

شناسایی قارچ‌های ایجاد کننده بیماری لکه‌قهوه‌ای برنج در استان گیلان

محمدرضا صفری مطلق^۱، حمیدرضا زمانی زاده^۲، قربانعلی حجارود^۳ و محمود اخوت^۳

^۱عضو هیأت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت؛ ^۲دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

تهران؛ ^۳اساتید گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: ۸۳/۶/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۸۴/۳/۲۴

چکیده

بیماری لکه‌قهوه‌ای، یکی از بیماری‌های بذرزاد برنج است که در کلیه مراحل رشد گیاه از خزانه تا مزرعه، روی گیاه دیده شده و خساراتی را از جنبه کیفی و کمی به محصول وارد می‌کند. هر چند این بیماری در بیشتر نقاط کشور که در آنها برنج کشت می‌شود وجود دارد، ولی اطلاعات دقیقی از پراکندگی بیماری، تنوع گونه‌ها و همچنین میزان خسارت‌های وارده، موجود نیست. از این رو مطالعاتی در زمینه شناسایی جنس و گونه‌های قارچ‌های عامل این بیماری در گیلان به عمل آمد که برای این منظور ابتدا از ۹۱ مزرعه برنج، در استان گیلان نمونه‌برداری شد و نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده جهت جداسازی قارچ عامل بیماری، روی محیط PDA و کاغذ صافی قرار داده شدند و بدین ترتیب ۱۲۰ جدایه بدست آمد که برای اسپورزایی، جدایه‌ها روی محیط آب شیت آگار و ساقه گندم کشت داده شدند و آنگاه صفات مورفولوژیکی کنیدی و کنیدیوفر، فرآیند تشکیل کنیدی و نحوه جوانه‌زنی آنها، جهت تشخیص تاکسونومیکی مورد بررسی قرار گرفتند که بر اساس نتایج بدست آمده قارچ‌های عامل بیماری متعلق به جنس *Bipolaris* بود و سه گونه *Bipolaris oryzae*، *Bipolaris victoriana* و *Bipolaris sp.* شناسایی شدند. گونه *Bipolaris oryzae* ۱۵ درصد، گونه *Bipolaris victoriana* ۷۵ درصد و گونه *Bipolaris sp.* ۱۰ درصد از کل جدایه‌ها را شامل شدند. آزمایش بیماری‌زایی روی نشاهای برنج رقم خزر، در محیط دسیکاتور انجام گرفت که نشان داد این قارچ‌ها روی برنج، بیماری‌زا بوده و موجب بروز علائم مشخص بیماری لکه قهوه‌ای برنج می‌گردند.

واژه‌های کلیدی: برنج، لکه قهوه‌ای، *Bipolaris*، گیلان

مقدمه

بیماری لکه‌قهوه‌ای^۱، یکی از بیماری‌های بذرزاد برنج است که در کلیه مراحل رشد گیاه از خزانه تا مزرعه روی برنج دیده می‌شود (بهاتاچاری و موکھوپودھیای، ۱۹۸۶). این بیماری دارای انتشار جهانی است و در همه کشورهای کشت‌کننده برنج در آسیا، آمریکا و آفریقا

گزارش شده است (او، ۱۹۸۵). این بیماری باعث سوختگی نشاها، آلودگی بذر از جمله پایین آوردن کیفیت و وزن آن، کاهش جوانه‌زدن ساقه اصلی شده و لکه‌برگی ایجاد می‌کند (بدی و همکاران، ۱۹۶۰). عامل این بیماری اولین بار توسط بردا دهان، در سال ۱۹۰۰ توضیح داده شد و او آن را *Helminthosporium oryzae* نامید (او، ۱۹۸۵). سپس هوری در ژاپن آن را توصیف کرد و

1- Brown spot

است (آلکورن، ۱۹۸۸). برای تمایز و تفکیک گونه‌های مختلف هر یک از این سه جنس، از ویژگی‌هایی همچون مورفولوژی کنیدیوم و کنیدیوفر، رنگ و شکل کلنی و مورفولوژی هیلوم استفاده می‌گردد (سیوانسان، ۱۹۸۷). شکل و اندازه کنیدی در این قارچ‌ها، با نوع موادغذایی و شرایط محیطی در ارتباط می‌باشد، به طوری که با افزایش میزان قند بیشتر از ۴ درصد و ازت بیشتر از ۰/۰۲ درصد، طول کنیدی و تعداد دیواره عرضی کنیدی اغلب آنها کاهش می‌یابد (ترینر و مارتینسون، ۱۹۷۸). pH محیط کشت نیز روی مورفولوژی کنیدی اثر دارد. طول کنیدی در محیط اسیدی یا خنثی بیشتر توسعه یافته و در محیط با pH بالا، تعداد دیواره عرضی کنیدی‌ها و طول آنها به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (هاردینگ، ۱۹۷۵).

