

اثر جیبرلیک اسید تولید شده توسط قارچ *Gibberella fujikuroi* بر فاکتورهای رشد بذر برنج

سارا عفتی لاکه^{۱*} و فریدون پاداشت دهکایی^۲

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۲)

چکیده

بیماری پوسیدگی طوقه برنج یکی از بیماری‌های بذرزاد برنج است که از خزانه تا شالیزار روی برنج دیده می‌شود. تولید گیاهچه‌های طویل و غیرطبیعی از بذر آلوده در اثر جیبرلیک اسید در خزانه و مزرعه از مهمترین علائم این بیماری می‌باشد. در این تحقیق، اثر جیبرلیک اسید تولید شده توسط *Gibberella fujikuroi* روی افزایش رشد ساقه‌چه و ریشه‌چه و مرگ‌ومیر بذر رقم هاشمی ارزیابی شد. بذر رقم هاشمی به وسیله سوسپانسیون کنیدیومی جدایه‌های *G. fujikuroi* سوسازی شده از گیاهچه‌های آلوده از مزارع برنج استان گیلان مایه‌زنی گردید. میزان افزایش رشد با اندازه‌گیری طول ساقه‌چه، ریشه‌چه و تعداد بذر مرده هر پنج روز یکبار و میزان جیبرلیک اسید تولید شده توسط جدایه‌های *G. fujikuroi* با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تعیین شد. نتایج تعیین کمی جیبرلیک اسید نشان داد که تمامی جدایه‌های مورد بررسی توانایی تولید این هورمون را داشتند. همبستگی معنی‌داری بین میزان هورمون جیبرلین استخراج شده از بیمارگر و طول ریشه‌چه و ساقه‌چه حاصل از جوانه‌زنی بذر هاشمی مایه‌زنی شده و نیز تعداد بذر مرده مشاهده نشد.

کلیدواژه: هورمون جیبرلین، HPLC، رقم هاشمی، استخراج، افزایش رشد رویشی.

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: efati_sara85@yahoo.com

۱. کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان.

۲. استادیار پژوهش، بخش گیاهپزشکی مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت.

Effect of Gibberellic acid produced by the fungus *Gibberella fujikuroi* on the growth factors of rice seed

S. Efati Lakeh^{1*} and F. Padasht-Dehkaei²

(Received: 3.10.2017; Accepted: 11.2.2019)

Abstract

Bakanae disease and Foot rot of rice is one of the rice seed-borne diseases that observed from nursery to paddy field. Most important symptoms of disease is production of elongated and abnormal seedlings from contaminated seeds on the effect of Gibberellic acid in nursery and field. This investigation, effect of Gibberellic acid produced by *Gibberella fujikuroi* evaluated on the increase of stem and root growth and mortality of Hashemi cultivar seeds. Hashemi's cultivar seeds inoculated by *Gibberella fujikuroi* conidial suspension isolated from infected seedlings from rice fields of Guilan province. Rate of increase of growth by measuring of stem and root length and number of dead seeds once every five days and amount of Gibberellic acid produced by *Gibberella fujikuroi* isolates was determined using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Results of quantitative determination of Gibberellic acid showed that all isolates were studied have ability to produce this hormone. There were not found any significant correlation between the amount of production of Gibberellin hormone in pathogen and increase of stem and root length from germination of inoculated seeds of Hashemi cultivar and also number of dead seeds.

Keywords: gibberellin hormone, HPLC, Hashemi cultivar, extraction, increase of vegetable growth

*Corresponding author's E-mail: efati_sara85@yahoo.com

1. M.Sc. of plant pathology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan.

2. ResearchAssistant Professor, Plant Protection, Rice Research Institute, Rasht, Iran.

مقدمه

سولفات استرپتومايسين و به منظور تحريك اسپورزایی از محیط کشت PDA و CLA در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی متناوب با نور نزدیک به ماوراء بنفش در دمای ۲۵ °C استفاده گردید (Saremi 2004). برای شناسایی گونه‌های فوزاریوم از کلید شناسایی لزی و سامرل (Leslie & Summerell 2006) و شرح گونه‌های گرلاخ و نیرنبرگ (Gerlach & Nirenberg 1982) استفاده شد.

