

مطالعه فعالیت لیپوکسی ژناز و فنیل آمونیلایز در برنج تحت تنش قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف، باکتری آنتاگونیست و القاء کننده های مقاومت

مهدی رستمی^۱، سعید طریقی^۱، پرینا طاهری^۱ و حشمت اله رحیمیان^۲

۱- گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

مسئول مکاتبات: سعید طریقی، پست الکترونیک: starighi@um.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۱/۲۵

۶۱) ۵۹-۷۶

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۰۳

چکیده

القا مقاومت به بیمارگرها از جمله راه کارهای مقابله با تنش های زیستی در گیاهان می باشد. آنزیم های فنیل آلانین آمونیلایز و لیپوکسی ژناز از جمله آنزیم های دفاعی قابل القاء هستند که در پاسخ به تنش های زیستی، در گیاه تولید می شوند. این تحقیق با هدف بررسی اثر القاء کننده های زیستی (جدایه هایی از باکتری *Pseudomonas sp.* و شیمیایی (سیلیکات پتاسیم) بر میزان بیان با استفاده از Real time PCR و تولید آنزیم های فنیل آلانین آمونیلایز و لیپوکسی ژناز پس از ایجاد آلودگی گیاهچه برنج رقم فجر به عامل بیماری سوختگی غلاف انجام شد. نتایج آنالیز بیان ژن لیپوکسی ژناز در زمان های صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ایجاد آلودگی نشان داد که حداکثر بیان ژن در کلیه ترکیبات تیماری در ۷۲ ساعت بعد از آلودگی گیاه مشاهده شده ولی ترکیب باکتری آنتاگونیست و ماده القاء کننده سیلیکات پتاسیم در مقایسه با دیگر ترکیبات تیماری در ۶ ساعت اولیه آلودگی بیشترین میزان بیان را برای دو آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز و لیپوکسی ژناز داشتند. آنالیز میزان بیان ژن ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ نیز نشان داد که استفاده از ترکیبات تیماری در بازه زمانی صفر تا ۶ ساعت اولیه آلودگی، سبب افزایش معنی دار در میزان پروتئین شدند که این تفاوت در ترکیب تیماری باکتری آنتاگونیست و ماده القاء کننده سیلیکات پتاسیم برای آنزیم لیپوکسی ژناز بیشتر از فنیل آلانین آمونیلایز بود. افزایش بیان این ژن ها با افزایش میزان فعالیت آنزیم های متناظر ارتباط مستقیم داشت که نشان دهنده نقش مستقیم ژن های دفاعی در فعالیت های سیستم دفاعی گیاه است که با کاربرد سیلیکات پتاسیم و باکتری آنتاگونیست و القاء کننده در گیاه می توان میزان بیان آن ها را افزایش داد.

واژه های کلیدی: مواد القاء کننده مقاومت، *Rhizoctonia solani*، برنج.

مقدمه

نواحی معتدله و گرمسیری مناطق کشت برنج است (Zuo et al., 2006). این بیماری یکی از مخرب ترین و گسترده ترین بیماری برنج بوده و محدودیت های عمده ای را در کاشت و تولید متراکم برنج بدنبال معرفی ارقام برنج نیمه کوتاه، با عملکرد بالا ایجاد نموده است (Kalpana et al., 2006). بیماری باعث ایجاد ۶۰ درصد خسارت به محصول و کاهش عملکرد دانه می شود (Groth, 2008; Bernardes et al., 2009). طیف میزبانی این بیماری بسیار وسیع میباشد و تاکنون هیچ منبع مقاومت قابل توجهی در مقابل این قارچ گزارش نشده است. تعاملات پاتوژن-گیاه، شبکه پیچیده ای از وقایع

گیاهان به طور مداوم توسط مجموعه ای از بیمارگرها تهدید می شوند. آن ها در مقابل بیمارگرها از طریق مکانیسم های پیچیده مقاومت با ارائه مقاومت ساختاری یا مقاومت القایی دفاع می کنند (Van Bockheven et al., 2013). برنج (*Oryza sativa L.*) محصولی است که حدود دو سوم کالری مورد نیاز مردم آسیا از آن تأمین شده و از غذاهای اصلی مردم ایران نیز می باشد (Gorbani et al., 2011). بیماری سوختگی غلاف، ایجاد شده توسط *Rhizoctonia solani* Kuhn (teleomorph: *Thanatephorus cucumeris*)، یک بیماری اصلی و مهم برنج در بیشتر

فعال می‌نماید و مانند اسید سالیسیلیک و اتیلن نقش مهمی در انتقال پیام دارد (Fauteux et al., 2005). کاربرد سیلیکون قبل از کاشت به صورت بذریه مالی میزان بیماری پژمردگی باکتریایی گوجه فرنگی ناشی از باکتری *Ralstonia solanaceum* (Smith) Yabuuchi et al. را از طریق افزایش بیان ژن‌های مرتبط به دفاع در گیاه کاهش داد (Fauteux et al., 2005). همچنین کاربرد سیلیکون باعث افزایش بیان ژن‌های دفاعی از جمله بتاگلوکان و انزیم‌های اکسیداز شد (Fauteux et al., 2005). افزایش مقاومت به بیماری بلاست برنج هنگامی که با سیلیس تیمار شده بودند باعث تراکم بیشتر سلول‌های سیلیسی شده در سلول‌های اپیدرم برگ شدند و با تشکیل یک لایه ضخیم سیلیکا در زیر کوتیکول، باعث ایجاد یک مانع فیزیکی از نفوذ *Pyricularia oryzae* Cavara به داخل گیاه می‌شود (Kim et al., 2002). Schurt و همکاران (۲۰۱۴) مشخص نمودند که افزایش فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیاز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیدازها و کیتینازها در غلاف برگ برنج که با محلول سیلیکون در غلظت ۲ میلی مولار تیمار شده بود، موجب کاهش پیشرفت لکه های سوختگی غلاف توسط *R. solani* به میزان ۳۴/۲ گردید (Schurt et al., 2014). همچنین Zhang و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمودند، استفاده از غلظت ۱/۵ میلی مولار سیلیکون باعث بهبود مقاومت برنج به سوختگی غلاف *R. solani* شد (Zhang et al., 2013). افزایش غلظت فنول‌ها، لیگنین‌ها و فیتوالکسین‌ها، همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط با دفاع مانند (کیتیناز، بتا-۱، ۳-گلوکاناز و فنیل آلانین آمونیا لیاز) و القاء سریع و قوی ژن‌های مرتبط با دفاع میزان در برابر بیمارگرها، مکانیسم‌های بیوشیمیایی هستند که در اثر سیلیس در برنج تقویت شده یا افزایش می‌یابند (Rodrigues et al., 2003, 2004, 2005; Liang et al., 2006; Brunings et al., 2009). نشان داده است که شدت بیماری کمتر در گیاهان تیمار شده با سیلیکون مربوط به فعالیت بالاتر آنزیم‌های حفاظتی است. همچنین ثابت شده است که در برگ‌های گیاه، سیلیکون تجمع آنزیم‌های مرتبط به دفاع را پس از عفونت

مولکولی و سیتولوژیکی می‌باشد که تعیین کننده دامنه بین حساسیت و مقاومت بوده و در سال‌های اخیر، در خصوص درک مکانیسم‌های پیچیده دفاعی گیاه در پاسخ به عوامل بیماری‌زا توجه زیادی شده است. تجمع سریع پروتئین‌های کدشده میزبانی، به عنوان پروتئین‌های دارای فعالیت ضد قارچی در تعاملات مختلف بیمارگر-میزبان شناسایی شده است (Van Loon et al., 2006). فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) به عنوان آنزیم اصلی مسیر فنیل پروپانوئید محسوب می‌شود، سطح فعالیت PAL کلیدی برای کنترل سنتز فنیل پروپانوئیدها و در نهایت، سنتز لیگنین می‌باشد. این مکانیسم دفاعی برای محافظت در مقابل حملات بیمارگر استفاده می‌شود. بنابراین PAL تبدیل به یکی از گسترده‌ترین آنزیم‌های مورد مطالعه در گیاهان شده و القاء PAL به عنوان پاسخ به آلودگی پاتوژن در تعاملات مختلف پاتوژن-گیاه ثبت شده است. لیپوکسیژناز (LOX) نیز می‌تواند به طور مستقیم به سیستم غشای گیاهی با یک روش غیر آنزیمی حمله کرده و فرآیند پراکسیداسیون لیپیدی غشا را فعال کند. علاوه بر این، متابولیت‌ها می‌توانند در پاسخ مقاومت به عنوان یک ماده ضد باکتری یا ماده مقاوم در برابر حشره مشارکت نمایند. استفاده از عوامل کنترل زیستی می‌تواند ضمن افزایش رشد گیاه، به عنوان القاء کننده بیان ژن‌ها و تولید آنزیم‌های حفاظتی نقش مهمی داشته و جایگزین مناسبی برای آفت کش‌های شیمیایی خطرناک برای محیط زیست باشد (Reshma et al., 2018). هنگامی که گیاه به طور مناسب تحریک شود، *Pseudomonas fluorescens* مقاومت را در گیاهان با تقویت فیزیکی دیواره سلولی همراه با ایجاد تغییراتی در واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی القاء می‌نماید. *P. fluorescens* همچنین باعث تولید آنزیم‌های مهم مرتبط با دفاع مانند پراکسیداز (PO)، پلی فنول اکسیداز (PPO) و فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) می‌شود (Reshma et al., 2018). علاوه بر این موارد، استفاده از موارد القاکننده مقاومت نیز تاثیر بسزایی در افزایش مقاومت گیاه به بیماری خواهد داشت. مطالعات مولکولی و بیوشیمیایی نشان می‌دهد که سیلیکون بیان ژن‌های مرتبط با سیستم دفاعی را

مواد گیاهی و اعمال تیمار

در این تحقیق از عامل قارچی *R. solani* RBL1 به شماره دسترسی HM211085 در پایگاه مرکز اطلاعات ملی زیست فن آوری (NCBI)، با توان بالای بیماری زایی در برنج جهت مایه زنی گیاهچه‌ها، سیلیکات پتاسیم (غلظت ۲ میلی مولار) به عنوان القاء کننده شیمیایی مقاومت، یک جدایه *Pseudomonas* دارای خاصیت آنتاگونیستی جدایه از ریزوسفر برنج رقم طارم از روستای میله آمل (۲۷۵) و جدایه دیگر *Pseudomonas* جدایه از ریزوسفر برنج رقم هاشمی از روستای اجوار کلای آمل با خاصیت القاء کنندگی (۲۴۳) استفاده شد. ابتدا بذور رقم پرمحصول فجر، حساس به قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف ضد عفونی شده و پس از شستشوی سطحی با آب مقطر سترون، به مدت ۲۴ ساعت در سوسپانسیون باکتری جدایه‌های *Pseudomonas* قرار گرفتند. بذور جوانه دار شده در گلدان‌های حاوی خاک سترون کاشته شده و گیاهچه‌های ۲۸ روزه برای مایه زنی با قارچ و سایر تیمارها در نظر گرفته شده و تیمارهای آزمایش در شرایط گلخانه به شرح ذیل اعمال شدند (جدول ۱).

