ارزیابی مقاومت برخی از ارقام برنج به بیماری بلایت باکتریایی ناشی از *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*

مائده اکبری[۱]، رسول رضائی[۲*] و حبیب‌اله چاره‌گانی[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

۲- *نویسنده مسوول: استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران (rrezaei@yu.ac.ir)

۳- استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۹/۱۶

چکیده

بلایت باکتریایی که توسط *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) ایجاد می‌شود، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های برنج در مناطق کشت این محصول در دنیا به شمار می‌آید. گرچه کاربرد ترکیبات شیمیایی به طور معنی‌داری بیماری‌های گیاهی را کاهش می‌دهد، ولی کاشت ارقام مقاوم همچنان به عنوان موثرترین روش کنترل بیماری‌های گیاهی به حساب می‌آید. هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی مقاومت چهار رقم برنج هاشمی، لنجان، فیروزان و گیلانه به بیماری بلایت باکتریایی در شرایط اتاقک رشد بود. بعد از مایه‌زنی باکتری *Xoo* به فضای بین‌سلولی گیاهان (10^7 واحد تشکیل دهنده کلنی بر میلی‌لیتر آب سترون)، رشد جمعیت باکتری، پیشرفت علائم بیماری و همچنین اثرات تنش باکتری بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در برگ‌های ارقام مختلف برنج مطالعه شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در برگ‌های آلوده ٤، ۸ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی باکتری مورد بررسی قرار گرفت. چهارده و شانزده روز پس از مایه‌زنی، حداکثر جمعیت باکتری در برگ‌های رقم هاشمی و بعد از آن در رقم گیلانه و فیروزان توسعه پیدا کرد. حداکثر فعالیت آنزیم پراکسیداز، در رقم لنجان و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی مشاهده گردید. فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در ارقام لنجان، گیلانه، هاشمی و فیروزان ۱۲ روز پس از مایه‌زنی باکتری در مقایسه با گیاه شاهد در همین زمان به ترتیب ۳۳/۳، ۲۳/۵، ۱۵/۵ و ۳۳/۳ درصد افزایش یافت. مطالعه حاضر نشان داد که رقم هاشمی بر اساس دینامیک جمعیت باکتری *Xoo* در برگ‌های ارقام مختلف، بیماری‌زایی (درصد ناحیه نکروز برگ) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، حساس‌ترین رقم و رقم لنجان بیشترین مقاومت را در مقایسه با سه رقم دیگر به بلایت باکتریایی داشتند.

کلیدواژه‌ها: برنج، بلایت باکتریایی، ارقام مقاوم، آنزیم

مقدمه

برنج از قدیمی‌ترین گیاهانی است که در دنیا کشت می‌شود و پس از گندم بیشترین سطح زیر کشت اراضی کشاورزی را به خود اختصاص داده و نقش بارز و چشمگیری در تغذیه و اشتغال مردم دنیا و نیز کشور ایران دارد. سطح زیر کشت برنج در ایران ۵۸۷۰۰۰ هکتار برآورد شده که حدود ۰/۴ درصد از کل اراضی زیر کشت برنج جهان می‌باشد (Pishgar-Komleh et al., 2011). درحال حاضر تولید برنج دردنیا ۵۶۰ میلیون تن می‌باشد که این مقدار بایستی تا سال ۲۰۲۰ به ۸۴۰ میلیون تن برسد. بنابراین افزایش تولید محصول برنج گامی مهم بوده و می‌توان از طریق تولید و کاشت ارقام

پرمحصول و حفظ آن از حمله‌ی عوامل خسارت‌زای زنده و غیرزنده به آن دست یافت (Eskandari Cherati et al., 2011). بیش از ۷۵ درصد از اراضی زیر کشت برنج در استان‌های شمال کشور یعنی گیلان و مازندران قرار دارند. این محصول مهم و استراتژیک، مورد هجوم عوامل بیماری‌زای زیادی قرار می‌گیرد که یکی از عوامل مهم خسارت‌زا در برنج، بیمارگرهای باکتریایی و به خصوص باکتری‌های جنس *Xanthomonas* می‌باشند. این جنس توانایی ایجاد بیماری در بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی را دارا می‌باشد (Chien et al., 2019). از جمله بیماری‌های مهم برنج که در سال‌های اخیر در کشور مشاهده شده است، بیماری سوختگی باکتریایی برگ برنج ناشی از باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) می‌باشد (Nelson et al., 1994). این بیماری اولین بار در سال ۱۸۸۴ در ژاپن ردیابی گردید و هم‌اکنون به یک بیماری مهم در اکثر کشورهای برنج‌خیز جهان مبدل شده است (Shen and Roland, 2002). این بیماری بعد از بلاست، دومین بیماری مهم برنج در جهان به شمار می‌آید که در آلودگی‌های شدید سبب خسارت ۶۰ تا ۸۰ درصدی محصول می‌شود (Kumar et al., 2013). اولین گزارش از وجود باکتری عامل سوختگی باکتریایی برنج از مزارع استان گیلان بود و عامل بیماری بر اساس خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی تحت عنوان *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* گزارش گردیده است (Khoshkdaman et al., 2014). بیماری دارای سه نشانه‌ی مشخص سوختگی، زردی برگ و پژمردگی است. نشانه‌ی سوختگی برگ متداول‌تر بوده، ولی در مرحله پژمردگی بیشترین خسارت به گیاه وارد می‌شود (Tran et al., 2018). اقدامات کنترلی برای بیماری سوختگی برگ برنج شامل انتخاب شیوه‌ی مناسب کشت، کنترل شیمیایی و بیولوژیکی، پیش‌آگاهی بیماری و مقاومت میزبان است (Nino-Liu et al., 2006). مهم‌ترین راه‌کار مبارزه با بیماری سوختگی باکتریایی استفاده از ارقام مقاوم برنج گزارش شده است (Read et al., 2016). تاکنون هیچ گونه کنترل موثری علیه این بیماری صورت نگرفته و تنها روش قابل اعتماد برای کنترل این بیماری معرفی و کشت ارقام مقاوم است. هدف از انجام این تحقیق بررسی مقاومت برخی ارقام برنج به بیماری سوختگی باکتریایی و بررسی برخی سازوکارهای بیوشیمیایی مقاومت از طریق اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در گیاهان تحت تنش باکتری بیمارگر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جدایه باکتری

