

Studying the effects of the biological inducer *Serendipita indica* and the non-biological inducers chitosan and potassium phosphite in rice plants against the brown spot disease agent *Bipolaris oryzae*

1. Sogand Mohammadzadeh : Graduate M.Sc., Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2. Valiollah Babaeizad : Professor, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
3. Safar Ali Mahdian : Assistant Professor, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
4. Milad Habibi Daronkolaei *: Researcher, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

*Corresponding Author's Email Address: milad.habibi08@gmail.com

Article Type:

Original Research

Received: 20 May 2025

Revised: date: 30 July 2025

Accepted: 03 August 2025

How to Cite: Mohammadzadeh, S., Babaeizad, V., Mahdian, S. A., & Habibi Daronkolaei, M. (2024). Studying the effects of the biological inducer *Serendipita indica* and the non-biological inducers chitosan and potassium phosphite in rice plants against the brown spot disease agent *Bipolaris oryzae*. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 60(2), 181-192.

DOI: 10.22034/IJPP.2025.2021848.482

Abstract:

Rice is one of the most important cereals in the world, and brown spot disease is considered a significant seed-borne disease of rice, attacking and damaging the crop at all stages of plant growth, from the nursery to the field. The present study was conducted as a factorial in a completely randomized design with five treatments: potassium phosphite, chitosan, *Serendipita indica*, positive control, and negative control. Treated and control plants were infected with the causative fungus and sampled 24 and 72 hours after infection to measure enzyme activity. In this research, the activity of catalase and guaiacol peroxidase enzymes was higher in treated rice compared to the positive and negative controls, and the severity of *Bipolaris oryzae* fungal disease was lower in chitosan, potassium phosphite, and *S. indica* treatments than in the positive control. The results highlight the importance of employing biological methods and environmentally friendly chemical compounds in plant disease management.

Keywords: Environment, Enzyme activity, Fungicides



© 2024 the authors. Published by Maher Publishing Institute. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License.

Extended Abstract

Introduction

Rice, as one of the most important agricultural crops and the staple food for over half of the world's population, plays a crucial role in ensuring food security. However, the production of this strategic crop faces various challenges, with plant diseases being one of the most significant. Among the common diseases affecting rice, brown spot disease stands out as one of the oldest and most widespread, causing substantial economic losses to farmers worldwide. This disease is caused by the fungus *Cochliobolus miyabeanus*, also known as *Bipolaris oryzae*. It is a seed-borne disease that can affect rice at all stages of growth, from the nursery to the field. The damage caused by brown spot disease can range from 4 to 52%, depending on environmental conditions and field management practices. Symptoms of the disease include the development of brown spots on the leaves, reduced photosynthesis, and ultimately a decrease in crop yield. In recent years, the extensive use of chemical pesticides to control plant diseases has not only resulted in irreversible environmental damage but has also led to the development of pesticide resistance in pathogens. This situation has underscored the need to explore alternative and sustainable methods for managing plant diseases. One such approach involves the use of beneficial microorganisms and biocompatible compounds, which can effectively mitigate the effects of diseases by enhancing the plant's immune system and inducing resistance. The objective of this study is to investigate the activity of antioxidant enzymes in rice plants treated with chitosan, potassium phosphite, and the *Serendipita indica* fungus in combating brown spot disease.

Materials and Methods

In this study, the effect of different treatments on rice plant resistance to *B. oryzae* fungal disease was investigated. The experiment was conducted in a completely randomized design with five treatments: chitosan, potassium phosphite, *S. indica* fungus, positive control, and negative control, each

with three replications. First, local Tarom rice seeds were disinfected and placed on sterile, moist filter paper for germination. Some of the germinated seeds were soaked in a solution containing *S. indica* fungus spores for six hours. Then, all treated and germinated seeds were transferred to plastic pots containing sterile soil. The pots were maintained under controlled greenhouse conditions until the plants reached the five-germination stage. At this stage, the plants were treated with chitosan (at a concentration of two in a thousand) and potassium phosphite (at a concentration of two in a thousand). 48 hours after the application of these treatments, all plants except a few considered as negative controls were infected with *B. oryzae*. Sampling was carried out at two time intervals: 24 and 72 hours after infection. The collected and powdered samples were used to measure the activity of enzymes related to plant resistance, and the severity of the disease was recorded two weeks after infection. The data from this study were statistically analyzed using SAS software, and graphs related to the results were drawn using Excel software.

Resultss

The results of the study indicated that the use of chitosan as a biological material plays a significant role in reducing the number of spots formed on the surface of plants. Chitosan, with its antifungal properties and ability to induce resistance in plants, showed the best performance in reducing the disease. Following chitosan, the potassium phosphite treatment also demonstrated a significant reduction in the number of spots and was identified as an effective abiotic material. To investigate the defense mechanisms of plants against the disease, the activity of catalase (CAT) and guaiacol peroxidase (GPX) enzymes was assessed. The results revealed that in plants treated with chitosan, potassium phosphite, and *S. indica* fungus, the levels of these two enzymes increased 24 hours after inoculation with the fungus. The rise in enzyme activity suggests the stimulation of the plant's defense system against pathogens. However, after 72 hours, the activity of these enzymes decreased in the mentioned treatments compared to the positive and negative

control plants. This decline could be attributed to the modulation of the plant's defense response over time, as the plant may normalize enzyme activity levels after the initial encounter with pathogens.

