بررسی تأثیر سویه‌های بهینه‌سازی شده تریکودرما بر فرآیند گلدهی و عملکرد گیاه لوبیا

نگین اصلاحی[۱]، مژگان کوثری[۲،*]، مصطفی مطلبی[۳،#]، محمدرضا زمانی[۴] و سپیده اکبری[۵]

۱- دانشجوی دکتری، بخش بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران

۲- استادیار، بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج

۳- استاد، بخش بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران

۴- استاد، بخش بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران

۵- کارشناس ارشد، بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۲۷)

چکیده

انتقال از فاز رویشی به فاز زایشی در گیاهان مهم‌ترین رویداد در تولید و نوآوری‌های ژنتیکی است، این پدیده در گیاهان عالی تحت تأثیر بسیاری از عوامل ژنتیکی و محیطی می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهند که یکی از عوامل محیطی تأثیرگذار در فرآیند رشد زایشی و گلدهی گیاهان، گونه‌های قارچ تریکودرما هستند که به فراوانی در خاک وجود دارند. این مطالعه به‌منظور ارزیابی توانایی دو سویه *Trichoderma harzianum* نوترکیب حاوی *کیتیناز کایمر* ۴۲ (حاوی دمین ChBD) و سویه وحشی به‌منظور تأثیر بر گلدهی و بهبود عملکرد لوبیا در شرایط گلخانه‌ای انجام شد. بدین منظور، پارامترهای مؤثر در گلدهی مانند تعداد گل، زمان گلدهی و پارامترهای مؤثر در عملکرد، اندازه‌گیری گردید. هم‌چنین بیان برخی ژن‌های مربوط به گلدهی از جمله *FT* و *SOC1* با استفاده از تکنیک Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که گیاهان تیمار یافته با سویه‌های نوترکیب افزایش معنی‌داری در تعداد گل و نیز گلدهی زودتر نسبت به والد وحشی و گیاهان کنترل داشتند. هم‌چنین گیاهان تیمار یافته با سویه‌های نوترکیب تفاوت معنی‌داری در تعداد و وزن غلاف نسبت به گیاهان تیمار یافته با سویه وحشی تریکودرما و گیاهان بدون تیمار نشان دادند. علاوه‌بر این، گیاهان تحت تیمار با سویه T13، سطوح بیشتر بیان *FT* و *SOC1* را به‌ترتیب به‌میزان ۳/۴۲ و ۳/۴۱ برابر نسبت به سایر تیمارها و گیاه کنترل نشان دادند. در نهایت، سویه نوترکیب T13 با تأثیر بر میزان گلدهی و به‌دنبال آن افزایش عملکرد گیاه در مقایسه با سایر سویه‌ها، عملکرد بهتری نشان داد.

واژگان کلیدی: ژن *کیتیناز کایمر*، سویه‌های نوترکیب، عملکرد، گلدهی، لوبیا، Real-time PCR

* نویسنده مسئول مشترک، آدرس پست الکترونیکی: **kowsari@abrii.ac.ir**

نویسنده مسئول مشترک، آدرس پست الکترونیکی: **motalebi@nigeb.ac.ir**

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1398.6.1.5.5]

[DOI: 10.29252/pgr.6.1.47]

