

بیان ژن‌های کیتیناز، بتا- ۱ و ۳ گلوکوناز و پراکسیداز در برنج تحت تیمارهای قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف، باکتری‌های آنتاگونیست و القاء‌کننده مقاومت و سیلیکات پتاسیم

مهدی رستمی^۱، سعید طریقی^۲، پریسا طاهری^۳، حشمت اله رحیمیان^۳

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیاران گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

(تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷؛ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۸)

چکیده

سوختگی غلاف برنج ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* AG-1 IA به‌عنوان یکی از عوامل خسارت‌زای مهم در بسیاری از مناطق برنج‌کاری دنیا شناخته شده است. این تحقیق با هدف بررسی اثر دو جدایه باکتری آنتاگونیست و القاء‌کننده مقاومت از گونه *Pseudomonas protegenes* به‌تنهایی و در تلفیق با سیلیکات پتاسیم بر تغییرات بیان ژن و تولید آنزیم‌های کیتیناز، گلوکوناز و پراکسیداز انجام شد. پس از اعمال تیمارها، در زمان‌های صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی گیاهچه‌های برنج (رقم فجر) با قارچ عامل بیماری، از غلاف و برگ نمونه‌برداری شد. ۱۰۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم از پودر غلاف و برگ نیتروژن مایع به‌ترتیب در بافرهای استات سدیم و فسفات برای اندازه‌گیری آنزیم‌های کیتیناز، بتا- ۱ و ۳ گلوکوناز و پراکسیداز و ۱۰۰ میلی‌گرم از آن در RNAX-plus solution برای استخراج rRNA، استفاده شد. میزان تولید آنزیم بتا ۱ و ۳ گلوکوناز در ۷۲ ساعت و آنزیم کیتیناز در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی در حداکثر مقدار خود بود. باتوجه به این‌که بیان ژن‌های کیتیناز و پراکسیداز در تیمار باکتری آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکات پتاسیم نسبت به سایر تیمارها در زمان اولیه فرآیند بیمارگری یعنی ۶ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر در بالاترین سطح مشاهده شده و ژن بتا ۱ و ۳ گلوکوناز در فاصله زمانی ۲۴ ساعت به‌حداکثر بیان خود رسید، لذا این تیمار به‌عنوان بهترین تیمار در تحریک واکنش دفاعی گیاه شناسایی شد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت آنزیمی، کنترل زیستی، *Rhizoctonia solani*

Genes expression of chitinase, β - 1, 3- gluconase and peroxidase enzymes in rice treated with the causal agent of sheath blight diseases, antagonistic and inducer bacteria, and potassium silicate

M. ROSTAMI¹, S. TARIGHI², P. TAHERI², H. RAHIMIAN³

1 and 2. PhD student and associate professor of Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran respectively; 3. Department of Plant Protection, Agricultural Sciences and Natural Resources Sari University, Sari, Iran

Abstract

Rice sheath blight disease caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA has been recognized as a major damaging factor in many rice regions of the world. The aim of this research was investigating on the effect of two isolates of *Pseudomonas protegenes*, antagonistic and inducer isolates alone and in combination with potassium silicate on expression rate and production of chitinase, β - 1, 3- gluconase and peroxidase enzymes at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after inoculation of Fajr cultivar with the causal agent of rice sheath blight disease. The amount of 1000 and 200 mg of sheath- leaf tissue was prepared as powdered in liquid nitrogen and then in sodium acetate and phosphate buffers respectively to measure chitinase, β - 1, 3- gluconase and peroxidase enzymes and 100 mg of the powder in RNAX-Plus solution to study the genes expression and RNA extraction. The amount of β - 1, 3- gluconase enzyme in 72 hours and chitinase enzyme in 48 hours of infection was at maximum level. As regards, compared with other treatments, the highest level of expression of the genes for chitinase and peroxidase was observed in treatment of antagonistic bacteria in combination with potassium silicate in the early hours of the pathological process, 6 hours after inoculation with the fungal agent, and β - 1, 3- gluconase reached the maximum at 24 h, Thus this treatment recognized as the best treatment.

Keywords: Biological control, enzyme activity, *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

مقدمه

برنج از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی است که پس از گندم بیشترین سطح زیرکشت اراضی کشاورزی را در دنیا داشته و به‌عنوان غذای اصلی میلیاردها نفر در جهان، نقش بارزی در تغذیه، درآمد و اشتغال‌زایی مردم از جمله کشور ایران دارد. این گیاه ارزشمند به‌طور پیوسته توسط بیمارگرها تهدید می‌شود و در طول دوران رشد، میزبان عوامل بیماری‌زای مختلفی از جمله عوامل قارچی، باکتریایی، ویروسی و نماتدی می‌باشد که باعث کاهش عملکرد و کیفیت می‌شوند. در این میان عوامل بیماری‌زای قارچی بیشترین نقش و بالاترین فراوانی را دارا هستند. یکی از بیماری‌های مخرب و محدود کننده کشت و تولید برنج به‌ویژه در ارقام اصلاح شده و پرمحصول، بیماری سوختگی غلاف می‌باشد. این بیماری طی ده سال (۱۹۷۰ تا ۱۹۸۰)، مهمترین بیماری در اراضی شالیزاری جنوب کشور آمریکا بوده و کاهش محصول در ارقام حساس و در شرایط آلودگی شدید تا ۵۰ درصد محصول گزارش شده است (Savary et al., 2000). بیماری توسط قارچ *AG-1 IARhizoctonia solani Kühn* ایجاد می‌شود که یک بیمارگر خاکزاد است و باعث آلودگی برنج، ذرت، سورگوم، سویا، لوبیا و تعداد دیگری از میزبان‌ها در مناطق مختلف دنیا می‌شود. باوجودیکه مقاومت نسبی ژنتیکی در مقابل سوختگی غلاف برنج گزارش شده است و به رغم غربالگری بیش از ۳۰۰۰ گونه ژرم پلاسما در سراسر جهان، ژن‌های اصلی مسئول بروز مقاومت علیه این بیمارگر یافت نشده اند (Mew et al., 2004). گیاهان در مقابل بیمارگرها از طریق مکانیسم‌های مقاومت پیچیده‌ای نظیر مقاومت ساختاری یا القایی از خود دفاع می‌کنند (Van Bockheven et al., 2013). از طرفی استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید ضمن تقویت و افزایش رشد گیاهان، باعث القای مقاومت در گیاه علیه بیمارگرها و کاهش بیماری‌های گیاهی می‌شوند. برخی از ریزوباکتری‌ها دارای توانایی تولید انواع ترکیبات فعال بیولوژیکی (آنزیم‌ها، ویتامین‌ها، آمینو اسیدها و

هورمون‌های گیاهی) هستند که دارای اثر تحریک کننده فعال بر روی رشد و توسعه گیاه می‌باشند (Larsen et al., 2009; Filippi et al., 2011; Bhattacharya and Jha, 2012; Dawwam et al., 2013). کنترل بیولوژیکی با سودومونادهای فلورسنت، استراتژی موثری برای مدیریت بیماری‌های خاکزاد می‌باشد. چندین گونه از سودوموناس‌های فلورسنت گزارش شده که باعث ایجاد مقاومت القایی سیستمیک (ISR)، کاهش بیماری و افزایش رشد گیاه در بسیاری از محصولات می‌شوند (Reshma et al., 2018). باکتری‌های محرک رشد یا PGPRها (Plant growth promoting rhizobacteria) علاوه بر ارتقاء رشد گیاهان می‌توانند به کاهش شدت بیماری کمک کنند، زیرا آنها با تولید ترکیبات ضد میکروبی و یا با تحریک مکانیسم‌های مقاومت باعث کاهش بیماری می‌شوند (Qin et al., 2014, Son et al., 2014). نتایج گزارشات روی گیاهان برنج (Filippi et al., 2011)، فلفل (Son et al., 2014)، لوبیا چشم بلبلی (Verma et al., 2014) و چندین محصول دیگر (Zaidi et al., 2015) به نقش PGPR در تحریک واکنش‌های دفاعی گیاه در برابر بیمارگرهای مختلف اشاره داشته‌اند.

برهمکنش بیمارگر-گیاه شامل شبکه پیچیده‌ای از وقایع مولکولی و سیتولوژیکی می‌باشد که تعیین کننده بروز واکنش حساسیت و یا 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 دفاعی میزبان، به‌عنوان پروتئین‌های دارای فعالیت ضد قارچی در برهمکنش بیمارگر-میزبان شناسایی شده است (Van Loon et al., 2006). پروتئین‌های مرتبط با بیمارزایی (Pathogenesis-related protein) گروه متنوعی از پروتئین‌های گیاهی هستند که در پاسخ به حمله بیمارگرها بیان می‌شوند. در مکانیسم دفاعی گیاهان، دو خانواده PR-2 و PR-3 نقش مهمی در مقامت گیاهان به بیماری‌های قارچی دارند. خانواده PR-2 عمدتاً شامل بتا-۱ و ۳ گلوکوناز می‌باشند و توانایی هیدرولیز پلیمرهای گلیکوزیدی را که واحدهای آن با پیوند

