گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ٤٥، شماره ٤، زمستان ١٤٠١

10.22055/ppr.2023.17996

القای مقاومت در برنج علیه *Pyricularia oryzae* با دو گونه ریزوباکتر محرک رشد گیاه

افسانه زکریازاده[۱]، فاطمه شهریاری[۲*] علی اکبر عبادی [۳] و مریم خشکدامن [۴]

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۲-*نویسنده مسوول: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران (shahryari@znu.ac.ir)
۳-استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
۴-محقق گروه گیاه‌پزشکی، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۱

چکیده

بیماری بلاست برنج ناشی از قارچ *Pyricularia oryzae* یکی از بیماری‌های مهم برنج در جهان است. رایزوباکترهای محرک رشد گیاه با استقرار در ناحیه ریشه، نقش مهمی در القای مقاومت سیستمیک علیه بیمارگرها دارند. هدف از مطالعه حاضر بررسی گلخانه‌ای تاثیر دو جدایه رایزوباکتر محرک رشد گیاه، *Alcaligenes faecalis* strain O1R4 و *Bacillus idriensis* strain MR2، بر القای تولید آنزیم‌های مرتبط با مقاومت نظیر پراکسیداز و کاتالاز و شدت بیماری در گیاه برنج مایه‌زنی شده با قارچ بیمارگر بود. به‌این منظور ریشه‌ی نشاءهای دو رقم هاشمی و حسن‌سرایی قبل از کاشت در گلدان به مدت یک ساعت در سوسپانسیون جدایه‌ها قرار داده شد. سپس گیاهان برنج در مرحله چهار برگی با سوسپانسیونی از اسپورهای قارچ بلاست اسپری شدند. میزان آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در زمان‌های یک، سه، پنج و هفت روز پس از مایه‌زنی با اسپکتروفتومتر سنجیده شد. بر اساس نتایج، اثر تیمارهای باکتریایی بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در اولین روز پس از مایه‌زنی معنی‌دار نبود ولی در روزهای سوم، پنجم و هفتم در سطح ۱٪ معنی‌دار شد. اثر تیمارها بر میزان آنزیم کاتالاز، از اولین روز پس از مایه‌زنی تا روز هفتم در سطح ۱٪ معنی دار بود که نشان دهنده پاسخ سریع گیاه در تولید آنزیم کاتالاز در برابر عامل بیماری است. همچنین جدایه‌های *A. faecalis* O_1R_4 و *B. idriensis*MR2 با القای مقاومت سیستمیک در برابر عامل بیماری بلاست، شدت بیماری را در دو رقم هاشمی و حسن‌سرایی به ترتیب ۳۷ و ۲۱ ٪ کاهش دادند.

کلیدواژه‌ها: *Alcaligenes faecalis*، *Bacillus idriensis*، بلاست برنج، کنترل زیستی

دبیر تخصصی: دکتر مهدی مهرابی کوشکی

Citation: Zakariazadeh, A., Shahryari, F., Ebadi, A. & Khoshkdaman, M. (2023). Induction of resistance in rice against *Pyricularia oryzae* by two plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *45*(4), 133-147. https://doi.org/10.22055/ppr.2023.17996.

مقدمه

بیماری بلاست برنج ناشی از قارچ *Pyricularia oryzae* Cavara 1891 با فرم جنسی *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch 2002 یکی از بیماری‌های مهم برنج در اکثر نقاط دنیا است که در صورت کشت ارقام حساس میزان خسارت بسیار بالا خواهد بود (Talbot, 2003). این بیماری در سال ۱۳۵۳ تقریبا باعث نابودی ۱۰ ٪ کل محصول استان گیلان شد (Izadyar, 1998). خسارت ناشی از این بیماری در ارقام حساس برنج نظیر B40، IRBLZ5-CA و IRBLZT-T در حدود ۲۰-۱۰٪ گزارش شده است که در برخی موارد می‌تواند تا ۸۰ ٪ باشد (Pasha et al., 2017). با توجه به از بین رفتن بخشی از محصولات کشاورزی توسط بیمارگرها و نیاز روزافزون جوامع بشری به این محصولات، نگرانی‌هایی در مصرف بی‌رویه‌ی کودهای شیمیایی و سموم وجود دارد، هر چند که در برخی از نقاط جهان با آگاهی نسبت به خطرات سموم شیمیایی، مصرف آنها کاهش یافته است (Wilkinson et al., 2018). امروزه یافتن روش‌هایی جهت کنترل بیمارگرها بدون استفاده از سموم کشاورزی بسیار مهم است و میکروارگانیسم‌های مفید می‌توانند نقشی کلیدی در این چالش بزرگ ایفا کنند (Hermosa et al., 2011). این میکروارگانیسم‌ها دارای توانایی کنترل زیستی و تحریک رشدی گیاهان مختلف هستند و با مکانیزم‌های متفاوتی نظیر آنتی‌بیوز، پارازیتیسم، تولید آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها و مقاومت القایی در گیاه در کنترل بیمارگرهای گیاهی نقش دارند (Olanrewaju et al., 2017). یکی از انواع مقاومت‌های موجود در گیاه، مقاومت سیستمیک القایی است که رایزوباکترهای تحریک‌کننده رشد گیاه قابلیت ایجاد این نوع مقاومت را در گیاهان دارند (Pourabtahi et al., 2018). نه تنها میکروارگانیسم، بلکه گاهی اوقات مشتقات آنها مانند متابولیت‌های میکروبی نیز به عنوان عوامل کنترل زیستی استفاده می‌شوند (Barupal et al., 2020). محرک‌های شیمیایی ترکیباتی هستند که پیام‌هایی را برای فعال کردن مکانیسم‌های دفاع بیوشیمیایی در گیاهان القا می‌کنند. در بین محرک‌های شیمیایی که به فراوانی مطالعه شده‌اند، اسید سالیسیلیک، متیل سالیسیلات، بنزوتیادیازول، کیتوزان، اسید بنزوئیک و غیره بر تولید ترکیبات فنلی مختلف و فعال‌سازی آنزیم‌ها در سیستم‌های دفاعی گیاهان تأثیر دارند (Zehra et al., 2021). افزایش فعالیت آنزیم‌هایی نظیر پراکسیداز، کاتالاز، پلی فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیالیاز و همچنین ترکیبات فنلی در نتیجه پاسخ دفاعی میزبان در مقابل بیمارگر است (Daayf et al., 2001). آنزیم کاتالاز از مهمترین آنتی اکسیدان‌های شکننده پراکسید هیدروژن است و از این طریق سبب محافظت از سلول‌های میزبان می‌شود (Choodamani et al., 2009; Hameed & Iqbal, 2014; Sofo et al., 2015). پراکسیداز یکی از آنزیم‌هایی است که در برخی از مکانیسم‌های دفاعی شامل چوبی شدن[1]، تنظیم کشیدگی دیواره سلولها و همچنین در بهبود زخم نقش دارند (Hammond Kosack & Jones, 1996; Maksimov et al., 2014).

