Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

# Investigation of pathogenesis-related genes expression in rice symbiont with *Trichoderma harzianum* after inoculation with *Magnaporthe oryzae* fungus

**Somayeh Nazari**

PhD Candidate, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran. E-mail: somayehnazarimbs@gmail.com

**Hossein Alaei**

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Biotechnology Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran. E-mail: hossein.alaei@vru.ac.ir

**Valiollah Babaeizad**

Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail: v.babaeizad@sanru.ac.ir

**Ali Moumeni**

Associate Professor, Department of Seed Breeding and Preparation, Rice Research Institute of Iran, Mazandaran Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Amol, Iran. E-mail: amoumeni@areo.ir

## *Abstract*

### Objective

Rice is one of the most important crops in the world, which occupies a large area of arable land. Blast disease is one of the most important and destructive rice diseases, which reduces production of this product. Due to environmental pollution caused by overuse of fungicides to control this disease and on the other hand, the pathogen resistance to these chemicals, development of better and healthier strategies to control this pathogen is necessary. Biological control of plant diseases using antagonists can be a promising alternative method.

### Materials and methods

In this study, indirect effect of *Trichoderma harzianum* fungus on pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*, under greenhouse conditions was investigated by induction of systemic resistance in susceptible Tarom cultivar. For this purpose, expression of several important defense genes was investigated using real-time qPCR technique in plants symbiont with *Trichoderma*

compared to control plants (without *Trichoderma*) at different times after infection with pathogenic fungi.

**Results**

The results showed increasing expression level of NPR1, PR2 and PR3 genes after pathogen inoculation in plants symbiont with *Trichoderma* compared to the control plants that there was statistically significat difference about PR2 and PR3 genes. Nevertheles in a number of times, there was no significant difference in expression level of the evaluated genes between two treatments. Examination of various morphological traits such as root, stem and leaf dry weight, root length, stem diameter and plant height showed an increase in plants symbiont with *Trichoderma* compared to control plants (without *Trichoderma*), although this difference was not significant about these traits except for plant height. Chlorophyll a and b levels were also measured as physiological traits in both treatments. Although amount of chlorophyll a was higher in plants symbiont with *Trichoderma* than control plants, but no significant difference was observed. Phenotypic study of interaction of rice plant and pathogen in presence of *Trichoderma* showed a significant difference about disease severity in plants symbiont with *Trichoderma* compared to control plants.

**Conclusions**

These results could somewhat indicate the systemic protection of the rice plant against *M. o*ryzae due to symbiosis of the plant root with *Trichoderma harzianum* and induction of resistance and increase in pathogenesis-related genes, but this is not enough. Therefore, it is necessary to repeat greenhouse experiment to ensure that there is a significant difference in expression of the studied genes between symbiotic and control plants.

**Keywords:** Blast disease, Defense enzymes, Gene expression, Rice, Symbiont fungus

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Nazari S, Alaei H, Babaeizad V, Moumeni A (2021) Investigation of pathogenesis-related genes expression in rice symbiont with *Trichoderma harzianum* after inoculation with *Magnaporthe oryzae* Fungus. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (3), 107-130.

*Agricultural Biotechnology Journal* 13 (3), 107-130. DOI: 10.22103/jab.2021.17594.1318

Received: July 23, 2021. Accepted: August 24, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

# بررسی بیان ژن‌های مرتبط با بیماریزایی در برنج همزیست‌شده با قارچ *Trichoderma harzianum* پس از تلقیح با قارچ *Magnaporthe oryzae*

**سمیه نظری**

دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران. رایانامه: somayehnazarimbs@gmail.com

**حسین علائی**

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران. رایانامه: hossein.alaei@vru.ac.ir

**ولی‌اله بابائی زاد**

دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: v.babaeizad@sanru.ac.ir

**علی مومنی**

دانشیار، گروه اصلاح و تهیه بذر، موسسه تحقیقات برنج کشور، معاونت مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، آمل، ایران. رایانامه: amoumeni@areo.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲

## چکیده

**هدف:** برنج از مهم‌ترین گیاهان زراعی دنیا است که سطح وسیعی از اراضی زراعی قابل کشت را به خود اختصاص داده است. بیماری بلاست از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های برنج می‌باشد که موجب کاهش تولید این محصول می‌گردد. به دلیل آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از مصرف بی‌رویهٔ قارچکش‌ها جهت کنترل این بیماری و از طرفی مقاومت بیمارگر به این مواد شیمیایی، توسعهٔ راهکارهای بهتر و سالم‌تر برای کنترل این بیمارگر ضروری به نظر می‌رسد. کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی با استفاده از آنتاگونیست‌ها می‌تواند یک روش جایگزین امیدبخش باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تأثیر غیرمستقیم قارچ *Trichoderma harzianum* بر قارچ بیمارگر *Magnaporthe oryzae* در شرایط گلخانه از طریق القاء مقاومت سیستمیک در رقم حساس طارم محلی بررسی شد. بدین منظور، بیان چند ژن

مهم دفاعی در گیاهان همزیست شده با تریکودرما و گیاهان شاهد (فاقد تریکودرما) در زمان‌های مختلف پس از تلقیح بیمارگر با استفاده از روش Real-time qPCR مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** نتایج حاکی از افزایش سطح بیان ژن‌های NPR1، PR2 و PR3 پس از تلقیح بیمارگر در گیاهان همزیست‌شده با تریکودرما در مقایسه با گیاهان شاهد بود که در مورد ژن‌های PR2 و PR3 از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود دا شت. با این وجود در بعضی از زمان‌ها، اختلاف معنی‌داری در سطح بیان ژن‌های مورد ارزیابی بین دو تیمار مشاهده نشد. بررسی صفات مرفولوژیکی مختلف از قبیل وزن خشک ریشه، ساقه و برگ، طول ریشه، قطر ساقه و ارتفاع بوته حاکی از افزایش آن‌ها در گیاهان همزیست شده در مقایسه با گیاهان شاهد بود هر چند این اختلاف بجز صفت ارتفاع بوته در مورد بقیه صفات معنی‌دار نبود. میزان کلروفیل a و b نیز بعنوان صفات فیزیولوژیکی در هر دو تیمار اندازه‌گیری شد. اگرچه مقدار کلروفیل a در گیاهان همزیست شده بیشتر از گیاهان شاهد بود اما اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بررسی برهمکنش گیاه برنج و بیمارگر در حضور تریکودرما نشان داد که اختلاف معنی‌داری از نظر شدت بیماری بین گیاهان همزیست‌شده و گیاهان شاهد وجود دارد به طوری که همزیستی گیاهان با تریکودرما موجب کاهش شدت بیماری در مقایسه با گیاهان شاهد گردید.

**نتیجه‌گیری:** این نتایج می‌تواند تا حدودی بیانگر حفاظت سیستمیک گیاه برنج در مقابل قارچ *M. oryza* در اثر همزیستی ریشهٔ گیاه با قارچ *T. harzianum* و در نتیجه، القاء مقاومت و افزایش ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی باشد اما کافی نیست. بنابراین، لزوم تکرار آزمایش گلخانه و در نتیجه، اطمینان از وجود اختلاف معنی‌دار در بیان ژن های مورد مطالعه بین گیاهان همزیست‌شده و گیاهان شاهد ضروری به نظر می‌رسد.

**کلیدواژه‌ها:** آنزیم‌های دفاعی، برنج، بیان ژن، بیماری بلاست، قارچ همزیست.

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** نظری سمیه، علائی حسین، بابائی زاد ولی‌اله، مومنی علی (۱۴۰۰) بررسی بیان ژن‌های مرتبط با بیماریزایی در برنج همزیست‌شده با قارچ *Trichoderma harzianum* پس از تلقیح با قارچ *Magnaporthe oryzae*. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۳)، ۱۳۰-۱۰۷.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