افزایش مقاومت به بیماری سوختگی غلاف برنج را در اثر آلودگی به *R. Solani* AG-1 IA تقویت کند (Schurt et al., 2014). این عنصر واکنش‌های دفاع بیوشیمیایی را در برگ برنج با شتاب بخشیدن به بیوسنتز ترکیبات فنلی، فیتوالکسین و لیگنین تقویت می‌نماید. افزایش مقاومت بیوشیمیایی به علت افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط با دفاع افزایش تولید ترکیبات ضدقارچی، مانند محصولات متابولیسم فنل (لیگنین)، فلاونوئوئید، فیتوالکسین و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در گیاهان و فعال شدن برخی از ژن‌های مرتبط با دفاع گیاه می‌باشد (Van Bockhaven et al., 2013). سیلیس ژن‌های دفاعی میزبان را در گیاه فعال نموده و ساخت پروتئین مقاومت به بیماری را القاء می‌نماید و گیاه را در برابر تهاجم بیماری پس از انتقال سیگنال مقاوم می‌نماید. همچنین عنصر سیلیس روی دیواره‌های سلول ذخیره می‌شود و به عنوان یک سد فیزیکی یا مکانیکی رخنه ریشه قارچ‌ها به بافت گیاهی عمل می‌کند و گیاه را از حمله قارچ محافظت می‌کند (Sakr, 2016). از طرفی سیلیس پتانسیل بالایی برای افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط با دفاع گیاه مانند پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، کیتیناز و فیل آنالین آمونیلایز داشته و موجب کاهش شیوع بیماری سوختگی غلاف می‌شود (Schurt et al., 2014). گیاه برنج حساس به *Magnaporthe grisea* و تحت تیمار با سیلیکات کلسیم بیان بالاتری از آنزیم گلوکوناز را ۳۶ ساعت، تجمع پراکسیداز را ۱۲ ساعت و تجمع PR-1 را ۶۰ و ۹۶ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر نشان داده است (Rodrigues and Datnoff 2005). کوددهی گیاه سویا با سیلیکات کلسیم، با یا بدون مایه زنی با *Phakopsora pachyrhizi*، فعالیت کیتیناز، فیل آنالین آمونیلایز را ۱۴۱ ساعت و فعالیت گلوکوناز را ۷۲ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر افزایش داده است (Cruz et al. 2013). گیاه خیار تیمار شده با سیلیکات پتاسیم و مایه زنی شده با *Pythium aphanidermatum* بیان بالایی از گلوکوناز را ۶ روز پس از مایه زنی نشان داده است (Chérif et al. 1994). گیاهان پنبه را که در خاک دارای سیلیکات کلسیم کشت شده و با

بتا-۱ و ۳ گلوکان به یکدیگر متصل شده‌اند را دارند (Simmons, 1994)، این آنزیم باعث مهار رشد میسلیم در طیف گسترده‌ای از قارچ‌ها می‌شود (Nishizawa et al., 2003; Balasubramanian et al., 2012). خانواده PR-3 نیز شامل کیتینازها می‌باشد که پیوندهای گلیکوزیدی کیتین را به واحدهای مونومری می‌شکنند. کیتین و گلوکان اجزای تشکیل دهنده دیواره سلولی بسیاری از بیمارگرهای قارچی می‌باشند. در بسیاری از گیاهان در پاسخ به آلودگی، فعالیت این دو آنزیم القاء شده و باعث ایجاد مقاومت می‌شود. کیتینازها و گلوکونازها در تخریب دیواره سلولی قارچ‌ها با هم همکاری می‌کنند (Saikia et al., 2005). با توجه به اینکه کیتین در گیاهان عالی وجود ندارد، بررسی‌ها نشان می‌دهد که حضور آنزیم‌های کیتیناز در گیاهان، بخشی از پاسخ ایمنی گیاه در مواجهه با عوامل بیماری‌زای کیتین‌دار می‌باشد (Botha et al., 1998). پراکسیداز (POX) در مقاومت گیاهان تأثیر مستقیمی داشته و نقش مهمی را در پاسخ دفاعی میزبان از طریق تولید رادیکال آزاد پراکسید هیدروژن ایفا می‌کند و از طرفی باعث لیگنین شدن دیواره سلولی شده، پیوندهای متقابلی را با پروتئین‌های دیواره سلولی ایجاد نموده و باعث مقاومت گیاه علیه بیمارگر می‌شود (Chittoor et al., 1999; Torres et al., 2006). PR-9 فرم مخصوص پراکسیداز است که می‌تواند با تسریع در لیگنین نمودن دیواره سلول‌ها باعث تقویت آن شده و گسترش بیمارگر را در سلول‌ها و بافت‌های گیاه محدود نماید (Passardi et al., 2004). در ارقام نسبتاً مقاوم گیاه برنج، فعالیت پراکسیداز پس از مایه زنی با *Pyricularia oryzae*، *R. solani* AG-1 IA، *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* و ریزوباکتیریا القاء می‌شود (Jaishree et al., 1997; Sperandio et al., 2017).

عنصر سیلیس (Si) دارای پتانسیل قابل توجهی در کاهش شدت بیماری‌های مهم در محصولات مهم اقتصادی نظیر برنج، سورگوم، گندم، جو، ذرت، چاودار، توت فرنگی، خیار و سویامی‌باشد (Datnoff et al., 2007). این عنصر قادر است

آزمون نموده و نشان داده اند، حتی در گیاهان تیمار نشده با باکتری بیمارگر، تیمار سیلیکون باعث افزایش فعالیت پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیاکاز و گلوکوناز، ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی شده و باعث کاهش ۵۵ درصدی شدت بیماری شده است (Oliveira 2010).

بیماری سوختگی غلاف برنج یک تنش زیستی مهم و محدود کننده کشت در ارقام پرمحصول و اصلاح شده برنج محسوب شده و پس از بیماری بلاست، باعث بیشترین کاهش عملکرد محصول میشود. از طرفی تقویت و پایدار شدن نقش عوامل کنترل زیستی در تلفیق با مواد القاءگر مقاومت می‌تواند نقش بسزایی در کاهش مصرف آفت‌کشهای شیمیایی خطرناک برای محیط زیست داشته باشد. بنابراین، استفاده از عوامل مذکور می‌تواند به‌عنوان القاء کننده‌های بیان و تولید آنزیم‌های حفاظتی نقش مهمی در مدیریت این بیماری ایفاء نماید. از این رو تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست و القاء کننده *Pseudomonas protegens* در ترکیب با سیلیکات پتاسیم بر بیان ژنهای کد کننده پراکسیداز، کیتیناز و گلوکوناز و فعالیت این آنزیم‌ها در برنج تحت تنش قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف انجام شد.

روش بررسی

در این تحقیق از جدایه *Rhizoctonia solani* RBL1 با گروه و زیرگروه آناتوموزی AG-1 IA، به‌عنوان بیمارگر، سیلیکات پتاسیم به‌عنوان القاء کننده شیمیایی مقاومت، از یک جدایه *Pseudomonas protegens* Amol- 275 دارای خاصیت آنتاگونیستی و یک جدایه *Pseudomonas protegens* Amol- 243 دارای خاصیت القاء کننده‌گی که در مطالعات آزمایشگاهی (*In vitro*) و گل‌خانه‌ای (*In vivo*) صفات آنتی بیوزی و بیوکترلی مناسبی را نشان دادند، استفاده شد (چاپ نشده). ابتدا بذور رقم فجر (حساس به بیماری سوختگی غلاف) ضدعفونی شد و پس از شستشوی سطحی با آب مقطر

سترون، به مدت ۲۴ ساعت در سوسپانسیون جدایه‌های *Pseudomonas* قرار داده شدند. بذور جوانه زده در گلدان‌های حاوی خاک سترون کاشته شده و گیاهچه‌های ۲۸ روزه برای اعمال تیمارها در نظر گرفته شدند. یک لوپ از پرگنه جوان و یک روزه جدایه‌های باکتریایی مذکور در محیط کشت مایع King's B قرار گرفت و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۶ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. سوسپانسیون حاصل در ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصله با آب مقطر سترون مخلوط و میزان جذب نوری در یک واحد چگالی نوری (در طول موج ۶۰۰ نانومتر) و جمعیت 10^9 CFU/ml تنظیم و با کربوکسی متیل سلولز (۰/۱ درصد) و توئین ۲۰ (۰/۱ درصد) در دستگاه هموژنایزر یکنواخت و برای مایه‌زنی آماده شد. سیلیکات-پتاسیم در غلظت ۲ میلی مولار تهیه و به همراه کربوکسی متیل سلولز (۰/۱ درصد) و توئین ۲۰ (۰/۱ درصد) در دستگاه هموژنایزر یکنواخت و به صورت پاشش برگی استفاده شد. سوسپانسیون باکتری، محلول سیلیکات پتاسیم و محلول قارچکش تیلت (۶/۲۵ میلی لیتر در ۲۵۰ میلی لیتر) روی گیاهچه‌ها پاشش و یا در اطراف گیاهچه به خاک اضافه شد. قارچ عامل بیماری به مدت ۳ روز در محیط کشت سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA) حاوی آنتی بیوتیک استرپتومایسین ۰/۰۱ درصد و دمای ۲۷ درجه سلسیوس رشد نمود. سپس دیسک ۵ میلی متری از قارچ به مرکز محیط کشت مذکور که در اطراف آن خلال‌های دندان به طول ۱ سانتی متر به‌صورت مورب قرار گرفتند (Taheri and Tarighi, 2010)، کشت و پس از ۷۲ ساعت نگهداری در درجه حرارت ۲۷ درجه سلسیوس، جهت مایه‌زنی استفاده شد. زاد مایه، روی پنجه اصلی گیاهچه به تعداد ۳ عدد بین غلاف‌های اول، دوم و سوم گیاهچه، قرار گرفتند.

تیمارهای آزمایش در شرایط گلخانه به شرح ذیل اعمال شدند: تیمار ۱: پوشش بذر با باکتری آنتاگونیست، پاشش باکتری آنتاگونیست به میزان ۲۵۰ میلی لیتر از سوسپانسیون

مطالعه بیان ژن‌های دفاعی گیاه

ژن Ubiquitin به‌عنوان ژن مرجع در محاسبه میزان بیان نسبی ژن‌ها انتخاب و آغازگرهای رفت و برگشت مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزارهای Vector NTI (Rozen and Primer 3) (Skaletsky, 2000) و Oligo (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 ۱ درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد. برای حذف آلودگی DNA از RNase-free DNase I (Thermo Scientific) استفاده شد و سنتز رشته cDNA با استفاده از کیت SinaClon First Strand cDNA Synthesis (شرکت 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 Cycler (Bio-Rad, USA) و کیت SYBR Green I PCR Master Mix (TermoScientific, 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 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 and Schmittgen, 2001) در نرم افزار Microsoft Excel 2010 انجام گرفت.