سویه بیمارگر باکتری *Xoo* از بخش گیاهپزشکی دانشگاه شیراز دریافت و برای انجام تحقیقات مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون باکتری روی محیط کشت آگار مغذی[1] کشت داده شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت خالص‌سازی گردید.

ارقام برنج مورد استفاده

ارقام هاشمی، گیلانه، فیروزان و لنجان از موسسه تحقیقات برنج کشور تهیه گردید. بذور پس از شستشو با آب مقطر سترون در تشتک‌های پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شدند. تشتک‌های پتری به مدت سه تا چهار روز تا زمان جوانه‌زنی بذور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی درون انکوباتور نگهداری شدند. پس از جوانه‌زنی، بذرها به گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک مزرعه و کود دامی با نسبت ۲ به ۱ سترون شده با بخار آب منتقل شدند. گلدان‌ها به اتاقک رشد با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۵ درصد و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۵ درصد انتقال یافتند.

1- Nutrient Agar (NA)

مایه‌زنی باکتری

از کشت ۲۴ تا ۴۸ ساعته باکتری روی محیط کشت آگار مغذی سوسپانسیونی به غلظت 10^{7} واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر با چگالی نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر در آب مقطر سترون تهیه گردید. برگ‌های ارقام مختلف برنج، در مرحله چهار تا پنج برگی، با ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری محلول‌پاشی شدند. در تیمار شاهد از آب مقطر سترون استفاده گردید (Khoshkdaman et al., 2014).

بررسی مقاومت ارقام مختلف برنج

به منظور ارزیابی مقاومت ارقام از دو شاخص میزان رشد باکتری در برگ ارقام مختلف و درصد ناحیه نکروز برگ پس از مایه‌زنی باکتری استفاده گردید. برای تعیین جمعیت باکتری، نیم گرم از بافت برگ گیاهان مورد آزمایش به‌طور جداگانه وزن و در هاون چینی کاملاً له گردید. سپس از عصاره حاصل سری رقت تهیه و کشت شدند. پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت پرگنه‌های رشد کرده در هر تشتک پتری شمارش شدند. از فرمول زیر جهت شمارش کلنی باکتری استفاده گردید :

$$N= \Sigma c\times d/V$$

N: تعداد کلنی باکتری (واحد تشکیل‌دهنده کلنی) در هر گرم بافت برگ

Σc: تعداد کلنی باکتری در هر تشتک پتری

d: رقت شمارش شده

V: حجم سوسپانسیون استفاده شده در محیط کشت

نمونه‌برداری از برگ ارقام مختلف برنج در زمان‌های چهار، هشت، دوازده، چهارده و شانزده روز پس از مایه‌زنی انجام گرفت. به منظور مشخص شدن بیماری‌زایی باکتری در برگ ارقام مختلف برنج، ۳۰ روز پس از مایه‌زنی باکتری، درصد ناحیه نکروز برگ با استفاده از نرم‌افزار Image J محاسبه گردید (Abràmoff et al., 2004).

بررسی تغییرات آنزیمی در ارقام مورد مطالعه

به منظور بررسی نحوه پاسخ ارقام مختلف برنج به تنش باکتری سوختگی برگ برنج تعدادی از معیارهای بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند. میزان پروتئین محلول برگ‌ها به روش Bradford (1976) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۹۹۰ میکرولیتر محلول برادفورد داخل میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته و سپس ۱۰ میکرولیتر عصاره برگی به آن اضافه و پس از یک دقیقه (به منظور کامل شدن واکنش)، به داخل کیووت ۱ میلی‌لیتر ریخته و جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر گرم برگ تر با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد. هر نمونه با سه تکرار انجام و برای هر تکرار دو بار خوانش انجام گرفت. به منظور ترسیم منحنی استاندارد پروتئین ابتدا محلول غلیظ ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آلبومین سرم گاوی[1] تهیه شد. سپس با رقیق کردن این محلول غلظت‌های ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۵، ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شده و در مرحله بعد از هر کدام از استانداردها ۱۰ میکرولیتر برداشته و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و با ۹۹۰ میکرولیتر محلول برادفورد مخلوط و جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. سپس با استفاده از غلظت معلوم پروتئین در محلول‌های استاندارد خط رگرسیون ترسیم شد. با قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر و رسم منحنی رگرسیون بین میزان جذب استاندارد و غلظت آن‌ها و نسبت دادن جذب تیمارها با منحنی استاندارد، میزان پروتئین در نمونه بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. به منظور ارزیابی فعالیت آنزیم پراکسیداز، به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی پروتئینی، ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۶۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۶/۱، ۰/۵ میلی‌لیتر گایاکول ۲۸ میلی‌مولار و ۰/۵ میلی‌لیتر H_2O_2 ۳۰ میلی‌مولار اضافه و جذب به مدت یک دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیمی به صورت افزایش جذب در طول موج

