# وقوع آلودگی گیاه برنج به *Bipolaris sorokiniana* در ایران

# OCCURRENCE OF RICE INFECTION BY *Bipolaris sorokiniana* IN IRAN

شهرام نعیمی[1*]، وحید خسروی[2] و تاکائو تسوکیبوشی[3]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۶/۱۶)

## چکیده

**بوته‌های برنج دارای علائم پوسیدگی ناحیه طوقه و لکه‌های بزرگ قهوه‌ای تیره روی غلاف و ساقه در مزرعه‌ای در مازندران مشاهده گردید. بر اساس مشخصات مورفولوژیک، قارچ رشد یافته در اطراف قطعات کشت داده شده، *Bipolaris sorokiniana* شناسایی شد. پس از توالی یابی ناحیه ITS از ژن rDNA نسبت به ارزیابی همولوژی آن با توالی‌های موجود در بانک ژن اقدام گردید که با هشت استرین *B. sorokiniana* و *Cochliobolus sativus* (تلئومورف) با درجه بسیار بالا همولوژی نشان داد. فیلوگرام ترسیم شده نشان داد که در مقایسه با گونه‌های دیگر *Bipolaris*، *Cochliobolus* و جنس‌های قارچی خویشاوند آنها، استرین *B. sorokiniana* جدا شده از مازندران به همراه هفت استرین دیگر *B. sorokiniana* و یک استرین *C. sativus* در یک گروه قرار گرفتند. آزمون بیماری‌زایی روی دو رقم برنج و با روش‌های مختلف انجام شد. این اولین گزارش از بیماری‌زایی *B. sorokiniana* روی گیاه برنج در ایران می‌باشد.**

**واژه‌های کلیدی:** بیماری‌زایی، *Bipolaris sorokiniana*، *Oryza sativa*، مازندران

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shnaeimi@yahoo.com

۱. استادیار پژوهش مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، آزمایشگاه تحقیقات کنترل بیولوژیک آمل

۲. مربی پژوهش معاونت مؤسسه تحقیقات برنج کشور در مازندران، آمل

۳. استاد مؤسسه ملی علوم دامی و گیاهان علفی، سازمان ملی تحقیقات غذا و کشاورزی، ژاپن

## مقدمه

*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker پراکنش جهانی دارد و میزبان‌های مختلف بخصوص غلات دانه ریز (به ویژه گندم و جو) و نیز چندین علف هرز را آلوده می‌نماید. این قارچ عامل ایجاد پوسیدگی ریشه، لکه برگی (spot blotch)، بلایت گیاهچه، بلایت سنبله و سیاه شدن دانه (black point) در گندم و جو می‌باشد (Poloni *et al*. 2009) و باعث کاهش شدید عملکرد محصول می‌گردد (Mehta 1993; Asad *et al*. 2009). رطوبت نسبی و درجه حرارت بالا باعث شیوع بیماری به ویژه در مناطق جنوبی آسیا که در آنجا سیستم متراکم آبی گندم-برنج وجود دارد، می‌شود (Kumar *et al*. 2002). فرم جنسی قارچ، یک آسکومیست به نام *Cochliobolus sativus* (Ito & Kuribayashi) Drechsler ex. Dastur است که به ندرت در طبیعت تشکیل می‌شود. *واکر و همکاران* (Walker *et al*. 1968) برای اولین بار قارچ *C. sativus* را از گیاه برنج (بعنوان عامل لکه برگی) از استرالیا گزارش کردند.

*کوداما و همکاران* (Kodama *et al*. 1979) این قارچ را بعنوان عامل یک بیماری جدید برنج در ژاپن معرفی کردند که باعث ایجاد لکه‌های قهوه‌ای روی برگ‌ها و بذور می‌گردد. این قارچ از گیاه برنج در کلمبیا و نیجریه هم گزارش شده است (Sivanesan 1987). *پرم و همکاران* (Prem *et al*. 2009) اعلام کردند که *B. sorokiniana* دامنه میزبانی وسیعی دارد و میزبان‌های مختلف از جمله برنج را آلوده می‌سازد. در پایگاه داده‌های وزارت کشاورزی آمریکا، گیاه برنج یکی از میزبان‌های این بیمارگر قلمداد شده است (http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases). هم‌چنین *B. sorokiniana* به عنوان عامل لکه برگی برنج وحشی (*Zizania palustris*) نیز مطرح می‌باشد (Nyvall & Percich 1999). بر خلاف این گزارشات، در برخی منابع، از *B. sorokiniana* به عنوان یک قارچ غیر بیماری‌زا در برنج ذکر شده است (Manandhar *et al*. 1998; Iram & Ahmad 2004; Iftikhar *et al*. 2009).

