



مقاله پژوهشی

تجزیه و تحلیل جدایه‌های *Pyricularia oryzae* به دست آمده از برنج و علف‌های هرز با نشانگر rep-PCR و آزمون بیماری‌زاییگلزار قربانی^{۱*}، عادل پردل^۲، حسین صارمی^۱ و محمد جوان نیکخواه^{۱*}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۴)

چکیده

فارچ *Pyricularia oryzae* عامل بیماری بلاست و لکه برگی روی برنج و بیش از ۵۰ گونه گیاهی در خانواده Poaceae از جمله محصولات زراعی و علف‌های هرز می‌باشد. برای این پژوهش، نمونه برداری در سال ۱۳۹۶ از مزارع برنج در استان‌های گیلان و مازندران انجام شد. بررسی‌های ریخت شناسی نشان داد جدایه‌های به دست آمده از میزبان‌های برنج، چسبک، سوروف، سورگوم وحشی و پاسپالوم متعلق به گونه *P. oryzae* می‌باشند. نتایج آزمون بیماری‌زایی مشخص نمود جدایه‌های به دست آمده از هر میزبان روی همان میزبان قدرت بیماری‌زایی بالاتری دارند و روی میزبان‌های دیگر یا بیماری‌زا نبوده، و یا قدرت بیماری‌زایی کمتری دارند. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از انگشت‌نگاری DNA با استفاده از تکنیک مولکولی rep-PCR نشان داد که جدایه‌های به دست آمده از میزبان‌های مختلف در سه دودمان قرار می‌گیرند. به طور کلی، در دو دودمان شناسایی شده (به جز دودمان C)، جدایه‌هایی از میزبان‌های مختلف وجود داشت و ارتباطی بین الگوی بانندی با منطقه جمع‌آوری آنها دیده نشد.

کلیدواژه: دودمان، تنوع ژنتیکی، علف‌های هرز، *Pyricularia oryzae*

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد.

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

۱. به ترتیب فارغ التحصیل کارشناسی ارشد و استادان گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج.
۲. استادیار بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان (ایران‌شهر)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران‌شهر، ایران.



Research Article

Analysis of *Pyricularia oryzae* isolates from rice and weeds with rep-PCR marker, and pathogenicity

G. Ghorbani^{1*}, A. Pordel², H. Saremi¹, and M. Javan-Nikkhah^{1**}

(Received: 7.2.2021; Accepted: 25.5.2021)

Abstract

Pyricularia oryzae is the cause of blast leaf spot disease on rice and more than 50 plant species of crops and weeds in Poaceae family. Sampling was performed in 2017 in rice fields of Guilan and Mazandaran provinces. Morphological studies showed that the isolates obtained from *Oryza sativa*, *Setaria viridis*, *Echinochloa crus-galli*, *Sorghum halepense*, and *Paspalum dilatatum* were belonged to *P. oryzae*. The pathogenicity test revealed that isolates obtained from each host had higher pathogenicity on the same host and were either not pathogenic or less pathogenic on other hosts. Cluster analysis of DNA fingerprinting data using rep-PCR showed that isolates obtained from different hosts were located in three lineages. In general, there were isolates from different hosts in two identified lineages (except lineage C), and no correlation was found between the similarities of the band pattern with their collection areas.

Keywords: Clonal lineages, genetic diversity, weed plants, *Pyricularia oryzae*

* A Part of MSc Thesis of the First Author.

Corresponding author's E-mail: jnikkhah@ut.ac.ir

1. Graduated student and Prof. of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Assistant professor of Plant Protection Research Department, Baluchestan Agriculture and Natural Resources Research and Education Centre, AREEO, Iranshahr, Iran.

مقدمه

کلاغی روی میزبان برنج توسط زرین‌نیا و همکاران (۱۳۹۰) انجام شد. آنها در آزمون بیماری‌زایی از دو رقم حساس محلی به نام‌های طارم و بینام استفاده کردند. نتایج آزمون بیماری‌زایی آنها نشان داد که ارقام برنج در مقابل جدایه‌های به دست آمده از علف‌های هرز مقاوم بوده و یا لکه‌هایی با تعداد و شدت خسارت کمتر نسبت به شاهد مثبت که یک جدایه بیماری‌زا روی برنج بود، ایجاد نمودند (Zarrinnia et al. 2011). پردل و همکاران (Pordel et al. 2019, 2016) آزمون بیماری‌زایی را برای جدایه‌های بدست آمده از گیاهان زراعی و علف‌های هرز مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که جدایه‌های بدست آمده از هر میزبان تنها توانایی بیماری‌زایی روی همان میزبان را دارد.

در حال حاضر، ابزارهای مولکولی برای مطالعه پویایی جمعیت *P. oryzae* جهت ایجاد مقاومت با دوام مورد استفاده قرار می‌گیرند. نشانگرهای مولکولی تظاهرات مستقیم محتوای ژنتیکی هستند که به عنوان شاخص‌های قابل اعتماد از تغییرات ژنتیکی و پاتوتیپی عمل می‌کنند. علاوه بر این، آنها تکرارپذیر و مقرون به صرفه بوده و کاربرد آسانی دارند. نشانگرهای AFLP^۱، RFLP^۲، RAPD^۳، REMAP^۴، rep-PCR^۵ و ISSR^۶ و SSR^۷ متداول‌ترین نشانگرهای مولکولی برای نشان دادن چندشکلی در ژنوم جمعیت بیمارگرها هستند (Xu et al. 2018). جورج و همکاران (George et al. 1998) با الگو قرار دادن توالی Pot2، تکنیک مولکولی rep-PCR یا

قارچ *Pyricularia oryzae* Cavara (syn. *M. oryzae* B. C. Couch) عامل بیماری بلاست و لکه برگی روی برنج و بیش از ۵۰ گونه گیاهی در خانواده Poaceae از جمله محصولات زراعی و علف‌های هرز می‌باشد (Akase & Kusaba 2017). جدایه‌های این گونه قارچی در شش گروه اختصاصیت میزبانی با توجه به نتایج آزمون بیماری‌زایی قرار می‌گیرند که به عنوان شش پاتوتایپ تعیین شده‌اند: که شامل *Oryza pathotype* روی گیاه برنج *Setaria pathotype*، (*Oryza sativa* L.) دم روباهی (*Setaria italica* (L.) P. Beauv.)، *Panicum pathotype* روی گیاه ارزن معمولی (*Panicum Eleusine pathotype miliaceum* L.) روی گیاه ارزن انگشتی (*Eleusine coracana* (L.) Scop.)، *Triticum pathotype* روی گیاه گندم (*Triticum aestivum* L.) و *Lolium pathotype* روی گیاه چچم چندساله (*Lolium perenne* L.) بیماری‌زا می‌باشد (Akase & Kusaba 2017, Milazzo et al. 2019).

