

تغییرات بیان ژن‌های دفاعی در ریشه‌های خیار پس از مایه‌زنی با تریکودرما، سودوموناس و ترکیب آن‌ها*

حمیدرضا علیزاده^{۱*}، کیوان بهبودی^۲، مسعود احمدزاده^۲، محمد جوان‌نیکخواه^۲ و پیتر باکر^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۱۰)

چکیده

در طبیعت گیاهان در معرض طیف وسیعی از میکروب‌ها که باعث بروز بیماری‌ها و یا بهبود رشد و کمک به گیاه جهت غلبه بر تنش‌های زنده و غیر زنده می‌شوند قرار می‌گیرند. مهم‌ترین میکروب‌های مفید، گونه‌های تریکودرما و سودوموناس‌های فلورسنت می‌باشند. در این تحقیق اثر سویه‌های *Trichoderma harzianum* Tr6 و *Pseudomonas sp.* Ps14 که از فراریشه خیار جداسازی شده و قادر به القاء مقاومت در این گیاه بودند، بر سیستم ایمنی خیار با ارزیابی کمی تغییرات بیان ژن‌های دفاعی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان ژن‌های دفاعی بتا-۱ و ۳-گلوکاناز و کیتیناز به طور گذرا بعد از مایه‌زنی ریشه‌ها با این میکروب‌های مفید افزایش می‌یابند. افزایش بیان گذرای ژن‌های *PRI* و *LOXI* نیز پس از مایه‌زنی با Tr6 و ترکیب آن با Ps14 دیده شد. در حالی که مایه‌زنی با Ps14 فقط افزایش بیان *LOXI* را در پی داشت. این یافته‌ها دلالت بر این دارد که در ابتدا سیستم دفاعی گیاه در مقابل این میکروب‌های مفید فعال شده و سپس این میکروب‌ها با سرکوب سیستم دفاعی گیاه ارتباط همیاری با گیاه برقرار می‌کنند.

کلیدواژه: فعال شدن سیستم دفاعی، میکروارگانیزم‌های همیار، سرکوب سیستم ایمنی

* بخشی از رساله دکتری نگارنده اول، ارائه شده به گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: h_alizadeh48@yahoo.com

۱. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت.

۲. به ترتیب دانشیار و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج.

۳. استاد گروه بیولوژی دانشگاه اترخت، هلند.

Changes in defense genes expression in cucumber root after inoculation with *Trichoderma*, *Pseudomonas* and their combination *

H. Alizadeh^{1**}, K. Behboudi², M. Ahmadzadeh³, M. Javan-nikkhah³ and P.A.H.M. Bakker⁴

(Received: 7.7.2013; Accepted: 1.8.2015)

Abstract

In nature, plants are exploited by a plethora of microbes species that can cause severe diseases or establish beneficial relationships with them and improve plant growth or help the plant to overcome biotic or abiotic stresses. *Trichoderma* and fluorescent pseudomonads are the most useful beneficial microbes. In this study, the effects of *Trichoderma harzianum* Tr6, *Pseudomonas* sp. Ps14 and their combination, which isolated from cucumber rhizosphere and were able to induce resistance on cucumber, were evaluated on cucumber immune system by evaluation of defense gene expression. The results showed that expression of β -1,3-glucanase and chitinase transiently increased after inoculation with both microbes. The transient increase of expression of *PR1* and *LOXI* was observed after inoculation with Tr6 and its combination with Ps14, whereas only *LOXI* was increased after inoculation with Ps14. These findings indicate that the plant defense system was activated against beneficial microbes but later these microbes actively suppress the immune system of plants to establish a mutualistic interaction.

Keywords: immune system of plant, mutualism, suppress of immune system

* Part of Ph.D. Thesis of The First Author Submitted to College of Agric., Univ. of Tehran, Tehran, Iran

** Corresponding author's E-mail: h_alizadeh48@yahoo.com

1. Assis. Prof. of Plant Pathol., Univ. Jiroft, Jiroft, Iran.

2. Aso. Prof. of Plant Pathol., Univ. Tehran, Tehran, Iran.

3. Prof. of Plant Pathol., Univ. Tehran, Tehran, Iran.

4. Assis. Prof. of Plant Pathol., Utrecht Univ., Utrecht, Netherlands.

مقدمه

میکروب‌های همزیست و همیار همانند بیمارگرها در ابتدا به عنوان ارگانیسم‌های بیگانه توسط گیاه شناسایی می‌شوند و سیستم ایمنی گیاه علیه آنها فعال می‌شود (Zamioudis & Pieterse 2012). گیاهان با مکانیسم‌های مختلفی میزان کلینزاسیون میکروب‌های همزیست و همیار را مهار و تنظیم می‌کنند. تجمع سالیسیلیک اسید (SA) در گیاهان کلنیزه شده توسط این میکروب‌های مفید گزارش شده که به نظر می‌رسد گیاهان از مکانیسم فعال کردن پیام‌دهی SA برای محدود کردن کلینزاسیون استفاده می‌کنند (Schafer et al. 2009b, Van der Ent et al. 2009). اتیلن نیز دارای نقش حیاتی در تنظیم تعادل بین گیاه و میکروب‌های مفید می‌باشد و نقش افزایش اتیلن در کاهش کلینزاسیون گزارش شده است (Camehl et al. 2010). دیواره سلولی برخی سودومونادهای فلورسنت القاء کننده مقاومت، واکنش‌های دفاعی همچون افزایش فرم‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species ROS) افزایش Ca^{2+} و بیان ژن‌های دفاعی همچون *PAL* و *GST* را در سوسپانسیون سلولی توتون سبب شده‌اند (Van Loon et al. 2008). همچنین سلول‌های کشته شده با حرارت باکتری *P. fluorescens* WCS417 باعث فعال شدن ژن‌های دفاعی و رسوب کالوز در ریشه‌های آرابیدوپسیس شده است (Millet et al. 2010). مایه‌زنی ریشه‌های خیار با *T. harzianum* T203 باعث افزایش فعالیت پراکسیداز و کیتیناز (Yedidia et al. 1999) و افزایش بیان ژن‌های *LOX1* و *PAL1* به صورت گذرا پس از مایه‌زنی ریشه‌ها با *T. asperellum* T203 شده است (Shoresh et al. 2005).

