

## مقاله پژوهشی

# بررسی تاثیر باکتری *Pseudomonas protegens* CHA0 و قارچ اندوفیت *Serendipita indica* در القای مقاومت و بیان ژن‌های دفاعی در گندم بر علیه عامل بیماری‌زای سپتوریوز برگ

جواد اشرفی<sup>۱</sup>، کامران رهنما<sup>۱\*</sup>، ولی‌الله بابایی‌زاد<sup>۲</sup>، سیده ساناز رمضان‌پور<sup>۱</sup> و کریستوف کیل<sup>۳</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۲)

## چکیده

بیماری سپتوریوز برگ یکی از بیماری‌های مهم گندم می‌باشد. قارچ اندوفیت *Serendipita indica* و باکتری *Pseudomonas protegens* باعث تحریک مقاومت سیستمیک بر علیه عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌شوند. در این پژوهش میزان تغییر بیان ژن‌های مهم دفاعی *PAL*، *LOX*، *NPR1* و *PR5* در گیاهان گندم رقم حساس تاجن تیمار شده با قارچ میکوریز *S. indica* و باکتری *P. protegens* و نیز در گیاهان شاهد بدون تیمار با عامل بیوکنترل در زمان‌های مختلف پس از آلودگی با قارچ بیمارگر *Zymoseptoria tritici* با استفاده از تکنیک *Real-time qPCR* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان رونوشت ژن‌های *PAL* و *LOX* در گیاهان تیمار شده با باکتری *P. protegens* و میزان رونوشت ژن‌های *NPR1* و *PR5* در تیمار توام گیاهان با قارچ میکوریز *S. indica* و باکتری *P. protegens* بیشتر از سایر تیمارها بود. نتایج ارزیابی فنوتیپی میزان مقاومت در دو تیمار ذکر شده نیز نشان دهنده تاثیر بیان ژن‌های مذکور در القاء مقاومت می‌باشد. نتایج حاکی از نقش فعال این دو عامل بیوکنترل در حفاظت از رقم حساس تاجن در مقابل بیماری سپتوریوز برگ در اثر افزایش بیان ژن‌های مذکور نسبت به شاهد می‌باشد.

کلیدواژه: اندوفیت، سپتوریوز گندم، مقاومت سیستمیک، ژن‌های دفاعی، *RT-qPCR*

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rahnama@gau.ac.ir ; kamranrahnama1995@gmail.com

۱. به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار بخش گیاه پزشکی و بخش بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران.
۲. دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران.
۳. استاد بخش میکروبیولوژی، دانشگاه لوزان، لوزان، سوئیس.

## The effect of *Pseudomonas protegens* CHA0 and an endophyte fungus *Serendipita indica* on resistance induction with defense genes expression of wheat against *Septoria* leaf blotch disease

J. Ashrafi<sup>1</sup>, K. Rahnama<sup>1\*</sup>, V. Babaeizad<sup>2</sup>, S. S. Ramezanzpour<sup>1</sup>, and C. Keel<sup>3</sup>

(Received: 18.4.2020; Accepted: 23.9.2020)

### Abstract

Septoria leaf blotch (STB) caused by *Zymoseptoria tritici*, is one of the important wheat disease. The endophytic fungus *Serendipita indica* and the plant-protecting bacteria *Pseudomonas protegens* induce systemic resistance to plant pathogens. In this study, the expression rate of several defense genes in Tajan susceptible wheat cultivar treated by *S. indica* and *P. protegens* and in control plants at different times point after inoculation with *Z. tritici* were investigated by Real-time qPCR technique. The results showed that, the expression of PAL and LOX genes in plants treated with *P. protegens* was higher than other treatments. The expression of NPR1 and PR5 genes were higher in co-inoculated plants that treated by *S. indica* and *P. protegens*. The results of phenotypic evaluation of two mentioned treatments also show, the expression of these genes is effective in inducing resistance. The results indicate the active role of these two biocontrol agents in protection of susceptible Tajan cultivar against STB due to increased expression of these genes compared to control.

**Keywords:** Defense gene, Endophyte, RT-qPCR, Septoria, Systemic resistance.

---

\* Corresponding author's E-mail: Kamranrahnama1995@gmail.com

1. Ph.D. Student, Associate professors of plant protection department and department of biotechnology faculty of plant production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran.
2. Department of plant protection, Sari Agricultural sciences and Natural Resources university, Mazandaran, Iran.
3. Department of Fundamental Microbiology, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland.

## مقدمه

(ISR) <sup>۲</sup> *et al.* 2006). پدیده مقاومت سیستمیک القایی یکی از انواع مقاومت‌های القایی است که به وسیله‌ی برخی از نژادهای غیر بیماری‌زای قارچ‌ها و باکتری‌های همزیست ریشه و یا برخی از مواد شیمیایی ایجاد می‌شود (Van Loon *et al.* 2006).

در سال ۱۹۹۷ برای اولین بار در خاک‌های شمال غرب هندوستان یک قارچ اندومیکوریز همزیست با ریشه به نام *Piriformospora indica* Sav. Verma, Aj. Varma, Rexer, G. Kost & P. Franken مورد شناسایی قرار گرفت (Varma *et al.* 1998). پس از مطالعات Weib و همکاران (۲۰۱۶) نام جنس و موقعیت طبقه‌بندی این قارچ تغییر کرد. این قارچ متعلق به خانواده جدید *Sebacinaceae* و راسته جدید *Sebacinales* می‌باشد. راسته *Sebacinales* به دو تیره تقسیم شده است. تیره A شامل *Sebacinaceae* و تیره B شامل خانواده جدید *Serendipitaceae* می‌باشد. بنابراین نام این قارچ اندوفیت به *Serendipita indica* (Sav. Verma, Aj. Varma, Rexer, G. Kost & P. Franken) M. Weiß, Waller, A. Zuccaro & Selosse *comb.n.* تغییر داده شد (Weib *et al.*, 2016).

مقاومت سیستمیک القایی ایجاد شده توسط قارچ *S. indica* موجب بهبود دفاع در برابر استرس‌های زیستی و غیر زیستی و شاخص‌های رشدی در گیاه میزبان شده و به سیگنال‌های جاسمونیک اسید<sup>۳</sup> (JA)، عملکرد NPR1 سیتوزولی و سطح پایین بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت سیستمیک در گیاه قبل از حمله بیمارگر وابسته است. این قارچ همزیست طیف وسیعی از گیاهان تک‌لپه‌ای و دولپه‌ای می‌باشد (Peskan *et al.* 2004, Molitor & Kogel,

لکه‌برگی سپتوریایی<sup>۱</sup> (STB) با عامل *Zymoseptoria tritici* یکی از بیماری‌های مهم گندم در نقاط مختلف جهان به شمار می‌رود (Macholdt *et al.* 2017, Raza *et al.* 2019).

کاهش جهانی محصول گندم در اثر این بیماری ۵۳-۳۰ درصد، معادل ۹ میلیون تن برآورد شده است (Palmer & Skinner, 2002). میزان خسارت این بیمارگر طی سال‌های گذشته در استان گلستان ۴۴ درصد کاهش محصول در ارقام مختلف برآورد گردیده است (Kia & Torabi, 2008, Ashrafi *et al.* 2019). همانند سایر بیماری‌های هوازاد، برخی محققین کشت ارقام مقاوم را به عنوان سالم‌ترین روش از نظر زیست محیطی برای کنترل این بیماری معرفی نموده‌اند (Karisto *et al.* 2018, Dehghanpour- Farashah *et al.* 2019). استفاده از ارقام مقاوم، موثرترین سالم‌ترین و اقتصادی‌ترین روش از نظر محیط زیست برای کنترل این بیماری به شمار می‌آید (Chartrain *et al.* 2004, Akha, 2009). اما تفاوت در پایداری ژن مقاومت میزبان در برابر بیمارگر طی سال‌های مختلف همواره به عنوان یک محدودیت در استفاده از ارقام مقاوم محسوب می‌شود (Esse *et al.* 2020).

یکی از روش‌های القای مقاومت میزبان در برابر بیمارگرهای گیاهی، استفاده از میکروارگانیزم‌های مفید به عنوان همزیست با گیاهان می‌باشد (Kogel, 2006). مقاومت القایی به عنوان یک پتانسیل ثانویه در کنار مقاومت بوجود آمده با ژن R، موجب حفاظت از گیاهان مختلف در برابر تنش‌های محیطی می‌گردد. (Van Hulst

<sup>۲</sup> *Induced Systemic Resistance*

<sup>۳</sup> *Jasmonic acid (JA)*

<sup>۱</sup> *Septoria Tritici Blotch*

2009).

در دو دهه اخیر در تحقیقات زیادی از باکتری *Pseudomonas protegens* Ramette, sp. nov. حفاظت از گیاهان در مقابل بیمارگرها استفاده شده است (Hass & Keel, 2003). حضور باکتری‌های بیوکترول خاصی روی ریشه پاسخ مقاومت را در لوبیا، توتون و آرابیدوپسیس القاء کرده است. لذا مقاومت القایی یکی از سازوکارهای عمل ریزوباکترهای افزایش دهنده رشد گیاه بخصوص سودوموناس‌های فلورسنت، در کاهش بیماری است (Vallad & Goodman, 2004). سازوکار مقاومت سیستمیک در اثر تحریک بیمارگر یا سایر عوامل مانند باکتری‌های مفید ریشه ایجاد می‌گردد، که در نتیجه این تحریک‌ها پیام‌های مقاومت تولید شده و در ساختار گیاه پخش می‌شود (Weller, 2007). سویه<sup>۴</sup> CHA0 باکتری *Pseudomonas fluorescens* به خوبی به عنوان یک باکتری افزایش دهنده رشد گیاه شناخته شده است و این استرین به عنوان یک باکتری مدل برای بررسی‌های مهار زیستی نیز به کار می‌رود (Hass & Keel, 2003, Waller et al. 2007).

بسیاری از رویدادهای درون سلولی در گیاهان به وسیله الگوهای متفاوت بیان ژن‌ها اتفاق می‌افتد. اما مقاومت القایی در اثر تحریک ریشه گیاه میزبان و انجام یک سری تغییرات بسیار کم در میزان رونوشت برخی ژن‌های دخیل در ایجاد مقاومت در گیاه به وجود می‌آید. تغییر در میزان بیان ژن‌های دخیل در مقاومت قبل از حمله بیمارگر به گیاه میزبان با گیاهان شاهد تفاوت زیادی ندارد. در حالی که پس از حمله و رخنه بیمارگر به گیاه میزبان، بیان برخی از ژن‌ها و پروتئین‌ها به میزان زیادی افزایش می‌یابد

در این پژوهش تاثیر قارچ *S. indica* و باکتری *P. protegens* در القای مقاومت در برابر بیماری سپتوریوز (*Z. tritici*) در گندم رقم حساس تجن مورد بررسی قرار گرفت و میزان مقاومت به وجود آمده در تیمارهای مختلف و همچنین میزان بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت

<sup>۵</sup> Quantitative Real Time PCR

<sup>۶</sup> Real-time PCR

<sup>۴</sup> Strain

شامل ژن‌های PAL، LOX، NPR1، PR5 در گیاهان تیمار شده و گیاهان شاهد با استفاده از تکنیک Real-time PCR ارزیابی شد.

انجام شد و برای انجام PCR از آغازگرهای ITS 4,5 (جدول ۱) استفاده گردید. محصول PCR توالی‌یابی شده و توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی Blast، با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد. جدایه بیماری‌زای *Z. tritici* با نام ZTKJR و با شماره 3240C و MG969552 به ترتیب در کلکسیون بین‌المللی قارچ‌های ایران و در پایگاه بین‌المللی NCBI ثبت گردید. پس از بررسی و مقایسه‌ی میزان شدت بیماری‌زایی این جدایه با ۴ جدایه دیگر از مناطق مختلف استان گلستان بر روی ۲۶ رقم گندم، این جدایه برای استفاده در این پژوهش انتخاب گردید (Ashrafi et al. 2019).

#### تهیه و تکثیر و تیمار قارچ اندوفیت

جدایه قارچ اندوفیت *S. indica* ثبت شده با شماره DSM11827 از کلکسیون کشت سلولی و میکروارگانیسم-ها برونشویک آلمان، توسط پروفیسور کوگل رئیس موسسه بیماری‌شناسی و جانورشناسی دانشگاه گیسن آلمان تهیه گردید. قارچ *S. indica* بر روی محیط کشت جامد اختصاصی (CM)<sup>^</sup> حاوی گلوکز ۲۰ گرم، پپتون ۲ گرم، محلول نمک ( $\text{NaNO}_3$ , KCl,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ۵۰ میلی‌لیتر، عصاره مخمر ۱ گرم، محلول ریزمغذی ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , KI,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) یک میلی‌لیتر، کازامین اسید ۱ گرم و آگار ۱۵ گرم، در یک لیتر آب مقطر سترون کشت شد. برای تولید اسپور، ظروف پتری به مدت سه هفته در دمای ۲۵°C نگهداری شدند. سپس بر اساس روش والر و همکاران (Waller et al. 2005) اقدام به جمع‌آوری اسپورهای قارچ از سطح و داخل محیط کشت گردید. پس از گذراندن محلول حاوی اسپورها از یک

شامل ژن‌های PAL، LOX، NPR1، PR5 در گیاهان تیمار شده و گیاهان شاهد با استفاده از تکنیک Real-time PCR ارزیابی شد.

