Archive of SID

اختصاصیت میزبانی و وضعیت سازگاری جنسی جدایه‌های قارچ *Pyricularia oryzae* بدست آمده از میزبان‌های مختلف در ایران*

عادل پردل[۱]، محمد جوان نیکخواه[۱]**، دیدیه ترائو[۲]، امیر میرزدای گوهری[۱] و علی مومنی[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۲۶)

چکیده

قارچ *Pyricularia oryzae* عامل بیماری بلاست برنج و گندم و لکه برگی روی تعدادی از گیاهان گرامینه‌ای است. بیماری بلاست یکی از مهمترین بیماری‌های برنج در اکثر مناطق برنج‌خیز ایران به شمار می‌رود که معمولا سالانه خسارت اقتصادی قابل توجهی روی برنج ایجاد می‌کند. در تابستان سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۵ از مزارع برنج، ذرت، وعلف‌های هرز باغات مرکبات و جنگل‌های نواحی جنوبی دریای خزر و مزارع برنج استان خراسان رضوی نمونه‌برداری به عمل آمد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی جدایه‌ها، با استفاده از داده‌های به دست آمده از نواحی ژنومی اکتین (*ACT*)، کالمودلین (*CAL*) و زیرواحد بزرگ RNA پلیمراز II (*Rpb1*) انجام شد، نتایج فیلوژنی جدایه‌های حاصل از میزبان‌های مختلف را به عنوان *P. oryzae* تایید کرد. آزمون بیماریزایی روی میزبان‌هایی از قبیل برنج، ارزن دم‌روباهی، ذرت، سوروف و چسبک صورت پذیرفت. نتایج بیماریزایی نشان داد هر جدایه روی میزبان جدا شده بیماریزایی شدیدی را نشان داد اما شدت علائم در میزبان‌های دیگر نسبت به میزبان جدا شده کمتر بود. به منظور شناسایی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی از تکنیک Multiplex PCR و آغازگرهای L1 و L2 جهت تکثیر ایدیومورف *Mat1-1* و آغازگرهای T1 و T2 جهت تکثیر ایدیومورف *Mat 1-2* جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. وضعیت باروری جنسی جدایه‌ها با تیپ آمیزشی جدایه آزمایشگر تحت شرایط آزمایشگاه و روی محیط کشت آرد برنج-آگار نیز انجام گرفت. با توجه به نتایج ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی و تولید مثل جنسی، *Mat 1-1* بیشترین فراوانی را در جدایه‌های برنج و ارزن‌دم‌روباهی داشت و *Mat 1-2* بیشترین فراوانی را در بین علف‌های هرز و گیاه زارعی ذرت دارا می‌باشد.

کلیدواژه: دامنه میزبانی، برنج، بیماری بلاست، Multiplex PCR، *Pyricularia oryzae*.

---

* بخشی از پایان‌نامه دکتری نگارنده اول می‌باشد.

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

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

۲. دانشیار، موسسه تحقیقات و توسعه کشاورزی، CIRAD، مونتپلیه، فرانسه.

۳. دانشیار، موسسه تحقیقات برنج کشور- معاونت مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، آمل، ایران.

www.SID.ir

Archive of SID

Host-specificity and sexual compatibility of *Pyricularia oryzae* isolated from different hosts in Iran*

A. Pordel[1], M. Javan-Nikkhah[1], D. Tharreau[2], A. Mirzadi Gohari[1], and A. Moumeni[3]**

(Received: 11.4.2018; Accepted: 17.7.2018)