مطالعات آنزیمی و بیوشیمیایی

بررسی آنزیم‌های کیتیناز، بتا-۱ و ۳ گلوکوناز، و پراکسیداز در دو تکرار بیولوژیک انجام شد. به لوله‌های آزمایش محتوی ۱ گرم بافت گیاهی، ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استات سدیم ۰/۰۵ مولار با pH ۵ اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در

باکتری با جمعیت 10^9 CFU/ml و ۲۴ و ۴۸ ساعت قبل از مایه‌زنی با بیمارگر، تیمار ۲: پوشش بذر با باکتری آنتاگونیست، پاشش باکتری آنتاگونیست به میزان ۲۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت 10^9 CFU/ml و ۲۴ و ۴۸ ساعت و پاشش ۲۵۰ میلی‌لیتر از محلول ماده القاء کننده سیلیکات پتاسیم، ۷۲ ساعت قبل از مایه‌زنی با بیمارگر، تیمار ۳: پوشش بذر با باکتری القاء گر، اضافه نمودن ۲۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری القاء گر با جمعیت 10^9 CFU/ml در اطراف گیاهچه (soil drench)، ۴۸ و ۱۲۰ ساعت قبل از مایه زنی با بیمارگر، تیمار ۴: پوشش بذر با باکتری القاء گر، اضافه نمودن ۲۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری القاء گر با جمعیت 10^9 CFU/ml در اطراف گیاهچه، ۴۸ و ۱۲۰ ساعت و پاشش ۲۵۰ میلی‌لیتر از محلول ماده القاء کننده سیلیکات پتاسیم، ۷۲ ساعت قبل از مایه‌زنی با بیمارگر، تیمار ۵: گیاهچه مایه‌زنی شده با بیمارگر، تیمار ۶: پاشش ۲۵۰ میلی‌لیتر از محلول ماده القاء کننده سیلیکات پتاسیم، ۷۲ ساعت قبل از مایه‌زنی با بیمارگر، تیمار ۷ (شاهد): گیاهچه سالم، بدون مایه‌زنی با باکتری/ بیمارگر/ ماده القاء کننده (جدول ۱). گلدان‌ها در میانگین دمایی ۲۶ الی ۲۸ درجه سلسیوس با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با رطوبت نسبی ۹۰ تا ۹۵ درصد قرار گرفتند. ارزیابی شدت بیماری براساس اندازه‌گیری طول لکه پس از ۷ روز انجام شد.

نمونه‌برداری از غلاف و برگ گیاهچه در فواصل زمانی صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری انجام شد. نمونه‌های مذکور در فویل آلومینیومی قرار داده شدند و در ازت مایع نگهداری و به فریزر ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شد.

تعیین شدت بیماری و شاخص کنترل بیماری

طول لکه بیماری روی گیاهچه پس از ۷ روز در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری شد. سپس شاخص اثربخشی تیمار روی کنترل بیماری (control efficacy) محاسبه شد (Sharma et al., 1990).

Yedidia et al. (2000) با تغییراتی به شرح ذیل انجام شد. مخلوط واکنش شامل، ۱۰۰ میکرولیتر محلول یک درصد کربوکسی متیل سلولز که در بافر استات سدیم ۰/۰۵ مولار با pH ۵/۵ تهیه شده بود و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی بود. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. واکنش با اضافه نمودن ۶۰۰ میکرولیتر معرف DNS و قرار دادن در آب جوش به مدت ۵ دقیقه متوقف شد. حجم مخلوط واکنش با آب مقطر استرون به ۲/۵ میلی لیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و میزان جذب مایع روشن‌شده در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. دستگاه اسپکتروفتومتر با مخلوط واکنش که در ۵۰ درجه سلسیوس تیمار نشده بود، صفر شد. فعالیت اختصاصی آنزیم به صورت میلی گرم استیل گلوکز آمین آزاد شده در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین نمونه تعیین شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت های مختلف استیل گلوکز آمین تهیه و اندازه گیری در طول موج ۵۰۰ نانومتر انجام شد.

ارزیابی فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش Tang and Newton (2005) انجام شد. بدین منظور به تیوب‌های محتوی ۲۰۰ میلی گرم بافت گیاهی خرد شده، ۱۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار محتوی ۰/۱ میلی مولار EDTA اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ و از مایه روشن‌شده عصاره آنزیمی استفاده شد. کمپلکس یا کوکتل آنزیمی واکنش شامل ۷۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH= 7) حاوی ۰/۱ میلی مولار EDTA، ۷۰۰ میکرولیتر

دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ گردید. از محلول روشن‌شده به‌عنوان عصاره آنزیمی برای بررسی فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و بتا- ۱ و ۳ گلوکوناز استفاده شد.

برای تهیه کیتین کلونیدی از روش Berger and Reynolds با اعمال تغییراتی استفاده شد. ۳ گرم پودر کیتین و ۱۲۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۳۷ درصد غلیظ در ظرف در بسته ریخته شد و به مدت یک شبانه روز روی شیکر با دور ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس ۴۰۰ میلی لیتر اتانل سرد به آن اضافه و به مدت یک شبانه روز دیگر روی شیکر قرار داده شد سپس محلول حاصله چند بار با آب مقطر سترون شسته و در سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. مایه رویی دور ریخته شد و پلت جهت تعدیل pH مجدداً با آب مقطر سترون دارای pH حدود ۵ شسته شد. پس از آخرین مرحله سانتریفوژ مقدار ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر به کیتین کلونیدی اضافه و محلول یک درصد کیتین تهیه و به‌عنوان سوسترا برای واکنش‌های آنزیمی کیتیناز در نظر گرفته و در یخچال نگهداری شد. ارزیابی فعالیت کیتیناز به روش Bansode and Bajekal (2006) انجام شد. دستگاه اسپکتروفتومتر با مخلوط واکنش که در ۴۰ درجه سلسیوس تیمار نشده بود، صفر شد. فعالیت اختصاصی آنزیم به صورت میلی گرم استیل گلوکز آمین آزاد شده در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین نمونه تعیین شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف استیل گلوکز آمین تهیه و اندازه‌گیری در طول موج ۵۴۰ نانومتر انجام شد.

ارزیابی فعالیت آنزیم بتا- ۱ و ۳ گلوکوناز به روش

جدول ۱- تیمارهای اعمال‌شده در شرایط گلخانه بر روی گیاهچه‌ها.

Table 1. Applied treatments on seedlings under greenhouse condition.

No	Treatments
1	<i>Pseudomonas protegens</i> Amol- 275 (antagonistic effect), seed coating and spraying
2	<i>Pseudomonas protegens</i> Amol- 275 (antagonistic effect), seed coating and spraying+ K2O3Si
3	<i>Pseudomonas protegens</i> Amol- 243 (induced resistance effect), seed coating and drenching
4	<i>Pseudomonas protegens</i> Amol- 243 (induced resistance effect), seed coating and drenching+ K2O3Si
5	<i>Rhizoctonia solani</i> RBL1
6	K2O3Si + <i>Rhizoctonia solani</i> RBL1
7	Control

جدول ۲- ژن‌های مرجع برای برنج و اطلاعات مربوط به پرایمرها.

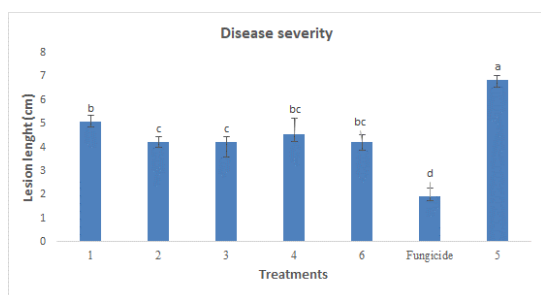
Table 2. Reference genes for rice and the primer information

length (bp)	Primer sequence	Gene	Primer
145	5'-CTACCCCTTCAAGCCTCAA-3' 5'-GCAGATCGAAAGCAACACCT-3'	Ubiquitin	Ubq
112	5'-TACAACGTACCGAGCAACCT-3' 5'-CAACTCCAAGGACCAATGCC-3'	β - 1, 3-Glucanase	Glu
196	5'-TCTACACCTACGACGCCTTC-3' 5'-TTGCCGTTGTTCTCTCCTT-3'	Chitinase	Chit
165	5'-CCAGAACTTCAGGGACAGGA-3' 5'-AGGTTGCTGTAGTAGGCGTT-3'	Proxidase	Pox

نشد، ولی پس از ۷ روز تیمارها تفاوت معنی‌داری از لحاظ تفاوت در طول لکه داشتند.

تأثیر تیمارها در کاهش علائم بیماری

به‌ترتیب تیمارهای ۲ و ۳ پس از قارچکش تیلت، تأثیر معنی‌داری را در کاهش شدت بیماری در مرحله گیاهچه-ای نشان دادند. پس از آن تیمارهای ۴ و ۶ سپس تیمار ۱ باعث کاهش شدت بیماری در مرحله گیاهچه‌ای شدند. تیمار شاهد نیز در گروه جداگانه‌ای قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱- ارزیابی شاخص شدت بیماری (طول لکه) در مرحله

گیاهچه‌ای

Fig. 1. Evaluation of disease severity index (lesion length) in seedling stage.

