

مقاله تحقیقی

بررسی الگوی بیان ژن‌های دفاعی برنج تیمار شده با نانوذره نقره بیولوژیک در تعامل با *Magnaporthe oryzae*، قارچ عامل بیماری بلاستسمیه نظری^۱، حسین علائی^۱، ولی اله بابایی زاد^۲، علی مومنی^۳

۱- دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، کرمان

۲- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران

۳- موسسه تحقیقات برنج کشور، معاونت مازندران، آمل

مسئول مکاتبات: سمیه نظری، ایمیل: somayehnazarimbs@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۲

۷۰-۴۹(۲)۸۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۰

چکیده

بلاست از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های برنج در دنیا می‌باشد. نانوذرات عوامل ضد میکروبی هستند که به صورت محرک‌های زیستی و غیرزیستی مورد استفاده قرار گرفته و می‌توانند موجب القای مقاومت در گیاه در برابر عوامل بیمارگر شوند. تأثیرات نانوذرات بیولوژیک و غیربیولوژیک مختلف در بازدارندگی بیمارگرهای قارچی مختلف گیاهان از جمله قارچ عامل بیماری بلاست به اثبات رسیده است. اما در مورد تأثیر نانوذره بیولوژیک بر کنترل این بیماری از طریق القاء مقاومت و بیان ژن‌های دفاعی مطالعه‌ای صورت نگرفته است. در این مطالعه، علاوه بر تأثیر مستقیم نانوذره نقره بیولوژیک سنتز شده از قارچ *Trichoderma harzianum* در شرایط آزمایشگاه، تأثیر غیرمستقیم آن از طریق القای مقاومت سیستمیک در رقم حساس طارم محلی بر قارچ بیمارگر *Magnaporthe oryzae* در شرایط گلخانه بررسی شد. بدین منظور، بیان چند ژن مهم دفاعی در گیاه تیمار شده با نانوذره بیولوژیک در مقایسه با گیاهان شاهد (تیمار فاقد نانوذره نقره بیولوژیک) در زمان‌های مختلف پس از تلقیح با بیمارگر با روش Real-time qPCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی مستقیم حاکی از تأثیر مثبت غلظت‌های مختلف نانوذره بیولوژیک در کاهش رشد بیمارگر در مقایسه با تیمار شاهد بود، به طوری که میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر در غلظت‌های ۴/۵، ۹، ۱۸، ۲۷ و ۳۶ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با تیمار شاهد به ترتیب ۷، ۲۸، ۵۶، ۸۱ و ۹۲ درصد بود. بررسی فنوتیپی برهمکنش گیاه برنج و قارچ عامل بیماری بلاست در حضور نانوذره بیولوژیک نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک در مقایسه با گیاهان شاهد وجود ندارد. همچنین تجمع ترانوشت ژن‌های NPR1، PR2، PR3 و LOX بین دو تیمار مذکور، افزایش قابل ملاحظه و معنی‌داری را نشان نداد. بنابراین، تأثیر غیرمستقیم نانوذره نقره بیولوژیک سنتز شده بر بیمارگر از طریق القاء مقاومت و افزایش بیان ژن‌های دفاعی گیاه برنج قابل توجه نمی‌باشد.

واژه‌های کلیدی: القاگر، بیمارگر، ژن‌های PR، مقاومت القایی، نیترا نقره، تریکودرما

مقدمه

افزایش می‌باشد (Lin et al., 1995; Singh et al., 2012) بیمارگرهای گیاهی از مهم‌ترین تنش‌های زیستی هستند که حیات گیاهان را تهدید نموده (Singh et al., 2012) و بیماری‌های ناشی از آنها از مهم‌ترین عوامل اتلاف محصولات کشاورزی محسوب می‌شوند (Agrios, 2005).

برنج (*Oryza sativa* L.) از مهم‌ترین گیاهان زراعی دنیا می‌باشد که سطح وسیعی از اراضی زراعی قابل کشت را به خود اختصاص داده و با توجه به افزایش رشد جمعیت، میزان مصرف آن به‌عنوان دومین غله پرمصرف جهان رو به

عوارض جانبی ناشی از روش‌های فیزیکی و شیمیایی سنتز نانوذرات، بسیاری از محققان به دنبال روش‌های سنتز بیولوژیکی آن هستند. پروتکل‌های سنتز بیولوژیکی شامل انواع زیادی از عوامل بیولوژیکی اند که می‌توانند برای سنتز نانوذرات فلزی استفاده شوند. از میان عوامل بیولوژیکی، میکروارگانسیم‌هایی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و اکتینومیست‌ها به‌طور عمده‌تری استفاده می‌شوند (Rai et al., 2013). قارچ‌ها به‌دلیل تولید مقادیر زیاد آنزیم‌های خارج سلولی که برای سنتز بیولوژیک نانوذرات فلزی نیاز است و این که به‌راحتی قابل کشت و جداسازی هستند، نسبت به باکتری‌ها و موجودات تک سلولی کارآمدتر شده‌اند (Mandal et al., 2006). در بین قارچ‌های غیر بیماری‌زا که برای بیوسنتز نانوذرات فلزی استفاده می‌شود، گونه‌های *Trichoderma* spp. برای محیط زیست بی‌خطر بوده و توانایی بیوسنتز خارج سلولی نانوذرات را در مقیاس بالایی دارند (Vahabi et al., 2014). *Trichoderma* مشهورترین و مؤثرترین جنس قارچی در زمینه کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی است. چندین گونه از جنس *Trichoderma*، عوامل کنترل زیستی مؤثری هستند که فعالیت آنتاگونیستی آن‌ها علاوه بر واکنش مایکوپارازیتی مستقیم، شامل پاسخ دفاعی سیستمیک می‌شود که توسط کلونیزاسیون ریشه در گیاه القاء می‌شود (Harman et al., 2004). در بین نانوذرات نیز نانوذرات نقره محبوب‌ترین آن‌ها از لحاظ خاصیت ضد میکروبی بوده و پتانسیل کنترل بیمارگرهای قارچی گیاهی را دارا می‌باشند (Mahdizadeh et al., 2015). با توجه به مزایای استفاده از نانومولکول‌ها، بدون شک وجود آفت‌کش‌های زیستی بر پایه نانوذرات بیوسنتز شده می‌تواند انقلابی در بخش کشاورزی باشد (Mishra & Singh, 2015). نتایج نشان داد که نانوذره نقره و نانوذره نقره-سیلیکای غیربیولوژیک بر کاهش و جلوگیری از رشد میسلیم قارچ عامل بیماری بلاست برنج در شرایط آزمایشگاهی مؤثر می‌باشد (Akter, 2019; Elamawi & El-Shafey, 2013; Park et al., 2006). Jo et al. (2009) نیز کاهش تشکیل اسپورهای قارچ *M. oryzae* در محیط کشت حاوی نانوذره نقره غیر-

محصول برنج نیز از این قاعده مستثنی نبوده و تولید آن همواره با تنش‌های مختلف زنده و غیر زنده همراه می‌باشد. در این میان، بیماری بلاست برنج که توسط قارچ *Magnaporthe oryzae* Couch ایجاد می‌شود، از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های قارچی در طول دوره رشدی گیاه برنج می‌باشد که تأثیر منفی قابل توجهی بر روی تولید برنج در جهان دارد، به‌طوری که کاهش محصول ناشی از آن در ارقام حساس می‌تواند به بیش از ۶۵ درصد برسد (Singh et al., 2012). در ایران، بیماری از سال‌ها قبل در استان‌های مازندران و گیلان وجود داشته است و از نظر گسترش و میزان خسارت وارده، نخستین بیماری برنج محسوب شده و تحت شرایط مطلوب برای بیمارگر و توسعه بیماری، خسارت قابل توجهی را به ارقام محلی برنج وارد می‌کند (Padasht Dehkaei & Izadyar, 2007). بیمارگر، برنج را در تمام مراحل توسعه‌ای آلوده نموده و موجب نشانه‌های بلاست برگ، طوقه، گردن و خوشه می‌شود (Howard & Valent, 1996). با کنترل عوامل بیماری‌زا و در نتیجه کاهش خسارت ناشی از آن‌ها می‌توان علاوه بر افزایش عملکرد، کیفیت محصولات تولیدی را نیز ارتقا داد (Agrios, 2005). آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه سموم شیمیایی جهت کنترل بیماری‌ها، ظهور نژادهای مقاوم به قارچ‌کش‌ها و کاهش تحمل بسیاری از ارقام مقاوم در نتیجه شکست مقاومت در مواجهه با تنوع بالای جمعیت بیمارگر، سبب ارایه روش‌های جدید و متفاوت جهت مقابله با بیمارگرها شده است (Song & Goodman, 2001; Grover & Gowthaman, 2003). گیاهان قادرند سطح مقاومت پایه‌شان (basal resistance) را در برابر حمله بیمارگر از طریق پدیده‌ای به نام مقاومت القایی که می‌تواند از طریق محرک‌های زیستی و غیرزیستی حاصل شود، افزایش دهند. نانوذرات از جمله عوامل ضد میکروبی محسوب می‌شوند که به‌صورت محرک‌های زیستی و غیرزیستی مورد استفاده قرار گرفته و می‌توانند موجب القاء مقاومت در گیاه در برابر عوامل بیمارگر شوند (Imada et al., 2016; Anusuya & Sathiyabama, 2015). با توجه به رشد نگرانی‌های زیست محیطی و

تولید اسپور قارچ *M. oryzae* و همچنین موجب تولید فیتوآلکسین‌ها در گیاه برنج و محافظت از آن در برابر بیماری بلاست برنج گردید (Song et al., 2020). کاربرد نانوذرات نقره بیولوژیک حاصل از جدایه‌های مختلف قارچ *Trichoderma*، به تنهایی و یا همراه با جدایه قارچی موجب القای مقاومت و افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز (POD)، فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) و پلی فنل اکسیداز (PPO) و کاهش شدت بیماری پوسیدگی ریشه خیار ناشی از قارچ *F. oxysporum* گردید (Zare, 2017). تیمار نانوذره بیولوژیک سنتز شده از قارچ *Pythium aphanidermatum* Fitzp. (Edson) سبب القای آنزیم‌های دفاعی و مقاومت در برابر عامل پوسیدگی ریزوم زردچوبه شد (Anusuya & Sathiyabama, 2015). تیمار ریشه گوجه فرنگی با نانوذره غیربیولوژیک اکسید منیزیم موجب افزایش بیان ژن‌های PR1، Pathogenesis related gene (1) القاء شده با سالیسیلیک اسید (Salicylic acid-inducible PR1)، لپوکسی ژناز آ (LoxA) القاء شده با جاسمونیک اسید (jasmonic acid-inducible LoxA) و بتا-۱ و ۳ گلوکاناز در ریشه و طوقه و القاء مقاومت سیستمیک در برابر باکتری *Ralstonia solanacearum* Smith عامل بیماری پژمردگی باکتریایی گوجه فرنگی شد (Imada et al., 2016). در این تحقیق، تأثیر غیرمستقیم نانوذره بیولوژیک بر بیماری بلاست برنج از طریق القای مقاومت گیاه میزبان در مقابل بیماری بررسی شد و تعیین میزان بیان تعدادی از ژن‌های دخیل در مقاومت به بیماری از قبیل NPR1 (Nonexpressor of pathogenesis related genes 1)، PR2، PR3 و LOX با استفاده از روش Real-time qPCR در شرایط *in vivo* (گلخانه) و تأثیر مستقیم آن از طریق ارزیابی بازدارندگی رشد کلنی قارچ بیمارگر در شرایط *in vitro* (درون پتری‌دیش) مورد مطالعه قرار گرفت. ژن NPR1 جزء اولین ژن‌هایی است که در برابر تنش‌های مختلف (حمله بیمارگر و غیره) در گیاه بیان شده و افزایش بیان آن در افزایش بیان دیگر ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR genes = Pathogenesis related genes) نقش دارد. ژن NPR1 واسطه اثر متقابل سالیسیلیک اسید-جاسمونیک