عوامل محیطی دیگری همچون میزان نوردهی و حرارت نیز بر مورفولوژی کنیدی مؤثرند (نیسیکادو، ۱۹۲۳). در ایران، این بیماری برای اولین بار در سال ۱۳۳۵ توسط پتراک از مزارع برنج سواحل دریای خزر، جمع‌آوری شد. پس از آن در مناطق برنج‌کاری لنجان اصفهان و شهرکرد نیز کم و بیش، دیده شد (بهداد، ۱۳۶۲). در این زمینه مطالعاتی توسط (ترابی، ۱۳۶۳؛ ذاکری، ۱۳۵۹؛ رضوی، ۱۳۷۲؛ خسروی، ۱۳۷۸) در مورد این بیماری انجام شده است. خسروی عوامل ایجادکننده این بیماری در مازندران را *Bipolaris oryzae* معرفی می‌کند. رضوی در تحقیقات خود بر روی بیماری لکه‌قهوه‌ای برنج در استان‌های فارس و کهگیلویه و بویراحمد به این نتیجه رسید که عوامل ایجادکننده این بیماری، قارچ‌های *Bipolaris oryzae* و *Bipolaris tetramera* می‌باشند (رضوی، ۱۳۷۲). فروتن و بامدادیان، تأثیر قارچ *Drechslera oryzae* در جوانه‌زنی بذور و ریشه گیاهچه برنج را بررسی کردند (فروتن و بامدادیان، ۱۳۷۲). مطالعاتی در مورد ارتباط بیماری لکه‌قهوه‌ای برنج با عناصر موجود در گیاه و خاک در گیلان توسط پاداشت

به‌همراه میابه، نام *H. oryzae* را بکار برد (گانگوپادهیای و پادمانابهان، ۱۹۸۷). کوریبایاشی و ایتو، تلومورف قارچ را در محیط کشت یافتند و به آن نام *Ophiobolus miyabeanus* دادند (ایتو و کوریبایاشی، ۱۹۲۷). درسلا، قارچ را متعلق به جنس جدید *Cochliobolus* دانست و دستور به‌طور رسمی آن را به این جنس منتقل کرد. نیسیکادو *Helminthosporium* را به دو زیر جنس تقسیم نمود: *Cylindro-Helminthosporium(a)* و *Eu-Helminthosporium(b)* (او، ۱۹۸۵). زیرجنس *Cylindro-Helminthosporium* در نهایت بوسیله ایتو (۱۹۳۰) به‌صورت یک جنس به نام *Drechslera* و زیر جنس *Eu-Helminthosporium* بوسیله شوماکر به‌صورت یک جنس به نام *Bipolaris* ارتقا یافت (شوماکر، ۱۹۵۹). خصوصیات دیگری همچون منشأ بوجود آمدن^۱، جهت رشد از لوله‌های تندشی کنیدیومی از سلول‌های انتهایی، آنتوژنی دیواره عرضی^۲ و رنگ، جهت تشخیص بین دو جنس *Bipolaris* و *Drechslera* بکار رفتند (لوترل، ۱۹۷۷). شوماکر، پیشنهاد کرد که چگونگی هیلوم کنیدی به‌عنوان یک خصوصیت مهم دیگر، جهت تشخیص این دو جنس بکار رود (شوماکر، ۱۹۶۶). یک جنس جدید دیگر به نام *Exserohilum* برای برخی از گونه‌های قرار گرفته در جنس‌های *Bipolaris* و *Drechslera* پیشنهاد شد (لئونارد و ساجس، ۱۹۶۳). الیس، چیدامبرام و همکاران، اظهار داشتند که در جنس *Exserohilum* هیلوم کنیدیوم به‌طور مشخص، برآمده بوده است (چیدامبرام و همکاران، ۱۹۷۳).

هم‌اکنون گونه‌های مختلف سه جنس *Bipolaris*، *Drechslera* و *Exserohilum* به‌عنوان عوامل ایجادکننده بیماری لکه‌قهوه‌ای برنج، شناخته شده که هر سه از قارچ‌های ناقص می‌باشند (سیوانسان، ۱۹۸۷).

در تاکسونومی این قارچ‌ها شکل کنیدیوفر و نحوه شکل‌گیری آنها، همچنین شکل و اندازه کنیدی بسیار مهم

1- Point of origin
2- Septum

مرطوب به سختی اسپور می‌دادند، استفاده گردید. پس از استریل کردن مقداری بذر و انتقال آنها به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری، قطعاتی از کلنی قارچ بداخل ارلن و سپس به انکوباتور با دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت.

جداسازی قارچ‌ها: برای جداسازی قارچ‌ها، از چندین روش استفاده گردید که اندام‌های گیاهی بکار رفته، برگ و خوشه (بذر) بودند.

روش کشت قطعات برگ روی محیط PDA: در این روش از حد فاصل بافت آلوده و سالم در برگ آلوده برش‌هایی به اندازه ۱-۰/۵ سانتی‌متر جدا گردید. این قطعات با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۱ تا ۲ دقیقه، ضدعفونی سطحی شدند و پس از شستشو با آب مقطر سترون، روی محیط کشت PDA، در تشتک پتری سترون، قرار گرفتند. برای جلوگیری از آلوده شدن محیط کشت بوسیله باکتری، مقداری سولفات استرپتومایسین به محیط اضافه گردید (۲ میلی‌گرم در هر ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع)، از آنجایی که قارچ عامل بیماری روی محیط کشت PDA، اسپور نمی‌دهد، پس از ۳-۲ روز از رشد قارچ بر روی PDA، مقداری از میسلیم آن به محیط کشت آگار انتقال داده شد، پس از چندین هفته (۳ هفته) که قارچ اسپورزایی کرد، آن را تک‌اسپور نموده، سپس تشتک‌های پتری به انکوباتور در درجه حرارت ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی، انتقال یافتند.

