Archive of SID

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۸، شماره ۱، شهریور ۱۳۹۹
DOI: 10.22092/jaep.2020.127198.1296

مقاله پژوهشی

تأثیر کیتوزان و اسیدسالیسیلیک بر واکنش گیاه برنج علیه عامل پوسیدگی ریشه و طوقه *Fusarium fujikuroi*

احمد ابراهیمی تودرواری[۱]، فاختک طلیعی[۲]✉، امیر ذوالفقاری[۳]

۱ و ۳- به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار بیماری شناسی گیاهی، گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان، ایران؛ ۲- استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران

(تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۸؛ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۹)

چکیده

پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر کیتوزان و اسیدسالیسیلیک بر پاسخ گیاه برنج در برابر قارچ *Fusarium fujikuroi*، عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه انجام شد. به این منظور تأثیر غلظت‌های ۲۰۰ و ٤۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان و اسیدسالیسیلیک بر رشد میسلیومی بیمارگر ارزیابی گردید. همچنین صفات زراعی و میزان فعالیت دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در زمان‌های صفر، ۲٤، ٤۸، ۹٦، ۱٤٤ و ۲۸۸ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر در رقم حساس طارم مطالعه شد. نتایج نشان داد غلظت ٤۰۰ پی‌پی‌ام اسیدسالیسیلیک و کیتوزان به‌ترتیب با ۳۵/۵۷ و ۲۵/۲۹ درصد، بیشترین بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ را نشان دادند. هر دو تیمار شدت علائم بیماری را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش دادند. کمترین مقدار شدت بیماری (به‌ترتیب ۳۷/۸ و ٤۱/۷ درصد) در غلظت‌های ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسیدسالیسیلیک و ٤۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان مشاهده شد. همچنین این دو تیمار، ارتفاع گیاه، طول و حجم ریشه را نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری ($P<0.05$) افزایش دادند. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو تیمار ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسیدسالیسیلیک و ٤۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان در زمان ۹٦ ساعت پس از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، ٤۸ ساعت پس از آلودگی در غلظت‌های ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسیدسالیسیلیک و ٤۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان مشاهده گردید. براساس نتایج این تحقیق، دو ترکیب اسیدسالیسیلیک و کیتوزان می‌توانند نقش موثری در القای مقاومت و کاهش شدت بیماری ناشی از این بیمارگر داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: القای مقاومت، باکانه، سنجش آنزیمی، *Fusarium fujikuroi*

Effect of salicylic acid and chitosan on response of rice against *Fusarium fujikuroi* the causal agentof rice root and crown rot

A. EBRAHIMI TODARVARI[1], F. TALIEI[2]✉, A. ZOLFAGHARI[3]

1 and 3. Graduated student and Assistant professor of Plant pathology, Agriculture department, Azad university, Gorgan branch, Gorgan, Iran; 2. Assistant professor, Plant production department, Gonbad Kavous university, Gonbad Kavous, Iran

Abstract

This study was carried out to investigate the effect of salicylic acid (sa) and chitosan (chi) on the response of rice to *Fusarium fujikuroi*, the causal agent of root and crown rot of rice plant. The effect of chitosan and salicylic acid with the concentrations of 200 and 400 ppm on mycelial growth of the pathogen was measured. Furthermore after 0, 24, 48, 72, 96, 144 and 288 hours of inoculation, growth traits of the plant and enzyme activity of peroxidase and catalase were evaluated in rice seedlings of a susceptible cultivar namely Tarom. Salicylic acid and chitosan in 400 ppm had the most mycelial inhibitory effect with 35.57 and 24.29% respectively. Both treatments could significantly reduce disease symptoms; the least disease severity was assessed 37.8 and 41.7 % in 200 and 400 ppm concentration of salicylic acid and chitosan respectively. Sa-200 and chi-400 pretreatment could significantly ($P<0.05$) increase the shoot and root length and root volume of seedlings compared to control. The maximum level of peroxidase activity was assessed 96 hours after inoculation in 200 and 400 ppm concentration of salicylic acid and chitosan respectively. The minimum level of catalase activity was assessed 48 hours after inoculation in 200 and 400 ppm concentration of salicylic acid and chitosan respectively. Thus salicylic acid and chitosan could effectively induced systemic resistance in rice resulted in the reduction of disease severity.

Keywords: Bakanae, enzyme assay, *Fusarium fujikuroi*, induce resistance

✉ Taliey.fa@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه برنج (باکانه) که توسط *Fusarium fujikuroi* species complex ایجاد می‌شود، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های برنج در اغلب نواحی برنج‌خیز دنیاست (Zainudin *et al.*, 2008). در مناطق تحت کشت برنج در آسیا، این بیماری دارای اهمیت اقتصادی بوده و خسارت آن در مناطقی که بیماری به‌صورت همه‌گیر بروز می کند، به ۲۰ درصد می‌رسد (Cumangun *et al.*, 2011). مطالعات انجام شده در خلال سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱٤ در ایالت‌های شمالی هندوستان نشان داده است که وقوع این بیماری در برنج به‌خصوص رقم باسماتی، از ۱/۲ تا ٤۰ درصد در نوسان بوده است (Gupta *et al.*, 2014). روش متداول کنترل این بیماری، ضدعفونی بذر با قارچ‌کش‌ها است (Gupta *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2018). همچنین تحقیقاتی در زمینه‌ی اصلاح ارقام برای مقاومت به این بیماری صورت گرفته است (Lee *et al.*, 2019). در سال‌های اخیر کاربرد موادی با منشا طبیعی مانند کیتوزان و اسیدسالیسیلیک که دارای خاصیت قارچ‌کشی و یا القای مقاومت در گیاه می‌باشند، به عنوان یکی از روش‌های ایمن و جایگزین، در کنترل بیماری‌های برنج بررسی شده است (Thanh *et al.*, 2017; Hekmati *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2012; Rodrı´guez *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2005).

در شرایط تنش، انواع مشتقات فعال اکسیژن[1] مانند پراکسید هیدروژن، رادیکال سوپراکسید و نیتریک اکسید در گیاهان تولید می‌شوند یا میزان آن‌ها افزایش می‌یابد تا مخاطرات حاصل از تنش را کاهش دهند. این پاسخ بخش مهمی از ساز و کار دفاعی گیاه است. اما گیاهان با روش‌های مختلف از جمله تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، سطوح ROS[1] را برای مقاصد سیگنال‌دهی حفظ می‌نمایند و اثرات سمی آن‌ها را کاهش می‌دهند (Guest and Brown, 1997). گزارش‌های متعددی در مورد پیش‌تیمار گیاهان با الیسیتورهای مختلف و تحریک پاسخ دفاعی گیاه و کاهش علائم بیماری در مورد بیماری‌های مختلف موجود است.

مطالعات نشان داده است که میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در پاسخ به بیماری پوسیدگی طوقه در برنج پیش‌تیمار شده با قارچ *Piriformospora indica* در مقایسه با گیاهان شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (Hajipoor Bagheri *et al.*, 2015). کاربرد کیتوزان روی گیاهچه‌های برنج، سبب تولید H_2O_2 ، تجمع گلوکانازها و کیتیناز، فنیل‌آلانین آمینولیاز و همچنین افزایش بیان ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی می‌گردد (Amborabe *et al.*, 2008). همچنین کاربرد کیتوزان با وزن مولکولی کم، تأثیر بیشتری در القای پاسخ دفاعی در این گیاه در برابر بیماری بلاست برنج دارد (Lin *et al.*, 2005). به علاوه غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان روی بذر برنج، بیشترین تأثیر را در افزایش میزان تولید آنزیم‌های دفاعی و کاهش علایم ناشی از بیماری بلاست برگی در گیاهان تیمار شده داشته است (Rodrı´guez *et al.*, 2007). بررسی تأثیر کیتوزان در القای مقاومت گیاه برنج در مقابل قارچ *Rhizoctonia solani* نشان داد که با افزایش میزان تولید آنزیم‌های پراکسیداز، فنیل آلانین آمینولیاز و پلی فنل اکسیداز، طول لکه‌ها و وقوع بیماری سوختگی غلاف به ترتیب به‌میزان ٦٦/۹۱ درصد و ۳۱ تا ۸٤ درصد کاهش یافت (Liu *et al.*, 2012). همچنین افزایش معنی‌دار تولید این آنزیم‌ها در گیاهچه‌های برنج تیمار شده با کیتوزان، پس از مایه‌زنی با دو باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* و *X. oryzae* pv. *oryzicola* نشان دهنده‌ی تأثیر مشابه این ماده در القای سیستم دفاعی گیاه در پاتوسیستم‌های گیاه–باکتری بوده است (Li *et al.*, 2013).