**مقدمه**

برنج (*Oryza sativa* L.) از مهم‌ترین محصولات غذایی انسان در جهان می‌باشد. با این وجود، بیماری‌های برنج از جمله بلاست، که توسط قارچ *Magnaporthe oryzae* ایجاد می‌شود، سبب کاهش تولید این محصول می‌گردد (El-Elamawi & Shafey 2013; Ou 1985) مدیریت این بیماری از طریق کشت ارقام مقاوم، مصرف قارچکش‌ها و عملیات زراعی صورت می‌گیرد اما، با توجه به حساس بودن اغلب ارقام برنج به نژادهای مختلف این قارچ در نتیجهٔ متغیر بودن بیمارگر (Roy-Barman & Chattoo 2005)، ایجاد مقاومت بیمارگر در برابر قارچکش‌ها و همچنین تهدید سلامتی انسان و محیط (El-Elamawi & Shafey 2013)، توسعهٔ راهکار(های) بهتر و سالم‌تر برای کنترل این بیمارگر ضروری به نظر می‌رسد. کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی با استفاده از آنتاگونیست‌ها می‌تواند یک روش جایگزین امیدبخش باشد (Benitez et al. 2004). تریکودرما مشهورترین و مؤثرترین جنس قارچی در زمینهٔ کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی است (Harman et al. 2004). علاوه بر توانایی *Trichoderma* spp. در حمله یا جلوگیری از رشد بیمارگرهای گیاهی به صورت مستقیم، آن‌ها همچنین از طریق کلونیزاسیون ریشهٔ گیاه موجب القاء مقاومت سیستمیک و فعال نمودن بیان ژن‌های درگیر در سیستم دفاعی گیاه در برابر انواع بیمارگرهای گیاهی شده و تأثیر قابل توجه‌ای بر رشد و توسعهٔ گیاه دارند (Shoresh et al. 2010; Sood et al. 2020; Gomes et al. 2017; Silva et al. 2019; Ghoniem et al. 2021). تریکودرما از طریق مسیرهای وابسته به جاسمونیک اسید–اتیلن و بیان ژن‌های دفاعی منجر به ایجاد ISR[1] شده و پاسخ‌های اولیه[2] در گیاه را آغاز می‌کند (Harman et al. 2004; Hermosa et al. 2012). مدارکی از تأثیرات مقاومت القائی از طریق گونه‌های مختلف تریکودرما در گیاهان مختلف تک لپه و دولپه در برابر بیمارگرهای مختلف قارچی و باکتریایی جمع‌آوری شده است (Harman et al. 2004). شاید اولین نمایش واضح از مقاومت القاءشده توسط تریکودرما توسط Bigirimana et al. (1997) چاپ شده باشد. آن‌ها نشان دادند که تیمار خاک با جدایهٔ T-39 قارچ *T. harzianum*، برگ‌های لوبیا را به بیماری‌های ایجادشده توسط قارچ‌های بیمارگر *Botrytis cinerea* و *Colletotrichum lindemuthianum* مقاوم نمود، با وجود این که T-39 فقط بر روی ریشه‌ها حضور داشت. تیمار خاک با همین جدایه موجب کاهش ۹۰–۷۵ درصدی قارچ *Sphaerotheca fusca*، عامل بیماری سفیدک پودری خیار گلخانه‌ای گردید و نشان داد که فعالیت این جدایه در کنترل بیماری از طریق مقاومت القائی می‌باشد (Purwantisari et al., 2018a). جدایهٔ *T. harzianum* (T9) موجب القاء مقاومت در گیاهان گوجه فرنگی و کاهش ۶۹/۳۲ درصدی لکه باکتریایی حاصل از باکتری *Xanthomonas campestris* pv. Vesicatoria دو هفته بعد از تلقیح گردید (Saksiriraz et al. 2009). تیمار خاک کشت شده با بذر سیب‌زمینی با سوسپانسیون کنیدی قارچ *Trichoderma viride* موجب القای مقاومت سیستمیک و کاهش شدت بیماری بلایت برگی با عامل *Phytophthora infestans* و افزایش محصول سیب‌زمینی گردید (Purwantisari et al.

[1] Induced systemic resistance
[2] Priming

2018b). تیمار گیاه گندم نان با قارچ *T. harzianum* به همراه تیمار خارجی با متیل جاسمونات، موجب القاء علامت دهی دفاعی وابسته به جاسمونیک اسید و یا سالسیلیک اسید[1] بعد از تلقیح قارچ بیمارگر *Bipolaris sorokiniana* و در نتیجه، افزایش مقاومت به بیماری لکه سوختگی گندم از طریق تحریک فعالیت‌های آنزیمی و تجمع ترکیبات فنولی گردید (Singh et al. 2019). بنابراین، اطلاعات مشخص می‌کند که مقاومت القائی سیستمیک از مهم‌ترین اجزای کنترل بیماری‌های گیاهی توسط *Trichoderma* spp. می‌باشد (Harman et al. 2004). به علاوه، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرآیندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi & Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی[2] یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور هم‌زمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آن‌ها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Mohammadabadi 2020). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *Escherichia coli* کشف شد (Ahsani et al. 2019a). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می باشد (Masoudzadeh et al. 2020). تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Ahsani et al. 2019b). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi 2021). با توسعهٔ روش‌های مولکولی، بتدریج خصوصیات و ویژگی‌های ژن‌های گوناگون مرتبط با مقاومت در برابر بیماری‌ها و مکانیسم‌های دخیل در مقاومت مطالعه شد. مطالعهٔ این ژن‌ها باعث شد که اهمیت و عملکرد آن‌ها در پاسخ به بیماری و کاربرد آن در گیاهان تراریخت با استفاده از مهندسی ژنتیک بیشتر شناخته شود (Persaud & Lipps 1995). ژن‌های کدکنندهٔ پروتئین‌های دفاعی مرتبط با بیماریزایی (PRs) که در بافت‌های گیاهان در استرس‌های مختلف تجمع می‌یابند، از جمله برجسته‌ترین ژن‌ها هستند که محققین بسیاری سعی نموده‌اند با افزایش بیان این ژن‌ها در گیاهان مختلف، مقاومت آن‌ها را به بیمارگرها بهبود بخشند (Makandar et al. 2006, Malnoy et al. 2007; Punja 2006). با توجه به نقش تریکودرما در القاء مقاومت در گیاه در برابر بیمارگرها، در این مطالعه، میزان بیان چندین ژن دفاعی شامل NPR1[3]، PR-2 و PR3 در سطح رونویسی در پاسخ مقاومت برنج همزیست‌شده با قارچ *T. harzianum* C.P.K 4499 در برابر عامل بیماری بلاست ارزیابی گردید. ژن NPR1 جزء اولین ژن‌هایی است که در برابر تنش‌های مختلف (حملهٔ بیمارگر و غیره) در گیاه بیان شده و افزایش بیان

[1] JA- and/or SA-dependent defense signaling
[2] DNA
[3] Nonexpressor of PR genes 1



Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

آن در افزایش بیان دیگر ژن‌های مرتبط با بیماریزایی[1] نقش دارد. ژن NPR1 واسطه اثر متقابل سالیسیلیک اسید–جاسمونیک اسید و تنظیم‌کنندهٔ مسیرهای پیام رسان SAR و ISR می‌باشد. ژن‌های PR2 و PR3 به ترتیب با سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید و همچنین از طریق بیمارگرها و الیسیتورهای مختلف در گیاه القاء می‌شوند و در مقاومت گیاه در برابر بیمارگرها نقش دارند. آنزیم‌های بتا ۱و۳ گلوکاناز و کیتیناز به ترتیب در نتیجهٔ بیان این ژن‌ها در گیاه تولید می‌شوند (Dong et al., 1998; Reymond & Farmer, 1998; Pieterse et al., 2014; Edreva, 2005; Golshani et al., 2015).

## مواد و روش‌ها

**تهیه و تکثیر قارچ تریکودرما و بیمارگر:** جدایهٔ C.P.K 4499 قارچ تریکودرما متعلق به گونه *T. harzianum* s. l.[2] (جداشده از خاک مزارع برنج استان مازندران) از کلکسیون قارچ شناسی گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه گردید. برای تکثیر قارچ از محیط کشت سیب زمینی–دکستروز–آگار[3] استفاده گردید. تعداد اسپورها با لام هموسیتومتر شمارش و برای تهیه سوسپانسیون با غلظت نهایی (غلظت $10^7$ اسپور در میلی‌لیتر) مورد استفاده قرار گرفت. جدایهٔ KBH قارچ *M. oryzae* با درجه بیماریزایی بالا جهت تلقیح گیاهچه‌های برنج از بخش تحقیقات گیاهپزشکی مؤسسه تحقیقات برنج کشور در آمل تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیه اسپور فراوان قارچ بیمارگر جهت تلقیح، از محیط کشت آردیولاف–آگار استفاده شد.

