دانشگاه گیلان
دانشکده علوم کشاورزی

تحقیقات غلات
دوره پنجم/ شماره سوم/ پاییز ۱۳۹۴ (۲۳۰-۲۱۹)

اثر همزیستی قارچ *Piriformospora indica* بر واکنش گیاه برنج (*Oryza sativa*) به بیماری پوسیدگی طوقه

عباس حاجی‌پور باقری[۱]، محمد مهدی سوهانی[۲*]، سید حسن حسنی[۲]، ولی‌الله بابایی‌زاد[۳] و سید محمد علوی[۴]

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادیار گروه بیوتکنولوژی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، ۳- کارشناس ارشد پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان، ۴- استادیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۳- تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۲)

چکیده

قارچ درون‌همزیست *Piriformospora indica* ریزجاندارای است که در بسیاری از موارد سبب القای مقاومت سیستمیک علیه بیمارگرها در گیاهان میزبان می‌شود. از طرف دیگر، قارچ *Fusarium proliferatum* که عامل بیماری پوسیدگی طوقه در گیاه زراعی برنج است، علاوه بر کاهش رشد و عملکرد، تولید زهرابه‌هایی می‌کند که برای انسان و دام سمی است. پژوهش حاضر با هدف تعیین برهمکنش بین قارچ درون همزیست *P. indica* و قارچ *F. proliferatum* به منظور کنترل بیماری پوسیدگی طوقه با استفاده از روش‌های غیر شیمیایی انجام شد. بر اساس نتایج حاصل، نشانه‌های مورفولوژیک بیماری پوسیدگی طوقه از قبیل ارتفاع غیر نرمال گیاهان، زرد یا قهوه‌ای شدن و خشکیدگی برگ‌ها، وجود ریشک‌های نابجا در گره‌های اول و دوم و پوکی در گیاهانی که قبلاً با قارچ *P. indica* پیش‌تیمار شده بودند، مشاهده نشد. میزان فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در پاسخ به بیماری پوسیدگی طوقه در گیاهانی که با قارچ *P. indica* پیش‌تیمار شده بودند، در مقایسه با گیاهان شاهد (تیمار نشده) نشان داد که سطوح فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در ریشه گیاهان پیش‌تیمار شده با این قارچ به طور معنی‌داری افزایش یافت، اما تغییر در برگ‌ها معنی‌دار نبود. فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در برنج دارای همزیست و آلوده به بیماری، افزایش معنی‌داری در برگ‌ها و ریشه‌ها داشت. این نتایج احتمالاً نشان دهنده نقش موثر قارچ *P. indica* در حفاظت از این گیاه زراعی مهم در برابر قارچ *F. proliferatum* با استفاده از روش‌های مختلف از جمله افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت است. بنابراین، بر اساس نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌شود از قارچ *P. indica* به عنوان یکی از روش‌های کنترل غیر شیمیایی بیماری پوسیدگی طوقه در برنج استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، بیماری باکانه، پراکسیداز، درون همزیست، کاتالاز

* نویسنده مسئول: mhdsohani@gmail.com ; msohani@guilan.ac.ir

مقدمه

برنج غذای عمده بیش از نیمی از مردم دنیا است. افزایش تولید و نیز پایداری تولید از اهداف کشورهای تولید کننده جهت دست‌یابی به امنیت غذایی است (Song and Goodman, 2001). عوامل غیر زیستی و زیستی مختلفی سبب کاهش عملکرد و کیفیت دانه برنج می‌شوند که قارچ‌های بیماری‌زا از عمده‌ترین عوامل هستند. پوسیدگی ریشه و طوقه از جمله بیماری‌های بذرزاد برنج است که در اکثر مناطق برنج‌خیز دنیا مشاهده می‌شود و علاوه بر کاهش عملکرد، با تولید زهرابه‌های قارچی باعث ایجاد مسمومیت در انسان و دام می‌شود (Desjardin *et al.*, 1997, 2000).

دو گونه *Fusarium fujikuroi* و *F. proliferatum* گونه‌های اصلی عامل ایجاد این بیماری در شمال ایران و گونه *F. proliferatum* گونه غالب در مازندران گزارش شده است (Alian *et al.*, 2005). فومونیزین (Fumonisin) مهم‌ترین متابولیت ثانوی است که به مقدار زیاد *F. proliferatum* آن را تولید و در همه بخش‌های گیاه از جمله بذر ذخیره میشود. این مایکوتوکسین در انسان و دام ایجاد مسمومیت می‌کند (Matić *et al.*, 2013). روش متداول کنترل بیماری پوسیدگی طوقه استفاده از قارچ‌کش‌ها است که هزینه بالایی دارد و نیز دارای آثار زیست محیطی نامطلوب است. بنابراین، لازم است استراتژی‌هایی ابداع شود تا مقاومت پایدار گسترش یابد و مقاومت القایی یکی از این استراتژی‌های پایدار است (Song and Goodman, 2001).

امروزه مشخص و ثابت شده است که یکی از روش‌های القای مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زای گیاهی استفاده از ریزجانداران همزیست در گیاهان است. از جمله این ریزجانداران، قارچ درون همزیست *Piriformospora indica* است که در ریشه تعداد زیادی از گیاهان گزارش شده است. این قارچ از راسته Sebacinales، رده Agaricomycetes و شاخه Basidomycota است و اولین بار از ریزوسفر گیاهان کهور و کنار در کشور هندوستان جداسازی شد (Verma *et al.*, 1998). این قارچ در فضای بین سلولی و داخل سلولی ریشه گیاه رشد می‌کند و موجب تحریک مقاومت سیستمیک علیه عوامل بیماری‌زای ریشه، ساقه و برگ در گیاه می‌شود.

همزیستی قارچ *P. indica* با گیاه جو موجب مقاومت سیستمیک گیاه علیه بیماری سفیدک سطحی جو *Blumeria graminis f.sp. hordei* شد (Waller *et al.*, 2005). در مطالعه دیگری، ریشه گیاهان جو تیمار شده با قارچ *P. indica* در مقایسه با گیاهان شاهد، مقاومت سیستمیک علیه بیماری پوسیدگی ریشه جو نشان دادند، ضمن اینکه مقاومت همراه با افزایش بیان ژن‌های مقاومت (PR) بود (Deshmukh and Kogel, 2007). همزیستی قارچ *P. indica* با گیاه جو باعث القای مقاومت در برابر بیماری پوسیدگی ریشه ناشی از *Fusarium culmorum* شد که این پدیده با افزایش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاه همراه بود (Harrach *et al.*, 2013).