نمونه برداری از غلاف-برگ موضعی گیاهچه در زمان‌های صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت بعد از مایه زنی با قارچ عامل بیماری انجام و در هاون چینی محتوی ازت مایع خرد و بلافاصله به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند.

بررسی تغییرات بیان ژن با روش Real time-PCR

ژن Ubiquitin به عنوان ژن مرجع در محاسبه میزان بیان نسبی ژن‌ها انتخاب و آغازگرهای رفت و برگشت مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزارهای Vector NTI و primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000) و (Rychlik, 2007) طراحی شد (جدول ۲).

استخراج RNA از بافت برگ گیاه با استفاده از بافر RNX-Plus (شرکت سیناکلون) انجام گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراجی با استفاده از ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتوفتومتر بررسی شد. برای حذف آلودگی DNA از DNase I (Thermo Scientific) استفاده شد و سنتز رشته cDNA با استفاده از کیت SinaClon First Strand cDNA Synthesis (شرکت

قارچی تحریک می نماید (Fauteux et al., 2005; Datnoff, 2007; Van Bockhaven 2013; Manikandan & Raguchander (۲۰۱۴) گزارش نمودند که فرمولاسیون مایع *P. fluorescens* (Pfl) باعث کاهش بروز پژمردگی ناشی از بیماری فوزاریومی ریشه گوجه فرنگی شد و باعث تولید آنزیم‌هایی نظیر فنیل آلانین آمونیا لیاز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، کاتالاز، بتا ۱ و ۳ گلوکوناز و سوپراکسید دیسموتاز در گیاه گردید (Manikandan & Raguchander, 2014). Singh و همکاران (۲۰۱۶) گزارش نمودند که اســـــــترین هـــــــای *T. harzianum* UBSTH-501 و *P. fluorescens* PF-08 زمانی که به صورت جداگانه یا ترکیبی مورد استفاده قرار می گیرند، به طور معنی داری باعث افزایش قابل توجه تجمع زیست مولکول‌های مرتبط با دفاع و آنزیم ها شده که پتانسیل کنترل زیستی را در برابر *R. solani* نشان می دهند (Singh et al., 2016). Anita & Samiyappan (۲۰۱۲) بیان داشتند که فعالیت فنول، PAL، PO و کیتیناز در گیاهان مایه زنی شده با باکتری بالاتر بوده و همچنین Rusterucci و همکاران (۱۹۹۹) با شناسایی فعالیت بالای LOX در سلول های اطراف لکه های خشک در برگ بیان داشتند که مسیر پراکسید وابسته به LOX منجر به نکروز بافت در اثر واکنش فوق حساسیت می شود (Anita & Samiyappan 2012). Rusterucci et al., 1999) طاهری و طریقی (۲۰۰۹) بیان نمودند در برنج، مسیر سیگنال جاسمونیک اسید دارای نقش مهمی در ایجاد واکنشهای دفاعی و مقاومت علیه عوامل بیماری زای نکروتروف می باشد (Taheri & Tarighi, 2009).

هدف از این تحقیق بررسی فعالیت آنزیمی و تغییرات مقدار بیان ژن‌های *pal* و *lox* در نقاط زمانی پس از آلودگی با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برنج در ژنوتیپ حساس فجر و نیز تاثیر استفاده از سیلیکات پتاسیم و باکتری آنتاگونیست و القاء گر *Pseudomonas* sp. بر کاهش علائم بیماری بود.

مواد و روش‌ها

آزمون و تعمیم فعالیت آنزیم به میلی گرم، ابتدا پروتئین موجود در نمونه‌ها به روش برادفورد (۱۹۷۶) استخراج شد (Bradford, 1976). هر نمونه سه بار قرائت شده و منحنی استاندارد پروتئین با استفاده از محیط اکسل رسم و فرمول منحنی به دست آمد. مطالعه بررسی آنزیم آنتی اکسیدانت لیپوکسیژناز و فنیل آمونیا لیاز در دو تکرار بیولوژیک انجام شد. ارزیابی فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز به روش Doderer و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد که در آن کارایی آنزیم بستگی به تفکیک اسید چرب (اسید لینولیک) دارد. جذب محلول در طول موج ۲۳۴ نانومتر به مدت ۱۰ دقیقه هر یک دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه ثبت و فعالیت آنزیم بر حسب یک واحد (میکرومول سوپسترا اکسید شده در دقیقه) به ازای میلی گرم پروتئین محاسبه شد (Doderer, 1992). ارزیابی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز به روش Polanco و همکاران (۲۰۱۲) و Dickerson و همکاران (۱۹۸۴) انجام شد (Polanco et al., 2012; Dickerson et al., 1984). جذب محلول در ۲۹۰ نانومتر اندازه گیری شد. ضریب اکسیداسیون برای ترانس سینامیک اسید $9630 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه شد. میزان فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیاز بر حسب نانو مول ترانس سینامیک اسید بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

سیناکلون) و طبق دستورالعمل آن انجام گرفت. نمونه cDNA سنتز شده برای انجام تمام واکنش‌ها در حجم ۱.۳ رقیق شد. مطالعه بیان ژن با استفاده از دستگاه C1000™ Thermal SYBR Green I PCR و Cycloer (Bio-Rad, USA) و کیت SYBR Green I PCR Master Mix (Termo Scientific, USA) در سه تکرار مستقل انجام گرفت. شرایط بهینه برای اجرای واکنش در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل SYBR Green به مقدار ۵ میکرولیتر، آغازگر رفت و برگشت ۰/۳ میکرولیتر، نمونه cDNA ۲ میکرولیتر و آب عاری از نوکلئاز ۲/۷ میکرولیتر فراهم گردید. چرخه دمایی برای تکثیر نمونه‌ها به این ترتیب استفاده شد که ۹۵ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه، ۹۵ درجه سلسیوس برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۵ ثانیه در ۴۰ سیکل چرخه تکرار شد. آنالیز منحنی ذوب نمونه‌ها بررسی شده و آنالیز کمی داده‌های مربوط به میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001) در نرم افزار Microsoft Excel 2010 انجام گرفت.

مطالعات آنزیمی و بیوشیمیایی مرتبط با مسیرهای دفاعی گیاه

جهت محاسبه فعالیت اختصاصی آنزیم های مورد

جدول ۱- تیمارهای اعمال شده در شرایط گلخانه بر روی گیاهچه‌ها

Table 1. Applied treatments on seedlings under greenhouse condition

Treatments	Code
Seed inoculation with antagonist bacteria (Isolate 275) and spraying of seedlings with the mention isolate suspension (275), 24 and 48 hours before inoculation with the <i>R. solani</i> .	Code 15
Seed inoculation with antagonist bacteria (Isolate 275) and spraying of seedlings with Potassium silicate (2 Mm) 3 days before inoculation with the <i>R. solani</i> and spraying of seedlings with the mention isolate suspension (275), 24 and 48 hours before inoculation with the <i>R. solani</i> .	Code 17
Seed inoculation with Inducer bacteria (Isolate 243) and soil drench with suspension of the Isolate 243, 2 and 5 days before inoculation with the <i>R. solani</i> .	Code 19
Seed inoculation with inducer bacteria (Isolate 243) and spraying of seedlings with Potassium silicate (2 Mm) 3 days before inoculation with <i>R. solani</i> and soil drench with suspension of the Isolate 243, 2 and 5 days before inoculation with <i>R. solani</i> .	Code 21
Seedlings inoculated with <i>R. solani</i> .	Code 22
Spraying of seedlings with Potassium silicate (2 Mm) as a chemical inducers 3 days before inoculation with <i>R. solani</i> .	Code 24
Seedlings without any spraying or inoculation seedlings with antagonistic/inducers bacteria or chemical inducers.	Code 26

جدول ۲- ژن های مرجع برای برنج و اطلاعات مربوط به پرایمرها

Table 2. Reference genes for rice and the primer information

Amplicon length (bp)	Primer sequence	Gene	Primer
145	5'-CTACCCCTTCAAGCCTCCAA-3' 5'-GCAGATCGAAAGCAACACCT-3'	Ubiquitin	<i>Ubc</i>
117	5'-GAAGAGGCTGTTTCATGCTCG -3' 5'-TCGTGCGGTGAGGAAGAAGAC -3'	Lipoxygenase	<i>Lox</i>
115	5'-ACATCGGCAAGCTCATGTTC-3' 5'-TTGAACCCGTAGTCCAAGCT-3'	Phenylamionialyse	<i>Pal</i>

تعیین شدت بیماری و شاخص کنترل بیماری

طول لکه بیماری روی گیاهچه پس از ۷ روز در تیمارهای مختلف اندازه گیری شد. سپس ارتفاع نسبی لکه به ارتفاع گیاهچه (RLH) اندازه گیری و شاخص اثربخشی تیمار روی کنترل بیماری (effectiveness control) محاسبه شد (Sharma et al., 1990).