بررسی بیان ژن کیتیناز در فواصل زمانی مختلف پس از مایه‌زنی با بیمارگر

بیان ژن کیتیناز در تیمار شاهد آلوده (گیاه مایه‌زنی شده

با بیمارگر) در فاصله زمانی ۶ و ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی

گیاکول ۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول عصاره آنزیمی استخراج شده است. واکنش با اضافه نمودن ۷۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار شروع شده و افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی براساس میزان تراگایاکول تشکیل شده و با استفاده از ضریب خاموشی $1/33 \mu\text{mol. cm}^{-1}$ به دست آمد. برای هر نمونه قرائت آنزیمی ۳ بار تکرار شد. جهت محاسبه فعالیت اختصاصی آنزیم‌های مورد آزمون و تعمیم فعالیت آنزیم به میلی‌گرم پروتئین موجود در نمونه‌ها به روش Bradford (1976) انجام شد. هر نمونه سه بار تکرار و میزان جذب نوری آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت و پروتئین آن اندازه‌گیری شد. از گیاه سالم به‌عنوان شاهد آزمایش استفاده شد.

نتایج

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

بیمارگر افزایش قابل توجهی نداشت ولی به‌طور چشم‌گیری تا فاصله زمانی ۷۲ ساعت بیان ژن افزایش یافته و این تغییر بیان نسبت به دیگر تیمارها بالاتر بوده و اختلاف معنی‌داری داشت. استفاده از باکتری آنتاگونیست و نیز سیلیکات پتاسیم صرفاً سبب افزایش بیان ژن کیتیناز در فاصله زمانی ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی گیاهچه‌ها با عامل بیماری شد و در ساعات اولیه پس از مایه‌زنی هیچ تأثیری بر میزان بیان ژن نداشت. سریع‌ترین القای پاسخ ژن نسبت به عامل بیماری در ترکیب تیماری باکتری آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکات پتاسیم و در فاصله زمانی ۶ ساعت مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری با ساعات اولیه در دیگر تیمارها داشت. بیان ژن مذکور ۵/۱۱ برابر بیشتر از تیمار باکتری آنتاگونیست و ۵/۲۷ برابر بیشتر از تیمار سیلیکات پتاسیم در ۶ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر بود. استفاده از باکتری القاکننده باعث افزایش بیان ژن کیتیناز در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی شد (۳/۱۸ برابر تیمار شاهد آلوده) که نسبت به دیگر تیمارهای مورد مطالعه در این بازه زمانی بالاتر بوده و اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۳).

بررسی بیان ژن بتا- ۱ و ۳ گلوکوناز در فواصل زمانی مختلف پس از مایه‌زنی با بیمارگر

حداقل بیان ژن بتا - ۱ و ۳ گلوکوناز در شاهد آلوده مشاهده شده و اختلافی بین ساعات ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت در میزان بیان ژن وجود نداشت. نکته قابل توجه کاهش بیان این ژن در شاهد آلوده بود. بیان ژن در تیمار استفاده از سیلیکات پتاسیم در ۶ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر افزایش نشان داد (۱۶/۲۱ برابر تیمار شاهد آلوده) و در فاصله زمانی ۲۴ ساعت به حداکثر بیان رسید (۱۰۵ برابر تیمار شاهد آلوده) و سپس در فاصله زمانی ۷۲ ساعت به شدت کاهش یافت. لذا سیلیکات پتاسیم قادر است ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر، باعث بیان حداکثری ژن بتا- ۱ و ۳ گلوکوناز در گیاه شود و گیاه را وارد مسیرهای مقاومتی نموده و باعث القاء مقاومت و تحمل گیاه در مقابل قارچ عامل بیماری سوختگی

غلاف شود. بیان ژن در ترکیب تیماری باکتری آنتاگونیست (پوشش بذر و پاشش) در تلفیق با سیلیکات پتاسیم و مایه‌زنی گیاهچه با قارچ عامل بیماری، در فاصله زمانی ۶ ساعت افزایش بسیار قابل توجهی داشت که در بین تیمارها بالاترین میزان بود (۴۱۴ برابر شاهد آلوده) و در فاصله زمانی ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری با افزایش بیان چشم‌گیر، به حداکثر مقدار خود رسید که بالاترین میزان بیان در تمام تیمارها بود. اگرچه میزان بیان در این ترکیب تیماری در فاصله زمانی ۷۲ ساعت کاهش یافت، با این حال در مقایسه با شاهد آلوده در فاصله زمانی ۷۲ ساعت افزایش بیان نشان داد (۶۵/۲۰ برابر شاهد آلوده). لذا تلفیق باکتری آنتاگونیست و سیلیکات پتاسیم سبب افزایش قابل توجه بیان ژن گلوکوناز در مراحل اولیه مایه‌زنی (۶ ساعت) پس از مایه‌زنی با بیمارگر شد که جهت جلوگیری از توسعه عامل بیماری می‌تواند بسیار موثر باشد. بنابراین تیمار باکتری آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکات پتاسیم توانسته گیاه را در زمان‌های اولیه فرآیند مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری القاء نموده و باعث شود ژن گلوکوناز در زمان کوتاه‌تری بیان شود. ضمناً بیان ژن مذکور در این تیمار ۱۱/۶۲ برابر بیشتر از تیمار باکتری آنتاگونیست و ۲۵/۵۶ برابر بیشتر از تیمار سیلیکات پتاسیم در فاصله زمانی ۶ ساعت پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری بود. مقایسه بیان ژن بتا- ۱ و ۳ گلوکوناز در تیمار باکتری آنتاگونیست و تیمار ماده القاء‌کننده نشان دهنده اثر بیشتر و سریع‌تر باکتری آنتاگونیست در افزایش تعداد رونوشت‌های ژن بتا- ۱ و ۳ گلوکوناز در پاسخ به عامل بیماری بود. بیان ژن در تیمار باکتری آنتاگونیست، در فاصله زمانی ۶ ساعت، ۲/۱۹ برابر، در فاصله زمانی ۲۴ ساعت، ۱/۱۴ برابر و در فاصله زمانی ۷۲ ساعت، ۳۹۴ برابر تیمار سیلیکات پتاسیم بود. علاوه بر این، در تیمار باکتری آنتاگونیست حداکثر بیان ژن در فاصله زمانی ۷۲ ساعت مشاهده شد که این افزایش بیان از شروع مایه‌زنی به صورت تدریجی در طول زمان صورت گرفت ولی در تیمار سیلیکات پتاسیم،

مسیرهای مقاومت نموده و باعث القاء مقاومت و تحمل در مقابل قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف گردد (جدول ۳).

بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز در فواصل زمانی مختلف پس از مایه‌زنی با بیمارگر: فعالیت آنزیم کیتیناز تیز تحت تأثیر تیمارهای مختلف قرار گرفته و نسبت به شاهد آلوده تغییرات قابل توجهی مشاهده شد. در تیمار استفاده از سیلیکات پتاسیم روند افزایشی تولید آنزیم از فاصله زمانی ۶ (۱/۳۷) برابر شاهد آلوده، آغاز و تا ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی بیمارگر ادامه داشت. در فاصله زمانی ۲۴ ساعت، کاهش مشهودی پیدا نمود و مجدداً در فاصله زمانی ۴۸ ساعت (۱/۴۵) برابر شاهد آلوده) با افزایش قابل ملاحظه‌ای تولید آنزیم همراه بود. در نهایت در فاصله زمانی ۷۲ ساعت با کاهش تولید آنزیم (۱/۲۱) برابری شاهد آلوده) روبرو شد. بنابراین تیمار مذکور در فواصل زمانی ۱۲ و ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر با افزایش قابل توجه تولید آنزیم کیتیناز روبرو بود. به‌طور کلی، تیمار مورد استفاده دارای بیشترین میزان تولید آنزیم و سریع‌ترین پاسخ آنزیمی به عامل بیماری بود. نتایج نشان داد که در اکثر تیمارهای مورد مطالعه اگرچه در ساعات اولیه مایه‌زنی، میزان تولید آنزیم افزایش یافت ولی بیشترین میزان پاسخ آنزیمی در ساعات انتهایی مورد مطالعه و به‌خصوص در ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر به وقوع پیوست. این تغییر و افزایش میزان تولید نسبت به دیگر ساعات بررسی، اختلاف معنی‌داری را نشان داد. باکتری آنتاگونیست به تنهایی توانست سبب افزایش میزان تولید کیتیناز در ساعت اولیه مایه‌زنی (۶ ساعت) و نیز فاصله زمانی ۴۸ ساعت شود که این افزایش تولید بعد از تیمار سیلیکات پتاسیم، بالاترین میزان تولید بوده و اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری با دیگر تیمارها به جز ترکیب تیماری سیلیکات پتاسیم و باکتری القاء‌کننده داشت. استفاده از سیلیکات پتاسیم به همراه باکتری آنتاگونیست باعث شد که تولید حداکثری آنزیم به تعویق افتاده و در فاصله زمانی ۷۲ ساعت بالاترین فعالیت آنزیم مشاهده شود (شکل ۲).

حداکثر بیان در فاصله زمانی ۲۴ ساعت مشاهده شد و در فاصله زمانی ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر کاهش شدیدی نشان داد. استفاده از تیمار باکتری القاء‌کننده و نیز ترکیب تیماری باکتری القاء‌کننده و سیلیکات پتاسیم در پاسخ به عامل بیماری، سبب افزایش بیان ژن بتا-۱ و ۳ گلوکوناز شد. این افزایش بیان در زمان ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی در هر دو تیمار به‌کار رفته افزایش چشم‌گیری نسبت به فاصله زمانی ۶ ساعت نشان داده (به ترتیب ۱۳۰ برابر و ۶۶/۹۳ برابر تیمار شاهد آلوده) و در تیمار باکتری القاء‌کننده در فاصله زمانی ۷۲ ساعت به حداکثر مقدار خود رسید (۳۶۲/۳۰) برابر تیمار شاهد آلوده، درحالی‌که در ترکیب تیماری باکتری القاء‌کننده و سیلیکات پتاسیم افزایش قابل مشاهده‌ای نداشت (جدول ۳).

