القای مقاومت به بیماری بلاست در گیاه برنج به کمک قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* *

INDUCTION OF BLAST DISEASE RESISTANCE IN RICE PLANTS BY ENDOPHYTE FUNUS *Piriformospora indica*

سید حسین موسوی[۱]، ولی اله بابایی زاد[۲]، بهرام شریف نبی[۱]، محمد علی تاجیک قنبری[۲] ، امیر مساح[۱] و سید محمد علوی[۳]**

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۲۱)

چکیده

بیماری بلاست برنج یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های برنج در ایران می‌باشد. قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* موجب تحریک مقاومت سیستمیک علیه عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌شود. در این مطالعه میزان تغییر بیان برخی ژن‌های مهم دفاعی در گیاهان تیمارشده توسط قارچ میکوریز *P. indica* و گیاهان بدون میکوریز در زمان‌های مختلف پس از آلودگی به بیماری بلاست برنج ناشی از *Magnaporthe oryzae* با استفاده از تکنیک Real-time qPCR مورد بررسی قرارگرفت. بررسی فنوتیپی برهم‌کنش گیاه برنج و قارچ عامل بیماری بلاست در حضور قارچ میکوریز نشان داد که گیاه حساسیت کمتری در برابر بیماری از خود بروز داده است. همچنین تجمع ترانوشت ژن‌های *Pr1b*، *NPR1*، *LOX* و *WRKY85* در گیاهان تیمار شده با قارچ میکوریز در مقایسه با گیاهان بدون میکوریز در اثر آلودگی به بیماری بلاست برنج افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. نتایج حاکی از نقش فعال قارچ *P. indica* در حفاظت از گیاه برنج در مقابل بیماری بلاست در اثر افزایش بیان ژن‌های مذکور می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: **بلاست برنج، ژن‌های دفاعی، مقاومت سیستمیک، میکوریز، Real-time qPCR**

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shm.musavi@gmail.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و استادیار بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. استادیاران بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳. کارشناس ارشد پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان

مقدمه

برنج محصول عمدهٔ غذایی برای حدود نیمی از جمعیت دنیا می‌باشد. این گیاه زراعی در ایران بعد از گندم در درجه دوم اهمیت قرار دارد. تولید برنج همواره با انواع تنش‌های زنده و غیر زنده مواجه می‌باشد که یکی از مهم‌ترین این تنش‌ها بیمارگرهای گیاهی می‌باشند. تقریباً ۷۰ نوع بیماری با عوامل قارچی، باکتریایی، ویروسی و نماتودی در برنج گزارش شده است. در میان بیماری‌های برنج، بیماری بلاست از مهم‌ترین بیماری‌های برنج محسوب می‌شود (Zhang *et al* 2009, Song & Goodman 2001) و یکی از گسترده‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های برنج در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری مرطوب از جمله ایران می‌باشد. میزان متوسط خسارت سالانهٔ بلاست برنج در سطح جهانی حدود ۱۱ تا ۳۰ درصد است (Torres & Teng 1993).

عامل بیماری قارچ *Magnaporthe oryzae* Couch از شاخه آسکومیکوتا با فرم غیرجنسی *Pyricularia oryzae* Cavara می‌باشد. برای کنترل بیماری از ارقام مقاوم و سموم شیمیایی استفاده می‌شود. با این وجود استفاده از ارقام مقاوم با پدیده شکسته شدن مقاومت در مقابله با تنوع بالای جمعیت بیمارگر مواجه است. استفاده از سموم هم پر هزینه است و هم اثر سوء روی محیط زیست دارد. از این رو به توسعه استراتژی‌هایی که مقاومت پایدار را گسترش می‌دهند، نیاز است. مقاومت القایی یکی از این استراتژی‌های پایدار است (Song & Goodman 2001).

یکی از روش‌های القای مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زای گیاهان استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید به عنوان هم‌زیست در گیاهان می‌باشد (Kogel *et al*. 2006). قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* Sav. Verma, Aj. Varma, Rexer, G. Kost & P. Franken از ریشه تعداد زیادی از گیاهان گزارش شده است. این قارچ در فضای بین سلولی و داخل سلولی ریشه گیاه رشد می‌کند و موجب تحریک مقاومت سیستمیک علیه عوامل بیماری‌زای ریشه، ساقه و برگ در گیاه می‌گردد. این حفاظت سیستمیک گیاه منجر به افزایش عملکرد می‌شود. قارچ *P. indica* اولین بار در سال ۱۹۹۸ توسط *ورما و همکاران* (Verma *et al*. 1998) از خاک ریزوسفری گیاهان کهور و کنار در کشور هندوستان جداسازی شد. این قارچ از راسته Sebacinales رده Agaricomycetes و شاخه Basidiomycota می‌باشد (Verma *et al*. 1998, Varma *et al*. 1999). *والر وهمکاران* (Waller *et al*. 2005) نشان دادند که *P. indica* موجب تحریک مقاومت سیستمیک جو در مقابل قارچ بیوتروف *Blumeria graminis* f.sp. hordei عامل سفیدک سطحی جو می‌شود. *اشتاین و همکاران* (Stein *et al*. 2008) نیز مشخص کردند که *P. indica* موجب حفاظت سیستمیک گیاه آرابیدوپسیس در برابر سفیدک سطحی با عامل *Golovinomyces orontii* از طریق مسیر ISR توسط سیگنال‌های JA و NPR1 می‌شود.

در این مطالعه اثر قارچ میکوریز *P. indica* در القای مقاومت علیه بیماری بلاست (*M. oryzae*) در برنج مورد بررسی قرار گرفت و میزان بیان ژن‌های درگیر در مقاومت به بیماری بلاست برنج شامل ژن‌های *Pr1b*، *NPR1*، *LOX* و *WRKY85* در گیاهان تیمار شده توسط میکوریز و گیاهان شاهد با استفاده از تکنیک Real-time PCR ارزیابی شد.