تاکنون، تحقیقات زیادی در زمینه کنترل زیستی بیماری‌های برنج، از جمله پوسیدگی طوقه، لکه قهوه‌ای، بلاست و سوختگی غلاف، انجام شده است (Khosravi & Velayi, 2017) در این زمینه می‌توان به اثر آنتی‌بیوتیک‌های مترشحه از باکتری *Bacillus subtilis* Cohn 1872 بر ممانعت از رشد رویشی و جوانه‌زنی کنیدیوم‌های قارچ *P. oryzae* در شرایط آزمایشگاه (Bettiol & Kimati, 1994)، کنترل موثر بیماری بلاست توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* Migula 1895 در شرایط گلخانه و مزرعه (Vidhyasekeran et

1- Lignification

al., 1997)، و کاربرد موثر دو گونه *P. fluorescens* و *Chryseobacterium balustinum* Vandamme et al. 1994 اشاره کرد (Lucas et al., 2014). همچنین در پژوهشی جدایه‌های EA105 و EA106 جداسازی شده از فراریشه گیاه برنج متعلق به گونه‌های *Pseudomonas* sp. و *Pantoea agglomerans* Gavini et al., 1989 در آزمایشگاه در کشت متقابل و در شرایط گلخانه با تیمار ریشه، کنترل موثری در جلوگیری از رشد بیمارگر و کاهش شدت بیماری نشان دادند (Spence et al., 2014).

در مطالعه دیگری اثر آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی جداسازی شده از مزارع برنج استان گیلان در مقابل عامل بلاست در شرایط آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه روی رقم حساس بینام بررسی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که گونه‌های مختلف جنس *Bacillus* (*B. circulance* Jordan 1890، *B. subtilis* و *B. megaterinum* de Bary 1884) و گونه *P. fluorescence* موثرتر از بقیه بودند و از رشد رویشی و جوانه‌زنی کنیدیوم‌های بیمارگر جلوگیری کردند و در نهایت به‌طور معنی‌داری سبب کاهش بیماری شدند (Padasht-Dehkaei et al., 2002; Padasht-Dehkaei & Izadyar, 2007).

ایجاد مقاومت سیستمیک القایی با استفاده از رایزوباکتری‌های محرک رشد گیاه از قبیل *Serratia* sp.، *Pseudomonas* spp. و *Bacillus* spp. در برنج علیه *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Swings et al. 1990 عامل بیماری بلایت باکتریایی برگ برنج باعث افزایش میزان آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و پلی فنل اکسیداز شد (Yasmin et al., 2016).

در این تحقیق تاثیر دو گونه باکتریایی مفید جداسازی شده از ریزوسفر رقم هاشمی در ایجاد مقاومت سیستمیک القایی در دو رقم برنج هاشمی و حسن سرایی در حضور قارچ *P. oryzae* و به تبع آن تاثیر آنها در کاهش شدت بیماری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌های باکتریایی

جدایه O1R4 از *Alcaligenes faecalis* Castellani & Chalmers 1919 و جدایه MR2 از *Bacillus idriensis* (Ko et al. 2006) که بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مولکولی شناسایی شده بودند، از بخش گیاه‌پزشکی موسسه تحقیقات برنج کشور اخذ شد. جدایه‌های فوق قبلا بر اساس توانایی حلالیت فسفات و تولید ایندول استیک اسید به‌عنوان ریزوباکترهای محرک رشد گیاه معرفی شده بودند (Gholamalizadeh et al., 2017). این جدایه‌ها در محیط کشت مایع لوریا پپتون[1]حاوی ۲۰ ٪ گلیسرول و در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. جهت استفاده روزمره، از کشت جدایه‌های باکتریایی روی محیط آگار غذایی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس استفاده شد.

تهیه قارچ بیمارگر و آزمون بیماری‌زایی

یک جدایه بیمارگر قارچ بلاست (*P. oryzae*) از کلکسیون قارچ‌های زنده مرکز تحقیقات برنج کشور اخذ شد. قارچ روی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA[2]) کشت شد. تشتک‌های پتری به مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در انکوباتور نگه‌داری شدند. پس از رشد قارچ با کشت مجدد و خالص سازی با روش نوک ریسه، سوسپانسیونی با غلظت ۲×۱۰^{۵} اسپور در هر میلی‌لیتر تهیه شد (Hayashi et al., 2009). آزمون بیماری‌زایی با اسپری زادمایه تهیه شده از اسپورهای قارچ

1- Luria pepton

2- Potato Dextrose Agar (PDA)

روی برگ‌های سالم گیاه برنج رقم‌های هاشمی و حسن‌سرایی در مرحله چهار تا پنج برگی در پنج تکرار انجام شد. گیاهان شاهد با آب مقطر سترون اسپری شدند. سپس گیاهان درگلخانه با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۰ ٪ نگه‌داری شدند و بروز علایم بیماری تا دو هفته بعد از مایه‌زنی بررسی شد.

بررسی شدت بیماری بلاست برنج در حضور جدایه‌های باکتریایی در شرایط گلخانه

ابتدا بذر ارقام حسن‌سرایی و هاشمی برنج در خزانه با خاک اتوکلاو شده کاشته شد. پس از ۲۱ روز، ریشه گیاهان شسته شد و به مدت یک ساعت درون سوسپانسیون تهیه شده از کشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت جدایه‌های باکتریایی با جمعیت تقریبی $۱۰^{۷}$ -$۱۰^{۶}$ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر ($OD_{600\ nm}$ =۰/۱) با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه تکان داده شد (Sharma et al., 2014). در مرحله بعد گیاهان در گلدان‌هایی با قطر و ارتفاع به ترتیب ۱۸ و ۲۲ سانتی‌متر کشت شدند. سپس در مرحله‌ی چهار تا پنج برگی و شروع پنجه‌زنی، گیاهان با سوسپانسیونی از قارچ بیمارگر با غلظت ۲×۱۰^{۵} اسپور در هر میلی‌لیتر اسپری شدند. در گیاهان شاهد منفی از آب مقطر سترون استفاده شد. سپس گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۰ ٪ نگه‌داری شدند. شدت بیماری بلاست ۱۰ روز پس از مایه زنی بیمارگر در ارقام مورد آزمایش تعیین شد. تخمین درصد سطح برگ آلوده با معیار صفر تا ۹ (به ترتیب نشان‌دهنده صفر، نیم، یک، دو، چهار، هشت، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۸۲ ٪ از سطح برگ آلوده است) بر اساس سیستم ارزیابی استاندارد (Standard Evaluation System) موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (IRRI, 2002) محاسبه شد. این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی در شش تکرار با چهار تیمار برای هر رقم انجام شد (جدول ۱). قابل ذکر است که گیاه مایه‌زنی شده با باکتری *A. faecalis* O_1R_4 و گیاه مایه‌زنی شده با باکتری MR2 *B. idriensis* نیز جهت کنترل وجود داشتند که در آنالیزها لحاظ نشدند.

بررسی توانایی جدایه‌های باکتریایی در القاء سیستم دفاعی گیاه میزبان

جهت بررسی القاء مقاومت در میزبان، نشاءهای ۲۱ روزه دو رقم هاشمی و حسن سرایی با جدایه‌های باکتریایی و سپس قارچ بیمارگر به روش ذکر شده در بالا مایه‌زنی شدند و به گلخانه در شرایط دمایی ۲۸ درجه سلسیوس انتقال داده شدند. سپس با تهیه عصاره گیاهی مقدار آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در روزهای اول، سوم، پنجم و هفتم پس از تیمار با قارچ بیمارگر اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه شد (Aebi, 1974). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و با هشت تیمار برای هر رقم انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده برای ارزیابی شدت بیماری بلاست و القاء مقاومت در گیاه برنج (رقم هاشمی و حسن‌سرایی) در شرایط گلخانه

Table 1. Treatments used in the evaluation of disease severity of blast and resistance induction in rice (cultivar Hashemi Hassan Sarai) on greenhouse condition.

