Iranian Journal of Plant Protection Science
Vol 49, No 1, Spring & Summer 2018 (81-90)
DOI: 10.22059/ijpps.2018.203699.1006704

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۹، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۷ (ص ۹۰-۸۱)

تنوع جدایه‌های قارچ *Gibberella fujikuroi* از نظر ارتباط بین تولید هورمون جیبرلین و شدت بیماری‌زایی در گیاه برنج

سارا عفتی لاکه[۱]، فریدون پاداشت‌دهکایی[۲*] و حسین صارمی[۳]
۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه زنجان
۲. استادیار پژوهش، بخش گیاه‌پزشکی مؤسسهٔ تحقیقات برنج کشور
۳. استاد، گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۳)

چکیده

پوسیدگی طوقهٔ برنج از مهم‌ترین بیماری‌های این گیاه در مناطق برنج‌کاری است. قدکشیدگی از علائم بارز این بیماری است که در اثر تولید هورمون جیبرلین توسط بیمارگر ظاهر می‌شود. این تحقیق به‌منظور شناسایی مجدد گونه‌های بیمارگر باکانه، ترکیب جمعیتی گونه‌ای بیمارگر، شدت بیماری‌زایی، تولید هورمون جیبرلین و ارتباط دو صفت اخیر با جمع‌آوری ۵۰ نمونهٔ گیاهی و سواسازی ۲۳ جدایه از بیمارگر انجام شد. تعیین شدت بیماری‌زایی به روش مایه‌زنی ساقه‌ی رقم گوهر در مرحلهٔ گیاهچه‌ای صورت گرفت. نتایج شناسایی جدایه‌ها منجر به تشخیص گونه‌های *Fusarium fujikuroi* و *Fusarium verticillioides* به ترتیب با ترکیب جمعیتی ۸۸/٤ و ۱۱/٦ درصد شد. نتایج آزمون بیماری‌زایی نشان داد، مایه‌زنی باعث ایجاد آلودگی در تمام گیاهان می‌شود، هرچند جدایه‌ها از جهت شدت بیماری‌زایی در میزبان متفاوت بودند. تعیین میزان جیبرلین به روش‌های اسپکتروفتومتری(طیف‌سنج نوری) و HPLC نشان داد، همهٔ جدایه‌ها قادر به تولید جیبرلین می‌باشند ولی میزان آن در جمعیت مورد مطالعه متفاوت بود. آنالیز داده‌ها مشخص کرد که بین شاخص میزان تولید جیبرلین در بیمارگر و درصد افزایش ارتفاع ساقه (شدت بیماری‌زایی) در گیاه از لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. احتمالاً حضور بیمارگر در گیاه و تأثیر قدرت بیماری زایی آن بیشتر و یا سریع‌تر از تأثیر جیبرلین در گیاه واقع شده است. این موضوع منجر به عدم درک رابطهٔ بین میزان جیبرلین تولید و شدت بیماری‌زایی بیمارگر شد.

واژه‌های کلیدی: اسپکتروفتومتری، جیبرلیک‌اسید، *Fusarium fujikuroi*، HPLC.

Diversity between different *Gibberella fujikuroi* isolates on their gibberellin hormone production and disease severity in rice plant

Sara Efati Lakeh[1], Fereidoun Padasht-Dehkaei[2*] and Hossein Saremi[3]
1. Former M.Sc. Student, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran
2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Rice Research Institute, Rasht, Iran
3. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Apr. 3, 2016 - Accepted: Apr. 23, 2018)

ABSTRACT

Bakanae disease of rice is one of the most important rice diseases all over the worlds. Elongation is one of the conspicuous symptoms of Bakanae disease that is caused by gibberellins-producing isolates of the pathogen. The present investigation was done to reconsider the species of Bakanae, the ratio of pathogen's species, virulence, gibberellin production and the relationship between virulence and the rate of gibberellin production in 23 isolates by gathering 50 samples of infected plants from rice fields. In order to identify the disease severity, inoculation of the plant stem was done by injection of spore suspension at the seedling stage in the Gohar variety. Results led us to identify two species of pathogen *Fusarium fujikuroi* and *Fusarium verticillioides*, and each one of them had a population of 88.4 and 11.6%, respectively. Results of the pathogenicity test showed that inoculation of the seedling causes infection in all the plant. Furthermore, the disease severity caused by the tested isolates were different in all the host plants. Results from tests of gibberellin determination using spectrophotometry and HPLC methods revealed that all the isolates were able to produce the hormone but the amount of it differed among isolates. No significant correlation was observed between the amount of gibberellin and percentage of stem elongation (disease severity). Perhaps, it may be due to early effects of virulence ability of the pathogen in comparison with late effects of gibberellin in the host plant. This leads to a lack of relationship between gibberellin levels and the disease severity of the pathogen.

Keywords: *Fusarium fujikuroi*, gibberellic acid, HPLC, spectrophotometry.