روش کشت بذور آلوده روی محیط PDA: این روش مانند روش قبلی است با این تفاوت که بذور با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۵-۴ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند.

روش کاغذ صافی مرطوب و استفاده از سرمای زیر صفر درجه سانتی‌گراد: از این روش برای جدا سازی قارچ از بذور برخی ارقام برنج استفاده گردید (ترابی، ۱۳۶۳).

و همکاران و نیز خسارت روی برخی ارقام برنج و علائم آن در این استان توسط پاداشت و ایزدیار انجام شده است (پاداشت و همکاران، ۱۳۷۷). از آنجایی که این بیماری در سال‌های اخیر در استان گیلان اهمیت بیشتری یافته و خسارت زیادی به بار آورده و نیز به دلیل آنکه، یک بررسی منسجم در مورد عوامل ایجادکننده این بیماری، انجام نشده بود، به منظور مشخص نمودن این ابهامات، تحقیق حاضر انجام گرفت که هدف آن شناسایی عوامل اصلی قارچی ایجادکننده بیماری مذکور در استان گیلان بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: جمع‌آوری نمونه‌های آلوده از مزرعه برای بدست آوردن جدایه‌های مورد نظر در دو مرحله برگ و خوشه انجام گرفت. در هر شهرستان از چندین مزرعه برای جمع‌آوری نمونه استفاده شد که در مجموع ۱۲۰ جدایه از ارقام مختلف برنج مثل حسن سرایی، هاشمی، علی کاظمی، خزر، سپیدرود و بچار بدست آمد.

محیط‌های کشت مورد استفاده: برای جداسازی و شناسایی قارچ‌های عامل لکه قهوه‌ای برنج، از محیط‌های کشت مختلفی مثل محیط کشت سیب‌زمینی، دکستروز آگار (PDA) به عنوان محیط کشت عمومی قارچ‌ها و بررسی کلنی‌های جدایه‌های مختلف، از محیط آب - آگار برای خالص سازی قارچ‌ها (تهیه تک‌اسپور و نوک ریشه) و از محیط آب شیر - آگار و ساقه گندم^۱ برای اسپورزایی و تشخیص جنس و گونه‌های قارچ عامل بیماری و همچنین بررسی جوانه‌زدن اسپور آنها استفاده گردید. (سیوانسان، ۱۹۸۷؛ دینگرا و سینکلیر، ۱۹۹۴). از محیط کشت مایع متحرک (شامل ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۵۰ گرم سیب‌زمینی و ۵ گرم سوکروز) برای تهیه اسپور فراوان جهت اثبات بیماری‌زایی، استفاده گردید. همچنین از بذور استریل شده برنج، برای تهیه اسپور فراوان جهت اسپورزایی در برخی جدایه‌هایی که در محیط کاغذ صافی

1- (Tap Water Agar) TWA+wheat straw

داده شد آنگاه مقداری بذر رقم خزر به مدت ۱۰ دقیقه در آب گرم ۵۷-۵۲ درجه سانتی گراد در بن ماری ضد عفونی شده (پاداشت و همکاران، ۱۳۷۹) و تعداد ۱۰ عدد بذر در داخل هر تشتک پتری در میان ماسه سترون قرار گرفتند. این عمل در دو دسیکاتور، یکی به عنوان آلوده و دیگری به عنوان شاهد انجام گرفت. به هر تشتک پتری، مقداری آب مقطر سترون اضافه شد، به طوری که در تمام مدت آزمایش آبدار بودند. پس از ۱۷-۱۶ روز که نشاهای داخل تشتک پتری به مرحله ۲ برگی رسیدند، عمل اسپورپاشی روی آنها انجام گرفت. لازم به ذکر است که در تمام آزمایش‌های مذکور، دسیکاتورها در انکوباتور با درجه حرارت ۲۶ درجه سانتی گراد، رطوبت بیش از ۹۰ درصد و تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی، قرار داده شدند. روش مایه زنی بدین ترتیب بود که بر روی همه نشاها در دو دسیکاتور شاهد و آلوده، ابتدا بوسیله افشانه‌های کوچک دستی، آب مقطر پاشیده شد (در زیر هود سترون) سپس سوسپانسیون لازم برای مایه زنی فراهم گردید. لازم به ذکر است با توجه به اینکه در این بیماری میسلیم نیز به عنوان مایه تلقیح عمل می‌کند (شرف و همکاران، ۱۹۴۷). برای تهیه سوسپانسیون، از مجموع اسپور و میسلیم به عنوان مایه تلقیح استفاده گردید. در تمامی آزمایش‌ها از سوسپانسیونی شامل $10^4 \times 1$ (اسپور+ میسلیم) در میلی لیتر آب مقطر سترون استفاده گردید که برای شمارش آنها از لام گلبول شمار^۱ استفاده شد. همچنین برای افزایش جذب سطحی توئین-۲۰^۲ به نسبت ۱ درصد، بکار رفت.