**کاشت گیاه و استقرار قارچ تریکودرما در ریشه:** بذر برنج طارم محلی، به عنوان رقم حساس به بیماری بلاست، از بخش تحقیقات اصلاح و تهیه بذر مؤسسه تحقیقات برنج کشور–معاونت مازندران (آمل) تهیه شد. به منظور حذف آلودگی‌های سطحی، بذرها با اتانول و محلول هیپوکلریت سدیم ضدعفونی و با آب مقطر سترون شسته شده و برای جوانه‌زنی درون کاغذ فیلتر مرطوب در دمای ۲۶ درجه سلسیوس قرار گرفت. بذور جوانه‌زده در سوسپانسیون تریکودرما غوطه‌ور شده و به منظور امکان برقراری اتصال اسپورهای قارچ با ریشه به مدت پنج ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر با سرعت ۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. برای پخش یکنواخت‌تر و در نتیجه، جذب بیشتر اسپور، از توئین ۲۰ (۰/۰۵ درصد) استفاده شد . برای تیمار شاهد نیز بذور دارای ریشه‌چه، داخل آب مقطر سترون غوطه‌ور شد. در ادامه، بذور تلقیح شده در گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۵ و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر حاوی خاک سیلتی–رسی سترون با pH ۷/۴ و ۱/۵ درصد مادهٔ آلی (۰/۰۸ درصد نیتروژن، به ترتیب ۴/۹۵ و ۱۳۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم فسفر و پتاسیم) کاشته شده و در شرایط گلخانه با تناوب نوری ۱۶/۸ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد به مدت چهار هفته نگهداری شدند. آبیاری خاک گلدان‌ها روزانه به صورت دستی با آب مقطر سترون انجام می‌شد.

[1] Pathogenesis related genes
[2] Senso lato
[3] PDA

**بررسی میکروسکوپی همزیستی ریشه:** دو هفته بعد از تلقیح ریشه‌ها با تریکودرما، جهت ردیابی و اثبات همزیستی تریکودرما با ریشه، چند گیاه به طور تصادفی انتخاب و ریشه آن‌ها از خاک خارج و چند مرتبه با آب شسته شد. ریشه‌ها به روش Vierheilig et al. (1998) با اندکی تغییر رنگ آمیزی شدند. قطعات ریشه به مدت چهار دقیقه با هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد جوشانده شده و سپس سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو شدند. در ادامه به همراه اسید استیک (حاوی پنج درصد جوهر پلیکان) به مدت چهار دقیقه حرارت داده شده و سپس دو مرتبه با آب مقطر سترون شستشو شدند. قطعات ریشه به مدت ۲۰ دقیقه در آب مقطر حاوی اسید استیک دو درصد و در ادامه درون آب مقطر سترون قرار داده شدند. در نهایت، قطعات رنگ‌آمیزی شده به وسیلهٔ میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند.

**تلقیح قارچ بیمارگر و نمونه‌برداری:** سوسپانسیون اسپور قارچ (غلظت $10^5$ اسپور در میلی لیتر + توئین ۲۰، ۰/۰۵ درصد) توسط افشانه دستی بر روی برگ‌های بالایی گیاهچه‌های چهار هفته‌ای، تلقیح شد. گیاهچه‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط رطوبت نسبی بالا (۹۰ درصد<) قرار گرفتند. نمونه برداری برای استخراج RNA و ارزیابی بیان ژن‌های دفاعی در فاصله‌های زمانی صفر (قبل از تلقیح بیمارگر)، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح بیمارگر و از برگ‌های بالایی (اول و دوم) گیاهچه‌های همزیست‌شده و شاهد صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله در ازت مایع قرار گرفته و سپس به فریزر۸۰ – درجه سلسیوس منتقل شدند.

**توسعهٔ بیماری و اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی:** برای بررسی توسعهٔ بیماری بلاست برنج روی برگ‌های گیاهچه در گیاهان تیمارشده با تریکودرما و شاهد، شاخص شدت بیماری[1] مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. ۱۰ روز پس از مایه‌زنی، برگ‌های جوانی که در معرض اسپورهای قارچ قرار گرفته بودند مورد ارزیابی قرار گرفته و شدت بیماری با استفاده از مقیاس صفر تا ۹ بر اساس سیستم ارزیابی استاندارد[2] مؤسسه بین المللی تحقیقات برنج[3] و طبق فرمول زیر محاسبه شد (IRRI 2013).

رابطه ۱) $\frac{\sum n \times v}{N \times V} \times 100\%$

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

صفات مورفولوژیکی اندازه‌گیری شده شامل وزن خشک ریشه، ساقه و برگ، طول ریشه و ساقه، قطر ساقه و ارتفاع بوته و صفات فیزیولوژیکی شامل اندازه گیری میزان کلروفیل a و b بود. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. برای هر تیمار سه تکرار (گلدان) در نظر گرفته شد و از هر گلدان، سه گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون t و تحلیل‌های آماری با نرم افزار SAS نسخه ۹.۱ انجام شد.

[1] Disease severity
[2] SES= Standard Evaluation System
[3] IRRI

**استخراج RNA و ساخت cDNA**: به منظور استخراج RNA از کیت RNX$^{TM}$ Plus شرکت سیناژن (Cat. No: RN77BC) استفاده گردید. برگ‌ها با استفاده از ازت مایع پودر شده و RNA کل مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده، با الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد ارزیابی شد. جهت حذف آلودگی‌های احتمالی DNA از RNA، از کیت DNaseI RNase-free شرکت Fermentas (Cat. No: EN0525) استفاده شد. cDNA مربوط به هر نمونه با کیت Revert Aid™ first strand cDNA Synthesis، آغازگر الیگومر تیمیدین (oligodT) و آنزیم Reverse Transcriptase شرکت فرمنتاز و طبق دستورالعمل‌های عنوان شده ساخته شد. جهت بررسی کیفیت cDNAهای سنتز شده از آغازگر اختصاصی GAPDH استفاده شد و نتیجهٔ PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد رویت شد.

**بررسی بیان ژن و آنالیز داده‌ها**: بررسی بیان ژن‌های دفاعی مرتبط با برنج با دستگاه StepOnePlus Real-Time PCRشرکت Applied Biosystems و با روش Quantitative real-time PCR، طبق دستورالعمل کیت(2X) Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix شرکت فرمنتاز (Cat. No: K0221) بررسی شد. هر واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر مخلوط سایبرگرین، ۴/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، یک میکرولیتر از هر آغازگر رفت[1] و برگشت[2] و یک میکرولیتر از cDNA الگو رقیق شده بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس و سپس ۴۰ چرخه شامل مرحله واسرشت‌سازی به مدت ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس و مرحله اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه در۶۰ درجه سلسیوس بود. به منظور استاندارد نمودن داده‌ها، نمونه‌ها بوسیله ژن خانه‌داری نرمال گردیدند. در این بررسی ژن GAPDH به عنوان ژن خانه‌داری[3] و ژن‌های NPR1، PR2 و PR3 به عنوان ژن‌های هدف مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). داده‌های حاصل از دستگاه در فایل اکسل وارد شده و در ادامه، نرخ بیان نسبی هر ژن بر اساس روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (Livak & Schmittgen 2001). از آنجایی که آزمایش در دو تکرار تکنیکال انجام شد، از CT نتایج PCR مربوط به هر ژن میانگین گرفته شده و برای تعیین کمیت نسخه‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

ΔΔCt= ΔCT نمونه آزمایش - ΔCT نمونه کنترل = (CT ژن هدف) - نمونه آزمایش (CT ژن خانه‌داری-CT ژن هدف) - نمونه کنترل (CT ژن خانه‌داری

## نتایج و بحث

**وضعیت همزیستی قارچ تریکودرما با ریشه گیاه برنج**: نتایج میکروسکوپی حاصل از رنگ آمیزی ریشه بیانگر استقرار قارچ *T. harzianum* در ریشهٔ برنج بود. اسپورهای تریکودرما به همراه ریسهٔ قارچ در بافت کورتکس ریشهٔ گیاهان همزیست

[1] Forward primer
[2] Reverse primer
[3] Housekeeping gene



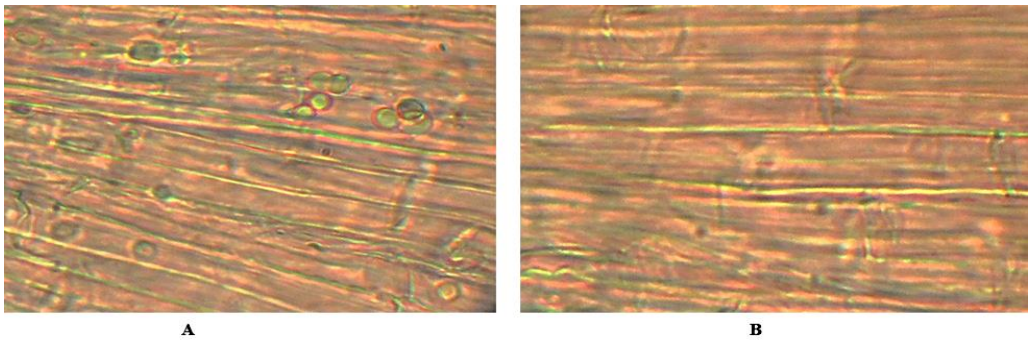
Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

به اشکال کروی و گرد در زیر میکروسکوپ مشاهده شدند، در صورتی که در ریشه‌های شاهد، اسپورهای قارچ دیده نشدند (شکل ۱).

**جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه**

**Table 1. Nucleotide sequence of used primers in this study**

| نام ژن Gene name | شماره دسترسی Accession number | توالی آغازگر Primer Sequences | منبع Reference |
|---|---|---|---|
| ژن OsGAPDH OsGAPDH Gene | AK064960 | 5'-AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT-3' آغازگر رفت Sense Primer | Jain et al. 2018 |
| | | 5'- CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT-3' آغازگر برگشت Antisense Primer | |
| ژن OsNPR1 OsNPR1 Gene | DQ450947 | 5'-AGTTGCTTTGGCGAGGATTATG-3' آغازگر رفت Sense Primer | the present study |
| | | 5'- TGTCTTTCAGGAGGTGGATTTG-3' آغازگر برگشت Antisense Primer | |
| ژن OsPR2 OsPR2 Gene | AK070677 | 5' AAGATTGTTCTGAGAAGAGATCGATCGA-3' آغازگر رفت Sense Primer | Heidarinejad et al. 2016 |
| | | 5'-GCTACGCGAAAATAGGTCTGGTAAACTT-3' آغازگر برگشت Antisense Primer | |
| ژن OsPR3 OsPR3 Gene | D16221 | 5'-TACTGTGTCCAGAGCTCGCAGTGG-3' آغازگر رفت Sense Primer | Sayari et al. 2014 |
| | | 5'-TCTGGTTGTAGCAGTCCAAGTTGG-3' آغازگر برگشت Antisense Primer | |




**شکل ۱. اسپورهای قارچ *T. harzianum* در بافت کورتکس ریشه برنج همزیست شده (A)؛ ریشهٔ برنج غیرهمزیست (B)**

**Figure 1. Spores of *T. harzianum* in cortex of symbiont rice root tissue**

**واکنش گیاهان به بیماری**: گیاهان همزیست‌شده با تریکودرما در مقایسه با گیاهان شاهد در برابر بیماری بلاست برنج حساسیت کمتری را از خود بروز دادند به طوری که شدت بیماری در تیمارها به ترتیب ۲۲/۲ و ۵۴/۳ درصد بوده است. شدت بیماری در گیاهان همزیست‌شده در مقایسه با گیاهان شاهد، ۲/۴ درصد کمتر بود. تجزیه واریانس تیمارها با آزمون t، نشان داد که بین دو تیمار از نظر شدت بیماری، اختلاف معنادار در سطح پنج درصد وجود دارد (جداول ۲ و ۳، شکل ۲).

**شکل ۲. نمونه لکه‌های ایجاد شده در برگ‌های برنج مایه‌زنی شده با *M. oryzae*. گیاه همزیست‌شده با *T. harzianum* (A) و گیاه شاهد (B)**

**Figure 2. Disease development in rice leaves inoculated with *M. oryzae* symbiont with *T. harzianum* (A); control plant (B)**

**بررسی صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی**: اگرچه میانگین وزن خشک ریشه (به ترتیب ۱/۴۴و ۰/۶۷گرم)، ساقه (به ترتیب ۲/۹۱ و ۲/۵۶ گرم) و برگ (به ترتیب ۰/۸۳ و ۰/۸۱گرم) و طول ریشه (به ترتیب ۱۹/۲ و ۱۸ سانتی‌متر) در گیاهان همزیست‌شده با تریکودرما بیشتر از گیاهان شاهد بود اما نتایج تجزیه با آزمون t نشان داد که بین دو تیمار از نظر صفت وزن خشک و طول ریشه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. اما در مورد ارتفاع بوته اختلاف بین دو تیمار در سطح یک درصد معنادار بود (به ترتیب ۷۴/۹ و ۶۸/۹). از طرفی قطر ساقه در گیاهان همزیست‌شده کمتر از گیاهان شاهد بود (به ترتیب ۴/۲ و ۴/۲۸)، اما نتایج تجزیه با آزمون t اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار نشان نداد (جداول ۲ و ۳). در مورد میزان کلروفیل (a و b)، اگرچه میزان کلروفیل a در گیاهان همزیست‌شده بیشتر از گیاهان شاهد بود اما نتایج تجزیه با آزمون t اختلاف معنی‌داری بین دو تیمار نشان نداد (جداول ۲ و ۳). افزایش محتوای کلروفیل در گیاهان برنجی که بذورشان با تریکودرما تیمار شده بود گزارش شد (Swain et al. 2018).

**جدول ۲. تجزیه واریانس شدت بیماری، صفات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان همزیست‌شده با *T. harzianum* و گیاهان شاهد در برابر *M. oryzae*.**

**Table 2. Analysis of variance of morphological triats in plants symbiont with *T. harzianum* and control plants against *M. oryzae* fungus.**

| t value | | |
|---|---|---|
| 0.0406* | شدت بیماری Disease severity | |
| 0.1170ns | ریشه Root | وزن خشک Dry weight |
| 0.3306ns | ساقه Stem | |
| 0.7742ns | برگ Leaf | |
| 0.1905ns | طول ریشه Root length | |
| 0.5402ns | قطر ساقه Stem diameter | |
| 0.0030** | ارتفاع بوته Plant height | |
| 0.3394ns | a | کلروفیل Chlorophyll |
| 0.9479ns | b | |

**ns، ** و * به ترتیب عدم معنی داری؛ معنی دار در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد.**

**ns, ** and * respectively none significant, significant at 1% and 5% probability level.**

**جدول ۳. مقایسه میانگین شدت بیماری، صفات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان همزیست‌شده با *T. harzianum* و ‘گیاهان شاهد در برابر *M. oryzae***

**Table 3. Means Comparisons for disease severity, morphological and physiological triats in plants symbiont with *T. harzianum* and control plants against *M. oryzae* fungus**

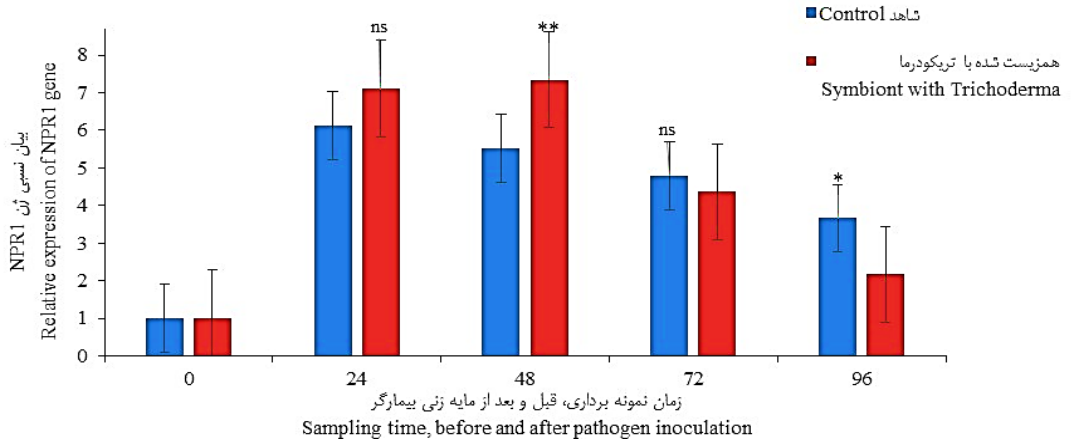
| شاهد Control | تیمار Treatment | | |
|---|---|---|---|
| 54.317 b | 22.217 a | شدت بیماری Disease severity | |
| 0.7667 a | 1.4467 a | ریشه Root | وزن خشک Dry weight |
| 2.5667 a | 2.9167 a | ساقه Stem | |
| 0.81 a | 0.8333 a | برگ Leaf | |
| 18 a | 19.222 a | طول ریشه Root length | |
| 4.2844 a | 4.2067 a | قطر ساقه Stem diameter | |
| 68.889b | 74.889a | ارتفاع بوته Plant height | |
| 0.8457 a | 2.1037 a | a | کلروفیل Chlorophyll |
| 3.1387 a | 3.034 a | B | |