بیولوژیک را گزارش نمودند. همچنین تیمار این نانوذره قبل از تلقیح قارچ مذکور، سبب کاهش شدت بیماری لکه برگی خاکستری در چمن ترغراس (turfgrass) شد (Jo et al., 2009). نانوذره غیر بیولوژیک کیتوزان نیز بر روی رشد قارچ *M. oryzae* تأثیر گذاشته و ترکیب آن با غلظت-های مختلف اسید پروتوکاتکویک (protocatechuic acid) سبب افزایش بیشتر قطر ناحیه بازدارندگی (zone of inhibition) نسبت به نانوکیتوزان تنها شد (Pham et al., 2019). نانوذره نقره غیر بیولوژیک موجب کاهش تولید سختینه (اسکلروت) و کاهش رشد میسلیم قارچ *Rhizoctonia solani* Kühn عامل سوختگی غلاف برنج در شرایط آزمایشگاهی و کاهش شدت بیماری در شرایط گلخانه گردید (Soltani Nejad et al., 2017). نانوذره نقره بیولوژیک سنتز شده از قارچ *Trichoderma viride* موجب بازدارندگی رشد قارچ *R. solani* گردید (Motalebi et al., 2016). نانوذره بیولوژیک سنتز شده از قارچ *Trichoderma harzianum* پژمردگی فوزاریومی لفل (*Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici*) را کنترل (Al Abboud, 2018) و از رشد میسلیم و تشکیل سختینه جدید قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* Lib. (de Bary) عامل کپک سفید سویا (جلوگیری نمود (Guilger et al., 2017). در تحقیقی دیگر نیز نانوذرات نقره بیولوژیک سنتز شده از گونه‌های مختلف *Trichoderma* موجب جلوگیری از رشد قارچ، تشکیل و جوانه‌زنی سختینه در قارچ *S. sclerotiorum* شد (Tomah et al., 2020). نانوذره نقره بیولوژیک سنتز شده از قارچ *Trichoderma longibrachiatum* Rifai تقریباً ۱۰۰ درصد از تشکیل کلنی قارچ *M. oryzae* در محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA=potatoto dextrose agar) جلوگیری نمود (Elamawi et al., 2018). Song همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند نانوذره بیولوژیک تولید شده از قارچ *Chaetomium elatum* Kunze در جلوگیری از رشد میسلیم و تولید اسپور قارچ *M. oryzae* مؤثر می‌باشد (Song et al., 2018). نانو ذرات بیولوژیک تولید شده توسط گونه‌های مختلف *Chaetomium* موجب کاهش

کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه گردید و در نهایت تنها یک جدایه (C.P.K 4499) برای سنتز نانوذره بیولوژیک انتخاب شد. سنتز نانوذره بیولوژیک از قارچ *Trichoderma*، طبق روش دوی و همکاران (Devi *et al.*, 2013) با اندکی تغییرات انجام شد. ابتدا پنج عدد بلوک میسلیمی پنج میلی‌متری از حاشیه کشت جوان پرگنه قارچ برداشته و به فلاسک ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع سیب زمینی دکستروز برات (potato broth dextrose) منتقل شد. سپس نمونه‌ها به مدت چهار روز درون شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. زیست توده حاصل سه مرتبه با آب دیونیزه سترون بخوبی شستشو شده و سپس با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون مخلوط و به مدت سه روز درون شیکر انکوباتور با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. سوسپانسیون از کاغذ فیلتر واتمن شماره ۱ عبور داده شده و عصاره بدست آمده با ۵۰ میلی-لیتر محلول نیترات نقره یک میلی‌مولار ترکیب شد و به مدت پنج روز در شرایط تاریکی قرار گرفت تا واکنش انجام شده و نانوذره نقره بیولوژیک سنتز گردد. برای مانیتور کردن کاهش یون نقره (Ag⁺) به نانوذره نقره و تعیین ویژگی‌های نوری (optical characteristics) نانوذرات در محلول نیترات نقره یک میلی‌مولار، نمونه‌ها در دستگاه طیف سنج مرئی-فرابنفش (UV-Vis Spectrophotometer) در محدوده طول موج ۸۰۰-۳۰۰ نانومتر اسکن و نمودارهای طیف جذبی رسم شد. اندازه و مشخصات ساختاری نانوذره نقره بیولوژیک سنتز شده، از طریق میکروسکوپ الکترونی روشی (SEM= Scanning Electron Microscopy) تعیین شد. برای اندازه‌گیری غلظت نانوذره سنتز شده، نمونه‌ها به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم کشاورزی ساری و منابع طبیعی فرستاده و با استفاده از دستگاه نشر اتمی پلاسما می‌میکروویو (MP-AES) تعیین غلظت شد.

تیمار گیاهچه‌های برنج با نانوذره بیولوژیک و تلقیح توسط بیمارگر

اسید و تنظیم‌کننده مسیره‌های پیام‌رسان مقاومت اکتسابی سیستمیک SAR (Systemic acquired resistance) و مقاومت سیستمیک القایی (ISR، Induced systemic resistance) می‌باشد. ژن‌های PR2 و PR3 به ترتیب با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید و همچنین از طریق بیمارگرها و محرک‌های مختلف در گیاه القاء می‌شوند و در مقاومت گیاه در برابر بیمارگرها نقش دارند. آنزیم‌های بتا-۳ و گلوکاناز و کیتیناز (Class I basic chitinase) به ترتیب در نتیجه بیان این ژن‌ها در گیاه تولید می‌شوند (Dong *et al.*, 1998; Reymond & Farmer, 1998; Pieterse *et al.*, 2014; Edreva, 2005; Golshani *et al.*, 2015). PRها به‌عنوان مارکرهای SAR شناخته می‌شوند. عدم ایفای نقش PRها در ISR، بیانگر تنوع استراتژی‌های دفاعی گیاه بوده و نشان می‌دهد که PRها فقط یکی از چندین ابزار دفاعی گیاه می‌باشد (Edreva, 2005). قارچ *M. oryzae* همی‌بیوتروف می‌باشد. در بیمارگرهایی که همی‌بیوتروف بوده و دارای چرخه بیوتروفی و در ادامه نکروتروفی می‌باشند، دفاع‌های تنظیم شده با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید-تیلن در مقاومت پایه در برابر بیمارگر مشارکت دارند (Van Loon *et al.*, 2006).

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جدایه قارچ بیمارگر

در این تحقیق بذر برنج طارم محلی، به‌عنوان رقم حساس به بیماری بلاست، از بخش تحقیقات اصلاح و تهیه بذر مؤسسه تحقیقات برنج کشور-معاونت مازندران (آمل) و جدایه KBH قارچ *M. oryzae* با درجه بیماری‌زایی بالا جهت تلقیح گیاهچه‌ها از بخش تحقیقات گیاهپزشکی این مؤسسه تهیه و مورد استفاده قرار گرفت (Khosravi, 2006).

بیوسنتز و تعیین مشخصات نانوذره نقره بیولوژیک

جهت سنتز بیولوژیک نانوذره نقره، تعداد هشت جدایه قارچ *Trichoderma* متعلق به گونه *T. harzianum* s. l. (جداشده از خاک مزارع برنج استان مازندران در ۱۳۸۵) از کلکسیون آزمایشگاه قارچ‌شناسی بخش بیماری‌شناسی پردیس

به‌منظور استخراج RNA از کیت RNX™ Plus شرکت سیناژن (Cat. No: RN77BC) استفاده گردید. برگ‌ها با ازت مایع در هاون سترون، پودر شده و RNA کل مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده، توسط الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد ارزیابی و به‌منظور حذف آلودگی‌های احتمالی DNA از RNA استخراج شده، از کیت RNase-free DNaseI شرکت فرمنتاز (Fermentas, Cat. No: EN0525) استفاده شد. cDNA مربوط به هر نمونه با استفاده از کیت Revert Aid™ first strand cDNA Synthesis شرکت فرمنتاز، ساخته شد. بدین منظور از آغازگر الیگومر تیمیدین (oligodT) و آنزیم Reverse Transcriptase استفاده گردید و تمامی مراحل طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت. صحت عملکرد نمونه‌های cDNA سنتز شده با استفاده از RT-PCR و آغازگر GAPDH، بر اساس ژن خانه‌داری (Housekeeping gene) بررسی و ارزیابی محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد انجام شد.

واکنش Real time PCR و محاسبه سطح بیان ژن‌ها

سطح بیان ژن‌های مورد مطالعه با روش Quantitative real-time PCR و استفاده از دستگاه-StepOnePlus Real-time PCR شرکت Applied biosystems و طبق دستورالعمل کیت Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (شرکت فرمنتاز، Cat. No: K0221) بررسی شد. نمونه DNA سنتز شده برای انجام تمام واکنش‌ها در حجم ۱:۴ رقیق شد. هر واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر و شامل ۷/۵ میکرولیتر مخلوط سایبرگرین، ۴/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، ۱۰ میکرومولار از هر آغازگر رفت (Forward primer) و برگشت (Reverse primer) و یک میکرولیتر از cDNA الگوی رقیق شده بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه شامل مرحله واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه و مرحله اتصال آغازگرها در ۶۰ درجه سلسیوس

بدور رقم طارم محلی پس از ضدعفونی، جوانه‌زنی و تولید ریشه‌چه و ساقه‌چه، به گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک سترون شده شالیزار منتقل شده و در شرایط گلخانه با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد نگهداری شدند. گیاهچه‌ها چهار هفته پس از کاشت در گلدان، از طریق افشانه‌پاشی سوسپانسیون اسپور قارچ عامل بیماری (غلظت ۱۰^۵ اسپور در میلی‌لیتر) بر روی برگ‌های بالایی گیاه، تلقیح شدند. ۲۴ ساعت قبل از تلقیح بیمارگر، گیاهچه‌ها در رطوبت نسبی بالا (> ۹۰) قرار گرفتند. تیمارهای مورد بررسی شامل تیمار نانوذره نقره بیولوژیک و تیمار شاهد (فقط بیمارگر) بود. در تیمار نانوذره نقره بیولوژیک، ۴۸ ساعت قبل از تلقیح بیمارگر (Sena *et al.*, 2013)، محلول نانوذره بیولوژیک به‌صورت افشانه‌پاشی برگ‌ها بر روی برگ‌های پایینی گیاهچه‌ها تلقیح شد. نمونه‌برداری در بازه‌های زمانی صفر (قبل از تلقیح بیمارگر)، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح بیمارگر و از برگ‌های بالایی (اول و دوم) گیاهچه‌ها صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله در ازت مایع قرار گرفتند و تا شروع کارهای مولکولی در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

توسعه بیماری

برای بررسی توسعه بیماری بلاست روی برگ‌های گیاهچه، شاخص شدت بیماری با معیار صفر تا نه بر اساس سیستم ارزیابی استاندارد (Standard Evaluation System) مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (IRRI, 2013) مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌های حاصل با استفاده از آزمون t و در نرم‌افزار SAS نسخه ۹.۱ (Soltani & Torabi, 2014) انجام شد.

بیان ژن‌های دفاعی گیاه

استخراج RNA و ساخت cDNA

در این بررسی ژن GAPDH به‌عنوان ژن خانه‌داری و ژن‌های NPR1، PR2، PR3 و LOX به‌عنوان ژن‌های هدف مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

ژن هدف (CT) = کالیبراتور CT - نمونه CT =
ژن خانه-CT-ژن هدف (CT) - نمونه (ژن خانه‌داری CT کالیبراتور (داری

به‌مدت یک دقیقه بود. به‌منظور استاندارد نمودن داده‌ها، نمونه‌ها بوسیله ژن خانه‌داری نرمال گردیدند. در ادامه، با داده‌های چرخه آستانه (ct) حاصل از دستگاه Real time، میزان بیان هر ژن در ساعات مختلف نمونه‌برداری مطابق با روش لیواک و همکاران (Livak & Schmittgen, 2001) و بر اساس فرمول 2^{-Ct} محاسبه شد. میزان بیان قبل از تلقیح قارچ به‌عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد.

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای استفاده شده

Table 1. Nucleotide sequence of primers used in this study

Primer	Accession number	Sequence	Reference
OsGAPDH	AK064960	5'-AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT-3' 5'-CGTAAACCCAGAATACCCCTTGAGTTT-3'	Jain <i>et al.</i> , 2018
OsNPR1	DQ450947	5'-AGTTGCTTTGGCGAGGATTATG-3' 5'-TGTCTTTCAGGAGGTGGATTG-3'	The present study
OsPR2	AK070677	5'-AAGATTGTTCTGAGAAGAGATCGATCGA-3' 5'-GCTACGCGAAAATAGGTCTGGTAAACTT-3'	Heidarinejad <i>et al.</i> , 2015
OsPR3	D16221	5'-TACTGTGTCCAGAGCTCGCAGTGG-3' 5'-TCTGGTTGTAGCAGTCCAAGTTGG-3'	Sayari <i>et al.</i> , 2014
OsLOX	XM-015795231	5'-GGTGGAGCCATACATCATCG-3' 5'-GTTGATCCGCATCGTGTAGC-3'	The present study

(2014) و مقایسه میانگین به روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) انجام شد.