گیاهان به علت ثابت بودن در یک مکان و عدم توانایی فرار دائماً در معرض انواع تنش‌های محیطی هستند. تنش‌ها در گیاهان سبب انفجار اکسیداتیو از طریق افزایش میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) می‌شوند. افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن، پراکسیداسیون لیپید غشای پلاسمایی و خسارت به پروتئین و اسیدهای نوکلئیک و نهایتاً مرگ سلولی را در پی خواهد داشت (Apel and Hirt, 2004). برای اجتناب از این خسارت گیاهان دارای مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی آنتی‌اکسیدانی هستند که تعادل بین تولید و از بین بردن آثار مضر رادیکال‌های آزاد اکسیژن را برقرار می‌سازد (Waller *et al.*, 2005). همزیستی قارچ درون همزیست *Harpophora oryzae* با ریشه برنج موجب حفاظت گیاه در برابر قارچ عامل بیماری بلاست (*Magnaporthe oryzae*) از طریق افزایش میزان تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پراکسیداز شد (Su *et al.*, 2013).

در این مطالعه اثر همزیستی قارچ *P. indica* با گیاه برنج و احتمال القای مقاومت علیه بیماری پوسیدگی طوقه بررسی شد. میزان تولید آنزیم‌هایی که احتمالاً در مقاومت به بیماری پوسیدگی طوقه برنج دخالت دارند، شامل پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در گیاهان تیمار شده با قارچ *P. indica* در مقایسه با گیاهان تیمار نشده و ویژگی آنتاگونیستی دو قارچ *P. indica* و *F. proliferatum* نسبت به یکدیگر نیز ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه و تکثیر قارچ‌ها

جدایه قارچ درون همزیست *P. indica* (تهیه شده از موسسه بیماری شناسی و جانور شناسی کاربردی دانشگاه

گیسن آلمان) در محیط کشت جامد اختصاصی CM (Complex Medium) (Waller *et al.*, 2005) کشت و برای تولید اسپور سه هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای تهیه مایه تلقیح اسپور قارچ درون همزیست، از آب مقطر سترون حاوی توئین ۲۰ به میزان ۰/۰۵ درصد استفاده شد

جدایه قارچ *Fusarium proliferatum* (تهیه شده از معاونت موسسه تحقیقات برنج کشور، آمل) در محیط کشت جامد (Potato-Dextrose- Agar PDA) در دمای ۲۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز رشد داده شد (Amatulli *et al.*, 2012). اسپورها در آب سترون حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ پخش و سوسپانسیون حاصل از پارچه دو لایه کتانی عبور داده شد. مایه تلقیح حاوی ۵×۱۰^{۴} اسپور در میلی‌لیتر برای آلوده سازی آماده شد.

استقرار قارچ درون همزیست *P. indica* در ریشه گیاه برنج

بذر برنج رقم طارم محلی (رقم رایج منطقه و حساس به بیماری پوسیدگی طوقه) از مزرعه پژوهشی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان- ساری تهیه شد. برای از بین بردن آلودگی‌های سطحی، بذرها با هیپوکلریت سدیم ۰/۲۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه ضد عفونی و سپس سه بار با آب مقطر استریل آبکشی شدند. ریشه گیاهچه‌های چهار روزه در مایه تلقیح قارچ *P. indica* ($۱۰^{۶}$ کلامیدوسپور در میلی‌لیتر) غوطه‌ور و به مدت پنج ساعت روی شیکر با سرعت ۴۰ دور در دقیقه تکان داده شد. هم‌زمان ریشه گیاهچه‌های شاهد نیز در محلول مشابه فاقد اسپور قارچ غوطه‌ور شد. گیاهچه‌های تیمار شده به مدت یک شب روی کاغذ صافی مرطوب شده با سوسپانسیون قارچ *P. indica* قرار داده شدند تا به خوبی کلامیدوسپورها وارد ریشه شوند. در نهایت گیاهچه‌های تیمار شده و شاهد در سه تکرار به ظروف حاوی محیط غذایی مایع یوشیدا (Yoshida *et al.*, 1976) به گلخانه انتقال یافتند.

آزمون همزیستی قارچ *P. indica* با ریشه گیاه

به منظور بررسی همزیستی قارچ درون همزیست با ریشه گیاه برنج، بافت گیاهان تلقیح شده و شاهد رنگ‌آمیزی (Vierheiling *et al.*, 1998) و با میکروسکوپ بررسی شدند.

استقرار پایدار قارچ میکوریز و همزیستی آن در ریشه گیاه، طی سه مرحله بررسی و مطالعه شد که شامل دو و چهار هفته پس از کاشت گیاهچه‌ها و پایان خوشه‌دهی بود و وجود کلامیدوسپورها در ریشه گیاهان تلقیح شده ارزیابی شد. تایید حضور قارچ درون همزیست در بافت‌های ریشه گیاه برنج با روش مولکولی نیز انجام شد. در این روش پس از ضد عفونی سطحی ریشه‌های تیمار شده و شاهد، DNA ژنومی با روش مورای و تامپسون (Murray and Thompson, 1980) از ریشه‌ها استخراج شد. برای ردیابی مولکولی قارچ، مقدار ۱۵۰ نانوگرم DNA ژنومی برای واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن (*tef*) EF-1-alpha (AJ249911) شامل آغازگرهای پیشرو و معکوس با توالی‌های زیر (Deshmukh and Kogel 2007) استفاده و ارزیابی محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد در بافر TBE (Tris-Boric acid-EDTA) انجام شد:

پیشرو: $^{5'}$ACCGTCTTGGGGGTTGTATCC$^{3'}$

معکوس: $^{5'}$TCGTCGCTGTCAACAAGATG$^{3'}$

مایه‌زنی قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه به گیاه

مایع تلقیح تهیه شده از جدایه قارچ *F. proliferatum* حاوی ۵×۱۰^{۴} اسپور در میلی‌لیتر برای مایه‌زنی گیاهچه‌ها استفاده شد. برای این منظور، ریشه و طوقه نیمی از گیاهچه‌های دو هفته‌ای شاهد و نیز نیمی از گیاهچه‌های دو هفته‌ای پیش تلقیح شده با قارچ *P. indica* به مدت ۱۲ ساعت داخل سوسپانسیون اسپور قارچ *F. proliferatum* غوطه‌ور شدند تا عمل مایه‌کوبی به خوبی انجام شود. به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، نمونه‌گیری از برگ و ریشه در فواصل زمانی صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مایه‌کوبی انجام و به فریزر ۸۰- درجه سلسیوس منتقل و نگهداری شدند تا فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت اندازه‌گیری شود.