**در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف متفاوت هستند، بر اساس آزمون t اختلاف معنی‌داری دارند.**

**Mean in each column followed by different letters, are significantly different using t test.**

**الگوی بیان ژن NPR1:** میزان بیان ژن NPR1 درگیاهان همزیست‌شده با تریکودرما و گیاهان شاهد در ۲۴ ساعت پس از تلقیح *M. oryzae* افزایش یافت به طوری که گیاهان همزیست‌شده ۷/۱۱ برابر نسبت به زمان صفر افزایش بیان نشان دادند که این افزایش رونوشت در گیاهان شاهد ۶/۱۳ برابر بود. با این وجود، افزایش بیان این ژن در ساعت ۲۴ درگیاهان همزیست‌شده نسبت به گیاهان شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. عواملی از قبیل افزایش غلظت مایهٔ تلقیح، و تکرار دفعات تلقیح قارچ تریکودرما و شرایط دمایی مناسب و استاندارد گلخانه که در کلونیزاسیون بهتر و موفق‌تر قارچ تریکودرما در ریشهٔ گیاه مؤثر می‌باشد، ممکن است در افزایش هر چه بیشتر بیان ژن در گیاهبان همزیست‌شده نسبت به گیاهان شاهد و در نتیجه، اختلاف آماری معنی‌دار بین دو تیمار تأثیرگذار باشد. بیشینهٔ بیان در گیاهان همزیست‌شده، ۴۸ ساعت پس از تلقیح و در گیاهان شاهد، ۲۴ ساعت پس از تلقیح بوده است. میزان بیشینه ترانوشت این ژن در گیاهان همزیست‌شده، ۷/۳۴ برابر و در گیاهان شاهد، ۶/۱۳ برابر نسبت به زمان صفر افزایش یافت. مقایسه میزان رونوشت در زمان اوج بیان در گیاهان همزیست‌شده، حدود ۱/۲ برابر گیاهان شاهد بود. میزان رونوشت ژن NPR1 درگیاهان همزیست‌شده، ۷۲ ساعت بعد از تلقیح نسبت به ۴۸ ساعت روند کاهشی مشاهده شد و در گیاهان شاهد ۴۸ ساعت بعد از تلقیح نسبت به ۲۴ ساعت روند کاهشی را نشان داد (شکل ۳). NPR1 واسطه اثر متقابل سالیسیلیک اسید–جاسمونیک اسید و تنظیم‌کنندهٔ مسیرهای پیام رسان SAR[1] و ISR می‌باشد (Pieterse et al. 2014). NPR1 یک تنظیم‌کنندهٔ کلیدی مسیر SAR می‌باشد که با افزایش اتصال DNA ی فاکتور رونویسی TGAs به عناصر پاسخ دهنده به SA[2] در پروموتور ژن‌های PR، نقش مهمی در فعال کردن این ژن‌ها بازی می‌کند (Pieterse & Van loon 2004; Feng et al. 2011). همولوگ NPR1 در برنج، OSNR1/NH1 نام دارد (Yuan et al. 2007). بررسی الگوی بیان این ژن در گیاهان همزیست‌شده، نشان دهندهٔ افزایش بیان در ۲۴ ساعت پس تلقیح بود که میزان رونوشت در ۴۸ ساعت بعد از تلقیح به اوج میزان خود رسید و اختلاف معنی‌داری را نسبت بـه گیاهان شاهد نشان داد. افزایش سریع و بالای ژن دفاعی NPR1 در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تلقیح بیمارگر، جهت مقابله با حمله و گسترش هیف مهاجم[3] قارچ به اولین سلول گیاهی می‌باشد (Ribot et al. 2008). NPR1برای ISR وابسته به JA/ET که از طریق بسیاری از PGPR[4]ها و PGPF[5]ها ایجاد می‌شود، لازم می‌باشد (Pieterse et al. 2014).

[1] Systemic acquired resistance
[2] SA-responsive
[3] Invasive hyphe
[4] Plant Growth Promoted Rhizobacteria
[5] Plant Growth Promoted Fungi

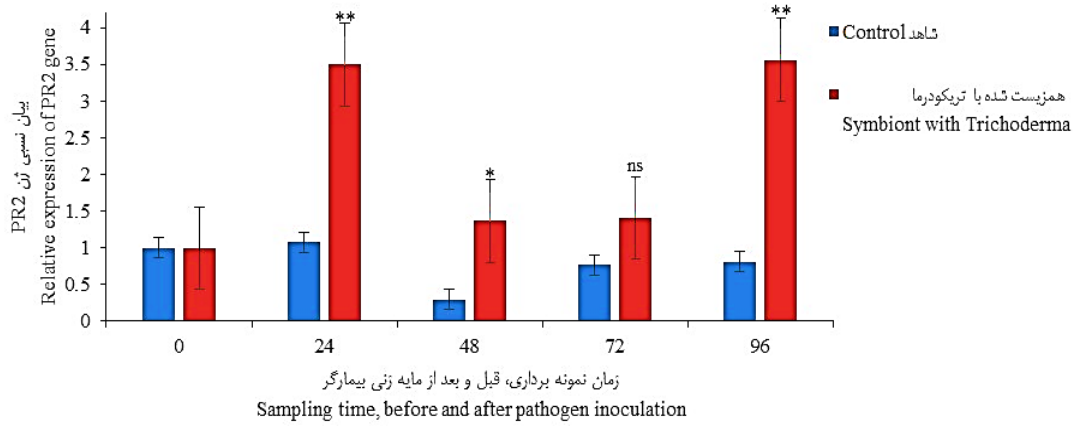



**شکل ۳. سطح بیان ژن NPR1 در گیاهان همزیست‌شده با *T. harzianum* و گیاهان شاهد تلقیح شده با قارچ *M.oryzae*. ns، ** و * به ترتیب عدم معنی داری؛ معنی دار در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد**

**Figure 3. Expression level of NPR1 gene in plants symbiont with *T. harzianum* and control plants under infection with *M*. oryzae. ns, ** and * respectively none significant, significant at 1% and 5% probability level**

**الگوی بیان ژن PR2:** میزان بیان ژن PR2 درگیاهان همزیست‌شده با تریکودرما و گیاهان شاهد در ۲۴ ساعت پس از تلقیح *M. oryzae* افزایش یافت به طوری که گیاهان همزیست‌شده ۳/۴۹ برابر نسبت به زمان صفر افزایش بیان نشان دادند که این افزایش رونوشت در گیاهان شاهد ۱/۰۸ برابر بود. در نتیجه، میزان رونوشت ژن در گیاهان همزیست شده با ۳/۲ برابر افزایش، اختلاف معنی‌داری را با گیاهان شاهد نشان داد. بیشینهٔ بیان در گیاهان همزیست‌شده، ۹۶ ساعت پس از تلقیح و در گیاهان شاهد، ۲۴ ساعت پس از تلقیح بوده است. میزان بیشینهٔ ترانوشت این ژن در گیاهان همزیست‌شده، ۳/۵۶ برابر و در گیاهان شاهد، ۱/۰۸ برابر نسبت به زمان صفر افزایش یافت. میزان ترانوشت ژن PR2 در گیاهان همزیست‌شده، ۳/۳ برابر بیشتر از گیاهان شاهد در زمان اوج بیان بود. میزان رونوشت ژن PR2 در گیاهان همزیست‌شده ۴۸ ساعت بعد از تلقیح نسبت به ۲۴ ساعت روند کاهشی را نشان داد اما نسبت به گیاهان شاهد با ۴/۶ برابر افزایش، اختلاف معنی‌داری را در این ساعت نشان داد. میزان رونوشت در گیاهان همزیست‌شده در ساعت ۹۶ افزایش یافته و با افزایش ۴/۴ برابری اختلاف معنی‌داری را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد اما در گیاهان شاهد، تقریبا در تمامی ساعات نمونه‌برداری شده افزایش بیان مشاهده نشد (شکل ۴). پروتئین‌های PR2 که به بتا ۱-۳ گلوکانازها شهرت دارند معمولا بعد از حملهٔ بیمارگر به گیاه و یا تحت تنش‌های زیستی یا غیرزیستی مختلف در گیاه القاء شده و تخریب پلی ساکارید بتا-۱و۳-گلوکان در از بین رفتن قارچ‌ها و در نتیجه، مقاومت به بیماری‌های مختلف نقش دارد (Van Loon & Van Strien 1999). بررسی نتایج الگوی بیان این ژن حاکی از آنست که در گیاهان همزیست‌شده، میزان بیان در ۲۴ ساعت پس تلقیح افزایش یافت اما در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تلقیح روند کاهشی را نشان داد، سپس در ۹۶ ساعت به اوج میزان خود رسیده

و نسبت به زمان ۷۲ ساعت حدود ۲/۵ برابر افزایش داشته است. افزایش بالای ژن دفاعی PR2 در ۷۲ ساعت بعد از تلقیح بیمارگر، جهت مقابله با گسترش هیف مهاجم از اولین سلول گیاه به سلول‌های مجاور می‌باشد (Ribot et al. 2008).

