمی

انتقال اگزیلم

سیگنال طولانی Q-CLE

انتقال فیلوم

فیلوم برگ

**تصویر 4.** تکرار کیناز شبیه به گیرنده غنی از لئوسین (LPR RLK) در تنظیم اعداد گره زایی لگیوم.

(الف) مکانیسم پیشنهادی مولکولی تنظیم خودکار ترارسانی سیگنال گره زایی (AON). چنین گفته می شود که مولفه های تحریک کننده عبارت از پپتیدهای مربوط به ClAVATA3/ESR (CLE) هستند که در ریشه به دنبال مایه کوبی ریبوزیا یا فرآوری نیترات سنتز شده اند. همچنین LRR RLK لیگاند محرک را در آپوپلاست شناسایی می کند و موجب آغاز وقایع سیگنالی پایین دست در سیتوزول می شود. ادارک لیگاند موجب فسفریلاسیون حوزه کیناز LRR RLK می شود. لازم به ذکر است که KAPP1 و KAPP2 بصورت متعاقب ترنس فسفریلات شده و در عوض موجب فسفریلات زدائی حوزه کیناز LRR RLK می شوند. سیگنال های حاصل به چندین افکتور ناشناخته پایین دست رله می شود. فعالسازی LRR RLK موجب آغاز تولید یک فاکتور ناشی از جوانه می شود که از گره زایی بیشتر جلوگیری می کند.

(ب) ساختار فرضی پروتئین حوزه LRR دانه سویا LRR RLK، *GmNARK* نشان دهنده حوزه پیوندی و فرضی CLE است.

(ج) مطالعات پیوندزنی کلاسیک از نوع وحشی و اَبَر گره زای متقابل گیاهان استفاده می کند که نشان می دهد عملکردهای LRR RLK در جوانه برای کنترل تعداد گره های ریشه صورت می گیرد. اخیراً یک نقش دیگر، و کمتر بارز شده LRR RLK در ریشه با فرآوری گیاهان پیوند زده شده یا سطح بالای نیتروژن، ژنوتیپ جهشی M؛ WT، ژنوتیپ نوع وحشی تعیین شده است.



سیتوزول

تعداد گره

حساسیت نیترات

ریشه

جوانه

حوزه کیناز

حوزه تراجایی

گره

بازداری گره

غشای پلاسما

حوزه تکرار گیرنده غنی از لئوسین

آپوپلاست

تحقیقات اخیر در مورد لوبیا اجزای جدیدی را نشان داده که تعامل مستقیم با AON LRR RLK یا عملکردهای پایین دست فعالیت آن در تنظیم AON دارد (تصویر 3). از آن جمله می توان به ژنهای رمزنویسی برای فسفاتاز پروتئین مربوط به کیناز، GmKAPP1 و GmKAPP2 اشاره نمود (میاهارا و همکاران، 2008). این ژن ها می توانند عملکرد مستقیم در تبدیل فعالیت GmNARK به عنوان بخشی از گذرگاه تراجایی سیگنال GmNARK داشته باشند. همچنین امکان ترنس فسفریلاته آنها توسط حوزه کیناز GmNARK وجود داشته و به نوبه خود موجب دفسفریلیته گیرنده GmNARK می شود (تصویر 4 الف). سیگنال حاصل از این تعامل از GmNARK رله شده و به افکتورهای متعدد و ناشناس پایین دست می رسد.

ادارک Q توسط AON LRR RLK در برگ منجر به تولید یک بازدارنده جدید بدست آمده از جوانه می شود که SDI نام دارد. به نظر می رسد که عامل بازدارنده وارد آوند آبکش شده و به سمت ریشه پائین می رود و در آنجا برای بازداری از گره زایی بیشتر وارد عمل می شود (گرسهاف و دلوز 1986؛ لین و همکاران، 2009) (تصویر 3). تحقیقات اخیر با استفاده از دانه سویا نشان داده است که SDI کوچک بوده (kDa 1 > )، در برابر گرما پایدار می باشد، وابسته به NF بوده و نیاز به فعالیت GmNARK برای بیوسنتز خود دارد و احتمال آنکه یک RNA یا یک پروتئین باشد ضعیف است (لین و همکاران، 2009).