ارزیابی فنوتیپی بیماری

برای ارزیابی فنوتیپی توسعه بیماری پوسیدگی طوقه در گیاهان تیمار شده با قارچ درون همزیست از سیستم استاندارد ارزیابی موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (International Rice Research Institute, 2014) و روش زین‌الدین و همکاران (Zainudin *et al.*, 2008)

استفاده شد. بر این اساس، واکنش گیاهان میزبان در برابر بیماری برای خصوصیاتی مانند رشد غیر طبیعی گیاهچه، زرد شدن، قهوه‌ای شدن و خشکیدن برگ‌ها، وجود ریشک‌های نابجا در گره‌های اول و دوم، وجود توده میسیلیوم قارچ در سطح ساقه گیاه و پوک شدن دانه‌ها یادداشت‌برداری شد. گیاهان با توجه به این علایم به پنج گروه مختلف و با مقیاس صفر تا ۴ ارزیابی شدند.

تعیین برهمکنش دو قارچ در شرایط *in vitro*

برهمکنش قارچ‌های *P. indica* و *F. proliferatum* در ظروف پتری حاوی محیط کشت جامد PDA مطالعه و بررسی شد، بدین نحو که در مرکز ظروف پتری، یک صفحه آگار *F. proliferatum* و به فواصل مساوی در چهار طرف آن، چهار صفحه آگار *P. indica* قرار داده شد. در حالتی دیگر، در ظرف پتری حاوی محیط کشت جامد SNA (Synthetic Nutrient deficient Agar) یک صفحه آگار *P. indica* در مرکز و پس از گذشت چهار روز از رشد قارچ هم‌زیست، در چهار طرف آن به فواصل مساوی یک صفحه آگار *F. proliferatum* قرار داده شد (Deshmuch *et al.*, 2007).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

چهار روز پس از مایه‌کوبی با قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه (*F. proliferatum*) از برگ‌ها و ریشه‌های گیاهچه‌های برنج کشت شده در محیط کشت آبی یوشیدا جهت اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) نمونه‌برداری شد. این بازه زمانی برای استقرار قارچ عامل بیماری کفایت می‌کند، ضمن اینکه آزمون‌های مقدماتی نشان داد که تا قبل از سه روز فعالیتی مشاهده نمی‌شود (نتایج نشان داده نشده است). برای سنجش فعالیت آنزیم POD از روش (Nickel and Cunningham, 1969) استفاده شد و فعالیت آنزیمی بر حسب میکرو مول بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد. تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. در محلول بلانک به جای عصاره آنزیمی از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار استفاده شد. برای سنجش فعالیت آنزیم CAT، از روش مارشنر و کاکماک (Cakmak and Marschner, 1992) استفاده شد و فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول پراکسید هیدروژن بر گرم بافت تازه در دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر ارزیابی شد. برای سنجش فعالیت آنزیم APX، از روش (Aono *et al.*, 1995) استفاده شد و منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت و سپس فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول آسکوربیک اسید بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد. تجزیه واریانس داده‌ها پس از آزمون نرمال بودن، در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و میانگین‌ها به روش توکی در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹ مقایسه شدند.

نتایج و بحث

همزیستی قارچ *P. indica* با ریشه گیاه برنج

جهت تأیید همزیستی قارچ *P. indica* با ریشه گیاه، پس از رنگ‌آمیزی ریشه تلقیح شده، کلامیدوسپورهای قارچ به صورت گرد تا گلابی شکل و زنجیره‌ای در بافت کورتکس مشاهده شدند. توده‌های ریسه قارچ نیز در سطح ریشه قابل مشاهده بودند، در صورتی که کلامیدوسپورها و توده‌های ریسه در ریشه‌های گیاهان شاهد مشاهده نشدند (شکل ۱). در بررسی مولکولی با آغازگر اختصاصی *tef* قطعه‌ای معادل ۱۶۰ جفت باز مربوط به *P. indica* در نمونه‌های تلقیح شده تکثیر و روی ژل مشاهده شد، اما در نمونه شاهد تکثیری صورت نگرفت و باندی مشاهده نشد (شکل ۲).

بیماری پوسیدگی طوقه در گیاهان تیمار شده با قارچ *P. indica*

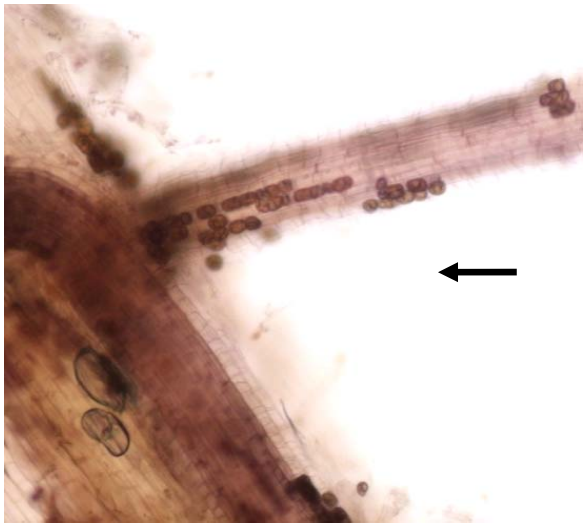
گیاهان برنج پیش تلقیح شده با قارچ درون‌هم‌زیست *P. indica* و سپس تلقیح شده با قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه با گیاهان شاهدی مقایسه شدند که فقط با قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه مایه‌کوبی شده بودند. ۱۰ روز پس از آلودگی علایم بیماری در دو گروه گیاه بررسی شد. نتایج نشان داد که همگی دارای رشد عادی و طبیعی در مقایسه با شاهد بودند، هر چند در گیاهان گروه اول زردی خفیفی در برگ‌ها مشاهده شد که بر اساس مقیاس زین‌الدین و همکاران (Zainudin *et al.*, 2008) در گروه یک قرار گرفتند (شکل ۳A). در مقابل، گیاهانی که فقط با قارچ عامل پوسیدگی طوقه تلقیح شدند دارای رشد غیر نرمال بوده بدین صورت که برخی از این گیاهان دارای ارتفاع کوتاه‌تر و برخی بلندتر از اندازه

نرمال تیپیک رقم را داشته‌اند (شکل ۳C). برگ‌های این قبیل گیاهان ابتدا سبز متمایل به زرد، سپس زرد، قهوه‌ای و در نهایت خشک شدند (۳B). ضمن اینکه، گیاهان ضعیف و تعداد پنجه‌های کمتری تولید کردند. در گره اول و دوم این قبیل گیاهان در سطح خاک ریشه‌های نابجا ظاهر شد و تعدادی از خوشه‌ها دارای دانه‌های پوک بودند (شکل ۳D). هیچ کدام از این علایم در گیاهانی که فقط با *P. indica* تلقیح شده بودند، مشاهده نشد.