* Corresponding author E-mail: padashtf@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) دومین منبع غذایی بشر بعد از گندم است. بیماری‌های برنج در غالب مناطق کشت این گیاه عامل اصلی کاهش محصول می‌باشند. بیماری پوسیدگی طوقهٔ برنج یا بیماری باکانه با عامل *Fusarium fujikuroi* یکی از بیماری‌های بذرزاد برنج است که از خزانهٔ بذری تا شالیزار روی برنج دیده می‌شود (Padasht-Dehkaei, 1993). تاریخ کشف هورمون جیبرلین (GA_3) با شناسایی بیمارگر قارچی *F. fujikuroi* در سال ۱۸۹۸ همزمان بوده است (Hori, 1898). تحقیقات در هند و کشورهای دیگر نشان داد، سه جمعیت آمیزشی از مجموع *G. fujikuroi* با باکانهٔ بیمارکنندهٔ برنج همکاری می‌کنند که شامل تیپ (جور)های آمیزشی A، C و D می‌باشند (Bashyal & Aggarwal, 2013). هرچند که اثر ترکیب‌شدهٔ این گونه‌های *Fusarium* spp. در بیماری باکانه به‌درستی شناخته نشده است. از طرفی طبق تحقیقی که در مالزی و اندونزی در راستای تغییرپذیری استرین (سویه)هایی از قارچ *Fusarium* spp. در نشاء واریته (رقم)های حساس برنج انجام شد، نشان داد که تنها جدایه‌هایی که به‌عنوان *F. fujikuroi* شناخته شدند قادر به ایجاد علائم بیماری باکانه بوده و در تولید جیبرلین توانا بودند (Zainudin & Salleh, 2010). Zainudin *et al.* (2008b) آزمونی را درزمینهٔ بیماری‌شناسی این قارچ روی یک رقم (واریته) از برنج انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که تنها گونهٔ *F. fujikuori* از گونهٔ کمپلکس *G. fujikuroi* است که قادر به تولید هورمون جیبرلین است، از سایر گونه‌ها بیماری‌زاتر بود (Zainudin *et al.*, 2008b). هورمون جیبرلین یک هورمون رشد منفرد است که باعث ارتقاء طول ساقه در سلول‌های گیاه می‌شود (Johnson & Coolbaugh, 1990). نقش هورمون جیبرلین در بیماری‌زایی به‌صورت افزایش طول غیرعادی ساقه است و آن به زمانی نسبت داده می‌شود که غلظت GA3 از حد عادی بیشتر شود (Zainudin *et al.*, 2008b). در اصل یک ارتباط بین شکل (فرم) جنسی عامل بیماری و ترشح جیبرلین به‌عنوان یک هورمون تنظیم‌کنندهٔ رشد وجود دارد (Sun & Snyder, 1981). با توجه به اهمیت محصول برنج در استان گیلان و نیز علائم قدکشیدگی در نشاهای آلوده به این بیماری که دلیل اصلی آن تولید مقادیر بالایی از هورمون جیبرلین توسط قارچ است و اینکه این بوته‌ها سرانجام در شالیزار دچار مرگ شده و از بین می‌روند، بررسی جدایه‌های مختلف این بیمارگر به‌منظور درک ارتباط بین میزان تولید هورمون جیبرلین و شدت علائم ایجادشده در گیاه موضوع این تحقیق قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری طی فصل زراعی ۱۳۹۱ از شالیزارهای استان گیلان که در آن سابقهٔ بیماری وجود داشت در مرحلهٔ نشاء (در خزانه)، پنجه‌دهی، خوشه‌دهی و رسیدن برنج انجام شد. نمونه‌های مشکوک که شامل قطعات ریشه و طوقهٔ آلودهٔ گیاه بود به آزمایشگاه مؤسسهٔ تحقیقات برنج انتقال یافت، پس از شستشو و ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت‌سدیم ۱٪، در محیط کشت‌های برگ میخک در آگار (CLA) و سیب‌زمینی- دکستروز آگار (PDA) کشت و نگهداری شدند (Saremi, 2005). پرگنه‌های قارچ عامل بیماری بعد از ۴-۳ روز در محیط‌های کشت ظاهر شدند.

شناسایی جدایه‌های قارچ عامل بیماری

از محیط کشت PDA جهت مشاهدهٔ خصوصیات ظاهری پرگنه و از محیط کشت CLA در دمای روزانهٔ ۲۵ درجهٔ سلسیوس و دمای شبانهٔ ۲۰ درجهٔ سلسیوس و شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی، جهت مشاهدهٔ مشخصات میکروسکوپی استفاده شد. به‌منظور تشخیص گونه‌ها از کلیدهای شناسایی Nirenberg & O'Donnell (1998) و Leslie & Summerell (2006) و شرح گونه‌های Gerlach & Nirenberg (1982) استفاده شد.

اثبات و بررسی شدت بیماری‌زایی

بذرهای برنج رقم گوهر به مدت ۲۴ ساعت داخل آب نگهداری شده و به تعداد شش عدد در هر گلدان کاشته شد. بعد از رشد بوته‌ها، بوته‌هایی که از لحاظ

Archive of SID

www.SID.ir

رشدی در شرایط مطلوب‌تری بودند، باقی گذاشته و بقیه حذف شدند. جهت آزمون بیماری‌زایی از روش تزریق سوسپانسیون (دروایهٔ) کنیدی بیمارگر در ساقه و بالای طوقه به جهت دستیابی سریع‌تر و قابل رؤیت‌تر به نتایج آزمون بیماری‌زایی نسبت به روش‌های دیگر (Padasht-Dehkaei, 1993) استفاده شد. در این روش از کشت شش‌روزهٔ جدایه‌های مختلف در محیط کشت PDA، سوسپانسیون کنیدیوم به غلظت 10^6 کنیدیوم در هر میلی‌لیتر تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون نهایی با استفاده از سرنگ هامیلتون در مرحلهٔ قدکشیدگی (دو ماه بعد از کشت) در ناحیهٔ بالای طوقهٔ بوته‌ها تزریق شد. همچنین در گلدان شاهد نیز همین مقدار آب مقطر سترون به بوته‌ها تزریق شد. شدت بیماری‌زایی که نشان‌دهندهٔ قدرت بیمارگری و ایجاد علائم در گیاه است با اندازه‌گیری و ثبت درصد افزایش ارتفاع ساقه در بوته‌های رقم گوهر قبل از مایه‌زنی (قبل از تزریق) و هر پنج روز یک‌بار بعد از مایه‌زنی انجام شد. طرح در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۲۳ تیمار و سه تکرار در گلخانه انجام گرفت و برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS Ver. 9.1 استفاده شد (Gomez & Gomezs, 1989).

شرایط کشت جدایه‌های قارچی و استخراج جیبرلین از بیمارگر

برای رشد انبوه قارچ *F. fujikuroi* و نیز تولید جیبرلین، از محیط کشت مایع اختصاصی Czapek – Dox (CD) broth استفاده شد. از کشت شش‌روزهٔ هر یک از جدایه‌های قارچی در محیط PDA، دو دیسک برداشته و به محیط کشت مایع اضافه شد. بعد از اختلاط، نمونه‌های کشت داده شده در دستگاه تکان‌دهندهٔ گرمایشی[1] به‌مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵C° و سرعت ۱۲۰ rpm قرار داده شدند. برای جداسازی جیبرلین از محیط مایع از روش Ergun *et al.* (2002) بهره گرفته شد. در این روش به محیط کشت مایع حاوی عصارهٔ قارچی، محلولی محتوای متانول، کلروفرم، آمونیوم هیدروکسید و آب مقطر به آن اضافه شد. محلول حاصل به قیف جداکننده[2] منتقل و لایهٔ کلروفرم و متانول از آن تبخیر شد. بعد از تنظیم pH به ۲/۵، محلول حاصل سه بار با اتیل استات استخراج گشته و به‌منظور تبخیر در دستگاه تبخیرکنندهٔ دوار[3] در دمای ۴۵ درجهٔ سلسیوس و سرعت[4] ۶۰rpm قرار گرفت. جیبرلین به‌صورت مادهٔ خشک سفیدرنگ، برای انجام مراحل بعدی در اتانول مطلق حل شد (Rangaswamy, 2012).