روش بررسی

تهیه و تکثیر قارچ اندوفیت

جدایه قارچ *P. indica* (اهدایی پروفسور کوگل، رئیس موسسه بیماری شناسی و جانورشناسی کاربردی دانشگاه گیسن آلمان) در محیط کشت جامد اختصاصی [Complex medium (CM)] حاوی گلوکز ۲۰ گرم، پپتون دو گرم، محلول نمک (Na NO3, KCl, Mg SO4. 7 H2O, KH2 PO4) 50 میلی‌لیتر، عصاره مخمر یک گرم، محلول ریز مغذی(MnCl2. 4 H2O, H3 BO3, Zn SO4 .7 H2O, Na2 MoO4.2 H2O, KI, Cu SO4.5 H2O) یک میلی لیتر، کازامین اسید یک گرم و آگار ۱۵ گرم در یک لیتر آب کشت و برای تولید اسپور سه هفته در دمای 25 Co نگهداری شد. برای تهیه مایه تلقیح اسپور قارچ اندوفیت، از آب مقطر سترون به همراه توئین۲۰ به میزان ۰/۰۵ درصد استفاده شد (Waller *et al*. 2005).

تهیه و تکثیر قارچ عامل بلاست برنج

برای آلوده‌سازی گیاه برنج به بیماری بلاست جدایه ۲۷۴ قارچ *M. oryzae* با قدرت بیماری‌زایی بالا از بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی موسسه تحقیقات برنج کشور تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. برای رشد اولیه قارچ از محیط PDA و برای تولید اسپور کافی جهت مایه زنی از محیط کشت آلو-آگار(Prune-Agar) (حاوی لاکتوز ۵ گرم، عصاره مخمر ۱ گرم، آلو ۳ عدد و آگار ۲۰ گرم در یک لیتر آب) استفاده شد. پس از یک هفته رشد قارچ در دمای $28^{o}C$ ، جهت تحریک اسپورزایی، محیط کشت تحت تناوب ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفت. پس از تکثیر مناسب قارچ و اسپور کافی با استفاده از آب مقطر استریل مایه تلقیح تهیه گردید(Mackill & Bonman 1992).

کاشت گیاه و استقرار قارچ اندوفیت در ریشه گیاه برنج

بذرهای ارقام طارم محلی از بخش تحقیقات اصلاح بذر موسسه تحقیقات برنج کشور تهیه شد. برای از بین بردن آلودگی‌های سطحی بذرها، ضدعفونی سطحی انجام شد. ریشه گیاهچه‌های چهار روزه، در مایه تلقیح قارچ *P. indica* (۱۰۶کلامیدوسپور در میلی‌لیتر) غوطه ور گردید و به مدت پنج ساعت روی شیکر با سرعت ۴۰ دور در دقیقه تکان داده شد.

هم‌زمان ریشه گیاهچه‌های شاهد نیز در محلول آب مقطر استریل به همراه ۰/۰۵ درصد توئین۲۰ غوطه‌ور شد تا شرایط برای همه گیاهچه‌ها یکسان باشد. پس از پنج ساعت گیاهچه‌های تیمار شده و شاهد در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار به تشت‌هایی حاوی محیط غذایی یوشیدا (مایع) (Yushida *et al*. 1976) انتقال یافتند. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD و تجزیه و تحلیل‌های آماری به کمک نرم افزار SAS انجام گرفت.

بررسی همزیستی ریشه

بررسی میکروسکوپی: برای این منظور در ابتدا ریشه گیاهان تلقیح شده و شاهد رنگ آمیزی و سپس با میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. رنگ آمیزی ریشه گیاه بر اساس روش ویرهیلیگ و همکاران (Vierheilig *et al*. 1998) انجام شد. جهت بررسی استقرار پایدار قارچ میکوریز در ریشه گیاه، سه مرحله رنگ‌آمیزی ریشه انجام پذیرفت. اولین رنگ‌آمیزی پس از دو هفته از کاشت گیاهچه‌ها، رنگ‌آمیزی دوم در چهارمین هفته پس از کاشت و سومین رنگ‌آمیزی در پایان خوشه دهی از ریشه گیاهان تلقیح شده به قارچ

میکوریز و شاهد انجام و وجود کلامیدوسپورها در ریشه مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی مولکولی: در روش مولکولی پس از ضدعفونی سطحی ریشه‌های تیمار شده و شاهد، استخراج DNA به روش موری و تامپسون (Murray & Thompson 1980) انجام شد. پس از استخراج DNA از ریشه‌های شاهد و تیمار شده با *P. indica*، برای ردیابی قارچ میکوریز از PCR با آغازگرهای اختصاصی Tef (accession no. AJ249911) استفاده شد(Deshmukh & Kogel 2007). ارزیابی محصول واکنش PCR روی ژل آگاروز ۲ درصد در بافر TBE 1X صورت گرفت.

مایه‌زنی قارچ عامل بیماری بلاست به برگ‌های برنج

برای مایه‌زنی از عامل بیماری غلظت ۱۰۵ اسپور در میلی‌لیتر قارچ عامل بلاست در آب مقطر استریل به همراه ۰/۰۵ درصد توئین۲۰ استفاده شد. مایه تلقیح تهیه شده توسط افشانه روی گیاهچه‌های چهار هفته‌ای موردآزمایش مایه‌زنی شد. گیاهچه‌ها زیر پوشش پلاستیکی تحت شرایط دمایی 28 و رطوبت بیش از ۹۰ درصد به مدت یک هفته نگهداری شد.

نمونه‌برداری

نمونه برداری از بافت برگی گیاهچه‌های تیمار شده و نیز شاهد در فواصل زمانی ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ انجام گرفت. نمونه‌های برگی پس از انتقال به لوله‌های فالکن به سرعت در نیتروژن مایع فرو برده و سپس به فریزر با دمای $-80\ ^{o}C$ منتقل شدند.

توسعه فنوتیپی بیماری

برای بررسی فنوتیپی توسعه بیماری بلاست برنج در گیاهان تیمارشده توسط میکوریز و شاهد شاخص‌های تیپ آلودگی، سطح برگ آلوده و تعداد لکه اسپورزا مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند.