نتایج این تحقیق امید بخش بود که در صورت تایید پس از آزمایش‌های تکمیلی می‌توان با همکاری متخصصان گیاه پزشکی روش‌های عملیاتی کردن این روش را در مزارع کشور در تحقیقات بعدی پیگیری کرد. مطالعه با سایر گیاهان نیز از امید بخش بودن نتایج حکایت دارد. مطالعات انجام شده در زمینه همزیستی قارچ *P. indica* با گیاه جو نشان داد که برهمکنش آن سبب تحمل بالاتر گیاه در برابر قارچ‌های بیماری‌زا مانند*F. culmorum* و *Cochliobolus sativus* در مقایسه با گیاهان شاهد فاقد همزیست شد و عملکرد دانه افزایش یافت (Waller *et al.*, 2005). قارچ *P. indica* موجب القای مقاومت سیستمیک در جو علیه بیماری سفیدک سطحی نیز شد که نتیجه آن کاهش ۷۰ درصدی در اندازه لکه‌ها (پوستول) بود. کلونیزه شدن ریشه جو با قارچ *P. indica* سبب شد تا گیاه نسبت به بیماری *F. graminearum* مقاومت پیدا کند، علایم بیماری شامل پوسیدگی ریشه و طوقه مشاهده نشود و عملکرد افزایش یابد (Deshmukh and Kogel, 2007). قارچ *P. indica* موجب حفاظت سیستمیک گیاه جو در برابر قارچ بیماریزای *F. culmorum* با افزایش میزان تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شد (Harrach *et al.*, 2013). همزیستی ریشه گندم با قارچ درون‌همزیست *P. indica* موجب شد گیاه در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای علایم بیماری سفیدک سطحی ناشی از *Blumeria graminis*، پوسیدگی ساقه ناشی از *Pseudocercosporella herpotrichoides* و پوسیدگی ریشه ناشی از *F. culmorum* را کمتر نشان دهد (Serfling *et al.*, 2007). بر این اساس، استفاده از این قارچ در قالب عملیات زراعی در مناطق برنج‌خیز شمالی می‌تواند علاوه بر مزایای دیگر به افزایش محصول برنج منجر شود.

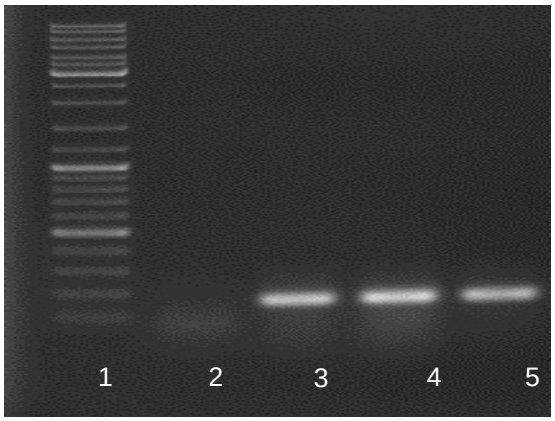
برهمکنش قارچ *P. indica* و *F. prolifratum* در شرایط *in vitro*

ویژگی آنتاگونیستی احتمالی دو قارچ در این آزمایش مطالعه شد، بدین نحو که قارچ *F. proliferatum* در مرکز محیط کشت PDA و در چهار طرف آن قارچ *P. indica* قرار داده شد. پس از اتمام مدت آزمایش مشاهده شد میسیلیوم دو قارچ رشد کرده و تأثیری مستقیم بر رشد قارچ دیگر نداشتند (شکل ۴). در بررسی اثر مستقیم آنتاگونیستی دو قارچ *P. indica* و *F. graminearum* نتایج نشان داد که دو قارچ اثر آنتاگونیستی مستقیم بر رشد یکدیگر نداشتند (Deshmuch *et al.*, 2006).



شکل ۱- بررسی میکروسکوپی ریشه‌های برنج تلقیح شده با قارچ درون همزیست *P. indica*. لکه‌های گرد تا گلابی شکل تیره که با پیکان نشان داده شده‌اند، کلامیدوسپورهای قارچ در بافت کورتکس ریشه برنج هستند.

Figure 1. Microscopic analysis of rice roots inoculated with endophytic fungi *P. indica*. Darkly pigmented and thick-walled clamidospores on the root surface presented by an arrow.



شکل ۲- باندهای الکتروفورزی محصول PCR با آغازگر اختصاصی ژن فاکتور طویل سازی ترجمه (*tef*) TEF-1-alpha قارچ درون همزیست *P. indica*، ۱- نشانگر اندازه (Fermentas, 100 bp)، ۲- گیاه شاهد (کنترل منفی)، ۳- DNA قارچ *P. indica* (کنترل مثبت)، ۴ و ۵- DNA گیاهان ۱۰ روز پس از تیمار شدن با قارچ *P. indica*.

Figure 2. Electrophoretic bands of PCR product of the elongation factor EF-1-alpha (*tef*) gene of root endophyte *Piriformospora indica*. 1. 100 bp DNA size marker, Fermentas, 2. Control plant (non-inoculated, negative control), 3. *P. indica* fungus DNA (positive control), 4 and 5. Plants 10 days after inoculation with the *P. indica*.