اخیراً آنالیز GeneChip و واکنش زنجیره پلیمراز بلادرنگ (PCR) برگ سویای تلقیح نشده متفاوت در عملکرد *GmNARK* حاکی از تنظیم جدید اعضای گذرگاه اکتادکانوید بوده است (کینکما و گرسهاف، 2008). این روند نشان از نقش جاسمونیک اسید، یک هورمون جدید گیاهی (مربوط به پروستاگلادینیز در انسان) در AON دارد (تصویر 3). علاوه بر آن، این ژن ها به عنوان کاندید افکتورهای پایین دست فعالیت GmNARK مورد توجه قرار می گیرند. ابزارهای عملکردی معکوس ژنتیکی همچون فرونشاننده ناشی از ویروس ژن (VIGS) در تصدیق آن مثمر خواهد بود که آیا این فاکتورها و GmKAPPs فی الواقع مولفه های اصلی چرخه سیگنال بندی AON می باشد یا نه.

ژن های ویژه ریشه در نخود (*PsNOD3،* پستما و همکاران، 1988) و ال. ژاپونیکوس (LjRDH1، ایشی کاوا و همکاران، 2008؛ LjTML، میگوری و همکاران، 2009) شناسایی شده که به احتمال قوی در بیوسنتز Q یا تراجایی آن و یا در ادارک SDI در ریشه نقش دارد. کارهای اخیر با استفاده از فنون شیوه پیوندزنی نشان داده است که عملکردهای احتمالی PsNOD3 در ریشه قبل از فعالسازی AON LRR RLK در برگ روی داده است. از این رو می توان گفت PsNOD3 نیز در تولید یا انتقال Q در ریشه نقش دارد (لی و همکاران، 2009).

تعدادی از ژن های دیگر نیز به عنوان تنظیم کننده های تعداد گره شناخته شده است. مطالعات صورت گرفته در مورد پیوندزنی نشان داده است که *LjKLAVIER* دارای نقش ویژه ریشه در تنظیم تعداد گره است (اکا- کیرا و همکاران، 2005). هر چند هویت این ژن هنوز نامشخص است. تضعیف عملکردی فاکتور تراجایی ERF ، *MtEFD*، منجر به افزایش تعداد گره شده و سیگنال بندی سیتوکینین را دگرگون می نماید (ورنی و همکاران، 2008). جالب آن است که *LjSTARAY* که رمزنویسی فاکتور تراجایی bZIP را با موتیف انگشتی رینگ انجام می دهد موجب تنظیم سیگنال بندی سبک و فوتومورفوژنیک شده و نیز گره زایی را تنظیم می کند که همگام با تضعیف عملکردی جهش ها و افزایش تعداد گره ها می باشد (نیشی مورا و همکاران، ب 2002). هنوز نمی دانیم که آیا عملکرد این ژن ها با AON بطور مستقیم صورت می گیرد یا غیرمستقیم.

فاکتورهای دیگر که موجب کاهش تعداد گره می شود شامل اتیلن و نیترات می باشد (کارول و همکاران، 1985؛ گوئینل و گیل، 2002؛ فرگوسن و متیوز، 2003؛ فرگوسن و همکاران، 2005؛ گرسهاف و همکاران، 2009؛ لوهار و همکاران، 2009). اتیلن عمدتاً از طریق فشار حاصل شده و این امکان وجود دارد که یک مکانیسم در بازداری از کاربرد فتوسیمیلیت در توسعه گره نقش داشته باشد، در حالیکه گیاه تحت فشار می باشد. همچنین چون نیتروژن جزء اصلی مورد نیاز گیاه در سیمبیوسیز لگوم – ریزوبیا است بسیار محتمل به نظر می رسد که یک مکانیسم در بازداری از گیاه در تشکیل گره نقش داشته باشد که مربوط به زمانی است که میزان نیتروژن در ریزوسفیر کافی باشد.