1 - Bovin serum albumin

۴۷۰ نانومتر در دقیقه به ازای هر میلی‌مول در گرم وزن تر برگ در عصاره‌ی آنزیمی محاسبه شد. فعالیت آنزیم کاتالاز به روش Aebi (1984) انجام شد. ارزیابی فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز بر اساس روش Beauchamp and Fridovich (1971) و فعالیت آنزیم بر حسب واحد در هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

طرح آزمایشی و تجزیه‌ی آماری یافته‌ها

آزمون بررسی مقاومت ارقام مختلف برنج و بررسی میزان پیشرفت نشانه‌های بیماری روی برگ ارقام مایه‌زنی شده با باکتری عامل سوختگی برگ برنج به صورت فاکتوریل (زمان×رقم) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام پذیرفت. در آزمون بررسی تغییرات آنزیمی، آزمایش به صورت فاکتوریل (زمان×رقم×باکتری) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و تجزیه‌ی آماری با استفاده از نرم افزار 9.1 SAS و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام پذیرفت (SAS Institute, Cary, NC) (SAS 1996).

نتایج و بحث

بررسی دینامیسم جمعیت باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* در برگ ارقام مختلف برنج و بیماری‌زایی

به منظور بررسی نوسانات جمعیتی، باکتری *Xoo* در چهار رقم لنجان، هاشمی، فیروزان و گیلانه مایه‌زنی گردید. جدول تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر رقم برنج در ۴، ۸ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی بر نوسانات جمعیت باکتری معنی‌دار نبود اما در ۱۴ و ۱۶ روز پس از مایه‌زنی در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱ و ۲). میزان جمعیت باکتری در ارقام مختلف مورد آزمایش نشان داد که در ارقام هاشمی و گیلانه، جمعیت باکتری در ۴، ۸ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی روند صعودی داشته و پس از آن در ۱۴ و ۱۶ روز پس از مایه‌زنی روند نزولی نشان داد اما در دو رقم فیروزان و لنجان روند صعودی در بازه زمانی ۴ و ۸ روز پس از مایه‌زنی مشاهده شد و از زمان ۱۲ روز پس از مایه‌زنی، روند نزولی در میزان جمعیت باکتری مشاهده شد. در طی روند پیشرفت بیماری بیشترین میزان رشد باکتری در رقم هاشمی و کمترین رشد در رقم لنجان مشاهده گردید (شکل ۱). میزان رشد باکتری در برگ‌های ارقام گیلانه و فیروزان از میزان رشد در رقم هاشمی کمتر و از میزان رشد در رقم لنجان بیشتر بود. در ابتدا بیمارگرهای باکتریایی در هم‌کنش‌های سازگار (بیماری) و ناسازگار (مقاومت) به یک اندازه تکثیر می‌یابند، ولی بعدا باکتری سازگار چندین برابر باکتری ناسازگار در گیاه میزبان تکثیر می‌یابد. مهم‌ترین تفاوت هم‌کنش سازگار و ناسازگار در دسترس بودن مواد غذایی برای سویه سازگار و عدم دسترسی آن برای سویه‌های ناسازگار می‌باشد (Hirano and Upper, 2000). سویه ناسازگار توانایی غلبه بر سیستم‌های دفاعی گیاه را ندارند و بنابراین تکثیر در فضای بین سلولی گیاه محدود می‌شود. جدول تجزیه واریانس در ارتباط با میزان پیشرفت نشانه‌های بیماری نشان داد که تأثیر رقم در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱ و ۲). بررسی میزان پیشرفت نشانه‌های بیماری روی برگ ارقام مایه‌زنی شده با باکتری عامل سوختگی برگ برنج بعد از ۳۰ روز نشان داد که بیشترین درصد ناحیه نکروز به میزان ۴۰ درصد در برگ رقم هاشمی بوده است. درصد ناحیه نکروز در برگ ارقام گیلانه و فیروزان در مقایسه با رقم هاشمی به ترتیب به میزان ۳۲/۵ و ۳۷/۵ درصد کاهش یافت اما بین دو رقم از لحاظ شدت بیماری‌زایی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($P \leq 0.01$). درصد نکروز برگ به میزان هشت درصد در رقم لنجان به طور معنی‌داری از درصد نکروز در سایر ارقام کمتر بود ($P \leq 0.01$) (شکل ۲). در زمان‌های ۱۴ و ۱۶ روز پس از مایه‌زنی باکتری بیشترین جمعیت در رقم هاشمی و در زمان ۳۰ روز پس از مایه‌زنی، بیشترین درصد ناحیه نکروز برگ نیز در این رقم مشاهده شد (شکل‌های ۱ و ۲) در حالیکه کمترین جمعیت و کمترین درصد ناحیه

نکروز برگ در رقم لنجان ردیابی گردید (شکل ۲). تکثیر و سرعت رشد و گسترش بیمارگر و پیشرفت علائم بیماری باکتریایی با تعداد باکتری بیمارگر ارتباط مستقیم دارد. نرخ رشد باکتری در واکنش ناسازگار گیاه و بیمارگر در مقایسه با واکنش سازگار کاهش می‌یابد و رشد باکتری محدود می‌شود (Hirano and Upper, 2000).