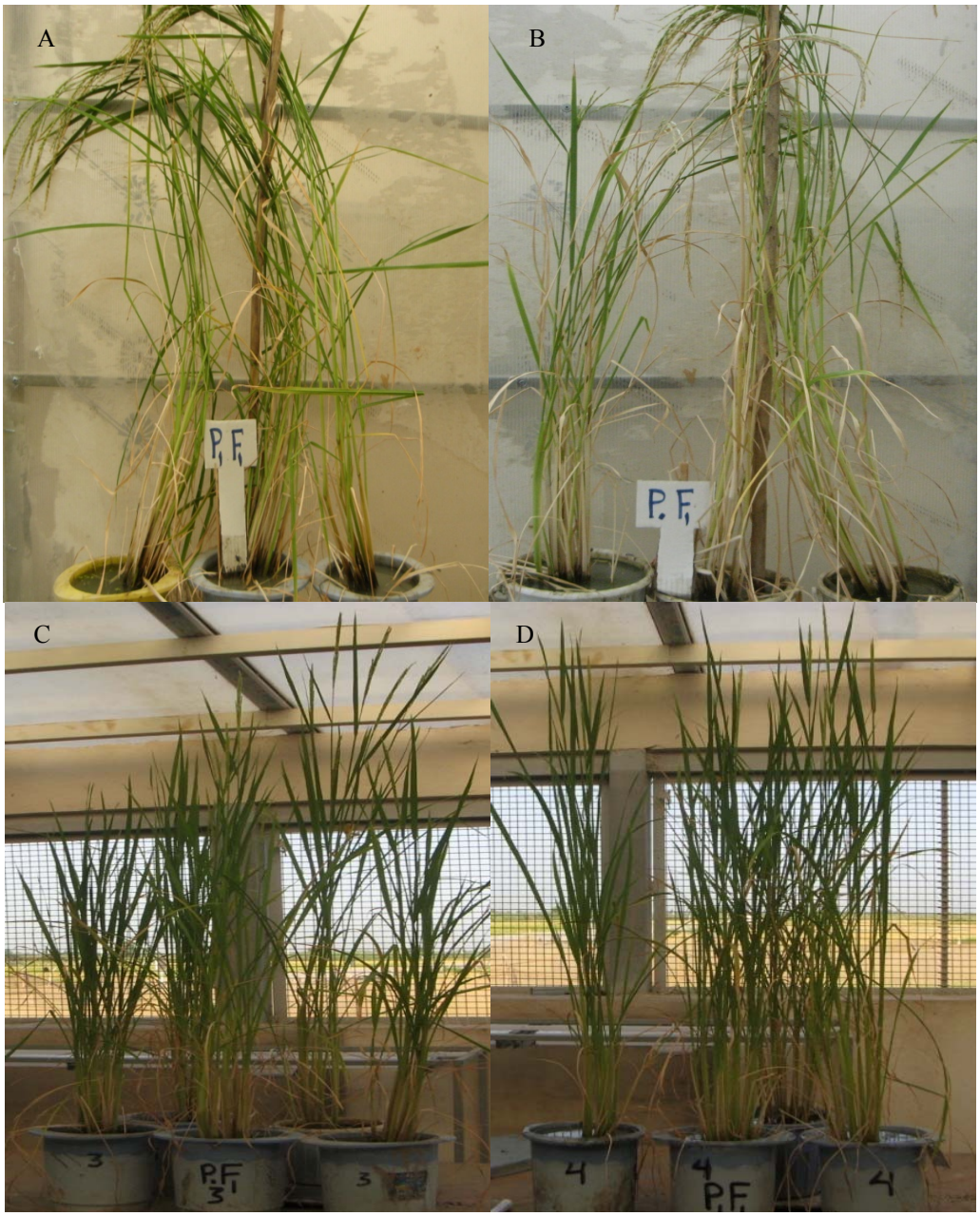
سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

چهار روز پس از آلودگی گیاهان با قارچ بیماری‌زای *F. proliferatum* ریشه و برگ کلیه تیمارها شامل: P_0F_0 (تیمار شاهد)، P_1F_0 (فقط تلقیح با *P. indica*)، P_0F_1 (فقط مایه‌کوبی با *F. proliferatum*) و P_1F_1 (تلقیح با *P. indica* و مایه‌کوبی با *F. proliferatum*) برداشت و از نظر میزان تولید سه آنزیم آنتی‌اکسیدانت پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) ارزیابی شدند. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین ها مبین آن است که میزان آنزیم پراکسیداز ریشه در تیمار P_1F_1 چهار روز پس از تلقیح با قارچ عامل بیماری به میزان حدود ۴۰ درصد نسبت به تیمارهای شاهد و تیمار P_0F_1 افزایش نشان داد، مقدار این آنزیم در برگ در بازه زمانی مطالعه شده تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها نداشت (شکل ۵).

ریشه‌های تلقیح شده با *P. indica* و نیز آلوده شده با هر دو قارچ *P. indica* و *F. proliferatum* نسبت به تیمار شاهد و تیمار P_0F_1 افزایشی به ترتیب حدود ۴۳ درصد و ۲۹ درصد در میزان تولید آنزیم آسکوربات پراکسیداز داشتند، در حالی که همچون آنزیم پراکسیداز اختلاف معنی داری برای این آنزیم در برگ‌ها وجود نداشت (شکل ۵). علت معنی‌دار شدن تولید آنزیم کاتالاز در برگ ها در مقایسه با سایر تیمارها و مشابه ریشه ممکن است به سبب انتقال پیام‌های مربوط به سیستم دفاعی ISR از ریشه به اندام‌های هوایی باشد.

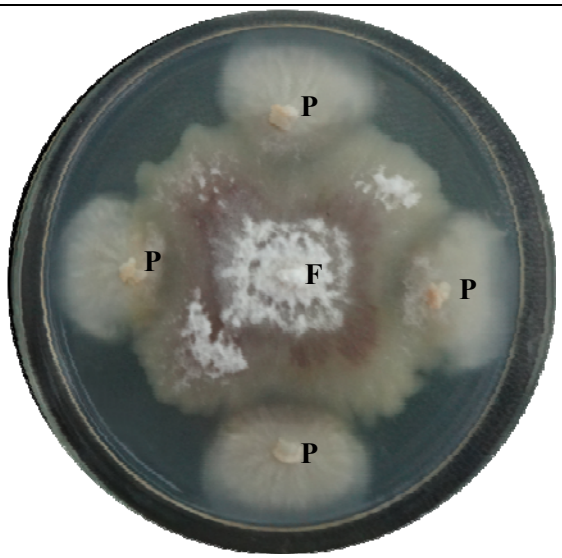
تیمارهای P_1F_0 و P_1F_1 میزان افزایش تولید آنزیم کاتالاز در ریشه‌های تیمار شده به ترتیب ۱/۵ و ۲/۵ برابر شاهد بود، به ویژه که تیمار P_1F_1 نسبت به تیمار P_0F_1 افزایشی حدود ۶۵ درصد را نشان داد (شکل ۵). این آنزیم در برگ هم در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نشان داد، بدین صورت که در تیمار P_1F_1 افزایشی حدود ۳/۳ برابر نسبت به شاهد و افزایش حدود ۳۸ درصدی نسبت به تیمار P_0F_1 داشت (شکل ۵).