جمعیت‌های این قارچ از نقطه نظر رنگ و مورفولوژی پرگنه (Asad *et al*. 2009)، فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی (Poloni *et al*. 2009)، تنوع ژنتیکی (Chand *et al*. 2003; Iram & Ahmad 2004) و بیماری‌زایی در گندم و جو (Jaiswal *et al*. 2007) بسیار متنوع هستند. *هتزلر و همکاران* (Hetzler *et al*. 1991) اعلان کردند که به نظر می‌رسد که تنوع و شدت تهاجم این بیمارگر با گذشت زمان در حال افزایش است. این تنوع بالای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و ژنتیکی، شناسایی و نیز کنترل این قارچ را با مشکل مواجه ساخته است (Tinline 1988; Zhong & Steffenson 2001). *B. sorokiniana* به عنوان عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گندم از استان‌های مختلف ایران من‌جمله گلستان (استان همجوار مازندران) معرفی شده است (Safaee *et al*. 2008). اما ظاهراً این بیمارگر تاکنون از استان‌های شمالی مازندران و گیلان گزارش نشده است.

## روش بررسی

در خرداد ۱۳۸۶ از شالیزاری در شهرستان آمل، بوته‌ی طارم محلی با علائم پوسیدگی ناحیه طوقه و لکه‌های بزرگ قهوه‌ای تیره روی غلاف و ساقه مشاهده شد و به آزمایشگاه منتقل گردید (شکل ۱-A). قطعات کوچکی از حد فاصل نواحی سالم و آلوده ابتدا با جریان آبِ شیر بخوبی شستشو شدند و سپس با محلول هیپوکلریت سدیم

۰/۵٪ ضدعفونی سطحی گردیدند و پس از شستشو با آب مقطر سترون در تشتک‌های پتری حاوی محیط آب آگار دو درصد بعلاوه سولفات استرپتومایسین کشت داده شدند. قارچ‌های رشد یافته در اطراف قطعات، با روش تک اسپور خالص گردیدند و در یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای شناسایی در حد گونه، قارچ در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت چهار روز، قطر پرگنه قارچ اندازه‌گیری شد. مشخصات ظاهر پرگنه به همراه شکل و اندازه هیف، کنیدیوفور و کنیدی ثبت گردید. ازکلید شناسایی *سیوانسان* (۱۹۸۷) برای شناسایی قارچ مورد نظر استفاده شد.

به منظور تایید شناسایی مورفولوژیک، نسبت به مقایسه آن با سایر قارچ‌های موجود در پایگاه داده‌ها اقدام شد. برای استخراج DNA، ابتدا جدایه‌ی مورد نظر در تشتک‌های پتری حاوی محیط غذایی مخمر-دکستروز-آگار که با ورقه‌ی سلوفان پوشیده شده بودند، کشت داده شد. پس از ۳-۲ روز، توده میسلیومی تازه قارچ از روی ورقه‌ی سلوفان برداشته شد و در داخل هاون چینی حاوی نیتروژن مایع به خوبی خُرد گردید. DNA ژنومی با استفاده ازکیت GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma, USA) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده استخراج گردید. سپس ناحیه ITS مربوط به rDNA هسته‌ای شامل ITS1 ، ژن 5.8S و ITS2 با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 (White *et al*. 1990) تکثیر شد (Hermosa *et al*. 2000). محصول PCR با استفاده از کیت GenElute PCR Clean-up Kit خالص‌سازی شد و برای تعیین توالی به شرکت Macrogen در کشور کره جنوبی ارسال گردید. برای توالی ITS جدایه مورد نظر، یک شماره دستیابی (accession number) از GenBank اخذ گردید.