جدول ۱. تجزیه واریانس حاصل از بررسی دینامیسم جمعیت باکتری روی برگ ارقام مایه‌زنی شده با باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Table 1. Data analysis of variance showing the population dynamics on inoculated cultivars with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

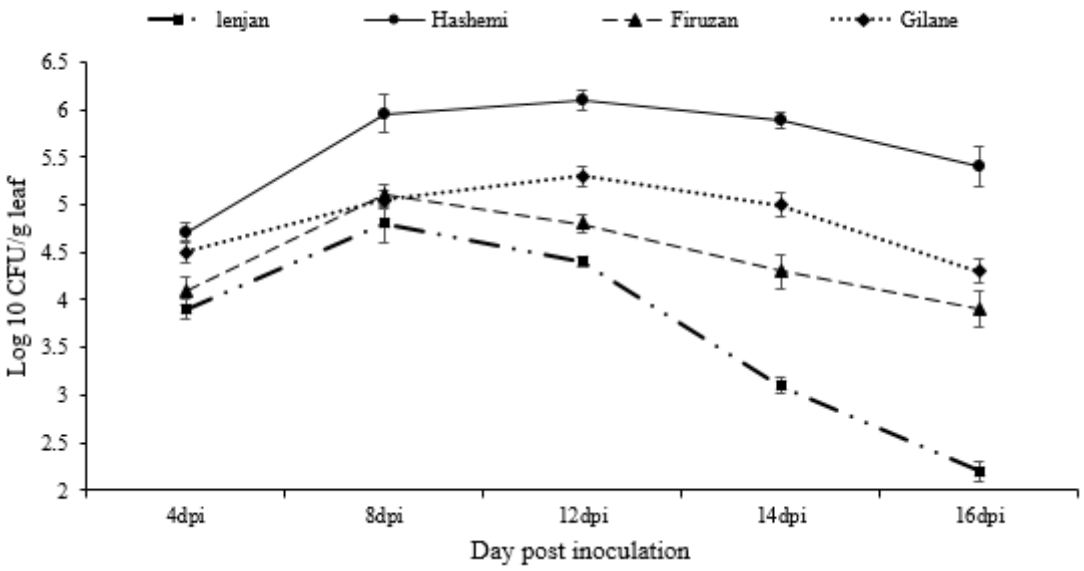
Source	df	Sum of squares	Mean square	F Value	Pr > F
Cultivars	3	33.32050000	11.10683333	38.15	<.0001
Time	4	20.63825000	5.15956250	17.72	<.0001
Error	72	20.96075000	0.29112153		
Total	79	74.91950000			

جدول ۲. میانگین دینامیسم جمعیت باکتری روی برگ ارقام مایه‌زنی شده با باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Table 2. Mean of the population dynamic on inoculated cultivars with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

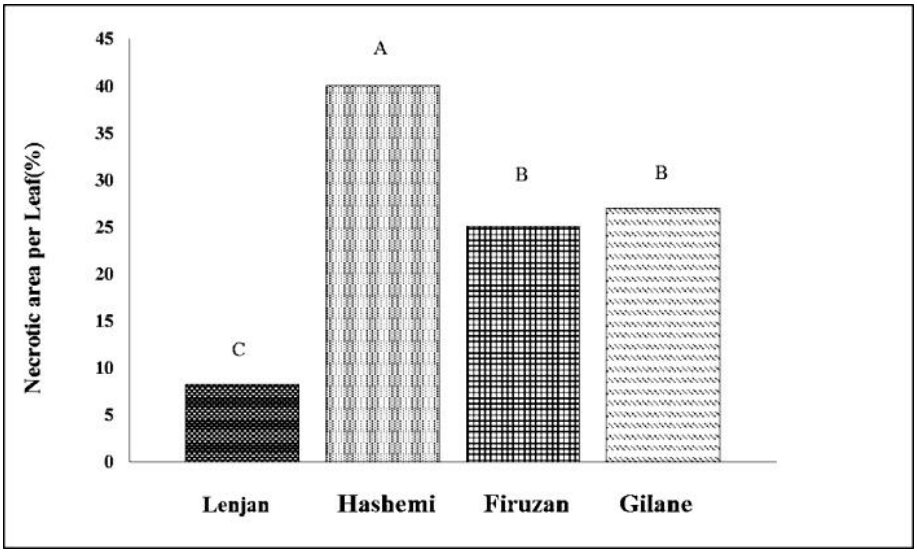
Cultivars	Time (Day post inoculation)	Log10 CFU/g leaf
Lenjan	4	3.9 ± 0.18 j
	8	4.83 ± 0.43 d-h
	12	4.43 ± 0.1 g-j
	14	3.08 ± 0.17 k
	16	2.2 ± 0.22 l
Hashemi	4	4.7 ± 0.22 e-h
	8	6 ± 0.43 a
	12	6.1 ± 0.21 a
	14	5.9 ± 0.14 ab
	16	5.4 ± 0.41 bc
Gilane	4	4.5 ± 0.22 f-i
	8	5.05 ± 0.19 c-f
	12	5.3 ± 0.23 cde
	14	4.98 ± 0.22 c-g
	16	4.3 ± 0.26 hij
Firuzan	4	4.1 ± 0.24 ij
	8	5.1 ± 0.24 cde
	12	4.8 ± 0.22 d-h
	14	4.3 ± 0.36 hij
	16	3.9 ± 0.4 j

Values are means ± standard error. Means followed by the same letter(s) are not different ($P \leq 0.01$) based on Duncan's multiple range test (DMRT).



شکل ۱- منحنی رشد باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* در برگ‌های ارقام برنج لنجان، هاشمی، فیروزان و گیلانه

Figure 1. Growth curve of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in leaves of rice cultivars Lenjan, Hashemi, Firuzan and Gilane.



شکل ۲- واکنش ارقام مختلف برنج به آلودگی *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* سی روز پس از مایه‌زنی. حروف مشابه روی هر ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار نمی‌باشد.

Figure 2. Response to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* infection in different rice cultivars 30 days post inoculation. Means in a column followed by the same letter(s) are not different ($P \leq 0.01$) based on Duncan's multiple range test (DMRT).

جمعیت باکتری‌ها در واکنش سازگار می‌تواند در طول ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی به شدت افزایش یابد و تعداد نهایی سلول‌های باکتری تا ۱۰۰۰۰۰ برابر زادمایه اولیه افزایش یابد ولی در هم‌کنش‌های ناسازگار افزایش جمعیت در طول دو تا چهار روز پس از مایه‌زنی حدود ۱۰ تا ۱۰۰ برابر جمعیت اولیه افزایش می‌یابد (Kelemu and Leach, 1990; Hodson et al., 1995).