Assay \ Treatment	A	B	A+B	F+A	F+B	F+A+B	C^+	C^-
Disease severity	+	+	_	+	+	_	+	+
Induced resistance	+	+	+	+	+	+	+	+

A: *Alcaligenes faecalis*, B: *Bacillus idriensis*, F: *Pyricularia oryzae*, C^+: positive control inoculated with pathogenic fungus, C^-: negative control inoculated with sterile distilled water (SDW).

تهیه بافر استخراج

از بافر استخراج فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته هفت حاوی Na_2EDTA[1] ۰/۵ میلی‌مولار و PVPV[2] ۲ ٪ استفاده شد. برای تهیه بافر استخراج، محلول شماره‌ی یک شامل ۰/۶۸ گرم از نمک پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) به همراه دو گرم PVPP و ۰/۰۱۸۶ گرم Na_2EDTAدر ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و سپس با آب مقطر حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول شماره‌ی دو شامل ۰/۸۷ گرم از نمک پتاسیم مونو هیدروژن فسفات (K_2HPO_4) به همراه دو گرم PVPP و ۰/۰۱۸۶ گرم Na_2EDTA در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و سپس به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول‌های شماره‌ی یک و دو به عنوان محلول‌های ذخیره در یخچال نگهداری شدند. جهت انجام آزمایش ۳۸/۵ میلی‌لیتر از محلول شماره‌ی یک با ۶۱/۵ میلی‌لیتر از محلول شماره‌ی دو مخلوط و اسیدیته آن در محدوده‌ی ۶/۸ تا ۷/۲ تنظیم شد.

آماده‌سازی عصاره‌ی گیاهی

به منظور اندازه‌گیری آنزیم‌ها، نیم‌گرم از نمونه‌های گیاهی با استفاده از نیتروژن مایع در هاون چینی کاملا پودر شد. پودر حاصل بی‌درنگ به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل و با افزودن یک میلی‌لیتر از بافر استخراج به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس، سانتریفیوژ شدند. سپس سطح رونشین به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتر منتقل شدند و مجدد به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. در ادامه محلول رویی در میکروتیوب ریخته شد و در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (Beauchamp & Fridovich, 1971). از این عصاره برای سنجش آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز استفاده شد.

ارزیابی میزان پروتئین کل قابل حل در عصاره گیاهی

برای محاسبه فعالیت اختصاصی آنزیم‌های مورد سنجش و تعمیم فعالیت آنزیم به میکروگرم پروتئین موجود در بافت، پروتئین کل از بافت گیاهی استخراج شد (Reuveni, 1995) و میزان پروتئین کل موجود در نمونه‌ها تعیین شد (Bradford, 1976). این روش بر مبنای اتصال رنگ کوماسی بریلیانت بلو موجود در معرف برادفورد به مولکول پروتئین استوار است.

تهیه منحنی پروتئین استاندارد

برای تهیه‌ی منحنی پروتئین استاندارد، ابتدا محلول پایه پروتئین آلبومین سرم گاوی[3] تهیه شد. به این منظور پنج میلی‌گرم از پروتئین استاندارد (فلوکا، سوئیس) در پنج میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته هفت ترکیب شد و در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شد. مقادیر ۵، ۱۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم از محلول BSA در آب مقطر سترون به طور جداگانه به سه میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه و پس از مخلوط کردن کامل اجزای آزمایش، بلافاصله میزان جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CARY 100 ساخت انگلیس) اندازه‌گیری شد. لوله‌های فاقد پروتئین استاندارد جهت صفر کردن دستگاه استفاده شد. هر کدام از غلظت‌ها در سه تکرار و میانگین آن‌ها جهت تهیه منحنی استاندارد استفاده شد (Gong et al., 1997). منحنی استاندارد و معادله‌ی رگرسیون بر اساس جذب نور هر کدام از غلظت‌ها محاسبه و ترسیم شد. برای تعیین میزان پروتئین کل عصاره مقدار پنج میکرولیتر از عصاره‌ی هر نمونه با سه میلی‌لیتر محلول برادفورد کاملا مخلوط شد و تغییرات جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر در سه تکرار برای هر نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

1- Ethylendiaminothetracetic acid

2- Poly vinyl poly pyrrolidone

3- Bovine serum albumin (BSA)

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

حجمی از عصاره حاوی ۴۰ میکروگرم پروتئین (این مقدار با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد)، با حجمی از بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته هفت به حجم دو میلی‌لیتر رسانده و سپس در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و دستگاه در طول موج ۲۴۰ نانومتر کالیبره شد. سپس میزان ۱۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳ ٪ به مخلوط واکنش اضافه شد و میزان جذب نور به مدت دو دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت کاتالاز بر اساس تجزیه پراکسید هیدروژن بر حسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میکروگرم پروتئین (ΔOD /Min/µg protein) در سه تکرار اندازه‌گیری شد (Gong et al., 1997).

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

حجمی از عصاره حاوی ۵۰ میکروگرم پروتئین (این مقدار با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد)، با پنج میلی‌مولار گوئیکول و مقدار کافی بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با اسیدیته هفت به حجم نهایی دو میلی‌لیتر رسانده شد و دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط در طول موج ۴۷۰ نانومتر صفر شد. سپس پنج میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳ ٪ به مخلوط اضافه شد و سریعا تغییرات جذب نور به فواصل زمانی ۱۰ ثانیه به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. مقدار فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میکروگرم پروتئین(ΔOD /Min/µg protein) بیان شد (Reuveni, 1995).

آنالیز آماری

آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار SAS (version 9.1) انجام شد. تجزیه واریانس با روش آنوا و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ و ۱ ٪ بررسی شدند. رسم نمودارها نیز با نرم‌افزار Excel 2016 انجام شد.

نتایج

آزمون بیماری‌زایی قارچ بیمارگر

در آزمون بیماریزایی، پس از اسپری برگ‌های برنج رقم‌های هاشمی و حسن سرایی با سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر، علایم بیماری به صورت لکه‌های بیضوی و دوکی شکل با مرکز خاکستری و نکروزه و حاشیه آب سوخته بعد از دو هفته مشاهده شد و قدرت بیماریزایی جدایه مورد نظر تایید شد (شکل ۱).

شکل ۱- لکه‌های ایجاد شده در برگ‌های برنج مایه‌زنی شده با قارچ *Pyricularia oryzae* بعد از ۱۴ روز (سمت راست). کنترل منفی مایه زنی شده با آب مقطر سترون (سمت چپ)

Figure 1. lesions formed on rice leaves inoculated with *Pyricularia oryzae* after 14 days (right). Negative control sprayed with sterile distilled water (left).

اثر جدایه‌های باکتریایی در شدت بیماری بلاست برنج در شرایط گلخانه

تجزیه‌ی واریانس داده‌های حاصل از اثر جدایه‌های *A. faecalis* O_1R_4 و *B. idriensis* MR2 بر شدت بیماری بلاست برنج در مرحله بلاست برگی روی رقم‌های هاشمی و حسن‌سرایی، نشان داد که اثر تیمارها در سطح ۱ ٪ معنی‌دار بود. در صورتی‌که تفاوت معنی‌داری بین ارقام مورد آزمایش مشاهده نشد. با توجه به نتایج گیاهان تیمار شده با جدایه‌های *A. faecalis* O_1R_4 و *B. idriensis* MR2 در مقایسه با گیاهان تیمار نشده (کنترل مثبت) در برابر قارچ عامل بلاست حساسیت کمتری داشتند و این جدایه‌ها به ترتیب ۳۷ ٪ و ۲۱ ٪ شدت بیماری را کاهش دادند و موجب حفاظت گیاه در مقابل بیماری شدند (جدول ۲) (شکل ۲).

