مطالعه خصوصیات مورفولوژیکی و روابط فیلوژنتیکی در گونه *Bipolaris oryzae* و تعدادی از گونه‌های جنس *Bipolaris* به دست آمده از برنج و علف‌های هرز

MORPHOLOGICAL AND PHYLOGENETIC INVESTIGATION OF *Bipolaris oryzae* AND SOME SPECIES OF *Bipolaris* OBTAINED FROM RICE AND GRASS WEEDS

عبداله احمدپور[۱*]، محمد جوان نیکخواه[۱**]، محمد رضا نقوی[۲] و فریدون پاداشت دهکایی[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۱۴)

چکیده

بیماری لکه قهوه‌ای برنج یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی است که خسارت نسبتا قابل ملاحظه‌ای به برنج وارد می‌کند. در طی سال‌های زراعی ۱۳۹۰-۱۳۹۱، ۳۴۸ جدایه های *Bipolaris* از مزارع برنج (بذرها و برگ‌ها) و علف‌های هرز حاشیه مزارع برنج استان‌های مازندران، گیلان، گلستان، خوزستان و فارس جداسازی شد. با مطالعه خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌ها شش گونه از جنس مذکور شامل *B. oryzae*، *B. cynodontis*، *B. spicifera*، *B. bicolor*، *B. sorokiniana* و *B. neergaardii* شناسایی شد. گونه *B. oryzae* با ۳۰۳ جدایه به عنوان گونه غالب از برگ‌های دارای علایم لکه قهوه‌ای و بذرهای برنج و ۱۲ جدایه مشکوک به گونه *B. oryzae* از سوروف (*Echinochloa colona*)، پاسپالوم (*Paspalum scrobiculatum*)، ذرت، موز و گیاه گرامینه ناشناخته جداسازی شد و بقیه گونه‌های *Bipolaris* از برگ‌ها و بذرهای بدون علایم بیماری لکه قهوه‌ای برنج جداسازی شدند. تنوع مورفولوژیکی زیادی بین جدایه‌های *B. oryzae* از نظر رنگ پرگنه، شکل و ابعاد کنیدیوم‌ها دیده شد و در چهار گروه مورفولوژیکی قرار گرفتند. با این حال براساس توالی‌یابی ناحیه rDNA-ITS و ژن *gpd* جدایه-های انتخاب شده به عنوان گونه *B. oryzae* شناسایی شدند و عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج در ایران نیز گونه مذکور تشخیص داده شد و گیاهان سوروف، پاسپالوم، ذرت، موز و گیاه گرامینه ناشناخته میزبان‌های جدیدی برای گونه مذکور معرفی می‌شوند. هم‌چنین به مطالعه روابط فیلوژنتیکی گونه‌های *Bipolaris* در مطالعه حاضر براساس توالی‌یابی ناحیه rDNA-ITS و ژن *gpd* پرداخته شده است.

واژه‌های کلیدی: قارچ، تاکسونومی قارچ، بیماری‌های برنج، برنج، فیلوژنی قارچ، *Cochliobolus*

---

*: بخشی از پایان‌نامه دکتری نگارنده اول که به دانشگاه تهران ارایه خواهد شد.

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی jnikkhah@ut.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری و استاد گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲. استاد گروه بیوتکنولوژی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳. استادیار بیماری شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات برنج کشور، رشت

مقدمه

بی‌شک یکی از مهم‌ترین عواملی که می‌تواند در کاهش عملکرد برنج تأثیرگذار باشد، شیوع بیماری‌های قارچی متنوعی است که اندام‌های مختلف آن را تحت تأثیر قرار داده و باعث کاهش کمی و کیفی این گیاه می‌گردند. در این میان لکه قهوه‌ای برنج یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی است که خسارت نسبتا قابل ملاحظه‌ای به برنج وارد می‌کند. لکه قهوه‌ای برنج توسط قارچ *Bipolaris oryzae* ایجاد می‌شود که بعد از بلاست در میان بیماری‌های برگی از بیشترین اهمیت اقتصادی برخوردار است (Ou 1985, Webster & Gunnell 1992). لکه قهوه‌ای برنج از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی بذربرد برنج می‌باشد و در تمام کشورهایی که برنج کاشت می‌شود شایع است و اغلب کولتیوارهایی که در دنیا کاشته می‌شوند به بیمارگر حساس می‌باشند (Ou 1985, Webster & Gunnell 1992). بیماری لکه قهوه‌ای به دلیل بذربرد بودن، در خزانه از بذور آلوده به نشاها حمله می‌کند و باعث از بین رفتن آنها می‌شود. در مزرعه نیز از ابتدای کاشت تا زمان برداشت همواره گیاه برنج را مورد حمله قرار می‌دهد (Ou 1985).

میزان خسارت بیماری در کشورهای مختلف دنیا با توجه به شرایط آب و هوایی مختلف متفاوت می‌باشد. در ژاپن، قارچ عامل بیماری به عنوان یکی از عوامل اصلی سوختگی خوشه و سوختگی نشا در جعبه‌های نشا در نظر گرفته می‌شود (Ou 1985). اپیدمی این بیماری در سال ۱۹۴۲ میلادی در بنگال گزارش شده و میزان محصول را ۴۰-۹۰٪ کاهش داده و باعث قحطی در این منطقه شده است (Padmanabhan 1973). در آمریکا نیز خسارت قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای روی برنج وحشی در مراحل طویل شدن میانگره‌ها تا بلوغ بذور تا ۷۴٪ گزارش شده است (Johnson & Percich 1992). اگرچه این بیماری در تمام مناطق کشت برنج در ایران شایع است اما اطلاعات جامعی در مورد گسترش بیماری، گونه‌های عامل بیماری و میزان خسارت حاصل از آنها وجود ندارد.

مدیریت بیماری لکه قهوه‌ای برنج از طریق کاربرد قارچکش‌ها، کوددهی مناسب و بهداشت مزرعه انجام می‌شود (Ou 1985). برخی از گزارش‌ها حاکی از آن است که این بیماری به‌ویژه در خاک‌هایی یافت می‌شود که از نظر عناصر غذایی همچون آهن، منگنز و کلسیم، پتاسیم و سیلیسیوم دچار کمبود باشند. هم‌چنین مشخص شده است که در خاک‌هایی با غلظت بالای مواد سمی از جمله سولفید هیدروژن علایمی مشابه به علایم بیماری لکه قهوه‌ای ایجاد می‌شود و بیماری ایجاد شده تحت عنوان آکیوچی (Akiochi) خوانده می‌شود. در بسیاری از مواقع تشخیص این دو نوع بیماری با مشاهدات ظاهری مشکل یا غیر ممکن است (Ou 1985).