بررسی تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ارقام مختلف برنج تحت تنش باکتری *Xoo*

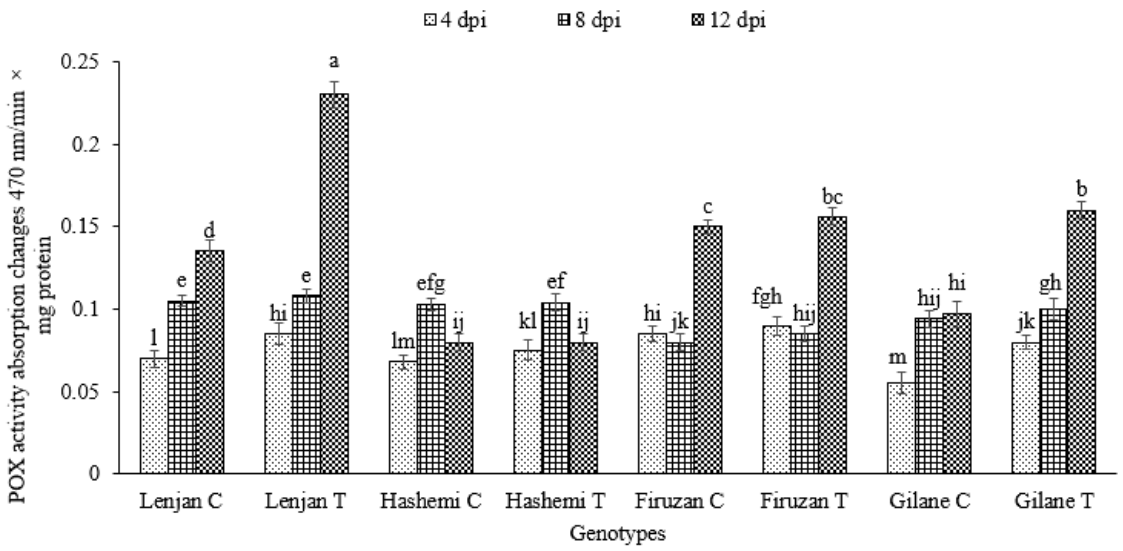
جدول تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر متقابل باکتری، زمان و رقم برنج بر میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در سطح پنج درصد و بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). میزان فعالیت آنزیمی در بازه زمانی ۴، ۸ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت. با بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به عنوان مکانیسم دفاعی گیاه برای خنثی سازی تجمع گونه-های اکسیژن فعال که علیه بیمارگر یا هر تنش دیگری در گیاهان تولید می‌شود می‌توان دریافت در چه رقمی با پیشرفت بیماری مکانیسم دفاعی گیاه توانسته مانع رشد و پیشرفت بیمارگر شود. محققان معتقدند از آنجا که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن (مکانیسم دفاعی گیاه در مقابل تنش) نقش مؤثری در مقاومت به تنش دارند، وجود فعالیت بیشتر این آنزیم‌ها می‌تواند نشان دهنده مقاومت بیشتر گیاه و یا ژنوتیپ‌های مختلف در شرایط تنش باشد (Gill and Tuteja, 2010). حداکثر فعالیت آنزیم پراکسیداز، در رقم لنجان و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی باکتری مشاهده گردید که در مقایسه با تمام ارقام برنج آلوده به باکتری و همچنین شاهد مورد بررسی معنی‌دار بود ($P\leq0.01$). تغییرات این آنزیم در هر سه بازه زمانی در ارقام هاشمی و فیروزان آلوده به باکتری در مقایسه با گیاهان شاهد سالم در همان بازه‌های زمانی معنی‌دار نبود ($P\leq0.01$). در رقم گیلانه در مقایسه با تیمار شاهد، در روزهای ۴ و ۱۲ پس از مایه‌زنی باکتری، آنزیم پراکسیداز افزایش معنی‌داری نشان داد اما میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در روز هشتم بعد از مایه‌زنی باکتری با گیاهان شاهد در همین زمان اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.01$) (شکل ۳). فعالیت پراکسیداز احتمالا به تولید آب اکسیژنه و دیگر گونه‌های اکسیژن فعال کمک می‌کند. آنزیم پراکسیداز از بین گونه‌های اکسیژن فعال، سمیت تجمع رادیکال سوپراکسید و آب اکسیژنه را برای گیاه خنثی می‌کند و در نتیجه می‌توان با توجه به روند کاهشی یا افزایشی میزان فعالیت این آنزیم، میزان مقاومت گیاه تحت تنش را مورد ارزیابی قرار داد. در گیاه برنج آلوده به قارچ عامل *Magnaporthe grrisea* در طول واکنش بین گیاه و بیمارگر، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز با توانایی میزان مقاومت گیاه برنج علیه قارچ عامل بلاست مرتبط بوده است اما در مورد نقش سایر آنزیم‌ها نظرات مختلفی وجود دارد. افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ برنج در فعالیت ناسازگار بین ۱۶ تا ۲۴ ساعت پس از مایه زنی بیمارگر به ثبت رسیده است (Reimers et al., 1992). فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در تمام ارقام ۱۲ روز پس از مایه‌زنی باکتری در مقایسه با گیاهان شاهد در همین زمان به طور معنی‌داری افزایش یافت و حداکثر فعالیت این آنزیم، در رقم لنجان و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی مشاهده گردید که این افزایش نسبت به سایر تیمارها معنی‌دار بود ($P\leq0.01$) (شکل ۴). اولین ترکیب خنثی‌کننده تجمع برخی گونه‌های اکسیژن فعال مانند آب اکسیژنه و رادیکال سوپراکسید، آنزیم سوپراکسیددیسموتاز می‌باشد که O_2 را به آب اکسیژنه تبدیل می‌کند و دهیدروآسکوربات ردوکتاز وآسکوربات پراکسیداز محصول سمی واکنش سوپراکسیددیسموتاز را حذف می‌کنند (Kumar et al., 2013). از آنجا که سوپراکسیددیسموتاز اکسیژن فعال را به پراکسید هیدروژن برای حذف توسط دیگر آنتی‌اکسیدان‌ها تبدیل می‌کند، افزایش این آنتی‌اکسیدان باید با دیگر آنتی‌اکسیدان‌ها همراه باشد (Khana-Chopra and Selote, 2007).