براساس مطالعات انجام شده، شناورسازی برگ بریده برنج در محلول ۵–۲ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک سبب تجمع H_2O_2 و رادیکال‌های آزاد اکسیژن، تغییر میزان تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و در نتیجه القای تنش اکسیداتیو شده است (Ganesan and Thomas, 2001). همچنین افزایش تولید ۳٦ نوع پروتئین دخیل در مسیر انتقال سیگنال، پروتئین‌های دفاعی و

[1] Reactive Oxygen Species=ROS

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تأثیر کاربرد این ماده به‌صورت محلول‌پاشی برگی در گیاه برنج، گزارش شده است (Jing *et al.*, 2007). بررسی اثر اسیدسالیسیلیک بر بیان تعدادی از ژن‌های مرتبط با ساز و کار مقاومت در دو رقم برنج مقاوم و حساس به بیماری بلاست بعد از تیمار با اسیدسالیسیلیک نشان داد که الگوی بیان ژن‌ها در اثر تیمار با این ماده تا حد زیادی وابسته به ماهیت ژنتیکی گیاه بوده است (Hekmati *et al.*, 2014).

به‌علاوه محلول‌پاشی برگی با غلظت هشت میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک، در چهار لاین ایزوژنیک برنج سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و تولید فیتوالکسین‌های اورایزولاکسین، مومیلاکتون و ساکروانتین و کاهش علایم بیماری بلاست شده است (Daw *et al.*, 2008). همچنین تیمار بذر برنج با اسیدسالیسیلیک یک میلی‌مولار، میزان تولید آنیون‌های سوپراکسید و واکنش فوق حساسیت را ٦ و ٤٨ ساعت پس از آلودگی با X. *oryzae* pv. *oryzae* به ترتیب ۲۸ و ۱۱۰ درصد افزایش و شدت بیماری حاصل از بیمارگر را به‌میزان ۳۸ درصد کاهش داده است. کاربرد این ماده سبب بازداری از رشد جمعیت باکتری نیز شده است (Thanh *et al.*, 2017).

گزارشهای متعددی مبنی بر نقش اسیدسالیسیلیک و کیتوزان بر کاهش اثرات ناشی از بیماری‌ها و تغییر میزان بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه برنج وجود دارد. در این تحقیق تأثیر دو القاگر کیتوزان و سالیسیلیک‌اسید بر واکنش گیاه برنج آلوده به قارچ *F. fujikuroi* از طریق مطالعه‌ی میزان تغییرات آنزیمی و اثر بر شدت بیماری حاصل مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

بررسی تأثیر اسیدسالیسیلیک و کیتوزان بر رشد میسلیومی بیمارگر

جدایه قارچ *F. fujikuroi* از کلکسیون قارچ‌های بخش گیاه‌شناسی دانشگاه گنبدکاووس دریافت و بیماری‌زایی آن در شرایط آزمایشگاه و گلخانه روی بذور و گیاهچه‌های برنج رقم حساس طارم محلی آزمون شد. به‌منظور بررسی تأثیر مستقیم کیتوزان و اسیدسالیسیلیک بر رشد بیمارگر، محیط کشت PDA به‌همراه غلظت‌های ۲۰۰، ٤۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان (Sigma-Aldrich –MMW) (به‌ترتیب Chi-200 و Chi-400) و اسیدسالیسیلیک (Merck) (به‌ترتیب Sa-200 و Sa-400) تهیه شد. در تیمار شاهد، از محیط کشت PDA بدون هیچ نوع افزودنی استفاده شد. سپس یک دیسک از حاشیه پرگنه جوان قارچ *F. fujikuroi* به قطر ۵ میلی‌متر روی آن‌ها کشت شد. بعد از ۷۲ ساعت درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ نسبت به شاهد محاسبه شد. آزمایش در قالب طرح‌های کاملاً تصادفی جداگانه با پنج تکرار، انجام شد.

مقایسه شاخص‌های دفاعی در ارقام حساس و مقاوم

ریشه و طوقه گیاهچه‌های دو هفته‌ای رقم طارم محلی، به‌عنوان رقم حساس به بیماری و رقم دم‌سیاه به‌عنوان رقم مقاوم به بیماری (Saremi, 2005) به مدت ۱۲ ساعت داخل سوسپانسیون اسپور قارچ حاوی 5×10^4 اسپور در میلی‌لیتر قارچ غوطه‌ور شده و در گلدان‌های پلاستیکی (با قطر دهانه ۲۰ و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر) حاوی خاک سیلتی لومی کاشته شدند (Hajipour Bagheri *et al.*, 2015). سپس گلدان‌ها تا ظهور علائم بیماری در اتاقک رشد با دمای ۱±۲۸ درجه سلسیوس و ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۸۵ درصد نگهداری شدند، سپس میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز و کاتالاز در فواصل زمانی صفر (پیش از مایه‌زنی) و ٢٤، ٤٨، ٩٦، ١٤٤، ٢٨٨ ساعت بعد از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (Model 6300Jenway-UK) به ترتیب در طول موج ٤٧٠ نانومتر (Janda *et al.*, 2003) و ٢٤٠ نانومتر (Dhindsa *et al.*, 1981) برحسب میکرومول بر گرم بافت تازه اندازه گیری شد.

بررسی تأثیر اسیدسالیسیلیک و کیتوزان بر شدت بیماری، صفات زراعی و شاخص‌های دفاعی

در دو آزمایش جداگانه، گیاهچه‌های دو هفته‌ای رقم طارم محلی، پس از تیمار با غلظت‌های ۲۰۰ و ٤۰۰ پی‌پی‌ام

www.SID.ir

Archive of SID

محلول اسیدسالیسیلیک و کیتوزان، با سوسپانسیون اسپور قارچ مایه‌زنی شدند. دو تیمار شاهد سالم (گیاهان با آب مقطر سترون آب‌پاشی شدند) و شاهد بیمار (با سوسپانسیون اسپور قارچ، مایه‌زنی شده و با آب مقطر سترون آب‌پاشی شدند) برای مقایسات در نظر گرفته شدند. گلدان‌ها تا ظهور علائم بیماری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز و کاتالاز تحت شرایط تیمارهای القایی در فواصل زمانی صفر و ۲٤، ٤۸، ۹٦، ۱٤٤، ۲۸۸ ساعت بعد از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد.

همچنین در روز دوازدهم، ریشه‌های هر گلدان پس از چندین بار شستشو از خاک خارج شده و اندام هوایی از محل طوقه از ریشه جدا شد. هر ریشه در داخل استوانه مدرج با میزان مشخص آب، گذاشته شد و از روی بالا آمدن آب، حجم ریشه بر حسب سانتی‌متر مکعب به دست آمد. برای اندازه‌گیری وزن ریشه‌ها و اندام هوایی در حالت تر و خشک از روش توزین با ترازوی دیجیتالی دارای دقت ۰/۰۰۱ گرم استفاده شد. برای این منظور ریشه‌ها و اندام هوایی به‌صورت جداگانه درون پاکت قرار گرفتند و وزن تر آن‌ها به دست آمد. در گام بعدی پاکت‌ها با قرار گرفتن در درون آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ٤۸ ساعت خشک شده و وزن خشک ریشه‌ها و اندام هوایی به دست آمد. همچنین ارتفاع گیاه، طول ساقه و طول برگ در هر تیمار اندازه‌گیری شد.

همچنین واکنش گیاهان میزبان در برابر بیماری به روش (Zainudin *et al.*, 2008) یادداشت برداری شد. گیاهان با مقیاس صفر تا ٤ ارزیابی و با توجه به این علایم به پنج گروه مختلف تقسیم شدند که عبارت بودند از: صفر: گیاهچه سالم و بدون علائم خارجی، ۱: گیاهچه رشد طبیعی دارد ولی برگ‌ها سبز-زرد هستند، ۲: رشد غیرطبیعی، طویل شدن یا کوتاه شدن گیاهچه، برگ‌ها باریک و سبز-زرد هستند، ۳: رشد غیرطبیعی، برگ‌ها باریک، کلروز یا متمایل به قهوه‌ای هستند، گیاهچه کوتاه‌تر یا بلندتر از حالت نرمال است و ٤: ظهور توده قارچی بر سطح گیاهچه آلوده و مرگ گیاه. شاخص شدت بیماری در هر تیمار بر اساس رابطه $DSI=[\sum(x_i\ n_i)]/N$ محاسبه شد که در آن x_i درجه شدت آلودگی براساس مقیاس و n_i تعداد گیاهان دارای درجه آلودگی i و N تعداد کل گیاهان مورد بررسی می‌باشد (Zainudin *et al.*, 2008).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر القاکننده به‌صورت جداگانه انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (ver 9.1) و میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD ($P<0.05$) مقایسه و سطوح مختلف هر تیمار با شاهد مقایسه شد.