اعداد در هر ستون که حداقل در یک حرف مشترک هستند، از نظر آماری در یک گروه قرار می‌گیرند. این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی در شش تکرار برای هر تیمار انجام شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز

اثر جدایه‌های باکتریایی *A. faecalis* O_1R_4 و *B. idriensis* MR2 بر میزان فعالیت آنزیم دفاعی پراکسیداز در مرحله‌ی چهار برگی گیاه برنج مایه‌زنی شده با قارچ عامل بلاست روی دو رقم هاشمی و حسن‌سرایی اندازه‌گیری شد. پس از تست نرمال بودن داده‌ها، تجزیه واریانس نشان داد که اثر رقم بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در روزهای یک و سه معنی‌دار نبود ولی در روزهای پنج و هفت در سطح ۱٪ معنی‌دار بود ($P<0.01$). همچنین اثر تیمار در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به جز روز سوم در مابقی روزها در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. در بررسی اثر متقابل رقم در تیمار، میزان فعالیت این آنزیم در روز سوم در سطح ۵ ٪ معنی‌دار بود و در مابقی روزها در سطح ۱٪ معنی‌دار شد. با توجه به معنی‌دار بودن صفات مورد بررسی، مقایسه میانگین داده‌ها در شکل ۳ و ۴ آورده شده است.

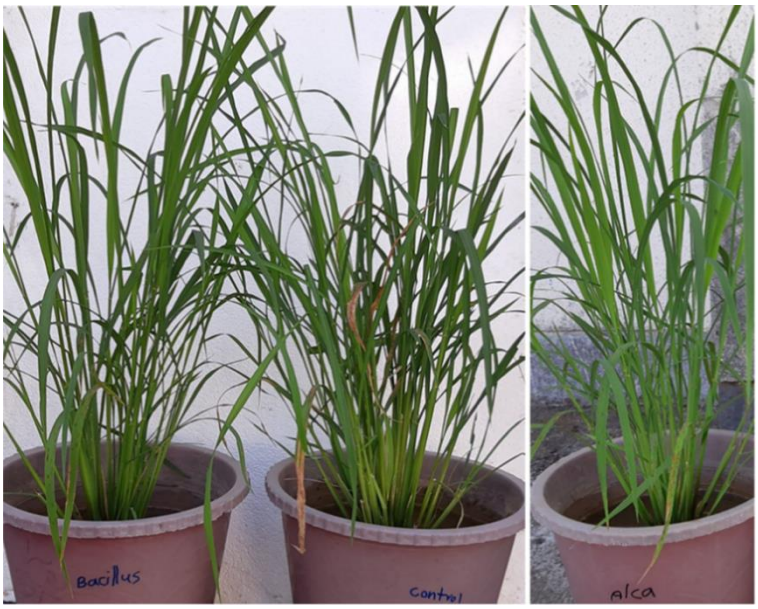
با توجه به شکل ۳ و ۴ مشخص شد میزان آنزیم پراکسیداز بصورت تجمعی طی هفت روز پس از مایه‌زنی، در تیمارهای آلوده در حضور *A. faecalis* O_1R_4 در ارقام هاشمی و حسن‌سرایی به ترتیب ۹۷ و ۱۷۴ ٪ بیشتر از شاهد مثبت بود. تاثیر حضور باکتری *B. idriensis* MR2 در مقدار آنزیم پراکسیداز در ارقام هاشمی و حسن‌سرایی به ترتیب ۶۹ و ۱۹۵ ٪ بیشتر از شاهد تعیین شد. همچنین در استفاده هم‌زمان دو جدایه باکتریایی میزان آنزیم پراکسیداز در ارقام به ترتیب ۱۷۴ و ۳۱۹ ٪ بیشتر از شاهد مثبت افزایش یافت.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر *Alcaligenes faecalis* O_1R_4 و *Bacillus idriensis* MR2 روی شدت بیماری بلاست برنج در شرایط گلخانه در رقم‌های هاشمی و حسن‌سرایی ١٤ روز پس از مایه‌زنی قارچ بلاست.

Table 2. Mean comparison of the effect of *Alcaligenes faecalis* O1R4 and *Bacillus idriensis* MR2 on the disease severity of rice blast in greenhouse conditions in Hashemi and Hassan Sarai cultivars, 14 days after inoculation of the blast fungus.

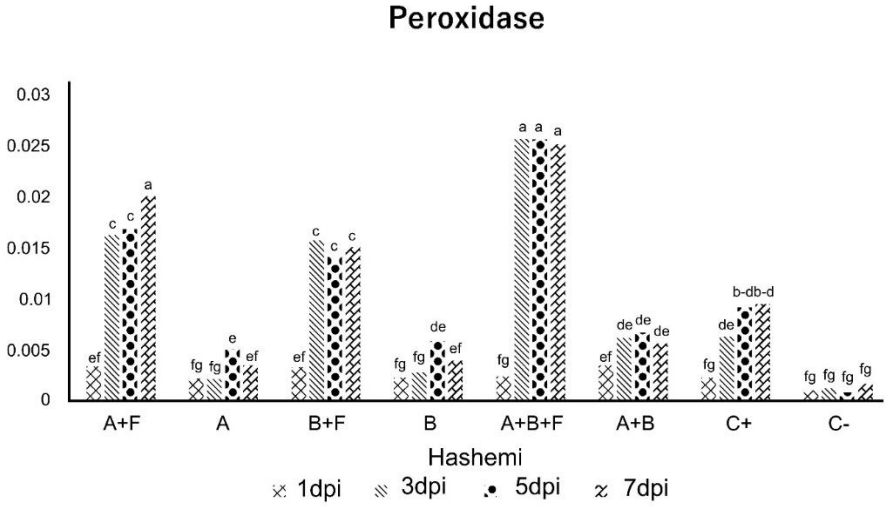
Treatment	(Disease severity (Based on the standard codes IRRI)
P. oryzae + *A. faecalis*	4.5 b
P. oryzae + *B. idriensis*	5.66 b
P. oryzae	7.1 a
Control	0 c

Means in a column followed by the same letter(s) are not significantly different according to Tukey's test (P = 0.01). The experiment was conducted in a completely randomized design with six replications



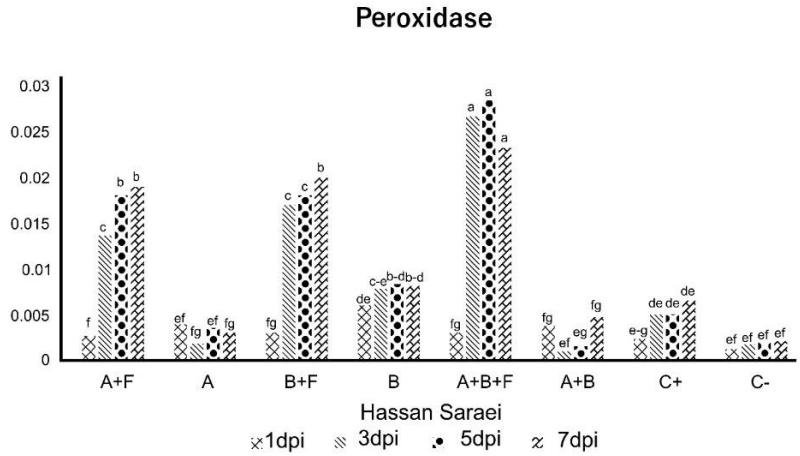
شکل ۲- اثر باکتری‌های محرک رشد گیاه *Alcaligenes faecalis* O1R4 (سمت راست) و *Bacillus idriensis* MR2 (سمت چپ) روی شدت بیماری بلاست برنج ۱۴ روز پس از مایه زنی قارچ بلاست. کنترل مثبت: گیاه مایه‌زنی شده با قارچ بلاست.