Discussion

In recent years, there has been a significant increase in attention towards new methods to enhance plant resistance to biotic and abiotic challenges in agricultural environments. One of the primary issues that plants encounter is the production of reactive oxygen species (ROS) during stressful conditions. These molecules have the potential to harm cellular macromolecules such as proteins, lipids, and nucleic acids, ultimately leading to a decrease in plant growth and overall performance. In this context, the activity of antioxidant enzymes such as CAT and GPX plays a crucial role in mitigating the damaging effects of ROS. These enzymes can protect plant cells from harm and boost plant immunity by regulating ROS levels. Recent studies have indicated that certain biotic and abiotic factors can effectively enhance the activity of these enzymes and bolster plant resistance to stresses. Previous research results showed that chitosan, potassium phosphite, and *S. indica* have a positive effect on disease control. In a recent study, it was observed that treating rice with chitosan, potassium phosphite, and *S. indica* fungus led to an increase in CAT and GPX enzyme activity 24 hours post-treatment. This rise in enzyme activity, compared to control groups, demonstrates the positive impact of these factors on fortifying the plant's defense mechanisms. Furthermore, the findings revealed a significant reduction in the severity of disease caused by *B. oryzae* fungus in plants treated with chitosan, potassium phosphite, and *S. indica* fungus, highlighting the effective role of these biological and chemical compounds in managing fungal diseases in rice. Based on the results of this study, it can be inferred that utilizing chitosan, potassium phosphite, and *S. indica* fungus is an effective approach in managing plant stresses and diseases. These methods not only decrease the reliance on harmful chemical pesticides but also contribute to

environmental preservation and enhance the sustainability of agricultural systems. They can play a pivotal role in ensuring global food security.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest in conducting the present study.

Ethical Considerations

All ethical principles and standards were fully observed in the conduct of this research.

Acknowledgments

The authors would like to express their sincere gratitude to all those who contributed to the various stages of this study.

بررسی تاثیر القاگر زیستی *Serendipita indica* و غیر زیستی کیتوزان و فسفیت پتاسیم در گیاه برنج در برابر عامل بیماری لکه قهوه‌ای *Bipolaris oryzae*

۱. سوگند محمدزاده^{ID}: دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲. ولی‌اله بابایی‌زاد^{ID}: استاد، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۳. صفرعلی مهدیان^{ID}: دانشیار، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۴. میلاد حبیبی درونکلانی^{ID*}: پژوهشگر، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

*پست الکترونیک نویسنده مسئول: milad.habibi08@gmail.com

نوع مقاله:

چکیده

پژوهشی اصیل

برنج از مهم‌ترین غلات در جهان است و بیماری لکه قهوه‌ای از بیماری‌های مهم بذرزاد برنج محسوب می‌شود و محصول را در تمام مراحل رشد گیاه از خزانه تا مزرعه، مورد حمله قرار داده و به آن خسارت وارد می‌کند. پژوهش حاضر به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و پنج تیمار فسفیت پتاسیم، کیتوزان، *Serendipita indica*، کنترل مثبت و کنترل منفی انجام گردید. گیاهان تیمار شده و شاهد به قارچ عامل بیماری آلوده و در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی، نمونه برداری و برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی استفاده شد. در این پژوهش در برنج‌های تیمار شده نسبت به شاهد مثبت و منفی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز بیشتر بوده و میزان شدت بیماری قارچ *Bipolaris oryzae* در تیمارهای کیتوزان، فسفیت پتاسیم و *S. indica* کمتر از کنترل مثبت بود. نتایج حاصل بیانگر اهمیت به‌کارگیری روش‌های زیستی و ترکیبات شیمیایی سازگار با محیط‌زیست در مدیریت بیماری‌های گیاهی است.

تاریخ دریافت: ۳۰ اردیبهشت ۱۴۰۴

تاریخ بازنگری: ۸ مرداد ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۲ مرداد ۱۴۰۴

نحوه استناددهی: محمدزاده، سوگند، بابایی‌زاد، ولی‌اله، مهدیان، صفرعلی، و حبیبی درونکلانی، میلاد. (۱۴۰۳). بررسی تاثیر القاگر زیستی *Serendipita indica* و غیر زیستی کیتوزان و فسفیت پتاسیم در گیاه برنج در برابر عامل بیماری لکه قهوه‌ای *Bipolaris oryzae*. بیماری‌های گیاهی، ۶۰(۲)، ۱۹۲-۱۸۱.

DOI:

10.22034/IJPP.2025.2021848.482

کلیدواژگان: فعالیت آنزیمی، قارچ‌کش، محیط زیست



مجوز و حق نشر: © ۱۴۰۳ تمامی حقوق انتشار این مقاله متعلق به نویسنده است. انتشار این مقاله توسط انتشارات ماهر به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با گواهی (CC BY 4.0) صورت گرفته است.

مقدمه

برنج از مهم‌ترین غلات و اقلام غذایی در جهان بوده و یکی از غذاهای اصلی نیمی از جمعیت جهان محسوب می‌شود. این گیاه سرشار از نیاسین، ریوفلاوین، تیامین، گلوتامیک و آسپارتیک اسید می‌باشد بنابراین یک منبع خوب انرژی است (Gulati & Narayanan, 2002). یکی از مهمترین چالش‌های تولید برنج، بیماری‌هایی است که در شالیزارها به محصولات آسیب زده و بهره‌وری برنج را کاهش می‌دهند و گاهی حتی باعث نابودی کل محصول می‌شوند. بیماری لکه قهوه‌ای از قدیمی‌ترین و رایج‌ترین بیماری شالیزارهای برنج تمام دنیا است. این بیماری از تمام کشورهای برنج‌کار جهان ثبت شده است (Sunder et al., 2014). کاهش عملکرد ناشی از لکه قهوه‌ای از ۴ تا ۵۲ درصد متغیر است (Barnwal et al., 2013). در ایران این بیماری علاوه بر مناطق برنج‌کاری گیلان، مازندران و گلستان از دیگر مناطق کاشت برنج از جمله لنجان اصفهان و شهرکرد نیز گزارش شده است (Safari Motlagh, 2008). میزان خسارت این بیماری در مزارع و به ویژه در خزانه برنج روی برخی ارقام همچون نعمت، در مواردی تا ۹۰ درصد برآورد شده است (Safari Motlagh et al., 2005). *Cochliobolus miyabeanus* عامل اصلی این بیماری نام دارد که آنامورف آن *Bipolaris oryzae* می‌باشد (Lumbsch & Huhndorf, 2007). این بیماری از مهمترین بیماری‌های بذرزاد برنج محسوب می‌شود و محصول را در تمام مراحل رشد گیاه از خزانه تا مزرعه، مورد حمله قرار داده و به آن خسارت وارد می‌کند (Tauger, 2003). علائم بیماری بر روی برگ‌ها به صورت لکه‌های دایره‌ای زرد رنگ یا قهوه‌ای دیده می‌شود. لکه‌ها در ابتدا کوچک و مدور و قهوه‌ای تیره هستند و با توسعه یافتن بیماری بیضی شکل با مرکز قهوه‌ای روشن تا خاکستری دیده می‌شوند که حاشیه‌ای قهوه‌ای تیره و متمایل به قرمز دارند. بر روی ارقام برنجی که مستعد بیماری لکه قهوه‌ای هستند،