جدول ۳. تجزیه واریانس بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در برگ ارقام برنج مایه‌زنی شده با باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Table 3. Data analysis of variance showing the effect of X*anthomonas oryzae* pv. *oryzae* on the activity of antioxidant enzymes peroxidase, superoxide dismutase and catalase in rice cultivars

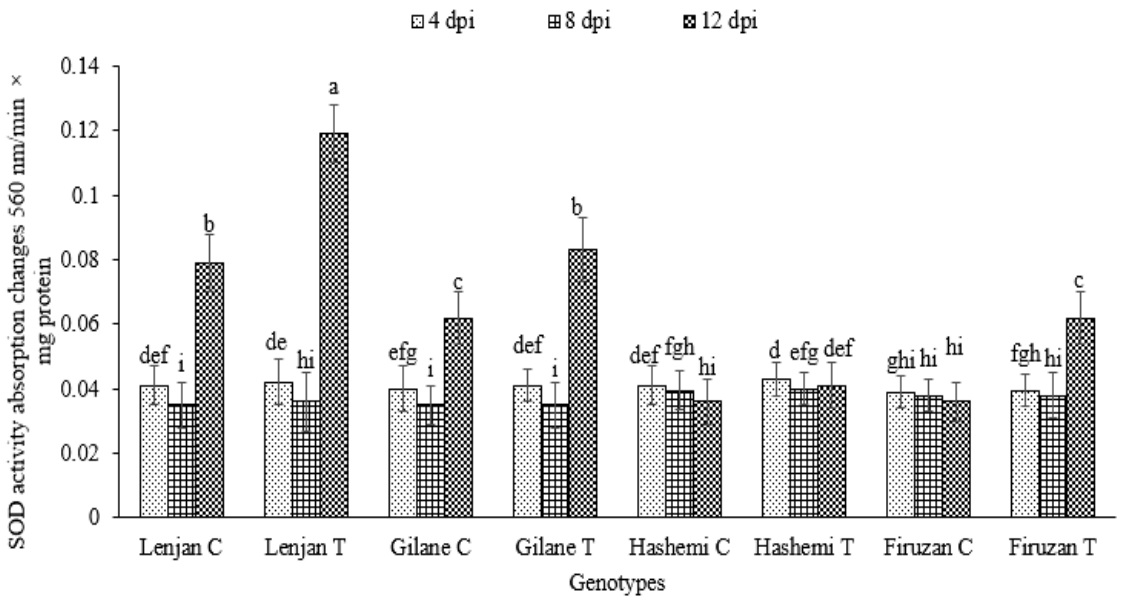
Source	df	Mean Square		
		POX	SOD	CAT
Cultivars	3	0.00737145**	0.0014664 **	7202.5578 **
Time	2	0.02362103**	0.0062517 **	8709.72720**
Bacterium	1	0.00442489 *	0.0006539 **	145.43247 ns
Cultivars×Time	6	0.00669270 **	0.0016145 **	1677.7287 ns
Cultivars× Bacterium	3	0.00163825 ns	0.0003074 **	3853.61043 *
Time× Bacterium	2	0.00287368 *	0.0003290 **	114.32441 ns
Cultivars×Time× Bacterium	6	0.00146974 *	0.0002758 **	2556.75562 *
Error	48	0.00074126	0.00003701	1221.6544
Total	71			

**, * and ns: There is a significant difference of 99 percent ($P \leq 0.01$), 95 percent ($P \leq 0.05$) and not significant, respectively.



شکل ۳- تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگهای ارقام مختلف برنج آلوده به باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae (Xoo)*. حروف مشابه روی هر ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار نمی‌باشد. C = گیاه شاهد، T = گیاه مایه‌زنی شده با *Xoo*.

Figure 3. Changes in peroxidase activity in leaves of rice cultivars exposed to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* infection. Means in a column followed by the same letter(s) are not different ($P \leq 0.01$) based on Duncan's multiple range test (DMRT). C = Control plant, T = Plant Inoculated with *Xoo*