تا به حال ۱۲ گونه از جنس *Bipolaris* شامل گونه‌های *B. australiensis*، *B. bicolor*، *B. cynodontis*، *B. hawaiiensis*، *B. maydis*، *B. neergaardii*، *B. oryzae*، *B. setariae*، *B. sorokiniana*، *B. spicifera*، *B. victoriae* و *B. zeicola* از روی برنج در دنیا گزارش شده‌اند (Farr & Rossman 2013, Sivanesan 1987) و عامل اصلی بیماری لکه قهوه‌ای برنج نیز *B. oryzae* ذکر شده است (Ou 1985, Sivanesan 1987). هم‌چنین برنج و برنج وحشی (*Zizania palustris*) میزبان اصلی *B. oryzae* گزارش شده‌اند. به علاوه، از طریق مایه زنی مصنوعی معلوم شده است که قارچ قادر است دامنه وسیعی از تبره گندمیان شامل گندم، ذرت، جو، یولاف، ذرت خوشه‌ای، ارزن، مرغ و غیره را آلوده کند (Ou 1985). در ایران گونه‌های *B. oryzae*، *B. victoriae*،

Bipolaris sp. و *B. sorghicola*، *B. indica*، *B. bicolor* به عنوان عوامل بیماری لکه قهوه‌ای ذکر شده‌اند (Khosravi 1999, Razavi 1992, Safari Motlagh *et al.* 2005, Shamsi *et al.* 2010, Nazari 2011) و *صفری مطلق و همکاران* (Safari Motlagh 2008, Safari Motlagh & Kaviani 20008a, Safari Motlagh *et al.* 2005, Safari Motlagh *et al.* 2006) گونه *B. victoriae* را به عنوان گونه غالب در استان گیلان معرفی کرده است. در حالی که برخی محققین دیگر گونه *B. oryzae* را عامل اصلی بیماری لکه قهوه‌ای می‌دانند (Khosravi 1999, Razavi 1992, Shamsi *et al.* 2010, Nazari 2011). با این حال در ایران مطالعات جامع و منسجمی در ارتباط با تعیین گونه غالب عامل یا عوامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج در مناطق مختلف کشور و روابط فیلوژنتیکی گونه‌های احتمالی دیده نمی‌شود و اغلب مطالعات انجام شده محدود به مناطق خاصی از کشور بوده است.

لذا، به منظور تدوین برنامه‌های به‌نژادی و مدیریت کنترل بیماری، آگاهی از عوامل ایجاد کننده بیماری لکه قهوه‌ای برنج و دامنه میزبانی عامل بیماری دارای اهمیت ویژه‌ای است. تحقیق حاضر با هدف جداسازی قارچ *B. oryzae* و گونه‌های احتمالی دیگر از جنس *Bipolaris* دخیل در ایجاد بیماری لکه قهوه‌ای برنج از مناطق مهم کشت برنج در ایران، مطالعه مورفولوژیکی جدایه‌ها برای شناسایی گونه‌های احتمالی، ارزیابی روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های منتخب شناسایی شده با استفاده از توالی‌یابی ناحیه ITS (ITS1-5.8S-ITS2) و ژن گلیسرآلدهید-۳ فسفات دهیدروژناز (*GPD*) و تعیین گونه غالب عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج از مناطق مختلف کشور انجام شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی نمونه‌های قارچی

نمونه‌برداری از مزارع برنج در استان‌های مازندران (شهرستان آمل)، گیلان (شهرستان‌های رشت و آستارا)، گلستان (شهرستان گرگان)، خوزستان (شهرستان باغ ملک) و فارس (شهرستان‌های مرودشت و کامفیروز) در سال‌های زراعی ۱۳۹۰-۱۳۹۱ به روش سلسله مراتبی (hierarchical method) انجام شد (McDonald *et al.* 1999). در روش سلسله مراتبی، از ٦-٨ محل داخل مزرعه که حدود ۱۰ متر با همدیگر فاصله داشتند نمونه‌برداری صورت گرفت. داخل هر محل نمونه‌برداری ٤-٨ گیاه آلوده انتخاب و از هر کدام یک نمونه برگی دارای علایم بیماری جمع‌آوری شد. به علاوه برای جداسازی گونه‌های احتمالی دیگر از جنس *Bipolaris* دخیل در ایجاد بیماری لکه قهوه‌ای برنج از مناطق ذکر شده و مناطق دیگر استان‌های مذکور به صورت تصادفی از بذور و برگ‌های برنج مزارع مختلف و علف‌های هرز حاشیه مزارع برنج نیز نمونه‌برداری شد. اندام‌های گیاهی جمع‌آوری شده هرکدام در پاکت‌های کاغذی جداگانه به آزمایشگاه منتقل شدند. جداسازی و شناسایی نمونه‌های قارچی به مشابه مطالعات قبلی انجام گردید (Ahmadpour *et al.* 2011, 2012 a, b). نمونه‌های میکروسکوپی با بهره‌گیری از منابع معتبر (Ellis 1971, 1976, Sivanesan 1987) شناسایی و تعیین نام شدند.

تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک

در این تحقیق براساس خصوصیات مورفولوژیکی ۱۵جدایه *B. oryzae*، ۵ جدایه از گونه‌های *B. cynodontis*، *B. neergaardii*، *B. sorokiniana*

B. spicifera و *B. bicolor* از روی برنج و ۱۰ جدایه مشکوک به گونه *B. oryzae* از میزبان‌های گیاهی دیگر جهت مطالعات فیلوژنتیکی انتخاب شدند (جدول ۲). پس از استخراج دی ان ای ژنومی (Ahmadpour *et al.* 2012 a, b)، برای تکثیر ناحیه آی تی اس هسته‌ای و ژن گلیسرآلدهید-۳ فسفات دهیدروژناز (*GPD*) به ترتیب از ترکیب آغازگرهای ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') و gpd1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و gpd2 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') به عنوان آغازگرهای مستقیم (forward) و معکوس (reverse) استفاده شد (White *et al.* 1990, Berbee *et al.* 1999). واکنش PCR و توالی‌یابی محصولات تکثیر شده مشابه مطالعات قبلی انجام گردید (Ahmadpour *et al.* 2012 a, b).

برای اطمینان از صحت توالی‌های به دست آمده از هر نمونه، هر یک از توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی BLAST (Biological Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1997) با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد. برای مقایسه روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های توالی‌یابی شده، ۱۲ گونه از *Bipolaris*، چهار گونه از *Curvularia*، چهار گونه از *Exserohilum* و چهار گونه از *Drechslera* از بانک ژن (NCBI) اخذ شد و گونه *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler نیز به عنوان تاکسون outgroup انتخاب شد (جدول ۲) (Berbee *et al.* 1999, Tsukiboshi *et al.* 2005, Manamgoda *et al.* 2011). توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Clustal X v 2.0.12 همردیف شدند (Thompson *et al.* 1997). آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از روش فاصله (Distance method) انجام گردید. ماتریکس فاصله توالی‌های مرتب شده با روش پارامتر دو کیمورا (Kimura's two parameter) محاسبه شد (Kimura 1980) و با استفاده از روش NJ (Neighbor-Joining) (Saitou and Nei 1987) و با نرم‌افزار MEGA4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, v 4.0) درخت فیلوژنتیکی رسم گردید (Tamura *et al.* 2007). برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در درخت فیلوژنتیکی، مقدار اعتبارسنجی (Bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار با استفاده از این برنامه محاسبه شد. توالی‌های مربوط به جدایه‌های مختلف گونه‌های *Bipolaris* در بانک ژن ثبت شدند و رس شمار اخذ شد (جدول ۲).