آزمون بیماری‌زایی انجام شده توسط او و همکاران (Oh et al. 2002) روی گونه‌های گیاهی مختلف در دمای ۲۰ درجه سلسیوس نشان داد جدایه‌های به دست آمده از یولاف به طور انحصاری روی یولاف بیماری‌زا بودند. آنها از هفت گونه گیاهی برای تعیین دامنه میزبانی جدایه یولاف استفاده کردند. جدایه یولاف روی ارقام یولاف بیماری‌زا و در سایر گیاهان غیر بیماری‌زا بود. گونه‌های گیاهی دیگر نیز روی ارقام یولاف غیر بیماری‌زا اما روی گیاه میزبان اصلی خود بیماری‌زا بودند. در ایران، اولین پژوهش جهت بررسی توان بیماری‌زایی جدایه‌های به دست آمده از علف‌های هرز سوروف، چسبک و پنجه

¹ Amplified fragment length polymorphism

² restriction fragment length polymorphism

³ random amplified polymorphic DNA

⁴ retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism

⁵ repetitive element based polymerase chain reaction

⁶ inter simple sequence repeat

⁷ microsatellites or simple sequence repeat

(Suzuki et al. 2006, Wicaksono et al. 2017)

در این پژوهش، با جمع‌آوری نمونه‌هایی از میزبان‌های مختلف و برخی از ارقام متداول برنج، ارتباط ژنتیکی بین جدایه‌های جمع‌آوری شده و احتمال اختصاصیت در بیماری‌زایی جدایه‌ها روی میزبان‌هایی شامل علف‌های هرز و همچنین چند رقم برنج (هاشمی، طارم دیلمانی، علی-کازمی و ندا) تعیین گردید. تاکنون مطالعه‌ای در خصوص استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مبتنی بر تراسپوزون Pot2 جهت بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ عامل بلاست، در بین جدایه‌های به دست آمده از برنج و علف‌های هرز میزبان در ایران صورت نگرفته است. بدین منظور در این تحقیق از تکنیک مولکولی rep-PCR برای بررسی ارتباط اختصاصی بین میزبان‌های گیاهی با کلون‌های شناخته شده قارچ استفاده شد. همچنین میزان شباهت و تفاوت ژنتیکی جدایه‌های به دست آمده از هر میزبان در بین آنها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه برداری، جداسازی، بررسی ریخت شناسی جدایه‌ها و شناسایی گونه

نمونه برداری از بوته‌های برنج و علف‌های هرز حاشیه مزارع به صورت تصادفی و از بافت‌های دارای علائم بلاست و لکه برگی در استان‌های گیلان و مازندران در مرداد و مهر ماه سال ۱۳۹۶ انجام شد. همچنین برای انجام این پژوهش، از جدایه‌های *P. oryzae* به دست آمده از میزبان‌های مختلف از نواحی حاشیه دریای خزر، موجود در کلکسیون قارچ شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران نیز استفاده شد. جهت جداسازی قارچ از روش کشت مرطوب در درون تشتک‌های پتری حاوی کاغذ صافی و

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مبتنی بر قطعه DNA تکرار شونده را به عنوان جایگزینی برای RFLP جهت انگشت-نگاری جدایه‌های قارچ و تعیین تنوع ژنتیکی آنها ابداع کردند. نتایج داده‌های انگشت‌نگاری آنها نشان داد جدایه‌های *M. grisea* به دست آمده از فیلیپین از گیاه برنج دارای ۲۶-۱۰ باند DNA و جدایه‌های بدست آمده از هیمالیا دارای ۳۲-۹ باند تکثیر شده بودند. در جدایه‌های به دست آمده از سایر گیاهان نیز ۲۸-۲ باند تکثیر شد. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از rep-PCR جدایه‌های به دست آمده از برنج و غیر برنج را از یکدیگر متمایز کرد. جدایه‌های به دست آمده از *Leersia hexandra* و *Panicum repens* در یک زیرگروه و جدایه‌های *Eleusine indica*, *Eragrostis* sp., *Digitaria ciliaris* و *Paspalum distichum* و *Panicum repens* در زیرگروه دیگری قرار گرفتند (George et al. 1998). انگشت‌نگاری DNA با روش rep-PCR ممکن است روش سنجش مناسبی را برای جریان ژنی در جمعیتی که مشکوک به نوترکیبی ژنتیکی فعال با استفاده از روش‌های جنسی یا پراجنسی هستند فراهم کند (George et al. 1998). در ایران تجزیه و تحلیل ساختار ژنتیکی گونه *M. grisea* برای اولین بار توسط جوان نیکخواه و همکاران (Javan-Nikkhah et al. 2004) روی ۲۲۱ جدایه به دست آمده از استان‌های گیلان و مازندران با استفاده از تکنیک مولکولی rep-PCR صورت گرفت و جدایه‌ها در شش دودمان یا گروه انگشت‌نگاری مجزا قرار گرفتند. تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ عامل بلاست با استفاده از آغازگر-های Pot2 و تکنیک مولکولی rep-PCR در سراسر جهان مورد مطالعه قرار گرفته است (Chen et al. 2006, Consolo et al. 2008, Farman 2002, Prabhu et al. 2007, Salimi et al 2018, Shang et al. 2016,

منابع معتبر شناسایی شدند (Bussaban *et al.* 2005, Ellis 1971, Ellis 1976, Pordel *et al.* 2016).

استخراج DNA ژنومی

برای تهیه میسلایوم جدایه‌های بدست آمده از برنج و علف‌های هرز از محیط غذایی PDA استفاده شد. استخراج DNA ژنومی قارچ با استفاده از روش ژنگ و استفنسون (Zhong & Steffenson 2001) با افزودن ۸۰۰ میکرولیتر بافر نمکی استخراج DNA (۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۵۰ میلی‌مولار EDTA و ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl [pH 7.5-8]) انجام شد.

تنوع ژنتیکی به روش rep-PCR براساس ترانسپوزون Pot2

برای تکثیر قطعات DNA بین تکرارهای عنصر انتقالی و تکرار شونده Pot2 جهت انگشت‌نگاری ژنوم قارچ، از جفت آغازگرهای POT2-1 (5'-CGGAAGCCCTAA) و POT2-2 (3'-AGCTGTTT) و (3'-CCCTCATTCGT) طراحی شده توسط جورج و همکاران (George *et al.* 1998) استفاده گردید. غلظت و مقادیر حجمی مواد به کار رفته در تهیه مخلوط PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل دو میکرولیتر از DNA رقیق شده هر جدایه (۱۰۰ نانوگرم)، دوازده میکرولیتر آب دیونیزه سترون، نه میکرولیتر مخلوط آماده PCR (ساخت شرکت AMPLIQON شامل 0.4 mM dNTPs، 1 U Taq DNA Polymerase، 1.5 mM MgCl₂ و بافر PCR) و یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۱۰ پیکو-مول در نظر گرفته شد. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Palm cyciler CG1-96) (Corbett Research, Australia) با برنامه حرارتی PCR طبق منبع (thermal cycler) با برنامه حرارتی PCR طبق منبع

تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس استفاده شد. به این ترتیب که برگ‌های واجد علائم بلاست به قطعات کوچک یک سانتی‌متری از قسمت‌های آلوده به همراه نواحی سالم بافت برگ بریده و در محلول هیپوکلریت سدیم رقیق شده ۱۰ درصد (نیم درصد کلر فعال) به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شده و پس از سه بار شستشو در آب مقطر استریل به درون تشتک‌های پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب منتقل شدند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت، تشتک‌های پتری مورد بررسی قرار گرفته و در صورت مشاهده کنیدیوم قارچ مورد نظر روی قطعات برگ، خالص‌سازی با استفاده از روش تک کنیدیوم انجام شد. بعد از گذشت ۷۲ ساعت از جوانه‌زنی کنیدیوم‌ها، برای داشتن جدایه خالص، تک نوک هیف‌ها به محیط کشت (Potato Dextrose Agar) PDA منتقل شدند (Pordel *et al.* 2016).