برای ارزیابی همولوژی بین توالی ITS قارچ مورد نظر با توالی‌های موجود در بانک ژن (GenBank)، از ابزار BLAST استفاده شد. برای تعیین روابط خویشاوندی، توالی‌های ITS مربوط به گونه‌های مختلف از جنس‌های *Bipolaris*، *Cochliobolus* و چندین جنس قارچی نزدیک به آنها یعنی *Curvularia*، *Pseudocochliobolus*، *Pyrenophora* و *Setosphaeria* از GenBank و DNA Data Bank of Japan (DDBJ) اخذ گردیدند و در آنالیز فیلوژنتیکی شرکت داده شدند. توالی‌ها با نرم افزار Clustal X 2.0 مرتب (align) شدند و آنالیز فیلوژنتیکی با روش neighbor-joining (NJ) انجام شد. شجره مربوطه بر اساس توالی‌های rDNA-ITS و با حمایت ۱۰۰۰ تکرارِ bootstrap ترسیم گشت. *Alternaria alternata* به عنوان گروه خارجی (outgroup) در نظر گرفته شد.

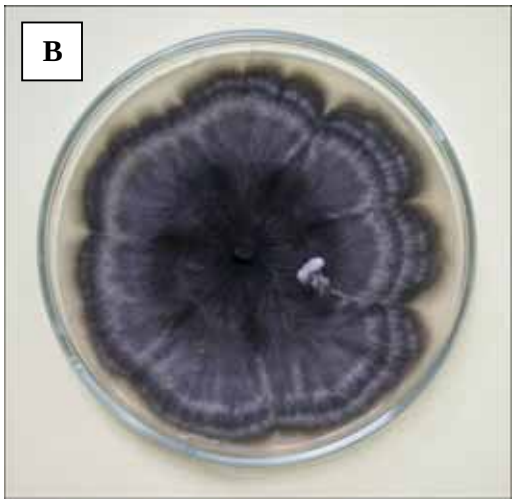
اثبات بیماری‌زایی به چهار روش و روی دو رقم برنج در گلخانه انجام شد. در روش اول، ابتدا قارچ مذکور در محیط غذایی آب آگار به علاوه ساقه برنج کشت داده شد. ۱۰۰ سی‌سی سوسپانسیون کنیدی‌های قارچ با غلظت $۳\times ۱۰^{۵}$ در هر میلی‌لیتر با محلولپاش دستی روی نشاهای برنج رقم طارم در مرحله ۵- ۴ برگی پاشیده شد. برای چسبیدن بهتر اسپورها به سطح اندام‌های هوایی برنج، Tween 20 به میزان چهار قطره در ۵۰ میلی‌لیتر به سوسپانسیون اضافه شد. در روش دوم، ۱۰۰ عدد بذر جوانه‌دار شده رقم طارم به مدت ۲۴ ساعت در سوسپانسیون کنیدی‌های قارچ با غلظت $۳\times ۱۰^{۵}$ در هر میلی‌لیتر غوطه ور شدند. سپس، بذور (آلوده و شاهد) روی کاغذ صافی‌های مرطوب و استریل قرار گرفتند. در

روش سوم، ابتدا از حاشیه پرگنه در حال رشد قارچ، دیسک‌های یک سانتی‌متری جدا شد و به فلاسک‌های ارلن مایر یک لیتری حاوی سبوس برنج به علاوه پوسته شلتوک استریل اضافه شد. پس از گذشت ۴۵ روز، اینوکولوم آماده شده با خاک مزرعه برنج به علاوه ماسه مخلوط شد و داخل گلدان‌های پلاستیکی ریخته شد. در وسط هر گلدان، نشاهای دو برگی رقم طارم محلی کاشته شد. این روش به دو صورت غرقابی و خشکه‌کاری انجام گرفت. در روش چهارمِ آزمایش اثبات بیماری‌زایی، دیسک‌هایی از میسلیوم‌های در حال رشد قارچ، بین غلاف و ساقه دو رقم طارم محلی (بومی) و شیرودی (پرمحصول) در مرحله اواخر پنجه زنی قرار گرفت. در این روش در مورد هر کدام از ارقام مذکور، سه بوته و پنج پنجه در هر بوته مایه‌زنی شدند. دمای گلخانه شیشه‌ای ۳۶-۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰٪ بود. آبیاری مرتباً انجام شد بطوری که گلدان‌ها همیشه غرقاب بودند (به استثنای حالت خشکه کاری در روش دوم).