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

جهت محاسبات آماری از نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ و برای مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

بررسی بیان ژن و فعالیت آنزیمی لیپوکسی ژناز پس از مایه زنی با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف (*R. solani*)

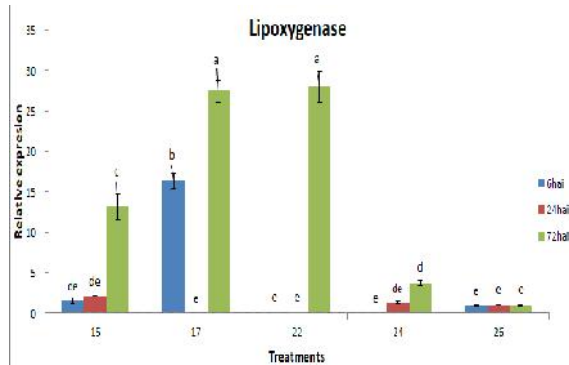
میزان بیان ژن لیپوکسی ژناز در کنترل مثبت (تیمار ۲۲) ۷۲ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر افزایش یافته و به حداکثر مقدار رسید. با استفاده از سیلیکات (تیمار ۲۴)، ۶ ساعت پس از مایه زنی با قارچ عامل بیماری شاهد کاهش بیان بوده ولی در ۲۴ ساعت بعد از مایه زنی، روند افزایش بیان ژن آغاز (۱۰/۳۰ برابر تیمار ۲۲) و بعد از ۷۲ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر این میزان بیان به حداکثر مقدار رسید. این تیمار (استفاده از سیلیکات) قادر بود ۴۸ ساعت زودتر از کنترل مثبت، بیان ژن لیپوکسی ژناز در گیاه را افزایش داد. ترکیب تیماری باکتری آنتاگونیست همراه با ماده القاء کننده (سیلیکات پتاسیم) سبب افزایش شدید بیان ژن ۶ ساعت بعد از مایه زنی شد (۱۶۴ برابر کنترل مثبت). اگرچه

میزان بیان ژن در زمان ۲۴ کاهش یافت ولی مجدداً بعد از ۷۲ ساعت، افزایش بیان بیشتری در مقایسه با زمان ۶ ساعت (۱/۶۷ برابر) مشاهده شد. این در حالی است که استفاده تنها از باکتری آنتاگونیست (تیمار ۱۵) اگرچه باعث افزایش بیان ژن در ساعات اولیه مایه زنی شده (۱۷/۸۸ برابر کنترل مثبت) و در ۷۲ ساعت بعد از مایه زنی به حداکثر مقدار خود رسید ولی این افزایش بیان ژن، کمتر از افزایش بیان ژن نسبت به ترکیب تیماری باکتری آنتاگونیست و ماده القاکنده بود. تیمار گیاهان فقط با استفاده از سیلیکات نیز اگرچه باعث افزایش بیان ژن لیپوکسی ژناز شد ولی این افزایش بیان در ساعات ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از مایه زنی بسیار کمتر از ترکیب تیماری باکتری آنتاگونیست همراه با ماده القاء کننده بود. تلفیق باکتری آنتاگونیست و ماده القاکنده سیلیکات باعث افزایش بالای بیان ژن لیپوکسی ژناز در مراحل اولیه آلودگی شده و مسیر پیام رسانی گیاه را فعال و توان گیاه را در جلوگیری از توسعه بیماری افزایش می دهد. میزان بیان ژن در استفاده از باکتری آنتاگونیست (تیمار ۱۵)، در زمان ۶ ساعت، ۱۶۱ برابر، در زمان ۲۴ ساعت، ۱/۵۴ برابر و در زمان ۷۲ ساعت، ۳/۵۱ برابر تیمار ماده القاکنده (سیلیکات پتاسیم) (تیمار ۲۴) بود (شکل ۲).

استفاده از باکتری القاکنده به صورت مجزا و نیز در ترکیب با ماده القاکنده، باعث افزایش بیان ژن لیپوکسی ژناز در ۷۲ ساعت بعد از مایه زنی شد. این افزایش در کاربرد مجزای باکتری القاکنده بسیار بیشتر از ترکیب آن با ماده القاکنده بوده و همچنین نسبت به کنترل مثبت (تیمار ۲۲) و تیمار ماده القاکنده (تیمار ۲۴) افزایش چشمگیری را نشان داد (شکل ۳).

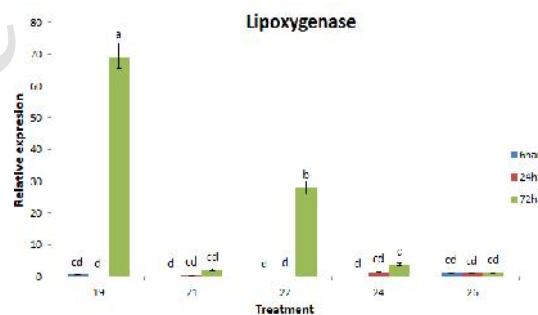
تولید آنزیم لیپوکسی ژناز نیز همانند بیان این ژن در گیاه با اعمال تیمارهای مختلف، تغییر نمود. میزان این آنزیم در گیاهان تیمار شده با عامل قارچ، نسبت به گیاهان شاهد (بدون اعمال تیمار) افزایش بیان (۲/۷۴ برابر) داشت. روند افزایشی تولید آنزیم از زمان ۶ ساعت شروع و در نقطه زمانی ۱۲ ساعت پس از مایه زنی بیمارگر به حداکثر مقدار خود رسید. پس از آن روند کاهشی تولید آنزیم در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت ادامه داشته و نهایتاً در نقطه زمانی ۷۲ ساعت مجدداً افزایش پیدا نمود (۴/۱۱ برابر شاهد منفی). افزایش سطح تولید آنزیم در دو نقطه زمانی ۱۲ و ۷۲ ساعت از لحاظ آماری معنی داری نداشتند. تیمار گیاهان با سیلیکات پتاسیم باعث افزایش تولید آنزیم لیپوکسی ژناز در آغاز مایه زنی گیاه در مقایسه با گیاهان شاهد منفی (۶/۲۲ برابر) شد. که این افزایش مقدار از لحاظ آماری معنی دار نبود. روند افزایشی تولید آنزیم در نقاط زمانی ۱۲ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر (۱/۲۰ برابر شاهد مثبت) و ۴۸ ساعت (۲/۷۸ برابر کنترل مثبت) به حداکثر مقدار خود رسید که نشان دهنده امکان افزایش تولید آنزیم لیپوکسی ژناز با استفاده از سیلیکات پتاسیم می باشد.

افشانه گیاهان با باکتری آنتاگونیست در ترکیب با سیلیکات پتاسیم سطح تولید آنزیم قبل از مایه زنی با قارچ عامل بیماری افزایش قابل توجه و معنی داری داشت که نشان از تاثیر قابل توجه این ترکیب در افزایش واکنش های دفاعی و القاء مقاومت در گیاه دارد. تولید آنزیم لیپوکسی ژناز، در زمان صفر (۱۵/۷۹ برابر شاهد منفی) (گیاه بدون اعمال تیمار) بوده و این روند افزایشی تولید آنزیم در نقاط زمانی ۱۲ ساعت (۳/۵۸ برابر شاهد مثبت) و ۷۲ ساعت (۵/۱۳ برابر شاهد مثبت) به حداکثر مقدار خود رسید. این افزایش مقدار، اختلاف آماری معنی داری با دیگر ترکیبات تیماری داشت. استفاده از تیمار باکتری آنتاگونیست نیز باعث افزایش معنی دار مقدار آنزیم لیپوکسی ژناز در ساعات اولیه اعمال تیماری نسبت به تیمارهای شاهد شد. این افزایش مقدار در ساعات دیگر نیز ادامه داشته و در ۷۲ ساعت به حداکثر مقدار خود رسید (شکل ۴).



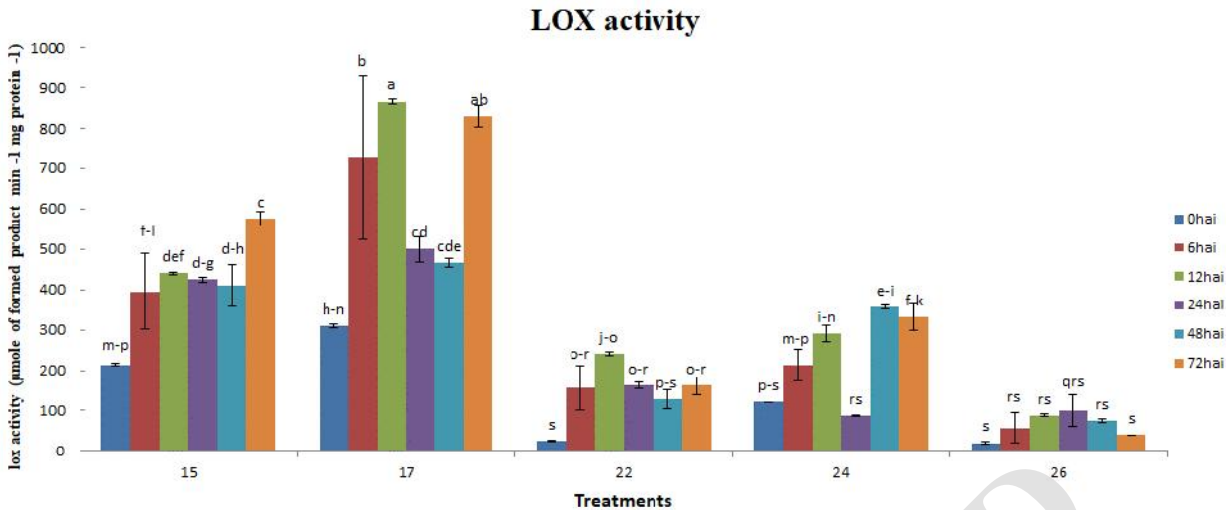
شکل ۱- بیان ژن لیپوکسی ژناز در نقاط زمانی ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف در تیمارهای ۱۵، ۱۷، ۲۲، ۲۴ و ۲۶ بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن، میانگین های دارای حروف مشابه در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی داری ندارند.