طول لکه‌ها ۵-۱۴ میلی‌متر است و موجب پژمردگی برگ‌ها می‌شود. اگر آلودگی در خزانه رخ دهد، ساقه‌های نشاء به رنگ قهوه‌ای در می‌آیند و از بین می‌روند. قارچ عامل لکه قهوه‌ای می‌تواند وارد دانه‌های برنج شده و آن‌ها را نیز آلوده کند و موجب تشکیل توده‌های سیاه رنگی روی دانه‌های درون خوشه گردد (Abrol et al., 2022).

امروزه استفاده‌ی بیش از حد از سموم شیمیایی، خسارات جبران‌ناپذیری به محیط زیست وارد کرده و همچنین سبب مقاوم شدن بسیاری از بیماری‌های گیاهی به این سموم شده است (Ghosh et al., 2016). بنابراین استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید و ترکیبات شیمیایی که با محیط زیست سازگار بوده یک استراتژی پایدار در کنترل بیماری‌های مختلف است که از طریق فعال شدن سیستم ایمنی گیاه تحت مقاومت القایی (Induced Resistance (IR)) ایجاد می‌گردد (Achary et al., 2017).

کیتوزان یک ترکیب شیمیایی زیست سازگار بوده که به‌عنوان یک جایگزین امیدوارکننده برای قارچ‌کش‌های شیمیایی گران‌قیمت مطرح شده است. این ماده خاصیت ضد قارچی دارد و توانایی بهبود پاسخ گیاهان به بیماری‌ها را نشان داده است (Narasimhamurthy et al., 2022). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که کیتوزان می‌تواند مقاومت آفتابگردان به بیماری سفیدک داخلی (*Plasmopara halstedii*) را از طریق فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کیتیناز تقویت کند (Nandeeshkumar et al., 2008). علاوه بر این، کیتوزان با داشتن بار مثبت می‌تواند با سلول‌های دارای بار منفی واکنش دهد و تغییر در نفوذپذیری سلولی ایجاد کند که به نوبه خود منجر به نشت سیتوپلاسم یا مهار ورود پاتوژن‌ها می‌شود (Lopez-Moya et al., 2019).

فسفیت پتاسیم از جمله ترکیباتی هستند که امروزه برای کنترل بیماری‌ها استفاده می‌شود. فسفیت‌ها نمک‌های قلیایی اسید فسفریک (H_3PO_4)، بوده که به عنوان کنترل‌کننده شناخته می‌شوند (McDonald et al., 2001). این

ترکیبات می‌توانند به طور مستقیم فسفوریلاسیون اکسیداتیو را در متابولیسم مهار نمایند (Lobato et al., 2008) و به‌طور غیرمستقیم مکانیسم دفاعی گیاه را فعال کرده و نهایتاً جلوی بیماری‌زایی را بگیرند (Daniel & Guest, 2005). تحقیقات نشان داده که در طول تنش‌های زیستی و غیرزیستی، غلظت بالایی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ایجاد می‌شود که قادر به آسیب رساندن به ماکرومولکول‌های سلولی است (Forouzanfar et al., 2016). تعادل میان ROS و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقشی کلیدی در تعیین ایمنی گیاهان دارد (Dias et al., 2014). همچنین مشخص شده که با فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تحمل گیاه در مقابل پاتوژن به وضوح افزایش می‌یابد (Chen et al., 2019; Lobato et al., 2011). نتایج تحقیقات نشان داده است که گیاهانی که با KPhi پیش‌تیمار شده‌اند، عمدتاً به خاطر افزایش غلظت آنزیم‌های دفاعی در بافت‌های گیاه میزبان پس از تنش‌های محیطی سطح مقاومت بالاتری دارند (Oyarburo et al., 2015).

Serendipita indica، یک قارچ اندوفیت از خانواده Sebacinaceae، تقریباً تمامی ویژگی‌های مفید قارچ‌های میکوریز آربوسکولار را دارد. با این حال، دامنه میزبان گیاهی آن گسترده و اختصاصیت میزبان آن کمتر است (Kumari et al., 2003; Peškan-Berghöfer et al., 2004). تأثیرات مثبت *S. indica* بر رشد و افزایش زیست‌توده گیاه میزبان به اثبات رسیده و امکان کشت آن نیز وجود دارد. به همین دلیل، در دهه‌های اخیر توجه زیادی به این قارچ جلب شده و پتانسیل کاربرد گسترده‌ای در حوزه کشاورزی دارد (Rabiey et al., 2017; Varma et al., 2012). همچنین، *S. indica* مقاومت میزبان را در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی، ویروسی و آفات افزایش می‌دهد (Gill et al., 2016). تقویت مقاومت میزبان در برابر تنش‌های زیستی به‌ویژه عوامل بیماری‌زای قارچی باعث شده این قارچ به موضوع تحقیقاتی مهمی در گیاه‌شناسی، میکروبیولوژی و حفاظت از گیاهان تبدیل شود (Deshmukh & Kogel, 2007; Jacobs et al., 2011). برای مثال، ثابت

شده که *S. indica* مقاومت جو را در برابر *Fusarium culmorum* و *Cochliobolus sativus* (Waller et al., 2005)، گندم را در برابر *F. culmorum* (Rabiey et al., 2013) و برنج را در برابر *Fusarium proliferatum* و *Rhizoctonia solani* افزایش می‌دهد (Hajipour et al., 2015; Nassimi & Taheri, 2023).

هدف این پژوهش، بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه برنج تیمار شده با کیتوزان، فسفیت پتاسیم و قارچ *S. indica* به‌منظور مقابله با بیماری لکه قهوه‌ای است.