## نتایج

قطر پرگنه قارچ پس از چهار روز در محیط PDA و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۵/۱ سانتی‌متر بود. پرگنه قارچ بصورت دوایر متحدالمرکز با حاشیه موجدار و به رنگ خاکستری است که بعداً سیاهرنگ می‌شود (شکل ۱-B). کنیدیوفور مستقیم یا خمیده، صاف، دارای دیواره عرضی، گاهی زانویی و به ابعاد ۹/۵- ۵ × ۲۷۳- ۶۵/۵ میکرومتر است. کنیدی‌ها مستقیم، دوکی و بیضوی، به رنگ زیتونی مایل به قهوه‌ای تیره، صاف، دارای ۱۲- ۳ دیواره عرضی کاذب و به ابعاد (۲۴) ۳۱-۱۵/۵ × (۶۲) ۷۴-۴۱ میکرومتر می‌باشند (شکل ۱-C) قارچ روی محیط‌های غذایی مورد استفاده به راحتی و به شدت اسپورزایی می‌نماید. بر اساس صفات مورفولوژیک فوق و مطابق کلید *سیوانسان* (۱۹۸۷) این قارچ، *B. sorokiniana* شناسایی گردید و کد B54 به آن اختصاص داده شد. نتایج ارزیابی همولوژی با ابزار جستجوی BLAST نشان داد که توالی مذکور (شماره دستیابی: GU480916) با هشت استرین *B. sorokiniana* و *C. sativus* (تلئومورف) با درجه بسیار بالا همولوژی دارد (E-value = 0.0 و شباهت توالی ۱۰۰-۹۹٪). فیلوگرام ترسیم شده با روش NJ نشان داد که در مقایسه با چهارگونه دیگر *Bipolaris*، ۱۶ گونه *Cochliobolus* و گونه‌های دیگرِ خویشاوند با این دو جنس قارچی، استرین *B.sorokiniana* جدا شده از مازندران (B54) با جدایه استاندارد *B. sorokiniana* AF158105 به همراه شش استرین دیگر این گونه (جدا شده از ژاپن) و یک استرین *C. sativus* در یک گروه قرار گرفتند که با مقادیر bootstrap ۱۰۰٪ حمایت گردید (شکل ۲).