برای استقرار یک برهم‌کنش دو جانبه با گیاه، میکروب‌های مفید باید بر واکنش‌های ایمنی گیاه که علیه آنها فعال شده غلبه کنند (Zamioudis & Pieterse 2012).

در طبیعت گیاهان در معرض طیف وسیعی از میکروب‌های بیمارگر قرار می‌گیرند که می‌توانند باعث بروز بیماری و ایجاد خسارت گردند. از طرف دیگر، ارتباطات مفید بین گیاهان و میکروارگانیسم‌ها نیز به فراوانی دیده می‌شود. میکروارگانیسم‌های مفید اغلب در فراریشه استقرار یافته و باعث بهبود رشد و کمک به گیاه جهت غلبه بر تنش‌های زنده و غیر زنده می‌شوند. تفاوت جامعه میکروبی فراریشه با خاک اطراف بیانگر نقش گیاهان در تغییر جامعه میکروبی اطرافشان می‌باشد (Badri & Vivanco 2009, Bais et al. 2004, Bisseling et al. 2009, Mendes et al. 2011).

گروهی از میکروارگانیسم‌ها همچون ریزوباکترهای بهبود دهنده رشد گیاه (Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) و قارچ‌های بهبود دهنده رشد گیاه (Plant growth promoting fungi, PGPF) از جنس‌های مختلف به خصوص سودومونادهای فلورسنت و تریکودرما رابطه همیاری (Mutualism) با گیاهان دارند و می‌توانند از طریق تجزیه آلاینده‌های خاک، سرکوب عوامل بیمارگر گیاهی، تولید محرک‌های رشدی گیاه و یا با القای مقاومت سیستمیک (Induced systemic resistance) ISR علیه طیف وسیعی از عوامل بیمارگر گیاهی، اثرات مفیدی بر گیاهان داشته باشند (De Vleeschauwer & Höfte 2009, Harman et al. 2004, Lugtenberg & Kamilova 2009, Pozo & Azcón-Aguilar 2007, Shoresh et al. 2010, Van der Ent et al. 2009a, Van Loon et al. 1998).

پیام‌های ایمنی در گیاهان، پس از درک مولکول‌های محرک (Elicitor) توسط دریافت کننده‌های گیاهان آغاز و منجر به فعال شدن سیستم ایمنی گیاه می‌شود (Boller & Felix 2009, Jones & Dangl 2006). هر دو گروه

تیمار گیاهان خیار با تریکودرما، سودوموناس و ترکیب آنها در یک دوره زمانی صفر تا ۹۶ ساعت پس از تیمار مورد بررسی قرار گرفت و مسیر پیام‌رسانی فعال شده توسط گیاه جهت مهار کلینزاسیون و مسیر پیام‌رسانی فعال شده توسط میکروب مفید جهت سرکوب دفاع و کلینزاسیون مورد تفسیر قرار گرفت.

مواد و روش‌های بررسی

سویه‌های تریکودرما و سودوموناس

در این تحقیق از سویه‌های *Trichoderma harzianum* Tr6 و *Pseudomonas sp.* Ps14 که از فراریشه خیار جداسازی شده و قادر به القاء مقاومت سیستمیک در خیار بودند، استفاده شد (Alizadeh et al. 2013). برای تهیه مایه قارچ جهت مایه‌زنی، سویه Tr6 در تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA برای هفت روز در ۲۴°C رشد داده شد. کنیدیوم‌های حاصله در سطح تشتک در سولفات منیزیم ۰/۰۱ مولار سترون سوسپانسیون و با پشم شیشه سترون ریشه‌ها از سوسپانسیون حاصله جدا گردید. تعداد اسپور در میلی‌لیتر به وسیله هماسیتومتر اندازه‌گیری شد. سوسپانسیون اسپور به گلدان‌ها اضافه شد تا جمعیت 10^5 اسپور به ازاء هر گرم خاک گلدان حاصل شود (Segarra et al. 2009).

باکتری Ps14 در محیط کشت KB آگار در ۲۸°C به مدت یک شب کشت داده شد. سپس پرگنه‌های باکتری رشد یافته در سطح تشتک در سولفات منیزیم ۰/۰۱ مولار سوسپانسیون شد و پس از دو بار شستشو و رسوب دادن با سانتریفوژ میزان جذب سوسپانسیون باکتری با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و با اضافه کردن سولفات منیزیم ۰/۰۱ مولار میزان جذب به یک (معادل 10^9 سلول در میلی‌لیتر) رسانده شد. مقدار لازم

میکروب‌های مفید از مکانیسم‌های مختلفی برای تعدیل سیستم ایمنی گیاهان استفاده می‌کنند. این مکانیسم‌ها شامل تنوع فازی (Phase variation) (Achouak et al. 2004)، بکار گرفتن مولکول‌های افکتور، سرکوب دفاع وابسته به اتیلین با تجزیه ACC-1 (Aminocyclopropane-1-carboxylate) (Glick et al. 2007, Verhagen et al. 2004, Wang et al. 2005) فعال کردن مسیر جاسمونیک اسید (JA) که مانع از فعالیت مسیر SA می‌شود (Millet et al. 2010)، تولید مولکول‌های شبه هورمونی از قبیل جیبرلین و اکسین که از طریق تداخل (Cross talk) با SA این مسیر را سرکوب و کلینزاسیون خود را میسر می‌نمایند (Lugtenberg & Kamilova 2009, Sirrenberg et al. 2007).