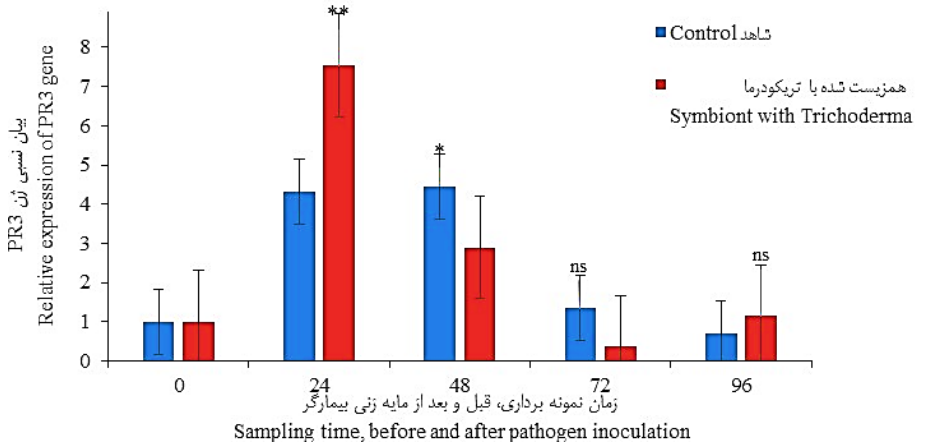



**شکل ٤. سطح بیان ژن PR2 در گیاهان همزیست‌شده با *T harzianum* و گیاهان شاهد تلقیح شده با قارچ *M. oryzae*. ns، ** و * به ترتیب عدم معنی داری؛ معنی دار در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد**

**Figure 4. Figure 3. Expression level of PR2 gene in plants symbiont with *T. harzianum* and control plants under infection with *M. oryzae*. ns, ** and * respectively none significant, significant at 1% and 5% probability level.**

**الگوی بیان ژن PR3:** میزان بیان ژن PR3 درگیاهان همزیست‌شده با تریکودرما و گیاهان شاهد در ۲۴ ساعت پس از تلقیح *M. oryzae* افزایش یافت به طوری که میزان رونوشت درگیاهان همزیست‌شده و گیاهان شاهد به ترتیب ۷/۵۴ و ۴/۳۲ برابر نسبت به زمان صفر افزایش یافت. در نتیجه، میـزان رونوشت ژن در گیاهـان همزیسـت شـده در ساعت ۲۴ بـا ۱/۷۵ برابـر افزایش، اختلاف معنی‌داری را با گیاهان شاهد نشـان داد. بیشینه بیان در گیاهان همزیست‌شده، ۲۴ ساعت پس از تلقیح و در گیاهان شاهد، ۴۸ ساعت پس از تلقیح بوده است. میزان بیشینهٔ رونوشت ژن PR3 در گیاهان همزیست‌شده، ۷/۵۴ برابر و در گیاهان شاهد، ۴/۴۵ برابر نسبت به زمان صفر افزایش یافت. مقایسهٔ میزان رونوشت در زمان اوج بیان در گیاهان همزیست‌شده ، حدود ۱/۷ برابر گیاهان شاهد بود. میزان رونوشت ژن PR3، ۷۲ ساعت بعد از تلقیح نسبت به ۴۸ ساعت روند کاهشی را نشان داد ولی در ساعت ۹۶ دوباره روند افزایشی پیدا کرد که این روند در گیاهان شاهد در ساعات ذکر شده به صورت نزولی بوده است (شکل ۵). PR3 ها جزئی از خانواده بزرگ کیتینازها می‌باشد که معمولا پس از حملهٔ بیمارگر، سطح بیان آن توسط سلول‌های گیاهی افزایش می یابد. کیتینازها دیوارهٔ سلولی قارچ را تجزیه نموده و بنابراین در مقاومت علیه این بیمارگرها نقش مهمی دارند ( Van Loon & Van Strien 1999). بررسی الگوی بیان این ژن در گیاهان همزیست‌شده، نشان دهندهٔ افزایش بیان در ۲۴ ساعت پس تلقیح بودکه به اوج میزان خود رسید. میزان بیشینهٔ بیان ژن در گیاهان همزیست‌شده بیشتر از گیاهان شاهد بود. افزایش سریع و بالای ژن دفاعیPR3 در ۲۴

ساعت بعد از تلقیح بیمارگر، جهت مقابله با حملهٔ هیف مهاجم قارچ به اولین سلول گیاهی می‌باشد (Ribot et al. 2008). 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.




**شکل ۵. سطح بیان ژن PR3 در گیاهان همزیست‌شده با *T. harzianum* و گیاهان شاهد تلقیح شده با قارچ *M. oryzae*. ns، ** و * به ترتیب عدم معنی داری؛ معنی دار در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد**

**Figure 5. Figure 3. Expression level of PR3 gene in plants symbiont with *T. harzianum* and control plants under infection with *M. oryzae*. ns, ** and * respectively none significant, significant at 1% and 5% probability level**

در این مطالعه، همزیستی قارچ تریکودرما در ریشهٔ گیاهان موجب کاهش شدت بیماری در سطح معنی‌داری پنج درصد در تیمار همزیست‌شده در مقایسه با تیمار شاهد گردید. مطالعات انجام شده توسط محققین، بیانگر تاثیر مثبت جدایه‌های مختلف تریکودرما در کاهش شدت بیماری در گیاهان تک لپه‌ای و دولپه‌ای می‌باشد. کاربرد جدایه *T. harzianum* NF-9 در ریشهٔ گیاه برنج دو هفته قبل از تلقیح بیمارگر *M. oryzae* موجب کاهش ۵۰-۳۴ درصدی بیماری گردید. کاربرد ریشه‌ای جدایهٔ *T. harzianum* T-22 در سطح مزرعه سبب کاهش ۸۰ درصدی بیماری لکه موجی گوجه فرنگی ایجاد شده توسط قارچ *Alternaria solani* در برگ‌ها گردید (Harman et al. 2004). گیاهان گوجه فرنگی که قبل از تلقیح با قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* و *Botrytis cinerea* با *Trichoderma asperellum* تیمار شدند نسبت به گیاهان شاهد (فاقد تریکودرما) شدت بیماری کمتری را نشان دادند (Herrera-Téllez et al. 2019). تعدادی از جدایه‌های تریکودرمای ریزوسفر تأثیرات مستقیمی بر روی گیاهان داشته، پتانسیل رشد و جذب مواد مغذی، درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر و تحریک دفاع‌های گیاه در برابر خسارت زنده و غیرزنده را افزایش می‌دهند (Shoresh et al. 2010). افزایش رشد گیاه از صفات مفید تریکودرما می‌باشد. افزایش

ارتفاع گیاه، تعداد برگ، تعداد پنجه و طول ریشه در گیاه برنج همزیست‌شده با تریکودرما گزارش شده است (Doni et al. 2014) . علاوه بر این، در گیاهان دیگر تلقیح شده با تریکودرما از قبیل گوجه فرنگی، سویا، پنبه و غیره نیز افزایش رشد مشاهده شده است (Hidangmayum & Dwivedi 2018). در این مطالعه، جدایهٔ تریکودرما موجب افزایش ارتفاع گیاهچه در سطح معنی‌داری یک درصد در گیاهان همزیست‌شده نسبت به گیاهان شاهد شد. اگرچه این افزایش در دیگر صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی اندازه‌گیری شده معنی دار نشد اما در مقایسه با گیاه شاهد افزایش داشته است. در مورد الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه، نتایج نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها پس از تلقیح بیمارگر در گیاهان همزیست‌شده با تریکودرما سریع‌تر از گیاهان شاهد افزایش یافت. نتایج نشان می‌دهد که قارچ *T. harzianum* از طریق مکانیسم مقاومت سیستمیک سبب القاء سریع و زودهنگام این ژن‌ها در گیاه شده تا از میزبان در برابر خسارات ناشی از قارچ *M. oryzae* محافظت نماید .Li et al (2006) 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. .Quilis et al (2008) نشان دادند که بیان ساختاری ژن NPR1 آرابیدوپسیس در برنج، افزایش مقاومت درمقابل *M. oryzae* را به همراه داشته و مدرکی برای نقش احتمالی OsNPR1 در مقاومت پایهٔ برنج به قارچ بلاست فراهم می‌کند. .Feng et al (2011) ثابت کردند که OsNPR1 نقش اساسی در مقاومت پایهٔ برنج به *M. oryzae* بازی می‌کند. بیان بیش از حد OsNPR1 در برنج به طور مهمی افزایش بیان ژن‌های PR و در نتیجه، افزایش مقاومت به بیماری بلاست برنج را به همراه داشت. مطالعات گوناگون نشان داد که کلونیزاسیون ریشه توسط استرین‌های مختلف تریکودرما منتج به افزایش سطوح آنزیم‌های گیاهی مرتبط با دفاع از قبیل β-1,3 گلوکانازها می‌شود (Harman et al. 2004). گونه‌های مختلف تریکودرما موجب القاء مقاومت در تعدادی از گیاهان دولپه و تک لپه در مقابل بیمارگرهای متعدد قارچی، باکتریایی و حتی ویروسی شدند. در سطح مولکولی، مقاومت به بیمارگرهای مختلف به خاطر افزایش فعالیت مکانیسم‌های دفاعی آنزیم‌هایی از قبیل گلوکاناز و پروتئین‌های PR می‌باشد (Waghunde et al. 2016). افزایش بیان ژن‌های PR از قبیل گلوکاناز و کیتیناز به خاطر بیان بیش از حد OsNPR1 در برنج، سبب افزایش مقاومت به بیماری بلاست برنج گردید (Feng et al. 2011; Kim et al. 2004). افزایش فعالیت آنزیم‌های گلوکاناز و کیتیناز در ارقام برنجی که تحت شرایط گلخانه، ۴۸ ساعت قبل از تلقیح جدایهٔ پرآزار *M. oryzae* با جدایهٔ غیرپرآزار همین قارچ تیمار شده اند مشاهده گردید (Filippi et al. 2014). همچنین در آزمایشی دیگر در گیاهانی که برگ‌های پایینی با جدایهٔ غیر پرآزار *M. oryzae* تیمار و سپس برگ بالایی با جدایهٔ پرآزار تلقیح شد، ارزیابی بیماری ۹ روز بعد از تلقیح بر روی برگ سوم، افزایش و کاهش درصد سطح برگ آلوده را به ترتیب در تیمارهایی که فقط با جدایهٔ پر آزار تلقیح شده بودند و تیمارهایی که قبل از تلقیح، با جدایهٔ غیرپرآزار تیمار شدند را نشان داد. این مطالعه علاوه بر کاهش شدت بیماری، همچنین فعالیت سیستمیک و القاء مقاومت را در پاسخ به تیمار جدایهٔ غیرپرآزار بر روی برگ پایین‌تر نشان داد (Filippi et al. 2014). تیمار JA و ET، ۴۸ ساعت قبل از تلقیح قارچ *P. oryzae* موجب القاء مقاومت از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی شامل گلوکاناز و کیتیناز و در نتیجه، کاهش نشانه‌های بلاست در رقم