مقدمه

لوبیای سبز (*Phaseolus vulgaris*) منبع مهمی از پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی، فیبرها و ترکیبات فنلی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و نیز کربوهیدارت‌های غنی از آهن می‌باشد (Pereira *et al.*, 2014). ارزش بیولوژیک پروتئین لوبیا به‌سبب دارا بودن مقادیر بالایی از اسیدهای آمینه‌ی ضروری بالا بوده و با داشتن ۲۲ درصد پروتئین نقش مهمی در تأمین مواد پروتئینی مورد نیاز انسان دارد، به‌طوریکه این میزان پروتئین ۲ تا ۳ برابر پروتئین غلات است. پروتئین‌های لوبیا عمدتاً از آلبومین‌ها (۱۰–۲۰ درصد)، گلوبولین (۷۹ درصد) و گلوتلین‌ها (۱۰–۲۰ درصد) تشکیل شده است (Barampama and Simard, 1993)، لذا افزایش عملکرد گیاه در واحد سطح بسیار حائز اهمیت است. امروزه برای تغذیه گیاهان مقدار زیادی کودهای شیمیایی نیتروژنه و فسفاته مصرف می‌شود که علاوه‌بر تخریب محیط‌زیست خطرات زیادی برای انسان‌ها دارد. در این راستا کودهای زیستی با تأمین عناصر غذایی برای گیاهان نقش مهمی را در کشاورزی پایدار ایفا می‌کنند (Kaewchai *et al.*, 2010). از میان کودهای زیستی، گونه‌های تریکودرما بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. تریکودرما قارچی خاکزی، غیربیماری‌زا، همزیست با ریشهٔ گیاهان است و به‌دلیل تنوع متابولیسمی و قدرت رقابتی بالا در بیشتر مناطق از موجودات غالب مایکوفلور خاک بوده و به آسانی تکثیر می‌شود (Kaewchai *et al.*, 2010). ترشح آنزیم‌های مختلف خارج سلولی در خاک، توان بالای کلونیزاسیون فراریشه، قدرت همزیستی در ریشه، توان اسپورزایی زیاد، تحمل به شوری و سایر ترکیبات موجود در محیط خاک و ریشه و نیز افزایش انحلال عناصری مانند فسفر و پتاسیم از خصوصیات مهم گونه‌های مختلف جنس تریکودرما به‌حساب می‌آیند (Altomare *et al.*, 1999; Harman *et al.*, 2004). این قارچ با نفوذ به درون ریشه و برقراری رابطه اندوفیتی با ریشه گیاه سبب تغییر پروفایل بیان ژن گیاه گردیده و به این روش موجب تغییر متابولیسم گیاه می‌گردد (Pereira *et al.*, 2014; Harman *et al.*, 2004; Mayo *et al.*, 2015). این گونه‌ها علاوه‌بر تأثیر بر رشد رویشی گیاهان در افزایش رشد زایشی از جمله افزایش گلدهی نیز مؤثر می‌باشند (Baker, 1989; Calvet *et al.*, 1993, Chang *et al.*, 1986; Ousley *et al.*, 1994)، به‌طوری‌که تیمار تریکودرما موجب تسریع گلدهی و افزایش تعداد گل در هر مترمربع نسبت به گیاهان کنترل می‌گردد (Baker, 1989). امروزه تکنولوژی مهندسی ژنتیک به‌طور گسترده‌ای جهت دستیابی به سویه‌های جدید تریکودرما با راندمان بالا در برنامه‌های کاربردی کشاورزی پایدار اهمیت یافته است. بدین منظور، کوثری و همکاران (Kowsari *et al.*, 2014a) با انتقال ژن *کیتیناز کایمر* حاوی دمین باندشونده به کیتین به قارچ *T. harzianum* چندین سویه‌ی نوترکیب تریکودرما تولید کردند. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر سویه‌های نوترکیب تریکودرما (T13 و T15) بر رشد زایشی و عملکرد گیاه لوبیا و بیان برخی ژن‌های درگیر در گلدهی و مقایسه آن‌ها با والد وحشی بود.

مواد و روش‌ها

سویه‌های قارچ تریکودرما: سه سویه‌ی *T. harzianum* شامل سویه‌ی وحشی (Tw) و سویه‌های نوترکیب (T13 و T15) تولید شده توسط کوثری و همکاران (Kowsari *et al.*, 2014a) مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). این سویه‌ها در محیط PDA کشت و به مدت ۱ هفته در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. سپس به‌منظور اسپورزایی طبق پروتکل Bastakoti و همکاران (Bastakoti *et al.*, 2017) در شرایط نور قرار گرفتند.

تهیه اینوکلوم قارچ تریکودرما: اینوکلوم سویه‌های قارچ تریکودرما به‌طور جداگانه بر روی بستر سبوس برنج و گندم با نسبت ۳:۱ تهیه گردید و ۴ روز قبل از کاشت با نسبت ۱ درصد به خاک گلدان‌ها اضافه گردید، به‌طوری‌که در یک‌سوم بالای گلدان‌ها قرار گرفت (Pugliese *et al.*, 2008).

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-05]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1398.6.1.5.5]
[DOI: 10.29252/pgr.6.1.47]

مواد گیاهی: بذور لوبیا رقم گلی تهیه شده از ایستگاه تحقیقاتی خمین با هیپوکلریت ۱ درصد به‌مدت ۱ دقیقه ضدعفونی و چندین بار به‌دقت با آب دو بار تقطیر استریل شستشو شدند. سپس با سوسپانسیون اسپور (۱×۱۰^{۶} اسپور در یک میلی‌لیتر) سویه‌های تریکودرما به مدت ۱ ساعت در انکوباتور شیکردار انکوبه گردیدند.