درصد جلوگیری از رشد = $100 \times \frac{(\text{رشد شعاعی نمونه} - \text{رشد شعاعی شاهد})}{\text{رشد شعاعی شاهد}}$

نتایج و بحث

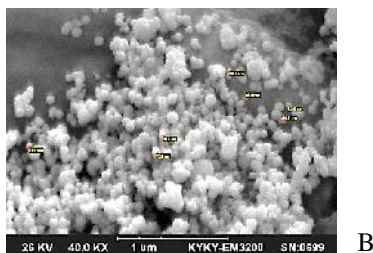
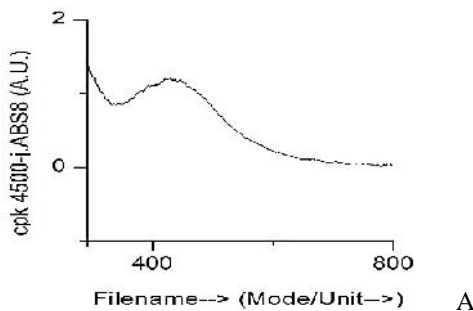
سنتر نانوذره نقره بیولوژیک

زمانی که عصاره قارچ *T. harzianum* (جدایه C.P.K.4499) به محلول نیترات نقره یک میلی‌مولار اضافه شد، رنگ محلول در شرایط تاریکی و نگهداری در دمای اتاق به قهوه‌ای تغییر پیدا کرد، در حالی که در نمونه‌های شاهد منفی (محلول نیترات نقره خالص) و شاهد مثبت (فقط عصاره قارچی) هیچ‌گونه تغییر رنگی مشاهده نشد (شکل ۱). ظهور رنگ قهوه‌ای، نشان دهنده تشکیل نانوذرات نقره در نتیجه برانگیختگی رزونانس پلاسمون سطح (SPR): نوسانات گروهی و بهم پیوسته الکترون‌های سطح) نانوذرات نقره

ارزیابی فعالیت ضدقارچی نانوذره نقره بیولوژیک علیه قارچ *M. oryzae*

برای ارزیابی فعالیت ضدقارچی نانوذره بیولوژیک و تعیین درصد کاهش رشد قارچ بیمارگر، بلوک‌هایی (قطر ۸ میلی‌متر) از حاشیه پرگنه جوان و در حال رشد قارچ بیمارگر برداشته و به مرکز پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت PDA که با غلظت‌های مختلف نانوذره بیولوژیک (۴/۵، ۹، ۱۸، ۲۷ و ۳۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) اصلاح شده بود، منتقل شد. تیمار شاهد شامل محیط کشت فاقد نانوذره بیولوژیک بود. پتری‌دیش‌ها به‌مدت ۱۰ روز در دمای ۲۷ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. رشد شعاعی کلنی قارچ پس از ۲، ۳، ۵، ۸ و ۱۱ (پرشدن پتری‌دیش شاهد) روز ثبت و درصد جلوگیری از رشد (Growth inhibition) طبق معادله زیر محاسبه شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار، آنالیز واریانس با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹.۱، (Soltani & Torabi,

الکترون‌های آزاد می‌باشد. تحریک (برانگیختگی) جمعی الکترون‌ها نزدیک سطح نانوذرات موجب رزونانس پلاسمای سطح شده که توسط دستگاه اسپکتروسکوپی مرئی-فرابنفش ثبت می‌شود. ارتعاش الکترون‌ها و در نتیجه طیف SPR نانوذرات به واسطه اندازه، شکل، تعاملات بین ذرات، چگالی الکترون آزاد و محیط اطراف تحت تأثیر قرار می‌گیرد، در نتیجه نانوذرات فلزی مختلف طیف جذبی مشخصی در ناحیه مرئی-فرابنفش دارند. به منظور تعیین اندازه و شکل نانوذره بیولوژیک سنتز شده، از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. نتایج حاصل از این دستگاه با دستگاه طیف سنجی مرئی-فرابنفش مطابقت داشته و میکروگراف SEM نشان داد که قطر نانوذرات نقره بیولوژیک سنتز شده کمتر از ۱۰۰ نانومتر، کروی شکل و به صورت همگن می‌باشد (شکل ۲-۱). غلظت نانونقره سنتز شده با دستگاه MP-AES، ۴۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شده که در آزمایشات گلخانه و درون پتری‌دیش مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۲-۱: نمودار طیف جذب مرئی-فرابنفش نانوذره نقره بیولوژیک سنتز شده؛ B: تصویر نانوذرات نقره بیولوژیک سنتز شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی

Fig. 2. A: UV-Visible absorption spectrum graph of synthesized silver nanoparticles; B: picture of synthesized silver nanoparticles by scanning electron microscopy

می‌باشد (Saha *et al.*, 2010; Devi *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2013)



شکل ۱- A، B و C به ترتیب: شاهد منفی (محلول نترات نقره)، شاهد مثبت (عصاره قارچی)، ترکیب عصاره قارچی با محلول نترات نقره بعد از پنج روز نگهداری در شرایط تاریکی

Fig. 1. A, B and C, respectively: negative control (silver nitrate solution), positive control (fungal extract), combination of fungal extract with silver nitrate solution after five days incubation at darkness condition

تعیین مشخصات نانوذره نقره بیولوژیک

دستگاه اسپکتروفتومتر جذب مرئی-بنفش، بیشترین طیف جذبی نانوذرات نقره بیولوژیک سنتز شده را در طول موج ۳۹۰ تا ۴۵۰ نانومتر با حداکثر جذب ۴۲۰ نانومتر نشان داد (شکل ۲-۱) که با طیف جذبی نانوذرات نقره کروی شکل مطابقت دارد (Abdelmalek & Salaheldin, 2016). مطالعات انجام شده طیف جذبی نانوذرات نقره بیولوژیک کروی را ۴۲۰ تا ۴۵۰ نانومتر (Shelar & Chavan, 2015) و ۳۹۰ تا ۴۲۰ نانومتر (Mishra *et al.*, 2014) بیان کردند. پیک جذب ۴۲۰ نانومتر که بر اثر رزونانس پلاسمون سطح نانوذرات نقره در محلول بوجود آید (Saha *et al.*, 2010) شاخص نانوذرات فلزی از جمله نقره با اندازه‌ی ۱۰۰-۲۰۰ نانومتر می‌باشد (Ali *et al.*, 2015). اسپکتروسکوپی مرئی فرابنفش (UV-visible spectroscopy) از مفیدترین و محبوب‌ترین روش‌ها برای تعیین تشکیل نانوذرات نقره و بررسی خصوصیات و ویژگی‌های ساختاری آن می‌باشد (Roy *et al.*, 2013). سطح فلز شبیه به پلاسمای بوده و دارای

در کل، بین غلظت‌های مختلف نانوذره بیولوژیک در جلوگیری از رشد قارچ عامل بیماری بلاست، تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول ۳). در گروه‌بندی که از طریق مقایسه میانگین به روش LSD صورت گرفت هر کدام از تیمارها (غلظت‌های مختلف بیولوژیک) در یک گروه جداگانه قرار گرفتند (جدول ۴).

جدول ۲- بازدارندگی رشد قارچ *M. oryzae* با غلظت‌های مختلف نانوذره بیولوژیک

Table 2. Growth inhibition of *M. oryzae* fungus with different concentration of silver nanoparticle

Nanosilver concentration ($\mu\text{g/ml}$)	4.5	9	18	27	36
Growth inhibition (%)	7	28	56	81	92

جدول ۳- تجزیه واریانس درصد جلوگیری از رشد در تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف نانوذره بیولوژیک و تیمار شاهد (فاقد نانوذره بیولوژیک) پس از تلقیح با قارچ *M. oryzae*

Table 3. Analysis of variance for percentage of growth inhibition at different concentrations of silver nanoparticle and control treatment after inoculation with *M. oryzae* fungus

Source of variance	Mean square	
	Growth inhibition (%)	DF
Treatment	4443.08	5
Error	5.5007	12
Coefficient of Variance (%)	5.32	

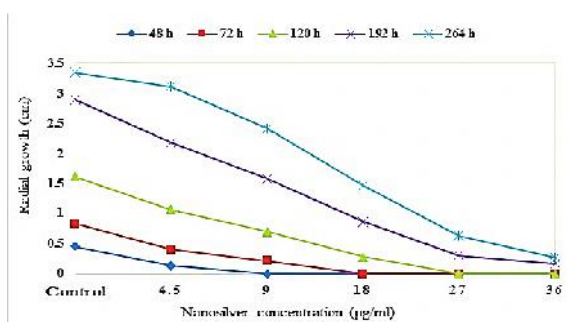
: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

** : Significant at 1% probability level ($P = 0.01$)

ارزیابی فعالیت ضدقارچی نانوذره نقره بیولوژیک

تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره نقره بیولوژیک بر رشد و جلوگیری از رشد قارچ بیمارگر

بر اساس نتایج بدست آمده، میزان رشد قارچ بیمارگر با غلظت نانوذره بیولوژیک رابطه معکوس داشته، طوری که با افزایش غلظت نانوذره، روند نزولی در رشد مشاهده شده است. در غلظت‌های ۲۷ و ۳۶ میکروگرم در میلی‌لیتر، تا پنج روز پس از تلقیح قارچ، هیچ رشدی مشاهده نشده است. در غلظت ۱۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بعد از گذشت سه روز، قارچ کمی شروع به رشد کرد که این امر برای غلظت ۹ میکروگرم در میلی‌لیتر در روز سوم اتفاق افتاد. در مورد کم‌ترین غلظت، قارچ روز دوم پس از تلقیح شروع به رشد کرد که از نظر سرعت رشد تفاوت زیادی با تیمار شاهد نداشت (شکل ۳).

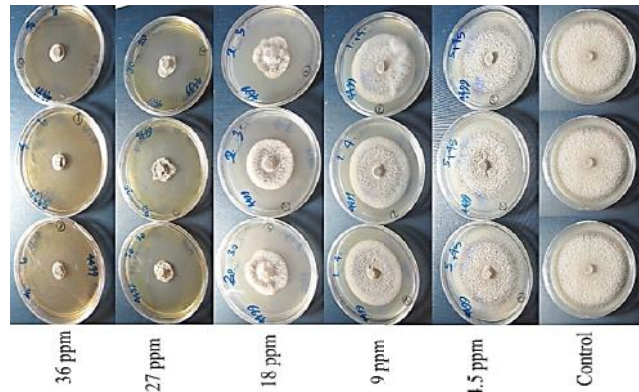


شکل ۳- رشد قارچ *M. oryzae* در طول زمان با غلظت‌های مختلف نانوذره بیولوژیک

Fig. 3. Growth of *M. oryzae* fungus during the time with different concentration of silver nanoparticle

تأثیر بازدارندگی نانوذره بیولوژیک در غلظت‌های مختلف در شکل ۴ نشان داده شده است. درصد جلوگیری از رشد قارچ بیمارگر با غلظت نانوذره بیولوژیک رابطه مستقیم داشته و کم‌ترین درصد جلوگیری از رشد در غلظت ۴/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده (حدود هفت درصد)، در صورتی که برای غلظت‌های ۹، ۱۸، ۲۷ و ۳۶ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۲۸، ۵۶، ۸۱ و ۹۲ درصد ثبت شده است (جدول ۲).