Figure 2. The effect of *Alcaligenes faecalis* O1R4 (right) and *Bacillus idriensis* MR2 (left) on the disease severity of rice blast 14 days after inoculation of the blast fungus. Positive control: plant inoculated with the blast fungus.



شکل۳- مقایسه میانگین اثر *Bacillus idriensis* MR2 و *Alcaligenes faecalis* O1R4 در رقم برنج هاشمی مایه‌زنی شده با قارچ عامل بلاست در آزمون سنجش میزان فعالیت پراکسیداز. اعداد بر حسب میانگین اختلاف جذب در دقیقه برای ۵۰ میکروگرم پروتئین است.(A: *A. facealis*، B: *B. idriensis*، F: قارچ عامل بلاست برنج، +C: شاهد مثبت مایه‌زنی شده با قارچ بیمارگر، -C: شاهد منفی) اعداد در هر ستون که حداقل در یک حرف مشترک می باشند، از نظر آماری در یک گروه قرار می گیرند. این آزمایش در سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

Figure 3. Mean comparison of the effect of *Bacillus idriensis* MR2 and *Alcaligenes faecalis* O1R4 on Hashemi rice cultivar inoculated with the blast fungus in peroxidase activity test. Numbers are the average difference in absorbance per minute for 50 µg of protein. (A: *A. facealis*, B: *B. idriensis*, F: rice blast fungus, C +: positive control inoculated with pathogenic fungus, C-: negative control. Means in a column followed by the same letter(s) are not significantly different according to Tukey's test (P = 0.01). The experiment was conducted with three replications for each treatment.



شکل ٤ – مقایسه میانگین اثر *Bacillus idriensis* MR2 و *Alcaligenes faecalis* O1R4 در رقم برنج حسن‌سرایی مایه‌زنی شده با قارچ عامل بلاست در آزمون سنجش میزان فعالیت پراکسیداز. اعداد بر حسب میانگین اختلاف جذب در دقیقه برای ۵۰ میکروگرم پروتئین است.(A: *A. facealis*، B: *B. idriensis*، F: قارچ عامل بلاست برنج، +C: شاهد مثبت مایه‌زنی شده با قارچ بیمارگر، -C: شاهد منفی) اعداد در هر ستون که حداقل در یک حرف مشترک می باشند، از نظر آماری در یک گروه قرار می گیرند. این آزمایش در سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

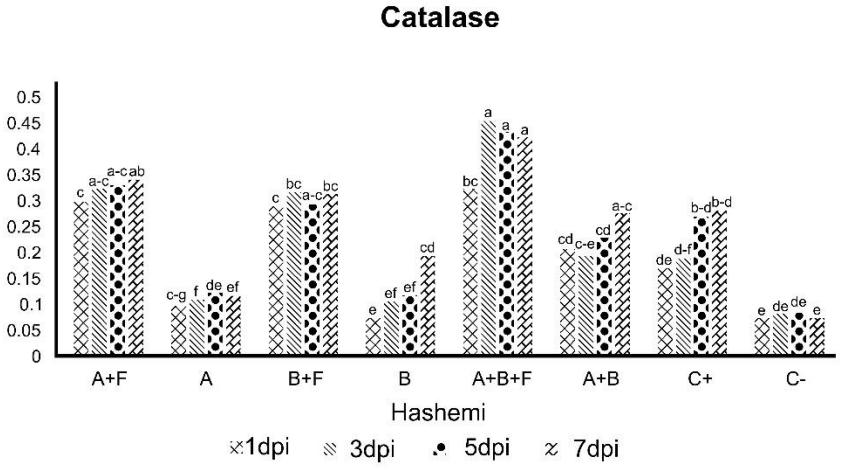
Figure 4. . Mean comparison of the effect of *Bacillus idriensis* MR2 and *Alcaligenes faecalis* O1R4 on Hassan Sarayi rice cultivar inoculated with blast fungus in peroxidase activity test. Numbers are the average difference in absorbance per minute for 50 µg of protein. (A: *A. facealis*, B: *B. idriensis*, F: rice blast fungus, C+: positive control inoculated with pathogenic fungus, C-: negative control. Means in a column followed by the same letter(s) are not significantly different according to Tukey's test (P = 0.01). The experiment was conducted with three replications for each treatment.

در بررسی اثر جدایه‌ها بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نیز پس از تست نرمال بودن داده‌ها، تجزیه واریانس نشان داد که اثر رقم، تیمار و اثر متقابل رقم در تیمار در میزان فعالیت آنزیم در روزهای اول، سوم، پنجم و هفتم پس از مایه‌زنی قارچ در سطح ۱ ٪ معنی‌دار بود ($P< 0.01$). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در شکل ۵ و ۶ آورده شده است.

شکل‌های ۵ و ۶ نشان می‌دهند که میزان آنزیم کاتالاز بصورت تجمعی طی هفت روز پس از مایه‌زنی، در تیمارهای آلوده در حضور *A. faecalis* O_1R_4 در ارقام هاشمی و حسن‌سرایی به ترتیب ۴۳ و ۱۲۵ ٪ بیشتر از شاهد مثبت بود. تاثیر حضور باکتری *B. idriensis* MR2 در مقدار آنزیم کاتالاز در تیمارهای آلوده برای ارقام هاشمی و حسن‌سرایی به ترتیب ۳۳ و ۱۲۱ ٪ بیشتر از شاهد مثبت تعیین شد. در استفاده هم‌زمان دو جدایه باکتریایی، میزان آنزیم‌های کاتالاز به ترتیب در ارقام هاشمی و حسن‌سرایی ۷۳ و ۱۶۶ ٪ بیشتر از شاهد مثبت افزایش یافت.

بحث

در تحقیق حاضر مشخص شد که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تمام تیمارهای آلوده در بازه زمانی ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی، تقریبا در یک سطح قرار داشت و این میزان بعد از ۲۴ ساعت روند افزایشی داشت و تا روز هفتم تقریبا اثر آن حفظ شد. همچنین نتایج نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور قارچ بیمارگر در گیاه برنج نسبت به شاهد منفی افزایش یافت، ولی این میزان در حضور باکتری‌های محرک رشد و قارچ بیمارگر نسبت به شاهد منفی بسیار بیشتر بود. همچنین مشخص شد که کاربرد همزمان *A. facealis* O_1R_4 و *B. idriensis* MR2 در حضور بیمارگر در تحریک فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر دو رقم از استفاده جداگانه هر یک از جدایه‌ها موثرتر بود و اختلاف معنی دار مشاهده شد.