Abstract

Pyricularia oryzae is rice and wheat blast causal agent and can occurs leaf spot on some grass species. Blast disease is one of the most important diseases in rice areas cultivated in Iran, annually it cause economic damage to rice. Sampling was conducted from rice, maize, foxtail millet, and weeds of wheat and rice cultivation regions, citrus orchards, and jungles in southern of Caspian Sea and from rice fields in Khorasan-razavi province during summers of 2013 and 2015. Phylogenetic analysis with partial regions of Actin (*ACT*), Calmodulin (*CAL*), and RNA polymerase II largest subunit genes (*Rpb1*) allowed to assign the strains from different hosts to *Pyricularia oryzae*. Pathogenicity test of *P. oryzae* species was applied on rice, foxtail millet, maize, barnyard grass, and wild foxtail millet in control condition. Based on pathogenicity, each isolate were highly pathogenic toward its host but not to the other hosts tested. In order to a determination of mating type, Multiplex PCR technique using primers L1 and L2 (for *Mat1-1)*, T1, and T2 (for *Mat1-2*) was done. Under lab conditions, the sexual stage was conducted with isolates from different hosts on rice flour-agar medium. The mating type and sexual reproduction show that *Mat1-1* is frequent in rice population and foxtail millet population and *Mat1-2* is frequent in weeds populations and maize population.

Keywords: Host range, Rice, Blast Disease, Multiplex PCR, *Pyricularia oryzae*

---

* A Part of Ph.D Thesis of the First Author.

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

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences & Engineering, University of Tehran, Karaj 31587-77871, Iran.
2. BGPI, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier, SupAgro, Montpellier, France.
3. Rice Research Institute of Iran, Mazandaran Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Postal-Code46191-91951, Km8 Babol Rd., Amol, Mazandaran, Iran.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گونه *Pyricularia oryzae* دارای تبارهای ژنتیکی اختصاصی میزبان است که روی علف‌های هرز و محصولات زراعی بیمارگر می‌باشد. بررسی‌ها نشان داده اند، شجره فیلوژنتیکی امروزی این گونه ناشی از دور شدن تبارهای *P. oryzae* سازگار با میزبان‌های مختلف در اثر جریان ژنی است. اگرچه جدایه‌های برنج در مقیاس بومی در اغلب مناطق به صورت کلونال می باشند، اثرهایی از نوترکیبی رخ داده در گذشته و همچنین شواهدی مبنی بر تولیدمثل جنسی در عصر حاضر در برخی مناطق آسیای جنوب شرقی، نزدیک خاستگاه بیماری، وجود دارد (Chiapello *et al.* 2015).

پراکنش وسیع و متمرکز محصولات زراعی و گیاهان هرز اصلی‌ترین علت تغییر میزبان بیمارگر است. که منجر به تغییر موفقیت‌آمیز، اختصاصیت و انشقاق ژنتیکی روی میزبان جدید می‌گردد. اگر برای اولین بار بیمارگر از سد گونه‌ای میزبانی عبور کند، بیماری‌زایی محدود به میزبان انشقاق یافته خواهد شد. مخصوصاً میزبانی که فراوان است و ازلحاظ ژنتیکی به‌صورت یکسان می‌باشد، انتشار کلون‌های پاندمیک (pandemic) بیمارگر صورت خواهد گرفت. پاتوسیستم عامل بلاست نه‌تنها یک مدل برای تقابل میزبان و بیمارگر است، برای تغییر میزبان روی گونه‌های گیاهی جدید در مدت‌زمان کوتاه نیز مدل مناسبی محسوب می‌شود (Couch *et al.* 2005).

تولیدمثل جنسی این گونه در طبیعت بسیار نادر است، ولی احتمالاً یکی از عوامل بروز تغییرات ژنتیکی در این قارچ می‌باشد. باروری در جدایه‌های مزرعه‌ای *Magnaporthe oryzae* دامنه‌ای از عقیمی کامل (male and female sterility) نر باروری (male fertility) تا باروری کامل (male and female fertility) دارد (Valent & Chumely1991). اکثر گونه‌های جنس *Magnaporthe* هتروتال می‌باشند. به عنوان مثال قارچ عامل بلاست برنج یک آسکومیست هتروتال است. تیپ آمیزشی و سازگاری جنسی در این قارچ با ژن‌های موجود در یک جایگاه ژنی منفرد کنترل می‌شود. این جایگاه ژنی دارای دو ایدیومورف متناظر به نام‌های *Mat1-1* و *Mat1-2* است (Kang*et al.* 1994).

