دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۵، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۳ (ص۱۸۴-۱۷۱)

نسب‌شناسی ژنی برای قطعه‌توالی‌های افتراقی بیان‌شدهٔ *Trichoderma harzianum* در طول کلونیزه‌شدن اسپرموسفر و سطح ریشهٔ گوجه‌فرنگی

مهدی مهرابی‌کوشکی[1*]، حمید روحانی[2] و عصمت مهدیخانی مقدم[3]
۱. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران
۲، ۳. استاد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
(تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱ - تاریخ تصویب: ۹۳/۶/۲۵)

چکیده

بعضی سویه‌های تریکودرما به عنوان عامل کنترل بیولوژیک علیه بیمارگرهای گیاهی استفاده شده‌اند. روش نمایش افتراقی تکثیر نسخه‌های معکوس mRNA (DDRT-PCR) استفاده شد تا ژن‌های متمایز بیان‌شدهٔ سویهٔ *T. harzianum* T7 در طول مراحل کلونیزه‌شدن اسپرموسفر و سطح ریشهٔ گوجه‌فرنگی ردیابی شود. تولیدات DDRT-PCR روی ژل آگارز تفکیک و ۴۲ باند افتراقی برش"،" خالص‌سازی، همسانه‌سازی و توالی‌یابی شد. قطعه‌توالی‌های بیان‌شدهٔ به‌دست آمده با استفاده از جست‌وجوی BLAST2GO به پایگاه اطلاعات NCBI معرفی و نسب‌شناسی ژنی آنها بررسی شد. اغلب قطعه‌توالی‌های بیان‌شده مرتبط با پروتئین‌های شناخته شده یا فرضی بود. این پروتئین‌ها مرتبط با گروه‌های کارکردی مختلف بودند و عمدتاً در سوخت‌وساز، انتقال سیگنال درون و بین‌سلولی، برهم‌کنش با میزبان، انتقال پروتئین، ترجمهٔ پروتئین‌ها، کنترل رشد و بقای سلولی، عادت به تغییرات محیطی، انتقال مولکول‌های زیستی بین هسته و سیتوپلاسم، تنظیم کارکرد پروتئین‌ها، تقسیم سلولی، تسریع در واکنش‌های آنالوگ، تعمیر مولکول‌های آسیب‌دیدهٔ DNA و دیگر کارکردهای حیاتی در موجودات مختلف نقش داشتند. بعضی قطعه‌توالی‌های بیان‌شدهٔ ردیابی‌شده در این مطالعه مرتبط با ژن‌هایی بودند که آنزیم‌های درگیر در تأمین غذایی تریکودرما را در زیستگاه‌شان کد می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: کارکرد ژن، BLAST2GO، DDRT-PCR، ESTs.

مقدمه

بعضی سویه‌های تریکودرما به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک بر علیه بیمارگرهای گیاهی خاکزاد استفاده شده است. سویه‌های تریکودرما به منظور نشان دادن توان بیوکنترلی و تحریک رشد گیاه در ابتدا باید ریشه‌گاه[1] را کلونیزه و با سایر عوامل تسخیرکنندهٔ ریشه‌گاه رقابت کنند و حداقل بخشی از جمعیت میکروبی را به خود اختصاص دهند تا قادر باشند با تولید انواع متابولیت‌های فرار و غیرفرار ضدمیکروبی، تحریک رشد و القای مقاومت گیاهی، توانایی بیوکنترلی خود را علیه بیمارگرها نشان دهند (Harman *et al*., 2004; Hermosa *et al*., 2012). شناسایی ژن‌هایی از تریکودرما که بیان آنها در طول مراحل اولیهٔ برهم‌کنش با ریشه‌های در حال توسعهٔ بذور جوانه‌زده تغییر می‌کند مرحلهٔ مهمی جهت درک قابلیت تسخیرکنندگی ریشه‌گاه در گونه‌های تریکودرماست. تحقیقات متعددی در خصوص آنالیز بیان ژن‌های تریکودرما در شرایط مختلف غذایی و برهم‌کنش با گیاهان انجام شده که منجر به تهیهٔ توالی تعداد زیادی از قطعه‌توالی‌های بیان‌شدهٔ (ESTها) گونه‌های مختلف تریکودرما شده که منبع ارزش‌مندی برای مطالعات آینده و از طرفی منجر به کشف، شناسایی و تعیین وظایف تعدادی از ژن‌های تریکودرما نیز شده است (Bailey *et al*., 2006; Chacon *et al*., 2007; Samolski *et al*., 2009; Rubio *et al*., 2012). قطعه‌توالی‌های بیان‌شدهٔ مربوط به ژن‌های بیان‌شده در پاسخ به کلونیزه‌شدن درون‌رستی ریشهٔ گیاهچه‌های کاکائو با چهار سویهٔ *T. ovalisporum* DIS

* تلفن: ۰۹۱۸۳۶۰۵۴۲۵
E-mail: mhdmhrb@gmail.com
1. rhizosphere

T. harzianum DIS 70a، *T. hamatum* DIS 219b و *Trichoderma* sp DIS 172ai با استفاده از 219f Differential Display Reverse Transcriptase-PCR (DDRT-PCR) شناسایی و سطح بیانشان با استفاده از macroarrays بررسی شد (Bailey *et al*., 2006). که در آن چهار قطعه‌توالی بیان‌شده القای بیان بالایی داشتند شامل glucosyl hydrolase family 2 (F3)، glucosyl hydrolase family 7 (F7)، serine protease (F11) و alcohol oxidase. در مطالعه‌ای (Chacon *et al*., 2007)، چندین کتابخانهٔ cDNA از ۱۰، ۱۹ و ۲۴ ساعت بعد از رشد *T. harzianum* CECT 2413 روی ریشهٔ گیاه گوجه‌فرنگی در کشت‌های هیدروپونیک تهیه شد که در آن قطعه‌توالی‌های بیان‌شده مرتبط با ژن‌های درگیر در سوخت‌وساز چربی، نقل‌وانتقال وزیکل‌ها، سنتز غشا و دیوارهٔ سلولی و تولید انرژی مرتبط با ATPases در طول مراحل اولیهٔ کلونیزه‌شدن القا شد. در مطالعهٔ دیگر (Samolski *et al*., 2009)، تغییرات نسخه‌برداری ژنی در سویهٔ بیوکنترلی *T. harzianum* CECT 2413 در برهم‌کنش‌های اولیه‌اش با ریشهٔ گیاه گوجه‌فرنگی با استفاده از فناوری ریزآرایه بررسی شد و در آن ژن‌های با تنظیم بیان بالا شناسایی شدند، شامل کدکنندهٔ هومولوگ‌های پروتئینی درگیر در مسیرهای سوخت‌وسازی به‌خصوص آنزیم‌هایی برای سوخت‌وساز اسیدهای آمینه، چربی و کربوهیدرات و آنزیم‌هایی برای بیوسنتز ویتامین و کوفاکتور، فرایندهای مرتبط با انرژی و سمیت‌زدایی ترکیبات بیگانه، توسعهٔ میسلیوم و شکل‌گیری ساختارهای آلودگی در توسعهٔ هم‌زیستی در روی یا نزدیک سطح میزبان بودند.

اخیراً در آزمایشی (Rubio *et al*., 2012) پاسخ‌های مقایسه‌ای نسخه‌برداری سه‌سویهٔ *T. harzianum* CECT 2413 (T34)، *T. virens* Gv29-8 (T87) و *T. hamatum* IMI 224801 (T7) بیست ساعت بعد از برهم‌کنش با ریشهٔ گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی با استفاده از فناوری HDO microarrays بررسی شد. در این آزمایش میزان بیان ژن‌های درگیر در سوخت‌وساز هیدرات‌های کربن و بیوسنتز دیوارهٔ سلولی در هر سه‌سویه افزایش نشان داد. همچنین بیان یک ژن درگیر در سوخت‌وساز چربی فقط در دوسویهٔ T34 و T87 افزایش یافت. ژن‌های مرتبط با سوخت‌وساز هیدرات‌های کربن و مراحل فیزیولوژیکی انتقال در هر سه‌سویه بیان بیشتری داشتند که وفق‌پذیری فعال تریکودرما را در ریزبوم ریشه‌گاه ثابت می‌کند.

در ارزیابی کلی از بررسی مطالعات برهم‌کنشی تریکودرما با گیاهان مختلف مخصوصاً مطالعاتی که تغییرات نسخه‌برداری تریکودرما را در واکنش به کلونیزه‌شدن ریشه بررسی کرده است (Bailey *et al*., 2006; Chacon *et al*., 2007; Samolski *et al*., 2009; Rubio *et al*., 2012) مشخص شد که هیچ‌گونه مطالعه‌ای (بر اساس انتشارات موجود در دسترس) در خصوص پاسخ‌های نسخه‌برداری تریکودرما در مراحل اولیهٔ کلونیزه‌شدن اسپرموسفر انجام نگرفته است. از طرفی، موفقیت تریکودرما در کلونیزه‌شدن ریشه و استقرار آن در ریشه‌گاه (به‌ویژه هنگامی که به روش بذرمال استفاده می‌شود) منوط به کلونیزه‌شدن اولیهٔ آن در اسپرموسفر در هنگام جوانه‌زنی بذر در خاک و ادامهٔ رشد آن در ریشه‌گاه است. لذا، در این مطالعه با بهره‌گیری از روش‌های بررسی بیان ژن در سطح نسخه‌برداری و با استفاده از روش DDRT-PCR، ۴۲ ژن از سویهٔ انتخاب‌شدهٔ *T. harzianum* T7، با نقش کلونیزه کنندهٔ موفق ردیابی و نسب‌شناسی ژنی شد (Mehrabi-Koushki *et al*., 2012) که در مراحل اولیهٔ کلونیزه‌شدن اسپرموسفر و ریشه‌گاه گوجه‌فرنگی بیان افتراقی داشتند.