#### مواد و روش

##### تهیه و تیمار رقم گندم تجن

این تحقیق در شرایط گلخانه انجام شد. گندم حساس رقم تجن با شجره‌نامه -CM67428- "Bow" s "/Nkt " s " (GM-LR-5M-3R-LB-Y) از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان تهیه شد (Kia et al. 2018).

بذرهای مناسب رقم تجن، در محیط سترون هود به مدت یک دقیقه در اتانول ۵۰ درصد و پس از آن بلافاصله به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپرکلریت سدیم ۱ درصد قرار داده و با آب مقطر سترون ۳ بار به مدت ۵ دقیقه شستشو شدند. سپس بذور در ظروف پتری حاوی کاغذ صافی سترون قرار داده شده و در محیط تاریک و در دمای معمولی آزمایشگاه (۲۰±۲°C) درجه سلسیوس) به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند.

##### تهیه و تکثیر قارچ عامل سپتوریوز گندم

نمونه برداری از مزارع شهرستان رامیان استان گلستان (۱۳۹۶-۱۳۹۷) انجام شد و پس از بررسی نمونه‌ها با استریو میکروسکوپ<sup>^</sup> و مشاهده پیکنیدیوم‌ها بر روی برگ‌ها، قارچ عامل بیماری با استفاده از روش ایال و همکاران (Eyal et al. 1987) جداسازی و خالص‌سازی گردید. پس از شناسایی ریخت‌شناسی جدایه خالص قارچ عامل بیماری، استخراج DNA به روش موری و تامپسون

<sup>^</sup> Complex medium

<sup>^</sup> Stereo Microscope

( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) و ۸ گرم نمک فیزیولوژیک (NaCl) انجام شد. ظروف ارلن به مدت ۳۶ ساعت بر روی دستگاه تکان دهنده با سرعت ۱۰۰-۱۲۰ دور در دقیقه در دمای معمول آزمایشگاه قرار گرفت. سلول‌های باکتری با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ rpm از محیط مایع ال-بی جدا شدند. باقیمانده محیط غذایی با استفاده از محلول ۰/۱۵ مولار نمک فیزیولوژیک شستشو شد. سپس سلول‌های باکتریایی با استفاده مجدد از سانتریفیوژ از محلول جدا شده و با استفاده از آب مقطر سترون از آنها سوسپانسیون تهیه گردید. جمعیت سلول-های باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با جذب نوری ۰/۷ در ۶۰۰ نانومتر در حدود  $10^9$  سلول باکتری در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون تعیین گردید.

مایه‌زنی بذور گندم در هر دو تیمار باکتری و باکتری توام با قارچ اندوفیت، با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه‌شده در زمان کاشت به هر بذر انجام شد (Sharifi Tehrani et al. 2011).

#### بررسی همزیستی ریشه

برای بررسی میزان همزیستی عوامل بیولوژیک با ریشه گندم رقم تجن از دو روش میکروسکوپی و مولکولی استفاده گردید. برای بررسی میکروسکوپی همزیستی قارچ اندوفیت *S. indica* از روش ویرهیلینگ و همکاران (Vierheilig et al. 1998) استفاده شد. بدین ترتیب که، سه هفته پس از زمان کاشت گیاهچه‌ها، به صورت تصادفی تعدادی از ریشه‌های گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ اندوفیت *S. indica* و شاهد، از خاک گلدان‌ها خارج و در زیر شیر آب با دقت شسته شدند. سپس ریشه‌ها به مدت ۴ دقیقه در محلول KOH ۱۰ درصد روی شعله حرارت داده شده و دو بار به مدت ۳ دقیقه با آب مقطر سترون شستشو

تنظیف تمیز، غلظت اسپورها با استفاده از لام هموسیتومتر در غلظت تقریبی  $10^5$  اسپور در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به همراه توئین ۲۰ به میزان ۰/۰۵ درصد تنظیم گردید. بذرها گندم جوانه زده دارای ریشه‌چه و ساقچه رقم تجن در شرایط سترون هود در محلول اسپور قارچ اندوفیت قرار گرفتند. همزمان ریشه گیاهچه‌های شاهد نیز در محلول آب مقطر استریل به همراه ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ غوطه‌ور شد تا شرایط برای همه گیاهچه‌ها یکسان باشد. بذرها تیمار شده به مدت ۴-۱۰ ساعت بر روی دستگاه تکان دهنده با سرعت ۱۰۰-۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفت. گلدان‌های با قطر دهانه ۱۵ سانتیمتر حاوی مخلوط خاک استریل (خاک مزرعه، پرلیت و ماسه بادی هر کدام یک قسمت) تهیه و سپس بذرها تیمار شده در گلدان‌ها کشت شدند. گلدان‌ها به مدت ۷-۱۰ روز از طریق ریختن آب در ظرف زیر گلدان برای جلوگیری از شسته شدن اسپورهای متصل شده به بذور جوانه زده و استقرار کامل آنها آبیاری گردیدند. گلدان‌ها در طول مدت آزمایش در دمای  $25 \pm 1^\circ C$  گلخانه نگه‌داری شدند (Mousavi et al. 2014).

#### تهیه و تکثیر باکتری *P. protegens* CHA0

جدایه باکتری *P. protegens* CHA0-mCherry = mCherry-tagged دارای ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ثبت شده با شماره CCOS2 در کلکسیون کشت سویس، از طریق پروفیسور کیل از دانشگاه لوزان سویس تهیه گردید. باکتری‌ها بر اساس روش (Sharifi Tehrani et al. 2011) در محیط کشت جامد نوترینت آگار (NA) کشت شدند. تکثیر باکتری در محیط کشت مایع ال-بی (LB) حاوی ۱۰ گرم تریپتون پیتون، ۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۲۵ گرم سولفات منیزوم آب دار

سوسپانسیون قارچ *Z. tritici* تلقیح شدند. زادمایه قارچ عامل بیماری، بر روی محیط کشت مایع حاوی عصاره مخمر، عصاره مالت و ساکارز هرکدام به نسبت ۱۰ گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه شد. فلاسک‌ها به شیکر انکوباتور<sup>۱۰</sup> منتقل و به مدت ۴ تا ۵ روز در دمای ۲۱°C با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. تعداد اسپور در هر میلی لیتر از سوسپانسیون به کمک لام گلبول شمار شمارش شده و به غلظت ۱۰<sup>۷</sup> اسپور در هر میلی لیتر تنظیم گردید. زادمایه قارچ بر روی گیاهان گندم که در گلدان‌های سترون کشت شده بودند با استفاده از اسپری دستی مایه-زنی شد. گلدان‌ها در شرایط رطوبت اشباع، در فضای بسته پوشش شفاف نایلونی و در دمای ۲۱±۱°C با تناوب نوری ۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. سپس گلدان‌های مایه‌زنی شده به مدت ۱۸ روز دیگر علاوه بر مدت زمان قبل، در دمای ۲۱±۱°C و در شرایط رطوبتی بالاتر از ۷۰ درصد نگهداری گردیدند (Zhang et al. 2001, Kia et al. 2017, Ashrafi et al., 2019)

برای محاسبه مقاومت ارقام گندم از روش مقیاس نمره دهی ۱-۹ ژانگ و همکاران (۲۰۰۱) استفاده گردید. در این رابطه ژنوتیپ‌ها بر اساس ژن‌های STB به ۴ گروه تقسیم می‌گردند. در این تقسیم‌بندی چنانچه میانگین علائم بیماری ۴/۹-۱ برآورد گردد، مقاوم (R)، میانگین بیماری ۶/۹-۵، نیمه مقاوم (MR)، میانگین بیماری ۷/۹-۷، نیمه حساس (MS) و میانگین بیماری ۸-۹، حساس (S) ارزیابی می‌گردد (Zhang et al. 2001). درصد نکروز و پوشش پیکنیدیومی سطح برگ با روش ساری و پرسکات (Saari and Prescott, 1975) تغییر یافته به وسیله ایال و همکاران (Eyal et al., 1987) نیز برای ارزیابی شدت

شدند. پس از آن ریشه‌ها به مدت ۴ دقیقه در محلول اسید استیک حاوی ۵ درصد جوهر آبی پلیکان حرارت داده شده و مجدداً دو بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. پس از شستشو، ریشه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در آب مقطر حاوی ۲ درصد اسید استیک برای رنگ‌بری بافت گیاهی قرار داده شدند. نمونه‌های ریشه بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شده و وجود ریشه‌ها و کلأمیدوسپورهای گلابی شکل قارچ اندوفیت *S. indica* با میکروسکوپ بررسی گردید.

برای بررسی میزان کلونیزاسیون ریشه گیاه توسط باکتری *P. protogens* ابتدا ریشه گیاهان مایه‌زنی شده و شاهد بصورت تصادفی از خاک خارج و در زیر شیر آب کاملاً شستشو گردید. سپس ریشه‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین شد. ریشه‌ها با استفاده از هاون سترون له گردید. سپس به وسیله آب مقطر سترون سری رقت به نسبت ۱:۹ و به حجم ۱۰ میلی لیتر تهیه شد و روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک جنتامایسین کشت گردید (Hass et al., 2003). کلنی‌های به دست آمده پس از مدت زمان ۲۴ ساعت رشد در دمای ۲۷°C با استفاده از دستگاه شمارشگر کلنی شمارش شدند. تعداد کلنی‌ها بر اساس واحد تشکیل کلنی (CFU g<sup>-1</sup>) در هر گرم<sup>۹</sup> بافت ریشه گیاه محاسبه و بیان گردید (Farhangi et al., 2014).

#### مایه‌زنی قارچ عامل بیماری سپتوریوز برگی گندم

برای ارزیابی مقاومت، پس از نمونه‌برداری از ریشه و اثبات وجود عوامل بیولوژیک در ریشه گیاهان تیمار شده و در ابتدای مرحله ساقه رفتن، گیاهان هر تیمار با

<sup>۱۰</sup> Incubator Shaker

<sup>۹</sup> Colony forming units per gram

۸۰- با استفاده از بافر RNX-Plus (شرکت سیناژن) مطابق با دستورالعمل کیت انجام شد. کیفیت RNA استخراج شده با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۲ درصد در بافر TAE 1X بررسی شد. به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی DNA از RNA های استخراجی از کیت RNase-free 1, DNase (ساخت شرکت Fermentase) استفاده گردید.

### ساخت DNA مکمل

ساخت DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis و طبق دستورالعمل کیت انجام شد. بدین منظور از آغازگر Super Script Reverse Transcriptase و آنزیم OligodT(18) برای بررسی کیفیت نمونه‌های cDNA سنتز شده از PCR با آغازگر اختصاصی ژن خانه-دار (Elongation Factor (EF) استفاده شد (Buetehorn et al. 2000).

### بررسی بیان ژن و آنالیز داده‌ها

بیان ژن با استفاده از روش Real-Time PCR و در دستگاه Applied Biosystems step one plus که قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد بررسی گردید. بافر مورد استفاده در این روش WizPure™ qPCR Master (SYBR) محصول شرکت Wizbiosolutions کشور کره جنوبی بود. در این بافر علاوه بر سایبرگرین از رنگ Rox Dye (50X) نیز به عنوان رنگ مرجع برای بهینه کردن واکنش استفاده می‌گردد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه ۱۰ دقیقه در ۹۵°C، سپس ۴۰ چرخه (شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵°C و ۱ دقیقه در ۶۰°C) بود. به منظور استاندارد نمودن داده‌ها، نمونه‌ها به

بیماری محاسبه گردید. بر اساس این روش گیاهان به صورت ۵ یا مصون (میانگین بیماری ۰) یا مقاوم (میانگین بیماری ۱۱-۳۰) یا نیمه مقاوم (میانگین بیماری ۳۱-۴۵) یا حساس (میانگین بیماری ۴۶-۶۵) یا حساس (میانگین بیماری ۶۶-۸۵) یا خیلی حساس (میانگین بیماری ۸۶-۹۹) ارزیابی می‌شود. داده‌های به دست آمده به وسیله نرم افزار SPSS مورد تجزیه آماری قرار گرفت. سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (Area Under the Disease Progress Curve: AUDPC) با استفاده از فرمول زیر برای صفات نکرز برگ و پوشش پیکنیدیومی محاسبه شد (Moldovan et al., 2005).

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} [(y_i + y_{i+1}) / 2] (t_i + t_{i+1})$$

در این فرمول n تعداد دفعات یادداشت‌برداری، y مقدار بیماری و t زمان (روز) پس از یادداشت‌برداری است.

### نمونه برداری

نمونه‌برداری از برگ‌های گیاهان تیمار شده و شاهد در فواصل زمانی ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی با قارچ *Z. tritici* انجام شد. ۶ گلدان از هر تیمار بصورت تصادفی انتخاب و از هر گلدان یک گیاه بدون زخم یا آسیب فیزیکی انتخاب شد و یک برگ کامل آن با دقت جدا گردید. نمونه‌های برگی پس از انتقال به لوله‌های فالکن<sup>۱۱</sup> سترون فاقد RNase به سرعت در نیتروژن مایع فرو برده شده و سپس به فریزر با دمای ۸۰°C - منتقل گردیدند.