Fig. 1. Gene expression of Lipoxigenase at the time points of 6, 24, and 72 hours after inoculation with *R. solani*, the causal agent of sheath blight disease in treatments 15, 17, 22, 24 and 26. The means with the same letters are not significant at 5% level according to Duncan's test.



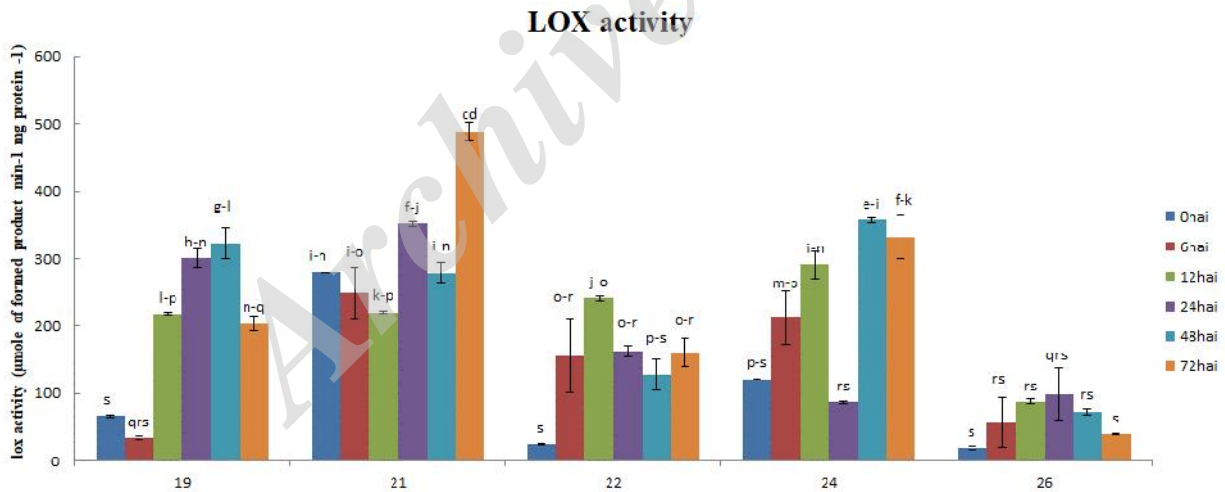
شکل ۲- بیان ژن لیپوکسی ژناز در نقاط زمانی ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف در تیمارهای ۱۹، ۲۱، ۲۲، ۲۴ و ۲۶ بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن، میانگین های دارای حروف مشابه در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی داری ندارند.

Fig. 2- Gene expression of Lipoxigenase at the time points of 6, 24, and 72 hours after inoculation with *R. solani*, the causal agent of sheath blight disease in treatments 19, 21, 22, 24 and 26. The means with the same letters are not significant at 5% level according to Duncan's test.



شکل ۳- فعالیت آنزیمی لیپوکسی ژناز در نقاط زمانی صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف در تیمارهای ۱۵، ۱۷، ۲۲، ۲۴ و ۲۶، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند.

Fig. 3. Enzymatic activity of Lipoxigenase at the time points of 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after inoculation with *R. solani*, the causal agent of sheath blight disease of rice in treatments 15, 17, 22, 24 and 26. The means with the same letters are not significant at 5% level according to Duncan's test.



شکل ۴- فعالیت آنزیمی لیپوکسی ژناز در نقاط زمانی صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف در تیمارهای ۱۹، ۲۱، ۲۲، ۲۴ و ۲۶، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی داری ندارند.

Fig. 4. Enzymatic activity of Lipoxigenase at the time points of 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after inoculation with *R. solani*, the causal agent of sheath blight disease of rice in treatments 19, 21, 22, 24 and 26. The means with the same letters are not significant at 5% level according to Duncan's test.

باشد. این رفتار گیاه در برخورد با تنش زیستی، مشابه با شرایط گیاه در برخورد با تنش در بیان ژن لیپوکسی ژناز بود (شکل ۶).

استفاده از باکتری القاکننده مقاومت باعث بروز تغییراتی در بیان ژن فنیل آمونیا لیاز شد که مشابه با تغییرات بیان ژن لیپوکسی ژناز بود. ۶ ساعت بعد از مایه زنی، بیان ژن افزایش یافته (۵/۵۷ برابر تیمار شاهد) و در ۷۲ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر به حداکثر مقدار خود (۲/۵۶ برابر تیمار شاهد) رسید. این تغییرات نشان دهنده موثر بودن باکتری القاکننده مقاومت در بیان ژن فنیل آمونیا لیاز می باشد (شکل ۷).

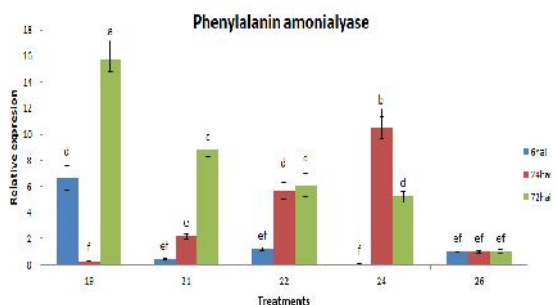
بررسی تولید آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز نشان داد که تیمارهای مختلف باعث بروز تغییر در بیان ژن می گردد. استفاده از سیلیکات پتاسیم در زمان صفر اختلاف معنی داری در تولید آنزیم فنیل آمونیا لیاز در مقایسه با شاهد منفی مشاهده نشد در حالی که در نقطه زمانی ۶ ساعت، تولید آنزیم افزایش معنی دار و قابل توجهی نسبت به شاهد مثبت نشان داده (۱/۵۲ برابر تیمار ۲۲) و به حداکثر مقدار خود در این تیمار رسید. حداکثر مقدار آنزیم در زمان ۷۲ ساعت از ترکیب تیماری باکتری آنتاگونیست و ماده القاکننده سیلیکات پتاسیم و نیز در زمان ۰ و ۶ ساعت از تیمار باکتری آنتاگونیست مشاهده شد که اختلاف معنی داری از لحاظ آماری با یکدیگر نداشته در حالی که با دیگر تیمارهای مورد مطالعه اختلاف معنی داری داشتند. اعمال این تیمارها باعث تولید آنزیم PAL در نقطه زمانی ۶ ساعت شده و می تواند به عنوان محرک سیستم دفاعی گیاه و القاء مقاومت با توجه به نقش آنزیم PAL در واکنش های دفاعی گیاه در ساعات اولیه آلودگی به بیمارگر باشد (شکل ۸).

اگرچه باکتری القاکننده به تنهایی نتوانست اختلاف معنی داری را در میزان آنزیم فنیل آمونیا لیاز نسبت به تیمار شاهد در زمان های مختلف ایجاد کند ولی ترکیب آن با سیلیکات پتاسیم در زمان های ۶ و ۱۲ ساعت بعد از مایه زنی باعث بروز افزایش قابل توجهی در مقدار آنزیم شده که این افزایش اختلاف معنی داری با دیگر تیمارها داشت (شکل ۹).

تولید آنزیم لیپوکسی ژناز در گیاه با کاربرد باکتری القاکننده و ترکیب تیماری آن با سیلیکات پتاسیم افزایش قابل ملاحظه ای داشت. به گونه ای که با شروع اعمال تنش، مقدار آنزیم در گیاه افزایش یافته و در کاربرد تیمار باکتری القاکننده، در ۴۸ ساعت بعد از مایه زنی به حداکثر مقدار خود (۲/۵۲ برابر کنترل مثبت) رسید. باکتری القاکننده در ترکیب با سیلیکات پتاسیم توانست باعث افزایش معنی دار سطح تولید آنزیم لیپوکسی ژناز در گیاه شود. این افزایش قابل توجه، از ساعات اولیه مایه زنی آغاز (۱۴/۳۰ برابر شاهد منفی و ۲/۳۰ برابر تیمار سیلیکات) و در ساعت ۷۲ به حداکثر مقدار خود (۳/۰۳ برابر شاهد مثبت) رسید (شکل ۵).