مواد و روش

تهیه بذر: برای انجام این تحقیق رقم بذر برنج رقم طارم محلی از پژوهشکده زیست فناوری طبرستان تهیه گردید.

تهیه و کشت قارچ *Bipolaris oryzae* و *Serendipita indica*:

جدایه *B. oryzae* از سوی موسسه تحقیقات برنج کشور و جدایه *S. indica* با کد DSM11827 (که توسط پروفیسور کوگل اهدا شده بود) تهیه شد و به محیط کشت Potato Dextrose Agar منتقل گردید. سپس محیط کشت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در داخل انکوباتور قرار داده شد.

ضدعفونی و جوانه دار کردن بذور: ابتدا بذرها درون الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی و با آب مقطر شستشو داده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه درون هیپوکلرید سدیم تجاری ۱ درصد قرار داده شد و در نهایت بذور سه بار با آب مقطر شستشو داده شد. کاغذ فیلتر (صافی) مرطوب را درون ظروف یکبار مصرف قرار داده و بذره‌های ضدعفونی شده را بر روی کاغذ فیلتر پخش کرده و سپس در شرایط تاریکی قرار داده تا جوانه‌دار شوند.

تیمار آزمایشی: مطالعه حاضر بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج مقایسه میانگین بر

اساس LSD در سطح ۰/۰۱ درصد توسط نرم افزار آماری SAS 9.1 انجام گرفت. نمودارهای بیان ژن با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم گردید.

تیمار گیاهچه‌ها توسط الفاکاننده زیستی *S. indica* و غیرزیستی

فسفیت پتاسیم و کیتوزان: تعداد ۵۰ بذر توسط قارچ‌ها *S. indica* (۵×۱۰^۵) اسپور در میلی لیتر) به مدت ۶ ساعت تیمار شدند. سپس بذور تیمار شده و تیمار نشده به گلدان‌های پلاستیکی که حاوی خاک استریل شده بودند انتقال داده شدند. در نهایت گلدان‌ها به گلخانه منتقل گردید. زمانی که گیاهچه‌ها به مرحله‌ی پنجه‌زنی رسیدند تعداد از گیاهچه‌های کشت شده با فسفیت پتاسیم دو در هزار و کیتوزان دو در هزار تیمار شدند.

تلقیح عامل بیماری: قارچ *B. oryzae* جهت اسپورزایی روی محیط Water Agar (WA) کشت و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در تاریکی قرار داده شد. پس از پنج روز سطح میسلیم در حجم بالا تولید اسپور شد. سوسپانسیون اسپور قارچ در آب مقطر با یک در هزار Tween-20 استریل به غلظت ۵×۱۰^۴ اسپور در میلی لیتر تهیه شد (Hashemi et al., 2013). سپس بوته‌های هر گلدان با حجم برابر از سوسپانسیونی اسپور قارچ آلوده شده و گلدان‌ها به مدت ۴۸ ساعت در زیر پوشش نایلونی نگهداری شدند.

نمونه برداری: نمونه‌برداری از بافت برگ گیاهچه‌های تیمار شده و شاهد مثبت و منفی به ترتیب در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار انجام گرفت. نمونه‌های برگ پس از انتقال به فویل به سرعت در نیتروژن مایع فرو برده و سپس به فریزر با دمای -۸۰ درجه سلسیوس منتقل شدند.

شدت بیماری: دو هفته بعد از آلوده سازی با قارچ عامل بیماری تعداد لکه‌ها تولید شده توسط بیمارگر در تیمارهای مختلف در ۱۰ سانتی متر طول از قاعده برگ ماقبل آخر انجام شد (Horsfall & Barratt, 1945; Khalili et al., 2012).

مطالعه فعالیت آنزیمی

استخراج عصاره برگ: ابتدا نمونه‌ها در ازت مایع پودر شده سپس ۰/۱ گرم بافت پودر شده با ۱/۸ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH ۶/۸) با استفاده از دستگاه ورتکس به خوبی مخلوط گردید سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد و فاز بالایی به عنوان عصاره جدا گردید.

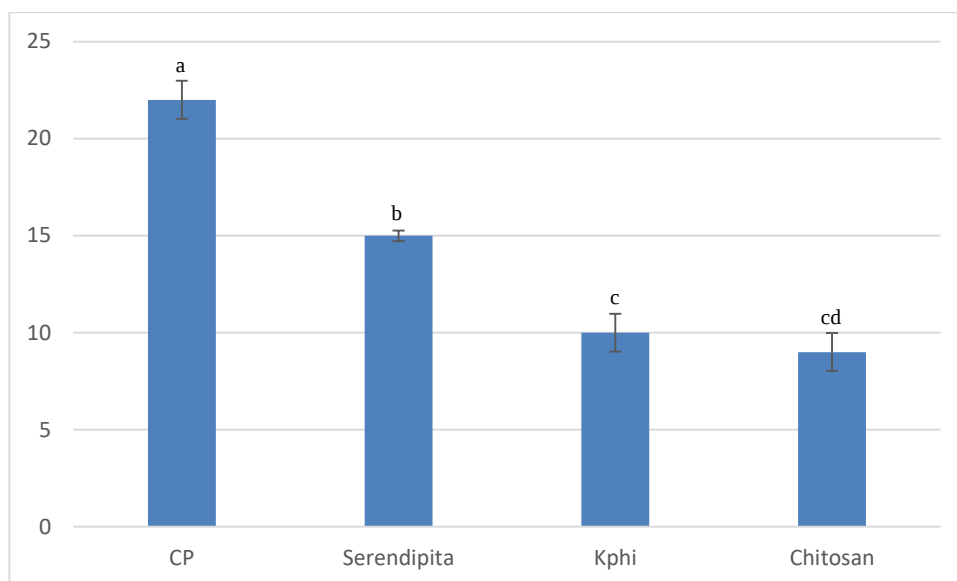
سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۳ میلی لیتر از بافر فسفات (۵۰ میلی مولار) حاوی H₂O₂، ۵ میلی مولار مخلوط و تغییرات جذب آن‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از اسپکترومتر خوانده شد (Aebi, 1984).