تیپ آلودگی

برای این منظور ۷ تا۱۰روز پس از مایه‌زنی، برگ‌های جوانی که در معرض اسپورهای قارچ قرار گرفته بودند مورد ارزیابی قرار گرفتند. تیپ آلودگی با استفاده از مقیاس صفر تا ۵ بر اساس روش مک گیل و بونمن (Mackill & Bonman 1992) ارزیابی شد که در آن واکنش میزبان به شش کلاس مختلف تقسیم می‌گردد. گیاهانی که واکنش‌های نوع صفر تا دو را نشان می‌دهند به‌عنوان گیاهان مقاوم، گیاهان با واکنش نوع سه نسبتاً حساس و گیاهان با واکنش‌های نوع چهار و پنج در گروه گیاهان حساس قرار می‌گیرند.

درصد سطح برگ آلوده

سطح برگ آلوده با معیار صفر تا ۹ بر اساس سیستم ارزیابی استاندارد (Standard Evaluation System) مؤسسه بین المللی تحقیقات برنج انجام شد (IRRI 1996).

تعداد لکه

تعداد لکه‌های اسپورزا با تیپ آلودگی ۳ $\leq$ به‌عنوان تعداد لکه روی هر گیاه شمارش شد.

استخراج آر ان ا و زدودن دی ان ای ژنومی

استخراج آر ان ا از نمونه‌های نگهداری شده در فریزر $-80\ ^{o}C$ با استفاده از بافرRNX-Plus (شرکت

سیناژن) مطابق دستورالعمل کیت انجام گرفت. کیفیت آر ان ای استخراجی با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۲ درصد در بافر TAE 1X ارزیابی شد. به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی دی ان ای از آر ان ای از کیت DNase I, RNase-free ساخت شرکت Fermentas استفاده شد.

ساخت دی ان ای مکمل

ساخت دی ان ای مکمل (cDNA) با کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis شرکت Fermentas طبق دستورالعمل آن انجام گرفت. برای این منظور از آغازگر oligodT(18) و آنزیم SuperScript Reverse Transcriptase استفاده گردید. جهت بررسی کیفیت نمونه‌های سی- دی ان ای سنتز شده از PCR با آغازگر اختصاصی اکتین استفاده شد.

بررسی بیان ژن و آنالیز داده‌ها

بررسی بیان ژن با تکنیک Quantitative real- time PCR انجام شد. برای این منظور از دستگاه C1000™ Thermal Cycler شرکت BioRad استفاده شد. کیت استفاده شده در این واکنش Maxima (SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X شرکت Fermentas بوده که طبق دستورالعمل انجام گرفت. آنالیز داده‌های Real time با نرم افزار Bio-Rad CFX Manager انجام شد. آنالیز نتایج در این روش با فرمول $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ محاسبه شد.

$\Delta\Delta C_T$=(نمونه آزمایش ΔCT - نمونه کنترل ΔCT)

ΔC_T =(ژن هدف CT - ژن خانه دار CT)

در این بررسی ژن اکتین به‌عنوان ژن خانه دار و ژن‌های *Pr1b*، *NPR1*، *LOX* و *WRKY85* به عنوان ژن‌های هدف مورد استفاده قرار گرفتند(جدول ۱).

ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده

به دلیل عدم اختصاصیت رنگ فلورسنس سایبرگرین، برای اطمینان از تولید قطعه اختصاصی و عدم وجود باندهای غیراختصاصی و ساختارهای ثانویه و دوپار آغازگر در محصولات Real-time PCR، منحنی ذوب (Melting Curve) رسم شد. ترسیم منحنی ذوب پس از اتمام واکنش با نرم افزار Bio-Rad CFX Manager انجام شد. جهت مشخص شدن اختصاصی بودن آغازگرها منحنی ذوب هر آغازگر باید دارای یک اوج (Peak) واحد باشد.

محاسبه کارایی Real time- PCR

برای محاسبه کارایی Real time- PCR از نرم افزار LinReg Analysis of quantitative RT-PCR data استفاده شد. ابتدا داده‌های حاصل از دستگاه Real time را به یک فایل اکسل تبدیل کرده و سپس داده‌ها را به نرم افزار LinReg داده و نرم افزار محاسبه کارایی هر نمونه قرائت شد. برای این کار فاز لگاریتمی از منحنی تکثیر هر نمونه و آنالیز رگرسیون خطی ازخط رگرسیون توسط نرم افزار انجام شد.

نتایج و بحث

وضعیت همزیستی قارچ با ریشه گیاه برنج

بررسی میکروسکوپی

با رنگ‌آمیزی ریشه، کلامیدوسپورهای قارچ در بافت

کورتکس ریشه گیاهان تلقیح شده به صورت گرد تا گلابی شکل و زنجیره‌ای مشاهده شدند. توده‌های ریسه قارچ نیز در سطح ریشه قابل مشاهده بود، در صورتی که در ریشه‌های شاهد کلامیدوسپورها و توده‌های ریسه دیده نشدند(شکل ۱).

جدول ۱. ژن‌ها و توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Genes and nucleotide sequences of primers used in this study.

ژن Gene name	توالی آغازگر Sequence	منبع Reference
Actin	F: 5'- CTGCGGGTATCCATGAGACT -3' R: 5'- GGAGCAAGGCAGTGATCTTC -3'	Zhong *et al*. 2009
Pr1b	F: 5' - AGGCGTTCGCGGAGAACTA -3' R: 5' - GAAGAGGTTCTCGCCAAGGTT -3'	Zhong *et al*. 2009
NPR1	F: 5'- GAACCCGGGATGGACACCACCATTG -3 R: 5'- AAGGATCCTCAAGGTACCTCCAAACCAAG -3'	Chern *et al*. 2001
Lox	F: 5'- AGATGAGGCGCGTGATGAC -3' R: 5'- CATGGAAGTCGAGCATGAACA -3'	Zhong *et al*. 2009
WRKY85	F: 5'- CAGCAAGAAAAGGAATATACAAAT -3' R: 5'- CTCAATGTGTTTCCTAACATTACA -3'	Ryu *et al*. 2006

بررسی مولکولی:

در بررسی مولکولی با آغازگر اختصاصی Tef باندی معادل ۱۶۰ جفت باز مربوط به *P. indica* در نمونه‌های تلقیح شده دیده شد اما در نمونه شاهد باندی قابل رویت نبود(شکل ۲).