مواد و روش‌ها

برهم‌کنش تریکودرما با بذور در حال جوانه‌زنی و ریشهٔ گوجه‌فرنگی

الف) بذور گوجه‌فرنگی (واریتهٔ مبیل) با قراردادن در هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت دو دقیقه ضدعفونی سطحی و پس از شستشو در شرایط کاملاً سترون در فلاسک‌های محتوی ۱/۱۰ حجم محیط غذایی هیدروپونیک (Yedidia *et al*., 1999) ریخته شد. فلاسک‌ها در دور ۵۰rpm به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد درون انکوباتور شیکردار نگهداری شد تا جوانه‌زنی یکنواخت انجام گیرد. سوسپانسیون اسپور سویهٔ *T. harzianum* T7 با غلظت 10^5 اسپور در هر میلی‌لیتر به فلاسک‌های سترون محتوی محیط

کشت SM (Yedidia *et al.*, 1999) مایه‌زنی و برای جوانه‌زنی مؤثر فلاسک‌ها در شرایط ۱۸۰ rpm و دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرارگرفت. مایهٔ میسلیومی (اسپورهای جوانه‌زده) با جمع‌آوری محیط رشدی در لوله‌های سانتریفیوژ و چند بار سانتریفیوژ در دور ۸۰۰۰ g با آب مقطر سترون برداشت شد.

فلاسک‌های محتوی بذور گوجه‌فرنگی جوانه‌زده پس از شستشو در شرایط سترون با محیط جدید هیدروپونیک (حاوی ۵g/L گلوکز) تعویض شد. این فلاسک‌ها با مایهٔ میسلیومی به نسبت 10^5 اسپور جوانه‌زده در هر میلی‌لیتر محیط مایه‌زنی شدند و در همان شرایط رشدی قرارگرفتند. فلاسک‌های محتوی محیط غذایی هیدروپونیک (حاوی ۵g/L گلوکز) بدون بذور جوانه‌زده با مایهٔ میسلیومی مایه‌زنی و شرایط غیرالقایی در نظر گرفته شد. برداشت میسلیوم از بذور جوانه‌زده کلونیزه شده ۱۸ و ۷۲ ساعت بعد از ایجاد شرایط برهم‌کنش انجام شد.

ب) گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی در دسته‌های ده‌تایی سازماندهی و ریشه‌های آنها در هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت سه دقیقه ضدعفونی سطحی و شستشو شد. فلاسک‌های نیم‌لیتری سترون محتوی ۱۵۰ ml محیط غذایی هیدروپونیک (حاوی ۵g/L گلوکز) با مایهٔ میسلیومی به نسبت 10^5 اسپور جوانه‌زده در هر میلی‌لیتر مایه‌زنی شد. دسته‌های گیاهچهٔ گوجه‌فرنگی در شرایط کاملاً سترون در داخل فلاسک‌ها قرارگرفت و با استفاده از نوارهای پنبهٔ سترون ثابت شد. فلاسک‌های محتوی محیط غذایی هیدروپونیک (حاوی ۵g/L گلوکز) با اسپورهای جوانه‌زده به همان نسبت مایه‌زنی شد و شرایط غیر القایی در نظر گرفته شد. فلاسک‌ها در شرایط ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و ۵۰ rpm در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. برداشت میسلیوم ۱۸ و ۳۶ ساعت بعد از ایجاد شرایط برهم‌کنش انجام گرفت.

بذور جوانه‌زده و ریشه‌های کلونیزه شدهٔ جداگانه در فلاسک‌های سترون محتوی ۲۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر روی شیکر ارلن با دور ۵۰rpm تکان داده شد به نحوی که میسلیوم‌ها از سطح بذور و ریشه‌ها جدا شود. سپس، محتوای فلاسک‌ها با استفاده از توری‌های مناسب فیلتر و به لوله‌های سانتریفیوژ ۵۰ml منتقل شدند. برای جمع‌آوری قطعات میسلیومی، لوله‌ها در دور ۸۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محتوای رسوب‌کردهٔ میسلیومی پس از آب‌گیری نسبی در مقادیر ۱۰۰mg در لوله‌های سانتریفیوژ ۲ ml تقسیم شد و بلافاصله در فرایند استخراج RNA قرارگرفت.

استخراج RNA و تهیهٔ cDNA

استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) و بر اساس مراحل دستورالعمل آن در دمای آزمایشگاه انجام گرفت. در تمامی مراحل استخراج از اتانول، آب مقطر، دسته هاون کوچک تجاری و دست‌ساز مخصوص استخراج در لوله و لوله‌های سانتریفیوژ با درجه کار مولکولی و فاقد RNase استفاده شد. محلول RNA حاصل با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل Biochrom WPA 221 Biowave) و نانودرآپ (مدل Thermo scientific NanoDROP 2000) غلظت‌سنجی شد. تهیهٔ cDNA با استفاده از آنزیم نسخه‌برداری معکوس SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, USA) و آغازگر dt-ACP1 با فناوری ACP حاوی ۲۲bp توالی ضمیمه، ۵bp توالی تنظیم‌کنندهٔ اتصال گوانین و ۱۸bp توالی تیمین ($CTGTGAATGCTGCGACTACGATGGGGG_{(T18)}$) بر اساس مراحل دستورالعمل کیت تجاری Gene-Fishing_DEG Kit (Seegene) انجام گرفت. cDNA حاصل به نسبت پنج برابر با آب مقطر عاری از DNase رقیق و در واکنش‌های DDRT-PCR استفاده شد.

واکنش‌های DDRT-PCR

واکنش‌های DDRT-PCR با آغازگر dT-ACP2 دارای فناوری ACP ($CTGTGAATGCTGCGACTACGA$ $TGGGGG_{(T15)}$) و بیست ترکیب آغازگر تصادفی ACP_{41}-ACP_{60} با استفاده از کیت Gene-Fishing_DEG Kit (Seegene) و بر اساس دستورالعمل سازنده انجام شد. توالی بیست آغازگر تصادفی ACP شامل ۲۲bp توالی مشابه ضمیمه، ۵bp توالی تنظیم‌کنندهٔ اتصال گوانین و ۱۰bp توالی تصادفی بود (جدول ۱). مخلوط واکنش DDRT-PCR برای هر ۵۰µl حاوی ۲/۵µl آغازگر 10µM-dTACP2، ۵µl از آغازگر تصادفی 5µM-ACP، ۱۲/۵µl از cDNA رقیق‌شدهٔ نمونهٔ القایی یا

کنترل، ۲۵µl مخلوط تجاری واکنش PCR (2X SeeAmpTM ACPTM Master Mix) و ۵µl آب مقطر بود. لوله‌های واکنش پس از تنظیم و اجرای برنامهٔ PCR در ترموسایکلر مدل Biometra T Personal تا زمان مشاهدهٔ دمای ذوب ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد روی صفحهٔ نمایش به دستگاه منتقل شد (hot-start). برنامهٔ دمایی شامل یک چرخهٔ آغازین (۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰۰ ثانیه ذوب اولیه و واسرشته‌سازی الگو، ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۸۰ ثانیه اتصال تصادفی آغازگرها و ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۸۰ ثانیه بسط آغازگرها)، ۴۰ چرخهٔ اصلی (۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه واسرشته‌سازی، ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه اتصال هدفدار آغازگرها و ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰-۸۰ ثانیه بسط آغازگرها) و بسط نهایی (۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۶۰۰ ثانیه) بود.