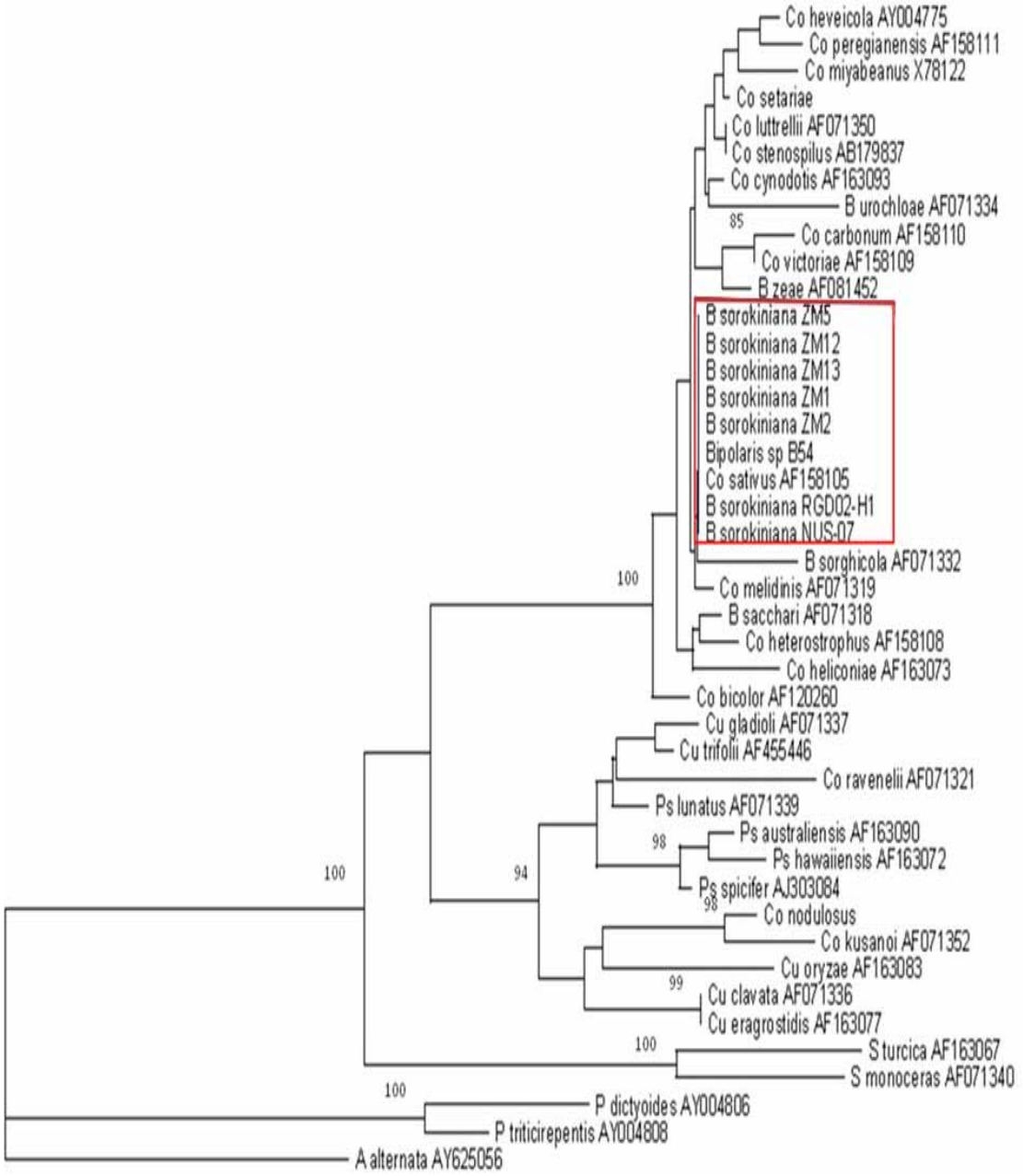
در روش اول اثبات بیماری‌زایی (پاشیدن سوسپانسیون کنیدی‌ها)، پس از چهار روز، لکه‌های زیادی (spot blotch) روی برگ‌های برنج پدیدار شد (شکل ۳-A). لکه‌ها ابتدا نوک سوزنی و آب‌سوخته بودند ولی پس از چند روز ابعاد آنها بزرگ‌تر شده و به صورت کشیده و قهوه‌ای رنگ نمایان شدند. در روش دوم (آلوده سازی مصنوعی بذرها)، پس از گذشت دو هفته، تفاوت فاحشی بین نشاهای تیمار و شاهد مشاهده نشد. هر چند که نشاهای ظروف تیمار شده با *B. sorokiniana* B54 اندکی زرد و ضعیف بودند. در روش سوم (مخلوط کردن اینوکولوم قارچ با خاک گلدان‌ها) در هر دو حالت غرقابی و خشکه‌کاری، علی‌رغم گذشتن بیش از دو ماه از تاریخ کاشت نشاها، هیچ گونه علائمی روی بوته‌های برنج در



**شکل ۱. (A) بوته برنج بیمار (رقم طارم) دارای علایم پوسیدگی در غلاف و ساقه. (B) پرگنه *B. sorokiniana* روی محیط PDA. (C) کنیدیفورها و کنیدی‌های قارچ در اسید لاکتیک**