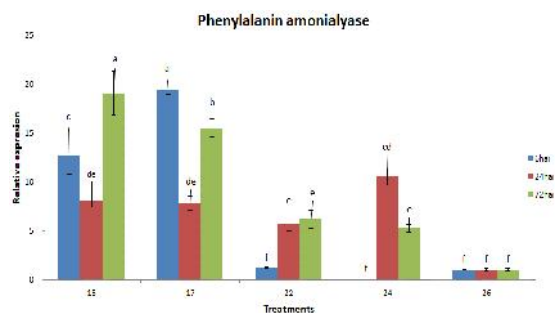
بررسی بیان ژن و فعالیت آنزیمی فنیل آمونیا لیاز پس از مایه زنی با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف (*R. solani*)

بررسی بیان ژن فنیل آمونیا لیاز نشان دهنده تغییر میزان بیان در ترکیبات تیماری مختلف می باشد. در تیمار گیاه با عامل بیماری (تیمار ۲۲)، روند افزایشی از ۶ ساعت تا ۷۲ ساعت بعد از مایه زنی مشاهده شد که نشان دهنده انجام فرآیند مقابله گیاه با عامل بیماری و علائم ناشی از مسیرهای پیام رسانی درک بیماری می باشد. با استفاده از سیلیکات پتاسیم (تیمار ۲۴)، فرآیند درک و مقابله با بیماری در مدت زمان کمتری صورت گرفته و در زمان ۲۴ ساعت بعد از مایه زنی به حداکثر مقدار (۱/۸۵ برابر تیمار ۲۲) می رسد. استفاده از باکتری آنتاگونیست بر روی گیاهان باعث شد تا در ساعات اولیه بعد از مایه زنی، بیان ژن فنیل آمونیا لیاز افزایش یافته که در قیاس با تیمار ماده القاکننده مقاومت (تیمار ۲۴) این افزایش در ساعات اولیه قابل توجه می باشد. این افزایش بیان در زمان ۲۴ ساعت کاهش یافته و سپس در زمان ۷۲ ساعت به حداکثر مقدار بیان می رسد. ترکیب تیماری باکتری آنتاگونیست و سیلیکات پتاسیم در قیاس با دیگر تیمارها، سبب افزایش بسیار بالای بیان ژن فنیل آمونیا لیاز در مراحل اولیه آلودگی به بیمارگر یعنی ۶ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر شد (۱۶/۲۶ برابر کنترل مثبت) که برای جلوگیری از توسعه عامل بیماری می تواند بسیار موثر



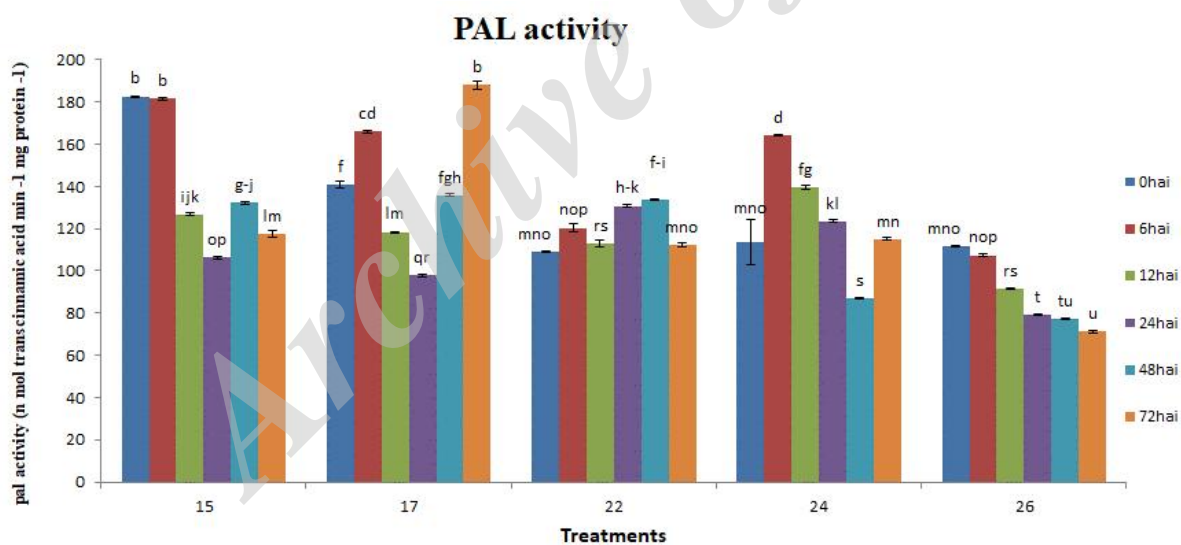
شکل ۶- بیان ژن فنیل آمونیا لیاز در نقاط زمانی ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف در تیمارهای ۱۹، ۲۱، ۲۲، ۲۴ و ۲۶، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی داری ندارند.

Fig. 6. Gene expression of phenylalanine ammonia lyase at the time points of 6, 24, and 72 hours after inoculation with *R. solani*, the causal agent of sheath blight disease in treatments 19, 21, 22, 24 and 26. The means with the same letters are not significant at 5% level according to Duncan's test.



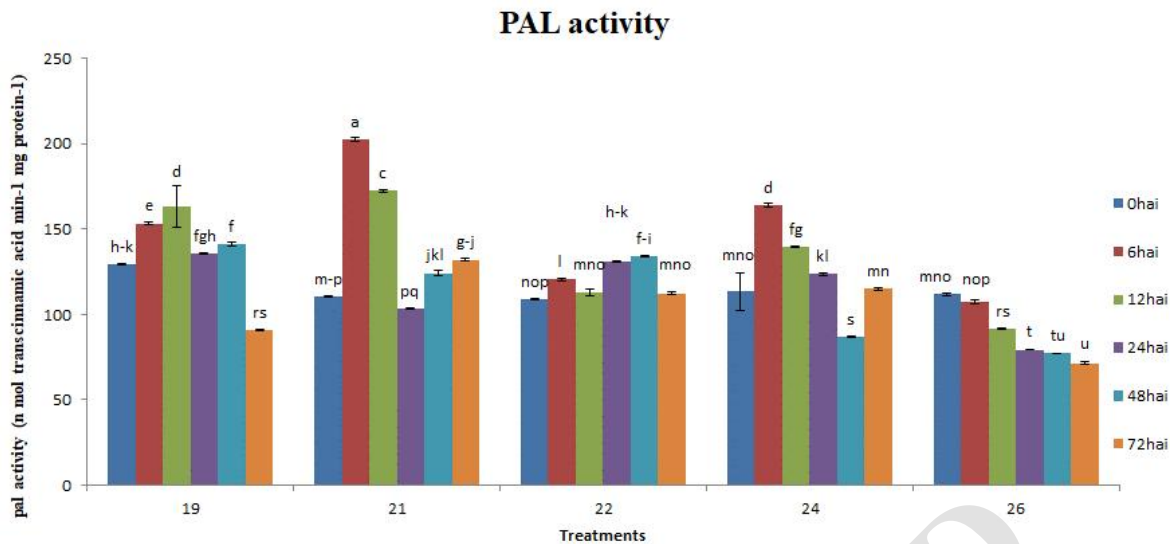
شکل ۵- بیان ژن فنیل آمونیا لیاز در نقاط زمانی ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف در تیمارهای ۱۵، ۱۷، ۲۲، ۲۴ و ۲۶، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی داری ندارند.

Fig. 5. Gene expression of phenylalanine ammonia lyase at the time points of 6, 24, and 72 hours after inoculation with *R. solani*, the causal agent of sheath blight disease in treatments 15, 17, 22, 24 and 26. The means with the same letters are not significant at 5% level according to Duncan's test.



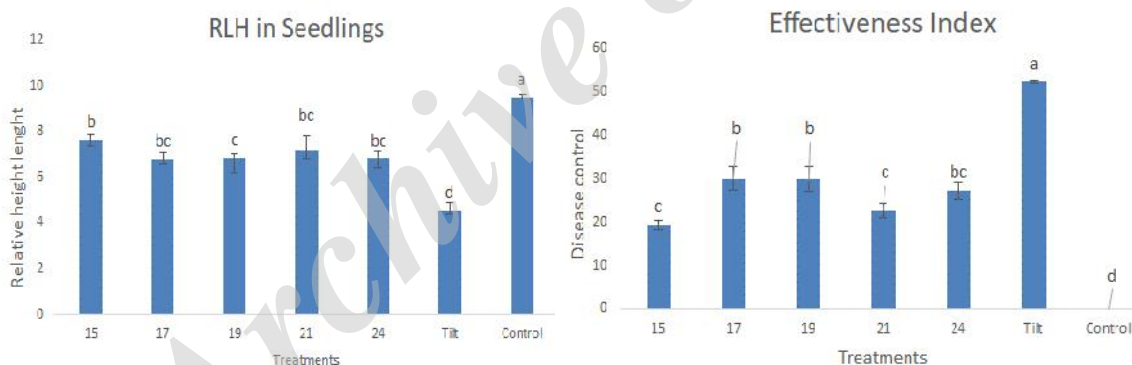
شکل ۷- نمودار فعالیت آنزیمی فنیل آمونیا لیاز در نقاط زمانی صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف در تیمارهای ۱۵، ۱۷، ۲۲، ۲۴ و ۲۶، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی داری ندارند.

Fig. 7. Enzymatic activity of phenylalanine ammonia lyase at the time points of 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after inoculation with *R. solani* the causal agent of sheath blight disease of rice in treatments 15, 17, 22, 24 and 26. The means with the same letters are not significant at 5% level according to Duncan's test.



شکل ۸- فعالیت آنزیمی فنیل آمونیا لیاز در نقاط زمانی صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف در تیمارهای ۱۹، ۲۱، ۲۲، ۲۴ و ۲۶، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

Fig. 8. Enzymatic activity of phenylalanine ammonia lyase at the time points of 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after inoculation with *R. solani*, the causal agent of sheath blight disease of rice in treatments 19, 21, 22, 24 and 26. The means with the same letters are not significant at 5% level according to Duncan's test.



شکل ۹- ارتفاع نسبی لکه به ارتفاع گیاهچه (RLH) و ارزیابی شاخص کنترل بیماری (EI) یا شاخص اثربخشی تیمارها در کنترل بیماری سوختگی غلاف در مرحله گیاهچه‌ای

Fig 9. Relative lesion height (RLH) and evaluation of effectiveness index (EI) on control of sheath blight disease in seedling stage

طول لکه‌های ناشی از قارچ عامل بیماری در تیمارهای مختلف پس از ۷ روز اندازه‌گیری شد. در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌داری بین تیمارها به لحاظ اندازه لکه‌ها مشاهده نشد، ولی پس از ۷ روز تیمارها تفاوت معنی‌داری از لحاظ تفاوت در طول لکه داشتند.