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در بررسی بیان افتراقی ژن‌های تریکودرما مورد استفاده در واکنش DDRT-PCR

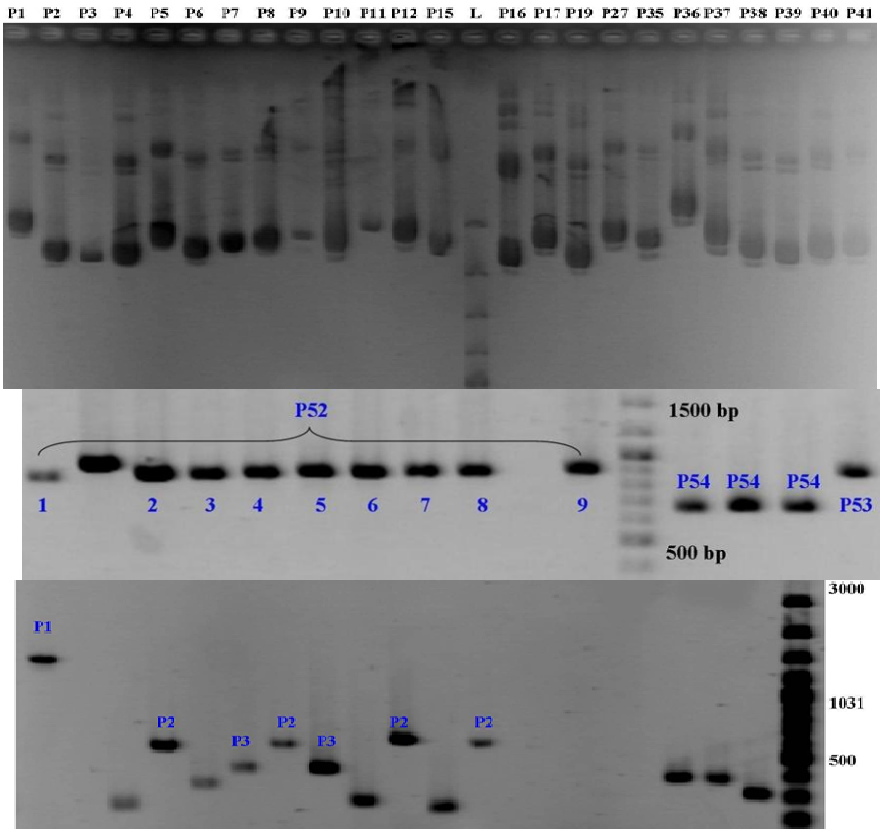
نام آغازگر	توالی آغازگر	نام آغازگر	توالی آغازگر*
ACP_{41}	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGCC GAAGACCT3′	ACP51	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGXXX XXXXXXX 3′
ACP_{42}	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGX XXXXXXXXX 3′	ACP52	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGTGC TCAGC00 3′
ACP_{43}	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGX XXXXXXXXX 3′	ACP53	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGXXX XXXXXXX 3′
ACP_{44}	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGX XXXXXXXXX 3′	ACP54	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGXXX XXXXXXX 3′
ACP_{45}	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGX XXXXXXXXX 3′	ACP55	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGTCC TGCACCG 3′
ACP_{46}	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGX XXXXXXXXX 3′	ACP56	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGTGC CCAAGCG 3′
ACP_{47}	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGX XXXXXXXXX 3′	ACP57	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGAGC GGACCTC 3′
ACP_{48}	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGA GCACTTCGG 3′	ACP58	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGXXX XXXXXXX 3′
ACP_{49}	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGGC CAACTGCC 3′	ACP59	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGGTG GCTGCAC 3′
ACP_{50}	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGA GAAGCTGCG 3′	ACP60	5′GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGGGGGGGT CGAAGAG 3′

* توالی تصادفی آغازگرهایی که در این مطالعه باند افتراقی بازیابی‌پذیر تولید نکردند، با حرف X نشان داده شده است.

استخراج و خالص‌سازی DNA از باندهای افتراقی و همسانه‌سازی آنها

بعد از بارگذاری محصولات DDRT-PCR روی ژل، باندهای افتراقی برش و قطعات تکثیری DNA با استفاده از کیت تجاری QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) و بر اساس دستورالعمل سازنده خالص‌سازی شد. قطعات DNA با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase در ناقل pTZ57R/T تلفیق و در سلول‌های پذیرندهٔ سویهٔ *E. coli* DH5α تهیه شده با استفاده از کیت تجاری InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas) و گاهی روش استفاده از محلول کلرید کلسیم همسانه‌سازی شد (شکل ۱). در روش کلرید کلسیم، کشت باکتری تکثیریافته در محیط LB (در حدود ۱/۶ میلی‌لیتر) به لوله‌های سانتریفوژ ۲ml منتقل و پس از توقف ۱۰ دقیقه‌ای روی یخ در ۳۰۰۰g و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل با افزودن ۵۳۰µl محلول ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم سوسپانیزه و به مدت ده دقیقه روی یخ نگهداری شد. سپس، در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب باکتریایی با ۱۶۰µl محلول ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم به‌عنوان سلول‌های مستعد و پذیرنده سوسپانیزه شد. سپس به ۵۰µl سلول مستعد، ۲/۵µl مخلوط تلفیق فوق (تهیه شده با کیت InsTAclone™ PCR Cloning) اضافه و کاملاً مخلوط شد. مخلوط همسانه‌سازی به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شد و در آب گرم ۴۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، سپس انتقال سریع آن به یخ، شوک حرارتی داده شد. قبل از کشت مخلوط همسانه‌سازی روی محیط گزینشگر و گزارشگر (LBA+X-Gal+IPTG)، به لولهٔ سانتریفوژ محتوی

مخلوط همسانه‌سازی ۲۰۰µl محیط غذایی LB اضافه شد و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و دور ۱۲۰rpm قرارگرفت. با تأیید و تکثیر پرگنه‌های انتخابی در محیط LB، استخراج پلاسمید جهت استفاده در عملیات توالی‌یابی با استفاده از کیت GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) و بر اساس دستورالعمل سازنده انجام گرفت (شکل ۱). در عملیات توالی‌یابی، خوانش با استفاده از آغازگر پیش‌رو M13 برای قطعات کوتاه و آغازگرهای پیش‌رو و معکوس M13 برای قطعات بلند توسط شرکت ماکروژن انجام گرفت.



شکل **۱.** الف) الکتروفورز ۳µl پلاسمید استخراج شده از همسانه‌های انتخابی (P1-P41) روی ژل‌آگارز ۱٪ و مشاهدهٔ آن بعد از رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم‌بروماید ۱µg/ml. ب) الکتروفورز ۵µl محصول واکنش‌های PCR همسانه‌ها (با استفاده از آغازگرهای M13) روی ژل‌آگارز ۱٪ و مشاهدهٔ آن بعد از رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم‌بروماید ۱µg/mlجهت تأیید همسانه‌های P1، P2، P3، P52 ، P53 و P54. اندازه باندهای تأیید همسانه‌ها از جمع اندازهٔ هر باند افتراقی و ۱۵۷bp از توالی ناقل pTZ57R/T حاصل شده است.

ویراستاری و آنالیز توالی‌ها

کیفیت توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BioEdit ارزیابی شد. سپس، این توالی‌ها با توالی ناقل مورد استفاده جهت همسانه‌سازی (pTZ57R/T) هم‌راستا شد تا امکان حذف توالی ناقل و توالی ضمیمه‌شده به آغازگرهای مورد استفاده در PCR-DDRT فراهم شود. از نرم‌افزار DNA Baser V3.5.0 برای مونتاژ خوانش‌های پیش‌رو و معکوس استفاده شد. توالی‌های کوچک‌تر از ۱۰۰bp بدون در نظر گرفتن توالی‌های پلی‌A/T از ادامهٔ ارزیابی حذف شد. قطعه‌توالی‌های بیان شده (Expressed Sequence Tags=ESTs) به جست‌وجوگر BLASTx، AmiGO و BLAST2GO معرفی شد تا با عملیات بلاست (BLASTx)، نقشه‌نگاری یا نگاشت[1] و تفسیر[2]، نسب‌شناسی ژنی[3] قطعه‌توالی‌های بیان‌شده به دست آید. محصول جست‌وجوی بلاست و نسب‌شناسی ژنی در

1. Mapping
2. Annotation
3. Gene ontology

صورتی که دارای E-value و P-value کمتر از ۰/۰۵ به ترتیب برای BLASTx و نسب‌شناسی ژنی بودند، یافته‌های معنادار در نظر گرفته شدند. قطعه‌توالی‌های بیان‌شده در بانک اطلاعات NCBI GenBank در قسمت dbEST نمایه شد.

نتایج و بحث

همسانه‌سازی باندهای افتراقی، توالی‌یابی، ویراستاری و ارزیابی قطعه‌توالی‌های بیان‌شده

در طول همسانه‌سازی، به علت ضعیف بودن باندهای تولیدی ناشی از ماهیت واکنش‌های DDRT-PCR و غلظت پایینِ قطعات DNA خالص‌سازی شده راندمان بسیار پایینی از همسانه‌سازی مشاهده شد و بسیاری از باندهای افتراقی بازیابی نشد. در بعضی موارد جهت افزایش بازیابی DNA بعد از استخراج باندهای افتراقی از ژل و در مرحلهٔ خالص‌سازی، نمونه‌ها با هم ادغام و در مرحلهٔ ارزیابی همسانه‌سازی بر اساس اندازهٔ باندهای حاصل از هم تفکیک شد. توالی‌های به دست‌آمده ارزیابی و ویراستاری شد و ۴۲ توالی آن که قطعه‌توالی بیان‌شده (EST) در نظر گرفته و در پایگاه اطلاعات ژنوم NCBI در بخش dbEST تحت شمارهٔ نمونه‌های JK757061 تا JK757086 و JK813925 تا JK813940 نمایه و ذخیره شد (جدول ۲).