تیمارهای گلخانه‌ای و طراحی آزمایش: آزمایش‌های گلخانه‌ای طی دوره‌ی رشدی لوبیا در تابستان سال ۱۳۹۷ در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (کرج) انجام شد. بذور به تعداد ۵ عدد در هریک از گلدان‌های حاوی خاک غیراستریل و اینوکلوم تریکودرما کشت گردید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۴ تیمار با ۳ تکرار (هر تکرار شامل سه گلدان) طراحی گردید. تیمارها شامل: ۱- گیاه کنترل (بدون تیمار تریکودرما)، ۲- گیاه تیمار شده با سویه نوترکیب T13 (T13)، ۳- گیاه تیمار شده با سویه نوترکیب T15 (T15) و ۴- گیاه تیمار شده با سویه وحشی تریکودرما (Tw) بودند.

بررسی تأثیر سویه‌های تریکودرما بر گلدهی: تیمارهای مورد آزمایش از نظر زمان گلدهی و تعداد گل در هر گیاه مورد بررسی قرار گرفتند. هم‌چنین به‌منظور بررسی بیان ژن‌های دخیل در گلدهی (*FT*[1] و *SOC1*[2]) تعداد ۳ برگ از هر تکرار تیمار در زمان گلدهی جمع‌آوری و به فریزر ۸۰- منتقل گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA: به‌منظور بررسی بیان ژن‌های گلدهی، RNA کل برگ با استفاده از بافر استخراج ترایزول طبق پروتکل تهیه شده توسط کمپانی اینویتروژن آمریکا استخراج گردید. سپس کمیت و کیفیت آن به‌وسیله دستگاه نانوداراپ (IMPLEN-آلمان) در طیف جذبی ۲۶۰/۲۸۰ و بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز بررسی شد. پس از اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، حدود ۱ میکروگرم از آن با آنزیم DNase I (شرکت پرومگا آمریکا) تیمار شد و cDNA طبق پروتکل کیت شرکت Vivantis مالزی سنتز شد.

شرایط Real-time PCR و آنالیز نتایج: بیان ژن‌های دخیل در گلدهی در گیاهان تیمار شده با سویه‌های تریکودرما و غیرتیمار شده با استفاده از تکنیک Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. آغازگرهای اختصاصی دو ژن مرتبط با گلدهی با استفاده از نرم‌افزار Primer Quest طراحی شدند (جدول ۲). ژن (*Elongation Factor 1*) *PvEF1* به‌عنوان کنترل‌داخلی برای مقایسه‌ی آنالیز ژن‌های گلدهی مورد استفاده قرار گرفت (Mayo *et al.*, 2015). هر واکنش با سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی آماده گردید و آنالیز نتایج با نرم‌افزار REST 2009 (Pfaffl *et al*., 2002) انجام شد. برای هر جفت آغازگر منحنی استاندارد با غلظت‌های مختلف cDNA (۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ نانوگرم) جهت تعیین کارایی PCR ترسیم شد.

بررسی تأثیر سویه‌های تریکودرما بر عملکرد گیاه لوبیا: در پایان مرحله رشد، پارامترهای عملکردی شامل تعداد غلاف در هر گیاه، وزن غلاف و تعداد دانه در هر غلاف اندازه‌گیری شد.

آنالیزهای آماری: نتایج حاصل از پارامترهای گلدهی و عملکرد با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ آنالیز گردید. میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ با آزمون دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

تأثیر سویه‌های نوترکیب و وحشی تریکودرما بر فاکتورهای گلدهی و عملکرد گیاه: نتایج (جدول ۳) نشان داد که گیاهان تیمار شده با سویه‌های تریکودرما به‌خصوص سویه‌های نوترکیب زودتر نسبت به گیاه کنترل وارد فاز زایشی شدند، به‌طوری‌که اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها مشاهده گردید. در مورد تعداد گل در هر گیاه به‌طور متوسط، گیاهان تیمار شده با سویه‌های نوترکیب افزایش معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ نسبت به گیاهان تیمار شده با سویه وحشی و کنترل نشان دادند (جدول ۳)،