نتایج و بحث

صفات مورفولوژیکی و وضعیت تاکسونومیکی جدایه‌های *Bipolaris* از نظر شکل ظاهری کلنی، مورفولوژی کلیدی و کنیدیوفر، فرآیند تشکیل کلیدی، نحوه جوانه زدن، کلیدی‌ها در ۳ گروه مختلف قرار گرفتند

نگهداری قارچ جدا شده: به منظور نگهداری جدایه‌های قارچی، پس از خالص سازی، به لوله‌های آزمایش حاوی PDA مورب انتقال یافته و سپس در انکوباتور در درجه حرارت ۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴-۳ روز نگهداری شدند و آنگاه به یخچال با درجه حرارت ۵-۴ درجه سانتی گراد انتقال یافتند که بعد از ۶-۵ ماه تجدید کشت انجام گرفت.

بررسی و شناسایی قارچ‌ها: پس از جداسازی و خالص سازی قارچ‌ها، خصوصیات ماکروسکوپی آنها همچون شکل، رنگ کلنی، سرعت رشد و ... روی محیط PDA و RPA مورد مطالعه قرار گرفت. پس از آن خصوصیات میکروسکوپی قارچ‌ها با تهیه اسلاید میکروسکوپی روی بسترهای آب مقطر و اسیدلاکتیک، بررسی گردید. برای بررسی نمونه‌های میکروسکوپی و اندازه گیری کنیدیوفر و کنیدی و ... از میکروسکوپ دوچشمی Olympus CH-2 استفاده شد. برای رشد اولیه تمام کشت‌ها به مدت یک هفته در حرارت ۲۶ درجه سانتی گراد در محیط PDA قرار گرفتند. ولی برای اسپورزایی از محیط کشت آب شیر- آگار به همراه ساقه گندم استفاده گردید که برای این منظور بعد از انتقال قارچ به محیط، تشتک‌های پتری به مدت ۳ هفته در حرارت ۲۶ درجه سانتی گراد (اپتیمم ۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد) در انکوباتور با تناوب نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند.

برای بررسی صفات مورفولوژیکی و مشخصات ظاهری از صفات ذیل استفاده شد :

کلنی: شکل کلنی، نحوه رشد میسلیم‌ها و رنگ آن

کنیدیوفر: منفرد یا گروهی بودن، ابعاد، رنگ

کنیدی: طول، عرض و تعداد دیواره عرضی کنیدی‌ها

جوانه زدن کنیدی: محل خروج لوله تندشی

آزمایش بیماری زایی: اثبات بیماری زایی در محیط دسیکاتور انجام گرفت که برای این منظور ابتدا مقداری ماسه در داخل شیشه‌های ارلن‌مایر ۳ بار اتوکلاو گردید و سپس مقداری از آن به یک تشتک پتری سترون انتقال

1- Hemacytometer
2- Tween-20

منشعب، زرد کم‌رنگ تا قهوه‌ای خیلی روشن، کنیدیوفر: منفرد یا در گروه‌های کوچک، راست تا مارپیچی، گاهی در بالا زانودار قهوه‌ای روشن روشن تا تیره، صاف، دیواره‌دار، به ابعاد ۹-۳۴×۵-۵۰ میکرومتر، کنیدیوم: کنیدیوم‌ها به‌طور جزئی خمیده، به‌طور وسیع دوکی یا دوکی گریزی وارونه، قهوه‌ای روشن تا تیره، صاف، دارای ۱۳-۴ (اغلب ۱۰-۸) دیواره عرضی، به ابعاد ۲۴-۱۴۳×۹-۳۲ میکرومتر، هیلوم کوچک بوده ولی دارای برآمدگی یا پاییل نمی‌باشند (شکل شماره ۳). گروه دوم جدایه‌ها از نظر فرآیند تشکیل کنیدی مشابه با گروه اول می‌باشند. صفات کلی در گروه دوم مشابه گروه اول می‌باشد و با مشخصات (*Bipolaris* (Shomeaker) مطابقت می‌کند ولی خصوصیات اختصاصی تر آن از جمله ابعاد کنیدی، کنیدیوفر و ویژگی‌های هیلوم، تعلق آن را به گونه *Bipolaris victoriae* نزدیکتر می‌سازد (نلسون، ۱۹۶۱؛ او، ۱۹۸۵؛ سیوانسان، ۱۹۸۷). لازم به ذکر است که گروه دوم جدایه‌ها، حدود ۷۵ درصد از کل جدایه‌ها را دربرمی‌گیرد. گروه سوم جدایه‌ها دارای مشخصات زیر بودند، کلنی: پخش یکنواخت، خاکستری تا خاکستری تیره متوسط، با رشد کندتر نسبت به گونه‌های قبلی است، ریشه‌ها: منشعب، زرد کم‌رنگ تا قهوه‌ای روشن، کنیدیوفر: منفرد یا گروهی، راست تا مارپیچی، در بالا زانودار، قهوه‌ای روشن تا تیره، صاف، دیواره‌دار، به ابعاد ۶/۵-۱۶۵×۵-۴۵۳ میکرومتر، کنیدی‌ها به‌طور جزئی خمیده، دوکی. گریزی تا سیلندری، قهوه‌ای روشن، صاف، با ۱۰-۱ دیواره عرضی، به ابعاد ۲۰-۸/۵×۹۵-۳۲ میکرومتر، کوچک، تیره، برآمده یا پاییل‌دار نمی‌باشد. گروه سوم جدایه‌ها نیز از نظر فرآیند تشکیل کنیدی و جوانه‌زدن کنیدی مشابه با گروه اول می‌باشند (شکل ۴). صفات کلی در گروه سوم مشابه گروه اول می‌باشد و با مشخصات *Bipolaris* Shoemaker مطابقت می‌کند ولی خصوصیات اختصاصی تر آن از جمله ابعاد کنیدی، کنیدیوفر و دیگر مشخصات آن در گونه‌های موجود و گزارش شده یافت نشد، لذا به‌عنوان *Bipolaris* sp. نامشخص گردید. این گروه حدود ۱۰ درصد از کل جدایه‌ها را شامل می‌شود.