تنش‌های غیر زنده و بیمارگرهای گیاهی باعث تنش اکسیداتیو در گیاهان از طریق تولید رادیکال‌های اکسیژن آزاد (ROS) و میزان بالای ROS سلولی سبب آسیب رساندن به سلول‌ها و نهایتاً مرگ سلولی می‌شوند. گیاه در اجتناب از این خسارت، از مکانیسم آنزیمی و غیر آنزیمی آنتی‌اکسیدانت استفاده می‌کند (Foyer and Noctor, 2005). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز از جمله آنزیم‌هایی هستند که در گیاه برای تجزیه ROS تولید می‌کند (Harrach *et al.*, 2013).



شکل ۳- بروز علایم در گیاهان برنج تیمار شده با ترکیب مختلف قارچ همزیست *P. indica* و بیمارگر *F. proliferatum*. A. زردی خفیف و عدم خسارت خوشه‌های گیاهان تیمار شده با *P. indica* و آلوده به *F. proliferatum*، B. زردی و خشکیدگی برگ‌ها و خسارت به خوشه‌ها و پوکی دانه‌ها در گیاهان آلوده به *F. proliferatum*، C. رشد طبیعی و ارتفاع متعادل در گیاهان تیمار شده با *P. indica* و آلوده به *F. proliferatum*، D. رشد غیر نرمال و ارتفاع نا متعادل در گیاهان آلوده به *F. proliferatum*.

Figure 3. Appearance of disease symptoms in rice plants inoculated with *P. indica* and infected with *F. Proliferatum*. A. Yellowish leaves and non-damaged panicles inoculated with *P. indica* and infected with *F. proliferatum*, B. Dry and yellow leaves, damaged panicles and unfilled grains in plants infected with *F. proliferatum*, C. Normal growth and balanced height in plants inoculated with *P. indica* and infected with *F. proliferatum*, D. Abnormal growth and unbalanced height in plants infected with *F. proliferatum*.



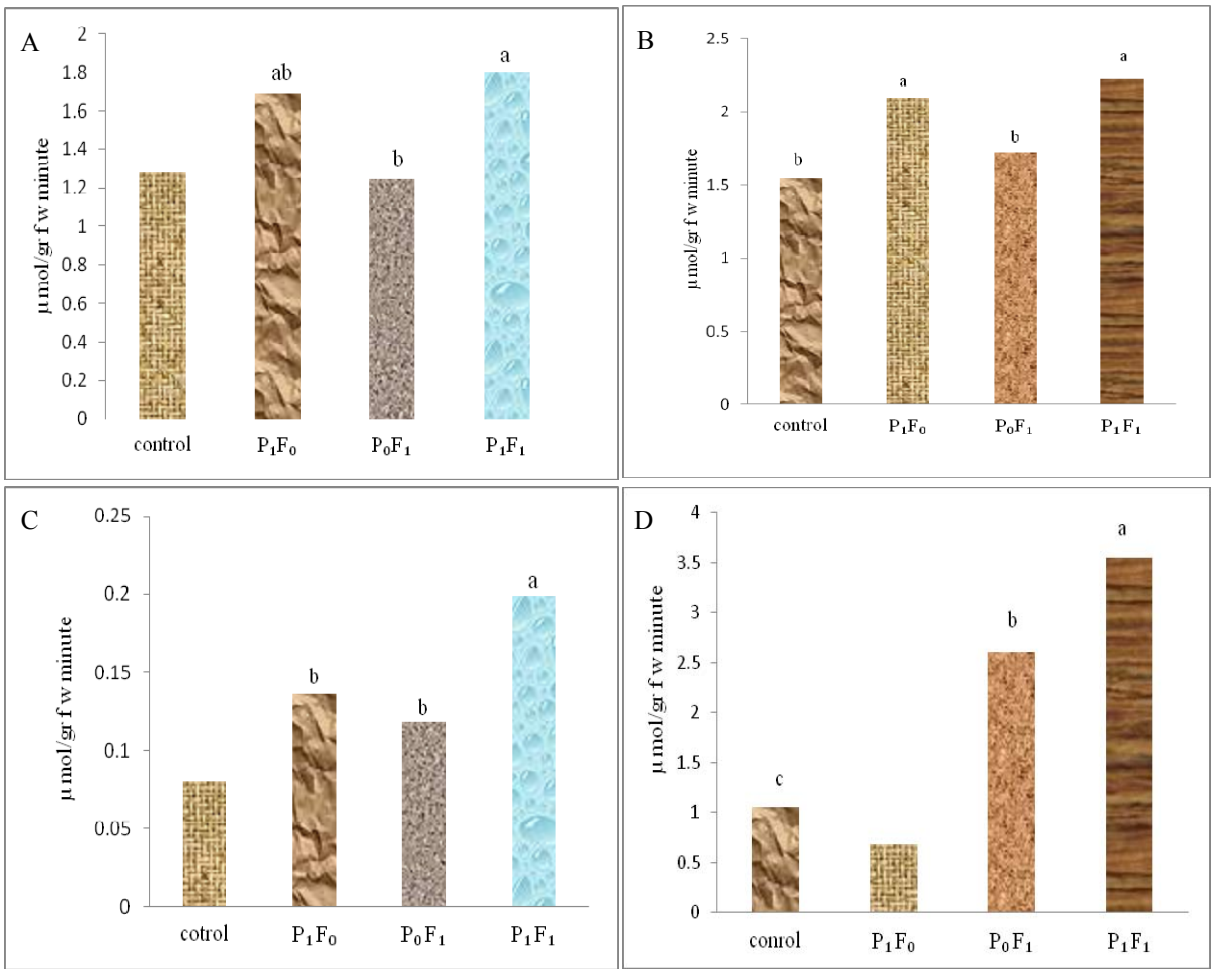
شکل ۴- برهمکنش قارچ *F. proliferatum* (F) و قارچ *P. indica* (P). رشد طبیعی میسیلیوم دو قارچ در پتری حاوی آگار ۷ روز پس از هم‌کشتی آنها نشان داد که هیچ‌گونه تأثیر آنتاگونیستی بین دو قارچ در شرایط *in vitro* وجود ندارد.