نتیجه و بحث

خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌ها

در این تحقیق ۳۳٦ جدایه از جنس *Bipolaris* از روی برنج (بذرها و برگ‌ها) جداسازی شد (جدول ۱). با مطالعه خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌ها شش گونه از جنس مذکور شامل *B. oryzae*، *B. cynodontis*، *B. neergaardii*، *B. sorokiniana*، *B. spicifera* و *B. bicolor* شناسایی شدند. گونه *B. oryzae* با ۳۰۳ جدایه گونه غالب از برگ‌های دارای علایم لکه قهوه‌ای و بذور جداسازی شد و گونه‌های *B. cynodontis* (۱۷ جدایه)، *B. spicifera* (۹ جدایه)، *B. bicolor* (٤ جدایه)، *B. sorokiniana* (۲ جدایه) و *B. neergaardii* (یک جدایه) از برگ‌ها و بذرهای بدون علایم لکه قهوه‌ای جداسازی شدند (جدول ۱). به علاوه، ۱۲ جدایه مشکوک به گونه *B. oryzae* از علف‌های هرز مزارع برنج (سوروف (*Echinochloa colona*) (۳ جدایه)، پاسپالوم (*Paspalum scrobiculatum*) (٤ جدایه)، ذرت (۲ جدایه)،

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های گونه‌های مختلف جنس *Bipolaris* جمع‌آوری شده از برنج و میزبان‌های دیگر از مناطق مختلف ایران در سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱

Table 1. Hosts and geographic origin of *Bipolaris* species collected from rice and other hosts during 2011–2012 in Iran

Species	No. isolates	Host	Geographical origin
Bipolaris oryzae	315	Rice (seed and leaf), maize, muse, *Echinochloa colona*, *Paspalum scrobiculatum*, unknown grass	Amol, Rasht, Astara, Gorgan, Baghe-e-Malek
B. cynodontis	17	Rice (seed and leaf)	Amol, Rasht, Astara, Gorgan, Baghe-e-Malek
B. spicifera	9	Rice (seed and leaf)	Amol, Rasht, Astara, Gorgan, Marvdasht
B. bicolor	4	Rice (leaf)	Amol, Rasht, Sari, Baghe-e-Malek
B. sorokiniana	2	Rice (leaf)	Amol, Sari
B. neergaardii	1	Rice (leaf)	Marvdasht

موز (یک جدایه) و گیاه گرامینه ناشناخته (۲ جدایه) جداسازی شد (جدول ۱). گونه *B. oryzae* از همه مناطق نمونه‌برداری به‌جز استان فارس (مرودشت و کامفیروز) جداسازی شد (جدول ۱).

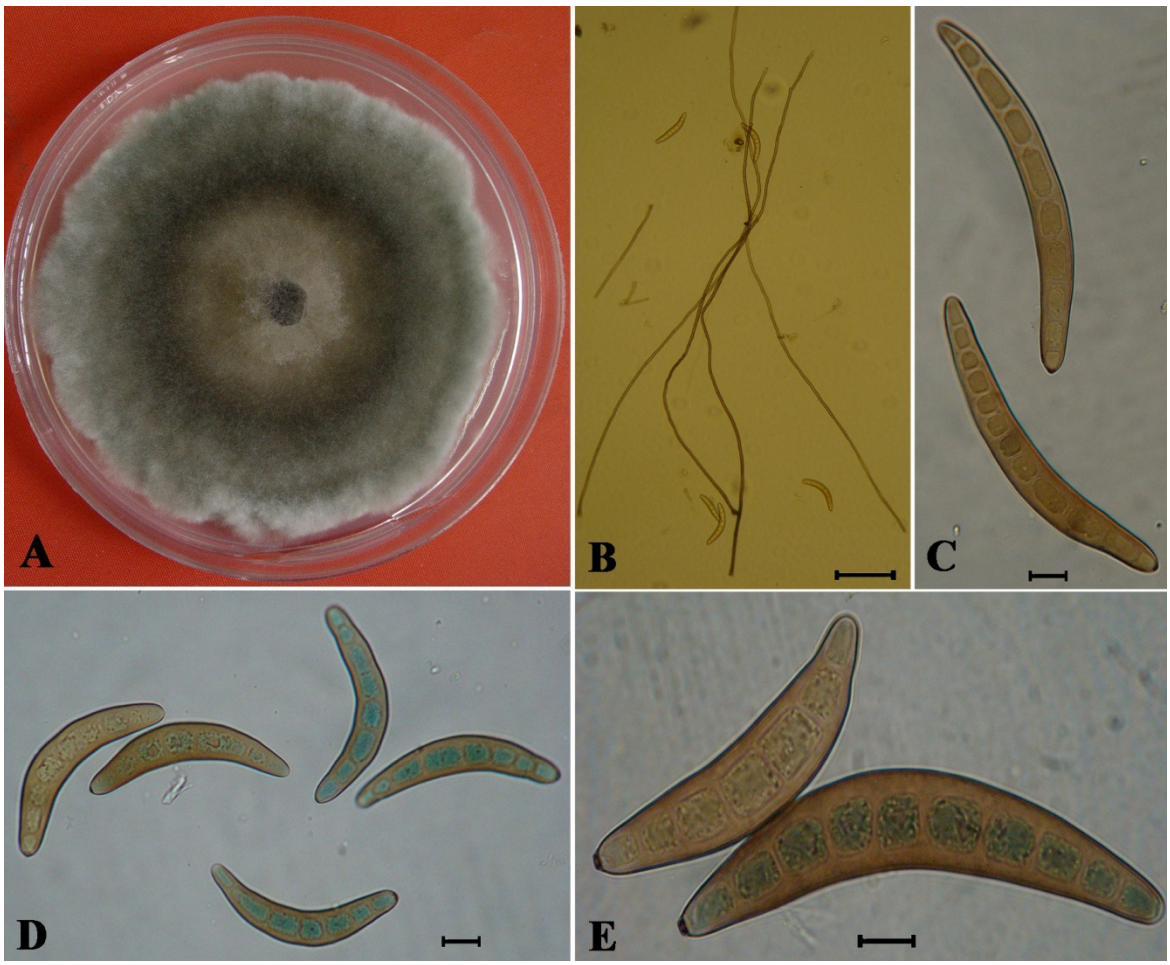
با مطالعه خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌های گونه *B. oryzae* (۳۰۳ جدایه) جدا شده از برنج چهار گروه مورفولوژیکی قابل تشخیص است. در گروه اول، جدایه‌ها دارای رنگ پرگنه زیتونی خاکستری تا خاکستری با ریسه‌های هوایی فراوان، کنیدیوفورهای طویل (تا ۸۰۰ میکرومتر)، کنیدیوم‌های دوکی شکل، به ندرت سیلندری، چماقی یا چماقی معکوس (Obclavate) به ابعاد ۲۰–۱۵ × ۱۰۰–۷۰ میکرومتر، (۱۲–) ۱۰–۷ (٦–) بند کاذب، قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای با برآمدگی (پاپیل) مشخص می‌باشند و اغلب جدایه‌ها در این گروه قرار گرفتند (۲۸۰ جدایه از ۳۰۳ جدایه) (شکل ۱ A-E). از جدایه‌های S23، S41 (جدا شده از آستارا)، K34A، K62 (جدا شده از باغ ملک)، A41، A21 (جدا شده از آمل) و R11، R31 و R82 (جدا شده از رشت) به عنوان نماینده این گروه در مطالعات فیلوژنتیکی استفاده شد (جدول ۲). به علاوه جدایه‌های جدا شده از گیاهان دیگر(۱۲ جدایه) نیز در این گروه قرار گرفتند. در گروه دوم، جدایه‌ها دارای خصوصیات مورفولوژیکی مشابه گروه اول هستند، اما کنیدیوم‌ها اغلب به شکل سیلندری، راست تا خمیده، بندرت دوکی یا به اشکال دیگر دیده می‌شوند (شکل ۲ A-D). گروه مذکور دارای ۱۳ جدایه (شش جدایه از باغ ملک، یک جدایه از رشت و شش جدایه از آمل) می‌باشند و از جدایه‌های A54 (جدا شده از آمل) و K32 (جدا شده از باغ ملک) از گروه مذکور در مطالعات فیلوژنتیکی استفاده شد (جدول ۲). گروه سوم با هفت جدایه (سه جدایه از باغ ملک، یک جدایه از آستارا و سه جدایه از آمل) با داشتن کنیدیوم‌های چماقی معکوس تا دوکی، ١٤–١٠ بند کاذب و با ابعاد بزرگ‌تر (۲۲–۱۵ × ۱۲۰–۱۰۰ میکرومتر) از جدایه‌های گروه اول و دوم متمایز می‌گردند (شکل ۲ E-H) و از جدایه‌های A13 (جدا شده از آمل)، K14 (جدا شده از باغ ملک) و S32 (جدا شده از آستارا) به عنوان نماینده گروه مذکور در مطالعات فیلوژنتیکی استفاده شد (جدول ۲). در گروه چهارم جدایه‌ها دارای رنگ پرگنه زیتونی تیره و بدون ریسه‌های هوایی، کنیدیوفورهای کوتاه (کمتر از ۵۰۰ میکرومتر) و کنیدیوم‌های دوکی تا چماقی معکوس، ۱۵–۱۰ بند کاذب