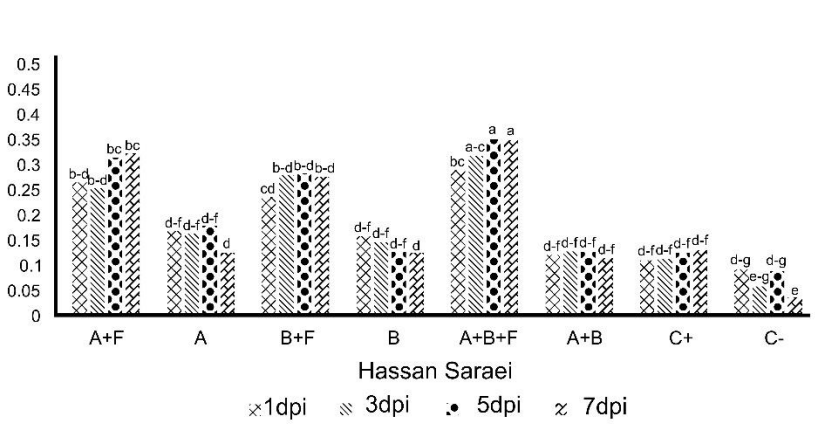


شکل ۵- مقایسه میانگین اثر *Bacillus idriensis* MR2 و *Alcaligenes faecalis* O_1R_4 در رقم برنج هاشمی مایه‌زنی شده با قارچ عامل بلاست در آزمون سنجش میزان فعالیت کاتالاز. اعداد بر حسب میانگین اختلاف جذب در دقیقه برای ۵۰ میکروگرم پروتئین است.(A: *A. facealis*، B: *B. idriensis*، F: قارچ عامل بلاست برنج، +C: شاهد مثبت مایه‌زنی شده با قارچ بیمارگر، -C: شاهد منفی) اعداد در هر ستون که حداقل در یک حرف مشترک می باشند، از نظر آماری در یک گروه قرار می گیرند. این آزمایش در سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

Figure 5. Mean comparison of the effect of *Bacillus idriensis* MR2 and *Alcaligenes faecalis* O1R4 on Hashemi rice cultivar inoculated with blast fungus in catalase activity test. Numbers are the average difference in absorbance per minute for 50 µg of protein. (A: *A. facealis*, B: *B. idriensis*, F: rice blast fungus, C +: positive control inoculated with pathogenic fungus, C-: negative control. Means in a column followed by the same letter(s) are not significantly different according to Tukey's test (P = 0.01). The experiment was conducted with three replications for each treatment.

فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در حضور قارچ عامل بیماری و جدایه‌های باکتریایی نسبت به شاهد منفی افزایش یافت، اما این افزایش بر خلاف آنزیم پراکسیداز که در بازه زمانی یک تا سه روز بعد از مایه‌زنی بود، در ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی اتفاق افتاد. در پژوهشی که میوه سیب با قارچ *Penicillium expansum* تیمار شده بود، نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در میوه سیب بعد از تیمار تا روز نهم حالت افزایشی داشته است (Zangoei et al., 2018). همچنین قارچ بیمارگر *Pythium debaryanum* به همراه چند جدایه‌ی محرک رشد گیاه از جمله *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus licheniformis* توانستند میزان آنزیم کاتالاز را در میزبان خیار به طور معنی‌داری افزایش دهند (Zehnder et al., 2001). افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و فنیل آمونیالیاز در برنج تیمار شده با *P. fluorescens* pf1 باعث افزایش مقاومت در مقابل نماتد *Meloidogyne graminicola* شده است (Anita & Samiyappan, 2012). در تحقیقی دیگری ریزوباکترهای محرک رشد جدا شده از فراریشه برنج (رقم‌های BRS Cambara، BRS Sertaneja و Perimavera) باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کیتیناز و بتا ۱-۳ گلوکوناز شدند (Fillippi et al., 2011). جدایه *Bacillus* L8 *megaterium* که به عنوان باکتری محرک رشد معرفی شده است، سطح فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز را در گیاه خیار آلوده به *Pythium aphanidermatum* (عامل زوال گیاهچه) افزایش داد و باعث کاهش زوال گیاهچه از ۸۳ ٪ به ۳۱ ٪ شد (Liang et al., 2011). در این مطالعه فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی گیاه با جدایه‌های بومی جداسازی شده از ریزوسفر برنج باعث شد که *A. faecalis* O_1R_4 و *B. idriensis* MR2 در مرحله بلاست برگی به ترتیب ۳۷ ٪ و

۲۱ ٪ شدت بیماری را کاهش دادند. در مطالعه‌ای تیمار ریشه گیاه برنج با جدایه‌های *Pseudomonas* sp. EA105 و *P. agglomerans* EA106 باعث شد که تعداد لکه‌های بلاست روی گیاهان به ترتیب ۳۳٪ و ۴۶٪ کاهش یابد (Spence et al., 2014). تهیه فرمولاسیونی از سه جدایه *B. subtilis* 5، *B. cereus* 3S5 و *P. fluorescens* 10S2 و کاربرد آنها علیه قارچ بلاست در شرایط گلخانه موجب شد که در مدت ۳۰ روز مقاومت گیاه ۳۳-۳۱٪ در مقایسه با شاهد مثبت افزایش یابد و فرمولاسیون موثری بود. در این مطالعه افزایش مقاومت گیاه در برابر بیمارگر به دلیل افزایش فعالیت پراکسیدازی بیان شده است (Chen et al., 2019). همچنین استفاده از قارچکش‌های جدید و پیشرفته بر پایه محصولات طبیعی باعث شده است که در مطالعات مختلفی توانایی گونه-های مختلف *Streptomyces* sp. در کنترل زیستی قارچ بلاست در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بررسی شود. در مطالعات گلخانه‌ای پس از تیمار گیاهچه‌های آلوده برنج با *Streptomyces* sp.، کاهش بیماری تا ۸۸/۳ ٪ مشاهده شد که بیشترین کارایی مربوط به گونه *S. globisporus* Waksman 1953 (Krassilnikov, 1941) بود که موثرتر از قارچکش تری‌سیکلازول عمل کرد (Law et al., 2017). ترکیبات زیست فعال با خاصیت ضدقارچی حاصل از گونه‌های مختلف *Streptomyces* sp. از قبیل آنتی بیوتیک‌های Blasticidin-S، Kasugamycin و Oligomycin A به عنوان ترکیبات جایگزین قارچ‌کش‌های سنتیک در مدیریت بیماری بلاست کاربرد دارد. بلاستی سیدین-اس اولین آنتی بیوتیک تجاری معرفی شده در ژاپن برای کنترل بلاست است (Fukunaga et al., 1955). کاسوگامایسین نیز با چندین فرمولاسیون مختلف مانند پودر وتابل، گرانول و مایع محلول با نام‌های تجاری Kasumin و Kasumin-Bordeaux به فروش می رسد (Hokko, 2015).



شکل ٦- مقایسه میانگین اثر *Bacillus idriensis* MR2 و *Alcaligenes faecalis* O_1R_4 در رقم برنج حسن‌سرایی مایه‌زنی شده با قارچ عامل بلاست در آزمون سنجش میزان فعالیت کاتالاز. اعداد بر حسب میانگین اختلاف جذب در دقیقه برای ۵۰ میکروگرم پروتئین است.(A: *A. facealis*، B: *B. idriensis*، F: قارچ عامل بلاست برنج، +C: شاهد مثبت مایه‌زنی شده با قارچ بیمارگر، -C: شاهد منفی) اعداد در هر ستون که حداقل در یک حرف مشترک می باشند، از نظر آماری در یک گروه قرار می گیرند. این آزمایش در سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

Figure 6. Mean comparison of the effect of *Bacillus idriensis* MR2 and *Alcaligenes faecalis* O1R4 on Hassan Sarayi rice cultivar inoculated with blast fungus in catalase activity test. Numbers are the average difference in absorbance per minute for 50 µg of protein. (A: *A. facealis*, B: *B. idriensis*, F: rice blast fungus, C+: positive control inoculated with pathogenic fungus, C-: negative control. Means in a column followed by the same letter(s) are not significantly different according to Tukey's test (P = 0.01). The experiment was conducted with three replications for each treatment.