مایه‌زنی بذور

در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. بذور رقم هاشمی (حساس) در بن‌ماری در دمای ۵۷ °C به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی گردیدند. سپس ۵۰ عدد بذر در هر پتری حاوی سوسپانسیون کنیدیوم با غلظت ۱۰^۵ به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق قرار داده شدند. بعد از اتمام این مدت در شرایط انکوباتور با دمای ۲۵ °C نگهداری شدند. برای تیمار شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد.

استخراج جیبرلیک اسید و سنجش کمی هورمون به روش HPLC

جهت تولید هورمون جیبرلین در بیمارگر، هر یک از جدایه‌ها در محیط کشت مایع Czapek-Dox (CD) کشت شدند. استخراج هورمون جیبرلین از روش ارگون و همکاران (Ergun et al. 2002) با اندکی تغییر انجام گرفت. مقدار کمی هورمون بوسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تعیین شد (Rangaswamy 2012).

ارزیابی و آنالیز آماری

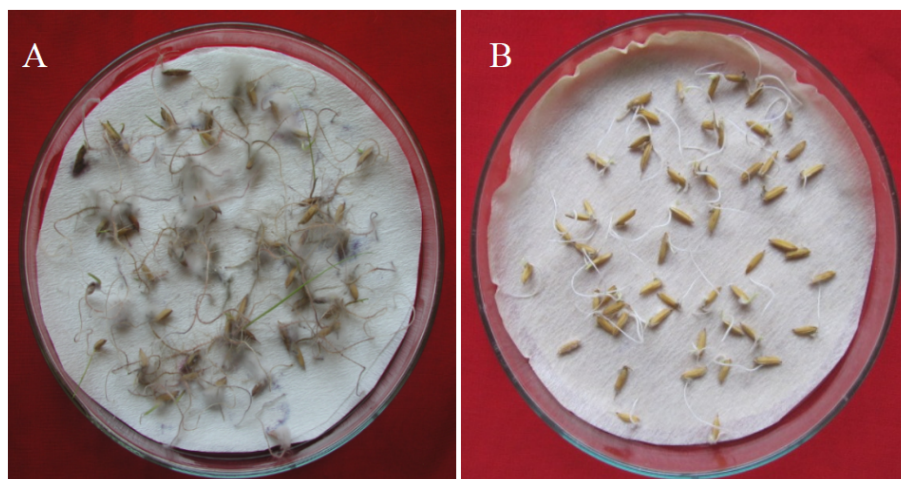
به منظور بررسی اثر جیبرلیک اسید روی افزایش رشد رویشی به فاصله هر پنج روز یکبار فاکتورهایی از قبیل

بیماری پوسیدگی طوقه برنج (باکانه) با عامل (Sawada) *Gibberella fujikuroi* Wollenwebber یکی از مهم‌ترین بیماری‌های بذرزاد برنج در شمال کشور است. علائم این بیماری در استان گیلان در سه مرحله جوانه‌زنی، خزان و مزرعه قابل مشاهده است. قدکشیدگی نشاء و پنجه‌های آلوده در مزرعه همراه با رنگ‌پریدگی یکی از علائم این بیماری است که در اثر تولید هورمون جیبرلین (جیبرلیک اسید) توسط عامل بیماری در گیاه آلوده ایجاد می‌گردد. در این حالت ساقه و برگ‌های گیاه و مخصوصاً برگ انتهایی باریک، بلند و نازک و پس از رنگ‌پریدگی کم‌کم زرد رنگ می‌شوند. این پنجه‌ها بعداً قهوه‌ای شده و می‌میرند. جیبرلین به عنوان یک هورمون گیاهی مطرح است که منجر به تنظیم مراحل رشد گیاه شامل جوانه‌زنی بذر، رشد ساقه، تشکیل گل و بلوغ میوه می‌گردد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر هورمون جیبرلین تولید شده توسط جدایه‌های *G. fujikuroi* بر افزایش رشد طول ساقه‌چه و ریشه‌چه و تعداد بذر مرده از بذور هاشمی مایه‌زنی شده با بیمارگر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مایه تلقیح قارچ