جدول ۲. منبع و رس شمارهای جدایه‌های *Bipolaris* مورد استفاده در آنالیزهای فیلوژنتیکی

Table 1. Source and accession numbers of *Bipolaris* isolates included in phylogenetic analysis

Species	Isolate/Strain	Source	GenBank ITS	GenBank *gpd*
Bipolaris australiensis	Alcorn 8320b	Berbee [a]	AF081450	AF081408
B. bicolor	CBS 690.96	Olivier et al. [b]	AF120260	-
B. cynodontis	BRIP16821	Goh & Hyde [c]	AF163093	JX276427
B. hawaiiensis	Alcorn 7612(b)-6	Berbee et al. [a]	AF071324	AF081378
B. heveae	Cyn-1	Tsukiboshi et al. [d]	AB179834	AY004811
B. sacchari	Macko HS4	Berbee et al. [a]	AF071318	AF081372
B. sorghicola	MAFF 511378	Berbee et al. [a]	AF071332	AF081387
B. sorokiniana	ICMP 6233	Manamgoda et al. [e]	JX256418	AF081385
B. spicifera	BRIP12529	Goh & Hyde [c]	AF163076	JN600979
B. victoriae	Macko HVW	Berbee et al. [a]	AF158109	AF158112
B. zeicola	Nelson CcA	Berbee et al. [a]	AF158110	AF081382
B. oryzae	MFLUCC 10-0714	Manamgoda et al.[e]	JX256414	JX276428
B. oryzae	Alcorn WKIC	Berbee [a]	-	AF081381
B. oryzae	13590-SS1	Krupinsky et al. [f]	-	AY277280
B. oryzae	86	Tomaso-Peterson [g]	GU222690	-
B. oryzae	K52B	This study	KC315916	KC333428
B. oryzae	K32	This study	KC315917	KC333429
B. oryzae	K14	This study	KC315918	KC333430
B. oryzae	K34A	This study	KC315919	KC333431
B. oryzae	K62	This study	KC315920	KC333432
B. oryzae	S32	This study	KC315921	KC333433
B. oryzae	S41	This study	KC315922	KC333434
B. oryzae	S23	This study	KC315923	KC333435
B. oryzae	A13	This study	KC315924	KC333436
B. oryzae	A54	This study	KC315925	KC333437
B. oryzae	A41	This study	KC315926	KC333438
B. oryzae	A21	This study	KC315927	KC333439
B. oryzae	R11	This study	KC315928	KC333440
B. oryzae	R82	This study	KC315929	KC333441
B. oryzae	R31	This study	KC315930	KC333442
B. oryzae	Bi w	This study	KC315935	KC333448
B. oryzae	TU81	This study	KC315936	-
B. oryzae	TU8	This study	KC315937	-
B. oryzae	BP2	This study	KC315938	-
B. oryzae	FP17	This study	KC315939	-
B. oryzae	BoM	This study	KC315940	-
B. oryzae	BoP	This study	KC315941	-
B. oryzae	BoS	This study	KC315942	-
B. oryzae	ZGO3	This study	KC315943	-
B. oryzae	ZGO1	This study	KC315944	-
B. cynodontis	A63	This study	KC315930	KC333443
B. spicifera	R12	This study	KC315931	KC333444
B. sorokiniana	A41	This study	KC315932	KC333445
B. neergaardii	F1	This study	KC315933	KC333446
B. bicolor	K81	This study	KC315934	KC333447
Curvularia clavata	DAOM 148084	Berbee et al. [a]	AF071336	AF081391
C. cymbopogonis	Alcorn 88109-1	Yun et al. [a]	AF071351	AF081403
C. gudauskasii	DAOM 165085	Berbee et al. [a]	AF071338	AF081393
C. lunata	UAMH9 1349	Berbee et al. [a]	AF071339	AF081394
Exserohilum minor	ATCCf 62323	Berbee et al. [a]	AF071341	AF081396
E. monoceras	DAOM 208988	Berbee et al. [a]	AF071340	AF081395
E. rostratum	ATCCf 32197	Berbee et al. [a]	AF071342	AF081379
E. turcicum	94/1823	Goh & Hyde [c]	AF163067	-
Drechslera biseptata	CBS 108940	Zhang & Berbee [a]	AY004788	AY004817
D. erythrospila	CBS 10894	Zhang & Berbee [a]	AY004782	AY004813
D. tritici-repentis	DAOM 208990	Berbee et al. [a]	AF071348	AF081369
D. tuberosa	DAOM 169286	Berbee et al. [a]	AF071347	AF081370
Alternaria alternata	Simmons 34-016	Berbee et al. [a]	AF071346	AF081400