جدول ۲. مشخصات ۴۲ قطعه‌توالی بیان‌شدهٔ (ESTs) در این مطالعهٔ نمایه‌شده در NCBI

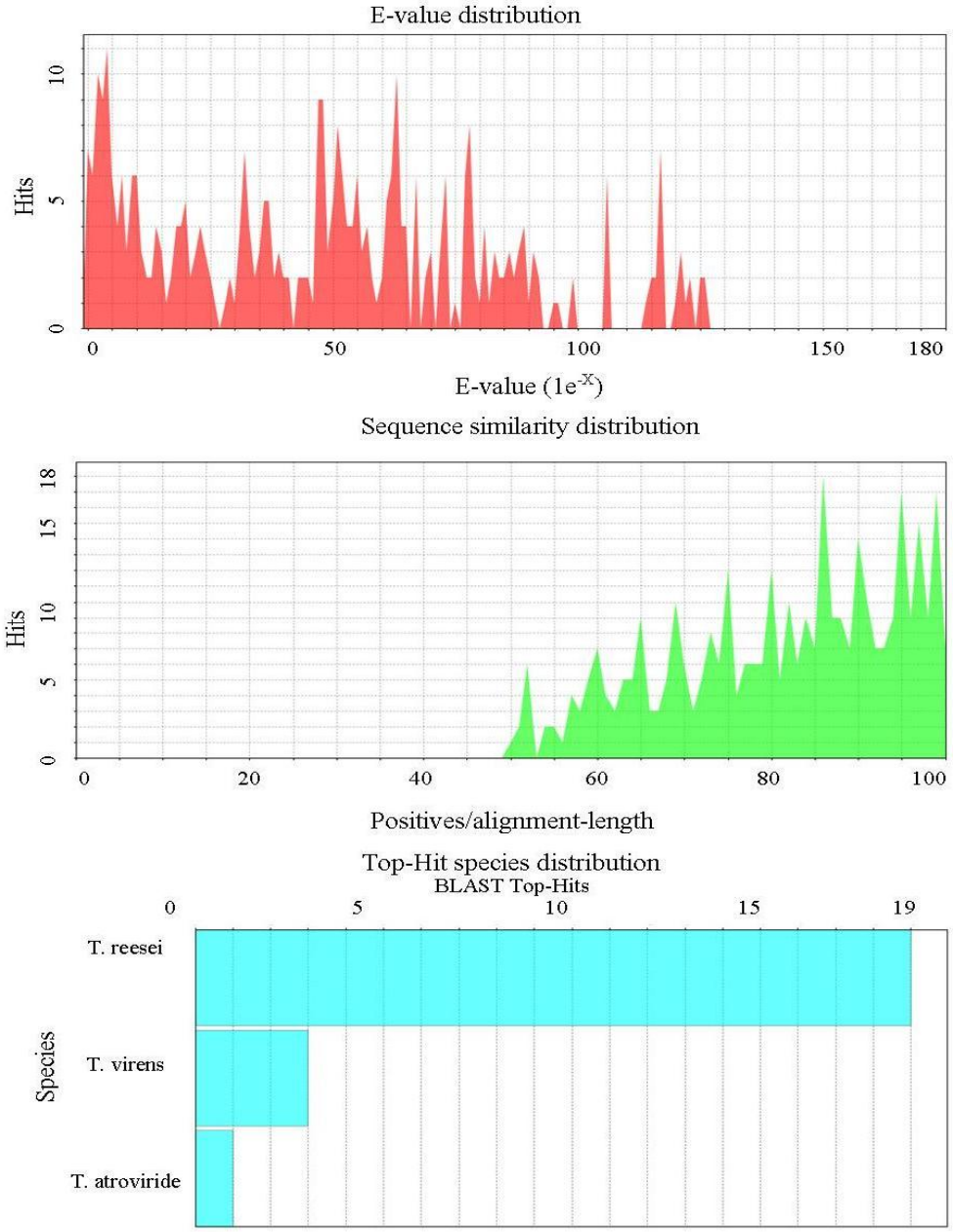
نام EST (User_Id)	نام در dbEST (dbEST_Id)	شماره نمونه (GenBank_Accn)	نام EST (User_Id)	نام در dbEST (dbEST_Id)	شماره نمونه (GenBank_Accn)
P10F-EST	79227039	JK757061	P45F-EST	79227060	JK757082
P36F-EST	79227040	JK757062	P45R-EST	79227061	JK757083
P36R-EST	79227041	JK757063	P5F-EST	79227062	JK757084
P48F-EST	79227042	JK757064	P8F-EST	79227063	JK757085
P48R-EST	79227043	JK757065	P4F-EST	79227064	JK757086
P7F-EST	79227044	JK757066	P54F-EST	76307382	JK813925
P11F-EST	79227045	JK757067	P52F-EST	76307383	JK813926
P12F-EST	79227046	JK757068	P53F-EST	76307384	JK813927
P1F-EST	79227047	JK757069	P6F-EST	76307385	JK813928
P1R-EST	79227048	JK757070	P32F-EST	76307386	JK813929
P2F-EST	79227049	JK757071	P35F-EST	76307387	JK813930
P3F-EST	79227050	JK757072	P37F-EST	76307388	JK813931
P15F-EST	79227051	JK757073	P40F-EST	76307389	JK813932
P17F-EST	79227052	JK757074	P42F-EST	76307390	JK813933
P26F-EST	79227053	JK757075	P46F-EST	76307391	JK813934
P26R-EST	79227054	JK757076	P47F-EST	76307392	JK813935
P27F-EST	79227055	JK757077	P49F-EST	76307393	JK813936
P38F-EST	79227056	JK757078	P50F-EST	76307394	JK813937
P41F-EST	79227057	JK757079	P39F-EST	76307395	JK813938
P43F-EST	79227058	JK757080	P51F-EST	76307396	JK813939
P43R-EST	79227059	JK757081	P44F-EST	76307397	JK813940

کشف نسب‌شناسی ژنی برای ۴۲ قطعه‌توالی بیان‌شده

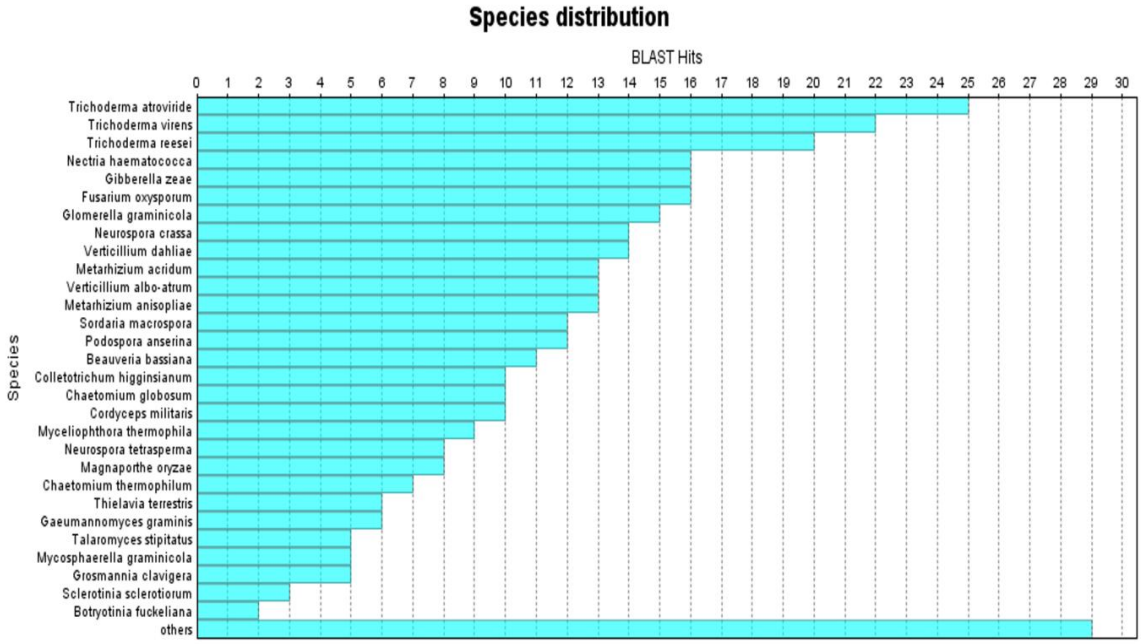
قطعه‌توالی‌های بیان‌شدهٔ (ESTs) به پایگاه اطلاعات ژنوم NCBI معرفی و به منظور تعیین تشابه آن با توالی‌های پروتئینی و نوکلئوتیدی نمایه‌شدهٔ قبلی در قسمت BLASTx، همچنین نسب‌شناسی ژنی در قسمت AmiGO و BLAST2GO جست‌وجو شد (جدول ۳). به منظور کشف کارکرد احتمالی قطعه‌توالی‌های به‌دست‌آمده و با هدف نسب‌شناسی ژنی سعی شد تا با استفاده از انبوه اطلاعات ژنی موجود در پایگاه‌های اطلاعات ژنوم به وظیفهٔ مولکولی[1]، مرحلهٔ بیولوژیکی[2] و جزء سلولی[3] هر قطعه‌توالی پی برد. در این راستا، در نسب‌شناسی ژنی با استفاده از جست‌وجوی BLAST2GO، نتایج حاصل در سه مرحلهٔ بلاست جهت کشف توالی‌های مشابه، نگاشت جهت جمع‌آوری اطلاعات نسب‌شناسی ژنی همراه هیت‌های[4] بلاست و تفسیر جهت تأیید اطلاعات قابل اعتماد به‌دست‌آمده برای توالی‌های معرفی‌شده انجام گرفت. در مرحلهٔ بلاست، توالی‌های مشابه در پایگاه‌های عمومی اطلاعات ژنوم، آستانهٔ شاخص E، تعداد هیت‌های بازیابی شده و حداقل طول هم‌راستایی[5] برای هر قطعه‌توالی بیان‌شدهٔ معرفی‌شده به دست آمد. همچنین، میزان شباهت ۴۲ قطعه‌توالی با هیت‌های جست‌وجوشده از گونه‌های مختلف و اعتبار آنها با توجه به دامنهٔ آستانهٔ شاخص E