1- Flowering Locus T
2- Suppressor of Overexpression of CO 1

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-05]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1398.6.1.5.5]
[DOI: 10.29252/pgr.6.1.47]

جدول ۱- سویه‌های تریکودرما استفاده شده در این پژوهش

Table 1. *Trichoderma* strains used in this study

جنس و گونه Genus and species	کد کلکسیون میکروبی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) Microbial collection code of agricultural biotechnology research institute of Iran (ABRII)	سویه Strain
Trichoderma harzianum	ABRII 10156	Wild type (Tw)
Trichoderma harzianum	ABRII 10154	E(18-10)13 (T130
Trichoderma harzianum	ABRII 10155	E(18-10)15 (T15)

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش جهت بررسی بیان ژن‌های درگیر در گلدهی گیاه لوبیا

Table 2. List of designed primers used in this study for real-time PCR analysis of bean flowering-related genes

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر ´۳ - ´۵ Primer sequence 5´- 3´	ژن Gene	شماره دسترسی در بانک ژن GenBank accession number
FT-F	CTCCAAGTCCTAGTGATCC	*FT*	XM_007152257
FT-R	ACTCTCATAGCCCATAACC		
SOC1-F	TGTGAGCAGTATGGTATCC	*SOC1*	XM_007139904
SOC1-R	CAACTAGACCTAGGTAGTCC		
PvEF1-F	GATCGGAAATGGCTATGC	*EF1*	XM-007151531
PvEF1-R	CCTTCTCGATCTCCTTACC		

جدول ۳- تأثیر سویه‌های مختلف تریکودرما بر گلدهی و فاکتورهای مؤثر در عملکرد گیاه لوبیا

Table 3. Effect of different *Trichoderma* strains on flowering and effective factors on bean yield

تیمار Treatment	زمان گلدهی Flowering time (day after sowing)	میانگین تعداد گل Average flower number	میانگین تعداد غلاف Average pod number	میانگین وزن غلاف (گرم) Average pod weight (gr)	میانگین تعداد دانه در هر غلاف Average number of seeds per pod
لوبیا (Bean)	83[a]	4.3[c]	3.6[c]	1.66[c]	4.6[b]
لوبیا + T13 (Bean + T13)	70[d]	12.3[a]	5.3[a]	3.5[a]	5.3[a]
لوبیا + T15 (Bean + T15)	73[c]	8.3[b]	4[b]	2.4[b]	5.3[a]
لوبیا + Tw (Bean + Tw)	79[b]	5[c]	3.3[c]	1.88[c]	4.6[b]

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف متفاوت هستند، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال۵ درصد تفاوت معنی‌دار دارند.

In each column, averages with different letters differ significantly according to the Duncan multiple-range test at the 5% probability level.