بررسی بیان ژن پراکسیداز در فواصل زمانی مختلف پس از مایه‌زنی با بیمارگر: در شاهد آلوده روند افزایشی بیان ژن از فاصله زمانی ۶ ساعت با افزایش بسیار کمی شروع و تا ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی بیمارگر ادامه داشت و در فاصله زمانی ۷۲ ساعت به حداکثر رسید که با توجه به حساسیت رقم فجر این موضوع طبیعی به نظر می‌رسد که ژن‌های مرتبط در زمان ۷۲ ساعت فعال شوند. سریعترین افزایش چشمگیر در پاسخ به عامل بیماری در تیمار باکتری آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکات پتاسیم در ۶ ساعت پس از مایه‌زنی مشاهده شد (۱۳) برابر شاهد آلوده) که اختلاف محسوسی با زمان مشابه در دیگر تیمارها داشته و جهت جلوگیری از توسعه عامل بیماری می‌تواند بسیار مؤثر باشد. بالاترین میزان بیان ژن پراکسیداز در زمان ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی در تیمار سیلیکات پتاسیم مشاهده شد. در صورتی که بیان ژن مزبور در شاهد آلوده ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر به حداکثر رسید، که مبین این موضوع است که سیلیکات پتاسیم قادر است ۴۸ ساعت زودتر از شاهد آلوده، گیاه را در بیان ژن پراکسیداز به حداکثر برساند. لذا استفاده از سیلیکات پتاسیم می‌تواند گیاه را وارد

جدول ۳- بیان ژن کیتیناز، بتا-۱ و ۳ گلوکوناز و پراکسیداز در برنج ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف در تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ (شاهد)

Table 3. Chitinase, β -1, 3gluconase and peroxidase gene expression in rice 6, 24 and 72 hours after inoculation with *Rhizoctoniasolani*, the causal agent of sheath blight disease of rice in treatments 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 (control)

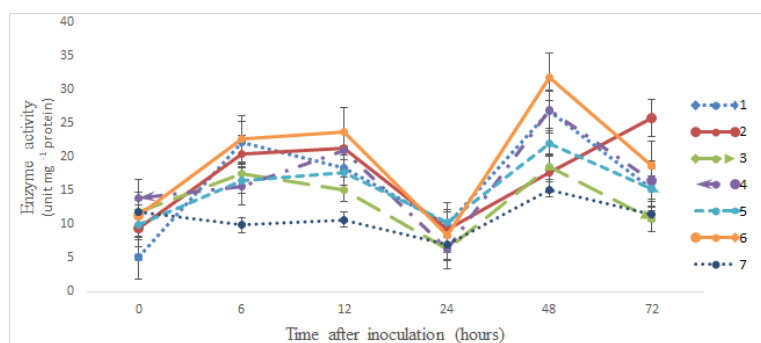
Treatments	Chitinase			β - 1, 3 gluconase			Proxidase		
	6hai	24hai	72hai	6hai	24hai	72hai	6hai	24hai	72hai
1	0.68 ^f	0.18 ^f	11.62 ^b	8.2 ^{gh}	54.08 ^{de}	142.03 ^b	3.58 ^e	33.58 ^a	25.47 ^{bc}
2	3.48 ^d	2.08 ^e	0.75 ^{ef}	95.34 ^c	206.9 ^a	25.43 ^{fi}	12.9 ^d	2.16 ^e	0.77 ^e
3	0.79 ^{ef}	3.85 ^d	0.81 ^{ef}	0.09 ⁱ	58.73 ^d	141.3 ^b	0.83 ^e	32.04 ^{ab}	0.11 ^e
4	0.33 ^f	0.2 ^f	3.96 ^d	0.11 ⁱ	30.12 ^{e-h}	32.81 ^{d-g}	0.73 ^e	23.53 ^c	19.43 ^{cd}
5	0.5 ^f	1.21 ^{ef}	14.33 ^a	0.23 ⁱ	0.45 ⁱ	0.39 ⁱ	1.04 ^e	3.78 ^e	25.48 ^{bc}
6	0.66 ^f	0.12 ^f	8.69 ^c	3.73 ^{hi}	47.25 ^{def}	0.36 ⁱ	3.55 ^e	35.77 ^a	14.97 ^d
7	1.02 ^{ef}	1.01 ^{ef}	1.07 ^{ef}	1.01 ⁱ	1.02 ⁱ	1 ⁱ	1.00 ^e	1.00 ^e	1.01 ^e

The means with the same letters are not significant at 5% level according to Duncan's test.hai: hour after inoculation.

تولید آنزیم گلوکوناز از فاصله زمانی ۶ ساعت شروع و در فاصله زمانی ۱۲ ساعت با افزایش حداکثری فعالیت آنزیم همراه شد. روند افزایش تولید آنزیم در فاصله زمانی ۴۸ ساعت و فاصله زمانی ۷۲ ساعت نیز مشاهده شد و از لحاظ مقدار تولید بالاتر از دیگر ترکیبات تیماری بودند. بیشترین میزان بیان در فاصله زمانی ۷۲ ساعت و ترکیب تیماری باکتری آنتاگونیست و سیلیکات پتاسیم مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری با دیگر تیمارها داشت. نکته قابل توجه، مشاهده شیب افزایشی تولید در واحد زمان و وجود حداکثر مقدار تولید آنزیم در ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی برای تمام تیمارهای مورد مطالعه بود (شکل ۳).

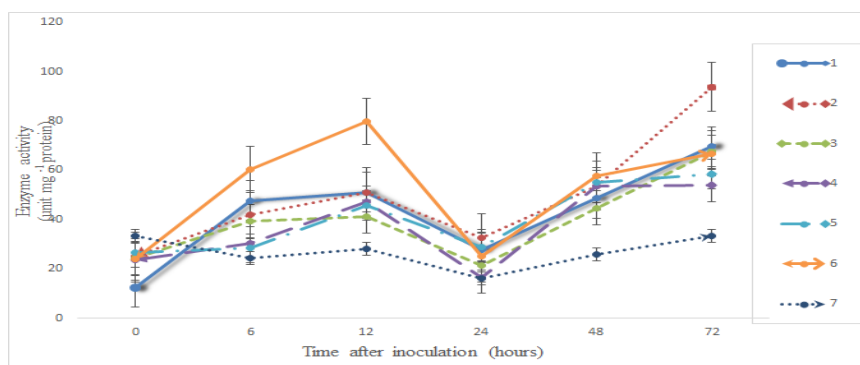
بررسی فعالیت آنزیم بتا-۱ و ۳ گلوکوناز در فواصل زمانی مختلف پس از مایه‌زنی با بیمارگر

براساس داده‌های بررسی تولید آنزیم بتا-۱ و ۳ گلوکوناز در شاهد آلوده تولید آنزیم مذکور در فاصله زمانی ۱۲ ساعت، با افزایش ۱/۶۳ برابری شاهد منفی به حداکثر رسیده و سپس روند کاهش در فاصله زمانی ۲۴ ساعت، مجدداً روند افزایش تولید آنزیم در فاصله زمانی ۴۸ ساعت شروع شد (۲/۱۳ برابری شاهد منفی) و نهایتاً در فاصله زمانی ۷۲ ساعت به حداکثر تولید رسید. در تمام تیمارهای مورد مطالعه، در نقطه زمانی صفر میزان تولید آنزیم در سطح پایین و یکسانی قرار داشت. در تیمار سیلیکات پتاسیم روند افزایش



شکل ۲- روند تغییرات فعالیت آنزیمی کیتیناز در برنج صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف در تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ (شاهد)

Fig. 2. Trend of changings of chitinase enzymatic activity in rice 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after inoculation with *Rhizoctoniasolani*, the causal agent of sheath blight disease of rice in treatments 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 (control).



شکل ۳- روند تغییرات فعالیت آنزیمی بتا- ۱ و ۳ گلوکوناز در برنج صفر، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف در تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ (شاهد).

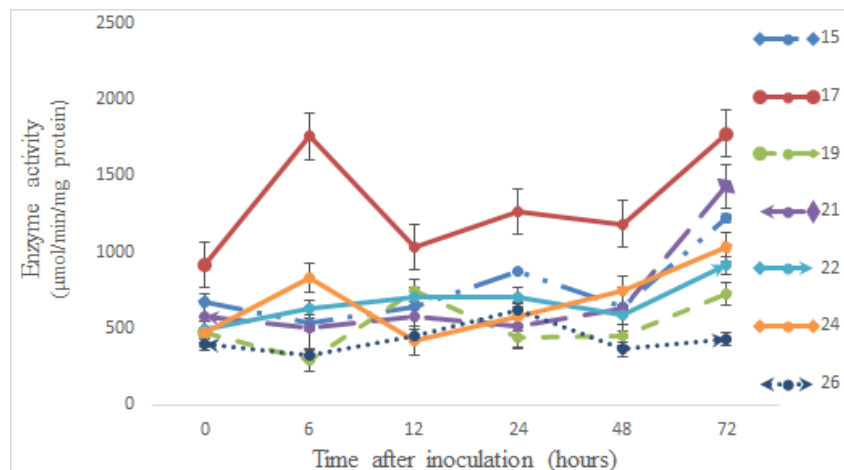
Fig. 3. Trend of changings of β -1, 3glucuronase enzymatic activity in rice 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after inoculation with *Rhizoctoniasolani*, the causal agent of sheath blight disease of rice in treatments 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 (control).