1. Molecular Function
2. Biological Process
3. Cellular Component
4. Hits
5. Alignment

ارائه شد (شکل‌های ۲ و ۳). در مرحلهٔ نگاشت، اطلاعات نسب‌شناسی ژنی همراه با هیت‌های به‌دست‌آمده از جست‌وجوی بلاست هر کدام از ۴۲ قطعه‌توالی‌های بیان‌شده و معرفی‌شده به پایگاه اطلاعات ژنوم در محیط نرم‌افزاری BLAST2GO بازیابی و در پایگاه‌های اطلاعات پروتئین PIR (Non-redundant Reference Protein database) مانند PSD، UniProtKB، Swiss-Prot، TrEMBL، RefSeq، GenPept و PDB جست‌وجو و کشف اطلاعات شد (شکل ۴ و ۵).



شکل ۲. نمایش نموداری نتایج مرحلهٔ BLASTx بعد از معرفی ۴۲ قطعه‌توالی بیان‌شده به محیط BLAST2GO. نمودار توزیع شاخص E (E value distribution) نشان می‌دهد که این شاخص برای نتایج جست‌وجوی بلاست در دامنهٔ $۱۰^{-۱۵۰}$-$۱۰^{-۵}$ قرارمی‌گیرد. نمودار توزیع شباهت (sequence similarity distribution) نشان می‌دهد که تمام قطعه‌توالی‌ها با هیت‌های جست‌وجو شده ۱۰۰-۵۰ درصد شباهت دارند. نمودار توزیع بیشترین شباهت گونه‌ای (Top-Hit species distribution) نشان می‌دهد که ۴۲ قطعه توالی بیان‌شده با توالی‌های پروتئینی و نوکلئوتیدی شناخته‌شدهٔ سه گونهٔ *T. reesei*، *T. virens* و *T. atroviride* بیشترین شباهت را دارند.



شکل ۳. نمایش نموداری نتایج مرحلهٔ BLASTx بعد از معرفی ۴۲ قطعه‌توالی بیان‌شده به محیط BLAST2GO. نمودار توزیع شباهتی گونه‌ها (species distribution) نشان می‌دهد که ۴۲ قطعه‌توالی بیان‌شده بیشترین شباهت را به گونه‌های نزدیک دارد.

در این فرایند، نرم‌افزار اطلاعات همراه هیت‌های بلاست را از سه طریق جمع‌آوری کرد:

۱. شمارهٔ دسترسی‌های مرحلهٔ بلاست مستقیماً در جدول DBXRef پایگاه اطلاعات نسب‌شناسی ژنی جست‌وجو شد.

۲. نام‌هایی که از دو فایل نگاشت geneinfo و gene2accession به دست آمد در جدول تولیدات ژنی پایگاه اطلاعات نسب‌شناسی ژنی جست‌وجو شد.

۳. شناساننده‌های UniProt برای استفاده از فایل نگاشت پایگاه‌های اطلاعات پروتئینی PIR اخذ شد.

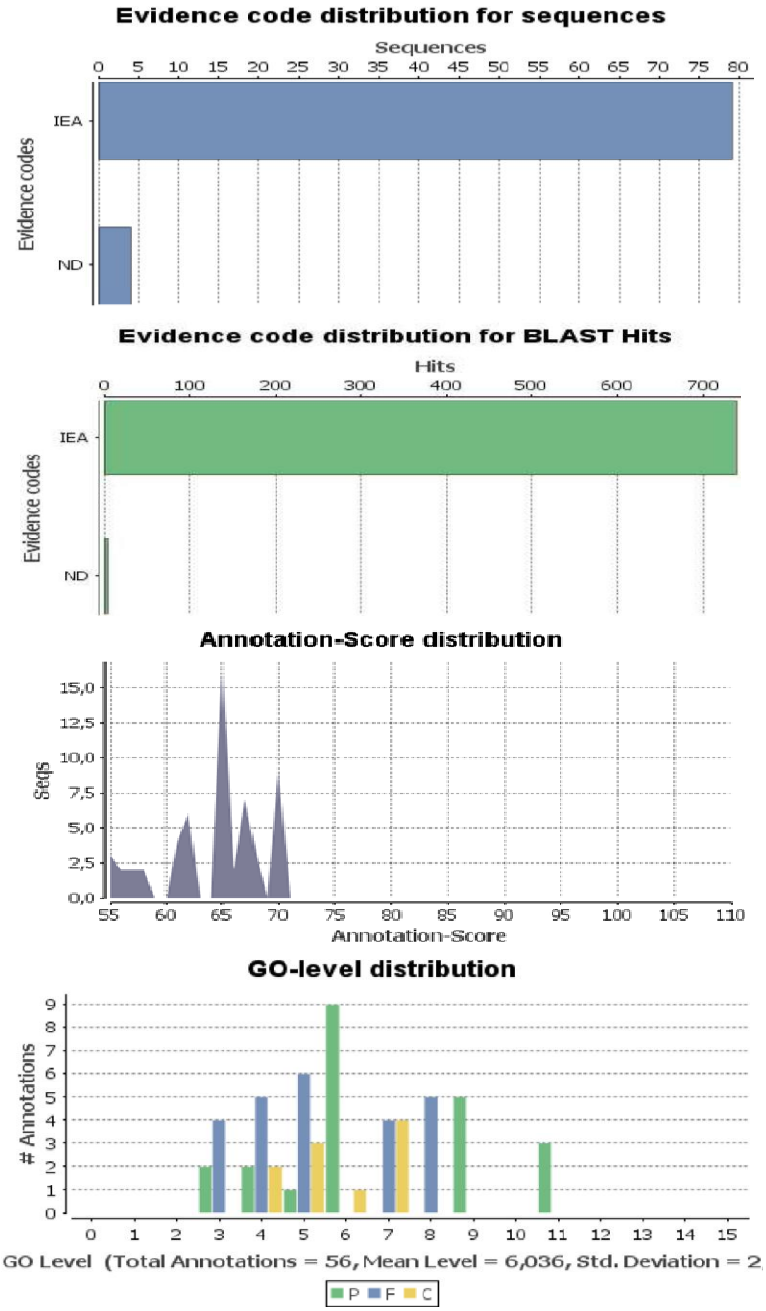
بدین‌ترتیب، نرم‌افزار ابتدا شناساننده‌های هیت‌های بلاست را ردیابی کرد و آنها را به منظور کشف اطلاعات کارکردی مرتبط با قطعه‌توالی‌ها از پایگاه‌های اطلاعات پروتئینی فوق مورد استفاده قرار داد. همچنین، کد مدرک برای هر تفسیر مشخص ارائه شد (شکل ۴). دقت در کدهای مدرک ثابت کرد که تمام کارکرد ارائه شده برای قطعه‌توالی‌های بیان‌شدهٔ این آزمایش در پایگاه اطلاعات نسب‌شناسی ژنی از تفسیرهای الکترونیکی IEA به دست آمده و هیچ کدام از ISS، RCA، IPI، IDA، IC، IMP، IGI حاصل نشده است (شکل۴).

در مرحلهٔ تفسیر، نرم‌افزار با ارزیابی انبوه اطلاعات جمع‌آوری شده در مرحلهٔ نگاشت و اعتبارسنجی آنها صحیح‌ترین و قابل‌اعتمادترین تفسیر نسب‌شناسی را برای قطعه‌توالی‌های بیان‌شدهٔ جدید ارائه کرد. این نتایج نشان داد که تمام اطلاعات نسب‌شناسی ۴۲ قطعه‌توالی بیان‌شدهٔ این مطالعه از پایگاه اطلاعات ژنومی UniProtKB به دست آمده است. با استفاده از نتایج حاصل از دو مرحلهٔ قبل و اعتبارسنجی آنها با شاخص‌های مختلف همچون توزیع سطوح نسب‌شناسی ژنی، توزیع نمرهٔ نسب‌شناسی، تعداد نتایج نسب‌شناسی برای توالی‌های تفسیر شده (شکل ۴ و ۵)، یک برداشت کلی از تفسیرهای داده‌شدهٔ نسب‌شناسی برای هر توالی به دست آمد و به یک گروه کارکردی مرتبط دانسته شد (جدول ۳).