در سال زراعی ۱۳۹۱ تعداد ۴۴ نمونه از نشاءها، بوته‌ها و ساقه‌های بیمار از خزان و مزارع برنجکاری استان گیلان که مشکوک به بیماری پوسیدگی طوقه برنج بودند جمع-آوری شد. نمونه‌برداری از مزارعی که رقم خزر (رقم حساس) در آنها کشت می‌شد در اولویت قرار داشت. برای جداسازی قارچ از قطعات آلوده ناحیه طوقه، محیط سیب-زمینی دکستروز آگار (PDA) و آب آگار (WA) حاوی



شکل ۱. مایه‌زنی سوسپانسیون قارچ *Gibberella fujikuroi* به بذر رقم هاشمی. A. تیمار ۱۰ روزه، B. شاهد.

Figure 1. Inoculation of fungus *Gibberella fujikuroi* suspension to Hashemi cultivar's seed. A. 10 days treat, B. Control

از مایه‌زنی رشد توده میسلیمی قارچ در بذر رقم هاشمی قابل مشاهده بود، در روز دهم میزان رشد توده میسلیمی در تیمارهای آلوده رو به افزایش گذاشت (شکل ۱). نتایج مقایسه میانگین فاکتورهای بذر (طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و تعداد بذر مرده)، اختلاف میانگین هر جدایه را با شاهد نشان می‌دهد (جدول ۱). در فاکتور تعداد بذر مرده فقط یک جدایه اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت و بقیه جدایه‌ها اختلاف معناداری را با شاهد نشان ندادند، بنابراین از آوردن میانگین آن در جدول ۱ خودداری شد. مقایسه میانگین فاکتورهای اندازه‌گیری شده به کمک آزمون LSD نشان داد که در فاکتور طول ریشه‌چه اکثر جدایه‌ها با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند ($P \leq 5\%$). در فاکتور طول ساقه‌چه تعداد هفت جدایه با شاهد اختلاف معنی‌داری داشت و بقیه جدایه‌ها اختلاف معنا-داری را با شاهد نشان ندادند ($P \leq 1\%, 5\%$). با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان اینگونه استنباط کرد که قارچ بعد از جوانه‌زنی بذر، از طریق ریشه و یا طوقه گیاه را آلوده می‌کند و آلودگی در این مرحله در ساقه‌چه اتفاق

طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و تعداد بذر مرده حاصل از بذر مایه‌زنی شده با جدایه‌های *G. fujikuroi* اندازه‌گیری گردیدند. جهت مقایسه میانگین اثر بیماری‌زایی جدایه‌های *G. fujikuroi* روی بذر برنج رقم هاشمی از آزمون LSD با کمک نرم‌افزار آماری IRRI STAT 92 استفاده شد. برای تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل از تعیین کمی غلظت هورمون جیبرلین در جدایه‌های *G. fujikuroi* از نرم‌افزار NTSYS-pc ver 2.02 e استفاده گردید. همچنین به منظور درک رابطه بین بیماری‌زایی در بذر (افزایش طول ریشه‌چه و ساقه‌چه و تعداد بذر مرده حاصل از بذر مایه‌زنی شده نسبت به شاهد) و میزان تولید هورمون جیبرلین، آزمون همبستگی با استفاده از نرم‌افزار SAS Ver. 9.1 انجام شد.

نتایج و بحث

بیست و سه جدایه *G. fujikuroi* به عنوان مایه تلقیح برای مایه‌زنی بذر هاشمی سواسازی و شناسایی شد. تمامی جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش قادر به ایجاد آلودگی در مرحله جوانه‌زنی بذر بودند. در روز پنجم

جدول ۱. مقایسه میانگین طول ریشه‌چه و ساقه‌چه در مایه‌زنی سوسپانسیون قارچ *Gibberella fujikuroi* به بذر برنج رقم هاشمی با استفاده از آزمون LSD.