ظهور علائم بیماری و اندازه‌گیری میانگین طول لکه در تیمارهای مختلف

علائم اولیه بیماری ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری به صورت لکه‌های اولیه آب‌گزیده شروع و به تدریج به رنگ قهوه‌ای روشن مشاهده شد. لکه‌ها در ابتدا به صورت قهوه‌ای روشن و به تدریج قهوه‌ای تیره شدند.

تأثیر تیمارها در کاهش علائم بیماری

به ترتیب تیمارهای ۱۷ و ۱۹ پس از قارچکش تیلت، تأثیر معنی داری را در کنترل بیماری در مرحله گیاهچه‌ای نشان دادند. پس از آن تیمار ۲۴ و سپس تیمارهای ۲۱ و ۱۵ بیشترین تأثیر را در کنترل بیماری سوختگی غلاف در مرحله گیاهچه‌ای نشان دادند. تیمار شاهد نیز در گروه جداگانه‌ای قرار گرفت.

بحث

نتایج اندازه‌گیری میزان بیان ژن و مقدار آنزیم‌های لیپوکسی ژناز و فنیل آلانین آمونیاک‌ناشان‌دهنده میزان متفاوت بیان این ژن‌ها در سطح mRNA و پروتئین در تیمارهای مورد بررسی بود. با توجه به نتایج، بین وجود و عدم وجود بیمارگر، وجود و عدم وجود ماده القاکننده و نیز باکتری آنتاگونیست و القاکننده در ترکیبات بیماری، تفاوت چشمگیری مشاهده شد، به عبارت دیگر می‌توان گفت که وجود بیمارگر در تعامل با میزان و کاربرد سیلیکات پتاسیم و باکتری، باعث القای افزایش بیان این ژن‌ها شد. با توجه به بالا رفتن زیاد بیان این ژن‌ها در گیاه بعد از تنش زیستی و نیز نقش مهم این ژن‌ها در دفاع گیاه علیه بیمارگر، این نکته تأکید می‌شود که با حمله عامل بیمارگر، گیاه میزان این آنزیم‌ها را افزایش می‌دهد. از طرفی این ژن‌ها نسبتاً القاء‌پذیر بوده و با کاربرد سیلیکات پتاسیم و باکتری آنتاگونیست و القاکننده روی گیاه می‌توان میزان آنها را افزایش داد.

عامل بیماری سوختگی غلاف توانایی افزایش بیان ژن‌های *pal* و *lox* را دارد. این دو ژن کدکننده آنزیم‌های مهمی در مسیر فنیل پروپانویید (phenylpropanoid) و اوکتادکانویید (octadecanoid) می‌باشند. نرخ بیان ژن *lox* که در مسیر سنتز اسید جاسمونیک نقش دارد، در گیاهان برنج تلقیح شده با *R. solani* به شدت افزایش می‌یابد. نخستین آنزیمی که در مسیر سنتز اسید سالیسیلیک مورد توجه می‌باشد، آنزیم PAL است. افزایش بیان این ژن در گیاهان برنج آلوده پیشنهاد می‌دهد که مسیرهای وابسته به اسیدسالیسیک در گیاهان مورد حمله بیماری قرار گرفته با برخی مکانیسم‌های دفاعی تداخل داشته که می‌تواند در

مقابله با *R. solani* موثر باشد. از این رو، به نظر می‌رسد که بالا بودن سطح پایه‌ای سالیسیلیک اسید (SA) در گیاهان برنج ممکن است منجر به افزایش سطح جاسمونیک اسید (JA) شده و در نتیجه موجب افزایش بیان ژن‌های وابسته به جاسمونیک اسید مانند PR-3، PR-4 و PR-12 می‌شود. داده‌های تحقیق حاضر در مورد آنزیم PAL با نتایج طاهری و طریقی (۲۰۰۹) که دریافتند که میزان بیان ژن *pal* در گیاهان برنج تحت تیمار ریپوفلاوین پس از تلقیح با *R. solani* افزایش می‌یابد، مطابقت دارد. آنزیم‌های مرتبط به بیمارگر شامل پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیاک‌ناشان‌دهنده و دیگر پروتئین‌هایی است که پس از حمله‌ی بیمارگر افزایش بیان نشان می‌دهند. این آنزیم‌ها منجر به افزایش مقاومت گیاه به حملات بعدی بیمارگر می‌شوند. فنیل آلانین آمونیاک‌ناشان‌دهنده (PAL) اولین و مهم‌ترین آنزیم مسیر فنیل پروپانویید می‌باشد، که سنتز بنزوئیک اسید، اسید سالیسیلیک و دیگر فنل‌های وابسته به دفاع گیاه را منجر می‌شود. PAL تبدیل -L فنیل آلانین به سینامیک اسید را کاتالیز می‌کند. سینامیک اسید به عنوان یک پیش ماده برای فنولیک‌ها، لیگنین و فورانو کومارین، فیتوآلکسین‌ها و دیگر متابولیت‌های پایین دست عمل می‌کند. فعالیت آنزیم PAL با عوامل زنده و غیرزنده مختلف القا می‌شود که در نتیجه تجمع ترکیبات فنلی مانند اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها را موجب می‌شود. آنزیم PAL با تنظیم متابولیسم ترکیبات مختلف فنلی مقاومت گیاهان نسبت به تنش‌ها را سبب می‌شود (Wen et al., 2005). در فعالیت PAL در طی اثر متقابل گیاه-بیمارگر و عوامل غیر بیماری‌زا نظیر شرایط محیطی القاء می‌شود. فعالیت PAL به سرعت تحت تأثیر محرک‌ها و حمله‌ی بیمارگر افزایش می‌یابد. در پاسخ به *R. solani* در لوبیا چشم بلبلی تیمار شده با سالیسیلیک اسید (SA) فعالیت PAL افزایش نشان داد (Chandra et al., 2007). افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاک‌ناشان‌دهنده بیان ژن آن پس از آلودگی با عامل بیماری در گیاه ۱۰ ساعت پس از آلودگی با *Pseudomonas syringae* (Denslow et al., 2005)، برگ‌های گیاه گندم آلوده شده با *Botrytis cinerea* (Huang et al., 2010) و گیاه گندم در پاسخ به

باکتری آنتاگونیست و تیمار ۲۱ به جهت مایه زنی باکتری القاء گر به ریشه گیاه به ترتیب باعث تسریع و تاخیر در تولید آنزیم لیپوکسی ژناز در گیاه شدند. ممکن است در زمان تماس مستقیم باکتری با سطح اندام های رویشی گیاه، القاء مقاومت زودتر اتفاق بیافتد. علاوه بر این، در تیمار ۱۷ در تمامی زمان ها، مقدار بیان و مقدار آنزیم تولیدی بیشتر از دیگر تیمارها بود. از این رو، تیمار ۱۷ توانست گیاه را قبل از شروع فرآیند بیماری زایی و پس از مراحل اولیه آلودگی به قارچ عامل بیماری، از وجود بیمارگر آگاه نموده و باعث بالا رفتن سطح تولید آنزیم لیپوکسی ژناز در گیاه شود.

فعالیت آنزیم لیپوکسی ژناز با مکانیسم دفاعی گیاهان در برابر پاتوژن ها مرتبط بوده و می تواند در اثر کاربرد مواد شیمیایی مختلف مانند (2,6-dichloroisonicotinic acid) BABA (Schaffrath et al., 2000) در برنج و (aminobutyric -) در انگور که نقش فعال کننده پاسخ دفاعی گیاهان را دارند، به شدت افزایش یابد (Hamiduzzaman et al., 2005). افزایش بیان ژن *lox* می تواند منجر به تولید برخی مولکول ها مانند هیدروپروکسید، رادیکال های آزاد، ترکیبات ضد میکروبی و برخی مولکول های پیام رسان مانند جاسمونیک اسید می شود (Croft et al., 1993). آنزیم اصلی در مسیر اکتادکانوئید (octadecanoid) که منجر به سنتز جاسمونیک اسید می شود، آنزیم LOX می باشد. جاسمونات بعد از تولید اولیه توسط LOX، سریعاً بعد از تیمار گیاهان با برخی مواد شیمیایی و یا آلودگی گیاهان با عامل بیماری، تجمع یافته و در نهایت باعث افزایش مقاومت گیاهان می شود (Creelman & Mullet, 1997). در نتایج مطالعه سیاری و همکاران (۲۰۱۴) به امکان نقش مسیر پیام رسانی اسید جاسمونیک در القاء پاسخ دفاعی در برنج بعد از حمله عامل بیماری سوختگی غلاف اشاره شده است (Sayari et al., 2014). ایشان بیان داشتند که در ۱۲ تا ۲۴ ساعت بعد از آلودگی گیاهان برنج با *R. solani*، سطح تولیدی LOX افزایش یافته و بیانگر مداخله این آنزیم در مکانیسم های مقاومت برنج به این بیماری می باشد. دونگ و بیر (۲۰۰۰) نیز به نتایج مشابه در خصوص نقش LOX در افزایش

آلودگی به *Mycosphaerella graminicola* (Gholamnejad et al., 2016) مشاهده شد. بنابر نتایج این تحقیق، سطح بیان ژن کد کننده آنزیم PAL به شدت تحت تاثیر ترکیبات تیماری مختلف قرار گرفت. این افزایش بیان در سطح رونوشت ژن، در سطح تولید آنزیم نیز مشاهده شد. با مقایسه تولید سطوح آنزیمی، بین تیمارهای ۱۷ و ۲۱، تیمار ۱۷ و ۲۱ در نقاط زمانی ۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت، باعث افزایش تولید آنزیم فنیل آمونیا لیاز در گیاه شدند که از این جهت با هم تشابه داشتند ولی سطح تولید آنزیم فنیل آمونیا لیاز در تیمار ۱۷ بالاتر از تیمار ۲۱ بود.