برای ارزیابی ویژگی‌های ماکروسکوپی هر جدایه از قبیل قطر، رنگ و شکل پرگنه، جدایه‌ها در محیط غذایی PDA کشت شدند و بعد از هفت و ده روز، بررسی و مشخصات آن‌ها یادداشت گردید. جهت بررسی خصوصیات میکروسکوپی هر جدایه در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت اختصاصی آب-آگار دو درصد (2% WA) به همراه برگ استریل برنج قرار داده شدند. سپس تشتک‌های پتری به داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل و تحت شرایط نور نزدیک به ماورای بنفش (NUV) متناوب (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) قرار گرفتند. بعد از گذشت ۱۰ تا ۱۲ روز اسلایدهای میکروسکوپی تهیه گردید. طول و عرض کنیدیوفور و کنیدیوم‌ها در هر جدایه با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus, BH2 Japan) بررسی و اندازه‌گیری شدند. نمونه‌های میکروسکوپی با بهره‌گیری از

صفر و یک برای الگوهای بانندی مربوط به آغازگر تشکیل شد. از این ماتریس جهت ایجاد جدول تشابه بین جدایه‌ها بر مبنای ضریب تشابه SM (Simple matching) استفاده گردید. بر اساس جدول تشابه، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای بر اساس الگوریتم UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) انجام شد و دندروگرام مربوطه با استفاده از نرم‌افزار NYSYS pc version 2.02e (Rohlf 1998) رسم گردید.

آزمون بیماری‌زایی

تعداد یازده جدایه از میزبان‌های برنج، سوروف، چسبک، سورگوم وحشی و پاسپالوم برای انجام آزمون بیماری‌زایی انتخاب شدند. بذور ارقام برنج (هاشمی، طارم دیلمانی، علی‌کاظمی و ندا) از مؤسسه تحقیقات برنج در معاونت آمل، بذور علف‌های هرز سوروف و چسبک از حاشیه مزارع برنج، بذر گندم (رقم زاگرس) از بانک ژن گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، بذر ذرت (لاین B73) از مؤسسه تحقیقات نهال و بذر کرج تهیه گردید. برای کشت میزبان سورگوم وحشی از ریزوم این گیاه که از محوطه فضای سبز پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران جمع‌آوری شده بود، استفاده شد. بذور ارقام برنج به مدت ۲۴ ساعت خیسانده و سپس به وسیله هیپوکلریت سدیم رقیق شده (با یک درصد کلر فعال) برای مدت ۱۰ دقیقه ضد-عفونی و سپس سه بار به مدت پنج دقیقه با آب مقطر شستشو شدند. بذور برنج، چسبک و سوروف جهت جوانه‌زنی درون تشتک‌های پتری شیشه‌ای حاوی کاغذ صافی استریل و مرطوب در دمای اتاق نگهداری شدند. گیاهچه بذور میزبان‌های ذکر شده بعد از پنج تا هفت روز در گلدان‌هایی با قطر و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر که با خاک

جورج و همکاران (George et al. 1998) به شرح زیر انجام شد.

یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲/۵ دقیقه، چهار چرخه شامل: واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها به ناحیه هدف در دمای ۶۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و گسترش رشته در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، ۲۶ چرخه شامل: واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به ناحیه هدف در دمای ۶۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و گسترش رشته در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه. یک چرخه گسترش نهایی رشته در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه (George et al. 1998).

برای مشاهده محصول PCR، الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد و با استفاده از نشانگر اندازه DNA با نام تجاری Gen Ruler™ 10 kb DNA Ladder Mix (Fermentas, Germany) انجام شد. ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR هر جدایه با دو میکرولیتر بافر رنگ (6X loading buffer) مخلوط و در چاهک‌های ژل آگارز ریخته شد. در ادامه، دستگاه الکتروفورز به مدت سه ساعت به منبع جریان الکتریکی با ولتاژ ۷۵-۷۰ ولت متصل گردید. با استفاده از دستگاه Gel Documentation (IMAGO (B&L system) عکس برداری از ژل انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

وجود و یا عدم وجود هر باند DNA برای هر نمونه به صورت یک و صفر در جدول داده‌ها (data matrix) در برنامه اکسل ۲۰۱۰ ثبت شد. ماتریس داده‌ها به صورت

شالیزار (برای ارقام برنج) و خاک زراعی معمولی (برای علف‌های هرز) پر شده بودند کشت شدند. ریزوم‌های جمع‌آوری شده به قطعات کوچک دارای جوانه تقسیم شدند و همزمان با گیاهچه سایر میزبان‌ها در عمق دو سانتی متری خاک قرار گرفتند. بذور گندم و ذرت به دلیل رشد سریع، ۱۰ روز قبل از زمان تقریبی مشخص شده برای مایه زنی کشت شدند. جهت حفظ رطوبت و رشد بهتر گیاهچه‌ها، روی گلدان‌ها به وسیله اتاقک‌های پلاستیکی با ارتفاع ۰/۵ متر پوشانده شد. برای هر میزبان تعداد معینی گیاهچه کاشته شد و بعد از مدتی گیاهچه‌های ضعیف حذف شده و تعداد چهار تا شش بوته در هر گلدان نگهداری شد. بعد از سه تا چهار هفته آزمون بیماری‌زایی گیاهان انجام گردید. برای تولید اسپور از محیط کشت آگار- برگ استریل برنج^۸ RLA و RBAS^۹ استفاده شد.

به ازای هر سه گلدان ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور که شامل یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون به غلظت اسپور^۵ 2×10^5 و نه میلی‌لیتر محلول ژلاتین ۰/۵٪ بود، تهیه گردید (Pordel et al. 2019). بوته میزبان‌های مختلف در مرحله چهار تا شش برگی مایه‌زنی شدند. بوته گلدان‌های شاهد هر میزبان نیز با محلول ژلاتین ۰/۵٪ مایه‌زنی شدند. گلدان‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵-۳۰ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی ۹۵ درصد و در تاریکی نگهداری شدند (برای اعمال تاریکی از پلاستیک ضخیم مشکی روی جعبه‌های پلاستیکی استفاده شد و بعد از ۲۴ ساعت، پلاستیک مشکی برداشته شد). بعد از زمان مایه-زنی، دستگاه رطوبت‌ساز به مدت ۳ شبانه روز به صورت مداوم روشن نگه داشته شد. بعد از ۷ و ۱۰ روز علائم

برگی بررسی و یادداشت برداری صورت گرفت. ارزیابی بیماری هفت و ۱۰ روز پس از مایه‌زنی انجام شد. تیپ آلودگی با استفاده از مقیاس صفر تا پنج بر اساس مدل والننت و همکاران (Valent et al. 1991) ارزیابی گردید که در آن واکنش میزبان به شش کلاس مختلف تقسیم شده است.