Table 1. Mean comparison of root and stem length in inoculation of fungus *Gibberella fujikuroi* suspension to rice seed cultivar namely Hashemi using LSD test

اختلاف با شاهد (LSD)	Mean of shoot length	اختلاف با شاهد (LSD)	Mean of root length	Isolate name
0.48*	0.58 ^{c-h}	5.04**	6.22 ^{ab}	1
0.90**	1.00 ^{b-c}	4.69**	5.86 ^{abc}	2
1.31**	1.41 ^b	4.73**	5.91 ^{abc}	5
0.77**	0.87 ^{cde}	3.35**	4.52 ^{c-f}	6
2.39**	2.49 ^a	5.32**	6.49 ^a	10
0.36 ^{ns}	0.46 ^{d-i}	3.60**	4.81 ^{b-c}	18
0.35 ^{ns}	0.45 ^{e-i}	4.27**	5.45 ^{a-d}	19
0.27 ^{ns}	0.37 ^{e-i}	2.94**	4.12 ^{d-g}	20
0.31 ^{ns}	0.41 ^{e-i}	5.20**	6.37 ^{ab}	24
0.87**	0.97 ^{bcd}	2.51**	3.68 ^{e-i}	26
0.40 ^{ns}	0.50 ^{c-i}	4.38**	5.56 ^{a-d}	29
0.20 ^{ns}	0.30 ^{f-i}	2.06**	3.23 ^{e-k}	31
0.04 ^{ns}	0.14 ^{ghl}	1.76*	2.94 ^{f-k}	32
0.43 ^{ns}	0.53 ^{c-i}	1.74*	2.91 ^{f-k}	34
0.10 ^{ns}	0.20 ^{f-i}	1.88*	3.06 ^{f-k}	35
-0.06 ^{ns}	0.03 ⁱ	0.41 ^{ns}	1.58 ^{kl}	37
-0.05 ^{ns}	0.04 ^{hi}	0.01 ^{ns}	1.19 ^l	46
0.5*	0.60 ^{c-g}	0.85 ^{ns}	2.02 ^{i-l}	47
0.07 ^{ns}	0.17 ^{f-i}	1.39 ^{ns}	2.57 ^{g-l}	49
0.00 ^{ns}	0.10 ^{ghi}	0.67 ^{ns}	1.84 ^{kl}	F22
0.04 ^{ns}	0.14 ^{ghi}	2.15**	3.33 ^{e-j}	F23
0.18 ^{ns}	0.28 ^{f-i}	1.07 ^{ns}	2.24 ^{hl}	189
0.04 ^{ns}	0.14 ^{ghi}	2.32**	3.49 ^{e-j}	261
-	0.10 ^{ghi}	-	1.17 ^l	Ctl

Ctrl: شاهد

*, **, ns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ و غیرمعنی‌دار

*, **, ns: Significant at 1 and 5 probability level and non significant respectively.

بیماری باکانه شود و تراکم‌های بسیار کم و یا نسبتاً زیاد از اینوکولوم در ایجاد بیماری ناتوان هستند. برخی از محققان دریافتند که اگر بذر در خاک‌های آلوده کاشته شود در نتیجه‌ی سرعت پیشرفت بیماری و درصد بالای مرگ‌ومیر، بذر جوانه نمی‌زند و تنها زمانی که اینوکولوم ملایم بیماری بکار برده شود به علت تراوشات آمینو اسید و شکر از بذر جوانه زده، می‌توان علائم بیماری باکانه را انتظار داشت. بنابراین می‌توان گفت در فاکتور تعداد بذر مرده به دلیل

نمی‌افتد که این نتیجه با نظر او (Ou 1985) مطابقت داشت. از طرفی این احتمال وجود دارد که هورمون جیبرلین موجود در قارچ عامل بیماری، در مرحله تشکیل ساقه‌چه نمی‌تواند باعث بروز علائم افزایش طول ساقه (هایپرتروفی) شود. بر اساس گزارش او (Ou 1985) مقدار اینوکولوم در بروز علائم بیماری تأثیرگذار است، به این معنی که فقط تراکم متوسط از پروپاگول ($5-12 \times 10^3$ گرم پروپاگول در یک گرم خاک) می‌تواند باعث بروز علائم