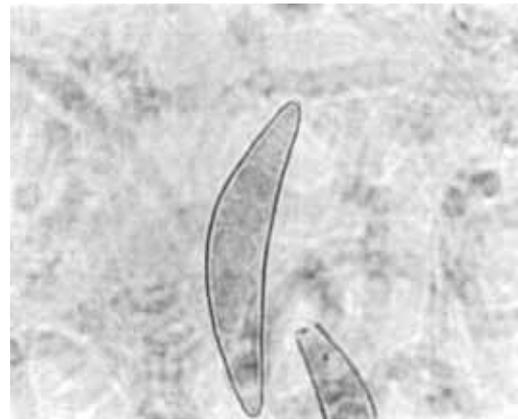
که صفات هر گروه بر اساس مشخصات ظاهری و مورفولوژی به‌طور جداگانه مطالعه شد. گروه اول دارای مشخصات زیر بودند: کلنی: پخش یکنواخت، ریشه‌ها با رشد هوایی زیاد و رشد سریع، خاکستری رنگ تا خاکستری تیره، ریشه‌ها: منشعب، پنبه‌ای، قهوه‌ای روشن تا کم‌رنگ، کنیدیوفر: منفرد یا در گروه‌های کوچک، راست تا مارپیچی، گاهی زانودار^۱، قهوه‌ای تیره که به طرف نوک کم‌رنگ‌تر می‌شود، با دیواره عرضی^۲ به ابعاد ۷-۴×۵۸۰-۴۳۰ میکرومتر (متوسط ۵×۵۰۰ میکرومتر)، کنیدی: کنیدی‌ها معمولاً خمیده، قایقی شکل، دوکی تا گریزی وارونه، گاهی اوقات سیلندری، زرد کم‌رنگ تا قهوه‌ای تیره، صاف و دارای ۱۲-۵ دیواره عرضی به ابعاد ۲۶-۱۰×۱۲۵-۶۷/۵ میکرومتر (متوسط ۱۶/۵×۹۴)، هیلوم کوچک و تیره یا روشن، اغلب برآمده و به‌طور جزئی پاییل‌دار می‌باشند (شکل‌های شماره ۱ و ۲)، از نظر فرآیند تشکیل کنیدی: اولین دیواره عرضی کمی پائین‌تر از وسط تشکیل شده و دومین دیواره در قسمت سلول قاعده و سومین در قسمت سلول نوک بوجود می‌آید، از نظر جوانه‌زدن کنیدی: در هنگام جوانه‌زدن کنیدی، لوله تندشی از دو سلول انتهایی به‌طور قطبی تندشی خارج شده، شفاف و بی‌رنگ بوده و در جهت امتداد محور طولی کنیدی رشد می‌کند و انشعاب در آنها به فاصله کمی دورتر از محل خروج انجام می‌شود. صفات کلی در این گروه با جنس *Bipolaris* Shoemaker مطابقت دارد (آلکورن، ۱۹۸۸؛ شوماکر، ۱۹۵۹).

صفات اختصاصی تری همچون رنگ، شکل کلنی، شکل، ابعاد و رنگ کنیدی و کنیدیوفر به مشخصات گونه *B. oryzae* نزدیکتر می‌باشد (الیس، ۱۹۷۱؛ او، ۱۹۸۵؛ سیوانسان، ۱۹۸۷). لازم به ذکر است که گونه فوق‌الذکر (*B. oryzae*)، ۱۵ درصد از جدایه‌های موجود را تشکیل می‌دهد. مشخصات گروه دوم جدایه‌ها، کلنی: پخش یکنواخت، خاکستری تا خاکستری تیره، ریشه‌ها:

- 1- Geniculate
- 2- Septate



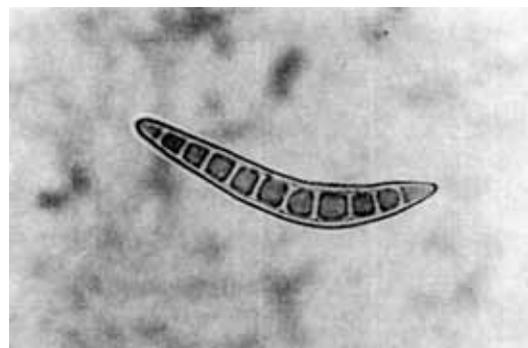
شکل ۲- هیلوم کنیدی قارچ *B. oryzae* با بزرگنمایی تقریبی ۱۲۰۰ برابر



شکل ۱- کنیدی قارچ *B. oryzae* با بزرگنمایی تقریبی ۴۶۰ برابر



شکل ۴- کنیدی قارچ *Bipolaris* sp. در حال جوانه زدن از دو قطب با بزرگنمایی تقریبی ۲۳۰ برابر