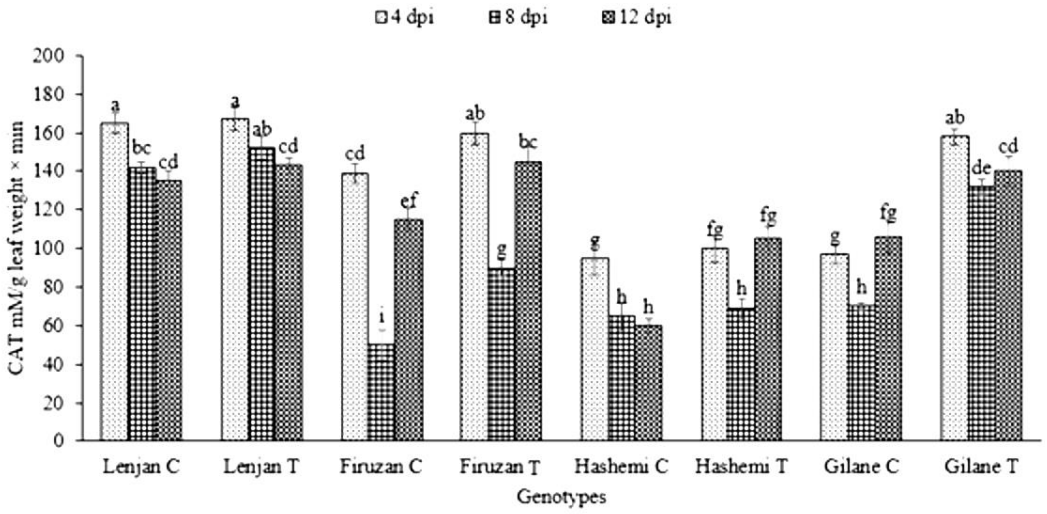


شکل ٤- تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در برگهای ارقام مختلف برنج آلوده به باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae (Xoo)*. حروف مشابه روی هر ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار نمی‌باشد.C = گیاه شاهد، T = گیاه مایه‌زنی شده با *Xoo*.

Figure 4. Changes in superoxide dismutase activity in leaves of rice cultivars exposed to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* infection. Means in a column followed by the same letter(s) are not different (*P*≤0.01) based on Duncan's multiple range test (DMRT). C = Control plant, T = Plant Inoculated with *Xoo*

آنزیم سوپراکسیددیسموتاز رادیکال سوپراکسید را به پراکسیدهیدروژن تبدیل می‌کند و کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، تجمع رادیکال سوپراکسید را در پی دارد. این رادیکال می‌تواند با پراکسید هیدروژن ترکیب و رادیکال فوق‌العاده خطرناک هیدروکسیل را بوجود آورد (Mittler et al., 2004). با توجه به روند فعالیت آنزیمی در بازه‌های زمانی مختلف در ارقام مختلف، آنزیم سوپراکسیدیسموتاز می‌تواند به عنوان فاکتور خنثی کننده سمیت ناشی از تجمع رادیکال سوپراکسید نقش مهمی در مقاومت گیاه علیه بیمارگر یا هر تنش دیگری داشته باشد. فعالیت آنزیم کاتالاز در بازه زمانی ۴ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی در رقم لنجان و هاشمی در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت. فعالیت این آنزیم در رقم فیروزان و گیلانه در تمام بازه‌های زمانی نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل ۵).

به طور کلی تغییر در فعالیت آنزیم در شرایط تنش به اثبات رسیده است و از این ویژگی به عنوان یک معیار مناسب برای گزینش ارقام مقاوم استفاده می‌شود. در اثر تنش غلظت رادیکال‌های مخرب اکسیژن در بافت‌های گیاه افزایش می‌یابد و در صورتی که این ترکیبات از بافت‌های گیاه حذف نشوند، خسارت‌های قابل توجهی متوجه گیاه می‌شود. از این رو در ارقام مقاوم، آنزیم‌های حذف‌کننده این ترکیبات فعال می‌شوند (Asada, 1999). میزان کاهش پیشرفت بیماری و بالا بودن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این پژوهش در ارقام مختلف نشان دهنده میزان مقاومت گیاه علیه بیمارگر می‌باشد.



شکل ۵- تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در برگهای ارقام مختلف برنج آلوده به باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae (Xoo)*. حروف مشابه روی هر ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار نمی‌باشد. C = گیاه شاهد، T = گیاه مایه‌زنی شده با *Xoo*.

Figure 5. Changes in catalase activity in leaves of rice cultivars exposed to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* infection. Means in a column followed by the same letter(s) are not different ($P \leq 0.01$) based on Duncan's multiple range test (DMRT). C = Control plant, T = Plant Inoculated with *Xoo*

در تحقیق حاضر در ارقامی که میزان فعالیت آنزیمی بیشتری مشاهده شد، میزان دینامیسم جمعیت باکتری و درصد پیشرفت بیماری به نسبت ارقامی که فعالیت آنزیمی کمتری داشته‌اند، پایین‌تر بود. حداکثر فعالیت سوپراکسیددیسموتاز در ارقام مختلف برنج تیمار شده با باکتری عامل بلاست برنج در برگ ارقام مقاوم (لنجان) ثبت شد. آنزیم سوپراکسیددیسموتاز بعنوان اولین پاسخ دفاعی آنزیمی برای تجزیه و خنثی نمودن اثر گونه‌های اکسیژن فعال مثل آب اکسیژنه و رادیکال سوپراکسید می‌باشد (Rais et al., 2017). با توجه به میزان فعالیت آنزیم در رقم لنجان و روند پایدار فعالیت آنزیم در این رقم، کمترین علائم بیماری مشاهده گردید. با توجه به روند فعالیت آنزیمی در بازه‌های زمانی مختلف در ارقام مختلف، آنزیم سوپراکسیدیسموتاز می‌تواند به عنوان فاکتور خنثی کننده سمیت ناشی از تجمع رادیکال سوپراکسید نقش مهمی در مقاومت گیاه علیه بیمارگر یا هر تنش دیگری داشته باشد. بر اساس یافته‌های دینامیسم جمعیت، بیماری‌زایی و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، رقم هاشمی به عنوان رقم حساس، ارقام فیروزان و گیلانه به عنوان رقم نیمه‌حساس و رقم لنجان به عنوان رقم مقاوم تعیین گردیدند.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از حمایت دانشگاه یاسوج به خاطر فراهم نمودن امکانات انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Abràmoff M.D., Magalhães, P. J., and Ram, S. J. 2004. Image processing with ImageJ. Biophotonics International, 11: 36–41.

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzymology. Academic press, Orlando. 105: 121-126.

Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Biology, 50: 601-639.