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: ۲۷۰۰ میکرولیتر بافر فسفات، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی و درنهایت ۱۰۰ میکرولیتر H₂O₂ به کووت اضافه گردید و تغییرات جذب آن‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکترومتر خوانده شد (Tang & Newton, 2005).

نتایج

نتایج تاثیر تیمارها در کاهش شدت بیماری

ارزیابی تاثیر تیمارهای مختلف زیستی و غیرزیستی روی بیماری لکه قهوه‌ای نشان داد قادر به کاهش تعداد لکه می‌شوند. تعداد لکه‌ها تشکیل شده در تیمار کیتوزان با اختلاف قابل ملاحظه کمتر از سایر تیمارها بود. کاهش تعداد لکه‌ها بعد از کیتوزان در تیمار با فسفیت پتاسیم مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱- تعداد لکه تشکیل شده توسط قارچ *B. oryzae* در تیمارهای مختلف

Fig 1. The number of stains formed by the Fungi *B. oryzae* in different treatments

میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌ها در اثر کیتوزان

سطح آنزیم کاتالاز در ۲۴ ساعت پس از تلقیح با قارچ، در گیاهانی که با کیتوزان تیمار شده بودند، تقریباً ۱۵۰ درصد بیش از گیاهان کنترل مثبت و کنترل منفی افزایش یافت. اما پس از ۷۲ ساعت، فعالیت آنزیمی در تیمار کیتوزان کاهش پیدا کرد و به سطح دو تیمار دیگر رسید. سطح آنزیم گایکول پراکسیداز ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ لکه قهوه‌ای در تیمار کیتوزان بیشتر از تیمارهای کنترل مثبت و منفی بود. با این حال، ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی، بیشترین فعالیت این آنزیم به ترتیب در کنترل مثبت، کنترل منفی و کیتوزان مشاهده شد (شکل ۲).

در یک پژوهش، جهت بررسی روند کنترل زنگ برگ گندم، از دو تیمار نانوذرات کیتوزان و اسید سالیسیلیک (SA) استفاده شده و تأثیر این مواد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در نمونه‌های گندم تحت تیمار، دوره نهفتگی، اندازه و تعداد جوش‌ها و شدت آلودگی به طور قابل توجهی کاهش یافته است. علاوه بر این، اوردینوسپورهای *Puccinia tritricina* پس از تیمار با نانوذرات کیتوزان دچار تغییرات ساختاری شدند که شامل ناهنجاری،

تخریب، لیز شدن و کوچک شدن بود. همچنین، افزایش معناداری در فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در گیاهان تیمار شده مشاهده گردید (Elsharkawy et al., 2022). مطالعه‌ای به ارزیابی تأثیر کیتوزان و نانوذرات مشتق شده از آن در مقابله با بیماری پژمردگی باکتریایی ناشی از *Ralstonia solanacearum* در گوجه‌فرنگی پرداخته است. نتایج نشان داد که گیاهانی که با کیتوزان و نانوذرات کیتوزان تیمار شده بودند، افزایش قابل توجهی در فعالیت آنزیم‌هایی نظیر فنیل آلانین آمونیلیاز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، کاتالاز و β -1-3 گلوکاناز داشتند، که این افزایش در مقایسه با گیاهان کنترل بسیار چشمگیر است (Narasimhamurthy et al., 2022). اثر ضد قارچی کیتوزان بر قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* که عامل پژمردگی گوجه فرنگی محسوب می‌شود، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی نشان داد که در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی تیمار شده با کیتوزان، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیلیاز، کاتالاز و β -1-3 گلوکاناز افزایش یافته است (Khaled & Alobaidi, 2023). در این پژوهش نیز سطح

فعالیت آنزیم‌ها در برنج تیمار شده با کیتوزان در ۲۴ ساعت نخست بالاتر از گروه‌های کنترل مثبت و منفی مشاهده شد.

میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌ها در اثر فسفیت پتاسیم (Kphi)

در ساعت ۲۴، سطح آنزیم کاتالاز در تیمار فسفیت پتاسیم به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از تیمارهای کنترل مثبت و منفی بود اما پس از ۷۲ ساعت از زمان مایه زنی قارچ، فعالیت آنزیم در تیمار فسفیت پتاسیم کاهش یافت و به میزان کمتری نسبت به کنترل مثبت و منفی رسید. سطح آنزیم گایکول پراکسیداز در ساعت ۲۴ در تیمار فسفیت پتاسیم بیشتر از کنترل مثبت و منفی بود. با این حال، در ساعت ۷۲، سطح این آنزیم در کنترل مثبت بالاتر از کنترل منفی و تیمار فسفیت پتاسیم شد (شکل ۲).

در یک مطالعه، نقش فسفیت پتاسیم در واکنش گیاهان خیار آلوده به قارچ *Pythium ultimum* var. *ultimum* بررسی شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز افزایش یافته است. این افزایش موجب کاهش علائم مرگ گیاهچه، بهبود رشد و عملکرد گیاه شد (Mofidnakhai et al., 2016). اثر فسفیت پتاسیم بر بیماری لکه سیاه سیب مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که استفاده از فسفیت پتاسیم، شدت بیماری لکه سیاه را تا ۶۲ درصد کاهش داده و تجمع اسید سالیسیلیک و پروتوکتونیک اسید را افزایش داده است (Felipini et al., 2016). یک پژوهش نشان داد که تیمار سیب‌زمینی با فسفیت پتاسیم پس از آلودگی به بیماری بادزدگی سیب‌زمینی (*Phytophthora infestans*) باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیوی مانند سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز می‌شود. این افزایش در مقایسه با گیاهانی که پس از آلودگی تحت تیمار قرار نگرفتند، به‌طور چشمگیری بیشتر بود (Mohammadi et al., 2020). در این پژوهش مشخص شد که میزان فعالیت آنزیم‌ها در گیاهانی که با فسفیت پتاسیم تیمار شده بودند، در مقایسه با گیاهان شاهد در ساعت ۲۴ بالاتر بود. این نتیجه

نشان‌دهنده آن است که یکی از دلایل کاهش تعداد لکه‌های قارچ در برنج ممکن است به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌ها باشد.