اولین آنزیم در مسیر بیوستنز جاسمونیک اسید لیپوکسی ژناز *LOX* می‌باشد. آنزیم *LOX* باعث تبدیل لینولئیک و لینولئیک اسید به JA می‌شود. نقش *LOX* در پاسخ‌دهی به بسیاری از تنش‌های زنده و غیر زنده در گیاهان گزارش شده است (Melan et al. 1993, Shores et al. 2005). کیتینازها نیز از آنزیم‌های مهم گیاهی هستند که در تجزیه کیتین دیواره سلولی قارچ‌های بیمارگر نقش دارند (Sahai & Manocha 1993). این آنزیم‌ها متعلق به خانواده PR3 می‌باشند. *Chitinase1 (Chit1)* یک عضو از کیتینازهای کلاس III می‌باشد (Shores et al. 2005). بتا ۱ و ۳ گلوکاناز (یکی از اعضاء خانواده PR2) در تجزیه دیواره سلول قارچ‌ها نقش داشته و بعد از حمله بیمارگر در گیاه القاء شده و باعث هیدرولیز بتا گلوکان که یکی از اجزاء اصلی دیواره سلول قارچی است، می‌شود و نقش مهمی در دفاع گیاه بازی می‌کند (Doxey et al. 2007).

در این پژوهش روند تغییرات کمی بیان ژنهای دفاعی *PR1*، بتا ۱ و ۳ گلوکاناز، کیتیناز، *PAL* و *LOX1* پس از

درآمدند. پودر حاصله در لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری که با فرو بردن در نیتروژن مایع خنک شده بود، ریخته شد (در هر لوله حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه خرد شده) و تا مرحله بعدی در نیتروژن مایع نگه‌داری شدند. استخراج RNA با کیت (RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) سازنده انجام شد. کارایی استخراج RNA با روش الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین و غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. جهت حذف DNA ژنومی، RNA استخراج شده با DNase تیمار شد. بدین منظور ۲/۵ میکروگرم از RNA به یک لوله منتقل و سه میکرولیتر از بافر ۱۰X (Ambion DNase free buffer) و ۰/۷۵ میکرولیتر آنزیم DNase (Ambion, CA, USA) به آن اضافه شد. حجم نهایی با اضافه کردن آب مقطر میلی‌کیو (MQ) عاری از RNases به ۳۰ میکرولیتر رسانده شد. لوله‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷°C قرار داده شدند. سپس ۰/۷۵ میکرولیتر دیگر آنزیم به هر لوله اضافه و لوله‌ها برای مدت ۴۵ دقیقه دیگر در ۳۷°C قرار داده شد. سپس شش میکرولیتر (۰/۲ حجم) از محلول متوقف کننده (Stop solution) (Ambion, CA, USA) به هر لوله اضافه و به مدت دو دقیقه در دمای اتاق قرار داده، سپس به مدت ۱/۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ و در آخر RNA عاری شده از DNA بدون برداشتن محلول متوقف کننده به لوله جدید عاری شده از RNase منتقل شد.

برای کنترل عملکرد DNase و عاری بودن RNA استخراجی از آلودگی به DNA ژنومی یک PCR با زوج آغازگر بـا تـوالی مسـتقیم 5'-GTCAAATACTGGGAAGATC-3' و معکوس 5'-TTTGAGGTAGGAAGTGTAGT-3' که یک اینترون

از سوسپانسیون بدست آمده برای رسیدن به جمعیت 10^5 سلول باکتری به ازای هر گرم به خاک اضافه گردید (Leeman et al. 1996).

تهیه نشاهای خیار

بذور خیار پس از ضدعفونی سطحی در محلول سفیدکننده تجارتي 10% به مدت ۳۰ ثانیه و سه بار آبکشی با آب مقطر سترون به مدت ۲۴ ساعت برای جوانه‌زنی بین کاغذ صافی مرطوب سترون در دمای ۲۸°C قرار داده شدند. سپس بذور جوانه‌دار زده در گلدان‌های پر شده با ماسه دو بار سترون شده کشت گردیدند و در اتاقک رشد با دمای ۲۴°C و دوره نوری ۱۴ ساعت و رطوبت نسبی ۷۰٪ رشد داده شدند. نشاها یک روز در میان با آب سترون آبیاری شدند. یک هفته پس از رویش گیاهان ریشه‌های آن‌ها با Ps14، Tr6 و ترکیب آن‌ها (PSTR) با تراکم 10^5 اسپور قارچ و یا سلول باکتری در میلی‌لیتر مایه‌زنی شد. نمونه‌برداری در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی با آنتاگونیست‌ها از ریشه‌ها انجام شد. بدین منظور در هر مرحله زمانی سه گیاه از هر تیمار انتخاب و ماسه بستر با تکان ملایم جدا، ریشه‌ها با آب شیر شستشو، با آب مقطر آب‌کشی، به کمک دستمال کاغذی آبیاری شدند. نمونه‌ها سپس در نیتروژن مایع بسرعت منجمد و در فریزر ۸۰°C- تا مراحل بعدی آزمایش نگهداری شدند. این آزمایش با چهار تیمار شامل Ps14، Tr6 و ترکیب آن‌ها (PSTR) و شاهد با ۲۰ تکرار انجام شد. نمونه‌های شاهد با سولفات منیزیم ۰.۱٪ مولار تیمار شدند.