سموم شیمیایی خطرات انکارناپذیری را بر سلامت انسان و سایر موجودات زنده دارند. این ترکیبات به آسانی در محیط زیست تجزیه نمی‌شوند و برای مدت طولانی موجودات زنده‌ای که در معرض این ترکیبات قرار می‌گیرند را تحت تاثیر خود قرار می‌دهند. محققان به دلیل مخاطرات بالایی که این گونه ترکیبات دارند همواره به دنبال ترکیبات کم خطری هستند که دارای دوام کمی در محیط زیست باشند (Zangoei et al., 2018). بنابراین بر اساس این مطالعه و سایر پژوهش‌ها، استفاده از میکروارگانیسم‌هایی که سبب القای مقاومت میزبان در برابر عوامل بیماریزا می‌شوند، می‌تواند به عنوان راه حلی مطمئن جهت کاهش حساسیت میزبان و خسارت ناشی از بیماری‌ها و در نتیجه افزایش تولید منابع غذایی در کشاورزی پایدار مدنظر باشد. با این حال، اثر بخشی هر عامل کنترل زیستی ممکن است تحت تاثیر عوامل متعددی از جمله شرایط محیطی و روش‌های کاربرد قرار گیرد. به منظور بهره برداری کامل از پتانسیل آنها، مطالعات بیشتر در مورد روش‌های جداسازی، فرمولاسیون و کاربرد آنها همراه با آزمایش‌های مزرعه‌ای برای اثبات مؤثر بودن عوامل کنترل زیستی مورد نیاز است.

سپاس‌گزاری

بدینوسیله از مرکز تحقیقات برنج رشت، معاونت پژوهشی دانشگاه زنجان و راهنمایی سرکار خانم دکتر صدیقه موسی نژاد (هیات علمی گروه گیاهپزشکی دانشگاه گیلان) تشکر و قدردانی می‌شود.

REFRERENCES

Aebi, H. (1974). Catalase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), Methods of enzymatic analysis. *Academic Press, New York*, 673-677.

Anita, B., & Samiyappan, R. (2012). Induction of systemic resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* against rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *Journal of Biopesticides*, *5*, 53-59.

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

Bettiol, W., & Kimati, H. (1994). Effects of *Bacillus subtilis* on *Pyricularia oryaze*, causal agent of rice blast. *Review of Plant Pathology*, *73*, 689 (Abstract).

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

Barupal, T., Meena, M., & Sharma, K. (2020). A study on preventive effects of *Lawsonia inermis* L. bioformulations against leaf spot disease of maize. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *23*, 101473.

Chen, W. C., Chiou, T. Y., Delgado, A. L. & Liao, C. S. (2019). The control of rice blast disease by the novel biofungicide formulations. *Sustainability*, *11*, 3449; doi:10.3390/su11123449.

Choodamani, M. S., Hariprasad, P., Sateesh, M. K., & Umesha, S. (2009). Involvement of catalase in bacterial blight disease development of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *International Journal of Pest Management, 55*, 121–127.

Daayf, F., Platt, H. W., Mahuku, G., & Peters, R. D. (2001). Relationships between RAPDs, Gpi-allozyme patterns, mating types, and resistance to metalaxyl of *Phytophthora infestans* in Canada in 1997. *American Journal of Potato Research, 78*, 129–139.

Fillippi, M. C. C., da Silva, G. B., Silva-Lobo, V. L., Cortes, M. V. C. B., Moraes, A. J. G., & Prabhu, A. S. (2011). Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biological Control, 58*, 160-166.

Fukunaga, K., Misato, T., Ishii, I., & Asakawa, M. (1955). Blasticidin, a new anti-phytopathogenic fungal substance. Part I. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 19*, 181–188. doi: 10.1271/bbb1924.19.181

Gholamalizadeh, R., Khodakaramian, G., & Ebadi, A. A. (2017). Assessment of rice associated bacterial ability to enhance rice seed germination and rice growth promotion. *Brazilian Archives of Biology and Technology, 60*, 1-13.

Gong, M., Li, Y., Dai, X., & Tian, M. (1997). Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of HS induced thermotolerance in maize seeding. *Journal of Plant Physiology, 150*, 615-621.

Hameed, A., & Iqbal, N. (2014). Chemo-priming with mannose, mannitol and H_2O_2 mitigate drought stress in wheat. *Cereal Research Communications, 42*, 450–462.

Hammond Kosack, K. E., & Jones, J. D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell, 8*, 1773.

Hermosa, R., Botell, L., Alonso-Ramirez, A., Arbona, V., Gomez-Cadenas, A., Monte, E., & Nicolas, C. (2011). Biotechnological applications of the gene transfer from the beneficial fungus *Trichoderma harzianum* spp. to plants. *Plant Signaling and Behavior, 6*, 8.

Hayashi, N., Kobayashi, N., Vera Cruz, C. M. & Fukuta, Y. (2009). Protocols for the sampling of diseased specimens and evaluation of blast disease of rice. Japan international research center for agricultural science. *Working Report, 63*, 7-28.

Hokko (2015). Company information and market report of agrochemicals in Japan. Available at: https://www.hokkochem.co.jp/wp-content/uploads/.

IRRI (2002). Standard Evaluation System for rice (SES). International Rice Research Institute (IRRI), Manila, 56 p.

Izadyar, M. (1998). Rice blast disease. Agricultural Research, Education and Extension Organization Publications. (In Farsi with English summary).

Khosravi, V., & Velayi, A. (2017). Management of rice blast disease. Iran Plant Protection Organization, pp.8 (In Farsi).

Krassilnikov, N. A. (1941). Guide to the Nauk, the soil globiforme bacteria. Iowa State S. S. S. R., Moscow, 122 p.

Law, J. W. F., Ser, H. L., Khan, T. M., Chuah, L. H., Pusparajah, P., Chan, K. G., Goh, B, H. and Lee, L. H. (2017). The Potential of *Streptomyces* as Biocontrol Agents against the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). *Frontiers in Microbiology*, *8*, 3. doi: 10.3389/fmicb.2017.00003

Liang, J. G., Tao, R. X., Hao, Zn, Wang, L. P., & Zhang, X. (2011). Induction of resistance in cucumber against seedling damping-off by plant growth- promoting rhizobacteria (PGPR) *Bacillus megaterium* strain L8. *Affrican Journal of Biotechnology, 10*(36), 6920-6927.

Lucas, J. A., García-Cristobal, J., Bonilla, A., Ramos, B. & Gutierrez-Manero, J. (2014). Beneficial rhizobacteria from rice rhizosphere confers high protection against biotic and abiotic stress inducing systemic resistance in rice seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry, 82*,44-53.

Maksimov, I. V., Valeev, A. S., Cherepanova, E. A., & Burkhanova, G. F. (2014). Effect of chitooligosaccharides with different degrees of acetylation on the activity of wheat pathogen-inducible anionic peroxidase. *Apply Biochemistry and Microbiology, 50*, 82–87.

Nguyen, Q. T., Ueda, K., Kihara, J., & Ueno, M. (2016). Induction of resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Biscogniauxia* sp. O821. *Journal of Phytopathology*, *164*(11-12), 990-995. https://doi.org/10.1111/jph.12519.

Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *33*,197-213.