جهش هایی که موجب اختلال توانایی گیاه در دریافت اتلین یا نیتروژن می شود موجب تعدیل ماهیت بازدارنده این فاکتورها شده و منجر به افزایش تعداد گره می گردد. این روند شامل ژن های لازم برای حساسیت و واکنش اتیلن می باشد (پنمزتا و همکاران، 2008؛ لوهار و همکاران، 2009). بعلاوه سیمبیوسیز پایدار نیترات و جهش های آن که بسیاری از گره ها را به هنگام رشد شکل می دهد تحت بازداری نیترات در سویا و نخود تشکیل یافته است (کارول و همکاران، 1985؛ دلوز و همکاران، 1986) ولی ژن های nts در AON همچنان بصورت کلونی باقی می ماند.

کارهای اخیر بصورت جالب توجهی نشان داده است که بازداری نیترات از گره زایی موجب عملکرد از طریق یک فراتنظیم در توالی نیترات حاصل از پپتید CLE در ریشه می شود (اوکاموتو و همکاران، 2009؛ دی رید، فرگوسن و گروسهاف، 2009؛ گروسهاف و همکاران، 2009) (تصویر 3 و 4 ج). این پپتید CLE ناشی از نیترات بسیار مشابه پپتید Q CLE ناشی از ریبوزیا است. هر دو CLEs از سوی AON LRR RLK مشابه دریافت می شود و فقط CLE ناشی از نیترات دارای پویایی اندک و عدم تحرک بوده و در ریشه ادارک میشود در حالیکه CLE ناشی از ریزوبیا دستخوش انتقال طولانی گشته و در جوانه ادارک می شود. این واقعیت که گیرنده مشابه برای درک هر دو پپتید Q لازم است نشان دهنده دلیل آن است که چرا تمامی جهش های nts سویا و نخود هم متحمل نیترات بوده و هم مدافع AON می باشد.

**نتیجه گیری و چشم اندازها**

مزایای محیطی و زراعی حبوبات طی سده های متمادی مشخص شده است. طی 10 سال گذشته درک ما از فرآیند گره زایی که تا حد زیادی مسئول این منافع می باشد بصورت قابل توجهی افزایش یافته است. این روند را می توان به پیشرفت های صورت گرفته در ابزارهای موجود و فنآوری های مرتبط دانست که همگام با استفاده از حبوبات مدل و برنامه های موتاژنی موجبات شناسایی بسیاری از ژن های کلیدی گره زایی را فراهم آورده است. البته سوالات بسیار دیگری نیز بدون جواب مانده است: هماهنگی پویای سیگنال برنامه های توسعه اپیدرمیز و کورتکس کدام است؟ چرا سه نوع گیرنده متفاوت NF وجود دارد و عملکرد آنها در دریافت NF و تعامل آنها چگونه است؟ آیا LRR RLK برای AON در جوانه ضرورت داشته و نقش دوگانه ای برای تنظیم نیتروژن گره زایی در ریشه ایفاء می کند؟

با برخورداری از فنآوری های بعدی و توالی های نسبتاً کامل ژنومی، موج جدیدی از ژن های نوین مورد نیاز برای اندامزایی گره به راه افتاده که مشتمل بر miRNAs بوده و بدون شک مشخص خواهد شد. استفاده متعاقب فنون پیشرفته همچون RNAi و VIGAS به تصدیق قابلیت عملکردی این ژن ها بدون نیاز به تولید خطوط جهش ثابت یاری می رساند. علاوه بر آن حساسیت فزاینده ابزارهای تحلیلی موجب حصول اطمینان از پیشرفت های مستمر در بیوشیمی گره زایی شده است. هر چند کاستی های زیادی در پایه دانش همچنان وجود دارد که باید بطور مستمر مورد بررسی قرار گیرد و در سطح جهانی هرگز در زمینه گره زایی حبوبات تجربه نشده است.