موسی نژاد و همکاران (Mousanejad *et al.* 2004) برای اولین بار، وضعیت باروری و پراکندگی آلل‌های تیپ آمیزشی قارچ عامل بیماری را مطالعه نمودند. این محققین ۱۵۸ جدایه بیمارگر برنج را که شامل ۹۴ جدایه از مناطق مختلف استان گیلان و ۶۴ جدایه از مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور در رشت بودند، با جدایه‌های استاندارد هرمافرودیت و بارور به نام‌های KA3 و TH12 (نماینده‌های تیپ آمیزشی *Mat1-1*) و KA9 و TH16 (نماینده‌های تیپ آمیزشی *Mat1-2*) تلاقی دادند. نتایج حاصل از این تلاقی‌ها نشان داد که ۶۲/۷۶ درصد از جدایه‌های نمونه‌های نقاط مختلف استان گیلان و ۳۲/۸۱ درصد از جدایه‌های مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج، بارور بوده و بقیه جدایه‌ها در هر دو مورد نابارورند. تمامی جدایه‌های بارور، نر بارور و از تیپ آمیزشی *Mat1-1* بودند. فرم جنسی قارچ در ایران در طبیعت یافت نشده است.

با توجه به موارد ذکر شده، مطالعه متمرکزی به منظور تعیین دامنه میزبانی و بررسی توانایی تولید مثل جنسی بین جدایه‌های حاصل از میزبان‌های مختلف گونه *P. oryzae* مورد نیاز است. این مطالعه جدایه‌های حاصل از

www.SID.ir

Archive of SID

میزبان‌های مختلف را به لحاظ مرفولوژی، فیلوژنی، دامنه میزبانی و توانایی تولید مثل جنسی مورد بررسی قرار می‌دهد.

روش بررسی

جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی جدایه‌های قارچی

در تابستان سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۵ از مزارع برنج، ذرت، وعلف‌های هرزباغات مرکبات و جنگل‌های نواحی جنوبی دریای خزر و مزارع برنج استان خراسان رضوی نمونه‌برداری به عمل آمد. نمونه‌برداری از بافت‌های دارای علایم بلاست و لکه‌برگی مزارع و باغات به صورت تصادفی انجام پذیرفت. اندام‌های گیاهی مشکوک به آلودگی درون پاکت‌های کاغذی جداگانه با ثبت مشخصات (مکان جمع‌آوری و تاریخ جمع‌آوری) به آزمایشگاه منتقل شدند، و سپس درون یخچال با دمای چهار درجه سیلسیوس نگه‌داری گردیدند. جهت جداسازی قارچ ابتدا بخش‌هایی از بافت‌های آلوده به مدت ۱۰ دقیقه زیر جریان ملایم آب شسته شده و سپس با اسکالپل به قطعات کوچکتری بریده شدند و به مدت یک دقیقه در محلول تجاری هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (نیم درصد کلر فعال) ضد عفونی سطحی گردیدند. پس از رطوبت‌گیری نمونه‌ها در کاغذ صافی سترون، قطعات تقریبی به اندازه یک سانتی‌مترمربع از قسمت‌های آلوده به همراه نواحی سالم بافت گیاهی به تشتک‌های پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شد و سپس تحت شرایط تاریکی یا نور نزدیک به فرابنفش و دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل گردیدند. قارچ‌های رشد کرده به روش تک کنیدیوم روی محیط کشت WA دو درصد خالص-سازی شدند و به منظور تهیه پرگنه خالص قارچ، به محیط PDA (Potato Dextrose Agar) منتقل شدند (Pordel *et al.* 2015).