نتایج و بحث

اثر مستقیم اسیدسالیسیلیک و کیتوزان بر رشد میسلیومی قارچ بیمارگر

نتایج وجود اختلاف معنی‌داری ($P<0.01$) بین اثر غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک و کیتوزان در بازداری از رشد میسلیومی بیمارگر، در مقایسه با شاهد را نشان داد. در هر دو تیمار بیشترین میانگین رشد پرگنه قارچ در تیمار شاهد مشاهده شد. با افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک، میانگین رشد پرگنه قارچ کاهش معنی‌داری ($P<0.01$) نشان داد (جدول ۱). بیشترین میزان بازداری از رشد میسلیومی قارچ مربوط به تیمار Sa-400 برابر ۳۵/۵۷ درصد بود که تفاوت معنی‌داری با میانگین درصد بازدارندگی در تیمار Sa-200 داشت. در مورد کیتوزان، کمترین مقدار رشد پرگنه قارچی در تیمار Chi-400 مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری ($P<0.01$) با تیمار Chi-200 نداشت. میزان بازداری از رشد میسلیومی قارچ در این تیمار برابر ۲٤/۳ درصد بود.

اثرات ضدقارچی اسیدسالیسیلیک به تغییر دادن بسیاری از اجزای میکروسکوپی سلول خصوصا میتوکندری (Amborabe *et al.*, 2002) و نیز تخریب غشای پلاسمایی و نشت پروتئین‌ها (da Rocha *et al.*, 2015) نسبت داده شده است. نتایج مشابهی در مورد قارچ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

www.SID.ir

Archive of SID

گزارش شده است (Abdel-Monaim *et al.*, 2012). همچنین کاربرد اسیدسالیسیلیک با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار توانسته است جوانه‌زنی اسپورهای *Penicillium expansum* را بعد از ۳۰ دقیقه به میزان ۹۰ درصد کاهش دهد (da Rocha *et al.*, 2015).

جدول ۱- اثر غلظت‌های ۲۰۰ و ٤۰۰ ppm اسیدسالیسیلیک و کیتوزان بر درصد بازداری از رشد میسلیومی قارچ *Fusarium fujikuroi* در محیط کشت PDA.

Table 1. The effect of concentrations 200 and 400 ppm of chitosan and salicylic acid on mycelial growth of *Fusarium fujikuroi* in PDA.

Concentration	Mycelial growth inhibition (%)	
	Salicylic acid	Chitosan
0 (Control)	0.0 c	0.0 b
200	25.37 b	18.93 a
400	35.572 a	24.294 a

حروف مختلف وجود اختلاف معنی‌دار را در سطح احتمال یک درصد نشان می‌دهند.

Different letters show significant differences at the probability level of 1%.

کیتوزان جوانه‌زنی اسپور، رشد میسلیومی و طویل شدن لوله تندش را در *Alternaria kikuchiana* به طور کامل متوقف می‌کند (Meng *et al.*, 2010). کیتوزان به‌دلیل ماهیت پلی‌کاتیونی باعث تخریب ساختمان سلولی و تراوش الکترولیت‌ها و پروتئین‌ها می‌شود. این ماده همچنین سبب تورم هیف و شاخه‌زایی فراوان میسلیوم در جنس *Fusarium* شده و در عین حال مسئول تغییرات سیتولوژیکی و تجزیه پروتوپلاسم می‌باشد (Falcon *et al.*, 2008). Khiareddine et al (2015) نشان دادند که میزان بازداری از رشد ده قارچ بیمارگر گیاه گوجه‌فرنگی وابسته به غلظت بوده و بیشترین درصد بازدارندگی در غلظت‌های ۱۰ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک و ٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان مشاهده شده است.

مطالعه‌ی تغییرات میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی در گیاهان حساس و مقاوم

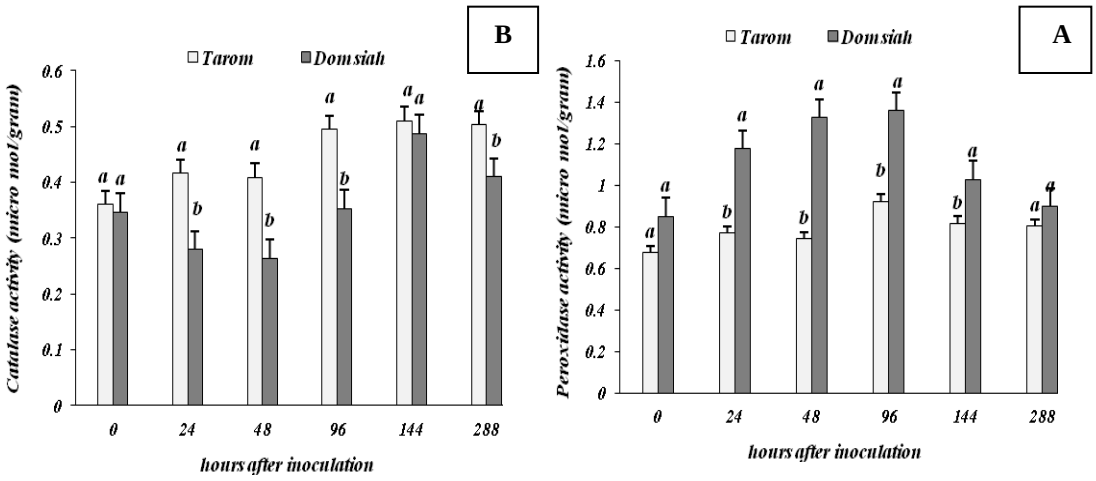
در این تحقیق ابتدا با هدف بررسی امکان استفاده از تغییرات دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز به‌عنوان شاخص مقاومت در پاتوسیستم برنج-*F. fujikuroi*، میزان تغییرات فعالیت دو آنزیم در دو رقم حساس و مقاوم بررسی شد تا امکان مداخله‌ی آنزیم‌های مذکور در مسیر مقاومت به این بیماری آشکار شود. بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، قبل از مایه‌زنی گیاهان، در دو رقم حساس و مقاوم به بیماری اختلاف معنی‌داری را بین دو رقم مورد مطالعه نشان نداد. اما ۲٤ ساعت پس از مایه‌زنی، فعالیت این آنزیم در رقم مقاوم کاهش یافت که اختلاف معنی‌داری ($P<0.01$) با گیاه حساس داشت. با گذشت زمان از میزان فعالیت این آنزیم در رقم مقاوم کاسته می‌شود و میزان آن تا ۹٦ ساعت پس از آلودگی به طور معنی‌داری کمتر از رقم حساس بود (شکل ۱-الف). همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز، قبل از مایه‌زنی گیاهان، در دو رقم حساس و مقاوم به بیماری اختلاف معنی‌داری را بین دو رقم مورد مطالعه نشان نداد، اما با گذشت زمان میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در رقم مقاوم بیشتر شد به‌طوری که مقدار آن در روزهای دوم و سپس چهارم پس از آلودگی به اوج خود رسید. و همچنان میزان فعالیت آن تا انتهای آزمایش بیشتر از رقم حساس بود. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در رقم حساس، ۹٦ ساعت پس از آلودگی مشاهده شد (شکل ۱-ب). اختلاف میزان تولید این دو آنزیم دفاعی بین دو رقم حساس و مقاوم، نشان‌دهنده‌ی نقش این دو آنزیم در واکنش دفاعی برنج در برابر این بیمارگر می‌باشد. نتایج مشابهی در گندم آلوده به زنگ زرد (Zeng *et al.*, 2010) نیز گزارش شده است.