گندم حساس به این بیماری گردید (Rios et al. 2014). کاربرد عصاره خام[1] قارچ *Epicoccum* sp. (غلظت ۴۰۰۰ پی پی ام) ۴۸ ساعت قبل از تلقیح بیمارگر *M. oryzae* موجب القاء مقاومت و سرکوب بلاست برگ در شرایط گلخانه شد. فعالیت آنزیم β-1,3-glucanase، ۲۴ ساعت پس از تلقیح بیمارگر، دوره بحرانی و مهم برای سرکوب آلودگی که طی آن قارچ فرآیند نفوذ را شروع می‌کند، در گیاه افزایش یافت. عصاره بر روی فازهای اولیه آلودگی تأثیر گذار نبود زیرا اسپورهای بیمارگر جوانه زده و آپرسوریوم تشکیل دادند ولی قادر به نفوذ نبودند (Sena et al. 2013). مطالعات نشان داد که گیاهان تراریخت با بیان بالای کیتیناز به تنهایی و یا همراه با سایر پروتئین‌های PR، سطوح بالایی از مقاومت به آلودگی قارچی یا توسعهٔ علائم بیماری را نشان می‌دهند. بیان بالای پروتئین تراریخت کیتیناز می‌تواند به طور مستقیم یا غیرمستقیم سبب مقاومت به بیمارگرهای قارچی شود (Jwa et al. 2006; Feng et al. 2011). مطالعات گوناگون نشان داد که کلونیزاسیون ریشه توسط استرین‌های مختلف تریکودرما منتج به افزایش سطوح آنزیم‌های گیاهی مرتبط با دفاع از قبیل کیتینازها می‌شود (Harman et al. 2004). گونه‌های مختلف تریکودرما موجب القاء مقاومت در تعدادی از گیاهان دولپه و تک لپه در مقابل بیمارگرهای متعدد قارچی، باکتریایی و حتی ویروسی شدند. در سطح مولکولی، مقاومت به بیمارگرهای مختلف به خاطر افزایش فعالیت مکانیسم‌های دفاعی آنزیم‌هایی از قبیل کیتیناز و پروتئین‌های PR می‌باشد (Waghunde et al. 2016). گیاهان ترانسژنیک که به طور پیوسته یک ژن کیتیناز class-I، Cht-2 یا Cht-3، را بیان کردند، مقاومت مهمی در برابر دو نژاد *M. oryzae* نشان دادند (Zhang et al. 2009).

**نتیجه‌گیری:** در این تحقیق اثر غیرمستقیم قارچ *Trichoderma harzianum* به صورت همزیست با ریشهٔ گیاه برنج رقم حساس طارم در القای مقاومت سیستمیک در گیاه علیه قارچ بیمارگر عامل بیماری بلاست برنج مورد مطالعه قرار گرفته و بروز این نوع مقاومت در گیاه با برر سی شدت بیان ژن‌های PR3, PR2 و NPR1 ارزیابی شد. نتایج حا صله حاکی از آن ا ست که کلونیزاسیون ریشهٔ گیاه با قارچ تریکودرما موجب افزایش معنی‌دار ارتفاع بوته و کاهش شدت بیماری بلاست برگ در گیاهان همزیست شده نسبت به گیاهان شاهد در شرایط گلخانه شده ا ست. سطح بیان ژن‌های مرتبط با بیماریزایی پس از تلقیح بیمارگر (ساعت ۲۴) در گیاهان همزیست‌شده با تریکودرما بیشتر از گیاهان شاهد بود که در مورد ژن‌های PR2 و PR3 از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود داشت. با این وجود در بعضی از زمان‌های مورد مطالعه، اختلاف معنی‌داری در سطح بیان ژن‌های مورد ارزیابی بین دو تیمار ذکر شده مشاهده نشد. با توجه به این که بین شدت بیماری و بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی رابطهٔ عکس وجود دا شته و افزایش بیان ژن‌ها در کاهش شدت و در نتیجه، کنترل بیماری نقش دارد (Kim et al. 2015)، بنابراین به منظور تعیین نقش قوی و مؤثر جدایهٔ C.P.K 4499 قارچ*T. harzianum* همزیست با ریشهٔ گیاه برنج رقم حساس طارم محلی در القای مقاومت سیستمیک در گیاه به واسطهٔ افزایش بیان ژن‌های مورد مطالعه، لزوم تکرار(های) آزمایش گلخانه و در نتیجه، اطمینان از وجود اختلاف معنی‌دار در بیان ژن‌های مورد مطالعه بین گیاهان همزیست شده و گیاهان شاهد ضروری به نظر می‌رسد.

[1] Crude extract

به علاوه، افزایش غلظت مایهٔ تلقیح، و تکرار دفعات تلقیح قارچ تریکودرما و رعایت شرایط دمایی مناسب و استاندارد گلخانه، که در کلونیزاسیون بهتر و موفق‌تر قارچ تریکودرما در ریشهٔ گیاه مؤثر می‌باشد، می‌تواند در افزایش بیشتر بیان ژن در گیاهان همزیست شده نسبت به گیاهان شاهد و در نتیجه، وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین دو تیمار تأثیرگذار باشد. با توجه به این که گونه‌های مختلف تریکودرما در سرکوب بیماری‌های گیاهی و رشد بیمارگرها در شرایط گلخانه و مزرعه نقش مهمی بازی می‌کند (Harman et al. 2004) استفاده از گونهٔ قارچی مورد مطالعه به صورت فرمولاسیون‌های مشخص در سطح مزرعه می‌تواند در پیشگیری و یا کنترل بیماری بلاست و در نتیجه، کاهش و یا حتی عدم مصرف قارچکش‌های شیمیایی و کاهش آلودگی محیط زیست، افزایش راندمان محصول و غیره مؤثر واقع گردد. از طرفی، با توجه به این که کاربرد همزمان عوامل بیولوژیکی و ارتباط سینرژیستی آن‌ها با یکدیگر می‌تواند سبب افزایش القاء مقاومت در گیاه و کاهش هر چه بیشتر شدت بیماری گردد، می‌توان به همراه تریکودرما از باکتری‌ها و قارچ‌های مفید دیگر نیز استفاده نمود.

**سپاسگزاری:** از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان به خاطر حمایت مالی، از گروه بیماری شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به خاطر حمایت مالی و معنوی و از همکاری گروه بیماری شناسی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و مؤسسه تحقیقات برنج آمل جهت تهیه جدایه‌های قارچی و همچنین از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی و ارزشمند در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

## منابع

احسنی محمدرضا ، محمدآبادی محمدرضا ، اسدی فوزی و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۱)، ۱۵۰-۱۳۵.

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۵۰-۳۵.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.