میلی لیتر بیشتر از ۵۰ درصد جلوگیری از رشد مشاهده شد. جلوگیری از رشد هیف و تشکیل کلنی جدید قارچ *M. oryzae* با غلظت‌های مختلف نانوذره بیولوژیک (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) نسبت به تیمار شاهد (فاقد نانوذره بیولوژیک) در شرایط آزمایشگاهی توسط (Elamawi و El-Shafey (۲۰۱۳) گزارش شد (Elamawi & El-Shafey, 2013). Jo و همکاران (۲۰۰۹) نیز کاهش تشکیل اسپورهای پخش شده قارچ *M. oryzae* در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نانوذره نقره غیر بیولوژیک (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) را گزارش نمودند (Jo et al., 2009). اگرچه Park و همکاران (۲۰۰۶) گزارش نمودند با تولید نانوذره غیر بیولوژیک نقره-سیلیکا رشد قارچ *M. oryzae* در غلظت‌های کمتر نانوذره (۳، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) کاهش یافت، به طوری که در غلظت ۳ میکروگرم در میلی لیتر، ۲۷ درصد و در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر، ۱۰۰ درصد از رشد قارچ جلوگیری شد (Park et al., 2006). نانوذره غیر بیولوژیک کیتوزان نیز بر روی رشد قارچ *M. oryzae* تأثیر گذاشته و ترکیب آن با غلظت‌های مختلف اسید پروتوکاتکویک سبب افزایش بیشتر قطر ناحیه بازدارندگی نسبت به نانوکیتوزان تنها شد (Pham et al., 2019). تحقیقات صورت گرفته در مورد تأثیر نانوذرات بیولوژیک بر رشد قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی نیز نشان از تأثیر مثبت این نانو-ذرات بر جلوگیری از رشد آن‌ها دارد. Elamawi و همکاران (۲۰۱۸) تأثیر نانوذره نقره بیولوژیک (سنتز شده از قارچ *T. longibrachiatum*) را بر روی قارچ *M. oryzae* مطالعه کردند. سوسپانسیون اسپور قارچ به مدت ۲۴ ساعت با محلول ۰/۵ میلی مولار نانوذره بیولوژیک مخلوط و سپس بر روی محیط کشت PDA پخش شد. شمارش تعداد کلنی‌های تشکیل شده بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داد که در تیمار نانوذره بیولوژیک، ۹۸/۹ درصد از تشکیل کلنی قارچ جلوگیری شد، در حالی که در تیمار شاهد (محلول یک میلی مولار نیترات نقره)، ۸۱/۵ درصد جلوگیری از تشکیل کلنی ثبت شد (Elamawi et al., 2018). رشد میسلوم و تشکیل سختینه جدید قارچ *S. Sclerotiorum*



شکل ۴- بازدارندگی قارچ *M. oryzae* با غلظت‌های مختلف نانوذره بیولوژیک

Fig. 4. Inhibition of *M. oryzae* fungus with different concentrations of silver nanoparticle

جدول ۴- مقایسه میانگین درصد جلوگیری از رشد در تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف نانوذره نقره بیولوژیک و تیمار شاهد پس از تلقیح با قارچ *M. oryzae*

Table 4. Means comparisons for growth inhibition percentage at different concentrations of silver nanoparticle and control treatment after inoculation with *M. oryzae* fungus

Treatment (ppm)	Growth inhibition (%)
Control	0.00 ^f
4.5	6.97 ^e
9	27.86 ^d
18	56.39 ^c
27	81.09 ^b
36	92.04 ^a

حروف غیرمشابه، بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد
Different letters means there is significant difference

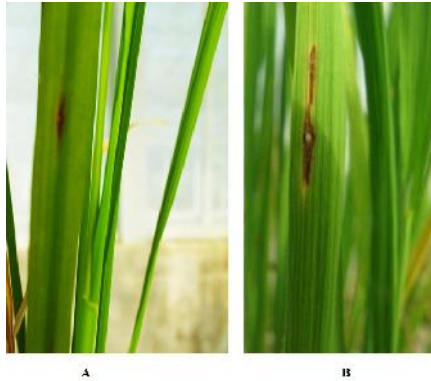
بر اساس نتایج این پژوهش، بین غلظت‌های مختلف نانوذره بیولوژیک در جلوگیری از رشد قارچ *M. oryzae* نسبت به تیمار شاهد تفاوت‌های معنی‌داری وجود داشت. برای غلظت‌های ۴/۵ و ۹ میکروگرم در میلی لیتر کمتر از ۵۰ درصد و برای غلظت‌های ۱۸، ۲۷ و ۳۶ میکروگرم در

مرگ درختان بلوط، مطالعه کردند. رشد قارچ در حضور نانوذرات نقره در غلظت‌های مختلف به‌طور معنی‌داری جلوگیری شد. آن‌ها همچنین تأثیر ترکیب فرم‌های مختلف نانوذرات غیربیولوژیک را بررسی نمودند. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که نانوذرات نقره غیربیولوژیک نه تنها بر روی میسلیم، بلکه بر روی جوانه‌زنی اسپور نیز تأثیرات مخرب دارد (Kim et al., 2009). آن‌ها همچنین تأثیر سه فرم مختلف نانوذره نقره غیربیولوژیک را در غلظت‌های مختلف (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰) میکروگرم در میلی‌لیتر) بر روی ۱۸ قارچ بیمارگر گیاهی در سه محیط کشت آرد ذرت-آگار (CMA)، عصاره مالت-آگار (MEA) و PDA بررسی کردند. نتایج نشان داد که عوامل مختلفی چون نوع محیط کشت و فرم نانوذره بر میزان فعالیت ضدقارچی نانوذره با غلظت‌های مختلف در جلوگیری از رشد بیمارگر تأثیرگذار است. در اکثر قارچ‌های مورد مطالعه، جلوگیری از رشد در محیط کشت PDA با افزایش غلظت نانوذره غیربیولوژیک، روند افزایشی داشته، به‌صورتی که بیشترین درصد جلوگیری از رشد در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد، در حالی که در محیط کشت‌های MEA و CMA در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده و ثبت شد. در کل، بیشترین درصد جلوگیری از رشد این بیمارگرها در محیط کشت PDA و غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذره غیر بیولوژیک مشاهده شد (Kim et al., 2012). کنترل پژمردگی فوزاریومی فلفل (*F. oxysporum* f. sp. *capsici*) از طریق نانوذره نقره بیولوژیک سنتز شده از قارچ *T. harzianum* (غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) (Al Abboud, 2018) و قارچ‌های جداسازی شده از ریزوسفر گیاه سالم این گیاه (غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) (El-Eraky et al., 2017) صورت گرفت که با افزایش غلظت نانوذره، تشکیل کلنی قارچ کاهش و درصد جلوگیری از رشد قارچ افزایش یافته و غلظت ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین درصد جلوگیری از رشد قارچ بیمارگر را نشان دادند (به ترتیب ۱۰۰ در صد و بالای ۹۰ درصد)، هر چند که در شرایط

(عامل کپک سفید سویا) با غلظت $10^3 \times 0.3$ در میلی‌لیتر نانوذره بیولوژیک سنتز شده از *T. harzianum* جلوگیری شد (Guilger et al., 2017). مطالعات نشان می‌دهد که بین غلظت نانوذره بیولوژیک با درصد جلوگیری از رشد قارچ و جوانه‌زنی اسپور رابطه مستقیمی وجود دارد (Song et al., 2018, 2020; Kim et al., 2009; Jo et al., 2009; Ali et al., 2015) و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند نانوذره بیولوژیک (از قارچ *C. elatum*) با غلظت‌های ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در جلوگیری از رشد میسلیم و تولید اسپور قارچ *M. oryzae* نسبت به تیمار شاهد مؤثر بوده و بیشترین درصد جلوگیری از رشد، کم‌ترین تعداد تولید اسپور و بیشترین درصد جلوگیری از جوانه‌زنی اسپور مربوط به غلظت ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (Song et al., 2018). نانوذره بیولوژیک سنتز شده از بیوسورفاکتانت (Biosurfactant)، مولکول‌های فعال سطح که توسط میکروارگانسیم‌ها به‌عنوان متابولیت تولید می‌شوند، تولید شده توسط باکتری *Bacillus vallismortis* با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۱/۵، ۲، ۳/۵، ۴، ۴/۵ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر قارچ *M. oryzae* اعمال شده و ناحیه بازدارنده ارزیابی شد. کم‌ترین و بیشترین ناحیه بازدارنده به ترتیب برای غلظت‌های ۰/۱ و ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (Kanmani, 2018). نتایج بررسی حاضر با نتایج Akter (۲۰۱۹) در بنگلادش متفاوت بود. او نشان داد که نانوذره نقره غیربیولوژیک با غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر کاهش رشد میسلیم قارچ و در نتیجه افزایش جلوگیری از رشد قارچ عامل بیماری بلاست برنج مؤثر می‌باشد، که غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین اثر را نشان داد. اما ۱۲ روز و بیشتر، پس از تلقیح قارچ، حتی این غلظت نیز نتوانست از رشد میسلیم قارچ جلوگیری کند. با این وجود، تأثیر نانوذره نقره از نانوذرات روی، مس و سیلیکون بیشتر بود. علت این تفاوت می‌تواند با نوع نانوذره نقره (بیولوژیکی یا شیمیایی)، استرین قارچ بیمارگر و غیره مرتبط باشد (Akter, 2019). Kim و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت ضدقارچی سه فرم مختلف نانوذره نقره غیربیولوژیک را در برابر قارچ *Raffaelea* sp. عامل

$$\frac{\sum n \times v}{N \times V} \times 100\% = (\text{Disease severity})$$

شدت بیماری = تعداد برگ‌های آلوده به بلاست؛ v = عدد معیار هر نمونه
برگی آلوده؛ N = تعداد برگ‌های مشاهده شده؛ V = بالاترین
عدد معیار



شکل ۵- نمونه لکه‌های ایجاد شده در برگ‌های برنج تلقیح شده با قارچ عامل بیماری بلاست. گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک (A) و گیاهان شاهد (B)

Fig. 5. Disease development in rice leaves inoculated with *M. oryzae*. Left, treated with silver nanoparticle; right, not treated

جدول ۵- تجزیه واریانس سنجش بیماری در گیاه برنج تیمار شده با نانوذره بیولوژیک و گیاه شاهد در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با قارچ *M. oryzae*

Table 5. Analysis of variance for disease evaluation parameters in rice plant treated with silver nanoparticle and control plant at various times after inoculation with the *M. oryzae*

Disease severity	
t value	0.2898 ^{ns}

ns: Non significant دار غیر معنی‌دار

جدول ۶- مقایسه میانگین شدت بیماری در گیاه برنج تیمار شده با نانوذره بیولوژیک و تیمار شاهد در زمان‌های مختلف پس از مایه‌زنی با قارچ *M. oryzae*

Table 6. Analysis of variance for disease evaluation parameters in rice plant treated with silver nanoparticle and control plant at various times after inoculation with the *M. oryzae*

Disease severity	
Treatment	30.863 ^a
Control	53.083 ^a

حروف مشابه یعنی اختلاف معنی‌دار وجود ندارد

Similar letters means there is no significant difference

گلخانه غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سبب کاهش شدت بیماری شد (El-Eraky et al., 2017). سنتز نانوذره نقره بیولوژیک از قارچ *Aspergillus versicolor* (Vuillemin) Tiraboschi و کاربرد آن با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی دو قارچ بیمارگر *S. sclerotiorum* و *Botrytis cinerea* Pers. جدا شده از توت‌فرنگی حاکی از افزایش درصد جلوگیری از رشد با افزایش غلظت نانوذره بیولوژیک بوده که غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین درصد جلوگیری از رشد را برای هر دو بیمارگر به همراه داشت (Elgorban et al., 2016). نتایج این پژوهش بر اساس محدوده غلظت تا حدودی مشابه نتایج Mahdizadeh و همکاران (۲۰۱۵) است، طوری که در غلظت‌های ۶، ۸، ۱۲ و ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر، درصد جلوگیری از رشد قارچ *R. solani* AG1 به ترتیب ۷۵، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ بود (Mahdizadeh et al., 2015). همچنین بر اساس مطالعات انجام شده توسط Abdelmalek و Salaheldin (۲۰۱۶)، نانوذره نقره (سنتز شیمیایی) با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درصد سبب جلوگیری از رشد قارچ‌های بیماری‌زای مرکبات *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl، *Alternaria citri* Ellis & N. Pierce، *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. در شرایط آزمایشگاه گردید (Abdelmalek & Salaheldin, 2016).

واکنش گیاهان به بیماری

شدت بیماری بلاست برگ، ۱۰ روز بعد از تلقیح بیمارگر و بر اساس سیستم ارزیابی استاندارد ارائه شده با معیار صفر تا نه توسط مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج طبق فرمول زیر محاسبه شد. اگرچه شدت بیماری در گیاهانی که قبل از تلقیح بیمارگر، با نانوذره بیولوژیک تیمار شده بودند در مقایسه با گیاهان شاهد که فقط با بیمارگر تلقیح شده بودند، ۱/۷ درصد کمتر بود (به ترتیب ۳۱ و ۵۳ درصد) (شکل ۵) اما تجزیه واریانس تیمارها با آزمون t، اختلاف معنی‌داری را بین دو تیمار ذکر شده نشان نداد (جدول ۵ و ۶).