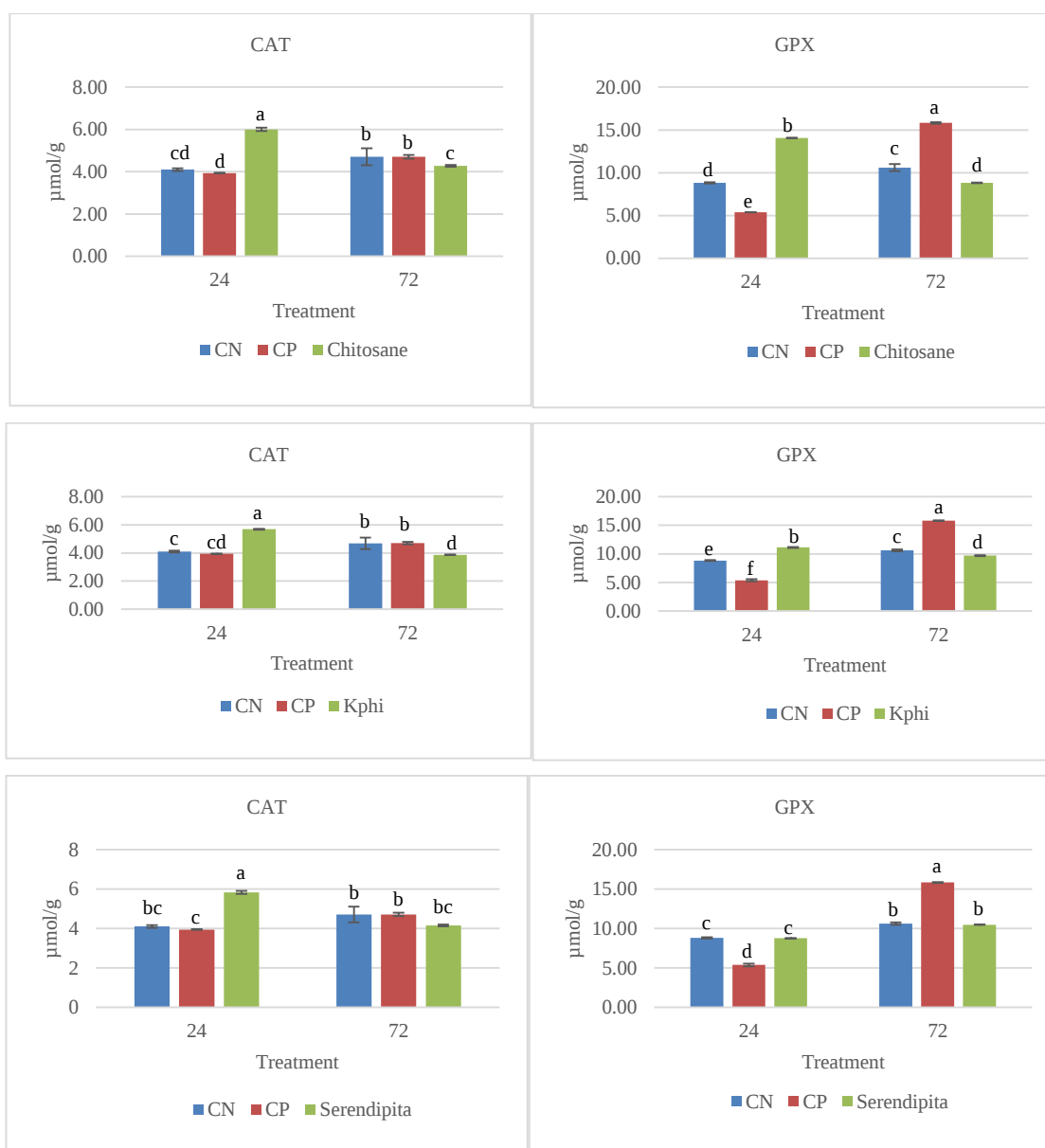
مقایسه فعالیت آنزیم‌های بررسی شده بین تیمارهای *S. indica*، کنترل مثبت و کنترل منفی

روند فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های برنج در ۲۴ ساعت پس از مایه زنی با پاتوژن در تیمار *S. indica* نسبت به کنترل مثبت و منفی بیشتر بود. اما پس از ۷۲ ساعت از زمان مایه زنی قارچ، میزان فعالیت آنزیم در تیمار *S. indica* کاهش و در کنترل مثبت و منفی افزایش یافت و لی معنی‌دار نبود. در این آزمایش سطح آنزیم گایکول پراکسیداز در دو تیمار *S. indica* و کنترل منفی در ۲۴ ساعت پس از تلقیح قارچ تقریباً یکسان بوده و از کنترل مثبت بیشتر بود در ساعت ۷۲ میزان فعالیت آنزیم افزایش یافت ولی فعالیت آنزیم در کنترل مثبت بیشتر از تیمار *S. indica* و کنترل منفی شد (شکل ۲).

نشان داده شد همزیستی گیاه جو با قارچ *S. indica* باعث افزایش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در القای مقاومت در برابر بیماری پوسیدگی ریشه ناشی از *Fusarium culmorum* می‌گردد (Harrach et al., 2013). بررسی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز نشان داد که به دنبال بروز بیماری پوسیدگی طوقه در برنج، میزان این آنزیم‌ها در گیاهانی که از قبل با قارچ *S. indica* تیمار شده بودند، در مقایسه با گیاهان شاهد به طور چشمگیری افزایش یافت (Bagheri et al., 2014). قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* تهدیدی جدی برای کشت موز محسوب می‌شود. در یک پژوهش، گیاهان موز با قارچ *S. indica* کلونیزه شده و سپس به قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* آلوده گردیدند. نتایج نشان داد که کلونیزاسیون توسط *S. indica* باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با این قارچ به طور قابل توجهی بیشتر از گیاهان شاهد بوده است (Cheng et al., 2020). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که اثر مثبت

کلونیزاسیون *S. indica* در کاهش لکه‌های *B. oryzae* در برنج تا حدی از

طریق تنظیم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به دست می‌آید.