با توجه به بررسی میکروسکوپی و مولکولی ریشه در مراحل مختلف رشد رویشی و همچنین پایان دوره زایشی، قارچ *P. indica* در ریشه برنج ردیابی شد که این نتایج می‌تواند بیانگر استقرار مناسب و پایدار قارچ در ریشه برنج باشد.

واکنش فنوتیپی گیاهان به بیماری

تیپ آلودگی

با بررسی تیپ آلودگی بر اساس روش *مک‌گیل و بونمن* (Mackill & Bonman 1992)، در برگ‌های گیاهان تیمار شده با میکوریز، لکه‌های ۱ تا ۳ میلی‌متری گرد و بیضوی مبین تیپ آلودگی از نوع ۳ ظاهر شد در صورتی که در برگ‌های گیاهان فاقد میکوریز لکه‌های مشخص دوکی شکل به طول ۳ میلی‌متر یا بیشتر، با مرکز خاکستری و نکروزه و حاشیه متمایل به قرمز و یا آب سوخته نمایان شد که این علایم بیانگر تیپ آلودگی از نوع ۴ می‌باشد(شکل ۳). براساس این روش گیاهان با تیپ آلودگی ۳ جزو گیاهان نسبتاً حساس یا متحمل و گیاهان با تیپ آلودگی ۴ جزو گیاهان حساس قرار می‌گیرند.

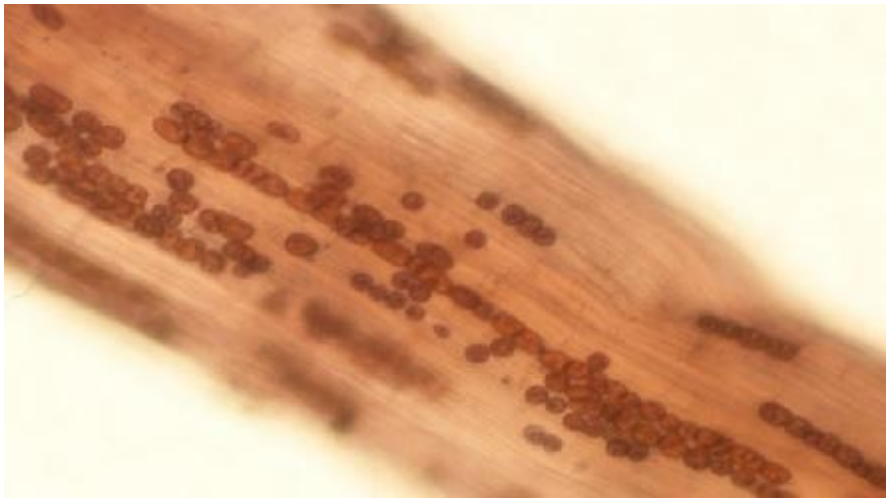
درصد سطح برگ آلوده

در این روش بر حسب شدت بیماری و آلودگی، علایم در ۹ معیار دسته‌بندی شده استاندارد ارزیابی شدند (IRRI 1996). علایم در گیاهان تیمار شده با قارچ میکوریز بر اساس سیستم ارزیابی استاندارد، معیار ۴ را نشان داد. میزان آلودگی سطح برگ برای این معیار ۳ تا ۷ درصد می‌باشد. در صورتی که علایم در گیاهان فاقد رابطه

هم‌زیستی با قارچ میکوریز، معیار ۶ را نشان می‌داد که میزان آلودگی سطح برگ در آن ۱۵ تا ۲۴ درصد است (شکل ۳).

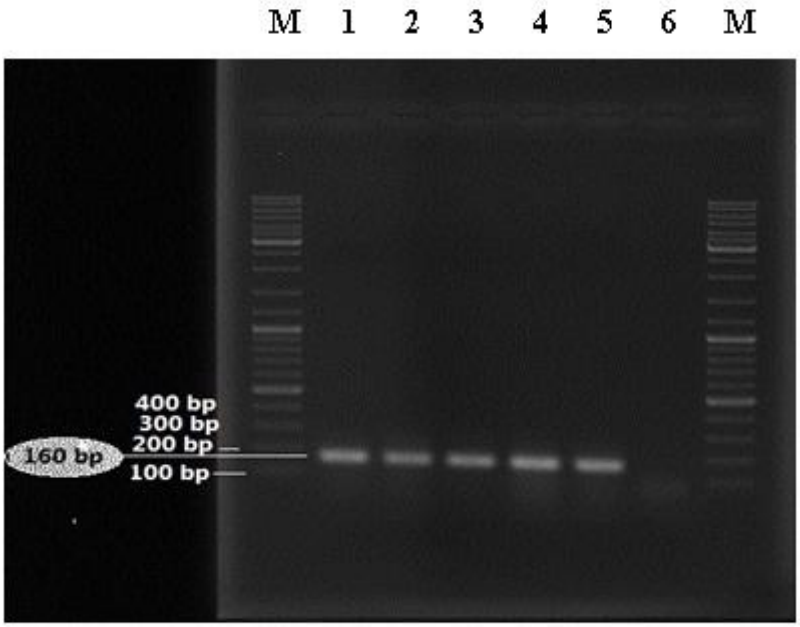
تعداد لکه‌های اسپورزا

شمارش تعداد لکه‌های اسپورزا نشان از تعداد لکه‌های



شکل ۱. بررسی میکروسکوپی ریشه برنج. کلامیدوسپورهای قارچ اندومیکوریز *Piriformospora indica* در بافت کورتکس ریشه برنج

Fig. 1. Chlamydospores of *Piriformospora indica* in cortex of rice root tissue.



شکل ۲. نقوش الکتروفورزی محصول PCR با آغازگر اختصاصی Tef بر روی ژل آگاروز ۲ درصد در بافر TBE 1X. راهک M، نشانگر (100bp Plus)، راهک ۱، کنترل مثبت (استخراج مستقیم از DNA قارچ)، راهک ۲ و ۳، گیاه تیمار شده با میکوریز در کشت خاکی، راهک ۴ و۵، گیاه تیمار شده با میکوریز در کشت هیدروپونیک و راهک ۶، گیاه شاهد(کنترل منفی).