- تیپ صفر: هیچ نشانه‌ای از بیماری روی برگ‌ها تشکیل نشود.
- تیپ یک: لکه‌های قهوه‌ای تا سیاه کوچکتر از نیم میلی‌متر و بدون اسپور روی برگ‌ها تشکیل شود.
- تیپ دو: لکه‌های قهوه‌ای با ابعاد نیم تا یک میلی‌متر و بدون اسپور روی برگ‌ها تشکیل شود.
- تیپ سه: لکه‌های یک تا سه میلی‌متری گرد و بیضوی با مرکزی خاکستری و احاطه شده با حلقه قهوه‌ای روی برگ‌ها تشکیل شود. این لکه‌ها کم و بیش اسپور دارند.
- تیپ چهار: لکه‌های مشخص دوکی شکل که به طول سه میلی‌متر یا بیشتر، مرکز آنها خاکستری و نکروزه با حاشیه متمایل به قرمز و یا آب سوخته روی برگ‌ها تشکیل شوند. لکه‌ها پیوسته نبوده و یا به طور جزئی بهم متصل شده‌اند، این لکه‌ها اسپوردار هستند.
- تیپ پنج: لکه‌ها به طور مشخص دوکی شکل بوده و بهم پیوسته باشند و در نتیجه بخش‌های بالایی برگ به طرف نوک در یک یا دو نقطه از بین رفته باشد.

نتایج

جدایه‌های قارچی و شناسایی

از مجموع نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده، ۱۲۱ جدایه با ویژگی‌های ریخت شناسی گونه *P. oryzae* از

^۸ Rice Leaf Agar

^۹ Rice Bran Agar Sucrose

روی علائم برگ‌گی گیاهان برنج، سورگوم، سوروف، چسبک

جدول ۱. جدایه‌های *Pyricularia oryzae* به دست آمده از برنج و میزبان‌های گیاهی دیگر، مورد استفاده در این پژوهش

Table 1. Isolates of *Pyricularia oryzae* from rice and other host plants used in this study.

Original Host	Isolate	Place of collection	Data	Reference
<i>Oryza sativa</i>	IR0077	Rasht- Guilan province	15/08/2015	Pordel et al. 2019
<i>O. sativa</i>	IR0136	Kordkuy- Golestan province	16/08/2016	Pordel et al. 2019
<i>O. sativa</i>	IR0060	Rasht- Guilan province	15/08/2015	Pordel et al. 2019
<i>O. sativa</i>	IR0028	Sari- Mazandaran Province	12/09/2012	Pordel et al. 2019
<i>O. sativa</i>	IR0145	Kalat- Khorasan Razavi Province	16/10/2016	Pordel et al. 2019
<i>O. sativa</i>	225-6	Tonekabon- Mazandaran Province	13/08/2017	This study
<i>O. sativa</i>	306-6	Rice Research Institute of Mazandaran Branch- Mazandaran province	14/08/2017	This study
<i>O. sativa</i>	173-4	Kalle Bast- Mazandaran Province	12/08/2017	This study
<i>O. sativa</i>	8-7	Rostamabad- Guilan province	17/10/2017	This study
<i>O. sativa</i>	63-4	Rice Research Institute of Iran- Guilan province	18/10/2017	This study
<i>O. sativa</i>	13-1	Amin Abad- Guilan province	17/10/2017	This study
<i>O. sativa</i>	97-6	Sangar- Guilan province	19/10/2017	This study
<i>O. sativa</i>	84-2	Someh sara- Guilan province	18/10/2017	This study
<i>O. sativa</i>	50-1	Shirgah- Mazandaran Province	10/08/2017	This study
<i>O. sativa</i>	338-3	Amol- Mazandaran Province	05/10/2017	This study
<i>Sorghum halepense</i>	58-1	Rice Research Institute of Iran- Guilan province	18/10/2017	This study
<i>S. halepense</i>	58-6	Rice Research Institute of Iran- Guilan province	18/10/2017	This study
<i>Paspalum</i> sp.	IR0003	Amol- Mazandaran Province	12/09/2012	Pordel et al. 2019
<i>Paspalum</i> sp.	IR0005	Amol- Mazandaran Province	12/09/2012	Pordel et al. 2019
<i>P. dilatatum</i>	234-6	Ramsar- Mazandaran Province	13/08/2017	This study
<i>P. dilatatum</i>	234-1	Ramsar- Mazandaran Province	13/08/2017	This study
<i>Eleusine</i> sp.	IR0002	Amol- Mazandaran Province	12/09/2012	Pordel et al. 2019
<i>Cyndon dactylon</i>	IR0144	Gharakhil- Mazandaran Province	16/09/2012	Pordel et al. 2019
<i>C. dactylon</i>	IR0009	Gharakhil- Mazandaran Province	12/09/2012	Pordel et al. 2019
<i>Echinochloa crus-galli</i>	130	Sharafshadeh- Guilan province	04/10/2017	This study
<i>E. crus-galli</i>	43-3	Rice Research Institute of Iran- Guilan province	18/10/2017	This study
<i>E. crus-galli</i>	48-4	Rice Research Institute of Iran- Guilan province	18/10/2017	This study
<i>E. crus-galli</i>	88-2	Someh sara- Guilan province	18/10/2017	This study
<i>Setaria viridis</i>	108-1	Lasht-e Nesha- Guilan province	19/10/2017	This study
<i>S. viridis</i>	51-3	Shirgah- Mazandaran Province	10/08/2017	This study
<i>S. viridis</i>	117	Lahijan- Guilan province	04/10/2017	This study
<i>S. italica</i>	IR0104	Gharakhil- Mazandaran Province	16/08/2016	Pordel et al. 2019

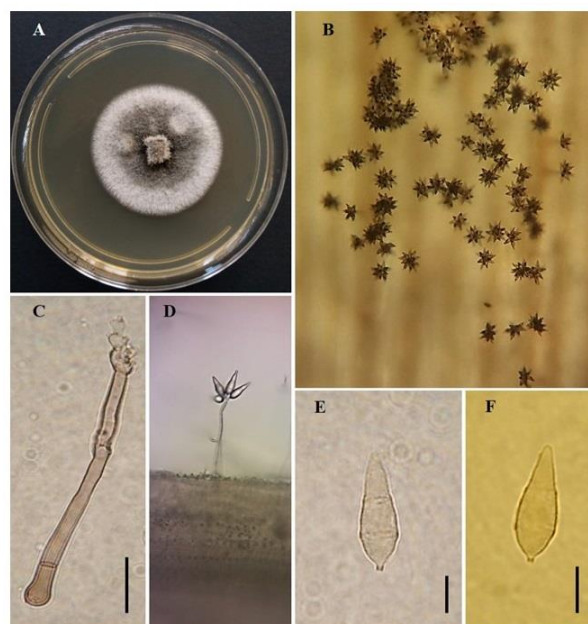
روشن، دارای دو دیواره عرضی و ابعاد $10-7 \times 16-25$ میکرومتر بود (شکل ۱، E-F). برای انجام این پژوهش، نوزده جدایه از ۱۲۱ جدایه به اضافه یازده جدایه *P. oryzae* به دست آمده از میزبان‌های مختلف از نواحی حاشیه دریای خزر، موجود در کلکسیون قارچ شناسی

و پاسپالوم جداسازی شد. که پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ خاکستری (شکل ۱، A)، کنیدیوفورها منفرد به رنگ قهوه‌ای روشن و طول آنها تقریباً ۲۵۰-۱۰۰ میکرومتر، سلول کنیدی‌زا زانویی و زائده‌دار (شکل ۱، C)، کنیدیوم‌ها گلابی شکل وارونه، به رنگ قهوه‌ای