معنی‌دار سطح تولید آنزیم در گیاه شد. بنابراین تیمار مذکور توانست گیاه را قبل از شروع پروسه بیماری‌زایی و پس از مراحل اولیه مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری، القاء نموده و باعث بالا رفتن سطح تولید آنزیم پراکسیداز در گیاه شود. ضمناً سطح تولید آنزیم در تیمار باکتری آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکات پتاسیم، ۳/۲۸ برابر تیمار باکتری آنتاگونیست در فاصله زمانی ۶ ساعت و ۱/۴۴ برابر تیمار باکتری آنتاگونیست در فاصله زمانی ۷۲ ساعت بود. همچنین سطح تولید آنزیم در تیمار باکتری آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکات پتاسیم، ۲/۱۱ برابر تیمار سیلیکات پتاسیم در فاصله زمانی ۶ ساعت و ۱/۷۱ برابر تیمار سیلیکات پتاسیم در فاصله زمانی ۷۲ ساعت بود (شکل ۴).

سطح فعالیت پراکسیداز در ترکیب تیماری باکتری القاء‌کننده و سیلیکات پتاسیم، در فاصله زمانی صفر افزایش داشت که در گروه‌های متفاوت آماری قرار گرفت و بیانگر آن است که باکتری القاء‌کننده در ترکیب با سیلیکات پتاسیم توانسته است باعث افزایش آنزیم پراکسیداز در گیاه قبل از مایه‌زنی با بیمارگر شود. پس از آن در فواصل زمانی ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت با کاهش تولید آنزیم روبرو شد. درحالی‌که در فاصله زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری با افزایش تولید آنزیم همراه بود. نتایج حاصله با نتایج به‌دست آمده از بیان ژن که در فاصله زمانی ۶ ساعت، با کاهش بیان روبرو بود، مطابقت دارد.

بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با عامل بیماری سوختگی غلاف

بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد که در تیمار شاهد آلوده (مایه زنی گیاه با قارچ) همانند میزان بیان این ژن، در فاصله زمانی ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی به حداکثر مقدار خود رسید و نسبت به دیگر زمان‌ها در این تیمار اختلاف معنی‌دار داشت. تولید آنزیم پراکسیداز در ترکیب تیمار باکتری آنتاگونیست و سیلیکات پتاسیم، در فاصله زمانی صفر ۲/۲۹ برابر شاهد (گیاه بدون اعمال تیمار) بود. این مبین آن است که در اثر مایه‌زنی با باکتری آنتاگونیست و سیلیکات پتاسیم سطح تولید آنزیم قبل از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری به‌طور معنی‌داری بالا رفته است. که نشان از القاء مقاومت و در نتیجه بالا رفتن سطح معنی‌دار تولید آنزیم در گیاه دارد. همچنین تولید آنزیم مذکور، ۶ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر به‌طور معنی‌داری به سطح بالایی رسید (۲/۸ برابر شاهد آلوده) که جهت جلوگیری از توسعه عامل بیماری بسیار مهم می‌باشد. در فواصل زمانی ۱۲، ۲۴ (۱/۸) برابر شاهد آلوده) و ۴۸ ساعت، سطح تولید آنزیم در مقایسه با فاصله زمانی ۶ ساعت، کاهش و مجدداً در فاصله زمانی ۷۲ ساعت افزایش یافت به گونه‌ای که کمی بیشتر از سطح تولید آنزیم در فاصله زمانی ۶ ساعت بود. بنابراین در دو فاصله زمانی ۶ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی گیاه با بیمارگر اعمال این تیمار باعث افزایش



شکل ۴- روند تغییرات فعالیت آنزیمی پراکسیداز در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی گیاه برنج با بیمارگر در تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ (شاهد).

Fig. 4. Trend of changings of peroxidase enzymatic activity in rice 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after inoculation with *Rhizoctonia solani*, the causal agent of sheath blight disease of rice in treatments 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 (control).

می‌باشد. تلفیق باکتری آنتاگونیست و سیلیکات پتاسیم سبب افزایش قابل توجه بیان ژن کیتیناز در مراحل اولیه آلودگی به بیمارگر یعنی ۶ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر شد که جهت جلوگیری از توسعه عامل بیماری می‌تواند بسیار موثر باشد. به عبارتی بیان شدن زودتر ژن‌های کدکننده PR پروتئین‌های گیاه می‌تواند باعث مقاومت گیاه علیه بیمارگر شود.

افزایش فعالیت گایاکول پراکسیداز در غلاف برگ برنج که با سیلیس تیمار شده بود، موجب کاهش پیشرفت لکه‌های سوختگی غلاف شده است (Schurt et al., 2014). پراکسیداز نقش مهمی را در پاسخ دفاعی میزبان از طریق تولید مقادیر ضد میکروبی پراکسید هیدروژن بازی می‌کند و از طرفی باعث لیگنینی شدن دیواره سلولی شده و پیوندهای متقابلی را با پروتئین‌های دیواره سلولی ایجاد می‌نماید (Torres et al., 2006). نقش فعال سیلیس در افزایش مقاومت برنج به بلاست همراه با افزایش سریع غلظت فن‌ها و فیتوالکسین‌ها و همچنین فعال شدن سریع و قوی ژن‌های POX و PR-1 بوده است (Rodrigues et al., 2004). فعالیت بالای پراکسیداز به دنبال آلودگی برگ‌های گندم تیمار شده با سیلیس با یک افزایش در غلظت لیگنین همراه بود است (Xavier- Filha et al., 2011). در این تحقیق در تمام تیمارها به جز تیمار باکتری آنتاگونیست

تیمار باکتری القاء‌کننده و سیلیکات پتاسیم، در مقایسه با تیمار باکتری القاء‌کننده سطح بالاتری از تولید آنزیم را نشان داد. همچنین توانست سطح بالاتری از تولید آنزیم را در فواصل زمانی صفر (۱/۲۱ برابر تیمار باکتری القاء‌گر)، ۶ (۱/۷۰ برابر تیمار باکتری القاء‌گر)، ۲۴ (۱/۱۸ برابر تیمار باکتری القاء‌گر)، ۴۸ (۱/۳۷ برابر تیمار باکتری القاء‌گر) و ۷۲ ساعت (۱/۹۶ برابر تیمار باکتری القاء‌گر) پس از مایه‌زنی با بیمارگر حفظ نماید (شکل ۴).

بحث

در این آزمایش میزان بیان و فعالیت آنزیم‌های PR2 (بتا- ۱ و ۳ گلوکوناز) و PR3 (کیتیناز) اندازه‌گیری شد. وجود بیمارگر در تعامل با میزبان و کاربرد سیلیکات پتاسیم و باکتری‌ها سبب افزایش بیان ژن‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌های مذکور شد. بیان ژن کیتیناز در مقایسه با بیان بتا- ۱ و ۳ گلوکوناز در فواصل زمانی مشابه بالاتر بود. با این حال افزایش بیان ژن ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی بیمارگر مشاهده گردید. لذا بیان این ژن و متعاقباً تولید آنزیم پس از ۷۲ ساعت که قارچ عامل بیماری روی گیاه کاملاً استقرار یافته و در حال توسعه می‌باشد، دیر هنگام بوده و در نتیجه قادر به کنترل بیماری نخواهد بود و به همین دلیل رقم فجر یک رقم حساس به بیماری

یا مایه‌زنی ریشه، به گیاه افزوده می‌شود، دیرتر اتفاق می‌افتد. در مقایسه تولید سطوح آنزیمی، تیمار باکتری آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکات پتاسیم در فاصله زمانی ۶ و تیمار باکتری القاءگر در تلفیق با سیلیکات پتاسیم در فاصله زمانی ۴۸ ساعت، باعث افزایش تولید آنزیم پراکسیداز در گیاه شدند. هر چند در فاصله زمانی صفر، تیمار باکتری آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکات پتاسیم، ۲/۲۹ برابر شاهد منفی دارای سطوح بالای آنزیمی بوده است، که مبین آن است که باکتری آنتاگونیست در ترکیب با ماده القاء کننده مقاومت توانستند سطح تولید آنزیم پراکسیداز را قبل از مایه‌زنی با بیمارگر در گیاه افزایش دهند. این مهم در تیمار باکتری القاءگر در تلفیق با سیلیکات پتاسیم و فاصله زمانی صفر، ۱/۴۵ برابر شاهد (گیاه بدون اعمال تیمار) بوده است. که نشان دهنده افزایش خاصیت القاءکنندگی جدایه باکتری ۲۷۵ در مقایسه با جدایه باکتری ۲۴۳ می‌باشد که جدایه ۲۷۵ روی گیاهچه پاشش شده بود ولی جدایه ۲۴۳ به‌صورت اضافه نمودن به خاک (Soil drench) روی گیاه مایه‌زنی شده بود. شاید بتوان در مورد تیمار باکتری القاءکننده در تلفیق با سیلیکات پتاسیم اظهار نظر نمود که به جهت مایه‌زنی ریشه و تماس باکتری از طریق ریشه، افزایش تولید آنزیم پراکسیداز دیرتر از تیمار باکتری آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکات پتاسیم و در نقاط زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر، اتفاق افتاد. به عبارتی تیمار باکتری آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکات پتاسیم به جهت پاشش مستقیم باکتری آنتاگونیست و تیمار باکتری القاءکننده در تلفیق با سیلیکات پتاسیم به جهت مایه-زنی باکتری القاءگر به ریشه گیاه به ترتیب باعث تعجیل و تاخیر در تولید آنزیم پراکسیداز در گیاه شدند.