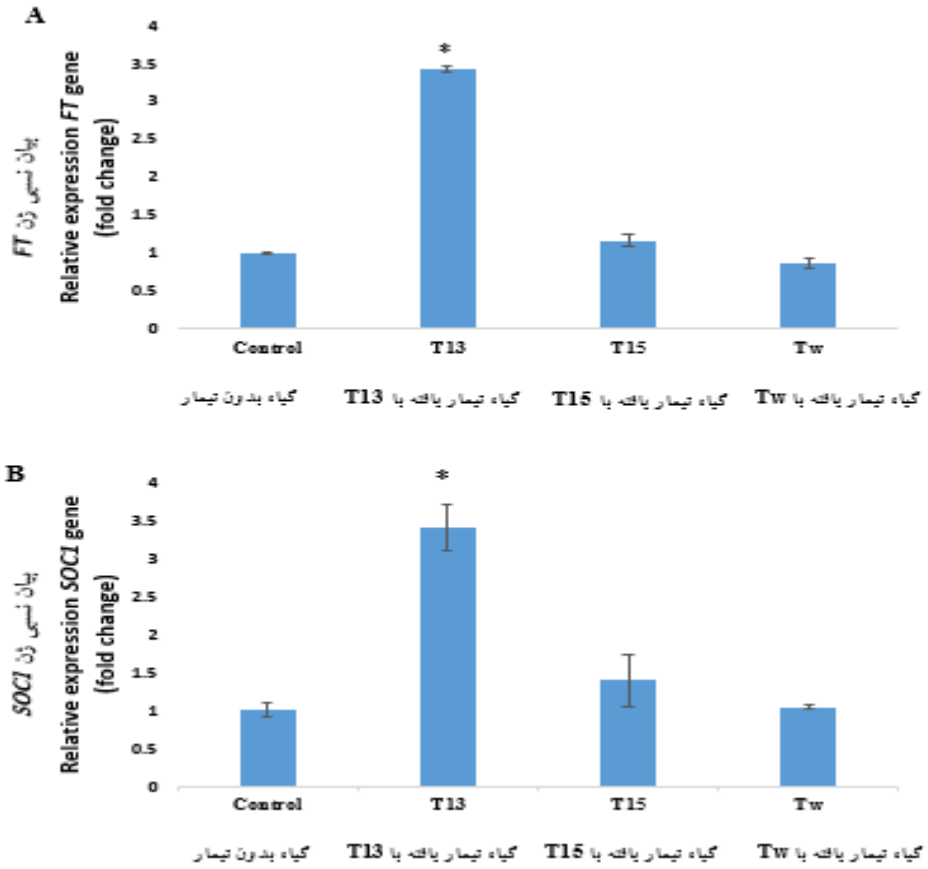
هم‌چنین افزایش معنی‌داری در گیاهان تیمار شده با T13 نسبت به T15 مشاهده گردید. از نظر فاکتورهای مؤثر در عملکرد، تیمارهای T13 و T15 به‌ترتیب افزایش معنی‌دار ۶۰ و ۲۱ درصد در تعداد غلاف نسبت به تیمار Tw نشان دادند؛ ولی بین تیمار Tw و کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در مورد میانگین وزن غلاف نیز افزایش معنی‌داری بین گیاهان تیمار شده با سویه‌های نوترکیب نسبت به گیاهان تیمار شده با Tw و کنترل وجود داشت. گیاهان تیمار شده با Tw و گیاهان کنترل اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. در مورد میانگین تعداد دانه در هر غلاف اختلاف معنی‌داری میان گیاهان تیمار شده با سویه‌های نوترکیب نسبت به گیاهان تیمار شده با سویه وحشی و گیاهان کنترل مشاهده شد.

تأثیر سویه‌های نوترکیب و وحشی تریکودرما بر بیان ژن‌های دخیل در گلدهی: نتایج (شکل ۱) نشان داد که بیان ژن‌های *FT* و *SOC1* در تیمار T13 به‌ترتیب به‌میزان ۳/۴۲ و ۳/۴۱ برابر و با اختلاف معنی‌دار نسبت به گیاه بدون تیمار افزایش یافت. در تیمار T15 اگرچه بیان نسبت به کنترل به‌میزان کمی افزایش یافت (۱/۱۶ و ۱/۳۹ به‌ترتیب برای ژن *FT* و *SOC1*) اما اختلاف معنی‌دار نبود، در تیمار

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-05]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1398.6.1.5.5]
[DOI: 10.29252/pgr.6.1.47]

Tw نیز بیان ژن *FT* و *SOC1* به‌ترتیب به میزان ۰/۸۶ و ۱/۰۴ بدون اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گیاه کنترل مشاهده شد.

تاکنون نقش گونه‌های مختلف تریکودرما بر رشد زایشی گیاهانی نظیر لوبیا، گل اطلسی، گل همیشه‌بهار، خرفه، گل شمعدانی و قدومه به اثبات رسیده است (Baker 1989; Calvet *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1986; Ousley *et al.*, 1994). تیمار تریکودرما در این گیاهان موجب تسریع گلدهی و افزایش تعداد گل در هر مترمربع نسبت به گیاهان کنترل گردید که این مسئله در گیاهان مهم در تجارت گل بسیار حائز اهمیت بوده و سبب افزایش درآمد می‌گردد، از سوی دیگر در گیاهان دانه‌دار نیز سبب افزایش عملکرد محصول و بهره‌وری خواهد شد (Ousley *et al.*, 1994). تسریع گلدهی در گیاهان می‌تواند به افزایش عملکرد در طول دوره رشد منجر شود، نتایج نشان داد که گیاهان تیمار شده با سویه‌های نوترکیب نسبت به گیاهان تیمار شده با Tw و گیاهان بدون تیمار زودتر وارد فاز زایشی شدند. از سوی دیگر تیمار لوبیا با این سویه‌ها سبب افزایش تعداد گل در واحد سطح گردید، به‌طوری‌که تعداد گل در گیاهان تیمار شده با T13 و T15 به‌ترتیب ۱۸۶ و ۹۳ درصد نسبت به گیاه کنترل افزایش یافت. این نتایج با مطالعات سایر پژوهشگران در مورد تأثیر تریکودرما بر گلدهی مطابقت داشت (Qusley *et al.*, 1994; Sisodia *et al.*, 2018).