تجزیه و تحلیل پلی مورفیسم DNA به روش rep-PCR

طول قطعات تکثیر شده از ۶۵۰ جفت باز تا حدود ۱۰ کیلو باز در جدایه‌های مختلف متغیر بود (جدول ۲). برای تعریف هر گروه انگشت نگاری DNA سطح شباهت ۷۵٪ در الگوی DNA معیار قرار گرفت به این ترتیب جدایه‌هایی که ۷۵٪ تا ۱۰۰٪ در الگوی DNA شباهت داشتند، در یک دودمان (lineage) قرار گرفتند. جدایه‌های جمع‌آوری شده از میزبان‌های مختلف در سه گروه انگشت نگاری قرار گرفتند. هر یک از گروه‌های انگشت نگاری با حروف انگلیسی A، B و C نامگذاری شدند (شکل ۳). دودمان A شامل جدایه‌هایی از میزبان برنج، سوروف، پاسپالوم و مرغ بود. اکثر جدایه‌های به دست آمده از میزبان برنج در این کلون قرار گرفتند. جدایه‌هایی از میزبان برنج، چسبک، ارزن و سوروف در دودمان B و جدایه‌هایی از میزبان پاسپالوم، گندیل و سورگوم وحشی در دودمان C قرار گرفتند. تنها جدایه گندیل مورد بررسی در این مطالعه با شباهت ۱۰۰ درصد در الگوی بانندی، در کنار دو جدایه از میزبان پاسپالوم قرار گرفت. دو جدایه پاسپالوم و یک جدایه گندیل مربوط به یک منطقه جغرافیایی (آمل) بودند. به طور کلی در هر سه دودمان شناسایی شده، ارتباطی بین جدایه‌های موجود در هر کلون با منطقه جمع‌آوری آنها

گروه گیاهپزشکی استفاده شد. این جدایه‌ها براساس نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل پلی مورفیسم DNA به روش



شکل ۱. رنگ پرگنه، کنیدیوفورها و کنیدیوم در جدایه 108-1 گونه *P. oryzae* به دست آمده از میزبان چسبک. (A) رنگ پرگنه، (B و D) کنیدیوفور و کنیدیوم روی برگ، (C) کنیدیوفور (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)، (E و F) کنیدیومها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig 1. Colony, conidiophores and conidia of *P. oryzae* (108-1) isolated from wild foxtail millet. A) Colony, B and D) Conidiophores and conidia on leaf, C) Conidiophore (Bar= 10 μ m), E and F) Conidia (Bar= 10 μ m).

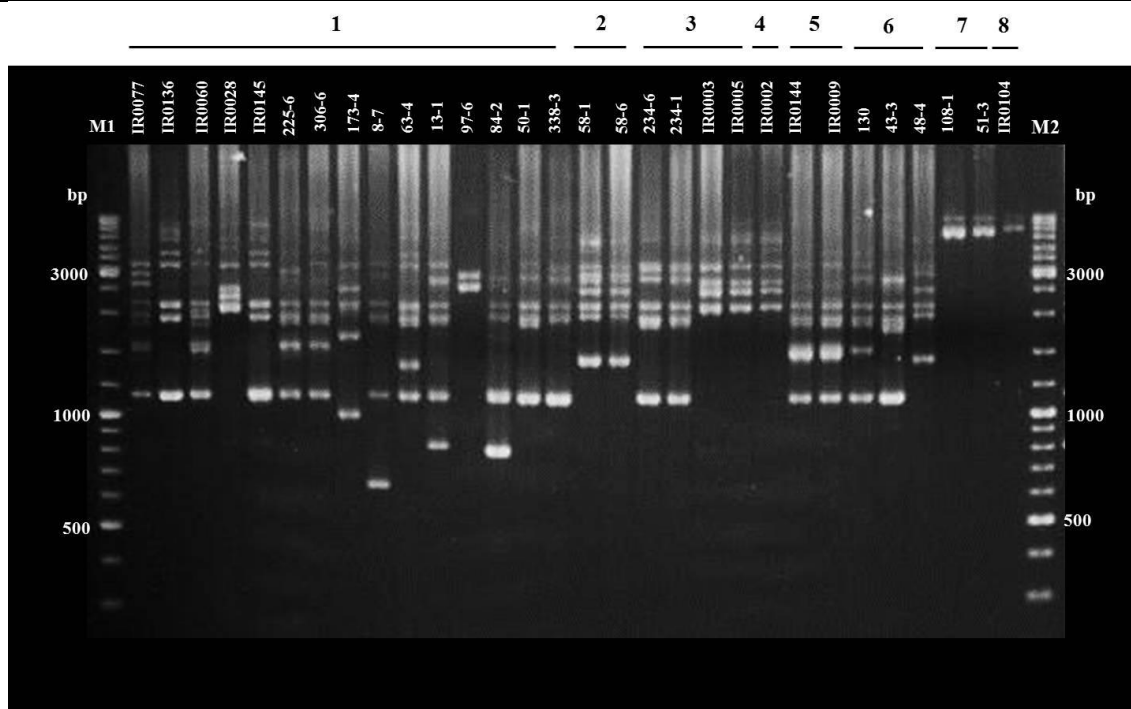
rep-PCR و با توجه به مشابهت الگوی بانندی حاصل از واکنش پی سی آر انتخاب گردید.

جدول ۲. تعداد قطعات DNA تکثیر شده و اندازه آنها در جدایه‌های *Pyricularia oryzae* به دست آمده از گیاهان میزبان مختلف.

Table 2. Number of amplified DNA fragments and their size in *Pyricularia oryzae* isolates from different host plants.

Original Host	Number of isolates	Number of bands	Size
<i>Oryza sativa</i>	15	2-9	650 bp-8 kb
<i>Sorghum halepense</i>	2	10	1.5 kb-8 kb
<i>Paspalum</i> sp.	4	8	1150 bp-8 kb
<i>Eleusine</i> sp.	1	8	2250 bp-8 kb

<i>Echinochloa crus-galli</i>	3	7-8	1150 bp-5 kb
<i>Setaria viridis</i>	2	2	8 kb-10 kb
<i>S. italica</i>	1	2	8 kb-10 kb



شکل ۲. الگوی انگشت‌نگاری DNA مربوط به جدایه‌های *Pyricularia oryzae* به دست آمده از برنج و گیاهان میزبان دیگر بر اساس روش مولکولی Pot2 rep-PCR. اعداد بالای شکل نشان دهنده میزبان‌ها هستند، ۱- برنج، ۲- سورگوم وحشی، ۳- پاسپالوم، ۴- گندیل، ۵- مرغ، ۶- سوروف، ۷- چسبک و ۸- مربوط به ارزن دم روباهی می‌باشد. M1 و M2 نشانگر اندازه DNA با نام تجاری Gen Ruler™ 10 kb DNA Ladder Mix (Fermentas, Germany)

Fig 2. DNA fingerprinting pattern of *Pyricularia oryzae* isolated from rice and other host plants using Pot2 rep-PCR. The numbers above the figure indicate the plant hosts; 1. *Oryza sativa* 2. *Sorghum halepense* 3. *Paspalum* sp. 4. *Eleusine* sp. 5. *Cyndon dactylon* 6. *Echinochloa crus-galli* 7. *Setaria viridis* 8. *S. italica*. Lane M1 and M2 Gen Ruler™ 10 kb DNA Ladder Mix (Fermentas, Germany).