تعیین و تخمین مقدار جیبرلین تولیدشده در هر یک از جدایه‌ها

تخمین کیفی میزان هورمون جیبرلین تولیدشده در نمونه‌ها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (طیف‌سنج نوری) با بهره‌گیری از روش Berrios (2004) انجام شد. در این روش عصارهٔ حلال در دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل WPA S2000) با طول‌موج ۲۵۴ نانومتر قرار گرفت. این روش که بر مبنای کدورت‌سنجی استوار است، تنها به‌منظور دانستن اینکه آیا جدایه‌ها قادر به تولید هورمون مذکور از روش موردنظر می‌باشند یا خیر، انجام شد. برای تخمین کمّی هورمون جیبرلین با کمک دستگاه کروماتوگرافی (فام‌نگار) مایع با کارایی بالا (مدل Shimadzu 501a)، استانداردهای جیبرلین خالص (Sigma) و جیبرلین محلول در اتانولِ استخراج‌شده از هر یک از جدایه‌های قارچی در شرایط مشابه به دستگاه تزریق شد. از متانول و آب‌اسیدی به نسبت ۳:۱ به‌عنوان فاز مایع استفاده شد که تخمین در نرخ جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و طول‌موج ۲۰۶ نانومتر با ستون C18 انجام شد (Bhalla *et al.*, 2010).

نتایج و بحث

شناسایی جدایه‌های قارچ عامل بیماری

با توجه به خصوصیات مورفولوژیکی (ریخت‌شناختی) در محیط کشت PDA و CLA، از مجموع ۵۰ جدایهٔ قارچی مورد آزمون، قارچ‌های زیادی از گروه‌ها و جنس‌های

1. Thermoshake

2. Separatory funnels
3. Rotary evaporator
4. Retention per minute

Archive of SID

www.SID.ir

مختلف در محیط کشت رشد نمودند. درمجموع ۴۴ جدایه از مناطق مختلف استان گیلان جداسازی شد که پنج جدایه به‌عنوان *F. verticillioides* و مابقی به‌عنوان *F. fujikuori* شناخته شدند. به‌رغم گزارش گونهٔ *F. proliferatum* از نمونه‌های آلودهٔ برنج استان گیلان (Hosein Nejad, 2007)، مشخصات جدایه‌های جداسازی شده با این‌گونه مطابقت نداشت. درنهایت آزمون‌های بیماری‌زایی و تخمین مقدار هورمون جیبرلین به‌طور تصادفی در ۲۳ جدایه از قارچ *F. fujikuroi* انجام شد (جدول ۱).

اثبات بیماری‌زایی

نتایج مربوط به آزمون‌های بیماری‌زایی نشان داد، تمام جدایه‌ها علائم بیماری را ایجاد کرده و بیماری‌زا بودند، هرچند که در تعدادی از تیمارها، ممکن بود تکرار به‌ظاهر سالم نیز مشاهده شود. علائم بیماری باکانه از قبیل کشیده و باریک‌تر بودن گیاهان آلوده نسبت به بوته‌های سالم در خزانه و شالیزار (به نسبت کم)، برگ‌های رنگ‌پریده و زرد، مرگ نشاءها در مراحل اولیهٔ رشد، ایجاد پوسیدگی در طوقه و ریشه (به نسبت زیاد) مشاهده شد که مجموعهٔ این عوامل سبب مرگ گیاه قبل از ظهور خوشه شد. با توجه به نظر Amoah *et al.* (1995) بیماری‌زایی گونه پیچیده *G. fujikuroi* در برنج (و ذرت) ممکن است به تعادل توکسین‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد که متأثر از جدایهٔ بیمارگر، محیط و حالت تغذیه‌ای گیاه است، وابسته باشد. گیاهچه‌ها در رقم گوهر علائم را در زمان یکسان و به مقدار مشابهی نشان ندادند، به این معنی که در برخی از جدایه‌ها علائم زودتر و برخی دیگر دیرتر بروز کرده و برخی از آن‌ها علائم شدیدتر و مابقی علائم کمتری داشتند.

Bashyal *et al.* (2016) در آزمایشی که روی بیماری‌زایی گونه‌های همکار در بیماری باکانه در واریته‌های حساس برنج انجام دادند، جدایه‌ها را بر اساس علائم افزایش طول (قدکشیدگی) و پوسیدگی طبقه‌بندی کردند. آنان مشاهده کردند، هر دوی این علائم در نشاءهای آلوده‌شده با جدایه‌های *F. fujikuroi* مشاهده شد درحالی‌که گونه‌های *F. verticillioides* و *F. proliferatum* تنها علائم پوسیدگی را تولید نمودند. شدت بیماری تلقیح شده در گونه‌های *F. fujikuroi* در نشاءها حداکثر (۴۰ تا ۸۰٪) بود و سپس گونه‌های *F. verticillioides* (۵۰ تا ۶۵٪) و *F. proliferatum* (۱۵ تا ۴۰٪) در درجات بعدی قرار گرفتند (Bashyal *et al.*, 2016). در این تحقیق میان جدایه‌های قارچی که از نواحی مختلف جغرافیایی و نیز در سال‌های متفاوت جمع‌آوری شده بود، سطوح متفاوتی از بیماری‌زایی مشاهده شد.

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های خالص‌سازی‌شده از گونهٔ *F. fujikuroi*

Table 1. Characteristics of the purified isolates of *F. fujikuroi*

Isolate name	Cultivar	Location	Date	Stage/Segment of plant
G1	native	Lif Shagerd	91/2/13	leaf/nursery
G2	native	Sheikh mahale	91/2/13	leaf/nursery
G5	Hashemi	Nokhale	91/3/2	leaf/nursery
G6	Khazar	Chamesghal	91/3/2	leaf/nursery
G10	Hashemi	Golsarek	91/3/3	leaf/nursery
G18	Gohar	Field of rice research institute	91/4/26	crown/field
G19	Khazar	Ghazedeh	91/5/3	crown/stem/leaf
G20	Khazar	Laksar	91/5/3	crown/stem/leaf
G24	Khazar	Some sara	91/5/3	crown/stem/leaf
G26	Khazar	Roudpish	91/5/9	crown/stem/leaf
G29	Khazar	Hoda shahr	91/5/9	crown/stem/leaf
G31	Khazar	Shah abasi 6	91/5/14	crown/stem/leaf
G32	Khazar	Shah abasi 5	91/5/14	crown/stem/leaf
G34	Khazar	Shah abasi 3	91/5/14	crown/stem/leaf
G35	Khazar	Shah abasi 2	91/5/14	crown/stem/leaf
G37	Khazar	Shah abasi 1	91/5/14	crown/stem/leaf
G46	Khazar	Torbe bar 6	91/5/21	crown/leaf/field
G47	Khazar	Abkenar 4	91/5/21	crown/leaf/field
G49	Khazar	Torbe bar 2	91/5/21	crown/leaf/field
Fu=22	Khazar	Asalem	78/5/3	crown/stem
Fu=23	Khazar	Asalem	78/7/17	crown/stem
G189	Khazar	Abkenar	83/5/29	tillering
G261	Khazar	Shahrestan	83/5/20	Tillering