استخراج RNA

نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۸۰°C- با استفاده از هاون خنک در نیتروژن مایع خرد شده و به صورت پودر

جدول ۱. جفت آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق به همراه توالی نوکلئوتیدی آنها

Table 1. Primers pairs used in this study with their nucleotide sequences

Gene	Forward	Reverse	Reference
<i>EF1α</i>	5'-CTGTGCTGTCCTCATTATTG-3'	5'-AGGGTGAAAGCAAGAAGAGC-3'	Wan <i>et al.</i> 2010
<i>CACS</i>	5'-TGGGAAGATTCTTATGAAGTGC-3'	5'-CTCGTCAAATTTACACATTGGT-3'	Migocka & Papierniak 2011
<i>PR1</i>	5'-TGCTCAAC AATATGCGAACC-3'	5'-TCATCCACCCACAACACTGAAC-3'	Current study
<i>LOXI</i>	5'-CTCTTGGGTGGTGGTGTTC-3'	5'-TGGTGGGATTGAAGTTAGCC-3'	Current study
<i>GLUCANAS</i>	5'-CAATTATCAAACTTGTTCGATGC-3'	5'-AACCGGTCTCGGATACAACAAC-3'	Shoresh <i>et al.</i> 2005
<i>CHIT1</i>	5'-TGGTCACTGCAACCCTGACA-3	5'-AGTGGCCTGGAATCCGACT-3'	Shoresh <i>et al.</i> 2005
<i>PAL1</i>	5'-ATGGAGGCAACTTCCAAGGA-3'	5'-CCATGGCAATCTCAGCACCT-3'	Shoresh <i>et al.</i> 2005

دقیقه در ۵۰°C در آخر ۱۵ دقیقه در ۷۰°C قرار داده شد.

در پایان cDNA حاصل در ۲۰°C - نگهداری شد.

انجام Quantitative real time PCR

برای ژنهای *PR1* و *LOXI* با استفاده از نرم افزار Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) با معیارهایی چون $TM = 60$ و محصول بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ جفت باز آغازگر طراحی شد. توالی آغازگرها از نظر تشکیل آغازگر دایمر و تاخوردگی (Hairpin) با نرم افزار Laserjet کنترل شدند. آغازگرهای مورد نیاز از شرکت Biolegio (هلند) تهیه شدند. آغازگرهای تهیه شده با PCR از نظر تکثیر یک قطعه واحد با cDNA سنتز شده در مراحل قبل مورد آزمایش قرار گرفتند. آغازگرهای ژنهای *CHIT1*، بتا-۱ و ۳- گلوکاناز، *PAL1*، *EF1α* و *CACS* (جدول ۱) انتخاب شدند. ژنهای *EF1α* و *CACS* به عنوان ژنهای مرجع برای خیار انتخاب شدند. مخلوط واکنش PCR شامل: دو میکرولیتر نمونه cDNA (حدود ۰/۰۴ میکرو گرم)، هشت میکرولیتر از مخلوط آغازگر مستقیم و معکوس (غلظت آغازگر یک پیکومول) و ۱۰ میکرولیتر از سایبرگرین میکس (AB Applied Biosystems, Foster, CA) مجموعاً ۲۰ میکرولیتر بود. بعد از اضافه کردن مخلوط فوق به پلیت ۹۶ خانه، با درپوش مخصوص حفره‌ها پوشیده و سپس به مدت یک دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. عملیات Quantitative

را در ژن *HSP70* خیار تکثیر می‌کنند، انجام شد (Wan *et al.* 2010). محلول واکنش PCR شامل یک میکرولیتر آغازگر مستقیم، یک میکرولیتر آغازگر معکوس (غلظت ۱۰ پیکومول)، دو میکرولیتر بافر، ۱۲ میکرولیتر آب مقطر MQ، یک میکرولیتر از نمونه و یک واحد آنزیم تک‌پلیمرز و برنامه دمایی شامل: ۹۵°C به مدت دو دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه و سپس ۳۵ چرخه با ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت یک دقیقه و در پایان شش دقیقه در ۷۲°C برای بسط نهایی چرخه‌ها انجام شد. در آخر محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد جهت مشاهده باندهای احتمالی در صورت آلودگی الکتروفورز گردید.

ساخت cDNA

یک میکروگرم RNA عاری از DNA به لوله عاری از RNases منتقل و به آن یک میکرولیتر آغازگر Oligo dT (محصول شرکت Invitrogen هلند) صد پیکومول در میکرولیتر اضافه و به مدت پنج دقیقه در ۶۵°C قرار داده شد. نمونه‌ها بلافاصله در یخ گذاشته شدند. چهار میکرولیتر بافر (Fermentas, 5X RT buffer EP0452) 5X، دو میکرولیتر از dNTPs ده میلی مول و یک میکرولیتر آنزیم (RevertAid H minus Reverse Transcriptase, Fermentas (EP0452/EP0451) اضافه و به ملایمت مخلوط شد. لوله‌ها سپس به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲°C، ۱۵

ژن *Chit1* در زمان ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی با Tr6، Ps14 و PSTR در همه تیمارها افزایش بیان نشان داد و بیشترین افزایش مربوط به تیمار PSTR و به میزان ۱۵/۱۴ و کمترین مربوط به Tr6 و به میزان ۹/۳۸ برابر نسبت به شاهد بود. در تیمار Tr6 از زمان ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی سیر نزولی آغاز و در تیمارهای Ps14 و PSTR از زمان ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی این سیر آغاز اما در زمان ۹۶ هنوز به سطح اولیه قبل از القاء نرسیده بود (شکل ۱).