شکل ۳- کنیدی قارچ *Bipolaris victoriana* با بزرگنمایی تقریبی ۴۶۰ برابر

در مراحل بعدی، *Bipolaris* sp. و سپس *Bipolaris victoriana* قرار می‌گیرد. با این حال به نظر می‌رسد که تفاوت‌های اساسی از نظر شدت بیماری‌زایی بین این سه گونه، وجود ندارد. گونه‌های گرامینه‌ای *Drechslera*، *Curvularia*، *Exserohilum* و *Bipolaris* جنسی آنها مورد بررسی قرار گرفته‌اند (سیوانسان، ۱۹۸۷). بزرگترین جنس در این گروه *Bipolaris* است که ۵۲ گونه دارد، در حالی که *Drechslera* و *Exserohilum* به ترتیب ۲۳ و ۲۰ گونه دارند.

مطالعات بیماری‌زایی: در تمامی مطالعات بیماری‌زایی، از یک رقم برنج، یعنی رقم خزر، استفاده شد و مایه‌زنی روی آن انجام گرفت. علائم ایجاد شده روی رقم مذکور در گونه‌های مختلف تا حدی متفاوت بوده، در حالی که علائم یک گونه متشابه بودند (ایری، ۱۹۹۶). در تمامی آزمایش‌های فوق، در راستای انجام اصول کخ، قارچ تلقیح شده، مجدداً از نشاهای بیمار، جدا گردید و مورد شناسایی قرار گرفت و نتیجه اولیه تأیید شد. همانگونه که ملاحظه می‌شود، شدت (درجه) بیماری ایجاد شده توسط *B. oryzae* تا حدی از دو گونه بعدی بیشتر می‌باشد و

جدول ۱- مقایسه تعداد برگ‌های آلوده و سالم پس از مایه‌زنی با سه گونه از قارچ *Bipolaris*.

	گونه‌های قارچ			شاهد
	<i>B. oryzae</i>	<i>B. victoriana</i>	<i>Bipolaris</i> sp.	
تعداد کل	۱۹	۱۴	۲۰	۱۰
بیمار	۱۴	۱۱	۱۶	۰
مرده	۲	۱	۱	۰
سالم	۳	۲	۳	۱۰

داد که شدت رنگدانه‌دار شدن هیلوم‌ها، همانند ابعادشان می‌تواند تاکسونومی استرین‌های وابسته را تحت تأثیر قرار دهد. تفاوت در مورفولوژی هیلوم‌های کنیدیومی، بین استرین‌های ژاپنی و آمریکایی، موجب تردید برای نیسیکادو شد که آنها با وجود اینکه، بیماری‌زایی مشابهی دارند به گونه‌های مختلف تعلق دارند (چولیل و هوگ، ۱۹۸۲). علاوه بر آن، کلیدهایی مانند سیوانسان، اساس تمایز به ویژه در سطح گونه‌ها را بر ابعاد کنیدی و کنیدیوفور و رنگ آنها قرار می‌دهند، و این در حالی است که دامنه تنوع طول و عرض کنیدیوم و کنیدیوفور و تعداد دیواره عرضی کنیدیوم‌ها، حتی در داخل یک گونه بسیار وسیع بوده و این امر، کار محقق را در تمایز و تفکیک دقیق جدایه‌های قارچ به‌ویژه در سطح گونه‌ها دشوار می‌سازد. از این رو انجام تحقیقات مولکولی با تکیه بر روش‌های تفکیکی دقیق مبتنی بر DNA قارچ، ضروری به نظر می‌رسد. اکفمیا در ۱۹۲۴، اولین علائم قابل رؤیت را در حدود ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی با قارچ *B. oryzae* مشاهده نمود (او، ۱۹۸۵). همچنین مشاهده شد که رنگ سلول‌های آلوده در ۱۷ تا ۲۰ ساعت پس از مایه‌زنی تغییر پیدا می‌کند (ساتو، ۶۵-۱۹۶۴). مطالعات انجام شده نشان داد که تغییرپذیری پاتوژنیک به تنوع استرین و مورفولوژی کنیدیوم، همبستگی ندارد (گانگوپادهای و پادمانابهان، ۱۹۸۷) و این درحالی است که در مطالعات انجام شده توسط رضوی درجه بیماری‌زایی گونه *B. oryzae* از دو گونه دیگر یعنی *B. tetramera* و *E. rostratum* بیشتر بوده است (رضوی، ۱۳۷۲). بر این اساس مشاهده می‌شود که در زمینه مقایسه شدت بیماری‌زایی گونه‌های مختلف بین محققین اختلاف نظر وجود داشته است. اما این گونه به نظر می‌رسد که گرچه تفاوت‌هایی بین شدت علائم ایجاد شده توسط گونه‌های مختلف قارچ *Bipolaris* مشاهده می‌گردد، اما آنها، تفاوت‌های اساسی و معنی‌داری نیستند که بر اساس آنها بتوان مستقیماً میزان شدت بیماری‌زایی را با نوع گونه، ارتباط داد.