Archive of SID

www.SID.ir

گونهٔ *G. fujikuroi* در تولید جیبرلین‌ها، توکسین (زهرابه)ها و آنزیم‌ها در شرایط *in vitro* متفاوت هستند (Thakur, 1974)، هرچند که نقش این ترکیب‌ها در علائم‌شناسی هنوز درک نشده است. طبق باور Ou (1985) توسعهٔ علائم بیماری باکانه به استرین قارچ درگیر در بیماری و شرایط محیطی از جمله دما و رطوبت بستگی دارد. Wolf *et al.* (2000) در زمینهٔ مقایسهٔ بیماری‌زایی تیپ‌های آمیزشی دخیل در ایجاد بیماری پوسیدگی طوقه، بیان کردند که همهٔ استرین‌ها جوانه‌زنی بذر برنج را کاهش داده و توانایی متفاوتی در ایجاد علائم باکانه در برنج داشتند و برخی از گونه‌ها از تیپ‌های آمیزشی دیگر بیماری‌زاتر بودند. Desjardins *et al.* (2000) در نپال، ۱۱ گونهٔ از جنس فوزاریوم را از برنج جداسازی کردند. همچنان که Ou (1985) نیز متذکر شده بود همهٔ عصاره‌های فیلتر (پالایش)شدهٔ این قارچ که در شرایط یکسانی رشد کرده‌اند نمی‌توانند علائم بیماری باکانه را ایجاد کنند. وی در مطالعهٔ بیماری‌زایی برخی از جدایه‌های این قارچ دریافت که علائم ایجادشده در بوته‌ها شامل پاکوتاهی و بلندقدی بوده و برخی دیگر بدون تأثیر در اندازه‌های گیاهچه‌های برنج هستند که این خود تأییدی دیگر بر نتایج این تحقیق است.

شدت بیماری‌زایی و تغییرات ارتفاع ساقه در برنج پس از مایه‌زنی با جدایه‌های مختلف بیمارگر

نتایج اندازه‌گیری افزایش طول ساقه بوته‌های رقم گوهر در چهار بازهٔ زمانی به فواصل هر پنج روز یک‌بار نشان داد، تقریباً همهٔ جدایه‌ها قادر به ایجاد علائم در نشاءهای برنج بوده اما درصد افزایش رشد بوته‌ها در اثر هر جدایه در هر مرحله از اندازه‌گیری متفاوت بود (شکل ۱). جدایه‌های قارچ درشدت بیماری‌زایی در سطح احتمال ۱ درصد با یکدیگر اختلاف داشتند. متنوع بودن توانایی تولید کردن متابولیت‌های ثانویه توسط این قارچ، قبلاً هم گزارش شده است (Bashyal *et al.*, 2016). در مرحلهٔ اول به‌علت اینکه فاصلهٔ زمانی بین زمان تزریق سوسپانسیون اسپور قارچ در گیاه و اولین مرحلهٔ ارزیابی کوتاه بود علائمی از بیماری ملاحظه نشد و گیاهان در تیمارهای اعمال‌شده به رشد عادی خود ادامه دادند. در مرحلهٔ دوم ارزیابی، شروع فعالیت عامل بیماری باعث بروز برخی علائم از قبیل پوسیدگی کم در ناحیهٔ نزدیک به طوقه شده که رشد عادی بوته را دچار مشکل کرد. در مرحلهٔ سوم اندازه‌گیری، علائم بسیار شدید ناشی از فعالیت قارچ عامل بیماری در بسیاری از تیمارها به‌صورت پوسیدگی شدید در طوقه و از رشد بازماندگی بوته‌ها مشاهده شد. در این زمان که اوج خسارت‌زایی عامل بیماری است، بسیاری از بوته‌ها حتی برخی از آن‌هایی که علائم قدکشیدگی ساقه نداشتند، دچار مرگ شده و از بین رفتند. در چهارمین مرحلهٔ اندازه‌گیری ارتفاع ساقه ازآنجایی‌که خسارت نهایی بیمارگر در مرحلهٔ سوم ارزیابی وارد شد، میزان مرگ‌ومیر بوته‌ها (پیشرفت بیماری) نسبت به مرحلهٔ قبل کمتر بود و بوته‌هایی که دچار مرگ نشده بودند، به رشد خود ادامه دادند.

جدول تجزیهٔ واریانس داده‌های هر مرحله از مراحل ارزیابی ارتفاع ساقه نشان داد، اختلاف جدایه‌ها در مراحل دوم و چهارم در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده و در مراحل اول و سوم، اثر جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۲). تفاوت درشدت بیماری‌زایی جدایه‌های بیمارگر باعث ایجاد علائم متفاوتی در تیمارها شد. این اختلاف در میزان درصد افزایش رشد ساقه می‌تواند به دلیل تفاوت درشدت بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچ عامل بیماری باشد. از طرفی می‌توان این اختلاف رشد در بوته‌ها را به اختلاف در میزان تولید هورمون جیبرلین توسط جدایه‌ها ارتباط داد.