ژن *PRI* به عنوان نشانگر مسیر مقاومت القاء شده وابسته به سالیسیلیک اسید می‌باشد. با بررسی تغییرات بیان این ژن می‌توان نقش SA را در مقاومت القاء شده تفسیر کرد (Pape et al. 2010, Ward et al. 1991). بدین منظور بیان این ژن در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفت. بیان ژن *PRI* در ۲۴ ساعت اولیه پس از مایه‌زنی با Tr6، Ps14 و PSTR تغییرات چندانی نسبت به شاهد نداشت. در ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی در تیمارهای Tr6 و PSTR افزایش بیانی به ترتیب برابر با ۶/۷۵ و ۵/۷۳ برابر نسبت به شاهد نشان داد و به حداکثر رسید. در زمان ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی بیان این ژن در همه تیمارها کاهش یافته و به سطح اولیه رسید. در تیمار Ps14 تغییر چندانی در بیان این ژن دیده نشد (شکل ۲).

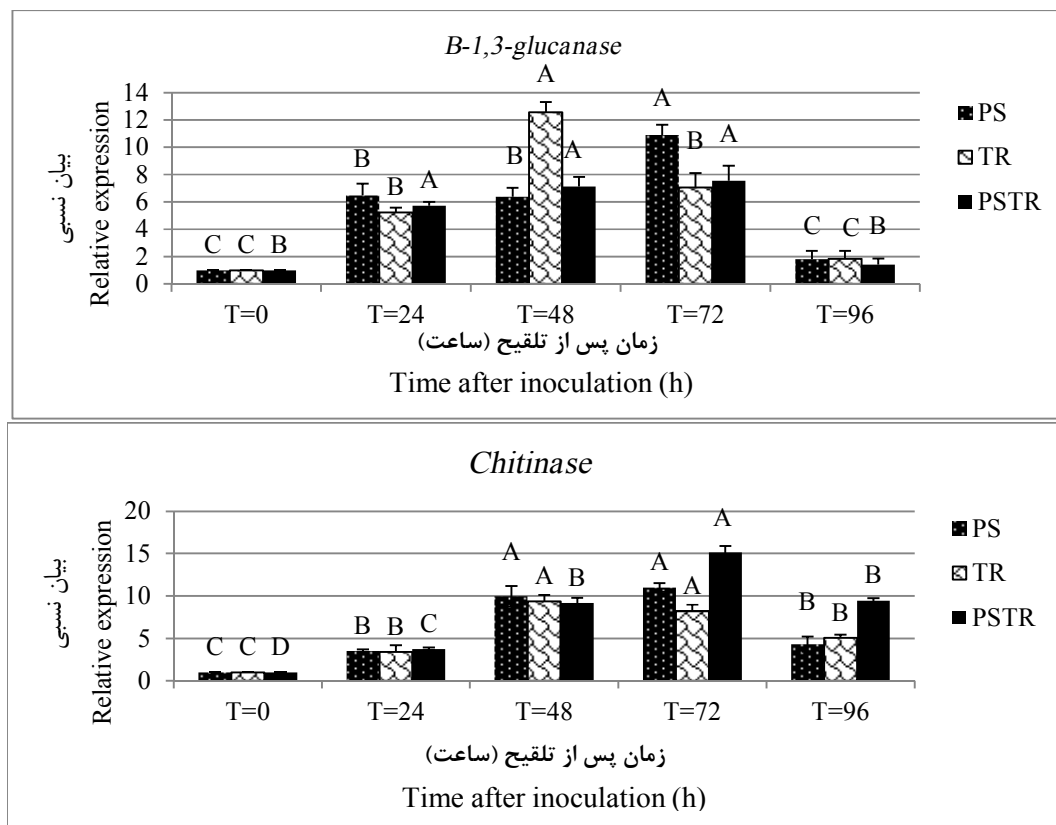
بیان ژن *LOXI* در همه تیمارها طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی افزایش داشته و در زمان ۹۶ به سطح اولیه کاهش یافت. بیشترین افزایش مربوط به تیمار PSTR با میزان ۱۲/۳۱ برابر نسبت به شاهد و در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی بود. در تیمارهای Ps14 و Tr6 به ترتیب افزایش بیانی برابر با ۳/۶۰ و ۴/۹۶ مشاهده شد (شکل ۲).

real time PCR در دستگاه GeneAmp7900HT Sequence Detection System ساخت AB Applied Biosystems Inc. کشور امریکا با شرایط دمایی ۹۵°C به مدت ده دقیقه برای واسرشت اولیه و به دنبال آن چهل چرخه با ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۰°C به مدت یک دقیقه، انجام گردید.

داده‌های حاصل از دستگاه QPCR به نرم‌افزار Sequence Detection System Applied Biosystems (Sequence Detection System Applied Biosystems SDS 2.4) منتقل و از نظر صحت انجام چرخه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و سپس جهت تجزیه به نرم افزار EXCEL منتقل شدند. کمیت‌یابی بیان ژن‌های مورد مطالعه نسبت به ژن رفرنس طبق روش پفافل و با استفاده از دو ژن رفرنس (Wan et al. 2010, Migocka & Papierniak) و در نظر گرفتن کارایی آغازگرها انجام شد (Pfaffl 2011). میانگین سطوح عوامل مختلف پس از تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفت ($P < 0.05$).

نتایج

بیان ژن β -1,3-glucanase در اثر تیمار با Tr6، Ps14 و ترکیب آنها (PSTR) در ساعات اولیه تا ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی افزایش یافت و سپس در زمان ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی به سطح اولیه در زمان صفر نزول کرد. بیان این ژن در تیمار Tr6 در ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی به حداکثر رسید و سپس سیر نزولی را شروع کرد. بیان این ژن در تیمارهای Ps14 و PSTR در ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی به حداکثر رسیده و سپس سیر نزولی را آغاز نمود. حداکثر و حداقل افزایش بیان این ژن به ترتیب مربوط به Tr6 و PSTR به میزان ۱۲/۵ و ۷/۵ برابر نسبت به شاهد بود (شکل ۱).