[a] Dept. Botany, University of British Columbia, 6270 University Blvd, Vancouver, BC V6T 1Z4, Canada.
[b] Dept. Plant Pathology, Cornell University, 334 Plant Science Building, Ithaca, NY 14853, USA
[c] Dept. Ecology & Biodiversity, The University of Hong Kong, Pokfulam Road, Hong Kong SAR, China.
[d] National Institute of Floricultural Science, Laboratory of Plant Pathology; Fujimoto 2-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8519, Japan.
[e] Dept. Microbiology, Mae Fah Lunah University, Muang 333, Chiang Rai 57100, Thailand
[f] Dept. Botany and Plant Pathology, Oregon State University, 2082 Cordley Hall, Corvallis, OR 97333, USA
[g] Dept. Plant Pathology, Mississippi State University, P.O. Box 9655, Mississippi State, MS 39762, USA

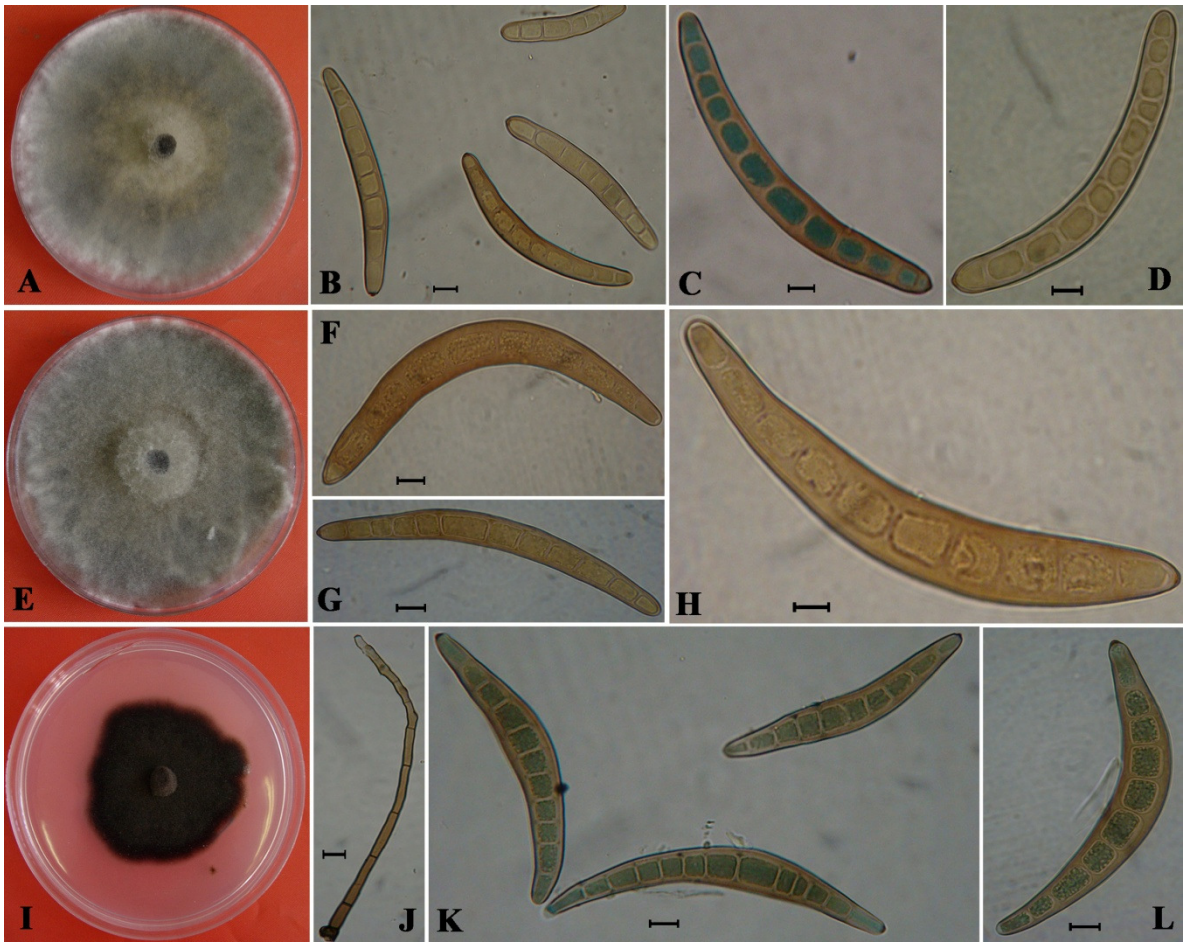


شکل ۱. رنگ پرگنه، کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها در جدایه A41 گونه *Bipolaris oryzae* (گروه یک): A) رنگ پرگنه، B) کنیدیوفورها (مقیاس= ۱۰۰ میکرومتر)، C-E) کنیدیوم‌ها (مقیاس= ۱۰ میکرومتر).

Fig. 1. Colony color, conidiophores and conidia in the isolate A41 of *Bipolaris oryzae* (group 1): A) Colony color, B) Conidiophore (Bar= 100 µm), C-E) Conidia (Bar= 10 µm).

و به ابعاد ۲۶–۱۵ × ۱۵۰–۱۰۰ میکرومتر می‌باشند و از گروه‌های قبلی کاملاً متمایز هستند (شکل ۲ I-L). این گروه دارای سه جدایه از باغ ملک بود و جدایه K52B از گروه مذکور در مطالعات مولکولی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲).

از روی برگ‌ها و بذرها با علایم لکه قهوه‌ای تنها گونه *B. oryzae* جداسازی شد و بقیه گونه‌ها از برگ‌ها و بذور بدون علایم لکه قهوه‌ای جداسازی گردیدند. بنابراین به نظر می‌رسد که گونه *B. oryzae* عامل اصلی لکه قهوه‌ای برنج در ایران باشد. در ایران عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج به گونه *B. victoriae* نسبت داده شده است و گونه مذکور با ۷۵–۸۵٪ گونه غالب در نظر گرفته شده است و گونه *B. oryzae* ۱۰–۱۵٪ از کل جدایه‌ها را شامل شده است و گونه‌های *B. bicolor* و *B. indica* به ترتیب با فراوانی ۳ و ۲٪ گزارش شده‌اند (Safari Motlagh 2008, Safari Motlagh & Kaviani 20008a, Safari Motlagh *et al.* 2005, Safari Motlagh *et al.* 2006). برخی



شکل ۲. رنگ پرگنه، کنیدیوفور و کنیدیوم‌ها در جدایه‌های گونه *Bipolaris oryzae* (گروه‌های دو، سه و چهار): A-D) A52 (گروه دو)، E-H) S32 (گروه سه)، I-L) K52B (گروه چهار) (مقیاس= ۱۰ میکرومتر).

Fig. 1. Colony color, conidiophore and conidia in *Bipolaris oryzae* isolates (groups 2, 3 and 4): A-D) the isolate A52 (group 2), E-H) the isolate S32 (group 3), I-L) the isolate K52B (group 4) (Bar= 10 µm).

محققین دیگر گونه *B. oryzae* را عامل اصلی بیماری لکه قهوه‌ای گزارش کرده‌اند (Khosravi 1999, Razavi 1992, Shamsi *et al.* 2010, Nazari 2011). تا به حال ۱۲ گونه از جنس *Bipolaris* از روی برنج در دنیا گزارش شده است (Farr & Rossman 2013, Sivanesan 1987) و عامل اصلی بیماری لکه قهوه‌ای برنج نیز *B. oryzae* ذکر شده است (Ou 1985, Sivanesan 1987). براساس مطالعه حاضر نیز عامل اصلی بیماری لکه قهوه‌ای گونه مذکور می‌باشد. گونه‌های *B. oryzae*، *B. cynodontis*، *B. neergaardii*، *B. sorokiniana*، *B. spicifera* و *B. bicolor* قبلاً از روی برنج گزارش شده‌اند (Ahmadpour *et al.* 2011, 2012 b, Ershad 2009).