شکل ۲- مقایسه میانگین تغییرات سطوح فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و گایکول پراکسیداز (GPX) در بازه‌های زمانی مختلف توسط تیمارهای تیمار کیتوزان (Chitosane)، فسفیت پتاسیم (Kphi) و *S. indica* در مقایسه با کنترل مثبت (CP) و کنترل منفی (CN)، ستون‌ها با حروف یکسان تفاوت معنی داری با هم ندارند.

Fig 2. Shows a comparison of the average changes in activity levels of catalase (CAT), and guaiacol peroxidase (GPX) enzymes in different time periods following treatments with chitosan, potassium phosphite (Kphi), and *Serendipita indica* When compared to the control positive (CP) and control negative (CN), columns with the same letters are not significantly different.

گروه‌های کنترل مثبت و منفی کاهش یافته است. این کاهش ناشی از افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایکول پراکسیداز در ۲۴ ساعت اولیه بوده که

مطالعات نشان داده‌اند که شدت بیماری قارچ *B. oryzae* در برنج‌هایی

که با کیتوزان، فسفیت پتاسیم و قارچ *S. indica* تیمار شده‌اند، نسبت به

موازن اخلاقی

در انجام این پژوهش تمامی موازن و اصول اخلاقی رعایت گردیده است.

تشکر و قدردانی

نگارندگان مقاله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و

منابع طبیعی ساری جهت کمک در تامین مواد مورد نیاز این پژوهش

سپاسگزاری می‌شود.

مقاومت گیاه برنج را بهبود بخشیده است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که

عوامل غیرزیستی مانند کیتوزان و فسفیت پتاسیم همراه با قارچ *S. indica*

نقش مؤثری در مقاومت برنج در شرایط گلخانه‌ای ایفا می‌کنند که بیانگر

اهمیت به‌کارگیری روش‌های زیستی و ترکیبات شیمیایی سازگار با

محیط‌زیست در مدیریت بیماری‌های گیاهی است.

تعارض منافع

نویسندگان تأیید می‌کنند که این تحقیق در غیاب هر گونه روابط تجاری

یا مالی می‌تواند به عنوان تضاد منافع بالقوه تعبیر شود، انجام شده است.

References

- Abrol, S., Singh, S., Mehta, A., Ahanger, S. A., Basu, U., Vaid, A., & Singh, V. (2022). Distribution pattern and prevalence of brown spot of rice (*Bipolaris oryzae*) in Jammu region. *Pharma Innovation Journal*, 11, 732-736. [Link]
- Achary, V. M. M., Ram, B., Manna, M., Datta, D., Bhatt, A., Reddy, M. K., & Agrawal, P. K. (2017). Phosphite: a novel P fertilizer for weed management and pathogen control. *Plant Biotechnology Journal*, 15(12), 1493-1508. [Link]
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. [Link]
- Bagheri, A. A., Saadatmand, S., Niknam, V., Nejadsatari, T., & Babaeizad, V. (2014). Effects of Piriformospora indica on biochemical parameters of *Oryza sativa* under salt stress. *International Journal of Biosciences*, 4(4), 24-32. [Link]
- Barnwal, M. K., Kotasthane, A., Magculia, N., Mukherjee, P. K., Savary, S., Sharma, A. K., & Zaidi, N. (2013). A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. *European Journal of Plant Pathology*, 136, 443-457. [Link]
- Chen, S. C., Ren, J. J., Zhao, H. J., Wang, X. L., Wang, T. H., Jin, S. D., & Ahammed, G. J. (2019). *Trichoderma harzianum* improves defense against *Fusarium oxysporum* by regulating ROS and RNS metabolism, redox balance, and energy flow in cucumber roots. *Phytopathology*, 109(6), 972-982. [Link]
- Cheng, C., Li, D., Qi, Q., Sun, X., Anue, M. R., David, B. M., & Lai, Z. (2020). The root endophytic fungus *Serendipita indica* improves resistance of banana to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *European Journal of Plant Pathology*, 156, 87-100. [Link]
- Daniel, R., & Guest, D. (2005). Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67(3-5), 194-201. [Link]
- Deshmukh, S. D., & Kogel, K. H. (2007). *Piriformospora indica* protects barley from root rot caused by *Fusarium graminearum*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 263-268. [Link]
- Dias, M. C., Figueiredo, P., Duarte, I. F., Gil, A. M., & Santos, C. (2014). Different responses of young and expanded lettuce leaves to fungicide Mancozeb: chlorophyll fluorescence, lipid peroxidation, pigments and proline content. *Photosynthetica*, 52(1), 148-151. [Link]
- Elsharkawy, M. M., Omara, R. I., Mostafa, Y. S., Alamri, S. A., Hashem, M., Alrumman, S. A., & Ahmad, A. A. (2022). Mechanism of wheat leaf rust control using chitosan nanoparticles and salicylic acid. *Journal of Fungi*, 8(3), 304. [Link]
- Felipini, R. B., Boneti, J. I., Katsurayama, Y., Neto, A. C. R., Veleirinho, B., Maraschin, M., & Di Piero, R. M. (2016). Apple scab control and activation of plant defence responses using potassium phosphite and chitosan. *European Journal of Plant Pathology*, 145, 929-939. [Link]
- Forouzanfar, M. H., Afshin, A., Alexander, L. T., Anderson, H. R., Bhutta, Z. A., Biryukov, S., & et al. (2016). Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053), 1659-1724. [Link]
- Ghosh, P., Sen, S., Chakraborty, J., & Das, S. (2016). Monitoring the efficacy of mutated *Allium sativum* leaf lectin in transgenic rice against *Rhizoctonia solani*. *BMC Biotechnology*, 16, 1-10. [Link]
- Gulati, A., & Narayanan, S. (2002). Rice trade liberalization and poverty missed discussion. *Molecular-Plant Microbe Interactions*, 12(5), 59-65.
- Hajipour, A., Sohani, M. M., Babaeizad, V., & Hasani-Kumleh, H. (2015). The symbiotic effect of *Piriformospora indica* on induced resistance against bakanae disease in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Molecular Breeding*, 3(2), 11-19. [Link]
- Harrach, B. D., Baltruschat, H., Barna, B., Fodor, J., & Kogel, K. H. (2013). The mutualistic fungus *Piriformospora indica* protects barley roots from a loss of antioxidant capacity caused by the necrotrophic pathogen *Fusarium culmorum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(5), 599-605. [Link]
- Hashemi, S., Babaeizad, V., Tajik, M. A., & Rahimian, H. (2013). Studying of several pathogenesis-related genes role in rice resistance to *Bipolaris oryzae*. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 49(2), 171-180. [Link]