نتایج آزمایش‌های تعیین مقدار هورمون جیبرلین در جدایه‌های قارچی

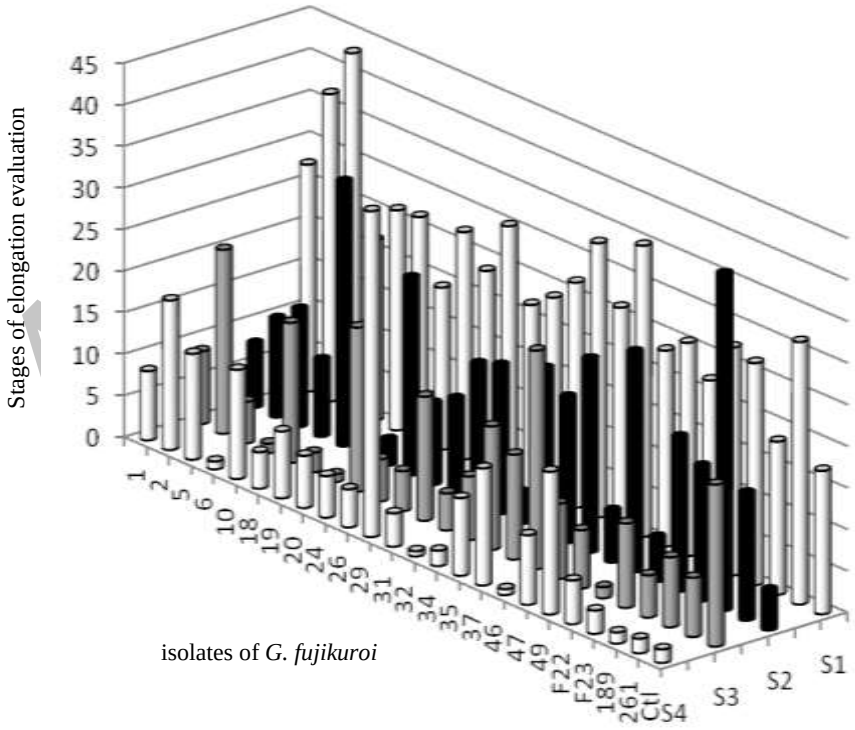
طبق نظر Gerlach & Nirenberg (1982) گونه *F. verticillioides* قادر به تولید هورمون جیبرلین نیست بنابراین تعیین میزان تولید هورمون جیبرلین تنها در جدایه‌های گونهٔ *F. fujikuroi* صورت گرفت. نتایج حاصل از روش اسپکتروفتومتری نشان داد، همهٔ جدایه‌های قارچ *F. fujikuroi* قادر به تولید هورمون جیبرلین می‌باشند. نتایج تخمین کمّی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)[1] نیز

1. High Performance Liquid Chromatography

Archive of SID

www.SID.ir

علاوه بر تأیید این نتیجه، مقدار دقیق جیبرلین تولیدی توسط هر جدایه را تعیین کرد (شکل ۲). بالاترین میزان تولید هورمون جیبرلین در محیط CD-broth توسط جدایه G10 به میزان ۱/۲ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین مقدار آن توسط جدایهٔ شمارهٔ G261 به میزان ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر بوده است. اگر فرض بر این گذاشته شود که مقدار هورمونی که قارچ بعد از تزریق به داخل گیاه سنتز (ساخت) می‌کند برابر با همان مقدار هورمونی باشد که قارچ در محیط اختصاصی و در شرایط بهینه ایجاد می‌کند، باز هم این مقدار هورمون در حدی نیست که بتواند علائم افزایش رشدی را به یک میزان در همهٔ ساقهٔ نشاءها ایجاد کند، زیرا شدت بیماری‌زایی در جدایه‌هایی که تولید هورمون جیبرلین بیشتری دارند، نسبت به جدایه‌هایی که هورمون کمتری تولید می‌کنند، به یک نسبت ثابت تغییر نمی‌کند. Sunder & Satyavir (1998) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، جدایه‌های *F. moniliforme* در تولید کردن GA3 در کشت مایع بسیار متنوع هستند. طبق نظر برخی محققان که آزمایش‌هایی روی تأثیر این هورمون بر افزایش رشد طولی گیاه نخودفرنگی انجام دادند، جیبرلیک اسید در غلظت‌هایی بین ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (mg/l) به میزان بسیار زیادی رشد طولی را در گیاهان سالم پاکوتاه نخودفرنگی تحریک می‌کند اما تأثیر کمی در نخود فرنگی‌های آلاسکا (غیر پاکوتاه) داشته و یا بدون تأثیر بوده است (Taniamoto *et al*., 2006). در این تحقیق برای وادار کردن قارچ مورد نظر به تولید حداکثر هورمون جیبرلین از محیط کشت اختصاصی با شرایط خاص استفاده شد، اما ممکن است مواد دیگری نیز در عصارهٔ قارچی حاصل وجود داشته باشند. شرایط استخراج برخی از جیبرلین‌ها از عصارهٔ قارچ *G. fujikuroi* از جمله GA_3، GA_4 و GA_7 تا حدودی مشابه است، بنابراین وجود این مواد در مادهٔ خشک نهایی اجتناب‌ناپذیر است. جیبرلین‌های GA_3 و GA_7/GA_4 اثر متفاوتی در گیاه دارند (Vandamme, 1989)، در این تحقیق به دلیل تفکیک نشدن جیبرلین‌ها در محصول نهایی، از اثرگذاری‌های احتمالی آن‌ها چشم‌پوشی شد.



شکل ۱. میانگین قدکشیدگی ساقه هر تیمار نسبت به شاهد در چهار مرحلهٔ ارزیابی ارتفاع بوته. مراحل ارزیابی شامل: S_1: مرحلهٔ اول ارزیابی ارتفاع ساقه، S_2: مرحلهٔ دوم ارزیابی ارتفاع ساقه، S_3: مرحلهٔ سوم ارزیابی ارتفاع ساقه، S_4: مرحلهٔ چهارم ارزیابی ارتفاع ساقه.

Figure 1. Means of elongation of the stem in comparison of four evaluation stages of plant length. S_1: the first stage of evaluation, S_2: the second stage of evaluation, S_3: the third stage of evaluation, S_4: Fourth stage of evaluation.

www.SID.ir

جدول ۲. مقایسهٔ میانگین درصد افزایش رشد ساقه در هر تیمار در چهار مرحلهٔ ارزیابی و میزان جیبرلین تولید شده توسط هر جدایه (برحسب ppm)

Table 2. Comparison between the average increase in rice stem growth (%) of treatments in four evaluation stages and amount of gibberellins hormone produced by each isolate (ppm)