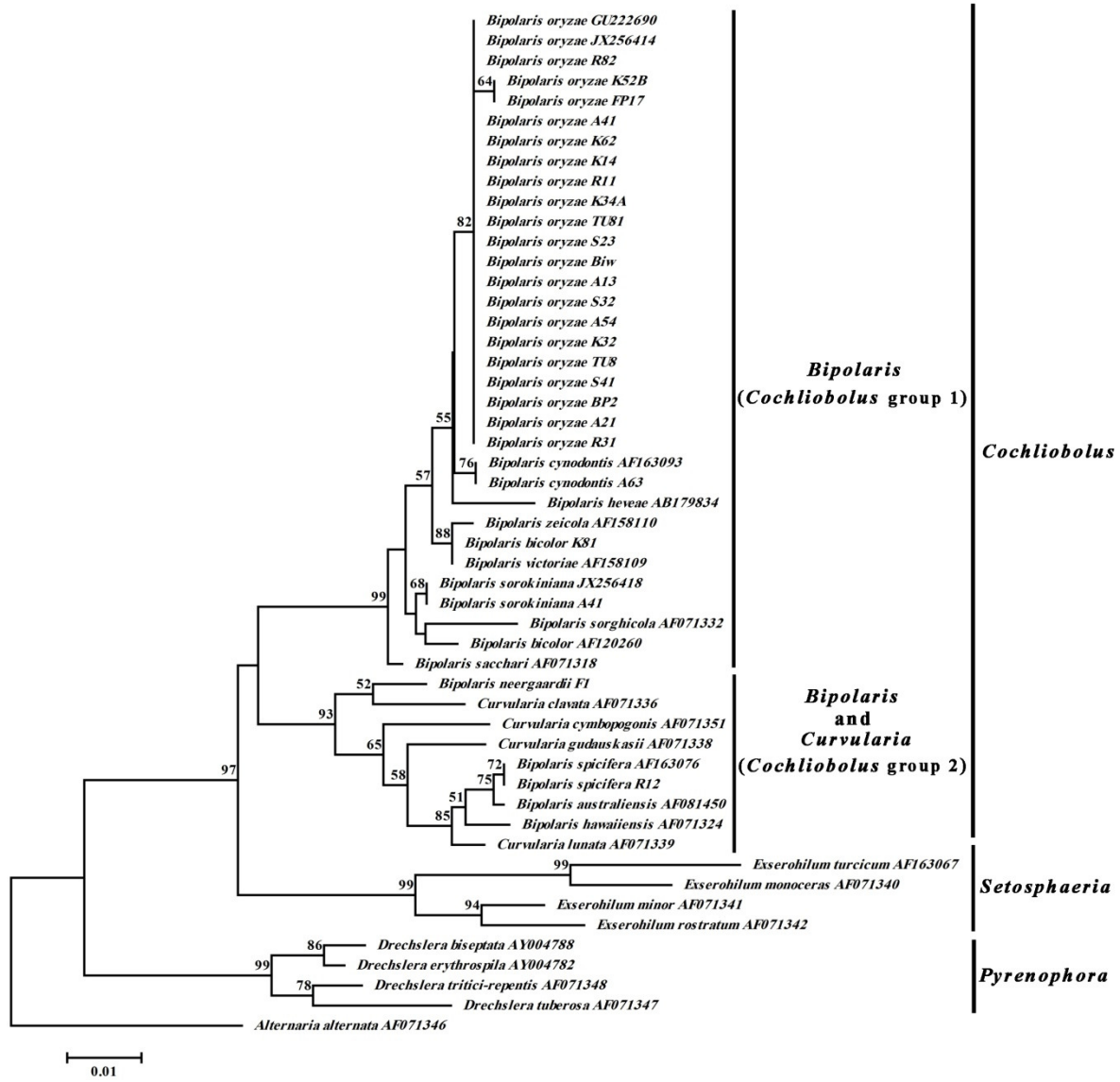
مشخصات مورفولوژیکی گونه *B. victoriae* بیان شده توسط *صفری مطلق و همکاران* (Safari Motlagh 2008, Safari Motlagh & Kaviani 20008a, Safari Motlagh *et al.* 2005, Safari Motlagh *et al.* 2006) با سایر محققین مطابقت ندارد و ویژگی‌های بیان شده بسیار شبیه به گونه *B. oryzae* است. در گونه *B. victoriae* طول

کنیدیوفورها کوتاه (کمتر از ۳۰۰ میکرومتر) بوده و کنیدیوم‌ها اغلب راست به‌ندرت خمیده، دوکی شکل با ۸-۱۰ بند کاذب و بدون پاپیل می‌باشند (Sivanesan 1987). گونه *B. oryzae* با کنیدیوم‌های اغلب خمیده و تعداد بند کاذب بیشتر (۷-۱٤ بند کاذب) و وجود پاپیل مشخص از گونه *B. victoriae* متمایز می‌شود (Sivanesan 1987). مطالعات ما نشان می‌دهد که گونه *B. victoriae* در ایران از فراوانی کمتری برخوردار بوده و به نظر می‌رسد بیشتر روی گیاهان گندم، جو، چاودار، یولاف و احتمالاً علف‌های حاشیه مزارع گیاهان مذکور وجود دارد (Ahmadpour *et al.* 2011, 2012 b). در دنیا نیز تنها یک گزارش از گونه مذکور روی برنج از کشور بولیوی دیده می‌شود (Farr & Rossman 2013, Sivanesan 1987). به علاوه، گونه *B. oryzae* به گونه *B. leersiae* نیز شبیه است (Sivanesan 1987). برخی از محققین گونه اخیر را مترادف گونه *B. oryzae* می‌دانند (مکاتبات شخصی با دکتر تاکائو تسوکیبوشی از کشور ژاپن). اخیراً گونه *B. oryzae* از میزبان‌های مختلف دیگر از جمله گندم، ذرت، برنج وحشی (*Zizania palustris*)، گونه‌های *Panicum* (*Panicum colonum*، *Panicum maximum* و *Panicum virgatum*)، *Cordia trichotoma*، *Eleusine indica* و *Leersia hexandra* در دنیا گزارش شده است (Farr & Rossman 2013, Krupinsky *et al.* 2004, Sivanesan 1987). در مطالعه حاضر نیز از روی سوروف، پاسپالوم، ذرت، موز و گیاه گرامینه ناشناخته جداسازی شد که می‌تواند در اتخاذ راهکارهای مدیریتی بیماری حائز اهمیت باشد. آزمایش‌های بیماری‌زایی گیاهان مذکور در شرایط گلخانه در دست بررسی است. براساس نتایج مطالعه حاضر عامل اصلی لکه قهوه‌ای برنج در ایران گونه *B. oryzae* می‌باشد.