### استخراج RNA و زدودن DNA ژنومی

استخراج RNA از نمونه‌های نگه‌داری شده در فریزر

<sup>۱۱</sup> Falcon tubes



وسيله ژن خانه‌دار بتا-اكتين ( $\beta$ -Actin) نرمال گردیدند. داده‌های حاصل از دستگاه، توسط نرم افزار REST 2000 جدول ۱. ژن‌ها و توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

**Table 3. Genes and nucleotide sequences of primers used in this study.**

ژن Gene name	توالی آغازگر Sequence	منبع Reference
ITS4.F, ITS5.R	F: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' R: 5'-ACC CGC TGA ACT TAA GC-3'	White <i>et al.</i> 1990
TaActin.789F, 940R	R: 5'-TCG TCG CTG TCA ACA AGA TG-3' F: 5'-GTC TGG ATC GGT GGC TCT AT-3' R: 5'-GCA GCA AGT CCC CTT TGT AA-3'	Himi <i>et al.</i> 2004
TaLOX1267F,1441R	F: 5'-TGA TCG AGG TCC TGT CCA AC-3' R: 5'-CGG TTC TTG AGT TGG CGA TT-3'	Gorlach <i>et al.</i> 1996
TaPAL.1536F,1651R	F: 5'-GCT GAA CAA GGT GCT GGT GG-3' R: 5'-TTG TCT CGT CGG CTG CTC A-3'	Barber <i>et al.</i> 2000
TaNPR1.745F,895R	F: 5'-CTT CGG AAT TTG CCC TTG GT R: 5'-TCC AGC ACA TTT GAA CAG CG-3'	Ahangar <i>et al.</i> 2014
TaThuLP.384F,533R	F: 5'-CTT GCC ATG GAC TTC TCG TG-3' R: 5'-TCA TGG GCA GAA GGT GAT CT-3'	Yu <i>et al.</i> 2001

در پایان هر واکنش منحنی‌های ذوب برای هر آغازگر با استفاده از نرم افزار Bio-Rad CFXManager رسم شد. برای این کار پس از اتمام واکنش PCR، منحنی ذوب واکنش در دمای ۹۵-۶۰ درجه سلسیوس با اختلاف ۰/۵ درجه در هر چرخه رسم شد. برای مشخص شدن اختصاصی بودن آغازگر مورد استفاده در واکنش، منحنی ذوب هر آغازگر باید دارای یک اوج (Peak) باشد.

لیست آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش در جدول ۱ آمده است. این آغازگرها پس از هم ردیف نمودن توالی‌های به دست آمده از بانک ژن NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) به وسیله نرم‌افزار Primer3 طراحی گردیدند. ساخت آغازگرها توسط شرکت تکاپوزیست انجام شد.

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار شامل: تیمار گیاهان با قارچ اندوفیت *S. indica*، باکتری *P. protegens*، تیمار توام با قارچ اندوفیت *S. indica* و باکتری *P. protegens* و تیمار شاهد انجام شد. تیمارها هرکدام در سه تکرار انجام و پس از محاسبه بیان ژن‌های

پیفال و همکاران (Pfaffl *et al.* 2002) بر اساس فرمول زیر تجزیه و تحلیل شدند و نمودارهای مربوط توسط نرم افزار Excel رسم شدند.

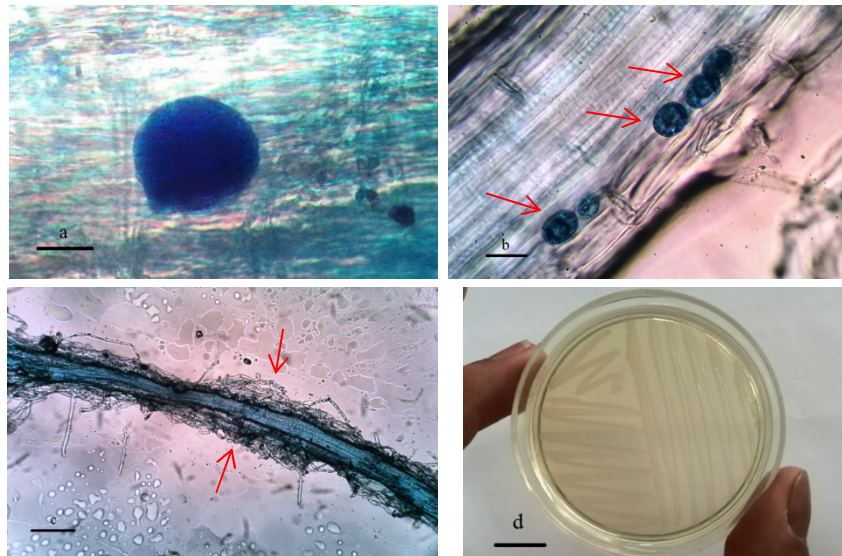
$$R = \frac{(E_{\text{Target}})^{\Delta\text{CP target}} (\text{MEAN Control} - \text{MEAN Sample})}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP ref}} (\text{MEAN Control} - \text{MEAN Sample})}$$

در این بررسی ژن بتا-اكتين به عنوان ژن خانه‌دار و ژن‌های PAL، LOX، NPR1، PR5 به عنوان ژن هدف استفاده شدند (جدول ۱).

#### ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده

به دلیل عدم اختصاصیت رنگ فلورسنس سایبرگرین و برای اطمینان از تولید قطعه اختصاصی و عدم وجود باندهای غیراختصاصی در محصولات Real-Time PCR ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرها به دو روش بررسی گردید. نخست، محصول حاصل روی ژل یک درصد آگارز با ولتاژ ۹۰ به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد. در این روش تشکیل شدن تنها یک بانده در محدوده ۱۵۰ تا ۲۰۰ بازی نشان دهنده عمل اختصاصی آغازگرها است. سپس،

مورد مطالعه برای هر نمونه، انحراف معیار آنها محاسبه و نتایج با استفاده از آزمون‌های مقایسه‌ای LSD و T student



شکل ۱. a- کلامیدوسپور رنگ آمیزی شده گلابی شکل قارچ *Serendipita indica* بر روی سطح کورتکس ریشه (Bar=5µm). b- کلامیدوسپورهای قارچ ریشه *S. indica* بر روی سطح ریشه (نشان داده شده با فلش قرمز رنگ) (Bar=5µm). c- توده میسلیم قارچ ریشه *S. indica* بر روی سطح ریشه (نشان داده شده به وسیله فلش قرمز رنگ) (Bar=10mm) کشت *Pseudomonas protegens* CHA0m-cherry بر روی محیط کشت NA پس از ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه (Bar=8mm).

Figure.1. a= Pear like shape *Serendipita indica* chlamydospore stained on root cortex (Bar=5µm). b= Colonization of *S. indica* chlamydospore (stained small spores) in root (Bar=15µm) indicated by red arrows. c= *S. indica* mycelium cluster on root (Bar=10mm) indicated by red arrows. d= *Pseudomonas protegens* CHA0m-cherry culture on NA medium after 24h at room temperature (Bar=8mm).

(a-c-۱).

test و با استفاده از نرم افزار IBM SPSS Statistics 19 آنالیز گردید.

۲۴ ساعت پس از کشت عصاره ریشه‌های گیاهان مایه-زنی شده با باکتری *P. protegens* CHA0-mCherry بر روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی بیوتیک جنتامایسین، کلنی‌های باکتری مشاهده گردید (شکل ۱-d). تعداد کلنی‌های باکتری در هر گرم بافت ریشه به میزان  $5 \times 10^5$  CFU  $g^{-1}$  محاسبه شد.

## نتایج و بحث

### وضعیت همزیستی قارچ ریشه اندوفیت و باکتری با ریشه

پس از رنگ آمیزی ریشه، کلامیدوسپورهای قارچ اندوفیت *S. indica* در بافت کورتکس ریشه گیاهان تلقیح شده به صورت گرد تا گلابی شکل و زنجیره‌ای مشاهده شدند. همچنین در سطح ریشه توده‌های ریشه قارچ نیز مشاهده گردید. در صورتی که بر روی سطح ریشه گیاهان شاهد کلامیدوسپور و توده ریشه قارچ مشاهده نشد (شکل

### ارزیابی میزان مقاومت گیاهان تیمار شده با عوامل

#### بیولوژیک نسبت به *Z. tritici*

سه روز پس از تلقیح گیاهان با سوسپانسیون اسپورهای قارچ *Z. tritici* و پس از برداشتن پوشش نایلونی از روی گلدان‌ها، در تمامی تیمارها و به ویژه در گیاهان تیمار شده

مقاومت به قارچ *Z. tritici* را از خود نشان دادند و با استفاده از آزمون LSD ( $P=0.5$ ) در گروه سوم (C) قرار گرفتند. میزان مقاومت تیمار توام گیاهان با قارچ *S. indica* و باکتری *P. protegens* نیز برابر تیمار قبل و در نتیجه میانگین مقاومت آن بر اساس روش Zhang و همکاران (۲۰۰۱) همانند تیمار قبل در گروه سوم (C) قرار گرفت (جدول ۲). میانگین میزان مقاومت گیاهان تیمار شده با قارچ *S. indica* بیشتر از میانگین دو تیمار قبل بود. بر اساس آزمون LSD ( $P=0.5$ ) این تیمار در گروه دوم (B) قرار گرفت (شکل ۲). سه تیمار شرح داده شده بر اساس روش Zhang و همکاران (۲۰۰۱) مقاوم (R) ارزیابی شدند. میانگین تیمار شاهد بیشتر از سه تیمار شرح داده شده قبل بود و واکنش آن بر اساس روش Zhang و همکاران (۲۰۰۱) نیمه مقاوم ارزیابی (MS) شد (جدول ۲). با توجه به آزمون LSD ( $P=0.5$ ) میانگین مقاومت تیمار شاهد در گروه اول (A) قرار گرفت (شکل ۲).

در این تحقیق برای ارزیابی میزان شدت بیماری‌زایی قارچ *Z. tritici* در همه تیمارها میانگین درصد نکروز و پوشش پیکنیریومی سطح برگ بر حسب (AUDPC) محاسبه شد (Saari and Prescott, 1975, Kia et al., 2018). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که شدت بیماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار است ( $F=23.944$ ,  $Sig=0.000$ ,  $CV\%=28.077$ ). آزمون LSD ( $P = 0.05$ ) نشان داد که میانگین تیمارها در ۳ گروه مختلف قرار می‌گیرد (شکل ۳). گیاهان تیمار شده با باکتری *P. protegens* دارای کمترین میانگین و کمترین میزان خسارت را از خود نشان دادند. میانگین این تیمار در گروه سوم (C) قرار گرفت. اختلاف بین تیمار باکتری *P. protegens* و تیمار توام با قارچ *S. indica* و باکتری *P. protegens* نسبت به همدیگر از نظر آماری معنی‌دار نبوده

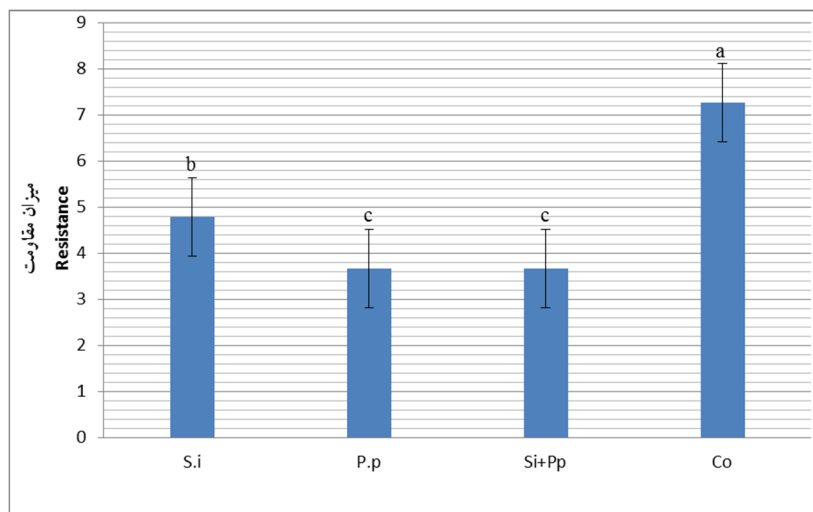
با باکتری *P. protegens*\_CHA0-mCherry، لکه‌های بسیار ریز کلروتیک مشاهده شد. ۷-۵ روز پس از تلقیح، لکه‌ها تیره‌تر گشته و به رنگ متمایل به قهوه‌ای تغییر رنگ دادند. این لکه‌های قهوه‌ای رنگ نشان دهنده مقاومت کامل به عامل بیماری می‌باشند (Kia et al., 2017). اما در سایر تیمارها مانند گیاهان تیمار شده با قارچ *S. indica* و به ویژه در گیاهان شاهد که با هیچ گونه عامل بیولوژیکی تلقیح نشده بودند و در خاک اتوکلاو شده و سترون کشت شده بودند، علائم کامل بیماری ۱۲-۱۰ روز بعد از زمان تلقیح ظاهر شد.

در روزهای نخست در این تیمارها لکه‌های زرد رنگی بر روی برگ‌ها مشاهده شد. این لکه‌ها با توجه به حساسیت تیمارها توسعه پیدا کردند. در تیمار شاهد، لکه‌ها به تدریج به رنگ قهوه‌ای درآمد و سطح برگ به تدریج خشک و لکه‌های نکروزه در سطح برگ تشکیل گردید. ۱۷ روز پس از تلقیح، پیکنیده‌های عامل بیماری به صورت لکه‌های ریز سیاه رنگ در هر دو سطح برگ به وجود آمد. ۲۱ روز پس از زمان تلقیح، در تیمار شاهد علائم بیماری به بالاترین سطح خود رسید و در این زمان یادداشت برداری نهایی همگی تیمارها با استفاده از روش نمره دهی Zhang و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد (شکل ۲).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که، میزان مقاومت گیاهان در تیمارهای مختلف در سطح ۱ و ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد. مقایسه میانگین مقاومت گیاهان در تیمارهای مختلف به قارچ *Z. tritici* با استفاده از آزمون LSD ( $P=0.5$ )، نشان داد که میانگین مقاومت تیمارها در ۳ گروه مختلف قرار می‌گیرد (شکل ۲).