- Horsfall, J. G., & Barratt, R. W. (1945). An improved grading system for measuring plant disease. *Plant Disease*, 35, 655. [Link]
- Jacobs, S., Zechmann, B., Molitor, A., Trujillo, M., Petutschnig, E., Lipka, V., & et al. (2011). Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of Arabidopsis roots by the fungus Piriformospora indica. *Plant Physiology*, 156(2), 726-740. [Link]
- Khaled, J. M., & Alobaidi, A. S. (2023). Priming effect of chitosan on induced protection against tomato root wilt disease mediated through upregulation of defense enzymes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 127, 102118. [Link]
- Khalili, E., Sadravi, M., Naeimi, S., & Khosravi, V. (2012). Biological control of rice brown spot with native isolates of three Trichoderma species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 297-305. [Link]
- Kumari, R., Kishan, H., Bhoon, Y. K., & Varma, A. (2003). Colonization of cruciferous plants by Piriformospora indica. *Current Science*, 85(12), 1672-1674. [Link]
- Lobato, M. C., Machinandiarena, M. F., Tambascio, C., Dosio, G. A., Caldiz, D. O., Daleo, G. R., & et al. (2011). Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. *European Journal of Plant Pathology*, 130, 155-163. [Link]
- Lobato, M. C., Olivieri, F. P., Altamiranda, E. G., Wolski, E. A., Daleo, G. R., Caldiz, D. O., & Andreu, A. B. (2008). Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. *European Journal of Plant Pathology*, 122, 349-358. [Link]
- Lopez-Moya, F., Suarez-Fernandez, M., & Lopez-Llorca, L. V. (2019). Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 332. [Link]
- Lumbsch, H. T., & Huhndorf, S. M. (2007). Outline of ascomycota-2007. *Myconet*, 13, 1-58. [Link]
- McDonald, A. E., Grant, B. R., & Plaxton, W. C. (2001). Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *Journal of Plant Nutrition*, 24(10), 1505-1519. [Link]
- Mofidnakhai, M., Abdossi, V., Dehestani, A., Pirdashti, H., & Babaeizad, V. (2016). Potassium phosphite affects growth, antioxidant enzymes activity and alleviates disease damage in cucumber plants inoculated with Pythium ultimum. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 49(9-10), 207-221. [Link]
- Mohammadi, M. A., Han, X., Zhang, Z., Xi, Y., Boorboori, M., & Wang-Pruski, G. (2020). Phosphite application alleviates Pythophthora infestans by modulation of photosynthetic and physio-biochemical metabolites in potato leaves. *Pathogens*, 9(3), 170. [Link]
- Nandeeshkumar, P., Sudisha, J., Ramachandra, K. K., Prakash, H. S., Niranjana, S. R., & Shekar, S. H. (2008). Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by Plasmopara halstedii. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(4-6), 188-194. [Link]
- Narasimhamurthy, K., Udayashankar, A. C., De Britto, S., Lavanya, S. N., Abdelrahman, M., Soumya, K., & Jogaiah, S. (2022). Chitosan and chitosan-derived nanoparticles modulate enhanced immune response in tomato against bacterial wilt disease. *International Journal of Biological Macromolecules*, 220, 223-237. [Link]
- Nassimi, Z., & Taheri, P. (2023). Priming effect of chitosan on induced protection against tomato root wilt disease mediated through upregulation of defense enzymes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 127, 102118. [Link]
- Oyarburo, N. S., Machinandiarena, M. F., Feldman, M. L., Daleo, G. R., Andreu, A. B., & Olivieri, F. P. (2015). Potassium phosphite increases tolerance to UV-B in potato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 88, 1-8. [Link]
- Peškan-Berghöfer, T., Shahollari, B., Giong, P. H., Hehl, S., Markert, C., Blanke, V., & et al. (2004). Association of Piriformospora indica with Arabidopsis thaliana roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. *Physiologia Plantarum*, 122(4), 465-477. [Link]
- Rabiey, M., Ullah, I., Shaw, L. J., & Shaw, M. W. (2017). Potential ecological effects of Piriformospora indica, a possible biocontrol agent, in UK agricultural systems. *Biological Control*, 104, 1-9. [Link]
- Rabiey, M., Ullah, I., & Shaw, M. W. (2013). The effect of Piriformospora indica, an endophytic fungus, on wheat resistance to Fusarium disease. *Aspects of Applied Biology*, 120, 91-94. [Link]
- Safari Motlagh, M. R., Padasht Dehkaee, F., & Hedjaroud, G. A. (2005). Rice brown spot disease and evaluation of the response of some rice cultivars to it. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 9(2), 171-182.
- Safari Motlagh, M. S. (2008). Characterization of new Bipolaris spp.: the causal agent of rice brown spot disease in the north of Iran. *International Journal of Agriculture and Biology*, 10(6), 638-642. [Link]
- Sunder, S., Singh, R. A. M., & Agarwal, R. (2014). Brown spot of rice: an overview. *Indian Phytopathology*, 67(3), 201-215. [Link]
- Tang, W., & Newton, R. J. (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(8), 760-769. [Link]
- Tauger, M. B. (2003). Entitlement, shortage and the 1943 Bengal famine: another look. *Journal of Peasant Studies*, 31(1), 45-72. [Link]
- Varma, A., Bakshi, M., Lou, B., Hartmann, A., & Oelmueller, R. (2012). Piriformospora indica: a novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus. *Agricultural Research*, 1, 117-131. [Link]
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., & et al. (2005). The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38), 13386-13391. [Link]