هر چند که گونه‌های دیگری از جنس *Bipolaris* از برنج قابل جداسازی است و اهمیت هریک از گونه‌های دیگر در ایجاد بیماری روی برنج در دست بررسی است. *نعیمی و همکاران* (Naeimi *et al.* 2011) گزارش کرده‌اند که *B. sorokiniana* قادر به آلودگی گیاهان برنج بوده و باعث پوسیدگی طوقه و لکه‌های قهوه‌ای تیره روی برگ‌ها و غلاف ساقه می‌گردد. همچنین گزارش‌هایی از ایجاد علایم شبیه بیماری لکه قهوه‌ای برنج با گونه *B. cynodontis* دیده می‌شود (Zehhar *et al.* 2008).

تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک

درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با روش NJ براساس توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA و ژن *gpd* نشان می‌دهد که جنس‌های *Pyrenophora*، *Cochliobolus* و *Setosphaeria* مونوفیلتیک می‌باشند (شکل‌های ۳ و ٤) و خاندان‌های (clades) *Drechslera/Pyrenophora*، *Bipolaris/ Curvularia/ Cochliobolus* و *Exserohilum/Setosphaeria* به ترتیب با مقدار اعتبارسنجی (Bootstrap) ۹۹، ۹۷ و ۹۹ درصد براساس ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA (شکل ۳) و با مقدار اعتبارسنجی ۸۷، کمتر از ۵۰ و ۷۰ درصد با ژن *gpd* حمایت می‌شوند (شکل ٤). خاندان *Bipolaris/Curvularia/Cochliobolus* به دو گروه یا زیرخاندان تقسیم می‌شود و در گروه یک *Cochliobolus* تنها گونه‌های *Bipolaris* قرار می‌گیرند و در گروه دو *Cochliobolus* گونه‌های *Curvularia* و تعدادی از گونه‌های *Bipolaris* قرار می‌گیرند (شکل‌های ۳ و ٤). در این تحقیق طول توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA و ژن *gpd* توالی‌یابی شده در جدایه‌های مختلف گونه‌های *Bipolaris* به ترتیب بین



شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی استنباط شده از ناحیه ITS و 5.8S rDNA از ۵۱ تاکسون با روش NJ (neighbor-joining). اعداد بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی (bootstrap) از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. طول شاخه‌ها با تعداد تغییرات باز که به صورت مقیاس بار نشان داده شده است، متناسب می‌باشد. گونه *Alternaria alternata* (AF071346) به عنوان outgroup انتخاب شده است.

Fig. 6. A neighbor-joining tree inferred from the ITS regions and 5.8S rDNA sequences from 51 taxa. The numbers above the branches show the bootstrap values in 1000 replicates. The length of branches is proportional to the number of base changes, indicated by the scale bar. *Alternaria alternata* (AF071346) is an outgroup.

۵۳۱-۵٦٤ و ۵۳۱-۵٦٤ جفت باز متغیر بود. با توجه به درخت NJ رسم شده همه جدایه‌های گونه *B. oryzae* روی برنج (۱۵ جدایه) و جدایه‌های مشکوک به گونه مورد نظر روی میزبان‌های دیگر (۱۰ جدایه) براساس ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA و ژن *gpd* به ترتیب با مقدار اعتبارسنجی ۸۲ و ۹۹ درصد تشکیل گروه مونوفیلتیک با گونه *B. oryzae* (JX256414، GU222690، JX276428، AF081381، AY277280)

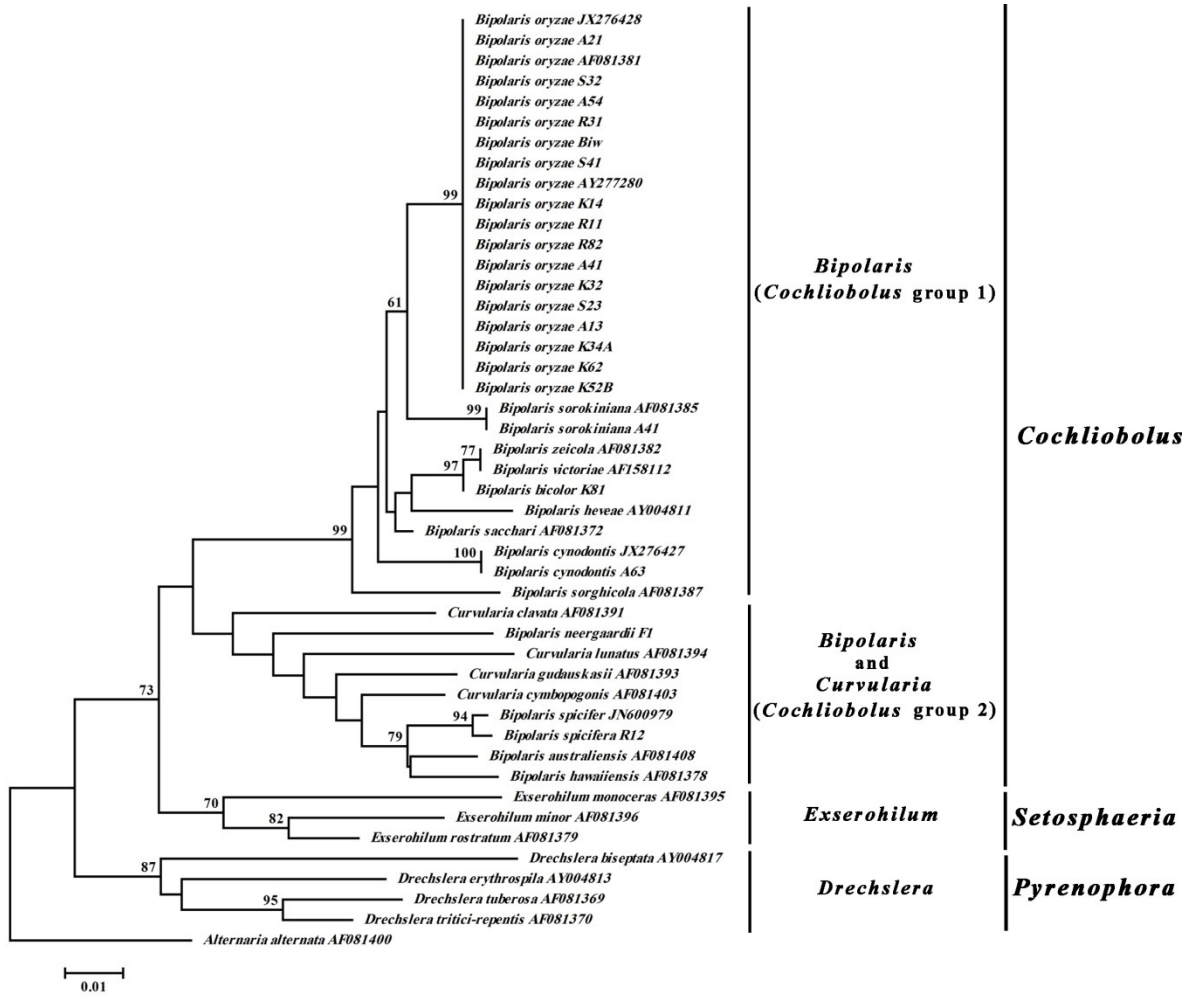
دادند و با هم گروه‌بندی شدند (شکل‌های ۳ و ٤) و میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی بین جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق بیش از ۹۹ درصد بود. جدایه‌های مختلف گونه *B. oryzae* در گروه یک *Cochliobolus* قرار گرفتند. گونه‌هایی که در این گروه قرار می‌گیرند معمولاً دارای کنیدیوم‌های بزرگ، خمیده و قایقی تا دوکی شکل هستند.