تأثیر اسیدسالیسیلیک و کیتوزان بر شدت بیماری

بررسی علائم بیماری در گیاهان، دوازده روز پس از مایه‌زنی، نشان داد که گیاهان شاهد سالم همگی دارای رشد عادی و طبیعی در مقایسه با گیاهان بیمار بودند، اما گیاهان شاهد آلوده، رشد غیرطبیعی و ارتفاع کوتاه‌تر از اندازه نرمال رقم را داشتند. شدت بیماری در گیاهان شاهد آلوده برابر ۹۲ درصد بود. بدین معنی که برگ‌های این قبیل گیاهان در ابتدا کلروز، سپس نکروزه و در نهایت خشک شدند. همچنین تیره

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- مقایسه تغییرات فعالیت آنزیم **A**- پراکسیداز و **B**- کاتالاز، در ساعات مختلف پس از مایه‌زنی با قارچ *Fusarium fujikuroi* در ارقام برنج حساس (طارم) و مقاوم (دم‌سیاه) به بیماری.

Fig 1. Comparison of changes in the activity of A) Peroxidase and B) catalase in different time after inoculation with *Fusarium fujikuroi* in sensitive (Tarom) and resistance (Domsiah) rice cultivars.

شدن ناحیه طوقه و در برخی موارد پوسیدگی ریشه مشاهده گردید. در گیاهان مایه‌زنی شده با بیمارگر و تیمار شده با دو القاگر، درجاتی از زردی در برگ‌ها و کاهش ارتفاع گیاه مشاهده شد. نتایج نشان داد که شدت بیماری در غلظت‌های ۲۰۰ و ٤۰۰ پی‌پی‌ام اسیدسالیسیلیک به‌ترتیب ۳۸/۸ و ۵۲/۸ و برای کیتوزان ۵۸/۳ و ٤۱/۷ درصد بود که اختلاف معنی‌داری بین این دو تیمار و غلظت‌های مختلف آن‌ها، در شدت بیماری ایجاد شده مشاهده نگردید (جدول ۲).

تحقیقات نشان داده است که اغلب گیاهان بیمار، ٤۰ تا ۵۰ روز پس از آلودگی، می‌میرند (Zainudin *et al.*, 2008). اما هر دو تیمار به کار رفته در این آزمایش به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) سبب کاهش شدت بیماری اندازه‌گیری شده نسبت به گیاه شاهد شدند. کاهش علائم بیماری می‌تواند به‌دلیل خاصیت ضد میکروبی روی بیمارگر و یا فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی وابسته به پروتئین‌های بیماری‌زایی در گیاه باشد. براساس مطالعات کاربرد برگی کیتوزان سبب کاهش زخم‌های ناشی از بیماری‌های قارچی از طریق لیگنینی شدن بافت برگ و جلوگیری از رشد قارچ‌های ساپروفیت می‌شود (Bhattacharya, 2013). کاهش علایم بیماری بلاست برنج تحت تیمار با کیتوزان نیز اثبات شده است (Rodrı´guez *et al.*, 2007). همچنین پوشش‌دهی بذر ذرت با استفاده از کیتوزان دو درصد، مانع از رشد *F. moniliforme* روی ریشه گیاه شده است (Lizarraga-Paulin *et al.*, 2011).

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های ۲۰۰ و ٤۰۰ ppm اسیدسالیسیلیک و کیتوزان بر شدت بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه برنج ناشی از *Fusarium fujikuroi*.

Table 2. The effect of concentrations 200 and 400 ppm of chitosan and salicylic acid on disease severity of rice crown and root rot.

Concentration	Disease severity (%)	
	Salicylic acid	Chitosan
0 (Control)	a 91.6	a 91.67
200	b 38.79	b 58.33
400	b 52.78	b 41.67

حروف مختلف وجود اختلاف معنی‌دار را در سطح احتمال یک درصد نشان می‌دهند.

Different letters show significant differences at the probability level of 1%.

تأثیر اسیدسالیسیلیک و کیتوزان بر صفات زراعی

نتایج نشان داد که ارتفاع گیاهان بیمار به‌طور معنی‌داری نسبت به گیاهان سالم کاهش یافت (۵۲/۹ درصد). همچنین گیاهان سالم از نظر کلیه صفات به جز وزن خشک ریشه و ساقه، اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشتند (جدول ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

اگرچه قارچ بیمارگر اغلب با تولید حجم بالای جیبرلیک اسید و طویل شدن سلول‌های گیاهی سبب افزایش رشد (باکانه) در گیاه برنج می‌شود (Johnson and Coolbaugh, 1990)، اما محققان نشان دادند که همبستگی معنی‌داری بین شدت علایم باکانه و میزان هورمون جیبرلین تولید شده توسط بیمارگر وحود ندارد که احتمالاً مربوط به غلظت زادمایه مورد استفاده در آزمایش می‌باشد(Efati Lake *et al.*, 2018). افزایش بیشتر کشیدگی ساقهٔ برنج هنگامی که زادمایه با غلظت $3/1\times10^4$ تزریق گردد اتفاق می‌افتد (Ahmad *et al.*, 1986). در تحقیق حاضر از غلظت بیشتری از زادمایه قارچ استفاده شده است و عدم بروز علائم افزایش طول بوته، می‌تواند مربوط به آن باشد. بر اساس بررسی‌ها در غلظت‌های بیشتری از سوسپانسیون قارچ، احتمالاً قدرت بیماری‌زایی بیشتر بروز می کند. بنابراین فرصتی برای تولید هورمون و تأثیر آن بر رشد گیاه باقی نمی‌ماند، و قبل از بروز قدکشیدگی در گیاه مایه زنی شده با قارچ، علائم زردی، پوسیدگی در ناحیهٔ طوقه، توقف رشد و در نهایت مرگ گیاه ظاهر می‌گردد(Efati Lake *et al.*, 2018). میانگین طول ریشه در تیمار Sa-200 و Sa-400 به‌ترتیب برابر ۱۸/۷ و ۱۲ سانتی‌متر و در گیاهچه‌های بیمار برابر ۱۱/۵ سانتی‌متر بود. همچنین حجم ریشه در تیمار Sa-200، ۳۸/۳ درصد بیشتر از حجم ریشه در گیاهان بیمار و Sa-400 بود. بر اساس نتایج مقایسه میانگین، تیمار Sa-200 از نظر صفات طول ریشه و حجم ریشه تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) با شاهد بیمار و تیمار Sa-400 داشت. همچنین ارتفاع گیاه در این تیمار (۳۰/۵ سانتی‌متر) اختلاف معنی‌داری با گیاهان شاهد بیمار و Sa-400 داشت که نشان دهنده‌ی تأثیر مثبت این تیمار، در کاهش خسارت بیماری و اثر آن بر صفات زراعی گیاه می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک بر باز شدن جوانه، نفوذپذیری غشای تنفسی، بسته شدن روزنه‌ها، انتقال مواد فتوسنتزی و در نتیجه سرعت رشد و جذب یون‌ها تأثیرگذار است (Alvarez, 2000). همچنین تیمار گیاه برنج با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک، مقاومت گیاه را در برابر سمیت سرب و طول ریشه و ساقه را به‌ترتیب ۱۱/۵ و ۱۵/۸ درصد نسبت به شاهد افزایش می‌دهد (Jing *et al.*, 2007).

مقایسه‌ی میانگین صفات زراعی در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های متفاوت کیتوزان (جدول ٤) نشان داد که طول ریشه و ارتفاع گیاه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد با گیاهان شاهد آلوده دارد. همچنین تیمار Chi-400 وزن تر ریشه (۱/۹۳ گرم) و حجم ریشه (۱/٤۷ سانتی‌متر مکعب) بیشتری نسبت به تیمار شاهد بیمار و Chi-200 داشت (P<۰/۰۵). همچنین استفاده از Chi-200 و Chi-400، ارتفاع گیاه را به‌ترتیب ٦٤/۷ و ۷٦/٦ درصد نسبت به گیاه شاهد بیمار افزایش داد. اگرچه مکانیسم عمل کیتوزان به درستی شناسایی نشده اما احتمالاً کیتوزان سیگنالی را برای سنتز هورمون‌های گیاهی القا می‌کند که رشد و نمو گیاه را توسط برخی مسیرهای سیگنالینگ افزایش می‌دهد. همچنین با افزایش سطح جذب مواد غذایی و بهبود غلظت عناصر مغذی در سطح سلول به رشد رویشی گیاه کمک می‌کند (Abu-Murifeh, 2013). تحقیقات نشان داده است که کیتوزان با تحریک جوانه‌زنی و رشد گیاهچه برنج، سبب افزایش عملکرد گیاه می‌گردد (Tavares *et al.*, 2014).