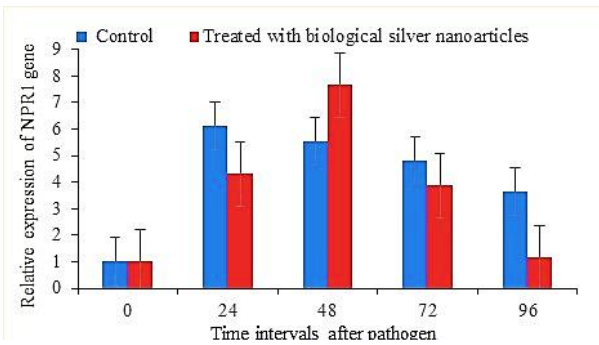
همولوگ NPR1 در برنج، OSNR1/NH1 نام دارد (Yuan et al., 2007). بررسی الگوی بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، نشان دهنده افزایش بیان در ۲۴ ساعت پس تلقیح بود که میزان رونوشت در ۴۸ ساعت بعد از تلقیح به حداکثر بیان رسیده و نسبت به زمان ۲۴ ساعت حدود ۱/۸ برابر افزایش داشته است. اگرچه میزان بیشینه بیان ژن در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک بیشتر از گیاهان شاهد بود، اما زمان بیان آن در گیاهان شاهد سریع‌تر از گیاهان تیمار شده اتفاق افتاد. افزایش بیان سریع ژن دفاعی NPR1 در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تلقیح با بیمارگر، جهت مقابله با حمله و گسترش هیف مهاجم (Invasive hyphe) به اولین سلول گیاهی می‌باشد (Ribot et al., 2008). Li و همکاران (۲۰۰۶) بیان ژن NPR1 را در تعامل برنج با قارچ *M. oryzae* مورد بررسی قرار داده و نشان دادند این ژن در تعامل سازگار و ناسازگار بیان می‌شود (Li et al., 2006). Yuan و همکاران (۲۰۰۷) بیان ژن OsNPR1 را در لاین‌های near-isogenic برنج H7R (دارای ژن مقاومت Pir1 به بیماری بلاست) و H7S (فاقد ژن مقاومت Pir1) بررسی نمودند. OsNPR1 در تعامل ناسازگار (مقاوم) نسبت به تعامل سازگار (حساس) سریع‌تر القاء شد (Yuan et al., 2007). اگرچه بیان ساختاری ژن NPR1، مقاومت به بیمارگرهای قارچی و باکتریایی را در گیاه آراییدوپسیس و گندم افزایش می‌دهد (Cao et al., 1998; Friedrich et al., 2001; Makandar et al., 2006) و در افزایش مقاومت پایه برنج به باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* نیز نقش دارد (Yuan et al., 2007; Chern et al., 2005, 2001; Fitzgerald et al., 2004) اما افزایش مقاومت به بلاست برنج در لاین‌های تراریخته OsNPR1 مشاهده نشد. Quilis و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که بیان ساختاری ژن NPR1 آراییدوپسیس در برنج، افزایش مقاومت در مقابل قارچ عامل بیماری بلاست برنج، *M. oryzae*، را به همراه داشته و مدرکی برای نقش احتمالی OsNPR1 در مقاومت پایه برنج به قارچ عامل بیماری بلاست فراهم می‌کند. در همین مطالعه، آن‌ها ثابت نمودند که بیان NPR1 در برنج همچنین مقاومت به دیگر

الگوی بیان ژن‌های دفاعی در گیاه

در این تحقیق، الگوی بیان ژن‌های PR3، PR2، NPR1 و LOX طی پنج فاصله زمانی قبل (زمان صفر) و پس از تلقیح رقم حساس طارم محلی با قارچ عامل بیماری بلاست برنج در نمونه‌های تیمار شده با نانوذره نقره بیولوژیک و تیمار شاهد مورد بررسی قرار گرفت. بررسی روند تغییرات بیان این ژن‌ها نشان می‌دهد که سطح بیان این ژن‌ها در زمان‌های مختلف پس از آلودگی متفاوت می‌باشد.

الگوی بیان ژن NPR1

میزان بیان ژن NPR1 در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک و تیمار شاهد در ۲۴ ساعت پس از تلقیح با قارچ *M. oryzae* افزایش یافت، طوری که گیاهان تیمار شده ۴/۳ برابر نسبت به زمان صفر افزایش بیان نشان دادند که این افزایش رونوشت در گیاهان شاهد ۶/۱۳ برابر بود. بیشینه بیان در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، ۴۸ ساعت پس از تلقیح و در گیاهان شاهد، ۲۴ ساعت پس از تلقیح بوده است. میزان بیشینه ترانوشت این ژن در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، ۷/۶۵ برابر و در گیاهان شاهد، ۶/۱۳ برابر نسبت به زمان صفر افزایش یافت. مقایسه میزان رونوشت در زمان حداکثر بیان در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، حدود ۱/۲۵ برابر گیاهان شاهد بود. میزان رونوشت ژن NPR1 در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، ۷۲ ساعت بعد از تلقیح نسبت به ۴۸ ساعت رونوشت کاهشی نشان داد و در گیاهان شاهد، ۴۸ ساعت بعد از تلقیح نسبت به ۲۴ ساعت رونوشت کاهشی داشت (شکل ۶). NPR1 واسطه اثر متقابل (Cross talk) سالیسیلیک اسید-جاسمونیک اسید و تنظیم کننده مسیرهای پیام‌رسان SAR و ISR می‌باشد (Pieterse et al., 2014). NPR1 یک تنظیم کننده کلیدی مسیر SAR می‌باشد که با افزایش اتصال DNA فاکتور رونویسی TGAs به عناصر پاسخ دهنده به سالیسیلیک اسید (SA-responsive) در پروموتور ژن‌های PR، نقش مهمی در فعال کردن این ژن‌ها بازی می‌کند (Pieterse & Van Loon, 2004; Feng et al., 2011).



شکل ۶- سطح بیان ژن NPR1 در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک و گیاهان شاهد تلقیح شده با قارچ *M. oryzae*

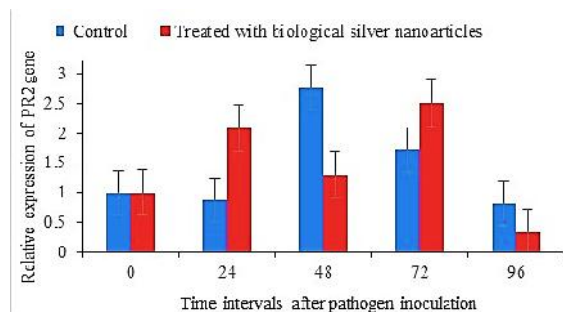
Fig. 6. Expression level of NPR1 gene in silver nanoparticle-treated plants and control plants under infection with *M. oryzae* fungus

الگوی بیان ژن PR2

میزان بیان ژن PR2 در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک در ۲۴ ساعت پس از تلقیح با قارچ *M. oryzae* افزایش یافت، طوری که گیاهان تیمار شده ۲/۱ برابر نسبت به زمان صفر افزایش بیان نشان دادند. این در حالی است که در گیاهان شاهد نسبت به زمان صفر افزایش بیان مشاهده نشده بود. بیشینه بیان در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، ۷۲ ساعت پس از تلقیح بیمارگر و در گیاهان شاهد، ۴۸ ساعت پس از تلقیح بود. نرخ بیان ژن در این فاصله زمانی در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، ۲/۵۱ برابر و در گیاهان شاهد، ۲/۷۷ برابر نسبت به زمان صفر افزایش یافت. میزان رونوشت ژن PR2 در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، ۴۸ ساعت بعد از تلقیح نسبت به ۲۴ ساعت روند کاهشی نشان داد، اما در ۷۲ ساعت پس از تلقیح روند افزایشی شده و میزان بیان به حداکثر رسید. در گیاهان شاهد، ۷۲ ساعت بعد از تلقیح نسبت به ۴۸ ساعت، روند کاهشی مشاهده شد (شکل ۷). پروتئین‌های PR2 که به بتا-۳ و گلوکانازها شهرت دارند، معمولاً بعد از حمله بیمارگر به گیاه و یا تحت تنش‌های زیستی یا غیر زیستی مختلف در گیاه القاء شده و در مقاومت به بیماری‌های مختلف نقش دارند. در تحقیقات مختلف، خاصیت سینرژیستی پروتئین‌های این گروه به همراه گروه PR3 اثبات شده است. این آنزیم از طریق شکستن

بیمارگرهای قارچی همانند *Fusarium* و *Verticillium* را به همراه دارد (Quilis et al., 2008). Sugano و همکاران (۲۰۱۰) مشاهده کردند که بیان بیش از حد OsNPR1 در لاین‌های برنج القاء شده با بنزوتیادiazول (آنالوگ سالیسیلیک اسید) نقشی اساسی در مقاومت به بیماری بلاست بازی می‌کند (Sugano et al., 2010). برخلاف گزارشات قبلی که هیچ‌گونه تأثیراتی از OsNPR1 در مقاومت پایه برنج به قارچ عامل بیماری بلاست مشاهده نشد (Yuan et al., 2007; Sugano et al., 2010) همکاران (۲۰۱۱) ثابت کردند که OsNPR1 نقش اساسی در مقاومت پایه برنج به بیمارگر قارچی *M. oryzae* بازی می‌کند. ژن‌های OsNPR1، PR-1a، کیتیناز، بتا-۳ و گلوکاناز و PAL در گیاهان تیپ وحشی (Wild-type) از طریق تلقیح *M. oryzae* شدند، اما سطوح بیان این ژن‌ها در لاین‌های OsNPR1-RNAi و OsNPR1- overexpressing به ترتیب کمتر و بیشتر از سطح داخلی گیاهان تیپ وحشی در زمان‌های مختلف بعد از تلقیح بود. بیان بیش از حد OsNPR1 در برنج به‌طور مهمی افزایش بیان ژن‌های PR و در نتیجه افزایش مقاومت به بیماری بلاست برنج را به همراه داشت. این نتایج با گزارش Quilis و همکاران (۲۰۰۸) که ارتباط بین افزایش مقاومت لاین برنج تلقیح شده به *M. oryzae* با بیان بیش از حد ژن NPR1 آراییدوپسیس و فعالیت سریع‌تر و قوی‌تر ژن‌های دفاعی (thaumatin-like protein; TLP و OsPR10، PR-1b (Feng et al., 2011; Quilis et al., 2008) مطابقت دارد (Microarray) نشان داد که NPR1 به‌طور مثبت بیان ژن‌های PR را در آراییدوپسیس تنظیم می‌نماید (Wang et al., 2005). بیان بیش از حد ژن OsNPR1 در برنج منجر به افزایش بیان ژن‌های دفاعی PR-1b، PAL و POD شد (Chern et al., 2005; Yuan et al., 2007).

که درصد سطح برگ آلوده (DLA= Disease Leaf Area) در تیمارهایی که قبل از تلقیح، با جدایه غیرپرزآزار تیمار شدند نسبت به تیمارهایی که فقط با جدایه پرآزار تلقیح شده بودند کاهش یافت. این مطالعه علاوه بر کاهش شدت بیماری، همچنین فعالیت سیستمیک و القاء مقاومت را در پاسخ به تیمار جدایه غیرپرزآزار بر روی برگ پایین‌تر نشان داد (Filippi *et al.*, 2014). تیمار جاسمونیک اسید و اتیلن، ۴۸ ساعت قبل از تلقیح *M. oryzae* موجب القاء مقاومت از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی شامل گلوکاناز و کیتیناز و در نتیجه کاهش علائم بلاست در رقم گندم حساس به بیماری گردید (Rios *et al.*, 2014). کاربرد عصاره خام (Crude extract) قارچ *Epicoccum sp.* (غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) ۴۸ ساعت قبل از تلقیح *M. oryzae* موجب القاء مقاومت و جلوگیری از بیماری بلاست برگ در شرایط گلخانه شد. فعالیت آنزیم بتا-۳ او-۳ گلوکاناز، ۲۴ ساعت پس از تلقیح بیمارگر، دوره بحرانی و مهم برای جلوگیری از آلودگی که طی آن قارچ فرآیند نفوذ را شروع می‌کند، در گیاه افزایش یافت. عصاره بر روی فازهای اولیه آلودگی تأثیرگذار نبود. زیرا اسپورهای بیمارگر جوانه زده و آپرسوریوم (Appressorium) تشکیل دادند، ولی قادر به نفوذ نبودند.