کارکرد احتمالی ژن‌های ردیابی‌شده بر اساس جست‌وجوی نسب‌شناسی ژنی و BLASTx

با انجام برهم‌کنش‌های مختلف در طول کلونیزه‌شدن بذور در حال جوانه‌زنی و ریشهٔ گوجه‌فرنگی با سویهٔ *T. harzianum* T7 و انجام و توسعهٔ واکنش‌های DDRT-PCR تعدادی ژن نقش‌آفرین در کلونیزه‌شدن اسپرموسفر و ریشه‌گاه ردیابی شد. اغلب ۴۲ قطعه‌توالی بیان‌شده با پروتئین‌های تنظیمی یا کارکردی شناخته شده در سایر موجودات خاصه قارچها مرتبط شناخته

شدند (جدول ۳). نه قطعه‌توالی بیان‌شده با پروتئین‌های فرضی یا پیش‌بینی شده در سایر موجودات به‌ویژه قارچ‌ها مرتبط شناخته شدند. همچنین، دوازده عدد از این قطعه‌توالی‌های بیان‌شده با توالی‌های پروتئینی و نوکلئوتیدی که تا به حال در پایگاه‌های اطلاعات ژنوم نمایه شده است تشابه معناداری نشان ندادند (شاخص E و P بزرگ‌تر از ۰/۰۵) و قطعه‌توالی‌های بیان‌شده‌ای در نظر گرفته شدند که نمایندهٔ ژن‌های جدید و بدیع تریکودرمایند.



شکل ۴. نمایش نموداری نتایج مرحلهٔ نگاشت و تفسیر بعد از معرفی ۴۲ قطعه‌توالی بیان‌شده به محیط BLAST2GO. نمودارهای توزیع کدهای مدرک برای توالی‌های معرفی‌شده و هیت‌های بلاست نشان می‌دهد که برای بیشتر ۴۲ قطعه‌توالی‌های بیان شده اطلاعات نسب‌شناسی ژنی کد مدرک در دسترس وجود دارد و عمدهٔ این اطلاعات از نوع تفسیرهای الکترونیکی است. ND، No biological Data available و IEA، Inferred from Electronic Annotation. نمودار سطح نسب‌شناسی ژنی نشان می‌دهد که تفسیرهای نسب‌شناسی در سه سطح وظیفهٔ مولکولی (F)، مرحلهٔ زیستی (P) و جزء سلولی (C) ارائه شده است.

این قطعه‌توالی‌های بیان‌شده شامل شماره‌های نمونهٔ JK813926، JK813927، JK813929 تا JK813933، JK813935 تا JK813937، JK813939، و JK813940 عمدتاً (به غیر از JK813939) در طول کلونیزه‌شدن بذور در حال جوانه‌زنی ردیابی شدند. این عدم تشابه، با توجه به بدیع بودن این نوع برهم‌کنش و نبود مطالعهٔ قبلی دور از انتظار نبود. در این مطالعه، با استفاده از روش DDRT-PCR، تعدادی از ژن‌های بیان شده به‌طور متمایز در طول برهم‌کنش‌های اولیهٔ قارچ تریکودرما با بذور در حال جوانه‌زنی و ریشه‌های گوجه‌فرنگی شناسایی شد. بیشتر این ژن‌ها با گروه‌های کارکردی مختلف در موجودات مختلف از جمله قارچ‌ها مرتبط شناخته شدند که عمدتاً در سوخت‌وساز، انتقال سیگنال درون و بین‌سلولی، برهم‌کنش با میزبان، انتقال پروتئین، ترجمهٔ پروتئین‌ها، ورود مواد به داخل غشا، پویایی اکتین[1] از طریق غیرفعال‌کردن پروتئین‌های ADF/cofilin، کنترل رشد و بقای سلولی، حرکت پروتئین‌ها داخل فضای درون غشایی میتوکندری، بیماری‌زایی میکروبی و شدت بیماری‌زایی، عادت به تغییرات محیطی همچون درجه حرارت، فشار، اسیدیته، قدرت یونی و وضعیت غذایی، تسهیل نقل‌وانتقال بین سیتوپلاسم و هسته، انتقال مولکول‌های زیستی بین هسته و سیتوپلاسم، تنظیم کارکرد پروتئین‌ها، تقسیم سلولی، تسریع در واکنش‌های آنالوگ، تعمیر مولکول‌های آسیب‌دیدهٔ DNA و دیگر کارکرد حیاتی در موجودات مختلف نقش دارند. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که بعضی از این ژن‌ها در برهم‌کنش‌های مشابه از جمله برهم‌کنش تریکودرما با گیاه (Samolski et al., 2009; Rubio et al., 2012; Chacon et al., 2007) و برهم‌کنش قارچ-گیاه در هم‌زیستی میکوریزایی (Menotta et al., 2007; Requena et al., 2002; Voiblet et al., 2001) دارای تنظیم و بیان بالای ژنی بوده‌اند (جدول ۳). پروتئین secretion-related GTPase هجده ساعت بعد از مایه‌زنی تریکودرما به بذور در حال جوانه‌زنی گوجه‌فرنگی ردیابی شد. در بررسی‌های قبلی (Chacon et al., 2007) زمانی‌که ریشهٔ گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی با سویهٔ *T. harzianum* CECT 2413 مایه‌زنی شد، سطح بیان آن در مراحل اولیهٔ کلونیزه‌شدن ریشه بیش از دو برابر افزایش یافت. در برهم‌کنش میکوریزایی قارچ *Glomus mosseae* با ریشهٔ گیاه جعفری (Requena *et al.*, 2002) بعضی هم‌سانه‌های مرتبط با GTPase سطح بالایی از تنظیم و بیان ژن را در میسلیوم‌های درگیر در مراحل قبل از تماس با گیاه نشان داد و این ثابت می‌کند که این پروتئین در سیگنال‌دهی جهت کنترل توقف رشد و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در موضع برهم‌کنش در غیاب یک سیگنال از گیاه میزبان دخالت دارد. بررسی نقش ژن CDC42 (یک small GTPase) در شکل‌گیری و توسعهٔ رابطهٔ اکتومایکوریزایی قارچ *Tuber borchii* با گیاه (Menotta *et al.*, 2007) نشان داد که بیان این ژن در حضور میزبان و مواد مترشحهٔ ریشهٔ اضافه‌شده به محیط کشت به ترتیب دو و پنج برابر افزایش یافت. این بررسی‌ها نقش احتمالی این خانوادهٔ ژنی در ایجاد جهت‌دهی اجزای داخل سلولی[2]، حفظ رشد ریسه‌ای و شکل‌گیری برهم‌کنش قارچ- ریشه را در قارچ‌های کلونیزه‌کنندهٔ گیاهی نشان می‌دهد.

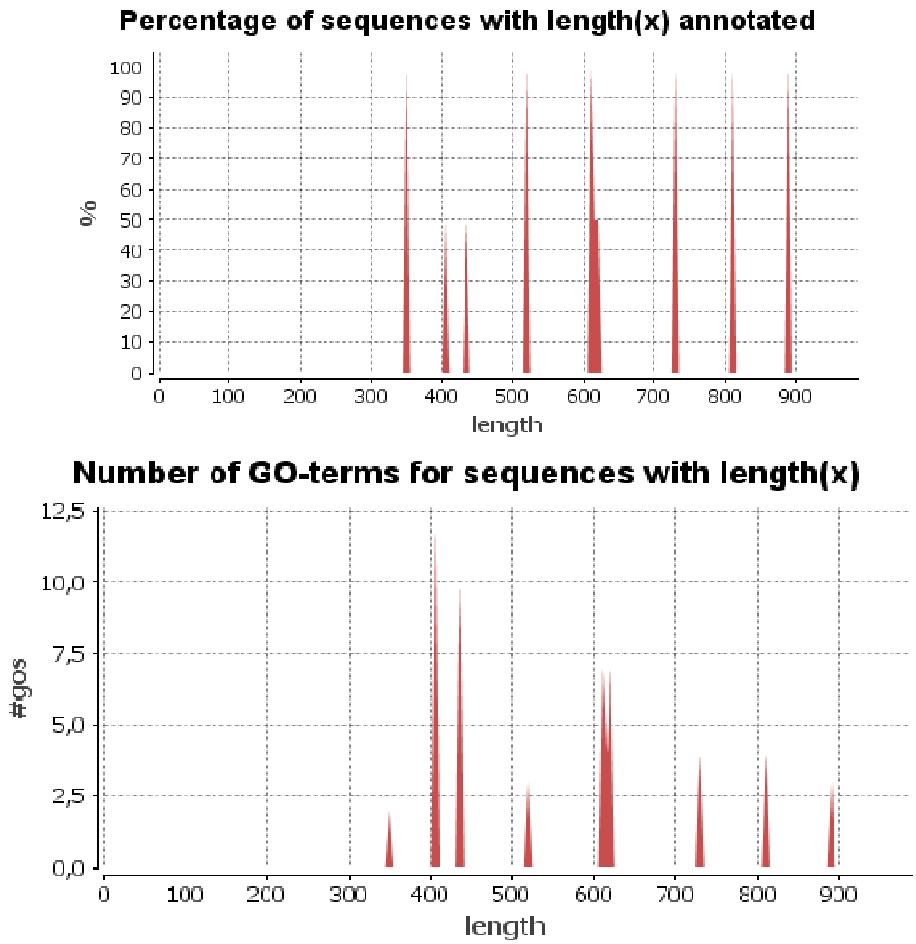
پروتئین‌های fatty acid desaturase، lipid phosphate phosphatase و phospholipase A2 هجده ساعت بعد از مایه‌زنی تریکودرما به ریشه و بذور در حال جوانه‌زنی گوجه فرنگی ردیابی شد. در مطالعات قبلی (Chacon *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2012) نیز چندین قطعه‌توالی بیان شده و مرتبط با سوخت‌وساز لیپیدها از جمله fatty acid hydroxylase، sterol desaturase، acetyl-CoA acetyl transferase، lipoic acid synthetase و 3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase در مراحل اولیهٔ برهم‌کنش تریکودرما با ریشهٔ گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی القا شد. برخی از این پروتئین‌ها علاوه بر اینکه از اجزای ساختاری فسفولیپیدهای غشای سلولی‌اند در انتقال سیگنال سلولی، تنظیم ارتباطات سلول به سلول، سوخت‌وساز داخل سلولی چربی، مهاجرت از طریق عمل کردن در