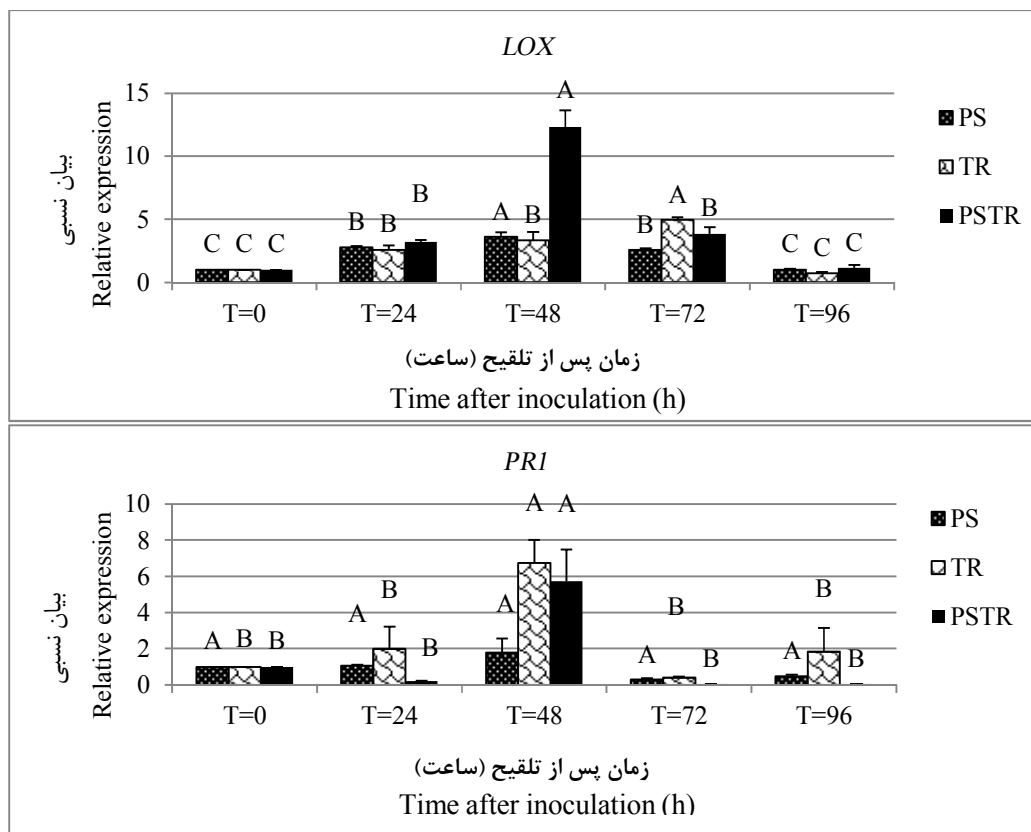
شکل ۱. تغییرات بیان ژنهای بتا-۱ و ۳-گلوکاناز و کیتیناز در ریشه‌های گیاهان خیار در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی ریشه‌ها با *Pseudomonas sp. Ps14* (PS)، *Trichoderma harzianum* Tr6 (TR)، ترکیب آنها (PS/TR). ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند بر حسب آزمون دانکن، در سطح آماری ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig 1. Relative expression of β -1,3-Glucanase, CHIT1 genes in roots of cucumber at different time points after inoculation with *Pseudomonas sp. Ps14* (PS), *Trichoderma harzianum* Tr6 (TR) and their combination (PSTR). For each time point bars with different letters are significantly different (Duncan post hoc test, $P < 0.05$).

بحث

پس آلودگی گیاهان به بیمارگرهای مختلف گزارش شده است (Alizadeh et al. 2013, Harish et al. 2009, Shores et al. 2005). افزایش بیان این ژن‌ها نیز در پاسخ به کلینزاسیون ریشه‌ها توسط تریکودرما (Shores et al. 2005) و سودومونادها نیز به طور گذرا گزارش شده که با نتایج حاصله در این تحقیق همخوانی دارد. ونگ و همکاران (Wang et al. 2005) با بررسی بیان ژن با روش ریزآرایه (Microarray) پس از مایه‌زنی ریشه‌های آرابیدوپسیس با *P. fluorescens* FPT9601-T5 افزایش بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم، مسیرهای پیام‌رسانی،

سویه‌های Tr6 و Ps14 قادر به القاء مقاومت در برابر بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و ساقه خیار بودند و ترکیب آن‌ها القاء مقاومت قوی‌تری را باعث شده است (Alizadeh et al. 2013). ژن‌های دفاعی بتا-۱ و ۳-گلوکاناز و کیتیناز و ژن‌های مسیرهای سیگنالی *PR1* و *LOX1* طی یک دوره زمانی پس از مایه‌زنی با این میکروب‌ها تغییر بیان نشان دادند. بتا-۱ و ۳-گلوکاناز و کیتیناز که از PR پروتئین‌های مهم گیاه می‌باشند و باعث تجزیه کیتین و گلوکان می‌شوند. افزایش بیان این ژن‌ها



شکل ۲. تغییرات بیان ژن‌های *LOX1* و *PRI* در ریشه‌های گیاهان خیار در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی ریشه‌ها با *T. harzianum* Tr6 (TR)، *Pseudomonas* sp. Ps14 (PS) و ترکیب آنها (PS/TR). ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند بر حسب آزمون دانکن، در سطح آماری ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Fig 2. Relative expression of *PRI* and *LOX1* genes in roots of cucumber at different time points after inoculation with *Pseudomonas* sp. Ps14 (PS), *Trichoderma harzianum* Tr6 (TR) and their combination (PSTR). For each time point bars with different letters are significantly different (Duncan post hoc test, $P < 0.05$).