Isolates	First stage	Second stage	Third stage	Fourth stage	Gibberellin (ppm)
G1	27.32^{a}	7.93^{cde}	8.75^{a}	8.30^{bcdef}	499.96
G2	36.98^{a}	11.83^{bcde}	22.13^{a}	17.99^{abc}	73.02
G5	43.06^{a}	14.11^{bcde}	9.15^{a}	12.72^{bcde}	785.98
G6	21.68^{a}	9.20^{bcde}	1.126^{a}	0.92^{ef}	646.70
G10	26.47^{a}	31.81^{ab}	16.82^{a}	13.32^{bcdef}	1249.87
G18	26.82^{a}	11.05^{bcde}	2.36^{a}	4.37^{bcdef}	593.55
G19	19.48^{a}	3.09^{e}	0.93^{a}	8.04^{def}	201.71
G20	27.33^{a}	23.73^{abcd}	19.75^{a}	6.27^{bcdef}	776.21
G24	23.82^{a}	9.78^{bcde}	5.05^{a}	3.80^{bcdef}	666.75
G26	30.37^{a}	11.50^{bcde}	4.80^{a}	4.56^{bcdef}	767.55
G29	22.05^{a}	16.86^{bcde}	14.91^{a}	39.19^{a}	593.35
G 31	24.10^{a}	17.85^{bcde}	4.45^{a}	4.01^{bcdef}	1042.68
G32	27.07^{a}	3.67^{e}	7.64^{a}	0.61^{f}	753.38
G34	32.97^{a}	19.79^{abcde}	14.83^{a}	1.84^{def}	688.20
G 35	26.38^{a}	17.51^{bcde}	12.60^{a}	9.33^{bcdef}	940.11
G37	34.99^{a}	23.25^{abcd}	26.27^{a}	14.06^{bc}	869.19
G46	23.54^{a}	6.19^{cde}	9.01^{a}	0.71^{f}	877.44
G47	25.63^{a}	26.44^{abc}	6.98^{a}	8.36^{bcdef}	1034.21
G 49	22.27^{a}	5.31^{de}	1.33^{a}	17.15^{ab}	462.70
Fu22	27.40^{a}	17.54^{abcde}	10.15^{a}	5.24^{bcdef}	844.27
Fu23	26.69^{a}	16.18^{bcde}	5.07^{a}	2.80^{cdef}	175.77
G189	18.40^{a}	44.44^{a}	8.82^{a}	1.33^{ef}	109.16
G261	31.55^{a}	15.27^{bcde}	6.42^{a}	1.73^{def}	52.40
Ctl	17.22^{a}	4.79^{e}	19.47^{a}	1.62^{ef}	---------

شکل ۲. نتایج تخمین کمّی میزان هورمون جیبرلین با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی در هر جدایه از قارچ *F. fujikuroi* برحسب ppm

Figure 2. Results of quantitative determination of gibberellin hormone produced by using each isolates of *F. fujikuroi* (ppm) HPLC method

نتایج آزمون هم‌بستگی افزایش رشد ساقه پس از مایه‌زنی در برنج و مقدار کمّی هورمون جیبرلین

تاکنون در کشور آزمونی مبنی بر درک تأثیر هورمون جیبرلین موجود در قارچ *F. fujikuroi* در بیماری‌زایی قارچ انجام نشده است. بنابر نتایج، رابطهٔ بین درصد افزایش ارتفاع ساقهٔ ایجادشده توسط جدایه‌های قارچ *F. fujikuroi* در گیاه برنج و میزان تولید هورمون جیبرلین توسط هر جدایه از قارچ گویای این مطلب است که در هیچ‌کدام از چهار مرحلهٔ ارزیابی، بین این شاخص‌ها هم‌بستگی معنی‌داری وجود ندارد. نتایج بررسی Voigt *et al.* (1994) که درزمینهٔ تغییرپذیری گونهٔ *G. fujikuroi* و گونه‌های همکار با آن در ایجاد بیماری باکانه انجام شد، نشان داد، جیبرلین‌ها در این قارچ به‌عنوان عامل بیماری‌زایی (ویرولنس) مطرح می‌باشند و درجهٔ بیماری‌زایی به مقدار جیبرلین‌ها بستگی دارد (Voigt *et al.*, 1994). همچنین

www.SID.ir

Takenaka *et al.* (1992) در تحقیقی که روی مقاومت جدایه‌های مزرعه‌ای قارچ *G. fujikuroi* به قارچ‌کش‌های تریفلومیزول و پفرازوئیت انجام دادند به این نتیجه رسیدند، جدایه‌هایی که حساسیت کمتری نسبت به این قارچ‌کش‌ها داشتند، بیماری‌زایی کمتری در گیاهان ایجاد می‌کنند که این حالت احتمالاً به دلیل تولید کمتر جیبرلین‌ها است. در این تحقیق عدم دستیابی به رابطهٔ معنی‌دار بین مقدار هورمون جیبرلین و بیماری‌زایی بیمارگر می‌تواند ناشی از تفاوت در محیطی باشد که آزمایش بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی و جداسازی هورمون جیبرلین از آن‌ها در آن انجام شده است، زیرا مقدار هورمون جیبرلین در محیط کشت سنتتیک اندازه‌گیری شده است، درحالی‌که گیاه در محیط خاکی (گلخانه) است و این‌که آیا تأثیرش بعد از تزریق عصارهٔ قارچی به گیاه به همین میزان است یا خیر، کار قضاوت در این مورد را مشکل می‌کند. Sunder & Satyavir (1998) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، همهٔ جدایه‌های قارچ *F. fujikuroi* عامل ایجاد کشیدگی طول ساقه نیستند. برخی از گیاهان دچار زردی شده و یا پاکوتاه ماندند و برخی از گیاهان مورد آزمایش در مراحل انتهایی علائم کشیدگی را بروز دادند. برخی از گیاهان آلوده‌شده تا زمان بلوغ عادی به نظر می‌رسند اما بعداً دانه‌های خالی و تغییر رنگ داده تولید می‌کنند. این علائم کاملاً با علائم ایجادشده توسط جدایه‌های تحقیق کنونی مطابقت دارد. Kurosawa (1926) دانشمند ژاپنی در نتایج بررسی‌های خود نشان داد، مایع صافی ضدعفونی شده از محیط کشت این قارچ قادر است باعث ایجاد تحریک رشد مشخص به همان اندازه در نشاءهای برنج بدون آلودگی قارچی شود (Vandamme, 1989; Kurosawa, 1926) اما در این رابطه Ou (1985) معتقد است اگرچه که صافی‌های محیط‌های کشت قارچ قادر به القاء علائم باکانه در نشاءهای برنج هستند، این پدیده در میان جدایه‌های بیمارگرهای باکانه معمول نیست (Ou, 1985) که نشان‌دهندهٔ تغییرپذیری در تولید GA3 است.