شکل ۱- بررسی بیان نسبی ژن‌های *FT* (A) و *SOC1* (B) در گیاه لوبیا تیمار شده با سویه‌های نوترکیب (T13، T15) و سویه وحشی (Tw) در مقایسه با گیاه کنترل (گیاه بدون تیمار)

Figure 1. Relative expression analysis of *FT* (A) and *SOC1* (B) genes in bean plants treated with recombinant strains (T13, T15) and *Trichoderma* wild type strain (Tw) compared with control plants (non-treated plants)

*: نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است. خطوط عمودی روی ستون‌ها نشان دهنده‌ی خطای معیار است.

*: Indicate significant differences ($P \leq 0.05$). The bars indicate standard error.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-05]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1398.6.1.5.5]
[DOI: 10.29252/pgr.6.1.47]

فراوانی مشاهده شده را می‌توان به افزایش اندازه گیاه و افزایش تعداد شاخساره و جوانه نسبت داد. در مطالعات پیشین بر روی این سویه‌ها، اثبات گردید که سویه‌های نوترکیب به‌دلیل داشتن توان رقابتی بالا در فلور میکروبی خاک (به‌واسطه داشتن کیتیناز قوی‌تر) و نیز بهبود جذب آب و عناصر موجبات افزایش رشد گیاه را فراهم می‌آورند (Kowsari *et al*., 2014a,b). تعداد غلاف در تیمار T13، ۴۷ درصد نسبت به گیاهان بدون تیمار و وزن غلاف نیز در تیمارهای T13 و T15 به‌ترتیب ۱۱۰ و ۴۴ درصد نسبت به گیاهان بدون تیمار افزایش نشان داد، اما کاربرد سویه وحشی نتوانست تأثیر معنی‌داری بر عملکرد داشته باشد. این نتایج با مشاهدات تقوی‌قاسم‌خیلی و همکاران (Taghavi Ghasemkheyli *et al*., 2014) در مورد تأثیر تریکودرما بر عملکرد گندم و نیز مذهبی و همکاران (Mazhabi *et al*., 2011) مبنی بر تأثیر این قارچ بر افزایش جذب مواد غذایی و افزایش عملکرد گیاه سازگار بود.