کاربرد سیلیکات پتاسیم سبب افزایش بیان و نیز افزایش چشمگیر تولید آنزیم‌های بتا-۱ و ۳ گلوکوناز و کیتیناز شده و باعث اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها شد. نتایج تحقیق نشان داد که استفاده از سیلیکات پتاسیم به همراه باکتری آنتاگونیست باعث کاهش میزان تولید و نیز به‌تعویق افتادن

در تلفیق با سیلیکات پتاسیم، بیان ژن پراکسیداز ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر به حداکثر مقدار خود رسید. بیان ژن در شاهد آلوده ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر به حداکثر بیان رسید که این زمان برای انتقال پیام تنش دیر هنگام می‌باشد و باعث توسعه و استقرار سریع‌تر عامل بیماری خواهد شد. لذا تیمارهای باکتری آنتاگونیست، باکتری القاء کننده و ترکیب آن با سیلیکات پتاسیم و سیلیکات پتاسیم نشان دادند که می‌توانند ۴۸ ساعت زودتر و در تیمار باکتری آنتاگونیست در ترکیب با سیلیکات پتاسیم، ۶۶ ساعت زودتر از شاهد آلوده به حداکثر بیان رسیده و باعث القاء مقاومت در گیاه گردند.

آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند سوپراکسید دیسمیوتاز (SOD) و پراکسیداز (POX) در دفع انواع مختلف ROS شرکت می‌نمایند (Barna et al., 2012). مولکول‌های ROS می‌توانند به‌عنوان پیام‌رسان در مکانیسم‌های مقاومت دخیل باشند که منجر به فعال شدن ژنهای مرتبط با دفاع می‌شود و در فعالیت دیگر مولکول‌های پیام‌رسان مهم نیز مداخله می‌نمایند (Chen et al., 2014). تجمع غیر کنترل شده ROS موجب گسترش مرگ سلولی می‌شود که در بعضی موارد می‌تواند حساسیت گیاه را افزایش دهد (Torres et al., 2006). بنابراین تولید و حذف ROS در حین برهمکنش‌های گیاهی و پاتوژن به‌شدت کنترل می‌شود. پراکسیداز یکی از مهمترین آنزیم‌های فعال در حذف ROS است و کاتالیزور اکسیدورودکس با استفاده از پراکسید هیدروژن را بر عهده دارد (Almagro et al., 2009). در تیمار بذری با سوسپانسیون باکتری *P. fluorescens* افزایش در فعالیت آنزیم پراکسیداز ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی با قارچ *R. solani* AG 1-IA آغاز شد. همچنین فعالیت پراکسیداز در تیمار بذر با سویه‌های باکتری *P. fluorescens* و پس از آن غوطه‌وری ریشه نشا در سوسپانسیون، پس از ۱۲ ساعت آغاز و حداکثر فعالیت آنزیم در روز سوم مشاهده شد (Reshma et al., 2018). به‌نظر می‌رسد تولید سطوح آنزیمی و بیان ژن پراکسیداز زمانی که باکتری به صورت خیساندن خاک

افزایش مقاومت به علت افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط با دفاع در برگ، از جمله پلی فنول اکسیداز، پراکسیداز، فنیل آلانین آمونالیاز و بتا- ۱ و ۳ گلوکاناز و نیز افزایش تولید ترکیبات ضد قارچی، مانند محصولات متابولیسم فنل (لیگنین)، فلاونوئوئید، فیتوالکسین و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در گیاهان و در نهایت فعال شدن برخی از ژن‌های مرتبط با دفاع گیاه باشد (Fauteux et al., 2005; Datnoff et al., 2007; Van Bockhaven et al., 2013). دو مکانیسم درگیر در افزایش فعالیت آنزیم‌ها و ترکیبات ضد قارچی به دلیل کاربرد سیلیکون در گیاهان می‌توانند پاسخ دفاعی شبیه به مقاومت اکتسابی سیستمیک را ایجاد کنند (Cai et al., 2009). Zhang et al. (2013) نشان دادند که استفاده از غلظت ۱/۵ میلی مولار سیلیکون باعث بهبود مقاومت برنج به بیماری سوختگی غلاف می‌شود. علاوه بر این، محلول سیلیکون در غلظت ۲ میلی مولار، منطقه زیرمنحنی پیشرفت توسعه طول نسبی لکه را به میزان ۳۴/۲ درصد در گیاه برنج کاهش داد (Schurt et al., 2014).

نتایج بررسی تأثیر تیمارها بر کاهش علایم بیماری در مرحله گیاهچه‌ای نشان داد، کلیه ترکیبات تیماری در مقایسه با شاهد آلوده توانستند بیماری را کنترل نمایند که نشان از همبستگی مثبت بیان ژن و فعالیت آنزیمی و متعاقباً کنترل بیماری داشت ولی هیچکدام از ترکیبات تیماری به اندازه قارچکش (تیلت) نتوانستند، بیماری را کنترل نمایند. در گروه بندی اندازه گیری طول لکه روی گیاهچه نیز تیمار باکتری آنتاگونیست و باکتری آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکات پتاسیم در گروه‌های متفاوت آماری قرار گرفتند که مبین آن است که باکتری آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکات پتاسیم بهتر از باکتری آنتاگونیست به تنهایی توانست باعث کاهش علائم بیماری شود که نشان دهنده تأثیر مثبت استفاده ترکیبی از جدایه آنتاگونیست با سیلیکات پتاسیم می‌باشد و این تأثیر بیشتر از زمانی بود که باکتری آنتاگونیست یا

تولید آنزیم کیتیناز شده در حالی که به همراه باکتری القاء کننده، میزان تولید آنزیم را افزایش داد. مشخص شده است که *R. solani* AG 1-IA جهت به دست آوردن مواد غذایی مورد نیاز و دستیابی به رشد توده‌ای به طور کامل سلول‌های برگ برنج را از بین میبرد. همچنین آسیب سلولی به طور قابل توجهی با انتشار آنزیم‌های هیدرولیتیک ترشح شده و توکسین‌های اختصاصی غیرمیزبانی به داخل بافت سالم غلاف برگ افزایش می‌یابد (Ou, 1985). گیاه برنج که با سیلیس تیمار شدند به سرعت و به طور مؤثرتری به آلودگی *R. solani* AG 1-IA واکنش نشان دادند، چرا که در مناطقی که سیلیس به فراوانی وجود دارد، تاخیری در نفوذ قارچی و کاهش کلونیزاسیون بافت، ایجاد شده و باعث میشود یک فرصت کافی برای فعال شدن مکانیزم‌های دفاعی در گیاه بوجود آید. در تعامل برنج با قارچ عامل سوختگی غلاف، سیلیس نشان داد که پتانسیل بالایی برای کاهش پیشرفت لکه‌های بیماری سوختگی غلاف به طور هماهنگ و همزمان با افزایش فعالیت‌های آنزیم‌های دفاعی PAL، POX، PPO و CHI دارد (Schurt et al., 2014).

به طور کلی اثر سیلیس بر مقاومت گیاهان به بیماری‌ها به علت تجمع سیلیس جذب شده در بافت اپیدرمی است و یا بیان متابولیکی یا پاسخ‌های دفاعی میزبان به واسطه بیماری‌زایی عوامل بیمارگر محسوب می‌شود (Fauteux et al., 2005; Datnoff et al., 2007; Van Bockhaven et al., 2013). با توجه به ویژگی‌های سیتولوژیک و بیماری‌زایی مرتبط با مقاومت فیزیکی، سیلیسی که در سطح بافت قرار می‌گیرد، باعث میشود تا تعداد لکه‌ها بر روی برگ برنج کاهش یابد و یا باعث افزایش دوره کمون بیماری می‌شود. این موضوع در پاتوسیستم‌های *Pyricularia grisea* و *R. solani* AG 1-IA گزارش شده است (Rodrigues et al., 2001; Seebold et al., 2004). علاوه بر این، Kim et al. (2002) گزارش نمودند که شدت بیماری بلاست برگ در ارقام حساس و نیمه مقاوم برنج که دیواره‌های سلولی اپیدرمی سیلیسی شده داشتند، کاهش یافته بود.

پتاسیم را در افزایش سطح مقاومت پایه به بیمارگر غلاف و برگ برنج تایید نمود. همچنین از آنجایی که در ابتدای فرآیند بیماری (۶ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر) در تیمار باکتری آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکات پتاسیم بالاترین سطح بیان ژن در پراکسیداز و کیتیناز مشاهده شد و سپس در فاصله زمانی ۲۴ ساعت در بتا ۱ و ۳ گلوکوناز به حداکثر بیان رسید و این تغییرات در مقایسه با شاهد آلوده، افزایش بیان نشان داده بود، بنابراین تیمار مذکور به‌عنوان بهترین تیمار شناسایی شد.

سیلیکات پتاسیم به‌صورت منفرد استفاده شده بودند. با این حال این موضوع در خصوص استفاده از باکتری القاء‌گر در تلفیق با سیلیکات پتاسیم و باکتری القاء‌گر به‌تنهایی مشهود نبوده و هر دو در یک گروه آماری قرار گرفتند. ولی در مقایسه با شاهد آلوده هر دو تیمار مذکور توانستند بیماری را کنترل نمایند. سیلیکات پتاسیم نیز در گروه‌های مشترک آماری با سایر ترکیبات تیماری قرار گرفت که نشان از القاء واکنش‌های دفاعی گیاه همانند سایر تیمارها داشت.