Fig. 2. Electrophoresis patterns of PCR products with specific primers Tef on agarose gel (2%) in TBE 1X buffer. Lanes: M, ladder (100bp Plus); 1, positive control (DNA extracted from the fungus); 2 and 3, plants grown in soil treated with mycorrhiza; 4 and 5, plants treated with mycorrhiza grown hydroponically; 6, control plant.

کمتر در گیاهان تیمارشده در مقایسه با گیاهان شاهد بود.

نتایج به‌دست آمده نشان داد که گیاهان تیمار شده با قارچ میکوریز در مقایسه با گیاهان تیمار نشده در برابر بیماری بلاست برنج حساسیت کمتری را از خود بروز داده‌اند. همچنین تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD برای سنجش بیماری، نشان از اختلاف

شکل ۳. نمونه لکه‌های ایجاد شده در برگ‌های برنج مایه‌زنی شده با عامل بلاست. گیاهان تیمارشده با قارچ میکوریز(سمت راست) و گیاهان فاقد میکوریز (سمت چپ)

Fig. 3. Disease development in rice leaves inoculated with *Magnaporthe oryzae* . Right, treated with *Piriformospora indica*; left, not treated.

معنادار در سطح پنج درصد در صفات تیپ آلودگی و تعداد لکه‌های اسپورزا و در سطح یک در صد برای صفت سطح برگ آلوده است(جدول‌های ۲ و ۳). بنابراین نتایج حاصله، نشان داد که قارچ میکوریز *P. indica* موجب حفاظت گیاه در مقابل بیماری بلاست برنج شده است.

والر و همکاران (Waller *et al*. 2005) با کلنیزه کردن ریشه جو با *P. indica* مشاهده کردند گیاه تحمل بالایی نسبت به قارچ‌های بیماری‌زای *Fusarium culmorum* و *Cochliobolus sativus* پیدا کرده است و موجب افزایش ۱۱ درصدی عملکرد دانه شده بود. دشموک وکوگل (Deshmukh & Kogel 2007) با کلنیزه کردن ریشه جو با *P. indica* نشان دادند که گیاه تحمل بالایی نسبت به قارچ بیماری‌زای *Fusarium graminearum* پیدا کرده است. *سرفلینگ و همکاران* (Serfling *et al*. 2007) با تیمار ریشه گندم با *P. indica* در آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای کاهش شدید علائم بیماری سفیدک سطحی ناشی از *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*، پوسیدگی ساقه با عامل *Pseudocercosporella herpotrichoides* و پوسیدگی ریشه با عامل *Fusarium culmorum* را در گندم مشاهده کردند. *والر و همکاران* (Waller *et al*. 2005) نشان دادند که *P. indica* موجب تحریک مقاومت سیستمیک جو در مقابل قارچ بیوتروف *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* عامل سفیدک سطحی

جو می‌شود که کاهش تا ۷۰ درصد در تعداد و اندازه لکه‌های (پوستول) سفیدک سطحی دیده شد. *اشتاین و همکاران* (Stein *et al.* 2008) مشخص کردند که *P. indica* موجب حفاظت سیستمیک گیاه آرابیدوپسیس در برابر سفیدک سطحی ناشی از *Golovinomyces orontii* از طریق مسیر ISR توسط سیگنال‌های JA و *NPR1* می‌شود.

ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده

نتایج منحنی ذوب برای آغازگرهای مطالعه شده در آزمایش نشان داد که همه آغازگرها به صورت اختصاصی عمل نموده و فاقد هر گونه قطعات غیراختصاصی و ساختارهای ثانویه می‌باشند.

جدول ۲. تجزیه واریانس سنجش بیماری در گیاه برنج تیمار شده با قارچ میکوریز *Piriformospora indica* و گیاه شاهد در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری بلاست (*Magnaporthe oryzae*)

Table 2. Analysis of variance for disease evaluation parameters in rice plant treated with mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* and control plant at various times after inoculation with the causal agent of blast disease (*Magnaporthe oryzae*).

				میانگین مربعات MS
منابع تغییرات SV	درجه آزادی DF	تیپ آلودگی Infection Type	درصد سطح برگ آلوده % leaf area affected	تعداد لکه های اسپورزا Number of Sporulating Lesions
تیمار Treatment	1	4.16*	308.16**	28.16*
خطاError	2	0.33	9.16	2.83
ضریب تغییراتCV		16.49	23.59	19.80

* و ** : به ترتیب معنی دار در سطح احتمالی پنج و یک درصد

* and ** : significant at 5% and 1% respectively.

جدول ۳. مقایسه میانگین سنجش بیماری در گیاه برنج تیمار شده با قارچ میکوریز *Piriformospora indica* و گیاه شاهد در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری بلاست (*Magnaporthe oryzae*).

Table 3. Comparison of mean disease evaluation parameters in rice plant treated with mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* and control plant at various times after inoculation with the causal agent of blast disease (*Magnaporthe oryzae*).

تیمارTreatment	تیپ آلودگیInfection Type	درصد سطح برگ آلوده % leaf area affected	تعداد لکه های اسپورزا Lesion Number of Sporulating
شاهد Control	4.33 [a]	[a]20	[a]10.66
تلقیح شده Inoculated	[b]2.66	[b]5.66	[b]6.33

در هر ستون میانگین هایی که دارای حروف متفاوت هستند، بر اساس آزمون LSD اختلاف معنی‌داری دارند.

Mean in each column followed by different letters, are significantly different using LSD test.

بررسی کارایی واکنشReal time- PCR

نتایج نشان داد که کارایی تکثیر در نمونه‌ها، مشابه هم بوده و روند مناسبی از تکثیر رخ داده است.