فعالیت ضد قارچی آنزیم PAL در برابر عامل بیماری قارچ سفیدک پودری کدو (Zeighaminejad & Sharifi, 2013)، گیاه گوجه فرنگی آلوده به *F. oxysporum* (Sirchi, 2013)، و عامل بیماری *f. sp. lycopersici* (He & wolyn, 2005) در لویا چشم بلبلی (*R. solani*) (Chandra et al., 2007) گزارش شده است. همچنین، سیاری و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی سطوح بیان پروتئین های مقاومت به بیماری ها و نیز آنزیم های دخیل در مسیر مقاومت، گزارش نمودند که بیان ژن *pal* در ارقام حساس و مقاوم برنج در ۱۲ ساعت بعد از القا توسط بیمارگر، افزایش قابل توجهی داشته و تا ۴۸ ساعت بعد از القا به حداکثر مقدار (۱۵ برابری) خود رسید.

نتایج تحقیق نشان داد زمانی که باکتری به صورت خیساندن خاک یا مایه زنی ریشه به گیاه افزوده می شود، حداکثر مقدار آنزیم در مدت زمان طولانی تری تولید می شود. البته احتمال دارد باکتری القاء کننده بدلیل خصوصیات آنتاگونیستی ضعیف تر، پتانسیل لازم را جهت افزایش تولید آنزیمی در مقایسه با باکتری آنتاگونیست نداشته باشد و یا ضعیف تر عمل نماید. با این حال در مقایسه تولید سطوح آنزیمی، بین تیمارهای ۱۷ و ۲۱، تیمار ۱۷ در نقاط زمانی ۱۲ و ۷۲ و تیمار ۲۱ در نقاط زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت باعث افزایش تولید آنزیم لیپوکسی ژناز در گیاه شدند. به دلیل مایه زنی ریشه و تماس باکتری از طریق ریشه، افزایش تولید آنزیم لیپوکسی ژناز دیرتر از تیمار ۱۷ و در زمان های ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر، اتفاق می افتد. به عبارتی تیمار ۱۷ به جهت اسپری پاشی مستقیم

بیماری‌زایی شده و منجر به کاهش خسارت ناشی از چندین عامل بیمارگر در محصولات مختلف گردد (Gozzo, 2003). از این رو کاربرد ترکیبات طبیعی (عصاره‌های گیاهی) و شیمیایی نظیر سیلیکات پتاسیم که می‌توانند مقاومت را به صورت سیستمیک در گیاهان القا نمایند، از اهمیت خاصی برخوردارند (Hammerschmidt *et al.*, 2001).

نتایج بررسی تاثیر تیمارها بر کاهش علائم بیماری در مرحله گیاهچه‌ای نشان داد، تیمار ۱۷ بیشترین تاثیر و تیمار ۱۵ کمترین تاثیر در کاهش علائم بیماری سوختگی غلاف را نشان دادند که مبنی تاثیر مثبت استفاده ترکیبی از جدایه آنتاگونیست با سیلیکات پتاسیم می‌باشد. در واقع این تاثیر بیشتر از زمانی بود که باکتری آنتاگونیست یا سیلیکات پتاسیم به صورت منفرد استفاده شده بودند. نتایج این تحقیق با نتایج حاصل از ارزیابی تیمارهای مشابه در کاهش لکه‌های بیماری در مرحله شکم (booting) نشان داد که ترکیب استفاده از باکتری آنتاگونیست با سیلیکات پتاسیم نیز تاثیر معنی‌داری در کنترل بیماری در مقایسه با استفاده تنها از باکتری آنتاگونیست یا سیلیکات پتاسیم داشته بود (De Souza Cortes, unpublished data) و همکاران (۲۰۱۵) نیز به نتایج مشابه‌ای به لحاظ استفاده ترکیبی سیلیس با سه گونه *Burkholderia pyrrocinia*, *P. fluorescens* و *Trichoderma asperellum* کاهش لکه‌های بیماری بلاست برنج به میزان ۹۶ درصد رسیده بودند (De Souza Cortes *et al.*, 2015). دستیابی به راهکارهای مناسب با هدف مدیریت مبارزه تلفیقی بیماری‌های گیاهان از جمله اهداف محققان می‌باشد. هدف نهایی این روش‌ها، کنترل بیماری‌ها، کاهش خسارت اقتصادی آنها و نیز حفظ محیط زیست می‌باشد. از این رو می‌توان گفت که القا مقاومت یک پدیده امید بخش بوده و توجه به ترکیبات بیماری مختلف با هدف دستیابی به بیشترین بهره‌وری در سیستم مبارزه تلفیقی در تحقیقات کشاورزی مورد توجه قرار گرفته است. ترکیب بیماری باکتری آنتاگونیست به صورت بذرمالی و اسپری‌پاشی ۲۴ و ۴۸ ساعت قبل از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری

مقاومت گیاه اشاره داشتند (Dong & Beer, 2000). نتایج تحقیق نشان داد که باکتری القاء‌گر در ترکیب با سیلیکات پتاسیم توانست باعث تولید سطح بالاتری از آنزیم لیپوکسی‌ژناز در قیاس با تیمار باکتری القاء‌گر شود که نشان‌دهنده تاثیر مثبت باکتری القاء‌گر در افزایش مقاومت گیاه در برابر عامل بیماری‌زا و نیز افزایش کارایی استفاده از سیلیکات پتاسیم است. در نتیجه می‌توان گفت، سیلیکات پتاسیم نیز قادر است گیاه را وارد مسیرهای مقاومت نموده و باعث القاء مقاومت و تحمل در گیاه شود. در هر صورت باکتری آنتاگونیست در مقایسه با ماده القاء‌کننده مقاومت، توانایی بالاتری در افزایش بیان ژن لیپوکسی‌ژناز نشان داد. همچنین، در زمان صفر تیمار ۱۷، ۱/۲۶ برابر شاهد منفی آنزیم فیل‌آمونیا لایز تولید نمود که مبنی آن است که باکتری آنتاگونیست در ترکیب با ماده القاء‌کننده مقاومت توانست سطوح تولید آنزیم مذکور را قبل از مایه‌زنی با بیمارگر در گیاه افزایش دهد. این مهم در زمان صفر و در تیمار ۲۱، برابر با شاهد منفی بود که نشان‌دهنده افزایش خاصیت القاء‌کنندگی باکتری ۲۷۵ (تیمار ۱۷) در مقایسه با ۲۴۳ (تیمار ۲۱) می‌باشد. مضافاً این که استرین باکتری ۲۷۵ به صورت اسپری‌پاشی روی گیاهچه ولی استرین باکتری ۲۴۳ به صورت اضافه نمودن به خاک روی گیاه مایه‌زنی شده بود. عوامل کنترل بیولوژیک، کنترل بیمارگرهای گیاهی را از وابستگی به ترکیبات شیمیایی مستقل کرده و دوست‌دار محیط زیست هستند. برخی گونه‌ها از باکتری جنس *Pseudomonas* در بین عوامل کنترل بیولوژیکی موثر علیه بیمارگرها قرار دارند. مشاهده شده است، این باکتری رشد گیاه را با تولید مواد بهبوددهنده رشد گیاهی تقویت می‌کنند و از این رو (PGPR) *plant growth promoting rhizobacteria* نامیده می‌شوند. PGPRها می‌توانند به‌طور سیستمیک مکانیسم‌های دفاعی نهفته گیاهی را که مقاومت سیستمیک القایی (ISR) *induced systemic resistance* نامیده می‌شود، فعال کنند (Hammerschmidt, 1995). علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند که تیمار خارجی گیاهان با برخی مواد شیمیایی می‌تواند باعث القا مقاومت سیستمیک و تجمع پروتئین‌های مرتبط با

باعث القاء مقاومت و تحمل در مقابل تنش زنده و قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برنج گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از پژوهشکده ژنتیک و زیست فن آوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری که در طی مدت زمان فرصت مطالعاتی، ضمن تامین امکانات پژوهشی، ما را در انجام تحقیق یاری نمودند، صمیمانه تقدیر و تشکر به عمل می آید.

اسپری پاشی با ماده القاء کننده (سیلیکات پتاسیم) و مایه زنی گیاهچه با قارچ عامل بیماری، نسبت به سایر ترکیبات تیماری توانست در زمان کوتاه تری، سبب افزایش سطح بیانی و تولیدی آنزیم های دخیل در مکانیسم مقاومت گیاه برنج به بیماری سوختگی غلاف برنج شده و از این طریق امکان دریافت سریع تر پیام تنش و افزایش مقاومت به بیماری را فراهم نماید. همچنین، استفاده از سیلیکات پتاسیم می تواند گیاه را زودتر وارد مسیرهای مقاومتی نموده و

References

- Anita, B. & Samiyappan, R. 2012. Induction of systemic resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* against rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *Journal of Biopesticide*, 5: 53–59.
- Bernardes, J., Storari, M., Zala, M., Wang, W., Jiang, D., ShiDong, L., Jin, M., McDonald, B. A. & Ceresini, P. C. 2009. Genetic structure of populations of the rice-infecting pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from China. *Phytopathology*, 99:1090–1099
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–54.
- Brunings, A.M., Datnoff, L.E., Ma, J.F., Mitani, N., Nagamura, Y. & Rathinasabapathi, B. 2009. Differential gene expression of rice in response to silicon and rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Annals of Applied Biology*, 155: 161–170.
- Chandra, A., Saxena, R., Dubey, A. & Saxena, P. 2007. Change in phenylalanine ammonialyase activity and isozyme patterns of polyphenol oxidase and peroxidase by salicylic acid leading to enhanced resistance in cowpea against *Rhizoctonia Solani*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29: 361–367.
- Creelman, R.A. & Mullet, J.E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 48: 355–381.
- Croft, K., Juttner, F. & Slusarenko, A.J. 1993. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Physiology*, 101: 13–24.
- De Souza Cortes, A.C.A., De Sousa, T.P., de B, M.V., Rodrigues, F.A., da Silva, G.B., Filippi, M.C.C. 2015. Enzyme-Induced Defense Response in the Suppression of Rice Leaf Blast (*Magnaporthe oryzae*) By Silicon Fertilization and Bio agents. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 3: 22–32.
- Datnoff, L.E., Elmer, W.H. & Huber, D.M. 2007. *Mineral Nutrition and Plant Disease*. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society.
- Denslow, S.A., Walls, A.A. & Daub, M.E. 2005. Regulation of biosynthetic genes and antioxidant properties of vitamin B6 vitamins during plant defense responses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66: 244–255.