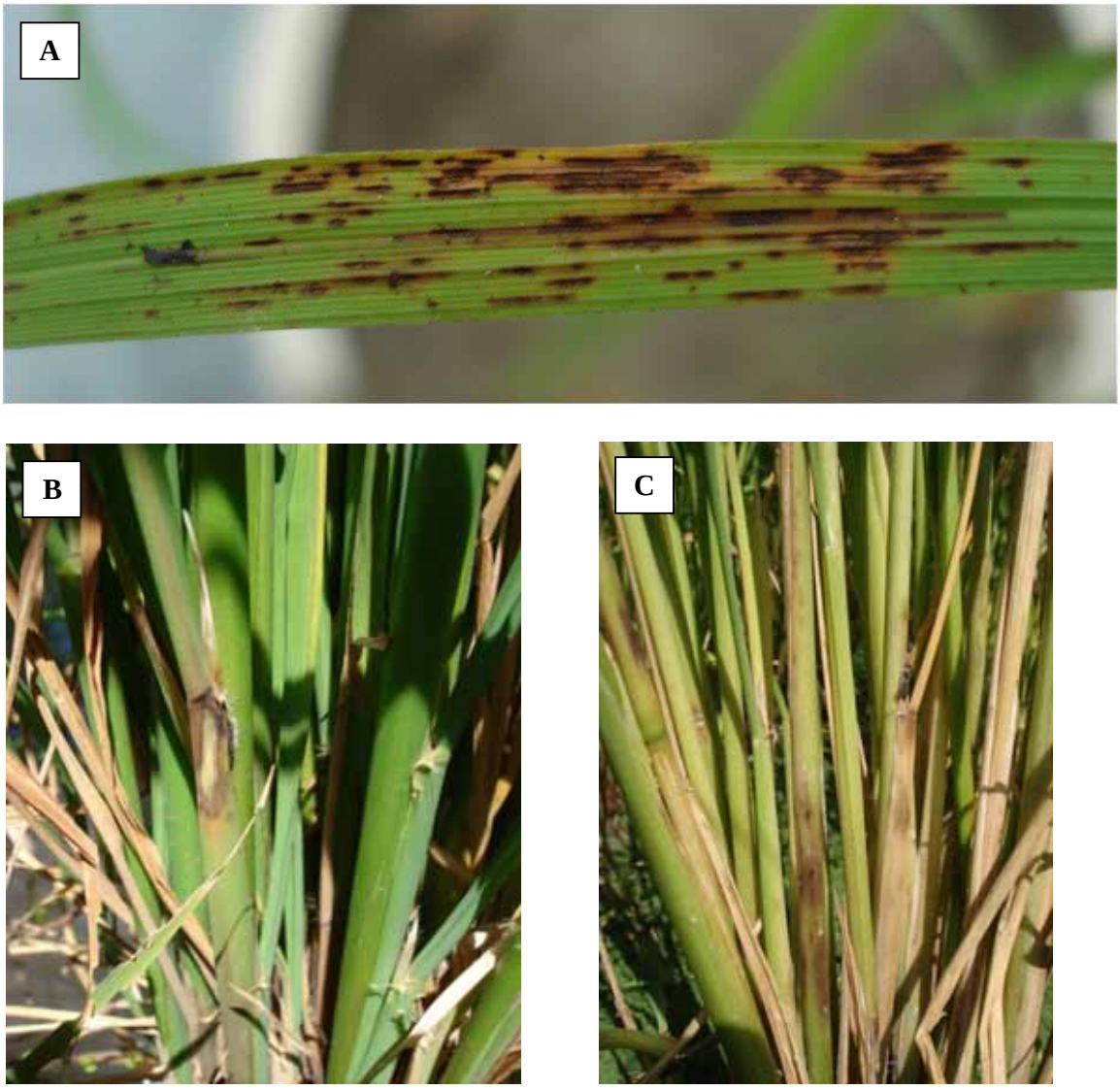
**Fig. 1. (A) Diseased rice hill (cv. Tarom) with dark brown lesions on sheaths and stems. (B) Colony appearance of *B. sorokiniana* on PDA and (C) Conidiophores and conidia**

گلخانه دیده نشد. در روش چهارم، در هر دو رقم طارم و شیرودی، پس از سه روز، علایم اولیه شامل لکه‌های آب سوخته کشیده با حاشیه قهوه‌ای روی غلاف ساقه مشاهده شد. پس از یک هفته علایم توسعه بیشتری پیدا کردند و لکه‌های نسبتاً بزرگی را ایجاد کردند (میانگین طول لکه‌ها: پنج سانتی‌متر). لکه‌ها روی رقم طارم محلی بزرگ تر بودند و پیشروی بیشتری داشتند (شکل ۳-B و C). این اولین گزارش از بیماری‌زایی *B. sorokiniana* روی گیاه برنج در ایران می‌باشد.