الگوی بیان ژن *NPR1*

میزان بیان ژن *NPR1* در گیاهان تیمار شده با *P. indica* و گیاهان تیمار نشده در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به قارچ *M. oryzae* افزایش یافت که بیشینه بیان در گیاهان تیمار شده با *P. indica* ، ۲۴ ساعت پس از آلودگی و در گیاهان تیمار نشده، ۴۸ ساعت پس از آلودگی بوده است. میزان بیشینه ترانوشت ژن *NPR1* ، در گیاهان تیمار شده با میکوریز، ۷/۲ برابر و در گیاهان تیمار نشده، ۳/۲ برابر نسبت به شاهد (زمان صفر) مربوطه افزایش یافت. همچنین مقایسه گیاهان تیمار شده با *P. indica* با گیاهان تیمار نشده در زمان اوج بیان نشان داد که میزان ترانوشت ژن *NPR1* در گیاهان تیمار شده با *P. indica*، ۲/۲ برابر بیشتر از گیاهان تیمار نشده بود (شکل ۴).

بررسی‌های مختلف نشان داد که افزایش بیان این ژن در گیاهان باعث القای مقاومت به بیمارگرها می‌شود. یکی از اولین مراحل برای SAR بیان ژن *NPRI* درسطح بالاتر از معمول است که پروتئین محصول آن برای انتقال نشانه‌های اسیدسالیسیلیک ضرورت دارد (Jwa *et al*. 2006). *یوان و همکاران* (Yuan *et al*. 2007) نشان دادند که بیان ژن *NPR1* در مقاومت به بیماری بلاست و بلایت باکتریایی دخالت دارد. *کرن و همکاران* (Chern *et al*. 2001) نشان دادند در گیاهان تراریخت با القا ژن *NPR1*، مقاومت به بیماری بلاست و بلایت باکتریایی برنج در اثر بیان ژن‌های *PR1b*، *PR5*، *PR10* و *PBZ1* افزایش یافت. *لی و همکاران* (Li *et al*. 2006) بیان ژن *NPR1* را در تعامل برنج با قارچ *M. grisea* مورد بررسی قرار داده و نشان دادند این ژن در تعامل سازگار و ناسازگار بیان می شود.

مولیتور و کوگل (Molitor & Kogel 2009) نشان دادند ژن *NPR1* به عنوان تنظیم‌کننده اصلی مسیر دفاعی گیاهان تیمار شده با قارچ میکوریز در برابر بیمارگرها می‌باشد.

الگوی بیان ژن *PR1b*

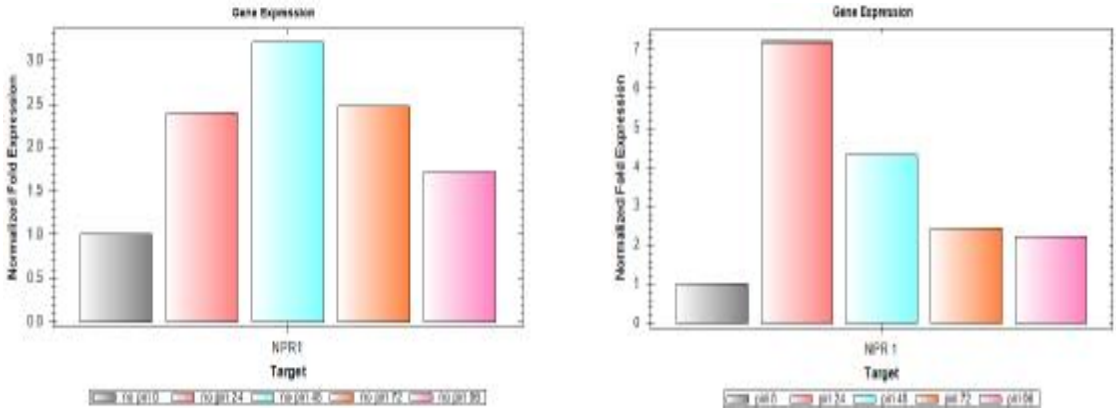
میزان بیان ژن *PR1b* در گیاهان تیمار شده با *P. indica* و گیاهان تیمار نشده در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به قارچ *M. oryzae* افزایش یافت که بیشینه بیان در گیاهان تیمار شده، ۲۴ ساعت پس از آلودگی و در گیاهان تیمار نشده، ۴۸ ساعت پس از آلودگی بود. بیشینه نرخ بیان ژن *PR1b*، در گیاهان تیمار شده با *P. indica* ، ۱۲ برابر و در گیاهان تیمار نشده، ۴/۲ برابر نسبت به شاهد (زمان صفر) مربوطه افزایش یافت. همچنین مقایسه گیاهان تیمار شده با *P. indica* با گیاهان تیمار نشده در زمان اوج بیان نشان داد که میزان ترانوشت ژن *PR1b* در گیاهان تیمار شده با *P. indica*، ۲/۹ برابر بیشتر از گیاهان تیمار نشده بود. (شکل ۵).

کیم و همکاران (Kim *et al*. 2001) نشان دادند که هر دو ژن *PR1a* و *PR1b* در برگ‌های برنج تلقیح شده با قارچ عامل بلاست بیان می‌شوند. *آگراوال و همکاران* (Agrawal *et al*. 2001) در بررسی‌های خود با تیمار گیاهچه‌های برنج با SA، JA و آبسیزیک اسید (ABA) و بررسی بیان ژن‌های القایی در اثر آلودگی به بیماری بلاست، دریافتند که در زمان تیمار با SA و ABA میزان بیان ژن *OsPR1* بسیار افزایش می‌یابد.

اشتاین و همکاران (Stein *et al*. 2008) در بررسی مقاومت سیستمیک گیاه آرابیدوپسیس در مقابل قارچ عامل بیماری سفیدک سطحی *Golovinomyces orontii* توسط قارچ *P. indica* نشان دادند بیان ژن‌های *NPR1*، *PR1*، *PR5*، *PDF* و *ERF1* افزایش یافت. *مولیتور و همکاران* (Molitor *et al*. 2011) نشان دادند بیان ژن‌های *PR1*، *PR2*، *PR5* و *Hsp70* در گیاهان جو تیمار شده با قارچ میکوریز *P. indica* در اثر آلودگی به قارچ عامل سفیدک سطحی *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* افزایش یافت.