میزان مقاومت گیاهان تیمار شده با باکتری *P. protegens* دارای کمترین میانگین بر اساس روش Zhang و همکاران (۲۰۰۱) بوده و در نتیجه بیشترین میزان

و این دو تیمار در یک گروه مشترک (C) قرار گرفتند (شکل ۳). گیاهان تیمار شده با قارچ *S. indica* دارای



شکل ۲. تاثیر قارچ *Serendipita indica* (S.i) و باکتری *Pseudomonas protegens* (P.p) بر مقاومت گیاه گندم رقم تجن تلقیح شده با قارچ *Z. tritici*، مقایسه میانگین با استفاده از آزمون LSD (P = 0.05)، Bar=Standard Deviation، Co=شاهد.

Figure.2. The effect of *Serendipita indica* (S.i) and *Pseudomonas protegens* (P.p) on Tajan wheat cultivar resistance inoculation with *Zymoseptoria tritici*, Analise of variance by LSD (P = 0.05), Bar=Standard Deviation, Co=Control.

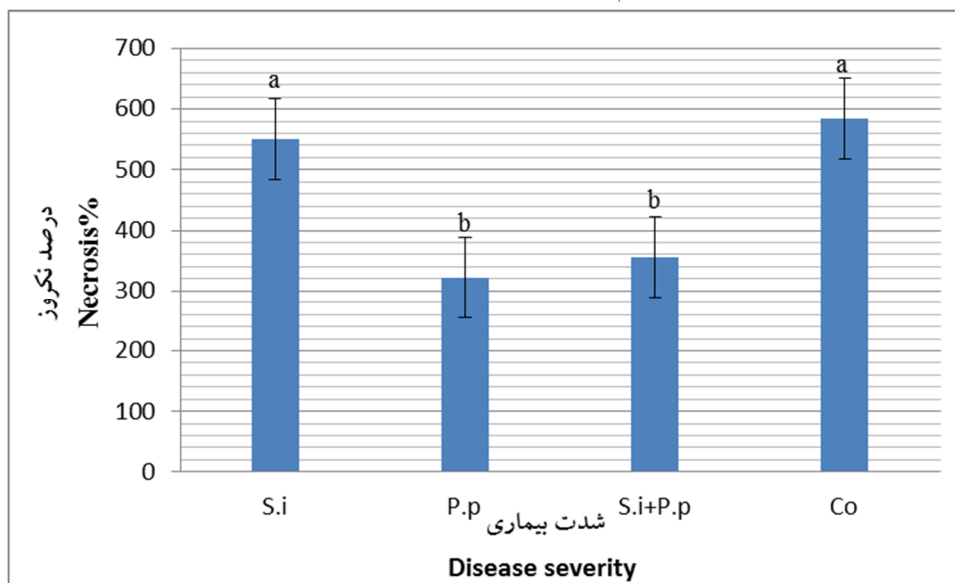
باکتری *P. protegens* دارد (جدول ۲). از طرف دیگر میزان اختلاف بین میانگین مقاومت گیاهان تیمار شده با قارچ *S. indica* و تیمار توام با قارچ *S. indica* و باکتری *P. protegens* به مقدار ۱/۱ واحد می‌باشد. قارچ *S. indica* در هر دو تیمار ذکر شده حضور دارد، اما میانگین مقاومت این دو تیمار به اندازه ۱/۱ واحد با همدیگر اختلاف دارد. بنابراین نتایج نشان می‌دهد که افزایش در میزان مقاومت تیمار توام با قارچ *S. indica* و باکتری *P. protegens* به علت حضور *P. protegens* بوده است و میزان تاثیر *P. protegens* در تحریک و افزایش مقاومت رقم تجن بیشتر از قارچ *S. indica* است.

همچنین با توجه به جدول ۲، قارچ *S. indica* قادر بوده است که میزان مقاومت رقم تجن را نسبت به قارچ عامل بیماری *Z. tritici* بر اساس روش نمره دهی ۱-۹ Zhang و همکاران (۲۰۰۱) به میزان ۴/۸ واحد افزایش دهد و باکتری *P. protegens* به مقدار ۱/۱ واحد به

خسارت بیشتری از دو تیمار شرح داده شده قبلی بودند. این تیمار بر اساس گروه‌بندی انجام شده با آزمون LSD (P = 0.05) در گروه دوم (B) قرار گرفت. میانگین نکرود سطح برگ تیمار شاهد بیشتر از سایر تیمارها بود و بر اساس گروه‌بندی انجام شده با آزمون LSD این تیمار در گروه (A) قرار گرفت (شکل ۳).

بر اساس نتایج، تیمار گندم رقم تجن با قارچ *S. indica*، باکتری *P. protegens* و تیمار توام با قارچ *S. indica* و باکتری *P. protegens* باعث تحریک و افزایش مقاومت گندم رقم تجن به قارچ *Z. tritici* گردید. میزان اختلاف میانگین مقاومت این تیمارها نسبت به تیمار شاهد بر اساس مقیاس نمره دهی ۱-۹ Zhang و همکاران (۲۰۰۱) به شرح زیر می‌باشد. میانگین مقاومت در تیمار شاهد به میزان ۲/۴۹ واحد با میانگین تیمار گیاهان تیمار شده با قارچ *S. indica*، و ۳/۶ واحد نیز با گیاهان تیمار شده با باکتری *P. protegens* و تیمار توام با قارچ *S. indica* و

میانگین مقاومت این تیمار افزوده و مقاومت رقم تجن را تحریک نموده است. اگرچه مقدار میانگین مقاومت به



شکل ۳. تاثیر قارچ *Serendipita indica* (S.i) و باکتری *Pseudomonas protegens* (P.p) بر شدت بیماری (درصد نکروز سطح برگ) گیاه گندم رقم تجن تلقیح شده با قارچ *Z. tritici* بر حسب (AUDPC)، مقایسه میانگین با استفاده از آزمون LSD (P = 0.05)، Bar=Standard Deviation، Co= شاهد.

Figure.3. The effect of *Serendipita indica* (S.i) and *Pseudomonas protegens* (P.p) on disease severity (leave necrosis%)Tajan wheat cultivar inoculation with *Zymoseptoria tritici* by (AUDPC), Analise of variance by LSD (P = 0.05), Bar=Standard Deviation, Co=Control.

#### الگوی بیان ژن PAL

با توجه به شکل ۴، بیان ژن PAL در گیاهان گندم رقم حساس تجن تیمار شده با قارچ *S. indica* به تدریج افزایش یافته و در روز سوم و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی گیاهان با سوسپانسیون اسپورهای قارچ *Z. tritici* به بیشینه بیان خود رسید. در این زمان میزان بیان این ژن در تیمار S.

وجود آمده در اثر این دو عامل بیولوژیک به میزان ۱/۱ واحد اختلاف دارد، اما در هر صورت هر دو عامل بیولوژیک با همدیگر در ریشه گیاه حضور داشته‌اند و هر دو با همدیگر و نیز با ریشه گیاهان گندم رقم تجن دارای تعامل بوده‌اند.

جدول ۲. تجزیه واریانس مقاومت و شدت بیماری (AUDPC) تیمارهای آزمایشی در گیاه گندم رقم تجن تیمار شده با قارچ

*Serendipita indica* و باکتری *Pseudomonas protegens* به قارچ *Z. tritici*

**Table 2. Analysis of variance for disease evaluation parameters in in Tajan wheat cultivar treated with mycorrhizal fungus *Serendipita indica*, *Pseudomonas protegens* bacteria and control plant at after inoculation with the causal agent of septoria leaf blotch (*zymoseptoria tritici*).**

تیمار	df	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	Sig.	CV%	LSD (۰/۰۵)
Treatment		SS	MS				
شدت بیماری ** (درصد نکروز سطح برگ % AUDPC)	۳	۱۶۰۲۹۹/۴۱۷	۵۳۴۳۳/۱۳۹	۲۳/۹۴۴	۰/۰۰۰	۲۸/۰۷۷	۱۲۲/۷۵
مقاومت ** Resistance	۱۱	۲۵/۹۳۸	۸/۶۴۶	۳۲/۶۱۵	۰/۰۰۰	۳۲/۹۷	۰/۹۶۹

در سطح ۵ درصد را نشان می دهد. به طور کلی، با توجه به شکل ۴، بیان ژن PAL در تمامی تیمارهای مورد بررسی به صورت تدریجی افزایش یافته و در زمان ۷۲ ساعت پس از تلقیح گیاهان با عامل بیماری زا به بیشینه بیان خود رسیده است. ۲۴ ساعت پس از تلقیح و در روز اول بیان این ژن در دو تیمار قارچ اندوفیت *S. indica* و باکتری *P. protegens* تقریباً یکسان بوده است. اما در روز دوم بیان این ژن در تیمار *P. protegens* نسبت به تیمار *S. indica* افزایش یافت. در نحوه بیان این ژن در تیمارهای مورد مطالعه، میزان بیان در تیمار توام عوامل بیولوژیک از دو تیمار دیگر کمتر بود. این نتیجه نشان می دهد که همزیست نمودن این دو عامل بیولوژیک با ریشه گندم رقم تجن ممکن است سبب به وجود آمدن اثر کاهشی در القاء مقاومت به این گیاه شود. بیشترین میزان نرخ بیان ژن PAL در تیمار *P. protegens* و در زمان ۷۲ ساعت پس از تلقیح گیاهان با عامل بیماری-زا بود.

ژن PAL یک آنزیم مهم در مسیرهای Phenylpropanoid و Octadecanoid می باشد (Stotz et al. 2009). این ژن نقش مهمی را در مقاومت گیاهان از طریق دخالت در

*indica*، ۹ برابر تیمار شاهد بود. میانگین تیمار مورد بررسی در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح با میانگین تیمار شاهد دارای تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد بودند. در تیمار گیاهان با باکتری *P. protegens* نیز همانند تیمار قبل میزان بیان ژن PAL در روزهای اول و دوم پس از مایه زنی با عامل بیماری سپتوریوز برگی گندم به تدریج افزایش یافته و ۷۲ ساعت پس از تلقیح به اوج بیان خود رسید. در این زمان میزان بیان این ژن ۱۰/۲۷ برابر بیان آن در تیمار شاهد بوده است. میانگین این تیمار در زمان های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه زنی دارای تفاوت معنی دار در سطح ۰/۱ درصد و در زمان ۲۴ ساعت پس از مایه زنی با نرخ بیان این ژن در تیمار شاهد دارای اختلاف در سطح ۱ و ۵ درصد بودند.

نحوه بیان ژن PAL در تیمار توام گیاهان با هر دو عامل بیولوژیک نشان داد که، در این تیمار نیز همانند دو تیمار قبل پس از مایه زنی گیاهان با عامل بیماری، بیان ژن مذکور به تدریج افزایش یافته و در روز سوم پس از تلقیح به حداکثر بیان خود رسید. در این زمان میزان بیان این ژن ۴/۱۶ برابر بیان آن در تیمار شاهد بوده است. میانگین این تیمار در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح، دارای تفاوت معنی دار بین نرخ بیان این ژن با تیمار شاهد

(Ahangar et al., 2014). در پژوهشی دیگر نیز با همزیست نمودن قارچ اندوفیت *S. indica* با گیاه گندم و تلقیح آن با *Fusarium culmorum* مشاهده نمودند که میزان بیان ژن PAL در روزهای نخستین پس از آلودگی افزایش یافته و موجب القاء مقاومت به میزبان گردید (Beccari et al., 2011). شریفی تهرانی و همکاران با بررسی تاثیر باکتری *P. protegens* در القاء مقاومت به گیاه گندم تلقیح شده با قارچ عامل بیماری زنگ قهوه‌ای *Puccinia tritici* اظهار داشتند که میزان بیان ژن PAL در اثر این تعامل افزایش یافته و در نهایت مقاومت میزبان نسبت به عامل بیماری‌زا افزایش یافته است (Sharifi Tehrani et al., 2011). در بررسی‌های انجام شده بر روی گندم تیمار شده با اسید سالیسیلیک و تلقیح گیاهان گندم با *Z. tritici*، افزایش در میزان ژن PAL گزارش شده است (Gholamnezhad et al., 2016). همچنین در آزمایشی دیگر و تیمار گندم با اسید اسکوربیک و تلقیح گیاهان با *Z. tritici*، میزان بیان ژن PAL در ۲ تا ۵ روز پس تیمار گیاهان به میزان ۲/۹۸ تا ۳/۴۸ برابر افزایش یافت (Somai-Jemmali et al., 2015). مومن و همکاران با بررسی سه رقم آلیکسان<sup>۱۵</sup> (حساس)، پرمیو<sup>۱۶</sup> (نیمه مقاوم) و آلتیگو<sup>۱۷</sup> (مقاوم) و تلقیح آنها با *Z. tritici*، افزایش میزان بیان ژن PAL را در رقم مقاوم آلتیگو نسبت به رقم حساس آلیکسان گزارش نمودند (Maumene et al., 2010). در آزمایش‌های دوبا و همکاران نیز افزایش در میزان بیان ژن PAL در گیاهان گندم تلقیح شده با قارچ *F. culmorum* و در نتیجه افزایش میزان مقاومت و کاهش علائم گزارش

مسیرهای سنتز ایزوفلاونوئید<sup>۱۲</sup> و فنیل‌پروپانوئید<sup>۱۳</sup> که فعالیت فیتوآلکسینی دارند ایفا می‌کند. این ژن همچنین در مسیر بیوسنتز سالیسیلیک اسید و دیگر ترکیبات وابسته دفاعی دخیل است و یک ترکیب کلیدی سیگنال‌دهی برای فعال نمودن ژن‌های وابسته دفاعی، کاتالیز کننده‌ها، پروتئین‌های گیرنده<sup>۱۴</sup> و فاکتور رونویسی است (Stotz et al., 2009, Gholamnezhad et al., 2016).