Figure 4. Interaction between *F. proliferatum* (F) and *P. indica* (P). Natural growth of the two fungi mycelium on the agar seven days after co-cultivation showed that there was no antagonistic effects between them.

قارچ‌های درون همزیست کلونیزه کننده ریشه مانند *P. indica* باعث ایجاد مقاومت سیستمیک و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاهان می‌شوند. در مطالعه‌ای، استفاده از قارچ‌های *P. indica* علیه سفیدک پودری گندم، سبب افزایش تولید آنزیم‌های گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و GSH در برگ شدند (Waller *et al.*, 2005). آلودگی ریشه گندم به گونه‌های مختلف فوزاریوم باعث افزایش چند برابری تنش اکسیداتیو می‌شوند، در حالی که *P. indica* کاهش دهنده قوی تجمع اکسیداتیوی است که توسط *F. culmorum* القا می‌شود. قارچ همزیست با القای افزایش میزان تولید آنزیم‌های سوپراکسید دیسمیوتاز (SOD)، APX، GR، دی‌هیدرو-آسکوربات ردوکتاز (DHAR) و مونو دی هیدرو آسکوربات ردوکتاز (MDHR) در گیاه باعث کاهش ROS می‌شود (Harrach *et al.*, 2013). همزیستی *Arthrobotrys oligospora* و آلوده شدن گیاه به نماتد باعث افزایش تولید آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مانند CAT، SOD، APX و POX و آنزیم‌های مرتبط با بیماری‌زایی مانند کیتیناز، بتا ۱-۳ گلوکاناز و فنیل آلانین آمونیالیاز می‌شوند (Singh *et al.*, 2013).

ثابت شده است که جوانه‌دار کردن بذرهای غلات مهم مانند جو و گندم و سپس تلقیح آن‌ها با سوسپانسیون اسپور قارچ *P. indica* سبب تغییرات مورفولوژیک و فیزیولوژیک در گیاهان میزبان می‌شوند و به طور معنی‌داری عملکرد را افزایش می‌دهد. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که این قارچ با القای مقاومت سیستمیک، گیاهان را در برابر تنش‌های زیستی و قارچ‌های بیمارگر گیاهی نیز مقاوم می‌کند (Harrach *et al.*, 2013).

با بهره‌مندی از نتایج این تحقیقات می‌توان در سطح تجاری به کشاورزان توصیه کرد تا پس از جوانه‌دار کردن بذر برنج قبل از بذرپاشی در خزانه، گیاهچه‌های ۳ یا ۴ روزه را به مدت ۵ ساعت در سوسپانسیون اسپور قارچ *P. indica* و سپس به مدت ۱۲ ساعت در سینی دارای کاغذ صافی مرطوب آغشته به اسپور قارچ قرار دهند تا اسپور به خوبی وارد و عمل کلونیزه شدن با احتمال بالایی انجام شود. با توجه به نتایج مطالعات در دیگر گیاهان خانواده گندمیان، قارچ *P. indica* احتمالاً می‌تواند علاوه بر افزایش عملکرد، مقاومت گیاه برنج را نسبت به تنش‌های غیر زنده مثل خشکی و شوری و بیمارگرهای قارچی افزایش دهد. با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد کاربرد قارچ *P. indica* می‌تواند سبب القای مقاومت سیستمیک در گیاه برنج بر علیه قارچ *F. proliferatum* شود و از این طریق خسارت ناشی از بیماری را کاهش دهد. بدیهی است پس از آزمایشات تکمیلی و تکرار آزمایش و در صورت تایید نتایج، ارایه راهکارهای عملی در استفاده از این قارچ در سطح مزارع برنج می‌تواند در کاهش و کنترل بیماری پوسیدگی طوقه در استان‌های شمالی کشور موثر باشد.



شکل ۵- اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در ترکیب‌های مختلف دو قارچ *P. indica* و *F. proliferatum* در برنج. A. فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه برنج، B. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ریشه برنج، C. فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه برنج، D. فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ برنج. مقایسه میانگین تیمارها با روش توکی در سطح احتمال ۵٪ انجام شده است. تیمارها عبارت‌اند از: P_0F_0 (تیمار شاهد)، P_1F_0 (فقط تلقیح با *P. indica*)، P_0F_1 (فقط مایه‌کوبی با *F. proliferatum*) و P_1F_1 (پیش تلقیح با *P. indica* و مایه‌کوبی با *F. proliferatum*).

Figure 5. Antioxidant enzymes activity in rice plants under different treatments of two fungi, *P. indica* and *F. proliferatum*. A. Peroxidase activity in rice root, B. Ascorbat peroxidase activity in rice root, C. Catalase activity in rice root, D. Catalase activity in rice leaf. Mean comparisons were conducted by Tukey's method at 5% probability level. The treatments are: P_0F_0 (control), P_1F_0 (only inoculated with *P. indica*), P_0F_1 (only infected with *F. proliferatum*) and P_1F_1 (pre-inoculated with *P. indica* and infected with *F. proliferatum*).

References

Alian, S. A., Nikkhah, M. J., Aminian, H. and Khosravi, V. 2007. Investigation on mating populations and mating types of *Gibberella fujikuroi*, the causal agent of rice bakanae disease in mazandaran and Zanjan province. **Journal of Plant Diseases** 11 (2): 121-136. (In Persian).

Apel, K. and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology** 55: 373-399.

Amatulli, M. T., Spadaro, D ., Gullino, M. L. and Garibaldi, A. 2012. Conventional and real-time PCR for the identification of *Fusarium fujikuroi and Fusarium proliferatum* from diseased rice tissues and seeds. **European Journal of Plant Pathology** 134: 401-408.

Aono, M., Saji, H., Fujiyama, K., Sugita, M., Kondo, N. and Tanaka, K. 1995. Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic *Nicotiana tabacum*. **Plant Physiology** 107: 645-648.

Cakmak, I. and Marschner, H. 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. **Plant Physiology** 98: 1222-1227.