(ROS) افزایش Ca^{2+} و بیان ژن‌های دفاعی همچون *PAL* و *GST* در سوسپانسیون سلولی توتون سبب شدند (Van Loon et al., 2008). همچنین سلول‌های کشته شده با حرارت باکتری *P. fluorescens* WCS417 باعث فعال شدن گزارشگرهای پاسخ‌دهی به MAMP (Microbe associated molecular patterns) و فعال شدن رسوب کالوز در ریشه‌های آراییدوپسیس شدند (Millet et al., 2010). دیدار و همکاران (Yedidia et al. 1999) نیز نشان دادند که مایه‌زنی ریشه‌های خیار با *T. harzianum* T203 باعث افزایش فعالیت پراکسیداز و کیتیناز طی ۴۸ و ۷۲

پاسخ به تنش و ژن‌های تنظیم‌کننده اکسین و کاهش بیان ژن‌های پاسخ‌دهی به اتیلن را گزارش کردند. وره‌اخن و همکاران (Verhagen et al. 2004) افزایش بیان ژن ۹۸ را در ریشه‌های آراییدوپسیس در پاسخ به مایه‌زنی با *P. fluorescens* WCS417r گزارش و مشاهده کردند که ژن‌های پاسخ‌دهی به اتیلن کاهش بیان و ژن فلاونال ردوکتاز که در ارتباط با سنتز لیگنین و آنتوسیانین می‌باشد، افزایش بیان نشان دادند. سوسپانسیون‌های دیواره سلولی برخی سودومونادهای فلورسنت القاء‌کننده مقاومت واکنش‌های دفاعی همچون افزایش فرم‌های فعال اکسیژن

به وسیله MAMP توسط *B. subtilis* (FB17) سرکوب می‌شود و این سرکوب به واسطه JIN1/MYC2 از مسیر پیام‌رسانی JA گزارش شده است (Lakshmanan et al. 2012). به طور کلی PGPRها واکنش‌های دفاعی را در ریشه‌ها سرکوب می‌کنند که این پدیده ظاهراً با القای مقاومت در گیاه هم‌خوانی پیدا نمی‌کند اما برای رسیدن به کلینزاسیون موفق، حفاظت از باکتری در مقابل MTI (MAMPs triggered immunity) فعال شده در گیاه ضروری بوده و پس از استقرار باکتری و حفاظت آن در مقابل دفاع این سرکوب متوقف خواهد شد (Millet et al. 2010).

هیچ گزارشی از پاسخ گیاهان به کاربرد ترکیبی تریکودرما و سودوموناس در فراریشه وجود ندارد. فعال شدن گذرای هر دو مسیر خصوصاً SA برای کنترل کلینزاسیون در این تحقیق دیده شد.

نتیجه‌گیری کلی این که در اثر این میکروبیوم مفید مرحله اولیه دفاع MTI در گیاه فعال می‌شود. این فعالیت منجر به القای بیان گذرای ژنهای دفاعی می‌شود که در مورد Tr6 از طریق مسیر وابسته به JA و SA ولی در مورد Ps14 از راه فعال سازی مسیر JA انجام می‌گیرد. متعاباً این مسیرها به حالت آماده‌باش برای جلوگیری از آلودگی به بیمارگرهای مهاجم ثانویه که همان مکانیسم ISR می‌باشد در می‌آیند.

ساعت پس از مایه‌زنی شد. شورش و همکاران (Shoresh et al. 2005) نیز افزایش بیان ژنهای *LOXI* و *PAL1* را به صورت گذرا ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی ریشه‌ها با *T. asperellum* T203 گزارش کردند. با توجه به افزایش بیان *PR1* و *LOXI* که نشانگرهایی برای SA و JA می‌باشند به نظر می‌رسد هر دو مسیر وابسته به SA و JA برای مهار کلینزاسیون توسط Tr6 در گیاه فعال می‌شود در حالیکه برای مهار کلینزاسیون توسط Ps14 مسیر وابسته به JA به طور گذرا فعال می‌گردد. این سویه‌ها علیه قارچ بیمارگر *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* نیز در گیاه خیار همین مسیرهای مقاومت را القاء می‌کنند (Alizadeh et al. 2013). در مورد قارچ شبه مایکوریز *Piriformospora indica* فعال شدن مسیر وابسته به SA توسط گیاه برای مهار کلینزاسیون گزارش شده و در ادامه این قارچ با القای مسیر JA، آبسزیک اسید (ABA) و تداخل آنها با SA بر مقاومت گیاه غلبه می‌یابد (Jacobs et al. 2009, Schafer et al. 2011). افزایش بیان ژن *PR1* نشان‌دهنده فعال شدن گذرای مسیر SA در گیاه برای کنترل کلینزاسیون می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد گیاهان از مسیر پیام‌رسانی وابسته به SA برای کنترل کلینزاسیون توسط قارچهای مفید استفاده می‌کنند.