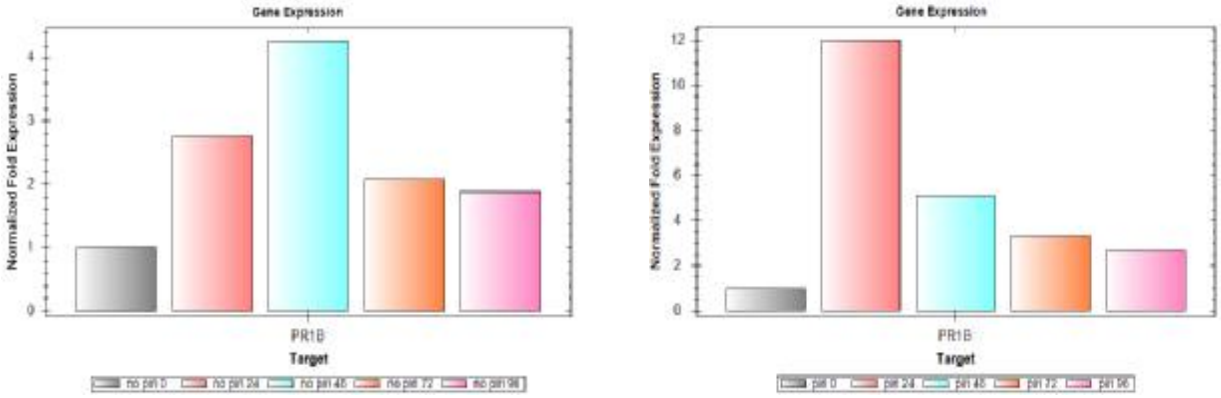
الگوی بیان ژن *LOX*

میزان بیان ژن *LOX* در گیاهان تیمار شده با *P. indica* و گیاهان تیمار نشده در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به قارچ *M. oryzae* افزایش یافت که بیشینه بیان در گیاهان تیمار



شکل ۴. الگوی بیان ژن *NPR1* در گیاه برنج تیمار شده با قارچ میکوریز *Piriformospora indica* (سمت راست) و گیاه برنج بدون قارچ میکوریز (سمت چپ) در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری بلاست (*Magnaporthe oryzae*).

Fig. 4. Expression patterns of *NPR1* gene. Rice plant treated with mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* (Right) and rice plant without mycorrhizal fungus (left) at various times after inoculation with the causal agent of blast disease (*Magnaporthe oryzae*).

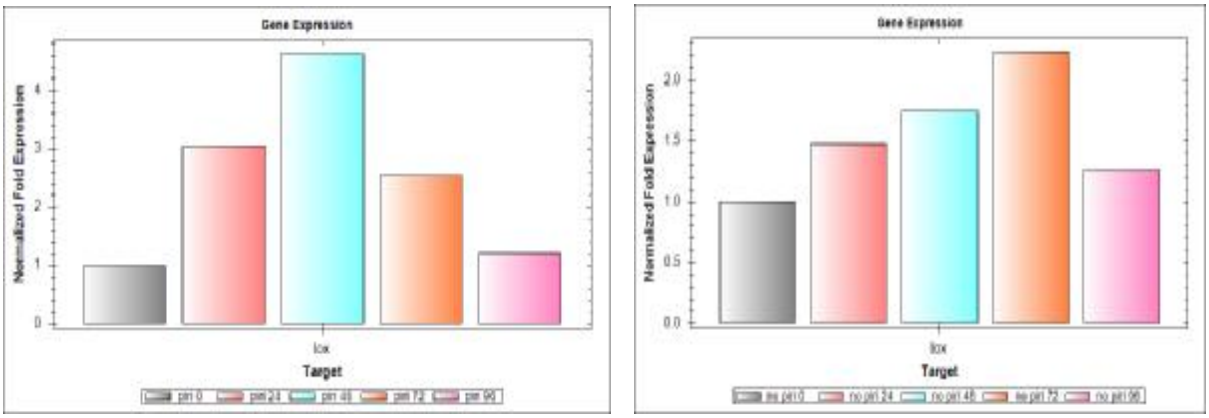


شکل ۵. الگوی بیان ژن *PR1b* در گیاه برنج تیمار شده با قارچ میکوریز *Piriformospora indica* (سمت راست) و گیاه برنج بدون قارچ میکوریز (سمت چپ) در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری بلاست (*Magnaporthe oryzae*).

Fig. 5. Expression patterns of *PR1b* gene. Rice plant treated with mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* (Right) and rice plant without mycorrhizal fungus (left) at various times after inoculation with the causal agent of blast disease (*Magnaporthe oryzae*).

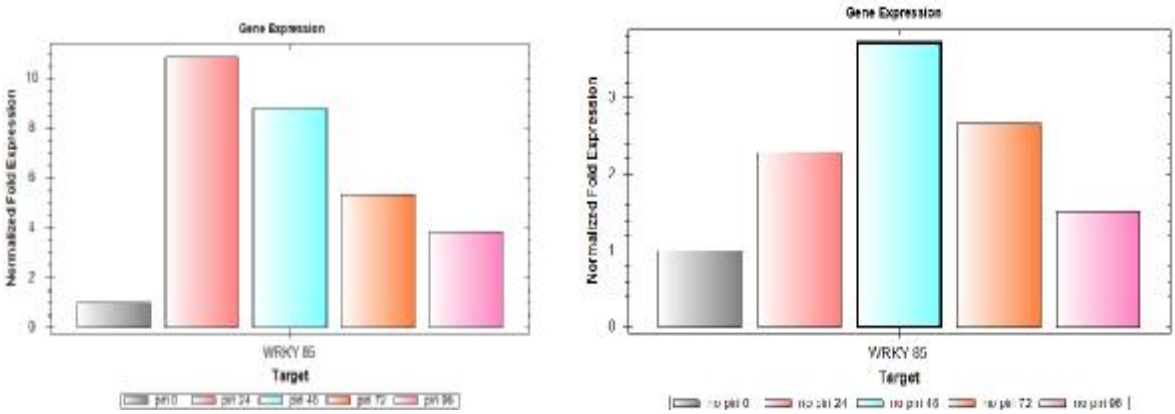
شده با *P. indica* ، ۴۸ ساعت پس از آلودگی و در گیاهان تیمار نشده، ۷۲ ساعت پس از آلودگی بوده است. میزان بیشینه ترانوشت ژن *LOX* ، در گیاهان تیمار شده با *P. indica*، ۵ برابر و در گیاهان تیمار نشده، ۲/۲ برابر نسبت به شاهد (زمان صفر) مربوطه افزایش یافت. همچنین مقایسه گیاهان تیمار شده با *P. indica* با گیاهان تیمار نشده در زمان اوج بیان نشان داد که میزان ترانوشت ژن *LOX* در گیاهان تیمار شده با *P. indica*، ۲/۳ برابر بیشتر از گیاهان تیمار نشده بود(شکل ۶).