شکل ۷- سطح بیان ژن PR2 در گیاهان تیمار شده با نانوذره

بیولوژیک و گیاهان شاهد تلقیح شده با قارچ *M. oryzae*

Fig. 7. Expression level of PR2 gene in silver nanoparticle-treated plants and control plants under infection with *M. oryzae* fungus

الگوی بیان ژن PR3

میزان بیان ژن PR3 در گیاهان تیمار شده و تیمار شاهد

با نانوذره بیولوژیک در ۲۴ ساعت پس از تلقیح با قارچ *M.*

واحدهای ۳ او-۳ بتا-دی گلوکوزیدی در بتا-۳ او-۳ گلوکان‌ها، که همراه با کیتین ساختمان اصلی دیواره سلولی قارچ‌ها را تشکیل می‌دهند، سبب تخریب این پلی ساکارید و در نهایت از بین رفتن قارچ‌ها می‌شود (Van Loon & Van Strien, 1999). در تحقیقات تکمیلی نشان داده شد که در بعضی موارد این پروتئین در آزاد کردن مولکول‌های الیستور گیاهی از جمله ترکیبات فنولی، فیتوالکسین‌ها و سایر PRها نقش دارد و افزایش مقاومت به علت عمل مستقیم این پروتئین نمی‌باشد (Vidhyasekaran, 2002). بررسی نتایج الگوی بیان این ژن حاکی از آن است که در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، میزان بیان در ۲۴ ساعت پس از تلقیح افزایش یافت، اما بعد از ۴۸ ساعت روند کاهشی و در ۷۲ ساعت پس از تلقیح به حداکثر بیان رسید و نسبت به زمان ۴۸ ساعت حدود دو برابر افزایش داشت. اگرچه میزان بیشینه بیان ژن در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک در مقایسه با گیاهان شاهد تقریباً برابر بود، اما زمان بیان آن در گیاهان شاهد سریع‌تر از گیاهان تیمار شده بود. افزایش بالای ژن دفاعی PR2 در ۷۲ ساعت بعد از تلقیح با بیمارگر، جهت مقابله با گسترش هیف مهاجم از اولین سلول گیاه به سلول‌های مجاور می‌باشد (Ribot *et al.*, 2008). افزایش بیان ژن‌های PR از قبیل گلوکاناز و کیتیناز به‌خاطر بیان بیش از حد OsNPR1 در برنج، سبب افزایش مقاومت به بیماری بلاست برنج گردید (Feng *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2004). در گیاهان برنج تراریخته بیان‌کننده ژن بتا-۳ او-۳ گلوکاناز، این ژن به تنهایی و یا در ترکیب با ژن کیتیناز موجب کاهش حساسیت این گیاهان به تلقیح توسط قارچ‌های معینی شد (Jwa *et al.*, 2006). افزایش فعالیت آنزیم‌های گلوکاناز و کیتیناز در ارقام برنج که در شرایط گلخانه، ۴۸ ساعت قبل از تلقیح جدایه پرآزار (*virulent isolate*) قارچ *M. oryzae* با جدایه غیرپرزآزار (*Avirulent isolate*) همین قارچ تیمار شده بودند، مشاهده گردید (Filippi *et al.*, 2014). همچنین در آزمایشی دیگر، برگ‌های پایینی گیاه با جدایه غیرپرزآزار *M. oryzae* تیمار و سپس برگ بالایی با جدایه پرآزار این قارچ تلقیح شد. ارزیابی بیماری نه روز بعد از تلقیح جدایه پرآزار نشان داد

به بیمارگرهای قارچی شود. در روش مستقیم کیتیناز، کیتین موجود در هیف‌های در حال رشد را تجزیه می‌کند در حالی که در روش غیرمستقیم، کیتیناز سبب آزادسازی الیگومرهای کیتین شده که می‌توانند به‌عنوان محرک‌های مکانیسم دفاعی در گیاه عمل کنند (Collinge *et al.*, 1993). کاربرد عصارهٔ خام قارچ *Epicoccum sp.* (غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) ۴۸ ساعت قبل از تلقیح بیمارگر *M. oryzae* موجب القاء مقاومت و کاهش بیماری بلاست برگ در شرایط گلخانه شد. فعالیت آنزیم کیتیناز ۷۲ ساعت بعد از تلقیح بیمارگر افزایش یافت. بنابراین امکان دارد کیتیناز (PR3) که برای ایجاد آلودگی موفق مهم است، در دفاع آغازین شرکت نداشته باشند (Sena *et al.*, 2013).

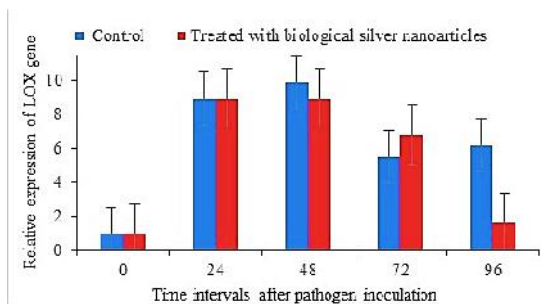
الگوی بیان ژن LOX

میزان بیان ژن LOX در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک و تیمار شاهد در ۲۴ ساعت پس از تلقیح با قارچ *M. oryzae* افزایش یافت، به طوری که میزان رونوشت در گیاهان تیمار شده و گیاهان شاهد حدود نه برابر نسبت به زمان صفر افزایش یافت. بیشینه بیان در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، ۲۴ ساعت پس از تلقیح و در گیاهان شاهد، ۴۸ ساعت پس از تلقیح با بیمارگر بوده است. میزان بیشینه رونوشت ژن LOX در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، ۸/۹۴ برابر و در گیاهان شاهد، ۹/۹۲ برابر نسبت به زمان صفر افزایش یافت. مقایسهٔ میزان رونوشت در زمان حداکثر بیان ژن در گیاهان شاهد، حدود ۱/۱۱ برابر گیاهان تیمار شده بود. میزان رونوشت ژن LOX، ۷۲ ساعت بعد از تلقیح نسبت به ۴۸ ساعت روند کاهشی را نشان داد، ولی در گیاهان شاهد در ۹۶ ساعت پس از تلقیح دوباره روند افزایشی پیدا کرد (شکل ۹). ژن LOX، اکسیژن رسانی اسیدهای چرب را تسریع می‌کند تا هیدروپروکسیدها را تولید کنند (Hao *et al.*, 2009). در واقع LOX آغازگر سنتز گروهی از ترکیبات حلقوی و غیرحلقوی موسوم به اکسی‌لیپین‌ها، که محصولات اکسیداسیون اسیدهای چرب هستند، می‌باشد (Porta & Rocha-Sosa, 2002). مسیر لیپوکسی‌ژناز منجر به تولید محصولات مختلفی از جمله

oryzae افزایش یافت، طوری که گیاهان تیمار شده ۷/۲۴ برابر نسبت به زمان صفر افزایش بیان نشان دادند که این افزایش رونوشت در گیاهان شاهد ۴/۳۲ برابر بود. بیشینه بیان در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، ۲۴ ساعت پس از تلقیح و در گیاهان شاهد، ۴۸ ساعت پس از تلقیح بوده است. میزان بیشینهٔ ترانوشت این ژن در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، ۷/۲۴ برابر و در گیاهان شاهد، ۴/۴۵ برابر نسبت به زمان صفر افزایش یافت. میزان ترانوشت ژن PR3 در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، ۱/۶۳ برابر بیشتر از گیاهان شاهد در زمان حداکثر بیان بود. میزان رونوشت ژن PR3 در گیاهان تیمار شده ۴۸ ساعت بعد از تلقیح نسبت به ۲۴ ساعت روند کاهشی را نشان داد و در گیاهان شاهد با نانوذره بیولوژیک، ۷۲ ساعت بعد از تلقیح نسبت به ۴۸ ساعت روند کاهشی مشاهده شد (شکل ۸). PR3ها جزئی از خانواده بزرگ کیتینازها می‌باشد که معمولاً پس از حملهٔ بیمارگر، سطح بیان آن توسط سلول‌های گیاهی افزایش می‌یابد. کیتینازها دیوارهٔ سلولی قارچ را از طریق هیدرولیز کیتین موجود در دیواره، تجزیه نموده و بنابراین می‌توانند نقش بسیار مهمی در مقاومت علیه بیمارگرها ایفا کنند (Van Loon & Van Strien, 1999; Collinge *et al.*, 1993). بررسی الگوی بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، نشان دهندهٔ افزایش بیان در ۲۴ ساعت پس از تلقیح بود که میزان رونوشت در این ساعت به حداکثر میزان خود رسید. بیشینهٔ بیان ژن در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک هم از نظر مقدار و هم از نظر زمان، بیشتر و سریع‌تر از گیاهان شاهد اتفاق افتاد. افزایش سریع و بالای ژن دفاعی PR3 می‌تواند بیانگر نقش بسیار مؤثر آن در مکانیسم دفاعی گیاه علیه بیمارگر قارچی باشد که مانع توسعهٔ قارچ در بافت پارانشیمی و همچنین القاء مقاومت در گیاه می‌شود. مطالعات نشان داد که گیاهان تراریخت با بیان بالای کیتیناز به تنهایی و یا همراه با سایر پروتئین‌های PR، سطوح بالایی از مقاومت را به آلودگی قارچی یا توسعهٔ علائم بیماری نشان می‌دهند (Jwa *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2011). تولید بالای پروتئین تراریخت کیتیناز می‌تواند به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم سبب مقاومت

است (Rocha-Sosa & Porta, 2002). Hao و همکاران (۲۰۰۹) بعد از تلقیح برنج رقم Jiajing3768 (مقاوم به بلاست برگ اما حساس به بلاست گردن) با قارچ *M. oryzae* دریافتند که ژن LOX در مقاومت به بلاست برگ نقش دارد. فعالیت آنزیم LOX در برگ‌های برنج تلقیح شده با نژاد ناسازگار *M. oryzae*، ۲۴ تا ۳۶ ساعت بعد از تلقیح در مقایسه با برگ‌های سالم به سرعت افزایش یافت که با جلوگیری از رشد هیف‌های قارچ در ترکیب ناسازگار مواجه بود. اگرچه فعالیت در برگ‌های تلقیح شده با نژاد سازگار نیز افزایش یافت، اما این افزایش، در واکنش نا سازگار بسیار بیشتر از واکنش سازگار بود. نتایج بیان می‌دارد که افزایش سریع بیان ژن LOX با پاسخ مقاومت ارقام برنج به تلقیح توسط قارچ عامل بیماری بلاست برنج، بسیار مرتبط است (Hao et al., 2009).

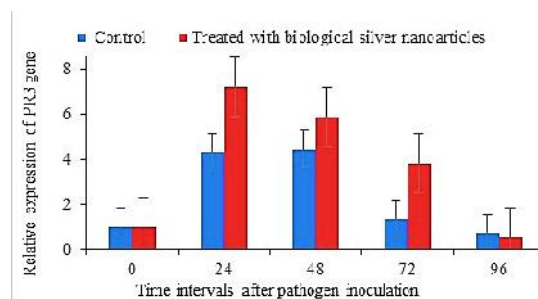
در گیاهان گوجه‌فرنگی تیمار شده با استرین BTP1 باکتری *Pseudomonas putida* میزان بیان ژن LOX بعد از تلقیح قارچ بیمارگر *B. cinerea* نسبت به گیاهان شاهد که با باکتری تیمار نشده بودند، افزایش بیشتری داشت (Akram et al., 2008). اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم LOX بعد از تلقیح قارچ *M. oryzae* بین گندم تیمار شده با جاسمونیک اسید، اتیلن و تیمار شاهد، مشاهده نشد. اما بین گیاهان تیمار شده با (Acibenzolar-S-Methyl) ASM و آنالوگی از (SA) و تیمار شاهد، اختلاف معنی‌دار بود. میزان تولید یا فعالیت این آنزیم ۴۸ ساعت بعد از تلقیح، کاهش و ۷۲ ساعت بعد از آن به حداکثر رسید (Rios et al., 2014).



شکل ۹- سطح بیان ژن LOX در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک و گیاهان شاهد تلقیح شده با قارچ *M. oryzae*

Fig. 9. Expression level of LOX gene in silver nanoparticle-treated plants and control plants under infection with *M. oryzae* fungus

جاسمونیک اسید می‌شود که نقش مهمی در فعالیت ضد میکروبی داشته و در تعامل بیمارگر-میزبان، موجب القاء مکانیسم دفاعی در برابر بیمارگر می‌شود (Thakur & Udayashankar, 2019).