ژن *FT* ژن کلیدی شروع گلدهی در پاسخ به فتوپریود بوده و توالی این ژن در بین گونه‌های گیاهی حفاظت‌شده است (Putterill, 2001; Endo *et al*., 2005; Yan *et al*., 2006). این ژن به‌طور اختصاصی در برگ‌ها به‌وسیله‌ی ژن *CO* (*CONSTANT*) در مسیر فتوپریود بیان می‌شود و پروتئین آن از طریق آوند آبکش به‌سمت رأس ساقه حرکت می‌کند و سبب تغییر برنامه رشد رویشی به زایشی در گیاه خواهد شد (Adrian *et al*., 2010). ژن *SOC1* از اعضای خانواده ژنی جعبه MADS بوده که در نهاندانگان تک‌لپه و دولپه حفاظت‌شده است و در برگ‌ها بیان می‌شود. این ژن در جهت القاء گلدهی به‌دنبال فعال شدن ژن *FT* فعالیت می‌کند (Liu *et al*., 2007, 2009; Melzer *et al*., 2008). در این مطالعه، نتایج بیان این دو ژن با هم هم‌سو بود، به‌طوری‌که در گیاهان تیمار یافته با T13 افزایش معنی‌داری در بیان هر دو مشاهده گردید که این یافته نیز نشان دهنده تأثیر مثبت این سویه بر مکانیسم‌های گلدهی در گیاه لوبیا بود. در مطالعات پیشین در مورد اثر سویه‌های نوترکیب نامبرده بر رشد رویشی گیاه لوبیا، تأثیر بیشتر سویه T13 در فعالیت بیوفرتیلایزری مشاهده گردید. ازآن‌جایی‌که این سویه‌ها والد مشترک دارند، شاید اختلاف در فعالیت آن‌ها را بتوان به تعداد نسخه ژن منتقل شده و ناحیه قرارگیری ژن در ژنوم قارچ نسبت داد و این امر مستلزم توالی‌یابی کل ژنوم این سویه‌ها بوده که تاکنون انجام نشده است.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، استفاده از سویه‌های نوترکیب تریکودرما در این مطالعه، سبب افزایش رشد زایشی لوبیا گردید که توانست ضمن بهبود ویژگی‌های رشدی، افزایش عملکرد را نیز در پی داشته باشد. اگرچه میانکنش گونه‌های مختلف تریکودرما با گیاهان، تحت تأثیر گونه‌های مختلف گیاهی و شرایط رشدی گیاه می‌باشد، به‌طوری‌که نتایج یکسان در گیاهان مختلف مشاهده نمی‌شود. با این وجود سویه نوترکیب T13 که در مطالعات پیشین به‌عنوان یک عامل افزایش دهنده رشد شناخته شده بود، در این مطالعه نیز برتری خود را نسبت به سایر سویه‌های مورد مطالعه اثبات نمود. این‌گونه استنباط می‌شود که قارچ تریکودرما قادر است با تأثیر بر بیان ژن *FT* سبب تغییر برنامه رویشی به زایشی گیاهان تیمار شده گردد و موجب گلدهی زودرس در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان بدون تیمار شود، به شرطی که قادر باشد در یک خاک آکنده از انواع میکروارگانیسم‌ها قارچ‌های رقیب را از میان برداشته و بتواند با گیاه زراعی کلونیزه شود که تریکودرمای نوترکیب T13 این پتانسیل را دارد.

References

Adrian, J., Farrona, S., Reimer, J.J., Albani, M.C., Coupland, G. and Turck, F. (2010). Cis-Regulatory elements and chromatin state coordinately control temporal and spatial expression of flowering locus t in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **22:**1425-1440.

Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T. and Harman, G.E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*, **65:** 2926-2933.

Baker, R. (1989). Improved *Trichoderma spp.*, for promoting crop productivity. *Trends in Biotechnology*, **7:** 34-38.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-05]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1398.6.1.5.5]
[DOI: 10.29252/pgr.6.1.47]

Barampama, Z. and Simard, R.E. (1993). Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi. *Food Chemistry*, **47:** 159-167.

Bastakoti, S., Belbase, S., Manandhar, S. and Arjyal, C. (2017). *Trichoderma* species as biocontrol agent against soil borne fungal pathogens. *Nepal Journal Biotechnology*, **5:** 39-45.

Calvet, C., Pera, J. and Barea, J.M. (1993). Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant Soil*, **148:** 1-6.

Chang, C., Chang, Y., Baker, R., Kleifeld, O. and Cbet, I. (1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, **70:** 145-148.

Endo, T., Shimada, T., Fujii, H., Kobayashi, Y., Araki, T. and Omura, M. (2005). Ectopic expression of an FT homolog from Citrus confers an early flowering phenotype on trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Research*, **14:** 703-712.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, **2:** 43-56.

Kaewchai, S., Soytong, K. and Hyde, K.D. (2010) Mycofungicides and fungal biofertilizers. *Fungal Diversity*, **38:** 25-50.

Kowsari, M., Motallebi, M. and Zamani, M. (2014a). Protein engineering of chit42 towards improvement of chitinase and antifungal activities. *Current Microbial*, **68:** 495-502.

Kowsari, M., Zamani, M. and Motallebi, M. (2014b). Overexpression of chimeric chitinase42 enhances the antifungal activity of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium graminearum*. *Mycologia Iranica*, **3:** 15-23.

Liu, C., Xi, W.Y., Shen, L.S., Tan, C.P. and Yu, H. (2009). Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Development Cell*, **16**: 711-722.

Liu, C., Zhou, J., Bracha-Drori, K., Yalovsky, S., Ito, T. and Yu, H. (2007). Specification of *Arabidopsis* floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development*, **134:** 1901-1910.

Mayo, S., Gutiérrez, S., Malmierca, M.G., Lorenzana, A., Campelo, M.P., Hermosa, R. and Casquero, P.A. (2015). Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma spp.*, in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. *Frontiers in Plant Science*, **6: 685:** 1-11.