Deshmukh, S. D. and Kogel, K. H. 2007. *Piriformospora indica* protects barley from root rot caused by *Fusarium graminearum*. **Journal of Plant Disease Protection** 114: 263-268.

Deshmukh, S. D., Huckelhoven, R., Schafer, P., Imani, J., Sharma, M., Waller, F. and Kogel, K. H. 2006. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. **Proceedings of The National Academic Science USA** 103: 18450-18457.

Desjardins, A. E., Plattner, R. D. and Nelson, P. 1997. Production of fumonisin B1 and moniliformin by *Gibberella fujikuroi* from rice from various geographic areas. **Applied and Environmental Microbiology** 63: 1838-1842.

Desjardins, A. E., Manandhar, H. G., Plattner, R. D., Manandhar, G. G., Poling, S. M. and Maragos, C. M. 2000. Fusarium species from Nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. **Applied and Environmental Microbiology** 66: 1020-1025.

Foyer, C. H. and Noctor, G. 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment** 28: 1056-1071.

Harrach, D. B., Helmut, B., Balázs, B., József, F. and Kogel, K. H. 2013. The mutualistic fungus *Piriformospora indica* protects barley roots from a loss of antioxidant capacity caused by the necrotrophic pathogen *Fusarium culmorum*. **Molecular-Plant Microbe Interactions** 26 (5): 599-605.

International Rice Research Institute. 2014. Standard evaluation system for rice. (5th ed.). International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines.

Kogel, K. H., Franken, P. and Huckelhoven, R. 2006. Endophyte or parasite-what decides? **Current Opinion in Plant Biology** 9: 358-363.

Matić, S., Spadaro, D., Prelle, A., Gullino, M. L. and Garibaldi, A. 2013. Light affects fumonisin production in strains of *Fusarium fujikuroi, Fusarium proliferatum, and Fusarium verticillioides* isolated from rice. **International Journal of Food Microbiology** 166: 515-523.

Murray, M. and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research** 8: 4321-4325.

Nickel, R. S. and Cunningham, B. A. 1969. Improved peroxidase assay method using Ieuco 2, 3, 6 trichlcroindophenol and application to comparative measurements of peroxidase catalysis. **Analytical Biochemistry** 27: 292-299.

Serfling, A., Wirsel, S. G., Lind, V. and Deising, H. B. 2007. Performance of the biocontrol fungus *Piriformospora indica* on wheat under greenhouse and field conditions. **Phytopathology** 97: 523-531.

Singh, U. B., Sahu, A., Sahu, N., Singh, B. P., Singh, R. K., Singh, D. P., Jaiswal, R. K., Sarma, B. K., Singh, H. B., Manna, M. C., Subba Rao, A. and Prasad, S. R. 2013. Can endophytic *Arthrobotrys oligospora* modulate accumulation of defense related biomolecules and induced systemic resistance in tomato *(Lycopersicon esculentum* Mill.) against root knot disease caused by *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology** 63: 45-56.

Song, F. and Goodman, R. 2001. Molecular biology of disease resistance in rice. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 59: 1-11.

Su, Z. Z., Mao, L. J., Li, N., Feng, X. X. and Yuan, Z. L. 2013. Evidence for biotrophic lifestyle and biocontrol potential of dark septate endophyte *Harpophora oryzae* to rice blast disease. **PLoS ONE** 8 (4): e61332.

Verma S., Varma, A., Rexer, K., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Butehorn, B. and Franken, P. 1998. *piriformospora indicagen. Et sp. Nov*., a new root-colonizing fungus. **Mycology** 90: 896-903.

Vierheilig, 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.

Waller, F., Achatz, H., Baltruschat, J., Fodor, K., Becker, M., Fischer, T., Heier, R. H., Ckelhoven, C., Neumann, D., Wettstein, P. and Kogel, K. H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **Proceedings of The National Academic Science USA** 102: 13386-13391.

Yoshida, S., Forno, A. D., Cook, J. H. and Gomes, K. A. 1976. Routine procedure for growing rice plants in culture solution. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. (3rd ed.). International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines. pp: 61-65.

Zainudin, N. A., Razak, A. A. and Salleh, B. 2008. Bakanae disease of rice in Malaysia and Indonesia: Etiology of the causal agent based on morphological, physiological and pathogenicity characteristics. **Journal of Plant Protection Research** 48 (4): 466-485.

Symbiotic effect of endophytic fungus *Piriformospora indica* with rice (*Oryza sativa*) on resistance against Bakanae disease

Abbas Hajipoor Bagheri[1], Mohammad Mahdi Sohani[2*], Seyed Hassan Hassani[2], Valiollah Babaiezad[3] and Seyed Mohammad Alavi[4]

1 and 2. Ph. D. Student and Assist. Prof., respectively, Dept. of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Iran, 3. M. Sc., Agricultural Genetics and Biotechnology Institute of Tabarestan, Iran, 4. Assist. Prof., Dept. of Plant Protection, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

(Received: May 24, 2014- Accepted: August 24, 2015)

Abstract

Fusarium prolifratum is a causal agent of Bakanae disease (root rot and crown rot) in rice (*Oryza sativa* L.) which result in sever reduction of plant growth and yield. Morever, it produces mychotoxin that cause toxication in human and animals. *Piriformospora indica* is a endophytic fungus that can induced systemic resistance against different plant pathogens. In the current study, rice plants were pre-inoculated with *P. indica* followed by infected with *Fusarium prolifratum* in order to study the endophytic effects on plant resistance against Bakane disease as well as possibility of non-chemical control of the disease. A mild typical symptoms of the Bakane disease were developed in rice plants pre-inoculated with *P. indica* and chalenged with the Fusarum. Activity of some antioxidant enzymes such as Proxidase (POD), Ascorbat proxidase (POD) and catalase (CAT) were measured 4 days after inoculation with *F. prolifratum* in root and leaves. The concentration of the three enzymes were significantly higher in colonized plants with *P. indica* and challenged with *F. prolifratum* compare to non-colonized and control plants in root and leaves. These results suggest that *P. indica* might protect rice from necrotrophic pathogens through activating the plant antioxidant enzyme. Therefore, results of this research showed that the endophytic fungus *P. indica* can be used as one of the non-chemical methods for controlling Bakanae disease in rice.

Keywords: Antioxidant enzyms, Ascorbat proxidase, Bakanae disease, Catalase, Endophyte, Proxidase

* Corresponding author: msohani@guilan.ac.ir ; mhdsohani@gmail.com