در این تحقیق جدایه‌های متفاوت، سطوح بیماری‌زایی متفاوتی را نشان دادند. به‌طورمعمول شدت بیماری هنگامی‌که غلظت‌های بالاتری از اینوکلوم (مایه) به‌کاربرده شود، بیشتر می‌شود (Ahmed *et al.*, 1986) و توقف بیماری به میزان کم یا زیاد به بیماری‌زا بودن هر جدایه بستگی دارد (Zainudin *et al.*, 2008b). Zainudin *et al.* (2008b) در نتایج بررسی‌های خود اظهار کردند، هنگامی‌که غلظت هورمون جیبرلین در گیاه از حد عادی بیشتر شود باعث بروز علائم افزایش طول غیرعادی می‌گردد. همچنین Ahmed *et al.* (1986) گزارش کردند، افزایش بیشتر کشیدگی ساقهٔ برنج هنگامی‌که اینوکلوم با غلظت conidia/ml $۳/۱\times۱۰^{۴}$ تزریق گردد اتفاق می‌افتد و بالاترین حد آن هنگامی است که غلظت اینوکلوم conidia/ml $۱/۲۵\times۱۰^{۵}$ باشد. آن‌ها به این نتیجه رسیدند، اگر سطح اینوکلوم کمتر از این غلظت‌ها باشد کشیدگی غیرعادی اتفاق نمی‌افتد. ازآنجایی‌که در این تحقیق غلظت سوسپانسیون اسپوری تزریق‌شده به ساقهٔ برنج بیشتر از مقداری است که Ahmed *et al.* (1986) در نتایج کار خود بیان کرده‌اند، می‌توان گفت که در غلظت‌های بیشتری از سوسپانسیون قارچ، احتمالاً قدرت بیماری‌زایی نمود بیشتری پیدا می‌کند و قبل از بروز قدکشیدگی در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ، شاهد ظهور علائم پوسیدگی در ناحیهٔ طوقه بودیم. Desjardins *et al.* (2000) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، محدودهٔ وسیعی از آلودگی برنج با تیپ‌های آمیزشی غیر تولیدکنندهٔ جیبرلین (*G. fujikuroi* MP-D) و تیپ‌های آمیزشی تولیدکنندهٔ جیبرلین از گونهٔ پیچیدهٔ *G. fujikuroi* اتفاق می‌افتد. همچنین همان‌طور که بیان شد این قارچ تولید چندین توکسین می‌کند، این موضوع که این توکسین‌ها چگونه فعالیت خود را در گیاه برنج آغاز کرده و تأثیر علائم آن‌ها چگونه است، نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. شرایط مناسب برای بیماری‌زایی عامل بیماری دمای بالای ۳۰ درجهٔ سلسیوس است درحالی‌که دمای مناسب برای تولید هورمون جیبرلین ۳۰ درجهٔ سلسیوس است. محدودهٔ pH مناسب برای تولید برای هورمون جیبرلین توسط قارچ ۴/۵ تا ۳/۵ است، درحالی‌که نمی‌توان با اطمینان گفت که همهٔ این شرایط برای

Archive of SID

www.SID.ir

تولید و فعالیت هورمون بعد از تزریق درون گیاه برنج فراهم بوده است. در نتایج بررسی دیگری که توسط Bashyala *et al.* (2016) در رابطه با سنجش میزان هورمون جیبرلین در گیاهان آلودهٔ برنج انجام گرفت، بیان کردند که محتوای جیبرلیک اسید جدایه‌های قارچ با علائم قد کشیدگی در بیماری باکانه هم‌بستگی مثبت داشت (r=۰/۷۹). آنان همچنین اعتقاد دارند، علائم قد کشیدگی بیماری به خاطر محتوای جیبرلیک اسید بیمارگر تولید می‌شود، هرچند که برخی دیگر از متابولیت‌ها به همراه فوزاریک اسید ممکن است مسئول نشانه‌های پوسیدگی باشند. با توجه به نتایج، در هیچ‌کدام از مراحل اندازه‌گیری ارتفاع ساقه نسبت به شاهد، همبستگی بین شدت بیماری‌زایی با مقدار کمّی هورمون جیبرلین مشاهده نشد. بنابراین می‌توان استنباط کرد که ارتباط مستقیم بین سنتز جیبرلین و بروز علائم بیماری در نشاهای برنج وجود ندارد. آزمون‌های بیماری‌زایی وسیع‌تر در تولید علائم پیچیدهٔ بیماری باکانه و ارتباطشان با میزان هورمون جیبرلین تولیدشده در قارچ عامل بیماری ضروری به نظر می‌رسد. ازآنجایی‌که Zainudin *et al.* (2008a) نیز معتقدند میزان تولید هورمون جیبرلین در گیاهان آلوده‌شده بیشتر است. لذا پیشنهاد می‌شود در آزمایشی مشابه، میزان جیبرلین و نیز فوزاریک اسید موجود در گیاهان آلوده‌شده بعد از تلقیح با قارچ، سنجیده شود.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به شواهد و نتایج به‌دست‌آمده از این آزمون‌ها می‌توان گفت هورمون جیبرلین باعث افزایش رشد در گیاهان آلوده‌شده و در این تحقیق جدایه‌های مورد بررسی از جهت درصد افزایش ارتفاع ساقهٔ برنج متفاوت بودند، اما به‌احتمال یکی از علل عدم درک رابطه بین میزان هورمون جیبرلین تولیدشده در جدایه‌های قارچ و افزایش ارتفاع ساقهٔ برنج، میزان اینوکلوم اولیهٔ مورد استفاده در مرحلهٔ تزریق به گیاه است. هنگامی اینوکلوم اولیه زیاد باشد گیاه برنج به‌سرعت می‌میرد بنابراین فرصتی برای تولید هورمون و تأثیر آن بر رشد گیاه باقی نمی‌ماند، درحالی‌که اگر میزان اینوکلوم اولیه در میزبان کم باشد بیماری با سرعت خیلی کمتر و ابتدا هم با قدکشیدگی در گیاه ظاهر می‌شود و پس از آن منجر به زردی و سپس توقف رشد شده و درنهایت به مرگ گیاه ختم می‌شود. مسلم است که قدرت بیماری‌زایی بیمارگر و مواد تولیدی ناشی از آن، تأثیر شرایط محیطی در سنتز هورمون جیبرلین در گیاه و چگونگی ارتباط آن‌ها با عمل هورمون جیبرلین در میزبان، در پدیدهٔ بیماری‌زایی نقش دارند و ممکن است تفکیک تأثیر هرکدام از این مجموعه به‌آسانی میسر نباشد و با کم‌رنگ شدن تأثیر هر یک از آن‌ها در شرایطی، بارزتر شدن تأثیر یکی دیگر مثل هورمون جیبرلین را در پی داشته باشد.