نوع تیپ بیماری‌زایی پایین‌تری را به خود اختصاص می‌دهند (جدول ۳). علائم ایجاد شده در اثر جدایه‌های *P. oryzae* به دست آمده از میزبان برنج حدود هفت روز پس از مایه‌زنی به صورت لکه‌های دوکی شکل کشیده و سفید رنگ با حاشیه قهوه‌ای در شرایط گلخانه روی برگ‌ها ظاهر گردید. جدایه‌های به دست آمده از میزبان برنج روی چهار رقم مورد بررسی، تیپ بیماری‌زایی متفاوتی را ایجاد کردند و هیچ‌یک از این جدایه‌ها روی رقم ندا بیماری‌زا

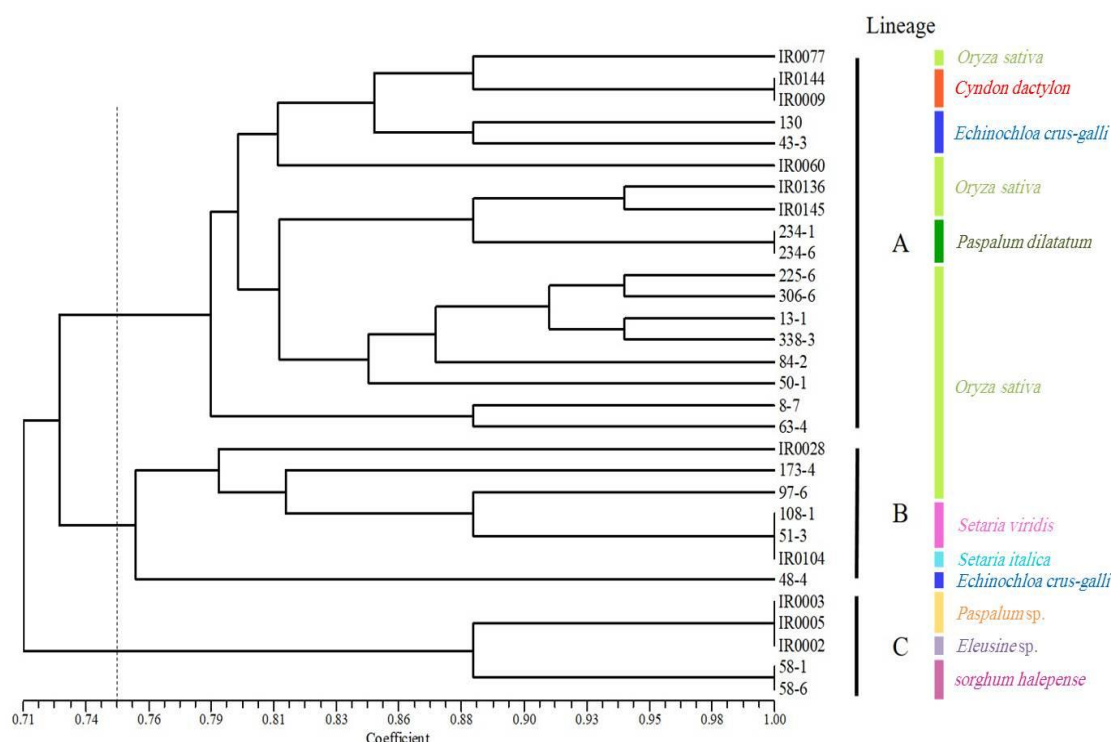
مشاهده نشد. الگوی بانندی تکثیر شده برای جدایه‌های میزبان‌های مختلف در شکل ۲ مشخص شده است.

آزمون بیماری‌زایی

نتایج آزمون بیماری‌زایی نشان داد که جدایه‌های به دست آمده از هر میزبان روی همان میزبان قدرت بیماری‌زایی بالاتری دارند و روی میزبان‌های دیگر یا بیماری‌زا نبوده، و یا قدرت بیماری‌زایی کمتری دارند و

روی رقم هاشمی بیمارگر قوی‌تری بود. جدایه‌های به دست آمده از میزبان برنج روی میزبان‌های سوروف،

نبودند اما هر چهار جدایه روی رقم دیلمانی بیماری‌زا بودند. جدایه 225-6 نسبت به دیگر جدایه‌های میزبان برنج



شکل ۳. فنوگرام حاصل از انگشت نگاری DNA با استفاده از تکنیک rep-PCR برای ۳۰ جدایه *Pyricularia oryzae* به دست آمده از برنج و میزبان‌های گیاهی دیگر بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه SM. مقیاس در پایین شکل ضریب تشابه را نشان می‌دهد.

Fig 3. Phonogram of 30 *Pyricularia oryzae* isolates from different host plants, constructed using UPGMA based on Simple Match's similarity coefficients; Data from Pot2 rep-PCR analysis; scale at the bottom represents coefficients of similarity.

کردند. جدایه‌های به دست آمده از سوروف روی میزبان چسبک علائم تیپ دو را ایجاد کردند و روی میزبان‌های گندم، ذرت و سورگوم وحشی بیماری‌زا نبودند (شکل ۴). علائم ایجاد شده توسط جدایه‌های *P. oryzae* به دست آمده از میزبان چسبک سه روز پس از مایه‌زنی به صورت لکه‌های دوکی شکل کشیده و سفید رنگ با حاشیه قهوه‌ای در شرایط گلخانه روی برگ‌ها ظاهر گردید. جدایه‌های به دست آمده از میزبان چسبک روی میزبان خود به شدت بیماری‌زا بود به طوریکه برگ‌ها کاملاً خشک شدند. این جدایه‌ها روی ارقام برنج، سوروف، گندم، ذرت و سورگوم

چسبک، سورگوم وحشی، گندم و ذرت نیز مایه‌زنی شدند. هیچ‌یک از جدایه‌های برنج روی سایر میزبان‌ها بیماری‌زا نبودند و یا علائم تیپ دو یعنی بیماری‌زایی ضعیف را نشان دادند. فقط جدایه 84-2 روی میزبان سورگوم وحشی علائم تیپ سه را ایجاد نمود. جدایه‌های به دست آمده از میزبان سوروف روی میزبان خود قدرت بیمارگری بالایی نداشتند و علائم بیماری‌زایی تیپ سه را به صورت لکه-های قهوه‌ای کوچک با طول دو میلی‌متر را ایجاد نمودند. این جدایه‌ها در ارقام هاشمی، علی‌کاظمی و ندا بیماری‌زا نبودند اما علائم تیپ سه را در رقم طارم دیلمانی ایجاد

وحشی بیماری‌زا نبودند. جدایه به دست آمده از میزبان سورگوم وحشی روی میزبان خود قدرت بیمارگری بالایی نداشت و علائم بیماری‌زایی تیپ سه را به صورت لکه‌های ارغوانی رنگ کوچک با طول دو میلی‌متر را ایجاد نمودند. جدول ۳. تیپ آلودگی گیاهان مایه زنی شده با جدایه‌های *Pyricularia oryzae* به دست آمده از برنج، سوروف، چسبک، سورگوم وحشی و پاسپالوم

Table 3. Infection type of plants inoculated with *Pyricularia oryzae* isolates from *Oryza sativa*, *Echinochloa crus-galli*, *Setaria viridis*, *Sorghum halepense*, *Paspalum dilatatum*.