حیدری نژاد امیر مسعود؛ بابایی زاد ولی‌اله؛ رحیمیان، حشمت اله (۱۳۹۴) مطالعه نقش ژنهای PR2 و PAL در مقاومت گیاه برنج به باکتری *Acidovorax* avenae subsp. Avenae. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۷، ۸۱-۶۷.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۱)، ۱۹۲-۱۷۷.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۶۷-۱۸۱.

**References**

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019a) Effect of Roasted Soybean and Canola Seeds on Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma (PPARG) Gene Expression and Cattle Milk Characteristics. Iran J Appl Anim Sci 9, 635-642.

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019b) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 11, 135-150 (In Persian).

Benitez T, Rincon AM, Limon MC, Codon AC (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Int Microbiol 7, 249-260.

Doni F, Isahak A, Zain CRCM et al. (2014) Formulation of *Trichoderma* sp. SL2 inoculants using different carriers for soil treatment in rice seedling growth. Springerplus 3, 532.

Elamawi RMA, El-Shafey RAS (2013) Inhibition effects of silver nanoparticles against rice blast disease caused by *Magnaporthe grisea*. Egypt J Agric Res 91, 1271-1283.

Feng J-X, Cao L, Li J et al. (2011) Involvement of OsNPR1/NH1 in rice basal resistance to blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Eur J Plant Pathol 131, 1-16.

Filippi MC, Silva GB, Silva-Lobo VL et al. (2014) Induction of resistance to rice leaf blast by avirulent isolates of *Magnaporthe oryzae*. Amazonian J Agric Environ Sci 57, 388-395.

Ghoniem AA, Abd El-Hai KM, El-khateeb AY, Eldadamony NM ET AL. (2021) Enhancing the potentiality of *Trichoderma harzianum* against *Pythium* pathogen of beans using chamomile (*Matricaria chamomilla*, L.) flower extract. Molecules 26 (4), 1178.

Gomes EV, Ulhoa CJ, Cardoza RE et al. (2017) Involvement of *trichoderma harzianum* Epl-1 protein in the regulation of *botrytis* virulenceand tomato defense-related genes. Front. Plant Sci 29 (8), 880.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A et al. (2004) *Trichoderma species*—opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol 2, 43-56.

Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E (2012) Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology 158, 17-25.

Herrera-Téllez VI, Cruz-Olmedo AK, Plasencia J et al. (2019) The protective effect of *Trichoderma asperellum* on tomato plants against *Fusarium oxysporum* and Botrytis cinerea diseases involves inhibition of reactive oxygen species production. Int. J. Mol. Sci. 20(8), 2007.

Heydari-Nezhad AM, Babaeizad V, Rahimian H (2016) Studying PR2 and PAL genes involvement in rice resistance against *Acidovorax avenae* subsp. *Avenae*. Agric Biotechnol J 7, 67-81. (in Persian)

Hidangmayum A, Dwivedi P (2018) Plant responses to *Trichoderma* spp. and their tolerance to abiotic Stresses: A review. J Pharmacogn and Phytochem 7, 758-766.

IRRI (2013) Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute, P.O. Box 933, 1099 Manila, Philippines, pp. 1-55.

Jain N, Vergish S, Khurana, JP (2018) Validation of house-keeping genes for normalization of gene expression data during diurnal/ circadian studies in rice by RT-qPCR. Sci Rep 8, 1-14.

Jwa N-S, Agrawal GK, Tamogami S et al. (2006) Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. Pl Physiol Biochem 44, 261–273.

Kim J-S, Lee J, Lee C-H et al. (2015). Activation of pathogenesis-related genes by the rhizobacterium, *Bacillus* sp. JS, which induce resistance in Tobacco plants. Plant Pathol J 31, 195-201.

Kim ST, Kim SG, Hwang DH et al. (2004) Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Proteomics 4, 3569–3578.

Li Q, Chen F, Sun L et al. (2006) Expression profiling of rice genes in early defense responses to blast and bacterial blight pathogens using cDNA microarray. Physiol Mol Pl Pathol 68, 51-60.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25, 402-408.

Makandar R, Essing JS, Schapaugh MA et al. (2006) Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of Arabidopsis NPR1. Mol Pl Microbe Interact 19, 123-129.

Malnoy M, Jin Q, Borejsza-Wysocka EE et al. (2007) Over-expression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus* X *domestica*. Mol Plant Microbe Interact 20, 1568-1580.

Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020) Effects of diets with different levels of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. Small Rumin Res 193, e106276.

Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. Agric Biotechnol J 12 (4), 167-181 (In Persian).

Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 12 (1), 177-192 (In Persian).

Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 10, 111-122 (In Persian).

Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Charachteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim Sci 7, 289-295.

Ou SH (1985) Rice Diseases. 2nd edition, Commonwealth Mycological Institute, England, pp.1-380.

Persaud RR, Lipps PE (1995) Virulence gene frequencies of *Blumeria graminis* f.sp. tritici in Ohio. Plant Dis 79, 494-499.

Pieterse CMJ, Van Loon LC (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. Curr Opin Plant Biol 7, 456–464.

Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL et al. (2014) Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. Annu Rev Phytopathol 52, 347–75.

Punja ZK (2006) Recent developments toward achieving fungal disease resistance in transgenic plants. Can J Pl Pathol 28, 298-308.

Purwantisari S, Priyatmojo A, Sancayaningsih RP et al. (2018a) Systemic inducing resistance against late blight by applying antagonist *Trichoderma Viride*. IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series 1025, 012053.

Purwantisari S, Priyatmojo A, Sancayaningsih RP et al. (2018b) The Resistance of Potatoes by Application of *Trichoderma viride* Antagonists Fungus. E3S Web Conf 73, 06014.

Quilis J, Peñas G, Messeguer J et al. (2008) The Arabidopsis AtNPR1 Inversely Modulates Defense Responses Against Fungal, Bacterial, or Viral Pathogens While Conferring Hypersensitivity to Abiotic Stresses in Transgenic Rice. Mol Pl Microbe Interact 21, 1215–1231.

Ribot C, Hirsch J, Batzergue S et al. (2008) Susceptibility of rice to the blast fungus *Magnaporthe grisea*. J Pl Physiol 165, 114-124.

Rios JA, Rodrigues FA, Debona D et al. (2014) Induction of resistance to Pyricularia oryzae in wheat by acibenzolar-S-methyl, ethylene and jasmonic acid. Trop Pl Pathol 39, 224-233.

Roy-Barman SR, Chattoo BB (2005) Rice blast fungus sequence. Curr Seq 89, 930-931.

Saksiriraz W, Chareerak P, Bunyatrachata W (2009) Induced systemic resistance of biocontrol fungus, *Trichoderma* spp. Against bacterial and gray leaf spot in tomatoes. Asian J Food Agro-Ind 2, 99-104.

Sallam NMA, Eraky AMI, Sallam A (2019) Efect of *Trichoderma* spp. On Fusarium wilt disease of tomato. Mol. Biol. Rep 46 (4), 4463-4470.

Sayari M, Babaeizad V, Tajick Ghanbari MA, 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. J Pl Prot Res 54, 36-43.

Sena APA, Chaibub AA, Côrtes MVCB et al. (2013) Increased enzymatic activity in rice leaf blast suppression by crude extract of *Epicoccum* sp. Trop pl pathol 38, 1-17.

Shoresh M, Mastouri F, Harman GE (2010) Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Annu Rev Phytopathol. 48, 21-43.

Silva RN, Monteiro VN, Steindorff AS et al. (2019) Trichoderma/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. Fungal Biol 123, 565-583.

Singh U, Malviya D, Singh S et al. (2019) *Trichoderma harzianum*- and Methyl Jasmonate-Induced Resistance to *Bipolaris sorokiniana* Through Enhanced Phenylpropanoid Activities in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). Front Microbiol. 10, 1697.

Sood M, Kapoor D, Kumar V et al. (2020) *Trichoderma*: The "Secrets" of a Multitalented Biocontrol Agent. Plants 9, 762.

Swain H, Adak T, Mukherjee AK et al. (2018) Novel *Trichoderma* strains isolated from tree barks as potential biocontrol agents and biofertilizers for direct seeded rice. Microbiol Res 214, 83–90.

Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. Agric Biotechnol J 6, 35-50.

Van Loon LC, Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol Mol Pl Pathol 55, 85-97.

Vierheilig H, Goughlan A, Wyss U, Piche Y (1998) Ink and vinegar, a simple staining technique for arbucular-mycorrhizal fungi. Appl Environ Microbiol 64, 5004-5007.

Waghunde RR, Shelake RM, Sabalpara AN (2016) Trichoderma: A significant fungus for agriculture and environment. Afr J Agric Res 11, 1952-1965.

Yuan Y, Zhong S, Li Q et al. (2007) Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. Pl Biotechnol J 5, 313–324.

Zhang Z, Li G, Li W, Song F (2009) Transgenic strategies for improving rice disease resistance. Afr J Biotechnol 8, 1750-1757.