زونگ و همکاران (Zhong *et al*. 2009) بعد از تلقیح برنج با قارچ *M. oryzae* دریافتند که ژن‌های *LOX*، *PR1b*، *PR4*، *PR10a* در مقاومت به بلاست برگی نقش



شکل ۶. الگوی بیان ژن *LOX* در گیاه برنج تیمار شده با قارچ میکوریز *Piriformospora indica* (سمت راست) و گیاه برنج بدون قارچ میکوریز (سمت چپ) در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری بلاست (*Magnaporthe oryzae*).

Fig. 6. Expression patterns of *LOX* gene. Rice plant treated with mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* (Right) and rice plant without mycorrhizal fungus (left) at various times after inoculation with the causal agent of blast disease (*Magnaporthe oryzae*).



شکل ۷. الگوی بیان ژن *WRKY 85* در گیاه برنج تیمار شده با قارچ میکوریز *Piriformospora indica* (سمت راست) و گیاه برنج بدون قارچ میکوریز (سمت چپ) در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری بلاست (*Magnaporthe oryzae*).

Fig. 7. Expression patterns of *WRKY 85* gene. Rice plant treated with mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* (Right) and rice plant without mycorrhizal fungus (left) at various times after inoculation with the causal agent of blast disease (*Magnaporthe oryzae*).

ایفا می‌کنند.

الگوی بیان ژن *WRKY 85*

میزان بیان ژن *WRKY 85* در گیاهان تیمار شده با *P. indica* و گیاهان تیمار نشده در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به قارچ *M. oryzae* افزایش یافت که بیشینه بیان در گیاهان تیمار شده با *P. indica*، ۲۴ ساعت پس از آلودگی و در گیاهان تیمار نشده، ۴۸ ساعت پس از آلودگی بوده است. میزان بیشینه ترانوشت ژن *WRKY 85* ، در گیاهان تیمار شده با *P. indica* ، ۱۱ برابر و در گیاهان تیمار نشده، ۳/۷ برابر نسبت به شاهد (زمان صفر) مربوطه افزایش یافت. همچنین مقایسه گیاهان تیمار شده با *P. indica* با گیاهان تیمار نشده در زمان اوج بیان نشان داد که میزان ترانوشت ژن *WRKY 85* در گیاهان تیمار شده با *P. indica*، ۳ برابر بیشتر از گیاهان تیمار نشده بوده است(شکل ۷).

ریو و همکاران (Ryu *et al.* 2006) در بررسی روی مولکول‌های سیگنال دفاعی نشان دادند بیان ژن *WRKY 85* در برگ‌های تیمار شده با JA در اثر آلودگی با قارچ *M. oryzae* افزایش یافت.

تجمع ترانوشت ژن‌های *Pr1b*، *NPR1*، *Lox* و *WRKY85* در گیاهان تیمار شده با قارچ میکوریز *P. indica* در مقایسه با گیاهان بدون میکوریز در اثر آلودگی به بیماری بلاست برنج افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد که بیشینه میزان بیان این ژن‌ها در گیاهان تیمار شده با قارچ میکوریز *P. indica* به ترتیب ۲/۹، ۲/۲، ۲/۳ و ۳ برابر در مقایسه با گیاهان بدون میکوریز بوده است. این نتایج می‌تواند بیانگر حفاظت سیستمیک گیاه در اثر هم‌زیستی گیاه برنج با قارچ میکوریز *P. indica* در مقابل قارچ *M. oryzae* از طریق القای ژن‌های مذکور باشد.

در حفاظت سیستمیک گیاه در برابر عوامل بیماریزا، میزان و سرعت بیان ژن‌های دفاعی نقش اساسی در مقاومت و کاهش خسارات ناشی از بیماری دارد. در این مطالعه بیشینه بیان ژن‌های *Pr1b*، *NPR1* و *WRKY85* در گیاهان تیمار شده با میکوریز در ۲۴ ساعت پس از آلودگی ولی در گیاهان بدون میکوریز ۴۸ ساعت پس از آلودگی بود. همچنین بیشینه بیان ژن *Lox* در گیاهان تیمار شده با میکوریز در ۴۸ ساعت پس از آلودگی با قارچ *M. oryzae* و در گیاهان بدون میکوریز ۷۲ ساعت پس از آلودگی بود. این نتایج بیانگر این حقیقت است که پاسخ‌های دفاعی در گیاهان تیمارشده با میکوریز سریع‌تر از گیاهان بدون میکوریز القا می‌شود.

از آنجایی که فاکتورهای ترانویسی (WRKY) در بالادست ژن *NPR1*، و ژن *PR1b* در پایین دست *NPR1* است، بنابراین بیان ژن‌های *WRKY* می‌تواند موجب بیان ژن *NPR1* و در نهایت سایر ژن‌های پایین دست از جمله *PR1b*شود. در این بررسی در گیاهان تیمار شده با میکوریز میزان بیشینه بیان ژن‌های *WRKY85*، *NPR1* و *PR1b* به طور همزمان بود، که این روند در گیاهان بدون میکوریز نیز رخ داده است. این روند پیوستگی در اوج بیان این ژن‌ها می‌تواند نشان‌دهنده نقش ژن *WRKY85* در تنظیم مثبت ژن‌های پایین‌دست در اثر آلودگی به عامل بیماری بلاست برنج باشد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (127-129) متن انگلیسی

مراجعه شود.