Archive of SID

REFERENCES

1. Ahmed, H. U., Mia, M. A. T. & Miah, S. A. (1986). Standardized test tube inolulation for bakanae disease (Bak). *International Rice Researsh Notes*, 11, 21-22.
2. Amoah, B. K., Rezanoor, H. N., Nicholson, P. & MAC-Donald, M.V. (1995). Variation in *Fusarium* section Liseola: pathogenicity and genetic studies of *Fusarium moniliforme* Sheldon from different hosts in Chana. *Plant Pathology*, 44, 563-572.
3. Bashyal, B. M. & Aggarwal, R. (2013). Molecular identification of *Fusarium* spp. associated with bakanae disease of rice in India. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 83, 72-77.
4. Bashyal, B. M., Aggarwal, R., Sharma, S., Gupta, S. & Singh, U. B. (2016). Single and combined effect of three Fusarium species associated with rice seeds in the severity of bakanae disease of rice. *Journal of Plant Pathology*, 98 (2), 405-412.
5. Berrios, J., Illanes, A. & Aroca, G. (2004). Spectrophotometric method for determining Gibberellic acid in fermentation broths. *Biotechnology of Letters*, 26, 67-70.
6. Bhalla, K., Sing, SH. B. & Agarwal, R. (2010). Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing *Fusarium* strains. *Environmental Monitoring and Assessment*, 167, 515-520.
7. Desjardins, A. E., Manandhar, H. K., Plattner, R. D., Manandhar, G. G., Poling, S. M. & Maragos, C. M. (2000). *Fusarium* species from Nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (3), 1020-1025.
8. Ergun, N., Topcuglu, F. & Yildiz, A. (2002). Auxin (Indole-3-acetic acid), Gibberellic acid (GA_3), Abscisic acid (ABA) and cytokinin (zeatin) production by some species of mosses and lichens. *Turkish Journal of Botany*, 26, 13-18.

www.SID.ir

9. Gerlach, W. & Nirenberg, H. I. (1982). *The Genus Fusarium-a Pictorial atlas*. Berlin.
10. Gomez, K. A. & Gomez, A. A. (1989). *Statistical procedure for agricultural research*. International Rice Research Institute (IRRI), Philippines.
11. Hori, S. (1898). Some observation on "bakanae" disease of rice plant. *Memory of Agricultural Station Research. Tokyo*, 12 (1), 110-119.
12. Hosein nejad, A. (2007). *Study on the sensitivity of Fusarium isolates, casual agents of rice bakanae and foot rot disease to fungicides and using RAPD and PCR-RFLP to compare these isolates in Guilan province*. M.Sc. Thesis. University of Hamedan. (in Farsi)
13. Johnson, S. W. & Coolbaugh, R. C. (1990). Light-stimulated gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Plant Physiology*, 94, 1696-1701.
14. Kurosawa, E. (1926). Experimental studies on the filtrate of the casual fungus of the bakanae disease of the rice plant. *Transactions of the Natural History Society of Formosa*, 16, 213-227. (in Japanese of Botany, 3, 91)
15. Leslie, J. F. & Summerell, A. B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing.
16. Nirenberg. H. I. & O'Donnell, K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90, 434-458.
17. Ou, S. H. (1985). *Bakanae disease and foot rot. Rice Diseases*. C.A.B. Press.
18. Padasht-Dehkaei, F. (1993). *Study on rice foot rot (Gibberella fujikuroi) in Guilan province.* M.Sc. Thesis. University of Tehran. (in Farsi)
19. Rangaswamy, V. (2012). Improved production of gibberellic acid by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Microbiology Research*, 2(3), 51-55.
20. Saremi, H. (2005). *Fusarium, biology, ecology and taxonomy*. Iran: Jihad Daneshgahi Press, University of Mashhad. (in Farsi)
21. Sun, S. K. & Snyder, W. C. (1981). *The bakanae disease of the rice plant*. In P. E. Nelson, T. A. Tousson & R. J. Cook (Ed.), *Fusarium disease, biology and taxonomy*. (pp. 104-113). The Pennsylvania State University press.
22. Sunder, S. & Satyavir, S. (1998). Vegetative compatibility, biosynthesis of GA_3 and virulence of *Fusarium moniliforme* isolates from bakanae disease of rice. *Plant Plathology*, 47, 767-772.
23. Thakur, K. S. S. (1974). Role of gibberellic acid, fusaric acid and pectic enzymes in the foot root disease of rice. *Riso*, 23, 191-207.
24. Takenaka, M., Hayashi, K., Ogawa, T., Kimura, SH. & Tanaka, T. (1992). Lowered virulence to rice plants and decreased biosynthesis of gibberellins in mutants of *Gibberella fujikuroi* selected with Pefurazoate. *Journal of Pesticide Sience*, 17, 213-220.
25. Taniamoto, E., Yanagishima, N. & Masuda, Y. (2006). Effect of gibberellic acid on dwarf and normal Pea plants. *Physiologia Plantarum*, 20(2), 297-298.
26. Vandamme, E. J. (1989). *Biotechnology of Vitamins, Pigments, and growth Factors, part Fungal Gibberellin Production*. Elsevier Science Publisher Ltd.
27. Voigt, K., Schleier, S. & Brukner, B. (1994). Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics*, 27 (6), 528-535.
28. Wulff, E. G., Sorensen. J. L., Lubeck, M., Nielsen, K. F., Thrane, U. & Trop, J. (2000). *Fusarium* spp. *associated with rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity*. Retrieved Feb. 21, 2015, University of Copenhagen, from ewu@life.ku.dk/ http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20002135.
29. Zainudin, N. A. I., Razak, A. A. & Salleh, B. (2008a). Secondary metabolite profiles and mating population of *Fusarium* species in section Liseola associated with nakanae disease of rice. *Malaysian Journal of Microbiology*, 4 (1), 6-13.
30. Zainudin, N. A. I., Razak, A. A. & Salleh, B. (2008b). Bakanae disease of rice in Malaysia and Indonesia: etiology of the causal agent based on morphological, physiological and pathological characteristics. *Journal of Plant Protection Research*, 48 (4), 475-485.
31. Zainudin, N. A. I. & Salleh, B. (2010). Variability of *Fusarium* speices associated with bakanae disease of rice based on their virulence, vegetative and biological compatibilities. *Sydowia*, 62 (1), 89-104.

Archive of SID

www.SID.ir