نتایج حاصل از این مطالعه اثرات سودمند سیلیکات

References

- ALMAGRO, L., L. V. GOMEZ ROS, S. BELCHI-NAVARRO, R. BRU, A. ROS BARCELO and M.A. PEDRENO, 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60: 377–390.
- BALASUBRAMANIAN, V., D. VASHISHT, J. CLETUS, and N. SAKTHIVEL, 2012. Plant β -1,3-glucanases: Their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnol Lett*, 34:1983–1990.
- BANSODE, V. B. and S. S. BAJEKAL, 2006. Characterization of chitinases from microorganisms isolated from Lonar Lake. *Indian Journal of Biotechnology*, 5: 357-363.
- BARNA, B., J. FODOR, B. D. HERRACH, M. POGONY and Z. Kiraly, 2012. The janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry*, 59: 37–43.
- BERGER, R. and M. REYNOLDS, 1958. The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 29: 522-534.
- BHATTACHARYYA, P. N. and D. K. Jha, 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28:1327–1350.
- BOTHA, A.M., M.A.C. NAGEL, A.J. VAN DER WESTHUIZEN and F.C. BOTHA, 1998. Chitinase isoenzymes in near-isogenic wheat lines challenged with Russian wheat aphid, exogenous ethylene, and mechanical wounding. *Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei*, 39: 99-106.
- 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.
- CAI, K., D. GAO, J. CHEN and S. LUO, 2009. Probing the mechanisms of silicon-mediated pathogen resistance. *Plant Signaling and Behavior*, 4: 1-3.
- CHERIF, M., A. ASSELIN, and R.R. BELANGER, 1994. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp.. *Phytopathology*, 84:236-242.
- CHEN, C., I. LENTIK, Y. HACHAM, P. DOBREV, B. H. BEN-DANIEL, R. VANKOVA, 2014. Ascorbate peroxidase 6 protects Arabidopsis desiccating and germinating seeds from stress and mediates cross talk between reactive oxygen species, abscisic acid, and auxin. *Plant Physiology*, 166: 370–383.
- CHITTOOR, J.M., J.E. LEACH and F.F. WHITE, 1999. In *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Edited by

- DATTA, S.K. and S. MUTHUKRISHNAN, pp. 171–193. CRC Press, Boca Raton, FL.
- CRUZ, M. F. A., F.A. RODRIGUES, L. R. POLANCO, C. R. S. CURVELO, K. J. T. NASCIMENTO, M. A. MOREIRA, E. G. BARROS, 2013. Inducers of resistance and silicon on the activity of defense enzymes in the soybean-*Phakopsora pachyrhizi* interaction. *Bragantia*, 72:162-172.
- DATNOFF, L.E., W.H. ELMER and D.M. HUBER, 2007. Mineral Nutrition and Plant Disease, St. Paul, MN: The American Phytopathological Society.
- DAWWAM, G.E., A. ELBELTAGY, H. M. EMARA, I. H. ABBAS, and M. M. HASSAN, 2013. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Science*, 58: 195–201.
- FAUTEUX, F., W. REMUS-BOREL, J.G. MENZIES and R.R. belanger, 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 249: 1–6.
- FILIPPI, M.C. C., G. B. DASILVA, V. L. SILVA-LOBO, M. V. C. B. CORTES, A. J. G. MORAES and A.S. PRABHU, 2011. Leaf blast (*Magnaportheoryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biological control*, 58: 160-166.
- JAISHREE, M., J. CHITTOOR, E. LEACH, and F. FRANK, 1997. Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzaepv. oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 10: 861–871.
- KIM, S., W. KIM, E. PARK and D. CHOI, 2002. Silicon-induced cell walls fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology*, 92: 1095-1103.
- LARSEN, J., P. CORNEJO and J. MIGUEL BAREA, 2009. Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the plant growth promoting rhizobacteria *Paenibacilluspolymyxa* and *P. macerans* in the mycorrhizosphere of *Cucumis sativus*. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 286-292.
- LIVAK, K.J. and T.D. SCHMITTGEN, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-[\Delta \Delta C[T]]}$ method]. *Methods*, 25: 402-408.
- MEW, T. W., H. LEUNG, S. SAVARY, C. M. V. CRUZ and J. E. LEACH, 2004. Looking ahead in rice disease research and management. *Crop Review of Plant Science*, 23: 103–127.
- NISHIZAWA Y., M. SARUTA, K. NAKAZONO, Z. NISHIO, M. SOMA, T. YOSHIDA, E. NAKAJIMA, and T. HIBI, 2003. Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible β -glucanase gene Gns1. *Plant Molecular Biology*, 51:143–152.
- OLIVERA, J.C., 2010. Caracterização de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* e redução da mancha-angular do algodoeiro mediada pelo silício. Master Dissertation. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Brasil.
- OU, SH, 1985. Rice Diseases, Association Applied Biology, Surrey, UK.
- PASSARDI, F., D. LONGET, C. PENEL and C. DUNAND, 2004. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, 65: 1879-1893.
- QIN, S., Y. J. ZHANG, B. YUAN, P. Y. XU, K. XING, and J. WANGLE, 2014. Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense*, (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. *Plant Soil*, 374: 753–766.
- RESHMA, P., M.K. NAIK, M. AIYAZ, S.R. NIRANJANA, G. CHENNAPPA, S.S. SHAIKH and R.Z. SAYYED, 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.A., L.E. DATNOFF, 2005. Silicon and rice disease management. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 457- 470.

- RODRIGUES, F.A., L.E. DATNOFF, G.H. KORNDORFER, K.W. SEEBOLD and M.C. RUSH, 2001. Effect of silicon and host resistance on sheath blight development in rice. *Plant Disease*, 85: 827–32.
- RODRIGUES, F.A., D.J. MCNALLY, L.E. DATNOFF, J.B. JONES, C. LABBE, N. BENHAMOU, 2004. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology*, 94: 177–183.
- ROZEN, S. and H. SKALETSKY, 2000. PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 132: 365–86.
- RYCHLIK, W., 2007. OLIGO 7 primer analysis software. *Methods in Molecular Biology*, 402: 35–60.
- SAIKIA, R., B.P. SINGH, R. KUMAR and D.K. ARORA, 2005. Detection of Pathogenesis-related Proteins–Chitinase and α -1,3-Glucanase in Induced Chickpea. *Current Science*, 89: 659–663.
- SAKR, N., 2016. The role of silicon (Si) in increasing plant resistance against fungal diseases. *Hellenic Plant Protection Journal*, 9: 1–15.
- SAVARY, S., L. WILLOCQUET, F.A. ELAZEGUI, N. CASTILLA and P.S. TENG, 2000b. Rice pest constraints in tropical Asia: quantification of yield losses due to rice pests in a range of production situations. *Plant Disease*, 84: 357–369.
- SCHURT, D. A., M. F. CRUZ, K.J. NASCIMENTO, M.C. FILIPPI and F.A. RODRIGUES, 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.
- SEEBOLD, K.W., Jr. L. E. DATNOFF, F.J. CORREA-VICTORIA, T.A. KUCHARREK and G. H. SNYDER, 2004. Effects of silicon and fungicides on the control of leaf and neck blast in upland rice. *Plant Disease*, 88: 253–258.
- SHARMA, N., P. TENG and F. OLIVARCE, 1990. Comparison of assessment methods for rice sheath blight disease. *Philipp. Phytopathology (Philippines)*, 26: 20–24.
- SIMMONS, C.R. 1994. The physiology and molecular biology of plant 1, 3- β -D-glucanases and 1,3;1,4- β -D-glucanases: Critical Review *Plant Science*, 13: 325–387.
- SON, J-S., M. SUMAYO, Y-J. HWANG, B-S. KIM and S-Y. GHIM, 2014. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against gray leaf spot disease in pepper. *Applied Soil Ecology*, 73:1–8.
- SPERANDIO, E. M., H. M. M do VALE, M de S. REIS, M. V. C. de C. B. CORTES, A. C. LANNA, and M. C. C. de FILIPPI, 2017. Evaluation of rhizobacteria in upland rice in Brazil: growth promotion and interaction of induced defense responses against leaf blast (*Magnaportheorizae*). *Acta Physiol Plant*, 39:259–270.
- TAHERI, P., and S. TARIGHI. 2010. Riboflavin induces resistance in rice against *Rhizoctonia solani* via jasmonate-mediated priming of phenylpropanoid pathway. *Journal of Plant Physiology*, 167: 201–208.
- TANG, W. and R. J. NEWTON, 2005. Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus*L.) zygotic embryos. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43:760–769.
- TORRES, M. A., D. G. J. JONATHAN, and J. L. DANGEL, 2006. Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology*, 141: 373–378.
- VAN BOCKHAVEN, J., D. DE VLEESSCHAUWER and M. HOFTE, 2013. Towards establishing broad-spectrum disease resistance in plants: silicon leads the way. *Journal of Experimental Botany*, 64: 1281–1293.
- VAN LOON, L.C., M. REP and C.M.J. PIETERSE, 2006. Significance of inducible defense related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44:135–162.
- VERMA, P., A. N. YADAV, S. K. KAZY, A. K. SAXENA and A. SUMAN, 2014. Evaluating the diversity and

- phylogeny of plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum*) growing in central zone of India. International Journal of Current Microbiology and Applied Science, 3: 432-447.
- XAVIER- FILHA, M. S., F. A. RODRIGUES, G.P. DOMICIANO, H. V. OLIVEIRA, P. R. SILVEIRA and W.R. MOREIRA, 2011. Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. Australasian Plant Pathology, 40:28-38.
- YEDIDIA, I., N. BENHAMOUB, Y. KAPULNIKC, and I. CHETA, 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. Plant Physiology and Biochemistry, 38: 863-873
- ZAIDI, A., E. AHMAD, M.S. KHAN, S. SAIF, and A. RIZVI, 2015. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: Current perspective. Scientia Horticulturae, 193:231-239.
- ZHANG, G., Y. CUI, X. DING and Q. DAI, 2013. Stimulation of phenolic metabolism by silicon contributes to rice resistance to sheath blight. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 176: 118-124.