علاوه بر این، PAL اولین آنزیم در مسیر فنیل‌پروپانوئید بوده و یک آنزیم کلیدی در سنتز برخی ترکیبات ثانویه مرتبط با دفاع گیاهان مانند لیگنین و فنل می‌باشد (Ngadze et al., 2012). افزایش در میزان PAL در گندم-های تلقیح شده با عامل بیماری‌زای *Pyrenophora tritici-repentis* گزارش شده است. این ژن باعث کاهش در میزان کلروز و نکروز در برگ‌های گیاه گندم و در نتیجه افزایش میزان مقاومت گیاه می‌گردد (Pandelova et al., 2012, Dorneles et al., 2017). گیاهان تراریخت توتون که فعالیت PAL در آنها کم می‌باشد، لیگنین کمتری در دیواره داشته و در مقایسه با گیاهان دستکاری نشده توتون، نسبت به تهاجم بیمارگر حساس‌تر می‌باشند. بنابراین PAL نقش مهمی در مقاومت گیاه به بیماری دارد (Stotz et al., 2009).

آهنگر و همکاران با همزیست نمودن قارچ اندوفیت *S. indica* با گیاه گندم رقم فلات و تلقیح این گیاه با *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* گزارش نمودند که بیان ژن PAL نسبت به شاهد افزایش یافته و موجب افزایش مقاومت گیاه میزبان به قارچ مذکور نیز گردیده است

<sup>۱۵</sup> Alixan<sup>۱۶</sup> Premio<sup>۱۷</sup> Altigo<sup>۱۲</sup> Isoflavonoids<sup>۱۳</sup> Phenylpropanoids<sup>۱۴</sup> Receptor

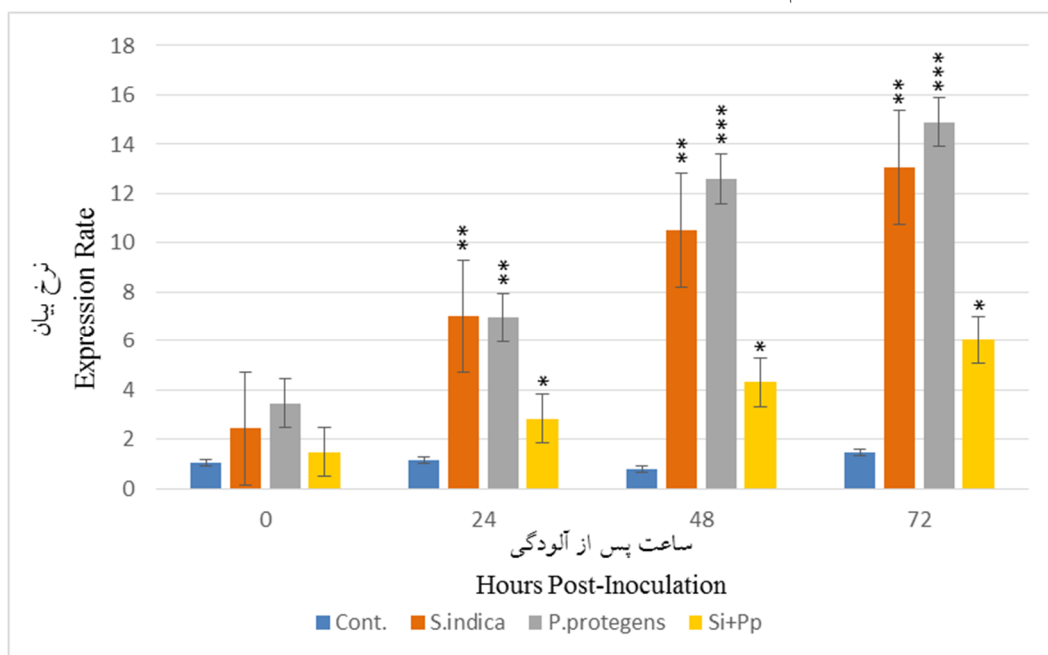
یافته است. در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تلقیح، نرخ بیان این ژن با تیمار شاهد دارای اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد بوده است. در این دو زمان میزان بیان ژن LOX به ترتیب ۵/۱۵ و ۱۳/۱۱ برابر تیمار شاهد بوده است.

۲۴ ساعت پس از تلقیح گیاهان با *Z. tritici* بیان ژن LOX در تیمار گیاهان با باکتری *P. protegens* افزایش یافت و در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی به حداکثر بیان خود رسیده است. آنالیز آماری نشان داده است که در ۳ زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح، در میزان بیان این

شده است (Duba et al. 2019). اورس و همکاران نیز در تحقیقات خود افزایش بیان ژن PAL را ۷۲ ساعت پس از تلقیح گیاهان گندم رقم آلیکسان با *Z. tritici* گزارش نمودند (Ors et al. 2017).

#### الگوی بیان ژن LOX

بیان ژن LOX در گیاهان تیمار شده با قارچ *S. indica*، در ابتدا تجمع یافته و در طی روز اول به تدریج مقدار بیان آن افزایش یافت. ۲ روز پس از مایه‌زنی گیاهان با سوسپانسیون اسپوره‌های *Z. tritici*، این ژن به بیشینه بیان خود رسیده و پس از آن در روز سوم میزان بیان آن کاهش



شکل ۴. الگوی بیان ژن PAL در گیاه گندم رقم تجن تیمار شده با قارچ ریشه *Serendipita indica* و باکتری *Pseudomonas protegens* در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری سپتوریوز برگ *Z. tritici*. \*، \*\*، \*\*\* به ترتیب نشان می‌دهد که بین تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد در سطح آماری ۵، ۱ و ۰٫۱ درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

**Fig. 4. Expression patterns of PAL gene in Tajan cultivar of wheat plant. Control, treated by mycorrhizal fungus *Serendipita indica*, *Pseudomonas protegens* and co-inoculated by *S. indica* and *P. protegens* at various times after inoculation with the causal agent of Septoria leaf blight *Z. tritici*.**

Note: \*, \*\*, \*\*\* Stars show that expression data means was statistically different at 0.05, 0.01 and 0.001 levels respectively.

ژن و تیمار شاهد اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰٫۱، ۱ و ۵ درصد وجود دارد. در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت



در مسیره‌های Phenylpropanoid و Octadecanoid می‌باشد (Stotz et al. 2009).

Beccari و همکاران با همزیست نمودن قارچ اندوفیت *S. indica* با گیاه گندم و مطالعه تغییر در میزان بیان ژن LOX و القاء مقاومت به قارچ بیماری‌زای *F. culmorum* مشاهده نمودند که بیان این ژن در مراحل اولیه پس از آلودگی در این گیاه افزایش یافته و پس از ۹۶ ساعت میزان بیان آن کاهش می‌یابد. ایشان افزایش در میزان بیان این ژن را در جلوگیری از رخنه پاتوژن و القاء مقاومت در گیاه میزبان موثر دانسته و این پدیده را به عنوان یکی از عوامل افزایش مقاومت میزبان معرفی نمودند (Beccari et al., 2011). فعالیت ضد میکروبی LOX در گیاهان مختلف و علیه بیمارگرهای متفاوت به اثبات رسیده است (Croft et al. 1993, Schaffrath et al. 2000). با حمله گونه‌های اکسیژن فعال به لیپیدهای غشایی در طول فرآیند پراکسیداسیون لیپیدی، مقدار LOX افزایش پیدا کرده و منجر به آزاد شدن اسیدهای چرب می‌شود. افزایش اولیه LOX منجر به تخریب غشاء و در نهایت ترشح الکترولیت‌ها خواهد شد. چندین گزارش در مورد فعالیت سریع و بیشتر آنزیم LOX، در واکنش مقاوم نسبت به واکنش‌های حساس وجود دارد. لیپوکسی‌ژناز، لینولئیک اسید را به جاسمونیک اسید تبدیل می‌کند و این آنزیم در مسیر مقاومت سیستمیک القایی (ISR) نقش دارد (Vick & Zimmerman, 1983). افزایش میزان بیان ژن LOX در گیاهان گندم تیمار شده با اسید سالیسیلیک و تلقیح شده با قارچ عامل سفیدک سطحی گندم *B. graminis* f. sp. *tritici* گزارش شده است. در این گیاهان میزان رخنه بیمارگر و تشکیل مکینه قارچ کاهش پیدا کرد (Tayeh et al. 2013). در بررسی‌های انجام شده بر روی گندم تیمار شده با ماده سورفاکتین و تلقیح شده با قارچ *Z. tritici*

پس از تلقیح، میزان بیان ژن LOX به ترتیب ۲۷/۰۷، ۵۶/۸۱ و ۷/۲۵ برابر میزان بیان آن در تیمار شاهد بوده است.

همچنین در زمان ۴۸ ساعت پس از تلقیح گیاهان با عامل بیماری‌زا در تیمار توام گیاهان با دو عامل بیولوژیک *S. indica* و *P. protegens* مقدار ژن LOX به بیشینه بیان خود رسیده است. در این زمان میزان بیان این ژن در این تیمار ۲۱/۲۲ برابر تیمار شاهد بوده است. ۲۴ ساعت پس از تلقیح نیز میزان بیان این ژن ۹/۴۶ برابر بیان آن در تیمار شاهد بوده است. در دو زمان ذکر شده بین میانگین این تیمار و میانگین تیمار شاهد اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد وجود دارد.

همان‌طور که در شکل ۵ نیز می‌توان مشاهده نمود، هر سه تیمار در افزایش بیان ژن LOX موثر بوده‌اند. بیان اولیه در زمان صفر، در هر ۴ تیمار با هم مساوی ۱ بوده است. اما در ۴۸ ساعت پس از تلقیح که بیان این ژن به بیشینه خود رسیده است، در این زمان میزان بیان در تیمار *P. protegens* از بقیه تیمارها بیشتر بوده است. میزان بیان ژن LOX در هر سه تیمار ۷۲ ساعت پس از تلقیح کاهش یافت. اما میزان بیان این ژن در تیمار *P. protegens* در زمان مذکور نیز در سطح ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد بود.

لیپوکسی‌ژناز<sup>۱۸</sup> یک دی‌اکسی‌ژناز است که منجر به هیدرو پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع دارای ساختار سیس و اسیدهای لینولئیک<sup>۱۹</sup>، لینولئیک و آرکیدونیک<sup>۲۰</sup> می‌شود. همچنین ژن LOX یک آنزیم مهم

<sup>۱۸</sup> Lipoxigenase

<sup>۱۹</sup> Linoleic

<sup>۲۰</sup> Archidonic

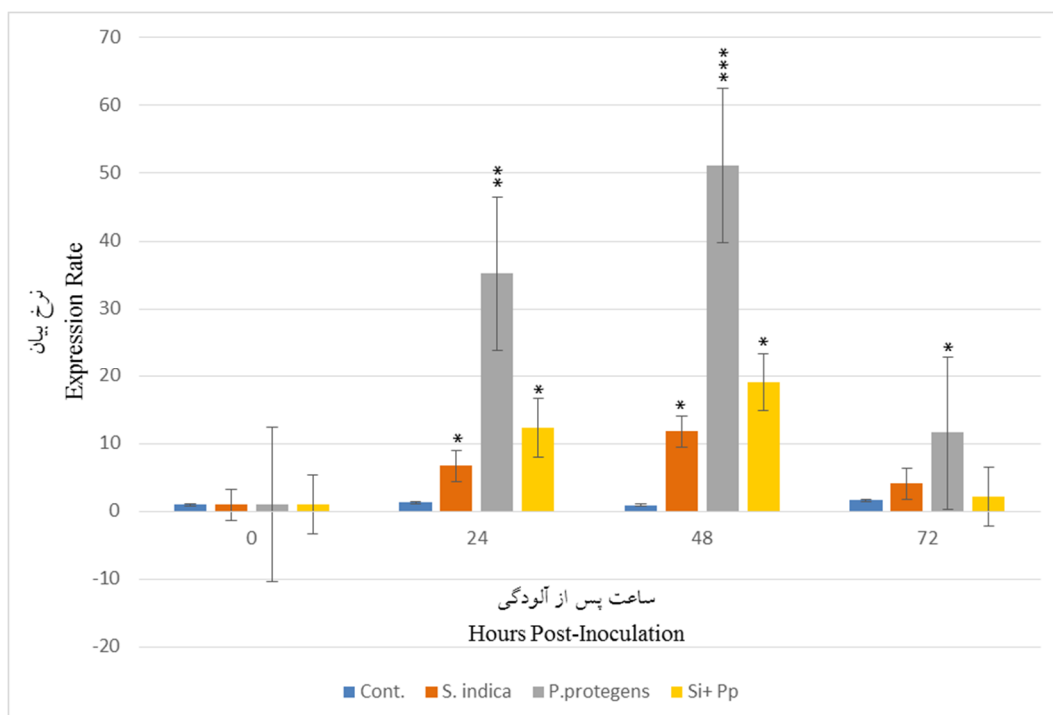
NPR1 (Nonexpressor of پروتئین *et al.* 2020)  
NIM1 (Pathogenesis related gene 1) که با نام‌های  
SAI1 (Salicylic acid- و (Non-inducible immunity  
(insensitive) نیز شناخته می‌شود، یک تنظیم کننده کلیدی  
می‌باشد که سبب مقاومت گیاهان علیه طیف وسیعی از  
بیمارگرها شده و نقش مهمی در SAR و ISR دارد (Bai  
*et al.* 2011).