آنالیز ریزآرایه در مرحله اول کلینزاسیون بوسیله *Bacillus subtilis* سرکوب بیان ژنهای دفاعی را نشان داده است (Niu et al. 2011). پاسخ‌های دفاعی فعال شده

منابع

- Achouak W., Conrod S., Cohen V. and Heulin T. 2004. Phenotypic variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a plant root-colonization strategy. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 872-879.
- Alizadeh H., Behboudi K., Ahmadzadeh M., Javan-Nikkhah M., Zamioudis C., Pieterse C. M. and Bakker P. A. H. 2013. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. *Biological Control* 65: 14-23.
- Badri D. V. and Vivanco J. M. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment* 32:

- 666-681.
- Bais H. P., Park S.-W., Weir T. L., Callaway R. M. and Vivanco J. M. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science* 9: 26-32.
- Bisseling T., Dangl J. L. and Schulze-Lefert P. 2009. Next-generation communication. *Science* 324: 691.
- Boller T. and Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review Plant Biology* 60: 379-406.
- Camehl I., Sherameti I., Venus Y., Bethke G., Varma A., Lee J. and Oelmüller R. 2010. Ethylene signalling and ethylene-targeted transcription factors are required to balance beneficial and nonbeneficial traits in the symbiosis between the endophytic fungus *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 185: 1062-1073.
- De Vleeschauwer D. and Höfte M. 2009. Rhizobacteria-induced systemic resistance, pp. 223-281. In: L. C., Van Loon (Ed.), *Advances in Botanical Research*. Academic Press.
- Doxey A. C., Yaish M. W., Moffatt B. A., Griffith M. and McConkey B. J. 2007. Functional divergence in the *Arabidopsis* beta-1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1045-1055.
- Glick B., Cheng Z., Czarny J. and Duan J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology* 119: 329-339.
- Harish S., Kavino M., Kumar N., Balasubramanian P. and Samiyappan R. 2009. Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against Banana bunchy top virus. *Biological Control* 51: 16-25.
- Harman G. E., Lorito M. and Lynch J. M. 2004. Uses of *Trichoderma* spp. to alleviate or remediate soil and water pollution. *Advances in Applied Microbiology* Academic Press, 56: 313-330.
- Jacobs S., Zechmann B., Molitor A., Trujillo M., Petutschnig E., Lipka V., Kogel K. H. and Schafer P. 2011. Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of *Arabidopsis* roots by the fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiology* 156: 726-740.
- Jones J. D. G. and Dangl J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.
- Lakshmanan V., Kitto S. L., Caplan J. L., Hsueh Y. H., Kearns D. B., Wu Y. S. and Bais H. P. 2012. Microbe-associated molecular patterns-triggered root responses mediate beneficial rhizobacterial recruitment in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 160: 1642-1661.
- Leeman M., Ouden F. M., Pelt J. A., Cornelissen C., Matamala-Garros A., Bakker P. A. H. M. and Schippers B. 1996. Suppression of fusarium wilt of radish by co-inoculation of fluorescent *Pseudomonas* spp. and root-colonizing fungi. *European Journal of Plant Pathology* 102: 21-31.
- Lugtenberg B. and Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63: 541-556.
- Melan M. A., Dong X., Endara M. E., Davis K. R., Ausubel F. M. and Peterman T. K. 1993. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiology* 101: 441-450.
- Mendes R., Kruijt M., De Bruijn I., Dekkers E., Van Der Voort M., Schneider J. H. M., Piceno Y. M., Desantis T. Z., Andersen G. L., Bakker P. A. H. M. and Raaijmakers J. M. 2011. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* 332: 1097-1100.
- Migocka M., Papierniak A., 2011. Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. *Molecular Breeding* 28: 343-357.
- Millet Y. A., Danna C. H., Clay N. K., Songnuan W., Simon M. D., Werck-Reichhart D. and Ausubel F. M. 2010. Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *The Plant Cell Online* 22: 973-990.
- Niu D. D., Liu H. X., Jiang C. H., Wang Y. P., Wang Q. Y., Jin H. L. and Guo J. H. 2011. The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 533-542.
- Pfaffl M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45.

- Pape S., Thurrow C. and Gatz C. 2010. The *Arabidopsis* PR-1 promoter contains multiple integration sites for the coactivator NPR1 and the repressor SN1. *Plant Physiology* 154: 1805-1818.
- Pozo M. J. and Azcón-Aguilar C. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 393-398.
- Sahai A. S. and Manocha M. S. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews* 11: 317-338.
- Schafer P., Pfiffi S., Voll L. M., Zajic D., Chandler P. M., Waller F., Scholz U., Pons-Kuhnemann J., Sonnewald S., Sonnewald U. and Kogel K. H. 2009. Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. *The Plant Journal* 59: 461-474.
- Segarra G., Van Der Ent S., Trillas I. and Pieterse C. M. J. 2009. MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biology* 11: 90-96.
- Shoresh M., Harman G. E. and Mastouri F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology* 48: 21-43.
- Shoresh M., Yedidia I. and Chet I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95: 76-84.
- Van Der Ent S., Van Hulten M., Pozo M. J., Czechowski T., Udvardi M. K., Pieterse C. M. and Ton J. 2009a. Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and beta-aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytologist* 183: 419-431.
- Van Der Ent S., Van Wees S. C. and Pieterse C. M. J. 2009b. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70: 1581-1588.
- Van Loon L. C., Bakker P. A. H. M. and Pieterse C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.
- Van Loon L. C., Bakker P. A. H. M., Van Der Heijdt W. H., Wendehenne D. and Pugin A. 2008. Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1609-1621.
- Verhagen B. W., Glazebrook J., Zhu T., Chang H. S., Van Loon L. C. and Pieterse C. M. 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 895-908.
- Wan H., Zhao Z., Qian C., Sui Y., Malik A. A. and Chen J. 2010. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Analytical Biochemistry* 399: 257-261.
- Wang Y., Ohara Y., Nakayashiki H., Tosa Y. and Mayama S. 2005. Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 385-396.
- Ward E. R., Uknes S. J., Williams S. C., Dincher S. S., Wiederhold D. L., Alexander D. C., Ahl-Goy P., Mettraux J. P. and Ryals J. A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell Online* 3: 1085-1094.
- Yedidia I. I., Benhamou N. and Chet I. I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1061-1070.
- Zamioudis C. and Pieterse C. M. J. 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 139-150.