- Dickerson, D.P., Pascholatiann, S.F., Hagerman, A.E., Butler, L.G. & Nicholson, R.L. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxycinnamate: CoA ligase in maize mesocotyls inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum*. *Physiological Plant Pathology*, 25: 111–123.
- Doderer, A., Kokkelink, I., van der Veen, S., Valk, B.E., Schram, A.W. & Douma, A.C. 1992. Purification and characterization of two lipoxygenase isoenzymes from germinating barley. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1120: 97–104.
- Dong, H. & Beer, S.V. 2000. Riboflavin induced disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. *Phytopathology*, 90: 801–811.
- Fauteux, F., Remus-Borel, W., Menzies, J.G. & Bélanger, R.R. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 249: 1–6.
- Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi Goltapeh, E., Naser Safaei, N. & Khadijeh Razavi, K. 2016. Study of defense genes expression profile pattern of wheat in response to infection by *Mycosphaerella graminicola*. *Iranian Journal of Plant Biology*, 30: 43–54 (in Persian)
- Ghorbani, H., SamizadehLahiji, H.A., Rabiei, B. & Allahgholipour, M. 2011. Grouping Different Rice Genotypes Using Factor and Cluster Analyses. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, 21: 89–111 (in Persian)
- Gozzo, F. 2003. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4487–4503.
- Groth, D.E. 2008. Effects of cultivar resistance and single fungicide application on rice sheath blight, yield, and quality. *Crop Protection*, 27: 1125–1130
- Hammerschmidt, R. 1995. *Induced resistance to disease in plants*. Springer Science and Business Media.
- He, C.Y. & Wolyn, D.J. 2005. Potential role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*. *Plant Pathology*, 54: 227–232.
- Hammerschmidt, R, Metraux, J.P & Van Loon, L.C. 2001. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 1–6.
- Hamiduzzaman, M.M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J.M. & Mauch-Mani, B. 2005. Beta-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18: 819–829.
- Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y.H., Yu, J.Q. & Chen, Z. 2010. Functional analysis of the Arabidopsis PALgene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*, 153: 1526–1538.
- Kalpana, K., Maruthasalam, S., Rajesh, T., Poovannan, K., Kumar, K.K. & Kokiladevi, E. 2006. Engineering sheath blight resistance in elite indica rice cultivars using genes encoding defense proteins. *Plant Science*, 170: 203–215.
- Kim, S.G., Kim, K.W., Park, E.W. & Choi, D. 2002. Silicon-induced cell walls fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology*, 92: 1095–1103.

- Liang, Y., Hua, H., Zhu, Y.G., Zhang, J., Cheng, C & Romheld, V. 2006. Importance of plant species and external silicon concentration to active silicon uptake and transport. *New Phytologist*, 172: 63–72.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ C[T] method]. *Methods*, 25: 402–408.
- Manikandan, R. & Raguchander, T. 2014. *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* retardation through induction of defensive response in tomato plants using a liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* (Pf1). *European Journal of Plant Pathology*, 40: 469–480.
- Polanco, L.R., Rodrigues, F.A., Nascimento, K.J.T., Shulman, P., Silva, L.C., Neves, F.W. & Vale, F.X. R. 2012. Biochemical aspects of bean resistance to anthracnose mediated by silicon. *Annals of Applied Biology* 161: 140–150.
- Reshma, P., Naik, M.K., Aiyaz, M., Niranjana, S.R., Chennappa, G., Shaikh S.S & Sayyed, R.Z. 2018. Induced systemic resistance by 2, 4- diacetylphloroglucinol positive fluorescent *Pseudomonas* strains against rice sheath blight. *Indian Journal of Experimental Biology*, 56: 207–212.
- Rodrigues, F., Benhamou, N., Datnoff, L.E., Jones, J.B. & Bélanger, R.R. 2003. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. *Phytopathology*, 93: 535–546.
- Rodrigues, F.A., McNally, D.J., Datnoff, L.E., Jones, J.B., Labbé, C., Benhamou, N. 2004. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology*, 94: 177–183.
- Rodrigues, F.A., Jurick, W.M., Datnoff, L.E., Jones, J.B. & Rollins, J.A. 2005. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66: 144–159.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. 2000. PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 132: 365–86.
- Ruste'rucci, C., Montillet, J-L., Agnel, J-P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J-J., Etienne, P., Suty, L. & Blein, J-P. 1999. Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin of tobacco leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 36446–36455.
- Rychlik, W. 2007. OLIGO 7 primer analysis software. *Methods Mol Biol*, 402: 35–60.
- Sayari, M., Babaeizad, V., Tajick Ghanbari, M.A. & Rahimian, H. 2014. Expression of the pathogenesis related proteins, NH-1, PAL, and lipoxygenase in the Iranian Tarom and Khazar rice cultivars, in reaction to *Rhizoctonia solani*– the causal agent of rice sheath blight. *Journal of Plant Protection Research*, 54: 36–43.
- Schaffrath, U., Zabbai, F. & Dudler, R. 2000. Characterization of RCI-1, a chloroplastic rice lipoxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators. *European Journal of Biochemistry*, 267: 5935–5942.
- Schurt, D. A., Cruz, M. F., Nascimento, K.J., Filippi, M.C. & Rodrigues, F.A. 2014. Silicon potentiates the activities of defense enzymes in the leaf sheaths of rice plants infected by *Rhizoctonia solani*. *Tropical Plant Pathology*, 39: 457–463.

- Sharma, N., Teng, P & Olivarce, F. 1990. Comparison of assessment methods for rice sheath blight disease. *Philippine Phytopathology*, 26: 20–24.
- Singh, U.B., Malaviya, D., Singh, W.S., Pradhan, J.K., Singh, B.P., Roy, M., Pathak, M.I.N., Basiyal, B.M., Rai, J.P., Sharma, B.K., Singh, R.K., Sharma, P.K., Saman, D.K, Manna, M.C., Sharma, S.K. & Sharma, A.K. 2016. Bioprotective microbial agents from rhizosphere ecosystem trigger plant defense responses provide protection against sheath blight disease in rice. *Microbiological Research*, 192: 300–312.
- Taheri, P. & Tarighi, S. 2009. A study on the effect of riboflavin as a defense activator in rice against *Rhizoctonia* diseases. *Journal of Plant Protection Research*, 23: 68–80.
- Van Bockhaven, J., De Vleeschauwer, D. & Höfte, M. 2013. Towards establishing broad-spectrum disease resistance in plants: silicon leads the way. *Journal of Experimental Botany*, 64: 1281–1293.
- Van Loon, L.C., Rep, M. & Pieterse, C.M.J. 2006. Significance of inducible defense related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44:135–162.
- Wen, P.F, Chen, J.Y., Kong, W.F., Pan, Q.H., Wan, S.B. & Huang, W.D. 2005. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonialyase gene in grape berry. *Plant Science*, 169: 928–934.
- Zeighaminejad, R. & Sharifi Sirchi, Gh.R. 2013. Study of PR gene expression and activity of effective enzymes in induced resistance to powdery mildew by salicylic acid. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 5: 97-110 (in Persian)
- Zhang, G., Cui, Y., Ding, X. & Dai, Q. 2013. Stimulation of phenolic metabolism by silicon contributes to rice resistance to sheath blight. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176: 118–124.
- Zuo, S.M., Zhang, Y.F., Yin, Y.J., Chen, Z.X. & Pan, X.B. 2006. Establishment and improvement of inoculation technique and rating system in researching rice sheath blight resistance in field. *Journal of Yangzhou. (Agriculture and Life Science)* 27: 57–61.

Study of lipoxygenase and phenylalanine ammonia-lyase gene expression and activity of related enzymes in rice under stress of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of sheath blight disease, antagonistic and inducer bacteria in combination with potassium silicate

Mehdi Rostami¹, Saeed Tarighi¹, Parisa Taheri¹, Heshmat Rahimian²

1. Department of Plant Protection, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2. Department of Plant Protection, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Corresponding author: Saeed Tarighi, starighi@um.ac.ir

Received: Jan., 23, 2019

6(1) 59-76

Accepted: Apr., 14, 2019

Abstract

Induced resistance is one of the ways by which plants cope with the biotic stress. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and lipoxygenase (LOX) as inducible defense enzymes, are synthesized by plant in response to biotic stress. This research was carried out with the aim of investigating the effect of *Pseudomonas* sp. isolates (antagonistic and inducer bacteria) and potassium silicate treatment on expression changes and production of enzymes at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after rice seedling contamination of Fajr cultivar to *R. solani*, the causal agent of rice sheath blight disease. Analysis of gene expression showed that the maximum expression was observed in 72 hours after plant inoculation, and the combination of antagonistic bacteria and potassium silicate as an inducer had the highest expression during the first 6 hours of infection. Analysis of enzyme content showed that the use of treatment compounds in the initial time interval of zero to 6 hours were caused a significant increase in protein content, which was more than the phenylalanine ammonia-lyase in the combination of the antagonistic bacteria and the potassium silicate as an inducing agent for the lipoxygenase enzyme. In general, by attacking the pathogens, the plant increases the amount of these enzymes due to the important role of these genes in defense against the pathogen. Increasing the expression level of these genes directly increases the activity of the enzymes which indicate direct role of these genes in plant defense system, that, it is possible to increase their expression by applying potassium silicate and antagonistic and inducer bacteria on the plant.

Keywords: antagonist, inducer, *Rhizoctonia solani*, sheath blight disease