در این پژوهش نیز بیان ژن NPR1 در اثر تیمار گیاهان  
گندم رقم تجن با قارچ ریشه اندوفیت *S. indica* و باکتری  
*P. protegens* و تلقیح با قارچ بیمارگر *Z. tritici* افزایش  
یافت. در روز دوم پس از تلقیح، در تیمار *S. indica* میزان

مشخص گردید، در شرایطی که میزان مقاومت گندم به  
مقدار ۷۰ درصد نسبت به شاهد افزایش پیدا کرده بود، بیان  
ژن LOX به شدت افزایش می‌یابد (Le Mire *et al.*  
2018). در بررسی‌های انجام شده با تیمار گندم با اسید  
اسکوربیک و تلقیح گیاهان با *Z. tritici*، میزان بیان ژن  
LOX در ۲۴ ساعت پس از تیمار گیاهان به میزان ۴ برابر  
افزایش یافت (Somai-Jemmali *et al.* 2015).

#### الگوی بیان ژن NPR1

از تحریک و بیان NPR1 در گیاهان به عنوان یک  
استراتژی برای ایجاد مقاومت در گیاهان و دفاع در برابر  
بیمارگرهای گیاهان یاد شده است (Xu *et al.* 2017, Esse



شکل ۵. الگوی بیان ژن LOX در گیاه گندم رقم تجن تیمار شده با قارچ ریشه *Serendipita indica* و باکتری *Pseudomonas*

*protegens* در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری سپتوریوز برگ *Z. tritici*

- \*, \*\*, \*\*\* به ترتیب نشان می‌دهد که بین تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد در سطح آماری ۵، ۱ و ۰٫۱ درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

**Fig. 5. Expression patterns of LOX gene in Tajan cultivar wheat plant. Control, treated by mycorrhizal fungus *Serendipita indica*, *Pseudomonas protegens* and co-inoculated by *S. indica* and *P. protegens* at various times after inoculation with the causal agent of Septoria leaf blight *Z. tritici*.**

Note: \*, \*\*, \*\*\* Stars show that expression data means was significantly different at 0.05, 0.01 and 0.001 levels respectively.

میزان بیان این ژن ۲/۷۷، ۱/۷ و ۲/۵۵ برابر میزان بیان آن در تیمار شاهد بود. در ۳ زمان ذکر شده، بین تیمار *P. protegens* و تیمار شاهد اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد وجود داشت.

بیان ژن NPR1 ۴۸ ساعت پس از تلقیح در تیمار توام گیاهان با دو عامل بیولوژیک *S. indica* و *P. protegens* به بیشینه بیان خود رسید. میزان بیان این ژن در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح، به ترتیب ۳/۳۸، ۲/۵۶ و ۳/۵۵ برابر بیان این ژن در تیمار شاهد بود. همچنین تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که این تیمار و تیمار شاهد از نظر آماری در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از

بیان ژن NPR1 به بیشینه خود رسید. در این زمان میزان بیان این ژن ۱/۴۲ برابر بیان آن در تیمار شاهد بود. بر اساس تجزیه و تحلیل انجام شده مشخص گردید که این تیمار و تیمار شاهد دارای اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

برخلاف تیمار قبل، در تیمار *P. protegens* بیان ژن NPR1 در زمان ۲۴ ساعت پس از تلقیح گیاهان با سوسپانسیون اسپورهای قارچ عامل بیماری‌زا به بیشینه بیان خود رسید. پس از آن، در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح به تدریج بیان این ژن در این تیمار کاهش پیدا کرد. در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اسپورپاشی،

(al. 2010, Chen et al. 2013). مشخص شده است که بیان ژن NPR1 پس از آلودگی آرابیدوپسیس با *P. parasitica* به شدت افزایش می‌یابد (Rairdan et al. 2001) و افزایش بیان این ژن در تنباکو منجر به افزایش مقاومت آن به قارچ‌های *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* و *Rizoctonia solani* می‌شود (Cao et al. 1997).

### الگوی بیان ژن PR5

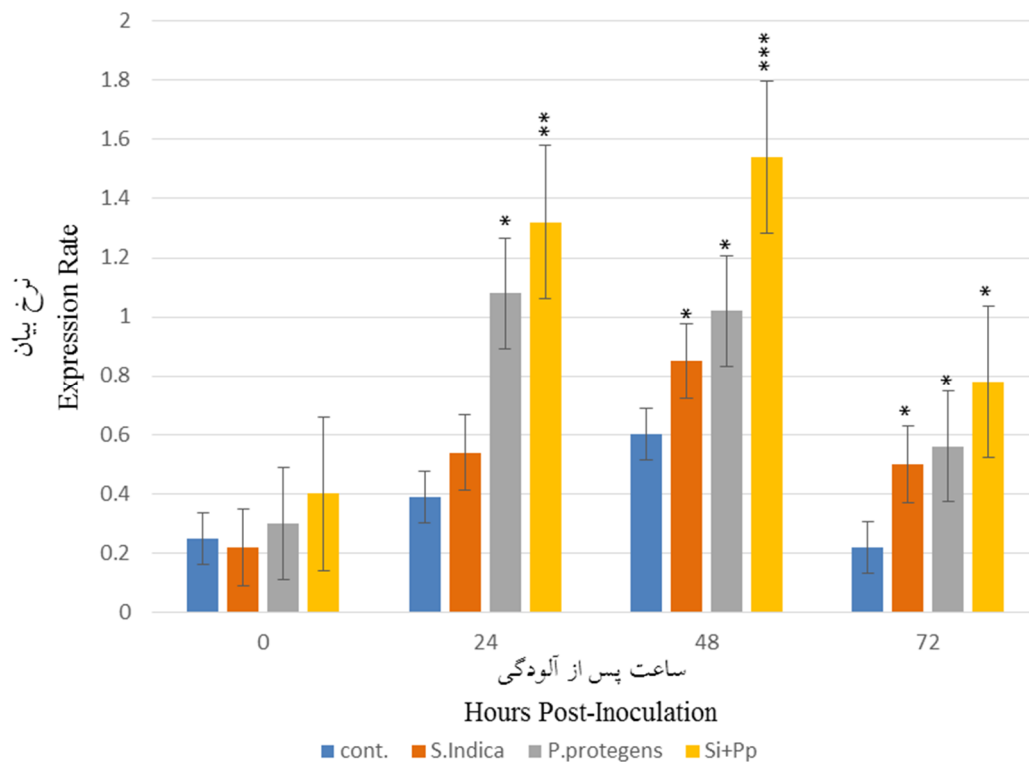
پروتئین PR5 در موجودات یوکاریوت گوناگونی وجود دارد. این ژن تحت عنوان پروتئین وابسته به بیماری‌زایی شناخته شده و در بازدارندگی قارچ‌های بیمارگر با اهمیت شمرده شده است. پروتئین‌های گروه PR5 پروتئین‌هایی با جرم مولکولی بیش از ۲۲ کیلو دالتون بوده و شباهت زیادی به پروتئین‌های توماتین دارند. اولین بار این پروتئین در برگ‌های برنج هندی رقم Hitomebore که با مس، JA و اشعه UV تیمار شده بود کشف شد (Linthorst et al. 1991).

با توجه به شکل ۷، تجمع بیان ژن PR5 در گیاهان گندم رقم تجن تیمار شده با قارچ اندوفیت *S. indica* در روز اول پس از تلقیح با *Z. tritici* شروع شده و در ۴۸ ساعت پس از آلودگی به حد بیشینه خود رسیده است. پس از آن در روز سوم نسبت به روز دوم پس از آلودگی میزان بیان آن کاهش یافته است. میزان بیان ژن PR5 در این تیمار در ساعت‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح ۱۰/۳ و ۲/۸۱ برابر تیمار شاهد بوده است. نتایج نشان داد که در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح تیمار *S. indica* با تیمار شاهد به ترتیب در سطوح ۱ و ۵ درصد دارای اختلاف آماری معنی‌دار است.

در تیمار گیاهان با باکتری *P. protegens* نیز همانند تیمار قبل بیشینه بیان ژن PR5 در زمان ۴۸ ساعت پس از

تلقیح گیاهان با عامل بیماری‌زا در سطح ۰/۱، ۱ و ۵ درصد دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشند. با توجه به شکل ۶، بیشترین میزان بیان در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی گیاهان گندم رخ داده است. بیشترین میزان بیان مربوط به تیمار توام گندم با *S. indica* و *P. protegens* می‌باشد.

آهانگر و همکاران با مطالعه بر روی تاثیر قارچ اندوفیت *S. indica* در القاء مقاومت به *B. graminnis* f. sp. *tritici* در گیاه گندم رقم تجن، اظهار داشتند که در گیاهان همزیست شده با این قارچ، میزان بیان ژن NPR1 و در نتیجه مقاومت گیاه نیز در طول ۴۸ ساعت پس از آلودگی افزایش یافته است. ایشان بر اساس نتایج این تحقیق، همزیستی گیاه میزبان با این قارچ و افزایش زود هنگام در میزان بیان ژن مذکور را در القاء مقاومت موثر دانستند (Ahangar et al., 2017). Beccari و همکاران با تحقیق بر روی تاثیر قارچ اندوفیت *S. indica* در افزایش مقاومت گندم نسبت به قارچ بیماری‌زای *F. culmorum* چنین ادعان داشتند که در گیاهان تیمار شده، در روزهای نخستین پس از آلودگی میزان فعالیت و بیان ژن NPR1 افزایش یافته و موجب افزایش مقاومت در گیاه میزبان می‌گردد (Beccari et al., 2011). همچنین تحقیقات نشان دادند که افزایش بیان NPR1 در آرابیدوپسیس منجر به افزایش مقاومت آن در مقابل بیمارگر باکتریایی *P. syringae* pv. *tomato* و قارچ عامل بیمارگر سفیدک داخلی *Peronospora parasitica* می‌شود (Cao et al. 1997). افزایش بیان NPR1 در گوجه فرنگی منجر به افزایش مقاومت آن به ویروس موزاییک گوجه فرنگی می‌شود (Lin et al. 2004). کلون نمودن ژن NPR1 از آرابیدوپسیس به مرکبات و همچنین بیان ژن CtNHI منجر به افزایش مقاومت میزبان به بیماری شانکر باکتریایی مرکبات *X. axonopodis* pv. *citri* می‌گردد (Zhang et



شکل ۶. الگوی بیان ژن NPR1 در گیاه گندم رقم تجن تیمار شده با قارچ ریشه *Serendipita indica* و باکتری *Pseudomonas protegens* در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری سپتوریوز برگ *Z. tritici* - \*، \*\*، \*\*\* به ترتیب نشان می‌دهد که بین تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد در سطح آماری ۵، ۱ و ۰٫۱ درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

**Fig. 6. Expression patterns of NPR1 gene in Tajan cultivar of wheat plant. Control, treated by mycorrhizal fungus *Serendipita indica*, *Pseudomonas protegens* and co-inoculated by *S. indica* and *P. protegens* at various times after inoculation with the causal agent of Septoria leaf blight *Z. tritici*.**

Note: \*, \*\*, \*\*\* Stars show that expression data means was significantly different at 0.05, 0.01 and 0.001 levels respectively.

۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح با میانگین تیمار شاهد دارای اختلاف آماری معنی‌دار به ترتیب در سطوح ۱ و ۵ درصد می‌باشد. همچنین میزان بیان ژن مورد نظر در این تیمار و در زمان‌های مذکور ۱۱/۲۳ و ۲/۸۶ برابر تیمار شاهد بود (شکل ۷).

با توجه به شکل ۷، بیشترین میزان بیان ژن PR5 در زمان ۴۸ ساعت پس از تلقیح می‌باشد. همانطور که در این شکل نیز مشاهده می‌گردد، بیشینه بیان و تجمع این ژن در تیمار *P. protegens* کمتر از بیشینه بیان تیمارهای *S. indica* و تیمار توام این دو عامل بیولوژیک می‌باشد.