بدین ترتیب مشاهده می‌شود که در نتیجه تحول در مفهوم تاکسونومیکی به‌کار رفته، پیچیدگی‌های زیادی در گونه‌های گرامینه‌ای *Helminthosporium* حاصل شده است. این تکرر، دقت و اعتبار اطلاعات ذخیره شده را کاهش می‌دهد. به طوری که در بسیاری از موارد تردیدهایی برای بیولوژیست‌ها در مورد چگونگی ایجاد یک طبقه‌بندی در جهت همبستگی‌های طبیعی و معیار معتبر برای تمایز گونه‌های *Helminthosporium* بوجود آمده است (آلکورن، ۱۹۸۸). از آنجایی که شکل و اندازه کنیدیوم‌ها در تفکیک گونه‌های گرامینه‌ای این قارچ به‌ویژه در سطح گونه‌ها حائز اهمیت فراوان است، توجه به جزئیات اسپوره‌های جدایه‌های مختلف دقت فراوانی را می‌طلبد. خصوصاً با توجه به این نکته که مورفولوژی کنیدیوم‌های این قارچ بسیار تحت تأثیر عوامل محیطی همچون رطوبت و حرارت و pH محیط کشت قرار گرفته، به طوری که طول کنیدی و تعداد دیواره عرضی آنها تغییر می‌یابد (ترینر و مارتینسون، ۱۹۷۸). همچنان که گفته شد شکل و اندازه کنیدیوم در این قارچ، با نوع ماده‌غذایی و شرایط محیطی در ارتباط می‌باشد، برخی از موادغذایی روی اندازه و شکل اسپور اثر دارند، به طوری که با افزایش میزان قند بیشتر از ۴ درصد و غلظت بالای ازت (بیشتر از ۰/۲ درصد)، طول، عرض و تعداد دیواره عرضی کنیدی اغلب آنها، کاهش می‌یابد (الیوت، ۱۹۴۹). بدین ترتیب اهمیت توجه و دقت در استاندارد بودن محیط‌های کشت و مطابقت آن با آنچه که در کلیدهای تشخیص عامل بیماری ذکر شده است، مشخص می‌گردد، زیرا که با کوچک‌ترین تغییر در اجزای سازنده محیط‌های کشت، تغییراتی در شکل و اندازه کنیدی‌ها بوجود آمده و میزان تنوع را به‌نحو چشم‌گیری افزایش می‌دهد. همچنین درجه رنگین شدن هیلوم‌های کنیدیومی در این قارچ و جنس‌های وابسته، متنوع است. طبق نظر لوترل (۱۹۷۷) تفاوت‌های بین چنین هیلوم‌هایی اهمیت تاکسونومیکی کمتری دارند. اما مطالعات انجام گرفته توسط چولیل و هوگ (۱۹۸۲) نشان

سپاسگزاری

محمد جوان نیکخواه استادیار محترم دانشکده کشاورزی
دانشگاه تهران، تشکر و قدردانی می‌گردد.

بدین وسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی
دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت و جناب آقای دکتر

منابع

۱. بهداد، الف. ۱۳۶۲. بیماری‌های گیاهان زراعی ایران. چاپخانه نشاط اصفهان. ۴۴۲ صفحه.
۲. پاداشت، ف.، روحانی، ح. و منصور، ش. ۱۳۷۹. ضد عفونی بذور برنج بوسیله چند میکروارگانیسم آنتاگونیست علیه بیماری بوسیدگی طوقه. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. صفحه ۲۴۹.
۳. پاداشت، ف. و ایزدیار، م. ۱۳۷۷. بررسی بیماری لکه قهوه‌ای برنج در گیلان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. خلاصه مقاله، صفحه ۸۳.
۴. پاداشت، ف.، فردوس، ب. و دریغ گفتار، ف. ۱۳۷۷. بررسی رابطه بیماری لکه قهوه‌ای برنج با عناصر موجود در گیاه و خاک. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. خلاصه مقاله، صفحه ۸۴.
۵. ترابی، م. ۱۳۶۳. مقایسه چند روش آزمایشگاهی به منظور جداسازی قارچ *Drechslera oryzae* از بذور آلوده برنج. مجله بیماری‌های گیاهی. جلد ۲۰، شماره (۴-۱): ۷-۱.
۶. خسروی، و. ۱۳۷۸. بررسی مهمترین بیماری‌های قارچی بذرزاد برنج در ارقام غالب منطقه مازندران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. ۱۰۲ صفحه.
۷. ذاکری، ز. ۱۳۵۹. بررسی میکوفلور سه رقم بذر برنج در ایران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته بیماری‌های گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. ۱۲۸ صفحه.
۸. رضوی، س. ا. ۱۳۷۲. مطالعه پراکندگی، خواص فنوتیپی، تاکسونومی و بیماری‌زایی جدا شده‌های مختلف شبه‌جنس *Helminthosporium* و شبه جنس‌های وابسته به آن از گیاه برنج در استان‌های فارس، کهگیلویه و بویراحمد. پایان‌نامه فوق‌لیسانس در رشته بیماری‌های گیاهی، دانشگاه شیراز. ۱۳۰ صفحه.
۹. فروتن، ع. و بامدادیان، ط. ۱۳۷۲. خلاصه مقالات اولین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی. ۲۳۶ صفحه.
10. Alcorn, J. 1988. Taxonomy of *Helminthosporium* species. Ann. Rev. Phytopathol. 26:37-56.
11. Bedi, K.S., and Gill, H.S. 1960. Losses caused by the brown leaf spot disease in the Punjab. Indian Phytopathology. 13:161-164.
12. Bhattachary, D., and Mukhopudhyay, N.K. 1986. Surface adherence and penetrability of mycobacillin as affected by adjuvants. Indian Phytopathology. 39(3): 390-394.
13. Chidambaram, P., Mathur, S.B., and Neergard, P. 1973. Identification of seed-borne *Drechslera* species. Fiersia. 10: 165-207.
14. Dhingra, O.D., and Sinclair, J.B. 1994. Basic plant pathology methods. CRC press, 434 p.
15. Cholil, A., and Hoog, G.S. 1982. Variability in *Drechslera oryzae*. Trans. Br. Mycol. Soc. 79(3): 491-496.
16. Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew. England. 608 p.
17. Gangopadhyay, S., and Padmanabhan, S.Y. 1987. Breeding for disease resistance in rice. Oxford and IBH Publishing Co. Calcutta. 340pp.
18. Elliot, E.S. 1949. The effect of the sugar concentration on conidial size of some species of *Helminthosporium*. Phytopathology. 39: 935-958.
19. Harding, H. 1975. Effect of pH and sucrose concentration on conidium size and septation in four *Bipolaris* species. Can. J. Bot. 53:1457-64.
20. IRRI, 1996. Standard Evaluation System for Rice. The Philippines. 52pp.
21. Ito, S. 1930. Study on some of new ascigerous stages of the *Helminthosporium* parasitic on cereal. Proc. Imp. Acad. (Tokyo). 6: 359-365.