1. Actin dynamics

2. Cell polarity

گیرنده‌های سلولی سطحی متصل به پروتئین G، نقل و انتقال مواد غذایی از غشاهای درون‌سلولی و کنترل رشد سلولی و ادامهٔ بقا در مراحل اولیهٔ توسعه دخالت دارند (McDermott *et al*., 2006).

سایر قطعه‌توالی‌ها که به‌طور افتراقی بیان شد مرتبط با موارد زیر بود: پروتئین nucleolar essential protein درگیر در سوخت‌وساز mRNA هسته‌ای، slingshot homolog 2b درگیر در پویایی اکتین با فعال‌سازی مجدد پروتئین‌های ADF/cofilin، nuclear pore complex subunit Nup133 درگیر در تسهیل و مدیریت تمام انتقال‌های بین سیتوپلاسم و هسته، 60S ribosomal protein l40 درگیر در شناساندن پروتئین‌ها، زیست‌زایی ریبوزوم و جزء ساختاری و مونتاژی ریبوزوم، 40S ribosomal protein S3 درگیر در ترجمه، 30–50 exonuclease/helicase (Wrn) درگیر در همانندسازی DNA، نسخه‌برداری، ترجمه، نوترکیبی، تعمیر DNA و زیست‌زایی ریبوزوم، Polycomb/Trithorax Set-15 protein درگیر در خاموش‌سازی ژن، DNA repair protein rad50 درگیر در تعمیر مولکول‌های آسیب‌دیدهٔ DNA و تحمل به مواد مضره با خصلت قارچ‌کشی، ubiquitin-activating enzyme درگیر در نسخه‌برداری، انتقال سیگنال، زیست‌زایی پراکسیزوم و فرایند تجزیهٔ پروتئینی، 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase درگیر در تسریع در واکنش‌های شیمیایی داخل سلول‌ها و Mitochondrial outer membrane translocase complex, subunit Tom7 درگیر در غربال کردن پروتئین‌ها، هنگامی که به داخل میتوکندری وارد می‌شوند (Honlinger *et al*., 1996; Hondo *et al*., 2007; Madan *et al*., 1973).



شکل ۵. نمایش نموداری نتایج مرحلهٔ نگاشت و تفسیر بعد از معرفی ۴۲ قطعه‌توالی بیان‌شده به محیط BLAST2GO. این دو نمودار درصد توالی‌ها تفسیر شده و تعداد تفسیرهای نسب‌شناسی ژنی را با در نظر گرفتن طول توالی‌ها نشان می‌دهد.

جدول ۳. شباهت توالی ۴۲ قطعه‌توالی بیان‌شده با پروتئین‌ها و ژن‌های شناخته شده با معرفی و جست‌وجوی آنها در BLASTx و AmiGO

شمارهٔ نمونه	نام پروتئین و گونه‌ای که بیشترین شباهت را با قطعه‌توالی بیان‌شده دارد	E value (BLASTx)	P value (GO)	نام برهم‌کنش	بیان‌شده در برهم‌کنش‌های مشابه
JK757061	Blastx: phospholipase A2 [*Nectria haematococca* mpVI 77-13-4]; GO: Putative uncharacterized protein [*Magnaporthe oryzae*]	$3e^{-61}$	$3.7e^{-36}$	کلونیزه‌شدن‌بذورجوانه‌زده،۱۸ساعت	-
JK757062	Blastx: secretion-related GTPase [*T. reesei*	$2e^{-70}$	$4.0e^{-54}$	کلونیزه‌شدن‌بذورجوانه‌زده،۱۸ساعت	Chacon et al., 2007; Menotta et al., 2007; Requena et al., 2002; Voiblet et al., 2001
JK757063	QM6a]; GO: Rab GTPase [*Dictyostelium discoideum*]	$1e^{-14}$			
JK757066	Mitochondrial outer membrane translocase complex, subunitt Tom7 [*Cordyceps militaris* CM01]	$8e^{-10}$	-	کلونیزه‌شدن‌بذورجوانه‌زده،۱۸ساعت	Samolski *et al*., 2009
JK757067	Blastx: fatty acid desaturase [*Metarhizium anisopliae* ARSEF 23]; GO: Potential delta(6)-or delta(8)-desaturase [*Candida albicans SC5314*]	$2e^{-95}$	$3.0e^{-43}$	کلونیزه‌شدن‌ریشه،۱۸ساعت	Rubio *et al*., 2012; Chacon *et al*., 2007

ادامهٔ جدول ۳

شمارهٔ نمونه	نام پروتئین و گونه‌ای که بالاترین شباهت را با قطعه‌توالی بیان‌شده دارد	E value (BLASTx)	P value (GO)	نام برهم‌کنش	بیان‌شده در برهم‌کنش‌های مشابه
JK757068	Blastx: 40S ribosomal protein S3 [*Metarhizium anisopliae* ARSEF 23]; GO: 40S ribosomal protein S1 [*Magnaporthe oryzae*]	$3e^{-119}$	$4.6e^{-86}$	کلونیزه‌شدن‌ریشه،۱۸ساعت	Chacon *et al*., 2007; Rubio *et al*., 2012
JK757071	Blastx: DNA repair protein rad50 [*Verticillium dahliae* VdLs.17] GO: RAD50 [*Saccharomyces cerevisiae*]	$2e^{-23}$	$1.2e^{-10}$	کلونیزه‌شدن،۱۸ساعت	-
JK757072	Blastx: predicted protein [*T. reesei* QM6a] GO: lipid phosphate phosphatase-related protein type 3, Rattus norvegicus	$5e^{-10}$	0.013	کلونیزه‌شدن‌ریشه،۱۸ساعت	Rubio *et al*., 2012
JK757073	Blastx: putative 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [*T. atroviride* IMI 206040]; GO: 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [*Magnaporthe oryzae*]	$5e^{-08}$	$2.6e^{-07}$	کلونیزه‌شدن‌ریشه،۳۶ساعت	-
JK757074	nuclear pore complex subunit Nup133 [*Metarhizium acridum* CQMa 102]	$6e^{-76}$	-	کلونیزه‌شدن‌ریشه،۳۶ساعت	-
JK757075	Blastx: ubiquitin-activating enzyme [*T. reesei*	$1e^{-87}$	$6.7e^{-64}$	کلونیزه‌شدن‌بذورجوانه‌زده،۷۲ساعت	Samolski *et al*., 2009
JK757076	QM6a]; GO: Ubiquitin-activating enzyme E1 1 [*Magnaporthe oryzae*]	$3e^{-155}$	$2.3e^{-92}$		
JK757077	3'-5' exonuclease/helicase (Wrn), putative	$3e^{-18}$	-	کلونیزه‌شدن‌بذورجوانه‌زده،۷۲ساعت	-
JK757084	[*Cordyceps militaris* CM01]	$7e^{-30}$			
JK757079	Blastx: 60S ribosomal protein L40 [*Lodderomyces elongisporus* NRRL YB-4239]; GO: Ubiquitin and ribosomal L40A fusion protein [*Saccharomyces cerevisiae*]	$1e^{-05}$	$2.9e^{-06}$	کلونیزه‌شدن‌بذورجوانه‌زده،۷۲ساعت	Chacon *et al*., ; 2007 Samolski *et al*., 2009
JK757082	hypothetical protein TRIATDRAFT_300026 [*T.*	$1e^{-04}$	-	کلونیزه‌شدن‌بذورجوانه‌زده،۷۲ساعت	-
JK757083	*atroviride* IMI 206040] and duf159 domain containing protein [*Grosmannia clavigera* kw1407]	0.029			
JK813928	slingshot homolog 2b [*Danio rerio*]	-	0.021	کلونیزه‌شدن بذورجوانه‌زده،۱۲ساعت	-
JK757086	Blastx: nucleolar essential protein [*Verticillium albo-atrum* VaMs.102]; GO: Member of the alpha/beta knot fold methyltransferase superfamily [*Saccharomyces cerevisiae*]	$4e^{-54}$	$3.4e^{-37}$	کلونیزه‌شدن بذورجوانه‌زده،۱۲ساعت	-
JK813925	Blastx: phospholipase A2 [*Nectria haematococca* mpVI 77-13-4]; GO: Putative uncharacterized protein [*Magnaporthe oryzae*]	$1e^{-57}$	$1.3e^{-33}$	کلونیزه‌شدن بذورجوانه‌زده،۷۲ساعت	-
JK813938	set-15, Polycomb/Trithorax protein [*Caenorhabditis elegans*]	-	0.0090	کلونیزه‌شدن ریشه،۳۶ساعت	-
JK757064	predicted protein [*T. reesei* QM6a]	$7e^{-84}$	-	کلونیزه‌شدن	-
JK757065		$9e^{-118}$	-	بذورجوانه‌زده،۱۸ساعت	-
JK757069	predicted protein [*T. reesei* QM6a]	$2e^{-98}$	-	کلونیزه‌شدن ریشه،۱۸ساعت	-
JK757070		$7e^{-157}$	-		-
JK757078	Blastx: predicted protein [*T. reesei* QM6a]; GO: Putative uncharacterized protein [*Magnaporthe oryzae*]	$3e^{-16}$	$2.1e^{-10}$	کلونیزه‌شدن بذورجوانه‌زده،۷۲ساعت	-
JK757080	predicted protein [*T. reesei* QM6a]	$1e^{-127}$	-	کلونیزه‌شدن	-
JK757081		$2e^{-98}$	-	بذورجوانه‌زده،۷۲ساعت	-
JK757085	predicted protein [*T. reesei* QM6a]	$4e^{-71}$	-	کلونیزه‌شدن بذورجوانه‌زده،۷۲ساعت	-
JK813934	Uncharacterized protein [*Sus scrofa*]	-	0.034	کلونیزه‌شدن بذورجوانه‌زده،۷۲ساعت	-