تأثیر اسیدسالیسیلیک و کیتوزان بر تغییرات شاخص‌های دفاعی

- آنزیم پراکسیداز

نتایج نشان داد که تیمار گیاهان با کیتوزان تأثیر معنی‌داری (P<۰/۰۱) بر میزان فعالیت پراکسیداز نسبت‌به شاهد در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری دارد. کمترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار شاهد، پیش از آلودگی مشاهده شد. همچنین تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۱) در بین زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در مورد این تیمار مشاهده شد. نتایج حاکی از آن است که پس از مایه‌زنی گیاهان با بیمارگر، میزان فعالیت پراکسیداز افزایش می‌یابد. این افزایش تدریجی بوده و ۹٦ ساعت پس از آلودگی در همه تیمارها به اوج خود می‌رسد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم، ۹٦ ساعت پس از

www.SID.ir

Archive of SID

آلـودگی و در تیمـار Chi-400 ثبـت گردیـد کـه ۵۹/۱ درصـد نسبت به زمان شروع آزمایش افـزایش داشـت. همچنـین ایـن تیمـار بـه‌ترتیـب افـزایش ۱۷/۸ و ۱۷/٦ درصـدی (P<۰/۰۵) نسبت بـه تیمـار شـاهد و Chi-200 داشـت. پـس از آن رونـد کاهشی تدریجی در فعالیت آنزیم در همه تیمارهـا مشـاهده شـد. میزان فعالیت این آنزیم در تیمار شـاهد، دو روز پـس از آلـودگی تا انتهای آزمایش کمتر از گیاهان تیمار شـده بـا کیتـوزان بـود (شکل ۲–الف) که نشانگر تأثیر کیتوزان در تحریک پاسخ‌های دفاعی است. همچنین پیش تیمار گیاهـان بـا اسیدسالیسـیلیک سبب افزایش میزان فعالیت این آنزیم در همه تیمارهـا نسـبت به شاهد گردید. در هـر دو غلظـت سالیسـیلیک‌اسـید، میـزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، در ساعات پس از آلودگی نسبت بـه تیمار شاهد بیمار افزایش یافت. میزان فعالیت ایـن آنـزیم، ٢٤ ساعت پس از آلودگی در تیمار Sa-200 تفاوت معنـی‌داری بـا تیمار Sa-400 داشت و همچنین ۳۵/۸ درصد نسبت بـه شـاهد افزایش داشت. بیشترین میزان فعالیت این آنـزیم، ۹٦ سـاعت پس از آلودگی و در دو تیمار اسیدسالیسـیلیک ثبـت شـد کـه افـزایش ۱۵/٦ و ۱۱/٦ درصـدی نسـبت بـه شـاهد داشـت و همچنان تا پایان آزمایش بیش از سایر تیمارها بود. در مجموع کاربرد Sa-200 با القای بیشتر (P<۰/۰۵) تولیـد ایـن آنـزیم در ساعات اولیه آزمایش تا روز چهارم نقش مؤثرتری در مقاومت گیاه در برابر بیماری نشان داد (شکل ۲–ب).

– آنزیم کاتالاز

نتایج نشان می‌دهد که تیمار گیاهـان بـا کیتـوزان، سـبب کاهش میزان فعالیت این آنزیم به میزان ۳۳–۳۷ درصد نسـبت به تیمار شاهد آلوده گردیـد (شـکل ۳–الـف). میـزان فعالیـت کاتالازی در گیاهان شاهد، در همه زمـان‌هـای نمونـه‌بـرداری تقریبا ثابت بوده و اختلاف معنـی‌داری بـا یکـدیگر نـداشـت. کمترین میزان فعالیت آنزیمی، ٤٨ ساعت پس از آلـوده‌سـازی گیاهـان و بیشـترین میـزان فعالیـت آن در روزهـای ششـم و دوازدهم پس از آلودگی و در تیمار Chi-400 مشاهده شـد کـه اختلاف معنی‌داری با گیاه شاهد داشت. میـزان فعالیـت آنـزیم در این تیمار تا روز دوم پس از آلودگی کاهش یافته و سـپس افزایش می‌یابد. در مجموع نتایج حکایت از تأثیر بیشتر تیمـار Chi-400 دارد. نتـایج نشـان داد کـه پـیش تیمـار گیاهـان بـا اسیدسالیسیلیک، سبب کاهش محسوس در میزان فعالیت ایـن آنزیم نسبت بـه شـاهد شـد. کمتـرین میـزان آنـزیم، پـس از آلوده‌سازی گیاهان و در تیمار Sa-200 مشاهده شد که تفـاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) با سایر تیمارهـا داشـت. در ایـن زمـان، کـاربرد دو تیمـار Sa-200 و Sa-400 میـزان تولیـد کاتـالاز را به‌ترتیب ٦۰/۸ و ٤۰/۲ درصد نسبت به تیمـار شـاهد کـاهش داد. در گیاهان شاهد، میزان ایـن آنـزیم تحـت تـنش بیمـاری افزایش یافته و تـا روز دوم پـس از آلـودگـی بیشـتر از سـایر تیمارها بود (شکل ۳–ب).

جدول ۳– تأثیر دو غلظت ۲۰۰ و ٤۰۰ ppm اسیدسالیسیلیک بر صفات زراعی گیاهچه‌های برنج در تیمارهای شاهد سالم و مایه‌زنی شده با *Fusarium fujikuroi*.

Table 3. The effect of salicylic acid at concentrations 200 and 400 ppm, on agronomic traits of healthy rice seedling, and after inoculating with *Fusarium fujikuroi.*

Treatment	Root dry weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root wet weight (g)	Shoot wet weight (g)	Root volume (cm^3)	Leaf length (cm)	Root length (cm)	Plant height (cm)
Healthy control	1.38 a	a 3.2	a 2.01	2.62 a	1.68 a	19.47 a	23.7 a	35.53 a
Infected control	0.93 a	a 2.65	b 1.39	b 1.87	b 0.9	b 13.27	b 11.5	b 16.7
Sa-200	1.08 a	a 2.89	b 1.726	ab 2.22	a 1.46	b 13.93	18.67 a	a 30.5
Sa- 400	a 0.97	a 2.68	b 1.734	ab 2.24	b 0.9	b 13.97	12.00 b	b 17.5

تیمارهایی که دارای حروف مشترک می باشند از نظر آماری (P<0.05) اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

There is no significant difference (P<0.05) between means having the same letters.

www.SID.ir

Archive of SID

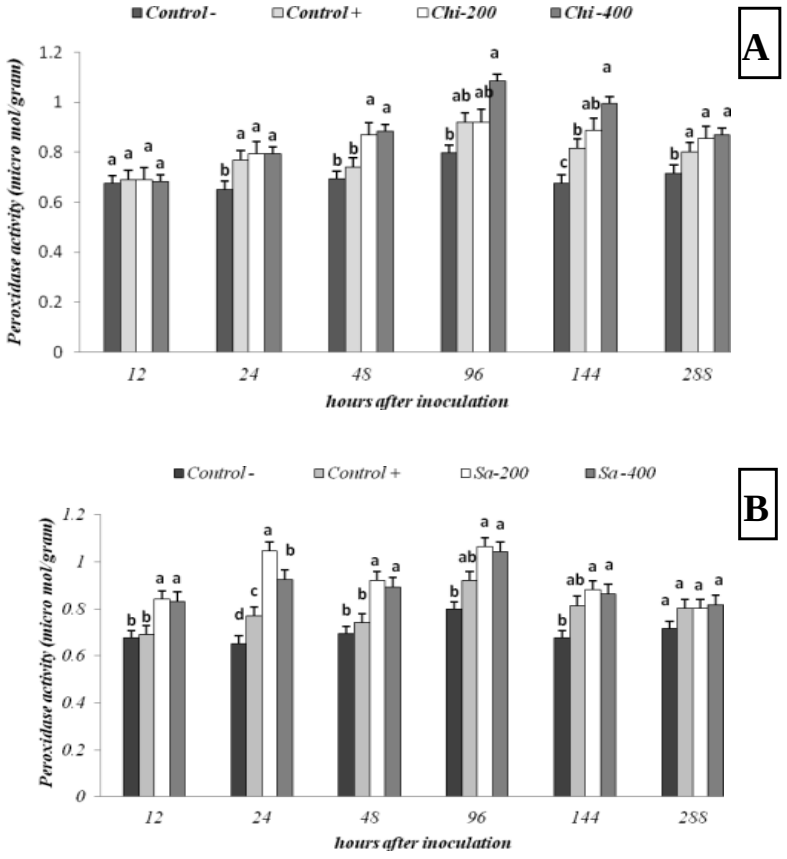
جدول ٤- تأثیر دو غلظت ۲۰۰ و ٤۰۰ ppm کیتوزان بر صفات زراعی گیاهچه‌های برنج در تیمارهای شاهد سالم و مایه‌زنی شده با *Fusarium fujikuroi*

Table 4. The effect of chitosan of concentrations 200 and 400 ppm, on agronomic traits of healthy rice seedling, after inoculating with *Fusarium.*

Treatment	Root dry weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root wet weight (g)	Shoot wet weight (g)	Root volume (cm^3)	Leaf length (cm)	Root length (cm)	Plant height (cm)
Healthy control	1.38 a	a 3.2	a 2.01	2.62 a	1.68 a	19.47 a	23.7 a	35.53 a
Infected control	0.93 a	a 2.65	b 1.39	c 1.87	b 0.9	b 13.27	c 11.5	c 16.7
Chi- 200	0.79 a	a 2.78	b 1.41	c 1.88	0.97 b	b 13.27	17.33 b	b 27.5
Chi-400	a 1.17	a 2.8	a 1.93	b 2.22	1.47 a	b 13.0	17.67 b	b 29.5

تیمارهایی که دارای حروف مشترک می باشند از نظر آماری (P<0.05) اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

There is no significant difference (P<0.05) between means having the same letters.