شکل ۲. فیلوگرام ترسیم شده بر اساس توالی‌های rDNA-ITS با روش NJ که نشان‌دهنده رابطه جدایه ایرانی *B. sorokiniana* (B54) با جدایه‌های دیگر این گونه، سایر گونه‌های جنس *Bipolaris* و جنس‌های قارچی نزدیک به آن می‌باشد. Co: *Cochliobolus*، B: *Bipolaris*، Cu: *Curvularia*، Ps: *Pseudocochliobolus*، S: *Setosphaeria* و P: *Pyrenophora*.

**Fig. 2. Phylogenetic relationship of Iranian isolate of *B. sorokiniana* (B54) with other isolates of this species, other *Bipolaris* spp. and closely related fungal genera. Phylogenetic tree is inferred by NJ method based on rDNA-ITS sequences. Abbreviations, Co: *Cochliobolus*; B: *Bipolaris*; Cu: *Curvularia*; Ps: *Pseudocochliobolus*; S: *Setosphaeria*; P: *Pyrenophora*.**




**شکل ۳. (A) لکه‌های (blotch) ایجاد شده توسط *B. sorokiniana* روی برگ برنج رقم طارم در گلخانه. لکه‌های ایجاد شده توسط *B. sorokiniana* روی غلاف ساقه‌ی برنج: (B) رقم شیرودی (C) رقم طارم**

**Fig. 3 (A) Spot blotch on rice leaves (cv. Tarom) caused by *B. sorokiniana* B54 in glasshouse. Lesions caused by *B. sorokiniana* B54 on rice sheaths (B): cv. Shiroodi (high-yielding) (C): cv.Tarom**

## بحث

نتایج تحقیق حاضر اثبات می‌کند که گیاه برنج هم به جمع میزبان‌های *B. sorokiniana* در ایران پیوسته است. اتفاقی مهم و در خور توجه که مسئولیت مدیریت بیماری‌های گیاهی برنج را در اراضی شالیزاری کشور سنگین‌تر می‌سازد. عدم آلودگی گیاه برنج به *B. sorokiniana* که در برخی منابع خارجی به آن اشاره شده است شاید به این دلیل باشد که جدایه‌های که روی گیاه برنج مورد ارزیابی

قرار گرفتند، در واقع در میزبان‌های گندم و جو بیماری‌زا بودند که ممکن است به دلیل وجود تنوع بالا در جمعیت‌های این بیمارگر، لزوماً همه جدایه‌های بیماری‌زا روی گونه‌های دیگر غلات، قادر نباشند که در برنج هم ایجاد بیماری کنند. از طرف دیگر، آزمون بیماری‌زایی روی تعداد محدودی از ارقام برنج صورت گرفته است که احتمالاً نسبت به *B. sorokiniana* مقاوم یا متحمل بودند. دلیل دیگر ممکن است با روش آزمون بیماری‌زایی انجام شده مرتبط باشد.

وجود میزبان‌های دیگر گیاهی، به عنوان منابع اینوکولوم اولیه، می‌تواند نقش مهمی در اپیدمی شدن یک بیماری ایفا نماید. از آن جایی که *B. sorokiniana* یک بیمارگر مهم و خطرناک در گندم می‌باشد و نظر به اینکه گیاه برنج در شرق استان مازندران و مناطق برنج خیز دیگرِ کشور، در مجاورت مزارع گندم کشت می‌شود، بنابراین برنج می‌تواند یک میزبان جایگزین یا ثانویه (alternate host) محسوب شود. از طرف دیگر، احتمال انتقال بیماری از گندم به برنج نیز بسیار مهم خواهد بود. لذا بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های *B. sorokiniana* گندم روی برنج و برعکس (Cross-pathogenicity) می‌تواند یکی از موضوعات تحقیق در این زمینه باشد. علاوه بر این، در آینده لازم است که وضعیت پراکنش این بیمارگر در سطح شالیزارهای مازندران و گیلان (و سایر استان‌های برنج‌خیز) و نیز بیماری‌زایی آن در سایر میزبان‌های زراعی و غیر زراعی (به ویژه علف‌های هرز شالیزار) روشن گردد.

## منابع

جهت ملاحظه به صفحات (125- 123) متن انگلیسی مراجعه شود.