Test Plants	Original Host and Isolates										
	<i>O. sativa</i>				<i>E. crus-galli</i>			<i>S. viridis</i>		<i>S. halepense</i>	<i>P. dilatatum</i>
	225-6	97-6	84-2	338-3	130	43-3	88-2	108-1	51-3	58-1	234-6
<i>O. sativa</i> cv. Hashemi	5	2	2	0	1	1	2	1	0	-	1
<i>O. sativa</i> cv. Tarom Dilamani	5	4	4	3	3	3	3	1	1	-	3
<i>O. sativa</i> cv. Ali-Kazemi	-	2	3	3	1	1	-	-	-	-	-
<i>O. sativa</i> cv. Neda	1	0	1	1	1	1	1	1	0	-	0
<i>E. crus-galli</i>	0	2	1	0	3	3	3	1	1	1	0
<i>S. viridis</i>	1	2	2	2	2	2	2	5	5	2	2
<i>S. halepense</i>	1	2	3	2	1	1	2	1	2	3	2
<i>Triticum aestivum</i> cv. Zagros	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Zea mays</i> Line B73	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0

* Infection type: 0, no visible evidence of infection 1, uniform dark brown pinpoint lesions up to 0.5 mm long 2, small lesion with distinct tan centers surrounded by a darker brown margin (up to 1 mm) 3, small eyespot lesions 2 mm in length with tan centers surrounded by dark brown margins 4, intermediate size eyespot lesions, approximately 3-4 mm in length 5, large eyespot lesions that attain the maximum size seen for a particular cultivar (Valent *et al.* 1991).

تنها توانایی بیماری‌زایی روی میزبان جدا شده را دارند و توانایی بیماری‌زایی روی میزبان‌های دیگر را دارا نمی‌باشند. پردل و همکاران (Pordel *et al.* 2015, Pordel *et al.* 2019) بیماری‌زایی جدایه‌های به دست آمده از میزبان‌های مختلف را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمون بیماری‌زایی آنها نشان داد جدایه‌های به دست آمده از میزبان‌های مختلف دامنه میزبانی محدودی را آلوده می‌کنند و علائم شدید آلودگی را روی میزبان خود ایجاد می‌نمایند. شیرکه و همکاران (Shirke *et al.* 2016) بیماری‌زایی جدایه‌هایی از میزبان‌های برنج (*O. sativa*)، ارزن دم روباهی (*S. italica*)، ارزن انگشتی (*Eleusine coracana* L.) و چمن تشی (*Cenchrus ciliaris* L.) را

این جدایه روی میزبان چسبک بیمارگر ضعیف و روی سایر میزبان‌ها غیر بیماری‌زا بود. جدایه به دست آمده از میزبان پاسپالوم علائم نوع تیپ سه را در رقم دیلمانی ایجاد کرد. این جدایه روی سایر ارقام بیماری‌زا نبود و روی میزبان‌های چسبک و سورگوم وحشی با ایجاد علائم تیپ دو، بیمارگر ضعیف شناخته شد (شکل ۴).

بحث

بر اساس بررسی‌های ریخت‌شناسی مشخص شد که جدایه‌های حاصل از میزبان‌های مختلف متعلق به گونه *Pyricularia oryzae* می‌باشد. بر اساس اطلاعات حاصل از بیماری‌زایی، جدایه‌های حاصل از میزبان‌های متفاوت

مورد بررسی قرار دادند. تمام جدایه‌های مورد استفاده در
این مطالعه هیچگونه بیماری‌زایی متقابل نشان ندادند.
ژونگ و همکاران (Zhong *et al.* 2016) بیماری‌زایی
جدایه‌هایی از میزبان‌های *S. viridis*، *O. sativa*، *Eleusine*



شکل ۴. بیماری‌زایی جدایه‌های *Pyricularia oryzae* (A) علائم ایجاد شده توسط جدایه به دست آمده از برنج (225-6) روی رقم برنج هاشمی. (B) علائم ایجاد شده توسط جدایه به دست آمده از برنج (84-2) روی گیاه چسبک. (C) علائم ایجاد شده توسط جدایه به دست آمده از برنج (84-2) روی سورگوم وحشی. (D) علائم ایجاد شده توسط جدایه به دست آمده از برنج (97-6) روی سورگوم وحشی. (E) علائم ایجاد شده توسط جدایه به دست آمده از سوروف (130) روی چسبک. (F) علائم ایجاد شده توسط جدایه به دست آمده از سوروف (88-2) روی سورگوم وحشی. (G و H) علائم ایجاد شده توسط جدایه به دست آمده از چسبک (108-1) روی چسبک. (I) علائم ایجاد شده توسط جدایه به دست آمده از چسبک (51-3) روی سورگوم وحشی. (K) علائم ایجاد شده توسط جدایه به دست آمده از سورگوم وحشی (58-1) روی سورگوم وحشی. (L) علائم ایجاد شده توسط جدایه به دست آمده از پاسپالوم (234-6) روی چسبک.

Fig 4. Virulence of the *Pyricularia oryzae* isolates. A) Lesion caused by *Oryza sativa* isolate (225-6) on rice cultivar Hashemi. B) Lesion caused by *O. sativa* isolate (84-2) on *Setaria viridis*. C) Lesion caused by *O. sativa* isolate (84-2) on *Sorghum halepense*. D) Lesion caused by *O. sativa* isolate (97-6) on *S. halepense*. E) Lesion caused by *Echinochloa crus-galli* isolate (130) on *S. viridis*. F) Lesion caused by *E. crus-galli* isolate (88-2) on *S. halepense*. G and H) Lesion caused by *S. viridis* isolate (108-1) on *S. viridis*. I) Lesion caused by *S. viridis* isolate (108-1) on *Zea mays*. J) Lesion caused by *S. viridis* isolate (51-3) on *S. halepense*. K) Lesion caused by *S. halepense* isolate (58-1) on *S. halepense*. L) Lesion caused by *Paspalum dilatatum* isolate (234-6) on *S. viridis*.

جغرافیایی مشاهده نشد. حضور عناصر تکرار شونده Pot2 در میزبان‌های برنج و غیر برنج نشان می‌دهد که این عناصر قبل از تکامل در اختصاصیت میزبانی در جدایه‌های *P. oryzae* وجود داشته است (Shirke et al. 2016). نتایج شانگ و همکاران (Shang et al. 2016) نشان داد جدایه‌هایی از یک استان از نظر ژنتیکی شباهت بیشتری به هم داشتند، با این حال منطقه جمع‌آوری جدایه‌ها کاملاً با خوشه بندی منطبق نبود و جدایه‌هایی از استان‌های مختلف در یک خوشه یا دودمان قرار گرفتند. نتایج تحقیق وی کیک سونو و همکاران (Wicaksono et al. 2017) نشان داد نمونه‌هایی که از مکان‌های نزدیک به هم جمع‌آوری می‌شوند همیشه شباهت بالایی ندارند. در پژوهش کانسولو و همکاران (Consolo et al. 2008) در آرژانتین، ارتباط معنی داری بین شباهت انگشت‌نگاری DNA و پاتوتایپ‌ها وجود نداشت. جمعیت *P. oryzae* از نظر ژنتیکی یکنواخت و عمدتاً کلونال بوده اما از تنوع پاتوتایپ بالایی برخوردار می‌باشد.