Padasht Dehkaei, F., Mansouri, Sh., Poyoushavi, A., Izadyar, M., & Gharyazi, B. (2002). Selected of bacterial antagonistic of *Pyricularia grisea* from rice fields. *2nd National Biotechnology Congress.* Karaj, pp 491-500. (In Farsi).

Padasht Dehkaei, F., & Izadyar, M. (2007). Study on the biological control of rice blast disease in the field condition. *Journal of Agricultural Sciences Nature Resource, 13*(6), 84-92. (In Farsi with English summary).

Pasha, A., Bagheri, N., Babaeian-Jelodar, N. & Nematzadeh, G. (2017). Evaluation of resistance to *Pyricularia oryzae* in rice genotypes. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 39*(4), 27-36.

Pourabtahi, H., Moghadam, A., & Heydarian, Z. (2018). Beta-Aminobutyric Acid (BABA) effect on induced resistance in tomato-infected bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Cell & Tissue Journal, 9*(3), 196-205.

Reuveni, R. (1995). Biochemical marker of disease resistance. In: Singh, R. P., & Singh, U. S. (Ed.) *Molecular Methods in Plant Pathology*, pp 99-114.
Sharma, A., Shankhdhar, D., Sharma, A., & Shankhdhar, S. C. (2014). Growth promotion of rice genotypes by PGPRs isolated from rice rhizosphere. J*ournal of Soil Science and Plant Nutrition, 14*(2), 505-517.

Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., & Vitti, A. (2015). Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences, 16*(6), 13561–13578.

Spence, C., Alff, E., Johnson, C., Ramos, C., Donofrio, Sundaresan, V. & Bais, H. (2014). Natural rice rhizospheric microbes suppress rice blast infections. *BMC Plant Biology*, *14*, 130 https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-130.

Talbot, N. J. (2003). On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology, 57*, 177–202.

Vidhyasekeran, P., Rabinddran, R., Muthamilan, M., Nayar, K., Rajappan, K., Subramanian, N., & Vasumathi, K. (1997). Development of powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of rice blast. *Plant Pathology, 46*, 291-297.

Wilkinson, S. W., Pastor, V., Paplauskas, S., & Pétriacq, P. (2018). Long-lasting β-aminobutyric acid-induced resistance protects tomato fruit against *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology, 67*(1), 30-34.

Yasmin, S., Zaka, A., Imran, A., Zahid, M. A., Yousaf, S., Rasul, G., Arif, M. & Mirza, M. S., (2016). Plant growth promotion and suppression of bacterial leaf blight in rice by inoculated bacteria. *PloS one, 11*(8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160688.

Zangoei, E., Bazgir, E., Gholamnezhad, J. & Darvishnia, M. (2018). Investigation of the peroxidase and catalase enzymes activity and expression level of its encoding genes in pathogen stress (*Penicillium expansum*) and Walnut green skin extract condition in apple fruits. *Cell & Tissue Journal, 9*(2), 159-175.

Zehnder, G., Murphy, J., Sikora, E., & Kloepper, J. (2001). Application of rhizobacteria for induced resistance. *European Journal of Plant Pathology*, *107*, 39-50.

Zehra, A., Raytekar, N. A., Meena, M., & Swapnil, P. (2021). Efficiency of microbial bio-agents as elicitors in plant defense mechanism under biotic stress: A review. *Current Research in Microbial Sciences*, *2*, 100054.

© 2023 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)

45(4), Winter, 2023

10.22055/ppr.2023.17996

Induction of resistance in rice against *Pyricularia oryzae* by two plant growth promoting rhizobacteria

A. Zakariazadeh[1], F. Shahryari[2*], A. Ebadi [3], M. Khoshkdaman[4]

1. M.Sc. Graduate of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
2. ***Corresponding Author:** Assistant professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran (shahryari@znu.ac.ir)
3. Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
4. Researcher, Department of Plant Protection, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

Received: 16 July 2022 Accepted: 1 January 2023

Abstract

Background and Objectives

Rice blast disease caused by *Pyricularia oryzae* is one of the most important rice diseases worldwide. Given the growing demand for non-toxic and chemical-free products, identification of plant growth-promoting microorganisms that can assist in mitigating challenges to plant growth is very important in sustainable rice cultivation. This study aimed to investigate the effect of two plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) isolates, *Alcaligenes faecalis* strain O1R4 and *Bacillus idriensis* strain MR2, on the induction of resistance-related enzymes such as peroxidase and catalase and on the severity of rice blast in Hashemi and Hassan Sarai cultivars.

Materials and Methods

The roots of the seedlings (cv. Hashemi and Hassan Sarai) were inoculated with a suspension of bacterial isolates (10^6-10^7 CFU/ml) for one hour and planted into pots. The plants were then sprayed in the four-leaf stage with an aqueous spore suspension (2×10^5 spore/ml) until run-off. The inoculated plants were transferred to the greenhouse at 28 °C and 90% relative humidity. Catalase and peroxidase activity in rice leaf extracts from different treatments were assayed one, three, five, and seven days after inoculation with blast fungus using a spectrophotometer. The activity was expressed in U µg–1 protein. The experiment was done in a completely randomized design with eight treatments and three replications for each cultivar. Also, the blast severity was assessed in the leaves of inoculated plants with six replications. The data were analyzed by SAS software (version 9.1) and Tukey's test at 0.05 and 0.01 probability levels.

Results
According to the analyses of variance, there was a significant influence of bacterial inoculation on the activity of peroxidase enzyme on the third, fifth, and seventh days. On the other hand, the activity of catalase enzyme increased on the first day to the seventh day at the 1% probability level. Mean comparison revealed in the treatments consisting of *A. faecalis* + *P. oryzae*, the levels of peroxidase and catalase enzymes were respectively elevated by 97% and 43% in Hashemi cultivar and by 174% and 125% in Hassan-Sarai cultivar compared to the positive control. Also, in the presence of *B. idriensis* + *P. oryzae*, the amount of peroxidase and catalase enzymes were respectively heightened in cv. Hashemi by 69% and 33% and in cv. Hassan-Sarai by 195% and 121% compared to the positive control. In the simultaneous use of two bacterial isolates and *P. oryzae*, the amount of catalase enzyme increased in Hashemi and Hassan-Sarai cultivars by 73% and 166% and the amount of peroxidase enzyme reached 174% and 319% in Hashemi and Hassan-Sarai cultivars, respectively compared to the positive control. Finally, the results showed that the blast severity was reduced using *A. faecalis* strain O1R4 and *B. idriensis* strain MR2 by 37% and 20% in the cultivars respectively.
Discussion
In the present study, peroxidase activity in all treatments consisting of blast fungus was approximately at the same level within 24 hours post-inoculation. Then, the peroxidase level increased and maintained until the seventh day. Further, the catalase activity increased in the presence of the blast fungus and PGPRs. The level of peroxidase activity increased one to three days after inoculation. In comparison, the level of catalase increased within 24 hours after inoculation. The simultaneous use of two bacterial isolates along with pathogenic fungus was more effective than usage of each isolate separately. In general, the results of this research were consistent with previous studies that indicate the bacterial isolates can reduce the blast severity by inducing systemic resistance in rice.

***Keywords**: Alcaligenes faecalis, Bacillus idriensis, Biological control, Rice blast*

Associate editor: M. Mehrabi-Koushki (Ph.D.)

Citation: Zakariazadeh, A., Shahryari, F., Ebadi, A. & Khoshkdaman, M. (2023). Induction of resistance in rice against *Pyricularia oryzae* by two plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 45*(4), 133-147. https://doi.org/10.22055/ppr.2023.17996.