Beauchamp, C., and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry, 44: 276-287.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Chien, C. C., Chou, M. Y., Chen, C. Y., and Shih, M. C. 2019. Analysis of genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* populations in Taiwan. Scientific Reports, 9: 316.

Eskandari Cherati, F., Bahrami, H., Asakereh, A. 2011. Energy survey of mechanized and traditional rice production system in Mazandaran province of Iran. African Journal of Agricultural Research, 6: 2565e70.

Gill, S. S., and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 909-930.

Hirano, S. S., and Upper, C. D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*: a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64: 624–653.

Hodson, A., Smith, A., and Hignett, R. 1995. Characterization of an outer membrane preparation of *Pseudomonas syringae* pv. *mors-prunorum* and its biological activities *In planta*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 47: 159–172.

Kelemu, S., and Leach, j. E. 1990. Cloning and characterization of an avirulence gene from *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. Molecular Plant-Microbe Interaction, 3: 59-65.

Khana-Chopra, R., and Selote, D. S. 2007. Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than-susceptible wheat cultivar under field condition. Environmental and Experimental Botany, 60: 276-283.

Khoshkdaman, M., Ebadi, A. A., Majidi-Shilsar, F., and Dariush, S .2014. Preliminary evaluation of resistance genes in rice against bacterial leaf blight in Guilan province Iran. Agricultural Sciences, 5: 94-98.

Kumar, A., Guha, A., Bimolata, W., Reddy, A. R., Laha, G. S., Sundaram, R. M., Pandey, M. K., and Ghazi, I. A. 2013. Leaf gas exchange physiology in rice genotypes infected with bacterial blight: An attempt to link photosynthesis with disease severity and rice yield. Australian Journal of Crop Science 7: 32-39.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Breusegem, F. V. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science, 9: 490-498.

Nelson, R. J., Baraoidan, M. R., Vera Cruz, C. M., -Yap, I. V., Leach, J. E.,- Mew, T. W., and Leungh, H. 1994. Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. Applied Environmental Microbiology, 60: 3275-3283.

Nino-Liu, D. O., Ronald, P. C., and Bogdanove, A. J. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. Molecular Plant Pathology Journal, 7: 303-324.

Pishgar-Komleh, S. H., Sefeedpari, P., and Rafiee, S. 2011. Energy and economic analysis of rice production under different farm levels in Guilan province of Iran. Energy, 36: 5824–5831.

Rais, A., Jabeen, Z., Shair, F., Hafeez, F. Y., Hassan, M. N. 2017. *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. Plos One, 12: e0187412.

Read, A. C., Rinaldi, F. C., Hutin, M., He, Y., Triplett, L. R., and Bogdanove, A. J. 2016. Suppression of Xo1-mediated disease resistance in rice by a truncated, non-DNA-binding TAL effector of *Xanthomonas oryzae*. Frontiers in Plant Science, 7: 1516.

Reimers, P. J., Guo, A., and Leach, J. E. 1992. Increased activity of a cationic peroxidase associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* and rice (*Oryza sativa*). Plant Physiology, 99: 1044-1050.

SAS Institute, 1996. SAS User's Guide. 3rd ed., SAS Institute Inc., Cary, NC.

Shen, Y., and Roland, P. 2002. Molecular determinant of disease and resistance in interaction of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. Microbes and Infection, 4: 1361-1367.

Tran, T. T., Pérez-Quintero, A. L., Wonni, I., Carpenter, S. C. D., Yu, Y., Wang, L., Leach, J. E., Verdier, V., Cunnac, S., Bogdanove, A. J., Koebnik, R., Hutin, M., Szurek, B. 2018. Functional analysis of African *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* TALomes reveals a new susceptibility gene in bacterial leaf blight of rice. PLoS Pathogens, 14: e1007092.

© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 42(3), Fall, 2019

Evaluation of resistance in some rice cultivars to bacterial blight disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

M. Akbari[1], R. Rezaei[2*] and H. Charehgani

1. M.Sc. graduate of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran
2. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran (rrezaei@yu.ac.ir)
3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

(DOI): 10.22055/ppr.2019.15095

Received: 5 May 2019 Accepted: 7 December 2019

Abstract

Background and Objectives

Bacterial leaf blight of rice, caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, is a destructive bacterial disease of rice in growing regions of this plant worldwide. Although the application of chemicals significantly reduces plant diseases, planting resistant cultivars remains the most effective strategy to control crop diseases. This study aims to evaluate the resistance of four rice cultivars Hashemi, Lenjan, Firuzan and Gilane to bacterial blight, under growth chamber conditions.

Materials and Methods

The population growth and symptom development were monitored after introduction of bacterial suspensions (10^7 cfu ml^{-1}) into leaf intercellular spaces. In this investigation, the effects of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* stress on the activity of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in different rice leaves were evaluated. Antioxidant assays were performed with leaf samples collected on 4th day after infection (4th DAI), 8th DAI and 12th DAI.

Results

After infiltration of different cultivars with the bacterium, the highest populations were detected in Hashemi cultivar, followed by Gilane and Firuzan cultivars 14 and 16 days after infiltration. At 12th DAI, the higher peroxidase activity was observed in Lenjan cultivar. At 12th DAI, the activity of *superoxide dismutase* was increased 33.3, 23.5, 15.5 and 33.3 percent, respectively, in Lenjan, Gilane, Hashemi and Firuzan cultivars compared to the control.

Discussion

The present study showed that based on the population dynamics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in different rice leaves, pathogenicity (percentage of necrotic area per leaf) and antioxidant activity, Hashemi was the most susceptible cultivar and Lenjan was the most resistant cultivar to bacterial blight.

Keywords: Rice, Bacterial blight, Resistant cultivars, Enzyme