Digitaria sanguinalis و *indica* را مورد مطالعه قرار دادند. جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه بیمارگری خود را حفظ کرده و فقط روی میزبان مربوطه بیماری‌زا بودند که این نشان می‌دهد جدایه‌ها اختصاصی میزبان هستند. در پژوهش انجام شده توسط کوچ و همکاران (Couch et al. 2005) در تمام آزمون‌های بیماری‌زایی انجام شده، جدایه‌های برنج به شدت روی برنج بیماری‌زا بودند و جدایه‌های غیربرنج روی برنج عموماً غیربیماری‌زا و یا بیمارگر ضعیف بودند. تعدادی از جدایه‌های غیربرنج لکه‌هایی در ارقام برنج ایجاد کردند اما این لکه‌ها تیپ بیماری‌زایی کمتری را به خود اختصاص دادند و یا نسبت به جدایه‌های برنج تعداد لکه‌های کمتری را ایجاد کردند. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از انگشت‌نگاری DNA با استفاده از تکنیک مولکولی rep-PCR جدایه‌های به دست آمده از برنج و علف‌های هرز را در سه دودمان کلنی قرار داد. به طور کلی در هر سه دودمان شناسایی شده، جدایه‌هایی از میزبان‌ها و مناطق جمع‌آوری متفاوت وجود داشت و ارتباطی بین شباهت الگوی بانندی و منطقه

منابع

- Akase K. and Kusaba M. 2017. Overwintering of *Pyricularia oryzae* in wild infected foxtails. *Journal of General Plant Pathology* 83:197-204.
- Bussaban B., Lumyong S., Seelensa T., Park D. C., Mckenzie E. H. C. and Hyde K. D. 2005. Molecular and Morphological characterization of *Pyricularia* and allied genera. *Mycologia* 97:1002-1011.
- Chen Q. H., Wang Y. C. and Zheng X. B. 2006. Genetic Diversity of *Magnaporthe grisea* in China as Revealed by DNA Fingerprint Haplotypes and Pathotypes. *Phytopathology* 154:361-369.
- Consolo V. F., Cordo C. A. and Salerno G. L. 2008. DNA fingerprint and pathotype diversity of *Pyricularia oryzae* populations from Argentina. *Australasian Plant Pathology* 37:357-364.
- Couch B. C., Fudal I., Lebrun M., Tharreau D., Valent B., Kim P., Nottoghem J. and Kohn, M. 2005. Origins of Host-Specific Populations of the Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae* in Crop Domestication with Subsequent Expansion of Pandemic Clones on Rice and Weeds of Rice. *Genetics* 170:613-630.
- Ellis M. B. 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Common Wealth Mycological Institute, Kew, England.
- Ellis M. B. 1976. Dematiaceous hyphomycetes. Common Wealth Mycological Institute, Kew, England.
- Farman M. L. 2002. *Pyricularia grisea* isolates causing gray leaf spot on perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in the United States: Relationship to *P. grisea* isolates from other host plants. *Phytopathology* 92:245-254.
- George M. L., Nelson R. G., Ziegler R. S. and Leung H. 1998. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and Endogenous repetitive DNA Sequences. *Phytopathology* 88:223-229.

- Javan-Nikkhah M., McDonald B. A. and Banke S. 2004. Genetic structure of Iranian *Pyricularia grisea* population based on rep-PCR fingerprinting. *European Journal of Plant Pathol* 110:909-919.
- Milazzo J., Pordel A., Ravel S. and Tharreau D. 2019. First scientific report of *Pyricularia oryzae* causing gray leaf spot disease on perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in France. *Plant Disease*. 103.
- Oh H. S., Tosa Y., Takabayashi N., Nakagawa S., Tomita R., Don L. D., Kusaba M., Nakayashiki H. and Mayama S. 2002. Characterization of an *Avena* isolate of *Magnaporthe grisea* and identification of a locus conditioning its specificity on oat. *Canadian Journal of Botany* 80:1088-1095.
- Pordel A., Javan-Nikkhah M., Khodaparast S. A. 2015. A reappraisal of the Pyriculariaceae in Iran. *Mycologia Iranica* 2:109-116.
- Pordel A., Javan-Nikkhah M. and Khodaparast S. A. 2016. Revision of *Pyricularia oryzae* and occurrence of new hosts for the pathogen Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 52:67-83.
- Pordel A., Javan-Nikkhah M., Tharreau D., Mirzadi Gohari A. and Moumeni A. 2019. Host-specificity and sexual compatibility of *Pyricularia oryzae* isolated from different hosts in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 54:277-289.
- Pordel A., Ravel S., Charriat F., Gladieux P., Cros-Arteil S., Milazzo J., Adreit H., Javan-Nikkhah M., Mirzadi-Gohari A., Moumeni A., Tharreau D. 2021. Tracing the origin and evolutionary history of *Pyricularia oryzae* infecting maize and barnyard grass. *Phytopathology* 111:128-136.
- Prabhu A. S., Araujo L. G., Silva G. B. and Trindade M. G. 2007. Virulence and rep-PCR Analysis of *Pyricularia grisea* Isolates from Two Brazilian Upland Rice Cultivars. *Fitopatologia Brasileira*. 32:13-70.
- Salimi F., Javan-Nikkhah M., Padasht Dehkayi F., Alizadeh A., Soltanlu H. and Yousefirad S. 2018. Dynamic of *Pyricularia oryzae* at the two stages, leaf, and panicle neck blast based on the assessment of population structure at leaf, tiller, and field levels. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 49:187-201.
- Shang J., Wang Y., Su L., Luo M., Yan X., Yu C. and Zhu Y. 2016. Comparative analysis of genetic structure in *Magnaporthe oryzae* isolates from *indica* and *japonica* hosts in China. *Gen Plant Pathol*.
- Shirke M. D., Mahesh H. B. and Gowda M. 2016. Gnome-wide comparison of *Magnaporthe* species reveals a host-specific pattern of secretory proteins and transposable elements. *PLoS one* 11:1-19.
- Suzuki F., Arai M. and Yamaguchi J. 2006. DNA fingerprinting of *Pyricularia grisea* by rep-PCR using a single primer based on the terminal inverted repeat from either of the transposable elements *Pot2* and *MGR586*. *Journal of General plant Pathology* 72:314-317.
- Rohlf F. J. 1998. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.02 User Guide.
- Valent B., Farrall L. and Chmley F. G. 1991. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a Series of Backcrosses. *Genetics* 127:87-101.
- Wicaksono D., Wibowo A. and Widiastatud A. 2017. Genetic Diversity of *Pyricularia oryzae*, the caudal agent Agent of Rice Blast Disease, Based on Repetitive Element- Based Polymerase chain Reaction. *Springer*. 2017:41-56.
- Xu X., Yang W., Tian K., Zheng J., Liu X., Li K., Lu W., Tan Y., Qin Y. and Wang C. 2018. Genetic diversity and pathogenicity dynamics of *Magnaporthe oryzae* in the Wuling Mountain area of China. *European Journal of Plant Pathology* 153:731-742.
- Zarrinnia V., Javan-Nikkhah M., Zamani Zadeh H., Mehrabi R. and Khosravi V. 2011. An investigation of the pathogenicity characteristics of *Magnaporthe grisea* isolates collected from different host plants from the family Poaceae and race determination of the pathogenic isolates. *Iranian Journal of Plant Protection* 42:179-190.
- Zhong Zh., Norvienyeku J., Chen M., Boa J., Lin L., Chen L., Lin Y., Wu X., Cia Z., Zhang Q., Lin X., Hong Y., Huang J., Xu L., Zhang H., Chen L., Tang W., Zheng H., Chen X., Wang Y., Lian B., Zhang L., Tang H., Lu G., Ebbolle D. J., Wang B. and Wang Z. 2016. Directional Selection from Host Plants Is a Major Force Driving Host Specificity in *Magnaporthe* Species. *Scientific Report* 6:25591:1-12.
- Zhong S. and Steffenson B. J. 2001. Virulence and molecular diversity of *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology* 91:469-476.