Mazhabi, M., Nemati, H., Rouhani, H., Tehranifar, A., Moghadam, E.M., Kaveh, H. and Rezaee, A. (2011). The effect of *Trichoderma* on polianthes qualitative and quantitative properties. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, **21:** 617-621 (In Persian).

Melzer, S., Lens, F., Gennen, J., Vanneste, S., Rohde, A. and Beeckman, T. (2008). Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, **40:** 1489-1492.

Ousley, M.A., Lynch, J.M. and Whipps, J.M. (1994). The effects of addition of *Trichoderma inocula* on flowering and shoot growth of bedding plants. *Scientia Horticulturae*, **59:** 147-155.

Pereira, J.L., Queiroz, R.M., Charneau, S.O., Felix, C.R., Ricart, C.A., da Silva, F.L., Steindorff, A.S., Ulhoa, C.J. and Noronha, E.F. (2014). Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. *PLoS One*, **9:** e98234.

Pfaffl, 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:** e36-e36.

Pugliese, M., Liu, B.P., Gullino, M.L. and Garibaldi, A. (2008). Selection of antagonists from compost to control soil-borne pathogens. *Journal of Plant Disease Protection*, **115:** 220-228.

Putterill, J. (2001). Flowering in time: genes controlling photoperiodic flowering in *Arabidopsis*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, **356:** 1761-1767.

Sisodia, A., Pal, A. and Singh, A.K. (2018). Varietal response and effect of *Trichoderma* on flowering in gladiolus. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **7:** 3658-3660.

Taghavi Ghasemkhili, F., Pirdashti, H., Tajik Ghanbari, M.A. and Bahmanyar, M.A. (2014). Effect of *Trichoderma harzianum* on wheat (*Triticum aestivum* L.) grain yield under different levels of cadmium nitrate. *Iranian Journal of Field Crops Research*, **12(3):** 454-462.

Yan, L., Fu, D., Li, C., Blechl, A., Tranquilli, G., Bonafede, M., Sanchez, A., Valarik, M., Yasuda, S. and Dubcovsky, J. (2006). The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, **103:** 19581-19586.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-05]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1398.6.1.5.5]

[DOI: 10.29252/pgr.6.1.47]

Evaluation of Effect of Improved *Trichoderma* Inocula on Flowering and Crop Productivity of Bean

Negin Eslahi[1], Mojegan Kowsari[2,*], Mostafa Motallebi[3,#], Mohammad Reza Zamani[4] and Sepideh Akbari[5]

1- Ph.D. Student, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3- Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
4- Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
5- M.Sc., Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

(Received: March 9, 2019 – Accepted: June 17, 2019)

Abstract

The transition from the vegetative phase to reproductive phase is the most important event in production and genetic innovation. This phenomenon is influenced by many genetic and environmental factors in plants. According to studies carried out in this field, one of the environmental factors affects the reproductive and flowering process is *Trichoderma* species, which is abundant in soil. This study was carried out to evaluate the ability of two recombinant *Trichoderma harzianum* strains containing *chimeric chit 42* (with CHBD domain) and wild-type strain to promote common bean flowering and yield increase *in vivo* condition. To do this, flowering parameters such as a number of flowers, flowering time and effective parameters in yield were evaluated. Also, expression level of some flowering-related genes such as *FT* and *SOC1* were measured using real-time PCR. The results showed that the bean plants treated with recombinant strains had a significantly increased number of flowers and earlier flowering compared to the control and wild type *Trichoderma*. Also, plants treated with recombinant strains showed a significant difference in the number and weight of the pod compared to the plant treated with wild type strain and non-treated plants. In addition, the plants treated with T13 strain showed more expression levels of the *FT* and *SOC1* genes (with ratio of 3.42 and 3.41 fold respectively) compared to other treatments and control plant. Finally, T13 recombinant strain exhibited a better performance compared to the other strains through a positive effect on flowering and then increased the crop yield.

Keywords: *Chimeric chit 42* gene, Recombinant strains, Yield, Flowering, Bean, Real-time PCR

[*] **Co-Corresponding Author, E-mail: kowsari@abrii.ac.ir**
[#] **Co-Corresponding Author, E-mail: motalebi@nigeb.ac.ir**

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-05]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1398.6.1.5.5]
[DOI: 10.29252/pgr.6.1.47]