بذر در مقایسه با زمانی که حضور آن در بذر با بیمارگر همزمان است نمی‌توان نتایج را تعمیم داد. از طرفی همانطور که ذکر گردید زمانی که میزان متوسطی از پروپاگول در مایه تلقیح بکار برده شود علائم بیماری باکانه بروز می‌کند و در مقادیر کمتر یا بیشتر از این مقدار نمی‌توان علائم بوجود آمده را بعنوان علائم مورد انتظار بیماری دانست (Sun & Snyder 1987) و نیز پیشرفت سریع بیماری در حالتی است که بذر خشک در خاک آلوده کشت شوند و در صورت کاشت بذر از پیش خیسانده شده و یا جوانه زده خسارت ملایم‌تری از بیماری اتفاق می‌افتد (Kanjansoon 1965)، بنابراین عدم ارتباط بین این صفات را می‌توان به علت توسعه ناکافی بیمارگر و عدم تأثیر ماده قارچی برشمرد. پیشنهاد می‌شود به منظور بروز علائم وسیع بیماری، آزمایشی مشابه با مقادیر مختلف از اینوکولوم بیمارگر انجام گردد.

کمبرود اینوکولوم، قارچ عامل بیماری قادر به ایجاد مرگ سریع در بذر نبوده است (Rajagopalan & Bhuvanewari 1964). تعیین کمی هورمون جیبرلین در نمونه‌ها توسط دستگاه HPLC نشان داد که همه جدایه‌های مورد مطالعه توانایی تولید هورمون جیبرلین را داشتند. آزمون همبستگی بین فاکتورهای بذری بررسی شده از رقم برنج هاشمی با مقدار کمی هورمون جیبرلین مشخص کرد که در فاکتورهای طول ساقه‌چه و تعداد بذر مرده ارتباط مثبت و غیر معنادار و در فاکتور طول ریشه‌چه ارتباط منفی و غیر معنادار مشاهده شد. برومباق (Brumbaugh 2009) در آزمایش تأثیر هورمون جیبرلین بر روی بذر نخودفرنگی پاکوتاه به این نتیجه رسید که این هورمون بر روی رشد ریشه تأثیر مثبت داشته و باعث پیچیدگی و طول بیشتر سیستم ریشه می‌شود، اما در این تحقیق به دلیل عدم اطمینان از نحوه تأثیر هورمون خالص در مایه‌زنی به

منابع

- Brumbaugh S. G. 2009. Gibberellic acid and its effect on the growth of dwarf pea plants. Section A, Pea Lab. Biology 100 Laboratory Manual. pp: 49-53.
- Ergun N. Topcuglu F. and Yildiz A. 2002. Auxin (Indole-3-acetic acid), Gibberellic acid (GA₃), Abscisic acid (ABA) and Cytokinin (Zeatin) production by some species of mosses and lichens. Turkish Journal of Botany 26: 13-18.
- Gerlach W. and Nirenberg H. I. 1982. The Genus *Fusarium*— a Pictorial atlas. Berlin. 406 p.
- Kanjansoon P. 1965. Studies on the bakanae disease of rice in Thailand. Doctoral Agriculture Thesis, Tokyo university. Japan.
- Leslie J. F. and Summerell A. B. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. All Rights Reserved. 388 p.
- Ou, S. H. 1985. Rice Diseases. 2th ed., C.A.B. Press. UK. 380 p.
- Rajagopalan K. and Bhuvanewari K. 1964. Effect of germination of seed and host exudation during germination on foot rot disease of rice. Phytopathology 50: 221-226.
- Rangaswamy V. 2012. Improved production of Gibberellic acid by *Fusarium moniliforme*. Journal of Microbiology Research 2(3): 51-55.
- Saremi H. 2004. *Fusarium*: Biology, Ecology and Taxonomy. Nashr-e-Jahad daneshgahi, Ferdossy Mashhad Publications. 164 p.
- Sun S. K. and Snyder W. C. 1978. The bakanae disease of rice plant. Science Bulletin, Taiwan. 10 (7) 2, (8) 4, (9) 4, (10) 4.
- Takenaka M., Hayashi K., Ogawa T., Kimura S. and Tanaka T. 1992. Lowered virulence to rice plants and decreased biosynthesis of gibberellins in mutants of *Gibberella fujikuroi* selected with pefurazoate. Journal of pesticide science 17(4): 213-220.