شکل ۸- سطح بیان ژن PR3 در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک و گیاهان شاهد تلقیح شده با قارچ *M. oryzae*

Fig. 8. Expression level of PR3 gene in silver nanoparticle-treated plants and control plants under infection with *M. oryzae* fungus

بررسی الگوی بیان این ژن در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک، نشان دهنده افزایش بیان در ۲۴ ساعت پس از تلقیح با بیمارگر بود که به حداکثر میزان خود رسید و میزان رونوشت در ۴۸ ساعت بعد از تلقیح نسبت به زمان ۲۴ ساعت تغییری نداشت. میزان بیشینه بیان ژن در گیاهان شاهد بیشتر از گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک بود. افزایش سریع و بالای ژن دفاعی LOX در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تلقیح بیمارگر، جهت مقابله با حمله و گسترش هیف مهاجم قارچ به اولین سلول گیاهی می‌باشد (Ribot et al., 2008). گزارشات مختلفی اثر متقابل نانوذرات نقره با مسیر علامت‌دهی گیاه را نشان دادند. به عنوان مثال در آراییدوپسیس، نانوذره نقره موجب کاهش بیان ژن‌هایی شد که در پاسخ به بیمارگرها و سیگنال‌های هورمونی از قبیل اتیلن نقش دارند. نانوذره نقره، یک بازدارنده شناخته شده اتیلن می‌باشد (Syu et al., 2014). با توجه به اینکه مسیر علامت‌دهی جاسمونات/اتیلن در بیان ژن LOX در گیاه نقش دارد (Shoresh et al., 2005) این امکان وجود دارد که نانوذره نقره از طریق بازدارندگی اتیلن موجب کاهش بیان این ژن در گیاه شده باشد. بیان ژن‌های LOX در طول تعامل بیمارگر-گیاه در چندین گونه گیاهی گزارش شده

Elamawi & El-Shafey, 2013; Park *et al.*, 2006; Elamawi *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2020) از آنجایی که نقره خاصیت حفاظتی بالایی دارد، بنابراین تاثیر مستقیم نانوذرات نقره بیولوژیک بر روی بیمارگر در شرایط *in vitro* مثبت شد. از طرفی در مطالعه انجام شده در گلخانه از آنجایی که هدف، بررسی تاثیر غیرمستقیم نانوذره بر بیمارگر از طریق القاء مقاومت سیستمیک بود و هیچ تماسی بین نانوذره بیولوژیک و بیمارگر صورت نگرفت به عبارتی محل تلقیح نانوذره بر روی برگ‌های پایینی گیاهچه و محل تلقیح بیمارگر بر روی برگ‌های بالایی گیاهچه بود، بنابراین انتظار می‌رفت نتیجه آزمایش مثبت (بیان سریع تر و بیشتر ژن‌ها و همچنین کاهش شدت بیماری در تیمار تلقیح شده با *Trichoderma* در مقایسه با تیمار شاهد) و یا منفی باشد. در صورتی که نانوذره نقره‌ای که استفاده می‌شد غیر بیولوژیک بود، به احتمال زیاد این نتیجه مثبت نمی‌شد، چون نقره یک قارچ کش حفاظتی بوده و مرتبط با ایجاد مقاومت در گیاه نمی‌باشد. ولی در این پژوهش از نانوذره نقره بیولوژیک استفاده شد که حاوی ماده مترشحه (exudate) از قارچ *Trichoderma* می‌باشد که می‌تواند در القاء مقاومت گیاه نقش داشته باشد. در این آزمایش، بیان ژن‌های دفاعی گیاه نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد و شدت بیماری نیز نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت اما معنی‌داری یا عدم معنی‌داری آن‌ها مشخص نشد که برای اثبات آن، ضروری است آزمایش در شرایط کنترل شده در گلخانه مجدداً تکرار شود.

سپاسگزاری

از همکاری و تأمین امکانات پژوهش توسط گروه بیماری شناسی و شیمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری قدردانی می‌شود.

از بین رفتن فعالیت غشای سلول قارچی در اثر تشکیل رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط نانوذره بیولوژیک، از مهم‌ترین مکانیسم‌های ضدقارچی نانوذره بیولوژیک می‌باشد (Kim *et al.*, 2007). در این مطالعه، نانوذره بیولوژیک در شرایط *in vitro* بر روی رشد قارچ عامل بیماری بلاست تأثیر گذاشته، به طوری که درصد جلوگیری از رشد قارچ بیمارگر بین تیمارهای مورد آزمایش (غلظت‌های مختلف نانوذره بیولوژیک) و تیمار شاهد (فاقد نانوذره بیولوژیک) اختلاف معنی‌داری را نشان داد که این امر در اثر تماس مستقیم نانوذره با قارچ بیمارگر و در نتیجه از بین رفتن فعالیت غشای سلول قارچی می‌باشد. از طرفی، تولید و یا تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (pathogenesis-related proteins) در پاسخ به حمله بیمارگر و یا موقعیت‌های مرتبط با تنش، از اجزای مهم مکانیسم دفاعی القایی در گیاهان می‌باشد (Jwa *et al.*, 2006). ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی در واکنش‌های ناسازگار (مقاوم) و سازگار (حساس) القاء می‌شوند، اما سرعت و میزان بیان آن‌ها متفاوت می‌باشد. در این مطالعه نیز بیان چند ژن دفاعی مرتبط با بیماری‌زایی در واکنش سازگار نسبت به زمان صفر (قبل از تلقیح بیمارگر) در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک و همچنین در تیمار شاهد (فاقد نانوذره) افزایش یافت، اما سرعت و میزان بیان این ژن‌ها بین دو تیمار تفاوت چندانی نداشت. اگرچه شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با نانوذره بیولوژیک تا حدودی کمتر از تیمار شاهد بود، اما از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. بنابراین نقش نانوذره نقره بیولوژیک در گیاه به صورت غیرمستقیم از طریق افزایش بیان ژن‌های دفاعی و القاء مقاومت سیستمیک و در نهایت کاهش شدت بیماری، قابل توجه نبود.

تاکنون مطالعات زیادی در مورد بررسی تاثیر نانوذرات نقره (بیولوژیک و یا غیربیولوژیک) به صورت مستقیم (تماسی) بر روی بیمارگر صورت گرفت (Akter, 2019)

References

- Abdelmalek, G.A.M. & Salaheldin, T.A. 2016. Silver Nanoparticles as a Potent Fungicide for Citrus Phytopathogenic Fungi. *Journal of Nanomedicine Research*, 3: 1–8.

- Agrios, G.N. 2005. Plant pathology. Elsevier Academic Press Burlington, MA.
- Akram, A., Ongena, M., Duby, F., Dommès, J. & Thonart, P. 2008. Systemic resistance and lipoxygenase-related defence response induced in tomato by *Pseudomonas putida* strain BTP1. BMC Plant Biology, 8: 1–12.
- Akter, R. 2019. Efficacy of silver nanoparticles against rice blast disease and farmers perception about its management in Bangladesh. Agroecology Master's Programme, 63 pp.
- Al Abboud, M.A. 2018. Fungal biosynthesis of silver nanoparticles and their role in control of *Fusarium* wilt of sweet pepper and soil-borne fungi in vitro. International Journal of Pharmacology, 14: 773–780.
- Ali, S.M., Yousef, N.M.H. & Nafady, N.A. 2015. Application of Biosynthesized Silver nanoparticles for the control of land snail *Eobania vermiculata* and some plant pathogenic fung. Journal of Nanomaterials, 2015: 1–10.
- Anusuya, S. & Sathiyabama, M. 2015. -d-Glucan nanoparticle pre-treatment induce resistance against *Pythium aphanidermatum* infection in turmeric. International Journal of Biological Macromolecules, 74: 278–282.
- Cao, H., Li, X. & Dong, X. 1998. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. Proceeding of the National Academy of Sciences USA, 95: 6531–6536.
- Chern, M-S., Fitzgerald, H.A., Canlas, P.E., Navarre, D.A. & Ronald, P.C. 2005. Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. Molecular Plant-Microbe Interaction, 18: 511–20.
- Chern, M-S., Fitzgerald, H.A., Yadav, R.C., Canlas, PE., Dong, X. & Ronald, P.C. 2001. Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 27: 101–113.
- Colling, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U. & Vad, K. 1993. Plant chitinases. The Plant Journal, 3: 31–40.
- Devi, P., Sakkaravarthi, K., Kamil, D., Borah, J.L., Narayansamy, P. & Chowluru, S.N. 2013. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Trichoderma* species. Indian Journal of Experimental Biology, 51: 543–547.
- Dong, X. 1998. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. Current Opinion in Plant Biology, 1: 316–323.
- Edreva, A. 2005. Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. General and Applied Plant Physiology, 31: 105–124.
- Elamawi, R.M., Al-Harbi, R.E. & Hendi, A.A. 2018. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 28: 1271–1283.
- Elamawi, R.M.A. & El-Shafey, R.A.S. 2013. Inhibition effects of silver nanoparticles against rice blast disease caused by *Magnaporthe grisea*. Egyptian Journal of Agricultural Research, 91: 1271–1283.
- El-Eraky, A.M., Moubasher, A.H., Ismail, M.A., El-Shaer, A.H. & Gouda, H.A. 2017. Mycosynthesis of silver nanoparticles and their role in the control of *Fusarium* wilt of pepper. Journal of Basic & Applied Mycology (Egypt), 8: 25–34.
- Elgorban, A.M., Aref, S.M., Seham, S.M., Elhindi, K.M., Bahkali, A.H., Sayed, S.R. & Manal, M.A. 2016. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus versicolor* and evaluation of their activity on plant pathogenic fungi. Mycosphere, 7: 844–852.
- Feng, J-X., Cao, L., Li, J., Duan, C-J., Luo, X.M., Le, N., Wei, H., Liang, S., Chu, Ch., Pan, Q. & Tang, J-L. 2011 Involvement of OsNPR1/NH1 in rice basal resistance to blast fungus *Magnaporthe oryzae*. European Journal of Plant Pathology, 131: 1–16.
- Filippi, M.C., Silva, G.B., Silva-Lobo, V.L., Viana, H.F. & Prabhu, A.S. 2014. Induction of resistance to rice leaf blast by avirulent isolates of *Magnaporthe oryzae*. Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Science, 57: 388–395.
- Fitzgerald, H.A., Chern, M.S., Navarre, R. & Ronald, P.C. 2004. Overexpression of (At) NPR1 in rice leads to a BTH- and environment-induced lesion-mimic/cell death phenotype. Molecular Plant Microbe Interaction, 17: 140–151.
- Friedrich, L., Lawton, K., Dietrich, R., Willits, M., Cade, R. & Ryals, J. 2001. NIM1 overexpression in *Arabidopsis* potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. Molecular Plant Microbe Interaction, 14: 1114–1124.
- Golshani, F., Fakheri, B.A., Behshad, E. & Mohammadpour Vashvaei, R. 2015. PRs proteins and their Mechanism in Plants. Biological Forum – An International Journal, 7: 477–495.
- Grover, A. & Gowthaman, R. 2003. Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. Current Science, 84: 330–340.
- Guilger-Casagrande, M., Pasquoto-Stigliani, T., Bilesky-Jose, N., Grillo, R., Abhilash, P.C., Fraceto, L.F., & Lima, R.D. 2017. Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. Scientific Reports, 7: 1–13.