22. Ito, S., and Kuribayashi, K. 1927. Production of the ascigerous stage in culture of *Helminthosporium oryzae*. Annual of the Phytopathological Society of Japan. 2:1-8.
23. Leonard, K.J., and Suggs, E.G. 1963. Taxonomic Criteria in *Helminthosporium*. Mycologia. 55: 643-674.
24. Luttrell, E.S. 1977. Correlations between conidial and ascigerous stage characters in *Pyrenophora*, *Cochliobolus* and *Setosphaeria*. Rev. Mycol. 41:271-79.
25. Nelson, R.R., and Kline, D.M. 1961. The pathogenicity of certain species of *Helminthosporium* to species of the gramineae. Plant Disease Reporter. 45: 644-648.
26. Nisikado, Y. 1923. Effect of temperature on the growth of *Helminthosporium-oryzae* Breda de Haan. Annuals of the Phytopathological Society of Japan. 1:20-30.
27. Ou, S.H. 1985. Rice diseases. Commonwealth Mycological Institute. 2nd ed. 380 p.
28. Sherf, A.F., Page, R.M., Tullis, E.C., and Morgan, T.L. 1947. Studies on factors affecting the infection of *Helminthosporium oryzae*. Phytopathology. 37: 281-290.
29. Shoemaker, R.A. 1959. Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from *Helminthosporium*. Can. J. Bot. 37: 879-887.
30. Shoemaker, R.A. 1966. A pleomorphic parasite of cereal seed, *Pyrenophora-semeniperda*. Can. J. Bot. 44: 1451-56.
31. Sivanesan, A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their telemorphs. CAB. International Mycological Institute. 261 p.
32. Trainor, M.J., and Marthinson, C.A. 1978. Nutrition during spore production and the inoculum potential of *Helminthosporium maydis* race T. Phytopathology. 68: 1049-1053.

Indentification of the causal agent fungi of rice Brown Spot disease in Guilan Province

M.R. Safari Motlagh¹, H.R. Zamanizadeh², GH. A. Hedjaraude³ and M. Okhovvat³

¹Faculty member of Agricultural College of Islamic Azad University, ²Associate Prof., Dept., of Plant protection of Azad Univ., Science and Research Campus, Tehran, ³Prof., Dept., of Plant protection of Agricultural College, Tehran Univ., Karaj

Abstract

The brown spot disease is one of the seed-borne diseases of rice, which is found in all stages of its growth from nursery to farm. It causes qualitative and quantitative damage on rice. Although the disease can be found in all parts of the country where rice is cultivated, there is no precise information about its dispersal, species and the rate of damage. Therefore, this study carried out in order to identify the genus and species of the rice brown spot agent in Guilan. To do so, at first some samples were collected from 91 paddy fields in Guilan. In order to isolate the fungus from disease tissues the gathered samples were cultured on PDA and filter paper, and by this, 120 isolates were isolated. Isolates were cultured for sporulation on culture medium of TWA+wheat straw. In order to identify the taxonomy, conidium and conidiophore morphology and the process of conidium formation and pattern of its germination were studied. According to the results, the present isolates were belonged *Bipolaris*, which was divided into 3 species: *Bipolaris oryzae*, *Bipolaris victoriae* Nelson and *Bipolaris* sp. The total isolates were consisted of 15% *Bipolaris oryzae*, 75% *Bipolaris victoriae* and 10% *Bipolaris* sp. Pathogenicity test of isolates in these three species was applied on cultivar Khazar seedlings in desicator, which revealed the pathogenicity of the species and their ability to cause brown spot on rice.

Keywords: Rice; Brown Spot; *Bipolaris*; Guilan