نتیجه‌گیری کلی

تعدادی از ژن‌های ردیابی و متمایز بیان‌شده در طول برهم‌کنش‌های کلونیزه‌شدن اسپرموسفر و سطح ریشهٔ مرتبط با ژن‌های شناخته‌شده‌ای به صورت بالقوه آنزیم‌های درگیر در تأمین نیازهای غذایی میکروارگانیزم‌ها از جمله تریکودرما را کد می‌کنند. از جملهٔ این ژن‌ها می‌توان به phospholipase A2، fatty acid desaturase، phosphatase lipid phosphate، ubiquitin-activating enzyme و 3-hydroxybutyryl-dehydrogenase CoA اشاره کرد. این ژن‌های مرتبط با سوخت‌وساز از طریق انجام وظیفه در به دست آوردن مواد غذایی از ترکیبات کربنی غنی از انرژی که از بذور جوانه‌زده و ریشه‌ها ترشح شده است، اهمیت آشکاری در استقرار تریکودرما در اسپرموسفر و سطح ریشه دارند. این ترکیبات که مواد خارج‌شدهٔ ریشه[1]، مواد مترشحهٔ ریشه[2]، موسیلاژها[3]، موسیژل‌ها[4]، لیزاتا[5]، ترکیبات گازی، توکسین‌ها و ترکیبات متنوع دیگر را شامل می‌شود نه‌تنها ریزبوم مساعد محیطی برای رشد میکروارگانیزم‌ها را فراهم می‌کنند بلکه منبع غذایی غنی از انرژی (عمدهٔ این ترکیبات) نیز عمل می‌کنند. سویه‌های تریکودرما همانند سایر قارچ‌ها و موجودات دیگر در ریزبوم ریشه‌گاه، مواد غذایی خود را از مواد آلی موجود در آن به دست می‌آورند. بر تسخیر ریشه‌گاه، گونه‌های تریکودرما، همچنین توانایی مصرف کربن از منابع پیچیدهٔ کربنی تأثیر دارند و این مرتبط با ترشح آنزیم‌های اختصاصی این میکروارگانیزم‌هاست (Ahmad and Baker, 1988). بنابراین جای تعجب نیست که ژن‌هایی از تریکودرما مرتبط با آنزیم‌های تجزیه‌کننده از جمله آنزیم‌های درگیر در سوخت‌وساز لیپیدها در طول کلونیزه‌شدن اسپرموسفر و سطح ریشه بیان بالایی داشته باشند. تعدادی از ژن‌ها همچون small GTPase، Fatty acid desaturases، lipid phosphate phosphatase، phospholipase A2 و ubiquitin-activating enzyme نیز مرتبط با انتقال سیگنال درون و بین سلولی، برهم‌کنش با میزبان، ورود مواد به داخل غشا و کنترل رشد و بقای سلولی، عادت به تغییرات محیطی و انتقال مولکول‌های زیستی بین هسته و سیتوپلاسم دارند. با توجه به اینکه در شرایط ایجاد برهم‌کنش غیربیماریزا بین تریکودرما و گیاه نیاز به شناسایی متقابل وجود دارد و باید مسیرهای سوخت‌وسازی لازم به‌منظور استقرار تریکودرما فراهم شود و این شرایط مستلزم فعال شدن مسیرهای انتقال سیگنال پیچیده جهت بیان ژن‌های تنظیمی و کارکردی و نهایتاً فرایندهای بیوشیمیایی است، لذا بیان بالای ژن‌های مرتبط با این فعالیت‌ها نیز کاملاً طبیعی است. در اینجا نقش پروتئین GTPase در سیگنال‌دهی جهت کنترل توقف رشد و مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده در موضع برهم‌کنش بسیار برجسته است.

REFERENCES

1. Ahmad, J.S. & Baker, R. (1988a). Growth on carbon substrates of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 34, 807-814.
2. Bailey, B.A., Bae, H., Strem, M.D., Roberts, D.P., Thomas, S.E., Crozier, J., Samuels, G.J., Choi, I.Y. & Holmes, K.A. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta*, 224, 1449-1464.
3. Chacon, M., Rodriguez-Galan, O., Benitez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobel, A. & Delgado-Jarana. J. (2007). Microscopic and transcriptome analysis of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *International Microbiology*, 10, 19-27.
4. Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review*, 2,43-56.

1. Root exudates
2. Root secretions
3. Mucilages
4. Mucigels
5. Lysata

5. Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. & Monte, E. (2012). *Trichoderma* beneficial effects to plants and transgenic plants expressing *Trichoderma* genes. *Microbiology*, 158, 17–25.
6. Hondo, D., Hase, S., Kanayama, Y., Yoshikawa, N., Takenaka, S. & Takahashi, H. (2007). The LeATL6-Associated Ubiquitin/Proteasome System May Contribute to Fungal Elicitor Activated Defense Response via the Jasmonic Acid-Dependent Signaling Pathway in Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 20, 72–81.
7. Honlinger, A., Bomer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K. & Pfanner, N. (1996). Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *EMBO Journal*, 15, 2125-2137.
8. Madan, V.K., Hillmer, P. & Gottschalk, G. (1973). Purification and properties of NADP dependent L(+)-3- hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *European Journal of Biochemistry*, 32, 51–6.
9. McDermott, M.I., Siga, Y.J., Crump, J.S. & Morris, A.J. (2006). Enzymatic analysis of lipid phosphate phosphatases. *Methods*, 39, 169–179.
10. Mehrabi-Koushki, M., Rouhani, H. & Mahdikhani Moghaddam, E. (2012). Differential display of abundantly expressed genes of *Trichoderma harzianum* during colonization of tomato-germinating seeds and roots. *Current Microbiology*, 65,524–533.
11. Menotta, M., Amicucci, A., Basili, G., Rivero, F., Polidori, E., Sisti, D. & Stocchi, V. (2007). Molecular characterisation of the small GTPase CDC42 in the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. *Protoplasma*, 231, 227–237.
12. Requena, N., Mann, P., Hampp, R. & Franken, P. (2002). Early developmentally regulated genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*: identification of GmGIN1, a novel gene with homology to the C-terminus of metazoan hedgehog proteins. *Plant and Soil*, 244, 129–139.
13. Rubio, M.B., Dominguez, S., Monte, E. & Hermosa, R. (2012). Comparative study of *Trichoderma* gene expression in interactions with tomato plants using high-density oligonucleotide microarrays. *Microbiology*, 158,119-28.
14. Samolski, I., de Luis, A., Vizcaino, J. A., Monte, E. & Suarez, M. B. (2009). Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray. *BMC Microbiology*, 9, 217-231.
15. Voiblet, C., Duplessis, S., Encelot, N. & Martin, F. (2001). Identification of symbiosis regulatedgenes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Plant Journal*, 25, 181-191.
16. Yedidia, I., Benhamou, N. & Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants *Cucumis sativus* L. by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied Environment Microbiology, 65,1061-1070.