- Hao, Z.N., Wang, L.P. & Tao, R.X. 2009. Expression patterns of defence genes and antioxidant defence responses in a rice variety that is resistant to leaf blast but susceptible to neck blast. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74: 167–174.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. 2004. *Trichoderma species*—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2: 43–56.
- Heydari-Nezhad, A.M., Babaeizad, V. & Rahimian H. 2015. Studying PR2 and PAL genes involvement in rice resistance against *Acidovorax avenae* subsp. *Avenae*. *Agricultural Biotechnology Journal*, 7(4): 67–82. (In Persian with English summary).
- Howard, R.J. & Valent, B. 1996. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual Reviews in Microbiology*, 50: 491–512.
- Imada, K., Sakai, S., Kajihara, H., Tanaka, S. & Ito, S. 2016. Magnesium oxide nanoparticles induce systemic resistance in tomato against bacterial wilt disease. *Plant Pathology*, 65: 551–560.
- IRRI. 2013. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute, P.O. Box 933, 1099 Manila, Philippines, 1–55.
- Jain, N., Vergish, S. & Khurana, J.P. 2018. Validation of house-keeping genes for normalization of gene expression data during diurnal/ circadian studies in rice by RT-qPCR. *Scientific Reports*, 8: 1–14.
- Jo, Y-K., Kim, B.H. & Jung, G. 2009. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Disease*, 93: 1037–1043.
- Jwa, N-S., Agrawal, G.K., Tamogami, S., Yonekura, M., Han, O., Iwahashi, H. & Rakwal, R. 2006. Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 261–273.
- Kanmani, N. 2018. Biosynthesis of silver nanoparticles and their evaluation of antifungal activity against *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7: 1638–1648.
- Khosravi, V. 2006. Identification of new races of *Magnaporthe grisea*, the causal agent of rice blast disease in Mzandaran. Final Report of Research Project. Iranian Rice Research Institute Publication, 27 pp.
- Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N. & Kim, J.H. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3: 95–101.
- Kim, S.T., Kim, S.G., Hwang, D.H., Kang, S.Y., Kim, H.J., Lee, B.H., Lee, J.J. & Kang, K.Y. 2004. Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proteomics*, 4 3569–3578.
- Kim, S.W., Jung, J.H., Lamsal, K., Kim, W.S., Min, J.S. & Lee, Y.S. 2012. Antifungal Effects of Silver Nanoparticles (AgNPs) against Various Plant Pathogenic Fungi. *Mycobiology*, 40: 53–58
- Kim, S.W., Kim, K.S., Lamsal, K., Kim, Y-J., Kim, S.B., Jung, M., Sim, S.J., Kim, H.S., Chang, S-J., Kim, J.K. & Lee, Y.S. 2009. An in vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* sp. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 760–764.
- Li, Q., Chen, F., Sun, L., Zhang, Z., Yang, Y. & He, Z. 2006. Expression profiling of rice genes in early defense responses to blast and bacterial blight pathogens using cDNA microarray. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68: 51–60.
- Lin, W., Anuratha, C., Datta, K., Potrykus, I., Muthukrishnan, S. & Datta, S.K. 1995. Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Nature Biotechnology*, 13: 686–691.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-CT} method. *Methods*, 25: 402–408.
- Mahdizadeh, V., Safaie, N. & Khelghatibana, F. 2015. Evaluation of antifungal activity of silver nanoparticles against some phytopathogenic fungi and *Trichoderma harzianum*. *Journal of Crop Protection*, 4: 291–300.
- Makandar, R., Essing, J.S., Schapaugh, M.A., Trick, H.N. & Shah, J. 2006. Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of Arabidopsis NPR1. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 19: 123–129.
- Mandal, D., Bolander, M.E., Mukhopadhyay, D., Sarkar, G. & Mukherjee, P. 2006. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 485–492.
- Mishra, S. & Singh, H. 2015. Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 1097–1107.
- Mishra, S., Singh, B.R., Singh, A., Keswani, C., Naqvi, A.H. & Singh, H.B. 2014. Biofabricated Silver Nanoparticles Act as a Strong Fungicide against *Bipolaris sorokiniana* Causing Spot Blotch Disease in Wheat. *PLOS ONE*, 9: 1–11.
- Motalebi, A., Mahdian, S.A., Tajic Ghanbari, M.A., Ghasemi Mir, S. 2016. Comparison of the effects of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Trichoderma viride* against the fungus *Rhizoctonia solani* of rice sheath blight and bacteria spot of rice striped *Acidovorax avenae*. 22nd Iranian plant protection congress, 27–30 AUG, Karaj, Iran, 340. (In Persian with English summary).

- Padasht Dehkaei, F. & Izadyar, M. 2007. Study on the biological control of rice blast disease in the field condition. *J. Agric. Sci. Natur. Resource*, 13: 1–9.
- Park, H-J., Kim, S.H., Kim, H.J. & Choi, S-H. 2006. A new composition of nanosized silica silver for control of various plant disease. *Plant Pathology Journal*, 22: 295–302.
- Pham, T.T., Nguyen, T.H., Thi, T.V., Nguyen, T-T., Le, T.D., Vo, D.M.H., Nguyen, D.H., Nguyen, C.K., Nguyen, D.C., Nguyen, T.T. & Bach, L.G. 2019. Investigation of chitosan nanoparticles loaded with protocatechuic acid (PCA) for the resistance of *Pyricularia oryzae* fungus against rice blast. *Polymers*, 11: 1–10.
- Pieterse, C.M.J. & Van Loon, L.C. 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:456–464.
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M. & Bakker, P.A.H.M. 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52:347–75.
- Porta, H. & Rocha-Sosa, M. 2002. Plant Lipoxygenases. *Physiological and Molecular Features. Plant Physiology*, 130: 15–21.
- Reymond, P. & Farmer, E.E. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 404–411.
- Quilis, J., Peñas, G., Messeguer, J., Brugidou, C. & Segundo, B.S. 2008. The Arabidopsis AtNPR1 Inversely Modulates Defense Responses Against Fungal, Bacterial, or Viral Pathogens While Conferring Hypersensitivity to Abiotic Stresses in Transgenic Rice. *MPMI*, 21: 1215–1231.
- Rai, M., Ingle, A.P., Gupta, I.R., Birla, S.S., Yadav, A.P. & Abd-Elsalam, K.A. 2013. Potential role of biological systems in formation of nanoparticles: mechanism of synthesis and biomedical applications. *Current Nanoscience*, 9: 576–587.
- Ribot, C., Hirsch, J., Batzergue, S., Tharreau, D., Notteghem, J.L., Lebrun, M-H. & Morel, J-B. 2008. Susceptibility of rice to the blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Journal of Plant Physiology*, 165: 114–124.
- Rios, J.A., Rodrigues, F.A., Debona, D., Resende, R.S., Moreira, W.R. & Andrade, C.C.L. 2014. Induction of resistance to *Pyricularia oryzae* in wheat by acibenzolar-S-methyl, ethylene and jasmonic acid. *Tropical Plant Pathology*, 39: 224–233.
- Roy, S., Mukherjee, T., Chakraborty, S. & Kumar, T. 2013. Biosynthesis, characterization, and antifungal activity of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Aspergillus foetidus* MTCC8876. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 8: 197–205.
- Saha, S., Sarkar, J., Chattopadhyay, D., Patra, S., Chakraborty, A. & Acharya, K. 2010. Production of silver nanoparticles by a phytopathogenic fungus *Bipolaris nodulosa* and its antimicrobial activity. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5: 887–895.
- Sayari, M., Babaeizad, V., Tajick Ghanbari, M.A. & Rahimian, H. 2014. Expression of the pathogenesis related proteins, NH-1, PAL, and lipoxygenase in the Iranian Tarom and Khazar rice cultivars, in reaction to *Rhizoctonia solani*–the causal agent of rice sheath blight. *Journal of Plant Protection Research*, 54: 36–43.
- Sena, A.P.A., Chaibub, A.A., Côrtes, M.V.C.B., Silva, G.B., Silva-Lobo, V.L., Prabhu, A.S., Filippi, M.C.C. & Araújo, L.G. 2013. Increased enzymatic activity in rice leaf blast suppression by crude extract of *Epicoccum* sp. *Tropical plant pathology*, 38: 1–17.
- Shelar, G.B. & Chavan, A.M. 2015. Myco-synthesis of silver nanoparticles from *Trichoderma harzianum* and its impact on germination status of oil seed. *Biolife*, 3:109–113.
- Singh, P., Singh, A., Singh, H. & Dhakad, B. 2012. Biological control of rice blast disease with *Trichoderma harzianum* in direct seeded rice under medium low land rainfed conditions. *Environment and Ecology*, 30: 834–837.
- Shoresh, M., Yedidia, I. & Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene Signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95: 76–84.
- Soltani Nejad, M., Shahidi Bonjar, G.H., Khatami, M., Amini, A. & Aghighi, S. 2017. In vitro and in vivo antifungal properties of silver nanoparticles against *Rhizoctonia solani*, a common agent of rice sheath blight disease. *IET Nanobiotechnology*, 11: 236–240.
- Soltani, A. & Torabi, B. 2014. Design and analysis of agricultural experiments with the SAS program. Mashhad University Press, Iran.
- Song, F. & Goodman, R.M. 2001. Molecular biology of disease resistance in rice. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59: 1–11.
- Song, J.J., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhalkul, K. & Soyong, K. 2018. Application of nano-particles derived from *Chaetomium elatum* ChE01 to control *Pyricularia oryzae* causing rice blast. *International Journal of Agricultural Technology*, 14: 923–932.
- Song, J.J., Soyong, K., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K. & Poeaim, S. 2020. Antifungal activity of microbial nanoparticles derived from *Chaetomium* spp. against *Magnaporthe oryzae* causing rice blast. *Plant Protection Science*, 56: 180–190.

- Sugano, S., Jiang, C.J., Miyazawa, S.I., Masumoto, C., Yazawa, K., Hayashi, N., Shimono, M., Nakayama, A., Miyao, M. & Takatsuji, H. 2010. Role of OsNPR1 in rice defense program as revealed by genome-wide expression analysis. *Plant Molecular Biology*, 74: 549–562.
- Syu, Y.Y., Hung, J.H., Chen, J.C. & Chuang, H.V. 2014. Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83: 57–64.
- Thakur, M. & Udayashankar, A.C. 2019. Lipoxygenases and Their Function in Plant Innate Mechanism. *Bioactive Molecules in Plant Defense*, 133–143.
- Tomah, A.A., Alamer, I.S.A., Li, B. & Zhang, J.Z. 2020. Mycosynthesis of Silver Nanoparticles Using Screened *Trichoderma* Isolates and Their Antifungal Activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Nanomaterials*, 10: 1955.
- Vahabi, K. & Karimi Dorcheh, S. 2014. Biosynthesis of silver nano-particles by *Trichoderma* and its medical applications. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, 29: 393–404.
- Van Loon, L.C. & Van Strien, E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55: 85–97.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 135–62.
- Vidhyasekaran, P. 2002. Bacterial disease resistance in plants: molecular biology and biotechnological applications, 452 Pp. The Haworth Press, Binghamton, NY.
- Wang, D., Weaver, N.D., Kesarwanti, M. & Dong, X. 2005. Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance *Science*, 308: 1036–1040.
- Yuan, Y., Zhong, S., Li, Q., Zhu, Z., Lou, Y., Wang, L., Wang, J., Wang, M., Li, Q., Yang, D. & He, Z. 2007. Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnology Journal*, 5: 313–324.
- Zare, F. 2017. Study of the ability of some *Trichoderma* strains in inducing resistance to control cucumber root rot. MSc. Thesis. Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan. (In Persian with English summary).

Investigation of the expression pattern of defense-related genes in rice plants treated with biological silver nanoparticles and *Magnaporthe oryzae*, the fungus causing blast disease**Somayeh Nazari¹, Hossein Alaei¹, Valiollah Babaeizad², Ali Momeni³**

1. Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Kerman, Iran

2. Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Mazandaran, Iran

3. Rice Research Institute of Iran, Mazandaran Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Mazandaran, Amol, Iran

Corresponding author: Somayeh Nazari, email: somayehnazarimbs@gmail.com

Received: Nov., 30, 2020

8(2) 49–70

Accepted: Aug., 03, 2021

Abstract

Blast is one of the most important and destructive rice diseases in the world. Nanoparticles are antimicrobial agents used as biological and non-biological stimulants and can induce resistance in plant against pathogens. Effects of different biological and non-biological nanoparticles on inhibition of various plant fungal pathogens has been proved. However, no study has been done about the effect of biological nanoparticles on control of this disease through induction of resistance and expression of defense genes. In this study, in addition to direct effect of biological silver nanoparticles synthesized using *Trichoderma harzianum* fungus *in vitro*, its indirect effect was investigated by inducing systemic resistance in susceptible local Tarom cultivar on pathogenic fungus *Magnaporthe oryzae* under greenhouse conditions. For this purpose, expression of several important defense genes investigated in biological silver nanoparticle-treated plants in comparison with control plant (without biological silver nanoparticle) using real-time qPCR technique at different times after pathogen inoculation. The results showed a positive effect of different concentrations of biological nanoparticles in reduction of pathogen growth in comparison with the control treatment so that the amount of inhibition of pathogen growth in different concentrations (36, 27, 18, 9, 4.5 ppm) was 92, 81, 56, 28 and 7 percent compared to the control treatment, respectively. Phenotypic study of rice plant interaction with the fungus causing blast disease in presence of biological nanoparticle showed that there was no significant difference between the disease severities in biological nanoparticle-treated plants compared to control plants. Also, accumulation of transcripts of NPR1, PR2, PR3 and LOX genes between two mentioned treatments did not show significant increase. Therefore, indirect effect of biological silver nanoparticle on pathogenic fungus by induced resistance and increasing the rice plant defense genes is not considerable.

Keywords: induced resistance, inducer, pathogen, PR genes, silver nitrate, *Trichoderma*