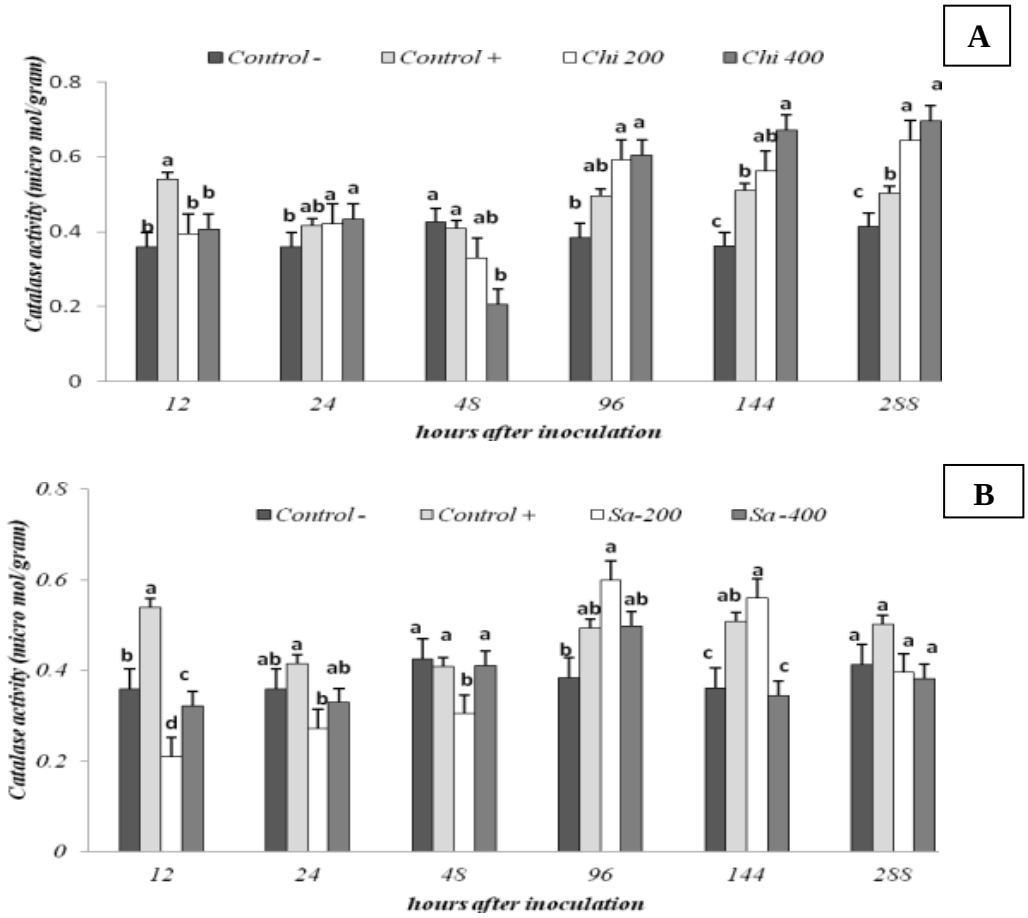


شکل ۲- مقایسه میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف A- کیتوزان و B- اسیدسالیسیلیک در ساعات مختلف پس از مایه‌زنی با قارچ *Fusarium fujikuroi*. (Control -) و (Control+) به ترتیب گیاهان شاهد سالم و بیمار، (Chi-200) و (Chi-400)معرف غلظت‌های ۲۰۰ و ٤۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان و (Sa-200) و (Sa-400) معرف غلظت‌های ۲۰۰ و ٤۰۰ پی‌پی‌ام اسیدسالیسیلیک می‌باشند. حروف متفاوت، وجود اختلاف معنی‌دار (P <۰/۰۵) بین تیمارها را در هر زمان نشان می‌دهند.

Fig. 2. Comparison of peroxidase activity in control plants and plants treated by different concentrations of A) Chitosan and B) salicylic acid in different times after inoculating with *Fusarium fujikuroi.* (control-) and (control +) are healthy and infected plants respectively. (Chi-200) and (Chi-400) showed chitosan at concentration of 200 and 400 ppm. (Sa-200) and (Sa-400) showed salicylic acid at concentration of 200 and 400 ppm. Different letters show significant differences (P<0.05).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- مقایسه میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف A- کیتوزان و B- اسیدسالیسیلیک در ساعات مختلف پس از مایه‌زنی با قارچ *Fusarium fujikuroi*. (Control -) و (Control+) به ترتیب گیاهان شاهد سالم و بیمار، (Chi-200) و (Chi-400)معرف غلظت‌های ۲۰۰ و ٤۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان و (Sa-200) و (Sa-400) معرف غلظت‌های ۲۰۰ و ٤۰۰ پی‌پی‌ام اسیدسالیسیلیک می‌باشند. حروف متفاوت، وجود اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین تیمارها را در هر زمان نشان می‌دهند.

Fig. 3. Comparison of Catalase activity in control plants and plants treated by different concentrations of A) Chitosan and B) salicylic acid in different times after inoculating with *Fusarium fujikuroi.* (control-) and (control +) are healthy and infected plants respectively. (Chi-200) and (Chi-400) showed chitosan at concentration of 200 and 400 ppm. (Sa-200) and (Sa-400) showed salicylic acid at concentration of 200 and 400 ppm. Different letters show significant differences ($P<0.05$).

اما کاربرد Sa-200، سبب کاهش میزان تولید آنزیم نسبت به تیمار شاهد شد. همچنین مقدار آنزیم در این تیمار طی زمان تا روز دوم پس از آلوده‌سازی اختلاف چندانی را نشان نداد. اما در ۹٦ ساعت پس از مایه‌زنی، میزان فعالیت کاتالاز به اوج خود رسید که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد در آن زمان داشت. در این ساعت تفاوتی بین تیمار Sa-400 و تیمار شاهد مشاهده نشد. در مجموع تیمار Sa-200 اثر بیشتری در القای فعالیت این آنزیم نشان داد. مطالعات نشان داده است در شرایط تنش در گیاهان، رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید می‌شود و یا میزان آن‌ها در گیاه افزایش می‌یابد تا اثرات زیان‌آور تنش را کاهش دهد (Hassibi *et al.*, 2007). کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز از جمله آنزیم‌های مهم در مقابله با ROS ها از جمله پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌باشند (Kulikov *et al.*, 2006). در عین حال H_2O_2 در پلیمریزه کردن

www.SID.ir

Archive of SID

لیگنین و افزایش استحکام دیواره سلولی نقش داشته و سبب کاهش سرعت نفوذ عامل بیماری می‌گردد. اما غلظت بالای این ماده طی بیماری‌زایی ممکن است سبب بروز واکنش‌های تجزیه‌ای و تخریب غشا و در نهایت مرگ سلول شود. بنابراین لازم است غلظت آن با کمک مکانیسم‌های مختلف سلولی تنظیم گردد که اغلب توسط آنزیم‌هایی مانند کاتالاز صورت می‌گیرد (Foyer and Noctor, 2005).