جدایه‌های توالی‌یابی شده از گونه‌های *B. sorokiniana* (به ترتیب با مقدار اعتبارسنجی ۶۸ و ۹۹ درصد براساس ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA و ژن *gpd*)، *B. cynodontis* (به ترتیب با مقدار اعتبارسنجی ۷٦ و ۱۰۰ درصد براساس ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA و ژن *gpd*)، *B. bicolor* در گروه یک *Cochliobolus* قرار گرفتند (شکل‌های ۳ و ٤). همه گونه‌های مذکور دارای کنیدیوم‌های راست تا خمیده، دوکی شکل و با تعداد بیش از هفت بند کاذب می‌باشند. جدایه (K81) گونه *B. bicolor* براساس ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA با گونه‌های *B. victoriae* و *B. zeicola* گروهبندی شد و دور از گونه *B. bicolor* (AF120260) قرار گرفت و براساس ژن *gpd* نیز با گونه‌های *B. victoriae* و *B. zeicola* گروه‌بندی شد. تنها یک توالی از گونه *B. bicolor* براساس ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA در بانک ژن وجود دارد و توالی ژن *gpd* گونه مذکور نیز وجود ندارد. بنابراین برای تعیین دقیق حدود و ثغور گونه مذکور نیاز به توالی‌های بیشتر و معتبر هست.

به علاوه، جدایه‌های توالی‌یابی شده از گونه‌های *B. spicifera* (به ترتیب با مقدار اعتبارسنجی ۷۲ و ۹٤ درصد براساس ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA و ژن *gpd*) و *B. neergaardii* در گروه دو *Cochliobolus* قرار گرفتند (شکل‌های ۳ و ٤) و گونه‌هایی که در گروه مذکور قرار می‌گیرند دارای کنیدیوم‌های راست (به ندرت خمیده)، کوتاه و با تعداد بند کاذب کمتر از هفت می‌باشند. هم‌چنین در گروه دو *Cochliobolus* گونه‌های *Curvularia* نیز قرار گرفتند (شکل‌های ۳ و ٤). تا به حال توالی‌یابی ناحیه rDNA-ITS و ژن *gpd* در گونه *B. neergaardii* انجام نشده است. این اولین گزارش از توالی‌یابی نواحی مورد نظر در گونه مذکور است. گونه‌های *Bipolaris* که در گروه اول *Cochliobolus* قرار می‌گیرند بیمارگرهای مهم گیاهان زراعی محسوب می‌شوند و در گروه دوم *Cochliobolus* هم تعدادی از گونه‌های *Bipolaris* و گونه‌های *Curvularia* با بیمارگرهای متوسط هستند. این گروه‌بندی براساس توالی نواحی ITS، *TEF*، *GPD*، *Brn1* و *MAT* نیز دیده می‌شود (Turgeon 1998, Berbee *et al.* 1999, Kodsueb *et al.* 2006, Sun *et al.* 2003, Manamgoda *et al.* 2011). نتایج این مطالعه با نتایج محققین دیگر نیز هم سو بود (Berbee *et al.* 1999, Kodsueb *et al.* 2006, Manamgoda *et al.* 2011).

صفری مطلق و انوری (Safari Motlagh & Anvari 2010) و *صفری مطلق و کاویانی* (Safari Motlagh & Kaviani 2008b) برای تمایز گونه‌های جنس *Bipolaris* جدا شده از برنج از روش RAPD-PCR و هضم محصولات تکثیر شده با آنزیم‌های برشی استفاده کرده‌اند. ضریب تشابه بین جدایه‌های گونه‌های مختلف جنس *Bipolaris* با روش RAPD-PCR بیش از ۷۰٪ بود.

به نظر نمی‌رسد که روش مذکور بتواند گونه‌های جنس *Bipolaris* را از هم تمایز دهد. برای تمایز گونه‌های جنس *Bipolaris* از ترادف‌یابی بخش‌هایی از rDNA (ITS1, 5.8S, ITS2)، ژن گلیسرآلدهید-۳ فسفات دهیدروژناز (*gpd*)، ژن *Brn1* (ژن مسئول در فرآیند سنتز ملانین) و هضم نواحی ITS1-5.8S-ITS2 rDNA (ITS PCR-RFLP)



شکل ۴. درخت فیلوژنتیکی استنباط شده از ژن گلیسرآلدهید-۳- فسفات دهیدروژناز (*gpd*) از ۴۶ تاکسون با روش NJ (neighbor-joining). اعداد بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی (bootstrap) از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. طول شاخه‌ها با تعداد تغییرات باز که به صورت مقیاس بار نشان داده شده است، متناسب می‌باشد. گونه *Alternaria alternata* (AF081400) به عنوان outgroup انتخاب شده است.

Fig. 6. A neighbor-joining tree inferred from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) gene from 46 taxa. The numbers above the braches show the bootstrap values in 1000 replicates. The length of branches is proportional to the number of base changes, indicated by the scale bar. *Alternaria alternata* (AF081400) is an outgroup.

استفاده شده است (Goh *et al.* 1998, Berbee *et al.* 1999, Kodsueb *et al.* 2006, Sun *et al.* 2003). تغییرپذیری خصوصیات مورفولوژیکی در گونه‌های جنس *Bipolaris* در شرایط آزمایشگاهی گزارش شده است (Alcorn 1983, 1988). در محیط‌های کشت نوع ماده غذایی، pH، دما و نور روی خصوصیات مورفولوژیکی گونه‌های جنس مذکور تأثیر می‌گذارند. در گونه *B. oryzae* چهار تیپ رنگ پرگنه گزارش شده است و از نظر بیماری‌زایی از یکدیگر متفاوت هستند (Kumar *et al.* 2011). در مطالعه حاضر نیز اختلاف

آشکاری بین مورفولوژی جدایه‌ها (رنگ پرگنه، شکل، اندازه و تعداد بندهای کاذب کنیدیوم‌ها) دیده شد. بنابراین برای تعیین دقیق حدود و ثغور گونه‌های جنس *Bipolaris* نیاز به روش‌های مولکولی نیز است. مطالعات ما نشان می‌دهد که هر دو تیپ آمیزشی در یک مزرعه و امکان تولیدمثل جنسی بین جدایه‌های گونه *B. oryzae* وجود دارد (داده‌ها چاپ نشده است) و می‌تواند در تغییرپذیری ژنتیکی جمعیت‌های قارچ تأثیر بسزایی داشته باشد. هر چند که مرحله جنسی قارچ در طبیعت یک‌بار دیده شده است (Dickson 1956). مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *B. oryzae* در ایران در دست بررسی است.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر فراهم کردن اعتبارات مالی این تحقیق کمال تشکر را دارند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (53-51) متن انگلیسی مراجعه شود.