تلقیح با قارچ بیمارگر *Z. tritici* بود. پس از آن نیز میزان بیان این ژن به تدریج کاهش یافت. در این زمان میزان بیان ژن مورد نظر ۵/۸۳ برابر بیان آن در تیمار شاهد بود. همچنین نتایج آنالیز آماری نشان داد که میزان بیان ژن مورد نظر تنها در زمان ذکر شده با میانگین تیمار شاهد دارای اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

بیشینه بیان ژن PR5 در تیمار توام گیاهان با *S. indica* و *P. protegens* نیز در زمان ۴۸ ساعت پس از اسپورپاشی گیاهان با قارچ بیمارگر *Z. tritici* بوده است. همچنین نتایج آنالیز آماری نشان داد که میزان بیان این ژن در ساعت‌های

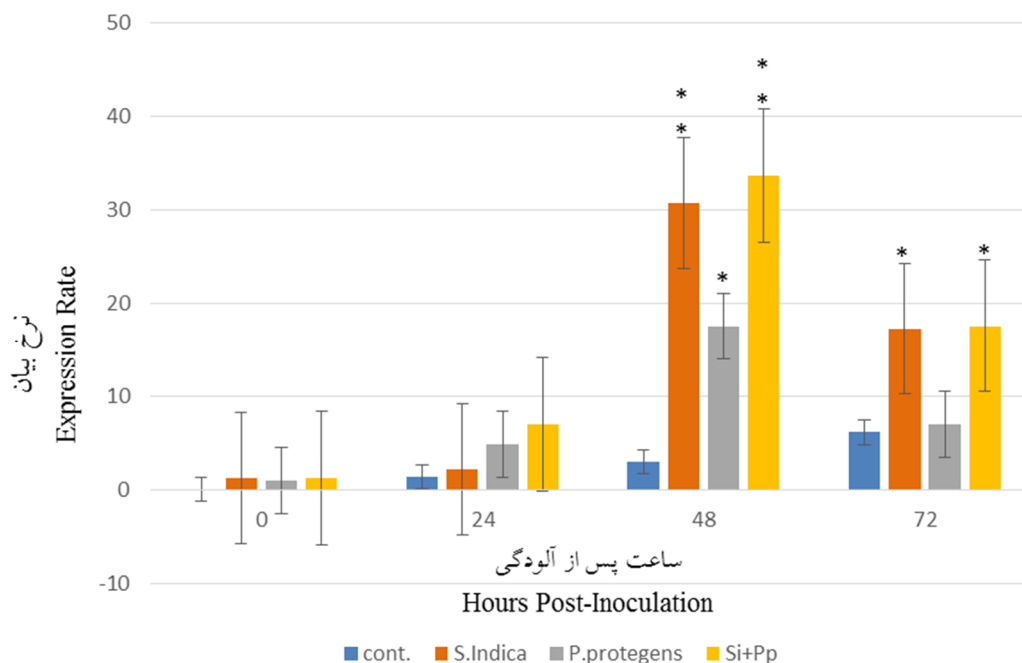
نسبت به شاهد افزایش پیدا کرده بود، بیان ژن PR5 به شدت افزایش می‌یابد (Le Mire et al. 2018). تجمع زیاد و زودهنگام PR5 در تعامل ناسازگار گندم با *Z. tritici* در آزمایش‌های سومای جمالی و همکاران نیز گزارش شده است (Somai-Jemmali et al. 2017).

همانطور که در شکل‌های ۴، ۵، ۶ و ۷ نیز مشاهده می‌شود، میزان افزایش بیان ژن‌های هدف در تیمار شاهد در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح گیاهان کمتر از سایر تیمارها است. این پدیده نشان دهنده نقش تیمار گیاهان با عوامل بیولوژیک در افزایش سریع و زود هنگام بیان ژن‌های مورد بررسی در پاسخ به حمله بیمارگر در رقم گندم حساس (تجن) می‌باشد. این پدیده می‌تواند در محدود کردن ورود بیمارگر به بافت گیاه و یا جلوگیری از فعالیت آن در همان ساعات نخستین و یا روزهای اولیه آلودگی موثر واقع شود. اما افزایش و تجمع دیر هنگام بیان ژن‌های دخیل در مقاومت میزبان به بیمارگر در گیاه شاهد، به بیمارگر این فرصت را می‌دهد که به درون بافت‌های گیاه نفوذ نموده و مستقر شود. در نتیجه پس از آن گیاه دیگر قادر به مقاومت نبوده و علائم بیماری حادث می‌گردد. این پدیده به خوبی در طی مراحل یادداشت‌برداری و در تیمار گیاهان با باکتری *P. protegens* نیز مشاهده گردید. در این تیمار همانطور که در قسمت بررسی فنوتیپی مقاومت تیمارها نیز ذکر گردیده است، علائم در روزهای نخستین تلقیح با *Z. tritici* به صورت لکه‌های بسیار ریز کلروتیک مشاهده گردید. این پدیده نشان دهنده تحریک و القاء مقاومت در این تیمار در اثر بیان زودهنگام ژن‌های PAL، LOX، NPR1 و PR5 است. بر اساس جدول ۲ نیز مشاهده می‌شود که میانگین مقاومت در تیمار *P. protegens* از تیمار شاهد و تیمار گیاهان با قارچ *S. indica* کوچکتر بوده و بر اساس گروه‌بندی انجام شده با

بیشترین میزان بیان در این قسمت مربوط به تیمار توام گیاهان با دو عامل بیولوژیک است.

تجمع PR5 در گیاهان در واکنش به موقعیت‌های تنش-زا مانند غلظت‌های نمک بالا و زخم‌ها یا حمله بیمارگرها دیده شده است. ایزوفرم‌های مختلف PR5 نقش‌های متنوعی مانند فعالیت‌های ضد قارچی، حفاظت در برابر تنش‌های اسمزی (Kononowicz et al. 1992, Shatters et al. 2006) و سرما (Hon et al. 1995) دارند. چندین گروه از PR5 ها فعالیت موثری علیه قارچ‌ها با ممانعت از رشد هیف، جوانه زدن اسپور و یا جلوگیری از توسعه لوله تندش در صورت جوانه زدن اسپور دارند (Velazhahan et al. 1998). PR5 با تجزیه و تخریب  $\beta$ -1,3-glucans ارتباط دارد. این پروتئین موجب زوال اسپورها و ممانعت از جوانه‌زنی آن‌ها در گونه‌های مختلف *Bipolaris*، *Fusarium* و *Phytophthora* شده است. همچنین بیان زیاد PR5 در سیب زمینی، گسترش علائم بیماری ناشی از *P. infestans* را به تعویق انداخته است (Shatters et al. 2006).

محققین ارتباط پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی مانند PR5 را در افزایش مقاومت گندم آلوده به *Z. tritici* موثر دانسته و گزارش نموده‌اند که بیان این ژن موجب دفاع این گیاه در برابر قارچ مهاجم می‌شود (Samain et al. 2019). نتایج آزمایش‌های آهنگر و همکاران نشان داد که همزیستی قارچ *S. indica* با گیاه گندم رقم فلات موجب افزایش بیان ژن PR5 و در نتیجه القاء مقاومت نسبت به قارچ بیماری‌زای عامل سفیدک سطحی گندم *B. graminis* f. sp. می‌شود (Ahangar et al., 2014, 2016). در بررسی‌های انجام شده بر روی گندم تیمار شده با ماده سورفاکتین و تلقیح شده با قارچ *Z. tritici* مشخص گردید که، در شرایطی که میزان مقاومت گندم به مقدار ۷۰ درصد



شکل ۷. الگوی بیان ژن PR5 در گیاه گندم رقم تاجن تیمار شده با قارچ ریشه *Serendipita indica* و باکتری *Pseudomonas protegens* در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری سپتوریوز برگ *Z. tritici* - \*، \*\* و \*\*\* به ترتیب نشان می‌دهد که بین تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد در سطح آماری ۰.۰۵، ۰.۰۱ و ۰.۰۰۱ درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

**Fig. 7.** Expression patterns of PR5 gene in Tajan cultivar of wheat plant. Control, treated by mycorrhizal fungus *Serendipita indica*, *Pseudomonas protegens* and co-inoculated by *S. indica* and *P. protegens* at various times after inoculation with the causal agent of Septoria leaf blight *Z. tritici*.

Note: \*, \*\*, \*\*\* Stars show that expression data means was significantly different at 0.05, 0.01 and 0.001 levels respectively.

جدول ۳. ارزیابی میزان مقاومت و شدت بیماری تیمارهای آزمایش و گیاه شاهد و واکنش رقم حساس تاجن تیمار شده با قارچ *Serendipita indica* و باکتری *Pseudomonas protegens* به قارچ *Z. tritici* بر اساس روش اندازه‌گیری Zhang et al., (2001) و همکاران (۲۰۰۱)، R=مقاوم، MS = نیمه مقاوم

**Table 3.** The evaluation of treatment and control plant resistance and disease severity in Tajan wheat cultivar treated with mycorrhizal fungus *Serendipita indica*, *Pseudomonas protegens* bacteria and control plant at after inoculation with the causal agent of septoria leaf blotch (*Zymoseptoria tritici*) by Zhang et al., (2001), R=Resistance, MS=Moderately Resistance

شدت بیماری Disease severity (Necrosis % (AUDPC) نکروز سطح برگ %)	واکنش Reaction	درجه مقاومت Resistance range (1-9 Scaled Zhang et al., 2001)	تیمار Treatment
۵۵۰/۶۶۷ <sup>a</sup>	R	۴/۷۸ <sup>b</sup>	<i>S. indica</i>
۳۲۲ <sup>b</sup>	R	۳/۶۷ <sup>c</sup>	<i>P. protegens</i>
۳۵۵/۸۳۳ <sup>b</sup>	R	۳/۶۷ <sup>c</sup>	<i>P. protegens</i> + <i>S. indica</i>
۵۸۴/۵ <sup>a</sup>	MS	۷/۲۷ <sup>a</sup>	شاهد Control

مدیرگروه محترم و پرسنل آزمایشگاه گروه‌های گیاه پزشکی و اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای پیگیری و انجام آزمایشات صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از پروفیسور کیل از دانشگاه لوزان کشور سوئیس برای همکاری در تحویل یک جدایه اختصاصی از باکتری *Pseudomonas protegens* CHA0 و مشاوره در خصوص این رساله دکتری صمیمانه سپاسگزاریم. از جناب آقای دکتر بابایی زاد و مدیر گروه محترم و پرسنل آزمایشگاه گروه گیاه پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به منظور در اختیار گذاردن فضای آزمایشگاهی برای انجام آزمایش‌های تکمیلی ارزیابی میزان mRNA صمیمانه قدردانی می‌گردد.

آزمون LSD نیز در گروه C قرار گرفته است. همانطور که در شکل‌های ۴، ۵، ۶ و ۷ نیز مشاهده می‌گردد، در تیمارهای گیاهان با باکتری *P. protegens* و در تیمار توام گیاهان با هر دو عامل بیولوژیک، میزان بیان و تسریع در زمان بیان ژن‌های مذکور در این دو تیمار که حضور باکتری *P. protegens* در آنها مشترک است مشهود می‌باشد. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تیمار و همزیست نمودن ریشه گیاهان گندم رقم تجن با باکتری *P. protegens* در القاء مقاومت به عامل بیماری سپتوریوز برگی گندم موثرتر می‌باشد.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات و همکاری‌های ارزنده

## منابع

- Ahangar L., Babaeizad V. A. and Ranjbar G. A. 2014. Analysis of NPR1 gene expression in wheat infected with powdery mildew after treatment with salicylic acid and *Piriformospora indica*. National Center for Biotechnology Information KM017012.1.
- Ahangar L., Ranjbar G. A., Babaeizad V. A., Zarrini H. N. and Biabani A. 2014. Assay of NPR1 gene expression in wheat under powdery mildew Stress. Journal of crop protection 6 : 157-166.
- Ahangar L., Babaeizad V. A., Ranjbar G. A. Zarrini H. N., and Biabani A. 2016. Study of PR Gene Expression Pattern related to in Induced Resistance to Powdery Mildew in Susceptible Wheat Genotype after Treating with Salicylic Acid. Journal of Crop Breeding 8: 208-218.
- Akha A. 2009. Barley powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*): Interaction, Resistance and Tolerance. Egyptian Journal of Experimental Biology 5: 1-20.
- Ashrafi J., Rahnama K., Babaeizad V., Ramezanzpour S. S., and Keel C. 2019. Investigating the mode distribution of *Septoria* leaf blotch and evaluating the resistance of wheat cultivars in Golestan province. Iranian Journal of Entomology and Phytopathology 86: 37-47.
- Bai W., Chern M., Ruan D., Canlas P. E., SzeZE-To W. H. and Ronald P. C. 2011. Enhanced disease resistance and hypersensitivity to BTH by introduction of an NH1/OsNPR1 paralog. Plant biotechnology journal 9: 205-215.
- Barber M. S. and Hall S. A. 2000. Mapping of a novel wheat phenylalanine ammonia-lyase to chromosome six using nullitetrasonic and ditelosomic stocks. National Center for Biotechnology Information AY005474.
- Beccari G., Covarelli L., and Nicholson P. 2011. Infection processes and soft wheat response to root rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. Plant Pathology 60:671-684.
- Buethorn B., Rhody D., and Franken P. 2000. Isolation and characterisation of Pitef1 encoding the translation elongation factor EF-1-alpha of the root endophyte *Piriformospora indica*. Journal of Plant Biology 2: 687-692.
- Cao H., Glazbrook J., Clarke J., Volko S. and Dong X. 1997. The Arabidopsis npr1 gene that controls systemic



- acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88: 57-63.
- Chartrain L., Brading P., Makepeace J. and BROWN, J. 2004. Sources of resistance to *Septoria tritici* blotch and implications for wheat breeding. *Plant Pathology Journal* 53: 454-60.
- Chen X., Barnaby J. Y., Sreedharan A., Huang X., Orbovic V. and Grosser J. W. 2013. Over expression of citrus gene, CfNH1 confers resistance to bacterial canker disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 84: 115-122.
- Croft K. P. C., Juttner F. and Slusarenko A. J. 1993. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. *The Journal of Plant Physiology* 101: 13-24.
- Dehghanpour-Farashah S., Taheri P. and Falahati-Rastegar M. 2019. Effect of polyamines and nitric oxide in *Piriformospora indica* induced resistance and basal immunity of wheat against *Fusarium pseudograminearum*. *Biological control* 104006:1-49.
- Ding L. N., Yang G. X., Yang R. Y., Cao J. and Zhou Y. 2016. Investigating interactions of salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways in monocots wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 93: 67-74.
- Dorneles K. R., Dallagnol L. J., Pazdiora P. C., Rodrigues F. A. and Deuner S. 2017. Silicon potentiates biochemical defense responses of wheat against tan spot. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 97: 69-78.
- Duba A., Goriewa-Duba K., Wachowska U., Glowacka K. and Wiwart M. 2019. The Associations between Leaf Morphology, Phenylalanine Ammonia Lyase Activity, Reactive Oxygen Species, and *Fusarium* Resistance in Selected Species of Wheat with Different Ploidy Levels. *Plants* 8: 1-19.
- Esse H. P. V., Reuber T. L. and Does D. V. 2020. Genetic modification to improve disease resistance in crops. *New Phytologist* 225: 70-86.
- Eyal Z., Scharen A. L., Prescott J. M. and Van Ginkel M. 1987. The *Septoria* diseases of wheat: concepts and methods of disease management. *Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo*, Mexico, D.F.; CIMMYT p.46.
- Farhangi M. B., Safari Sinegani A. A., Mosadeghi M. R., Unc A. and Khodakaramian G. 2014. Survival of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in soil; impact of calcium carbonate and temperature. *Arid Land Research and Management* 28: 36-48.
- Garrido-Sanz D., Arrebola E., Martinez-Granero F., Garcia-Mendez, S., Muriel C., Blanco-Romero E., Martin M., Rivilla R. and Redondo-Nieto M. 2017. Classification of Isolates from the *Pseudomonas fluorescens* Complex into Phylogenomic Groups Based in Group-Specific Markers. *Frontiers in Microbiology* 8: 1-10.
- Gholamnezhad J., Sanjarian P., Goltapeh E. M., Safaie N. and Razavi K. 2016. Effect of Salicylic Acid on Enzyme Activity in Wheat in Immediate Early Time after Infection with *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Sciences, Scientia agriculturae Bohemica* 47: 1-8.
- Gorlach J., Volrath S., Knauf-Beiter G., Hengy G., Beckhove U., Kogel K. H., Oostendorp M., Staub T., Ward E., Kessman H. and Ryals J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8: 629-643.
- Haas D. and Keel C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 41: 117-53.
- Hibbett D. S. 2006. A phylogenetic overview of the Agaricomycotina. *Mycologia* 98: 917-925.
- Himi E. and Noda K. 2004. Isolation of wheat actin gene. *National Center for Biotechnology Information* 2: AB181991.1
- Hon W. C., Griffith M., Mlynarz A., Kwok Y. C. and Yang D. S. C. 1995. Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis related proteins. *Plant physiology* 109: 879-889.
- Karisto P., Hund A., Yu K., Anderegg J., Walter A., Mascher F., Mc Donald B. A. and Mikaberidze A. 2018. Ranking quantitative resistance to *Septoria tritici* blotch in elite wheat cultivars using automated image analysis. *Phytopathology* 108: 568-581.
- Kia S. and Torabi M. 2008. Effects of infection with *Septoria* leaf blotch (*Septoria tritici* Rob. Ex. Desm.) at different growth stages on yield and yield components of wheat cultivars in Gorgan. *Seed and Plant* 24: 237-250 (in Persian).
- Kia Sh., Rahnama K., Soltanloo H., Babaeizad V. and Aghajani M. A. 2017. Effectiveness of Resistance Genes to

- Septoria tritici* Blotch (*Stb*) in Differential Cultivares of Wheat against *Zymoseptoria tritici* Isolates. Journal of Applied Researches in Plant Protection 6: 109-123.
- Kia Sh., Rahnama K., Soltanloo H., Babaeizad V. and Aghajani M. A. 2017. Identification of Resistance Sources to *Septoria tritici* Blotch with Causal Agent *Zymoseptoria tritici* in Bread Wheat Genotypes. Journal of Agricultural Biotechnology 10:51-67.
- Kia S., Rahnama K., Soltanloo H., Babaeizad V., and Aghajani M. A. 2018. Effectiveness of Resistance Genes to *Septoria tritici* Blotch (*Stb*) in Differential Cultivares of Wheat against *Zymoseptoria tritici* Isolates. Journal of Applied Plant Protection 6: 109-123.
- Kogel K. H., Franken P. and Huckelhoven R. 2006. Endophyte or parasite-what decides?. Current Opinion in Plant Biology 9: 358–363.
- Kononowicz A. K., Nelson D. E., Singe N. K., Hasegawa P. M. and Bressan R. A. 1992. Regulation of the osmotin gene promotor. The Plant Cell 4: 513-524.
- Le Mire G., Siah A., Noelle Brisset M., Gaucher M., Deleu M. and Jijakli H. 2018. Surfactin Protects Wheat against *Zymoseptoria tritici* and Activates Both Salicylic Acid- and Jasmonic Acid-Dependent Defense Responses. Agriculture 8: 1-14.
- Lin V. C., Lu C. F., Wu J. W., Cheng M. L. and Cheng C. P. 2004. Transgenic tomato plants expressing the Arabidopsis NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. Biomedical and Life Sciences. 13: 567-581.
- Linthorst H. J. M. 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. Critical Reviews in Plant Sciences 10: 123–150.
- Macholdt J. and Honermeier B. 2017. Yield Stability in Winter Wheat Production: A Surveyon German Farmers' and Advisors' Views. Agronomy 45: 2-18.
- Maumene C., Siah A., Ors M. E., Couleaud G., Randoux B., Rigolle P., Selim S., Halama P. and Reignault P. 2010. Interaction entre stimulateurs de défense des plantes et génotypes de blé tendre dans la lutte contre la septoriose. Fonds de Soutien à l'Obtention (FSOV) Végétale4: 1-10.
- Moldovan V., Moldovan M. and Kadar R. 2005. Assesment of winter wheat cultivars for resistance to fusarium heat blight. Annual Wheat New letter 51: 97-98.
- Molitor A. and Kogel K. H. 2009. Induced resistance triggered by *Piriformospora indica*. Plant Signaling Behavior 4: 215-216.
- Mousavi S. H., Babaeizad V., Sharifnabi B., Tajic Ghanbari M. A., Massah A. and Alavi S. M., 2014. Induction of blast disease resistance in rice plants endophyte fungus *Piriformospora indica*. Iranian Journal of Plant Pathology 50: 127-9. (in Persian with English Summary)
- Murray M. and Thompson W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-6.
- Ngadze E., Icishahayo D., Coutinho T. A. and Van Der Waals J. E. 2012. Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. Plant Disease 96: 186–192.
- Ors M., Randoux B., Siah A., Couleaud G., Maumene C., Sahmer K., Reignault P. H., Halama P. and Selim S. 2017. A plant nutrient and microbial protein-based resistance inducer elicits wheat cultivar dependent resistance against *Zymoseptoria tritici*. Phytopathology 43: 1-45.
- Pandelova I., Figueroa M., Wilhelm L. J., Manning V. A., Mankaney A. N., Mockler T. C. and Ciuffeti L. M. 2012. Host-selective toxins of *Pyrenophora tritici-repentis* induce common responses associated with host susceptibility. PLoS One 7: 402-440.
- Palmer C. L. and Skinner W. 2002. *Mycosphaerella graminicola*: latent infection, crop devastation and genomics. Molecular Plant Patholog 3: 63-70.
- Peskan-Berghofer T., Shahollari B., Giong P. H., Hehi S., Markert C., Blanke V., Kost G., Varma A. and Oelmuller R. 2004. Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant–microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. Physiologia Plantarum 122: 465-477.
- Piafal M. W., Horgan G. W. and Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic acids research 30: 36-36.

- Rairdan J. G., Donofrio N. M. and Delaney T. P. 2001. Salicylic acid and N1M1/NPR1 independent gene induction by incompatible *Peronospora parasitica* in Arabidopsis. *Molecular Plant Microb Interaction* 14: 1235-1246.
- Raza A., Razzaq A., Mehmood S. S., Zou X., Zhang X. and Lv Y. 2019. Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: a review. *Plants* 8: 1-29.
- Samain E., Aussenac T. and Selim S. 2019. The Effect of Plant Genotype, Growth Stage, and *Mycosphaerella graminicola* Strains on the Efficiency and Durability of Wheat-Induced Resistance by *Paenibacillus* sp. Strain B2. *Frontiers in Plant Science* 10: 1-16.
- Saari E. E. and Prescott J. M. 1975. A scale for appraising the foliar intensity of wheat disease. *Plant Disease* 59: 377-380.
- Schaffrath U., Zabbai F. and Dudler R. 2000. Characterization of RCI-1, a chloroplastic rice lipoxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators. *European Journal of Biochemistry* 267: 5935-5942.
- Seed and Plant Improvement Institute Annual Report. 2015. Introduction of cultivars, food safety and health. Seed and Plant Improvement Institute. p.44. www.SPII.ir
- Sharifi-Tehrani A., Farzaneh M., Afshari F., Behbodi K., Kelenberjer E. and Pechy-Tar M. 2011. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* CHA0mcherry in colonization of different wheat varieties and induction resistance to *Puccinia triticina*. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 42: 85-94.
- Shatter R. G., Boykin L. M. and Lapointe S. L. 2006. Phylogenetic and structural relationships of the PR5 gene family reveal an ancient multigene family conserved in plants and select animal taxa. *Journal of Molecular Evolution* 63: 12-29.
- Somai-Jemmali L., Magnin-Robert M., Randoux B., Siah A., Tis-Serant B., Halama P., Reignault P. and Hamada W. 2015. Ascorbic acid control *Mycosphaerella graminicola* in wheat through direct effect on the pathogen and indirect actin on the plant. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 40: 1-20.
- Sommaï-Jemmali L., Siah A., Harbaoui K., Fergaoui S., Randoux B., Magnin-Robert, M., Halama P., Reignault P. and Hamada W. 2017. Correlation of fungal penetration, CWDE activities and defense-related genes with resistance of durum wheat cultivars to *Zymoseptoria tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 100: 117-125.
- Stotz H. U., Thomson J. G. and Wang Y. 2009. Plant defensins defense, development and application. *Plant Signaling and Behavior* 11: 1010-1012.
- Tayeh C., Randoux B., Tisserant B., Khong G., Jacques P. and Reignault P. 2015. Are ineffective defense reactions potential target for induced resistance during the compatible wheat-powdery mildew interaction?. *Plant Physiology and Biochemistry* 96: 9-19.
- Vallad G. E. and Goodman R. M. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science* 44: 1920-1934.
- Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Foder J., Becker K., Fischer M., Heier T., Ckelhoven R. H., Neumann C., Wettstein D., Franken P. and Kogel K. H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS* 102:13386-13391.
- Waller F., Achatz B. and Kogel K. H. 2007. Analysis of the plant protective potential of the root endopytic fungus *Piriformospora indica* in cereals. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 45: 343-354.
- Van Hulst M., Pelser M., Vanloon L. C., Pieterse C. M. J. and Ton J. 2006. Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *PNAS USA* 103: 5602-5607.
- Van Loon L. C., Rep M. and Pieterse C. M. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.
- Varma S., Varma A., Rexer K. H., Hassel A., Kost G., Sarbhoy A., Bisen P., Butehorn B. and Franken P. 1998. *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root colonizing fungus. *Mycologia* 90: 896-903.
- Varma A., Verma S., Sudha N., Butehorn B. and Franken P. 1999. *Piriformospora indica*, a cultivable plant growth-promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiolog* 65: 2741-2744.
- Velazhahan R., Chen-Cole K., Anuratha C. S. and Muthukrishnan S. 1998. Induction of thaumatin-like proteins (TLPs) in *Rhizoctonia solani* infected rice and characterization of two new cDNA clones. *Physiologia Plantarum* 102: 21-28.

- Vierheiling H., Coughlan A. P., Wyss U. and Piche Y. 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 5004–5007.
- Vick B. A. and Zimmerman D. C. 1983. The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 111: 470-477.
- Von Felten A., Defago G., Maurhofer M. 2010. Quantification of *Pseudomonas fluorescens* strains F113, CHA0 and Pf153 in the rhizosphere of maize by strain-specific real-time PCR unaffected by the variability of DNA extraction efficiency. *Journal of Microbiological Methods* 81: 108–115.
- Weller D. M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soil borne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology* 97: 250-256.
- Yu L., Niu J. S., Ma Z. Q., Chen P. D., and Liu D. J. 2001. Cloning, location and expression of thaumatin-like protein gene (Ta-TLP) from wheat. *National Center for Biotechnology Information* AF384146.1.
- Zhang X., Haley S. and Jin Y. 2001. Inheritance of *Septoria tritici* blotch resistance in winter wheat. *Crop Science* 41: 323-326.
- Zhang X., Francis M. I., Dawson W. O., Graham J. H., Orbovic V., Triplett E. W. and Mau Z. H. 2010. Over expression of the Arabidopsis NPR1 gene in citrus increases resistance to citrus canker. *European Journal of Plant Pathology* 128: 91-100.