اسیدسالیسیلیک در گیاهان عالی، قارچ‌ها و جانوران با آنزیم کاتالاز اتصال برقرار می‌کند. بررسی‌ها نشان داده است که همه آنزیم‌های حاوی آهن از قبیل کاتالاز، لیپواکسیداز و پراکسیداز به آن متصل می‌شوند. این اسید یک ترکیب پیغام دهنده‌ی ثانوی در گیاهان است که با اتصال و ممانعت از فعالیت آنزیم کاتالاز، باعث افزایش مقدار H_2O_2 در سلول شده و ژن‌های مرتبط با دفاع گیاهان را فعال می‌کند (Ruffer *et al.*, 1995). یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که پیش تیمار گیاهان با اسیدسالیسیلیک، سبب کاهش محسوس در میزان پاسخ آنزیم کاتالاز می‌گردد. اگرچه در این آزمایش میزان H_2O_2 موجود در بافت اندازه‌گیری نشده است اما شواهد نشان می‌دهد که گیاهان پیش تیمار شده، با کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز پس از آلودگی، سبب افزایش سطح H_2O_2 به عنوان یک سیگنال در گیاه می‌گردند تا با فعال‌سازی القای مرگ سلولی و ژن‌های مرتبط با بیماری (PR پروتئین) در گیاه از آن در برابر بیمارگر محافظت نمایند (Wu, 2007). کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان برنج پیش تیمار شده با اسیدسالیسیلیک گزارش شده است (Jing *et al.*, 2007). پراکسیدازها بر اثر تحریک القاگرهای زنده یا غیرزنده، در گیاهان افزایش می‌یابند و به دنبال آن مقاومت گیاه نسبت به عوامل بیماری‌زا نیز افزایش می یابد. نتایج این مطالعه نیز حاکی از افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان پیش تیمار شده با اسیدسالیسیلیک و کیتوزان در مقایسه با شاهد بود. آنزیم پراکسیداز با تولید H_2O_2 از نفوذ قارچ در دیواره سلول گیاه جلوگیری می‌کند. در عین حال این آنزیم نیز نقش موثری در حذف H_2O_2 دارا می‌باشد (Tores *et al.*, 2006). بر اساس نتایج حاصله، فعالیت بالای این آنزیم در ساعات اولیه آلودگی می‌تواند به دلیل نقش آن در اتصالات عرضی و سنتز لیگنین و تقویت دیواره سلولی باشد و از سویی تولید بالای آن در بازه ۹۶ ساعت پس از آلودگی می‌تواند به دلیل نقش آن درالقای مرگ سلولی باشد تا از پیشرفت بیماری ممانعت نمایند. تحقیقات نشان داده است که در مورد بیمارگرهای نکروتروف، القای مقاومت سیستمیک، اغلب نیازمند توسعه‌ی زخم‌های نکروتیک است و دو تا سه روز پس از القای این زخم‌ها، سیگنال مقاومت در گیاه جابه‌جا می‌شود (Guest and Brown, 1997). همچنین در مورد پاتوسیستم برنج–*F. fujikuroi*، بحرانی‌ترین دوره آلودگی ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی می‌باشد که علت آن احتمالا ترشحات ریشه‌ای گیاه است که سبب فعال‌سازی قارچ می‌گردد (Zainudin *et al.*, 2008). این امر تولید حداکثر میزان آنزیم‌های دفاعی را در ساعت ۹۶ پس از آلودگی توجیه می‌نماید.

کیتوزان قادر است با اتصال به گیرنده های غشای پلاسمایی، واکنش‌های دفاعی گیاه را القا نماید (Lin *et al.*, 2005). تأثیر کیتوزان در افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در برنج آلوده به شیت بلایت (Liu *et al.*, 2012) و بلاست (Rodrı´guez *et al.*, 2007) گزارش شده است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. همچنین کاربرد سالیسیلیک‌اسید با غلظت ۵–۲ میلی‌مولار قادر بوده است میزان تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند پراکسیداز را افزایش داده و سبب القای تنش اکسیداتیو گردد (Ganesan and Thomas, 2001). مطالعه روی برنج آلوده به بلاست (Hekmati *et al.*, 2014) و عامل بلایت برگی باکتریایی (Thanh *et al.*, 2017) نتایج مشابهی به‌همراه داشته است. در تحقیق حاضر تغییرات میزان تولید این آنزیم‌ها در ارقام حساس و مقاوم برنج در واکنش به بیماری و کاهش شدت بیماری حاصل شده، موید تأثیر این آنزیم‌ها در سیستم دفاعی گیاه در برابر این بیماری است.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری کلی

حفاظت از گیاه نتیجه بروز پاسخ‌های دفاعی است. منابع آنزیمی در طول فعل و انفعالات میزبان-پاتوژن دستخوش تغییرات شده و مقاومت سیستمیک گیاه را به‌دنبال خواهند داشت و القاکننده‌ها به‌عنوان محرک‌های خارجی می‌توانند با فعال‌سازی مسیر مقاومت، پروسه آلودگی را به تاخیر اندازند. کیتوزان و اسیدسالیسیلیک آغازگر فعالیت‌های دفاعی در گیاه می‌باشند. تأثیر این دو ماده در تجمع آنزیم‌های دفاعی، پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی و فیتوالکسین‌ها در گیاه برنج مطالعه شده است. براساس نتایج این تحقیق کاربرد این دو القاکننده، نه تنها به دلیل خاصیت ضدمیکروبی آن‌ها، بلکه به دلیل نقش آن‌ها در تغییرات میزان تولید آنزیم‌های دفاعی در گیاه برنج آلوده به *F. fujikuro*i و کاهش علائم بیماری قابل توصیه می‌باشد. بر اساس نتایج تحقیق حاضر غلظت‌های ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسید سالیسیلیک و ٤۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان بیشترین تأثیر را در کاهش رشد میسلیومی بیمارگر نشان داد. همچنین غلظت‌های مذکور، کارایی بالاتری در فعال کردن سیستم دفاعی گیاه از طریق ایجاد تغییر در میزان بیان آنزیم‌های آنتی اکسیدان داشت. این نتایج موید یافته‌های حاصل از اندازه‌گیری شدت بیماری در گیاهان تیمار شده است به طوری که کمترین مقدار شدت بیماری در دو تیمار مدکور مشاهده گردید. به‌علاوه کاربرد این مواد، بهبود نسبی صفات مورفولوژیک گیاه را سبب گردید. در مجموع کاربرد این القاکننده‌ها به دلیل خواص مهمی مانند غیرسمی بودن، تجزیه‌پذیری بالا و عدم ایجاد آلودگی‌های زیست‌محیطی، کارایی کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی را افزایش خواهد داد. با توجه به نتایج مطالعات مختلف مبنی بر کارایی و قابلیت ژن‌های ذاتی موثر موجود در ژنوتیپ‌های مقاوم در مواجهه با بیمارگرها، نکته دیگری است که از تحقیق حاضر استنباط می‌شود، افزایش تولید نسبی آنزیم‌های دفاعی در رقم مقاوم (دم‌سیاه) به بیماری نسبت به رقم حساس می‌تواند بیانگر توانایی ذاتی اولیه این رقم در مواجهه با بیمارگر و ممانعت از استقرار و گسترش این قارچ باشد. هرچند تحقیقات بیشتر در زمینه تغییرات بیان ژن‌های دفاعی در این ارقام و تحت تأثیر تیمارهای القاکننده مورد نیاز می‌باشد.

References

ABDEL-MONAIM, M. F., M. A. W. ABDEL-GAID, and H. A. H. ARMANIOUS, 2012. Effect of chemical inducers on root rot and wilt diseases, yield and quality of tomato. International Journal of Agricultural Science, 2: 210-220.

ABU-MURIFEH, S. 2013. Effect of chitosan on common bean plants grown under water stress conditions. International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science, 3:192-199.

AHMED, H. U., M. A. T., MIA, and S. A. MIAH, 1986. Standardized test tube inolulation for bakanae disease (Bak). International Rice Researsh Notes, 11, 21-22.

ALVAREZ, M. 2000. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. Plant Molecular Biology, 44:429-442.

AMBORABE, B-E., J. BONMORT, P. FLEURAT-LESSARD, and G. ROBLIN, 2008. Early events induced by chitosan on plant cells. Journal of Experimental Botany, 59(9): 2317-2324.

AMBORABE, B. E., P. FLEURAT-LESSARD, J. F. CHOLLET, and G. ROBLIN, 2002. Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: structure activity relationship. Plant Physiology and Biochemistry, 40: 1051-1060.

BHATTACHARYA, A. 2013. Fungicidal potential of chitosan against phytopathogenic *Fusarium solani*. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, 1(4): 259-263.

www.SID.ir

Archive of SID

CUMAGUN, C.J.R., E. ARCILLAS, and E. GERGON, 2011. UP- PCR analysis of the seedborne pathogen *Fusarium fujikuroi* causing bakanae disease in rice. International Journal of Agriculture and Biology 13: 1029-1032.

da ROCHA, N. A. C., M. MARASCHIN, and R. M. DL PIERO, 2015. Antifungal activity of salicylic acid against *Penicillium expansum* and its possible mechanisms of action. International Journal of Food Microbiology, 23(215): 64-70.

DAW, D. B., L. H. ZANG, and Z. Z. WANG, 2008. Salicylic acid enhances antifungal resistance to *Magnaporthe grisea* in rice plants. Australian Plant Pathology, 37: 637-644

DHINDSA, R. S., P. DHINDSA, and A. T. THORPE, 1981. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decrease levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany, 32: 93-101.

EFATI LAKEH, S., F., PADASHT-DEHKAEI, and H., SAREMI, 2018. Diversity between different *Gibberella fujikuroi* isolates on their gibberellins hormone production and disease severity in rice plant. Iranian Journal of Plant Protection Science 49(1): 81-90.

FALCON, A. B., J. C. CABRERA, D. COSTALES, M. A. RAMIREZ, G. CABRERA, V. TOLEDO, and M. A. MARTINEZ-TELLEZ, 2008. The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24: 103-112.

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

GANESAN, V., and G. THOMAS, 2001. Salicylic acid response in rice: influence of salicylic acid on H_2O_2 accumulation and oxidative stress. Plant Sciences. 160: 1095–1106.

GUEST, D., and J. BROWN, 1997. Plant defence against pathogens, In: Plant pathogens and plant diseases 263-286. Citeulike.

GUPTA, A. K., I. S., SOLANKI, B. M., BASHYAL, Y., SINGH, and K. SRIVASTAVA, 2015. Bakanae of rice-an emerging disease in Asia. The Journal of Animal Plant Sciences 25: 1499–1514.

GUPTA, A.K., Y. SINGH, A.K. JAIN AND D. SINGH, 2014. Prevalence and incidence of Bakanae disease of rice in Northern India. Journal of Agricultural Search. 1(4): 233- 237.

HAJIPOOR BAGHERI, A., M. M. SOHANI, S. H. HASSANI, V. BABAIEZAD, and S. M. ALAVI, 2015. Symbiotic effect of endophytic fungus *Piriformospora indica* with rice (*Oryza sativa*) on resistance against Bakanae disease. Cereal Research, 5(3): 219-230. (In Persian with English abstract)

HASSIBI P, F. MORADI and M. NABIPOUR, 2007. Screening of rice genotypes for low-temperature stress-using chlorophyll fluorescence. Iranian Journal of Crop Science, 9: 14-31. (In Persian with English abstract)

HEKMATI, Z. H., A. AALAMI, and M. M. SOHANI, 2014. Effect of salicylic acid on expression of some defense-related genes in rice. Genetic Novin, 9(3): 363-372. (In Persian with English abstract)

JANDA, T. S., G, SZALAI, K. RIOZ-GONZALESE, O. VEISES, and E. PALDI, 2003. Compareative study of frost tolearence and antioxidant activity in cereals. Journal Plant Science, 164: 301-306.

JING, C., Z. H. U. CHENG, L. LI-PING, S. ZHONG-YANG, and P. XUE-BO, 2007. Effects of exogenous salicylic acid on growth and H2O2-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. Journal of Environmental Sciences, 19 44–49

JOHNSON, S. W., and R. C. COOLBAUGH, 1990. Light-stimulated gibberllin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Plant Physioliogy 944: 1696-1701.

KHIAREDDINE, H. J., R. S. EL-MOHAMEDY, F. ABDEL-KAREEM, R. A. BEN ABDALLAH, M. GUEDDES-CHAHED, and M. DAAMI-REMADI, 2015. Variation in Chitosan and Salicylic Acid

www.SID.ir

Archive of SID

Efficacy Towards Soil-borne and Air-borne Fungi and their Suppressive Effect of Tomato Wilt Severity. Plant Pathology and Microbiology, 6: 11

KULIKOV, S. N., S. N. CHIRKOV, A. V. IINA, S. A. LOPATIN, and V. P. VARLAMOV, 2006. Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. Prikl Biokhim. Mikrobiol, 42 (2): 224–228.

LEE, S. B., N., KIM, Y. J., HUR, S. M., CHO, T. S., KIM, J. H., LEE, J. H., CHO, J. K., LEE, Y. C., SONG, S. S., YOUNG, M. K., JONG, and D. S. PARK, 2019. Fine mapping of qBK1, a major QTL for Bakanae disease resistance in rice. Rice 12(36): 1-10.

LEE, S. B., Y. J., HUR, J. H., CHO, J. H., LEE, T. H., KIM, S. M., CHO, Y. C., SONG, Y. S., SEO, J. K., LEE, T. S., KIM, Y. J., PARK, M. K., OH, and D. S. PARK, 2018. Molecular mapping of qBK1WD, a major QTL for Bakanae disease resistance in rice. Rice 11: 3. https://doi.org/10.1186/s12284-017-0197-7

LI, B., B. P. LIU, C. L. SHAN, M. IBRAHIM, Y. H. LOU, Y. L. WANG, G. L. XIE, H. Y. LI, and G. C. SUN, 2013. Antibacterial activity of two chitosan solutions and their effect on rice bacterial leaf blight and leaf streak. Pest Management Science 69: 312–320.

LIN, W., X. HU, W. ZHANG, W. J. ROGERS, and W. CAI, 2005. Hydrogen peroxide mediates defense responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. Journal of Plant Physiology 162: 937–944.

LIU, H., W. X. TIAN, B. LI, G. X. WU, M. IBRAHIM, Z. Y. TAO, Y. L. WANG, G. L. XIE, H. Y. LI, and G. C. SUN, 2012. Antifungal effect and mechanism of chitosan against the rice sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. Biotechnology Letters 34: 2291–2298.

LIZARRAGA-PAULIN, E. G., I. TORRES-PACHECO, E. MORENO -MARTINEZ, and S. P. MIRANDA-CASTRO, 2011. Chitosan application in maize (*Zea mays*) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level. African Journal Biotechnology., 10: 6439-6446.

MENG, X.H., L. Y. YANG, J. F. KENNEDY, and S. P. TIAN, 2010. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. Carbohydrate Polymers 81:70–75.

RODRI´GUEZ, A. T., M. A. RAMI´REZ, R. M. CA´RDENAS, A. N. HERNA´NDEZ, M. G. VELA´ZQUEZ, and S. BAUTISTA, 2007. Induction of defense response of *Oryza sativa* L. against *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. by treating seeds with chitosan and hydrolyzed chitosan. Pesticide Biochemistry and Physiology 89: 206–215.

RUFFER, M., B. STEIPE. and M. H. ZENK, 1995. Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. FEBS Letters 377: 175-180.

SAREMI, H. 200۵. Study on root rot and crown rot of rice in Guilan and Zanjan provinces and introduction relatively resistant races to disease. Journal of Agricultural Science 11(2): 41-52. (In Persian with English abstract)

TAVARES, L. C., K. A. RUFINO, S. OLIVEIRA, A. P. BRUNES, and F. A. VILLELA, 2014. Treatment of rice seeds with salicylic acid: seed physiological quality and yield. Journal of Seed Science 36(3): 352-356.

THANH, T. L., K. THUMANU, S. WONGKAEW, N. BOONKERD, N. TEAUMROONG, P. PHANSAK, and N. BUENSANTEAI, 2017. Salicylic acid-induced accumulation of biochemical components associated with resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, Journal of Plant Interactions, 12(1): 108-120.

TORRES, M. A., D. G. JONATHAN, and J. L. DANGL, 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogen. Plant Physiology. 141: 373-378.

WU, Y., 2007. Study on the interaction between salicylic acid and catalase by spectroscopic methods. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 6(1): 796-801.

ZAINUDIN, N., A. A. RAZAK, and B. SALLEH, 2008. Bakanae disease of rice in malaysia and indonesia:

www.SID.ir

Archive of SID

etiology of the causal agent based on morphological, physiological and pathogenicity characteristics. Journal of plant protection research 48(4): 475-485.

ZENG, X., C. WANG, M. ALI, H. ZHANG, X. LIU, W. LI, and W. JI, 2010. Profiling gene expression patterns of strip rust (*Puccinia striformis* f.sp. *tritici*) resistance gene in new wheat germplasm. Pak. J. Bot 42(6): 4253-4266.

www.SID.ir