ده روز پس از کشت جدایه‌ها، رنگ و شکل پرگنه آنها مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین خصوصیات میکروسکوپی، هرجدایه درون تشتک‌های حاوی محیط کشت WA به همراه برگ سترون برنج و محیط کشت آگار-آرد برنج منتقل شد. تشتک‌ها به درون انکوباتور با دمای ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس و تحت شرایط نورفلورسنت متناوب (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) انتقال یافتند. پس از گذشت ۲۴-۱۵ روز با استفاده از لاکتوفنل، از جدایه‌های مورد نظر اسلاید میکروسکوپی تهیه گردید. جهت تهیه اسلاید از پنج نقطه مختلف پرگنه اندام‌های قارچی برداشته شد (Pordel *et al.* 2015).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک

استخراج DNA با روش Adreit *et al.* (2007) انجام پذیرفت. به منظور تکثیر نواحی ژنی از روش Klaubauf *et al.* (2014) استفاده شد. خالص‌سازی و توالی‌یابی توسط شرکت Genewiz آمریکا انجام گردید. همردیف سازی با برنامه MUSCLE در نرم افزار MEGA6.0 صورت پذیرفت (Edgar 2004). روابط فیلوژنی میان جدایه‌های جمع‌آوری شده همراه با توالی تعدادی دیگری از جدایه‌های گرفته شده از بانک ژن (Klaubauf *et al.* 2014) به روش ML (Maximum Likelihood) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و درخت فیلوژنتیکی رسم شد. اعتبار شاخه با انجام اعتبارسنجی (Bootstrap) در ۱۰۰۰ تکرار مورد سنجش قرار گرفت و ارزش بیشتر از ۸۰ روی تبارنمای حاصل نشان داده شد. تجزیه و تحلیل و رسم درخت فیلوژنتیکی با نرم‌افزار MEGA6.0 (Molecular

www.SID.ir

Archive of SID

Evolutionary Genetics Analysis, v 6.0) انجام گردید (Tamura *et al.* 2013).

آزمون بیماریزایی

در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۳ بذور ذرت (لاین حساس B73 و MO17) از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، بخش تحقیقات ذرت و گیاهان علوفه‌ای تهیه گردید. بذور برنج (رقم طارم هاشمی و موراتلی) و علف هرز مثل سوروف، چسبک و ارزن دم روباهی از موسسه تحقیقات و توسعه کشاورزی CIRAD، کشور فرانسه و موسسه تحقیقات برنج کشور و حاشیه مزارع تهیه گردید. گلدان‌هایی با قطر و ارتفاع ۱۰ سانتیمتر با کمپوست پر شدند و سپس شش بذر با فاصله و در عمق دو سانتیمتری خاک در هر گلدان کشت شدند. گلدان‌ها درون اتاقک داخل گلخانه با محدوده دمایی ۳۰-۲۰ درجه سلسیوس انتقال یافتند و هر دو روز یکبار آبیاری شدند و پس از گذشت حدود یک هفته گیاهچه‌ها از خاک بیرون آمدند. بعد از گذشت ۲۱ روز گیاهان برای بیماریزایی مورد استفاده قرار گرفت. برای تولید اسپور فراوان جهت مایه-زنی، قطعاتی از کاغذ صافی جدایه‌های ذکرشده روی محیط کشت آرد برنج-آگار قرار گرفتند. تشتک‌ها به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس مجهز به نور فلورسنت با تناوب ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی به مدت هفت روز انتقال یافتند. ابتدا مقداری آب مقطر سترون داخل تشتک پتری روی پرگنه واجد اسپور ریخته شد و اسپور و میسلیوم با خراش دادن سطح پرگنه توسط اسکالپل جمع آوری گردید و از توری گذرانده و به درون استوانه مدرج ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی لیتر آب مقطر سترون ریخته شد. غلظت سوسپانسیون با کمک لام هموسیتومتر شمارش و به میزان ۲×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر آب تنظیم شد (Silue *et al.* 1992). اسپورپاشی در مرحله چهار الی شش برگی گیاهچه‌ها انجام شد. ۱۰ میلی‌لیتر (۱ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور و ۹ میلی‌لیتر ژلاتین ۰.۰۵٪) سوسپانسیون در نظر گرفته شد که داخل ظرف ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شدند (Silue *et al.* 1992). عمل مایه‌زنی به صورت اسپری و با کمک دستگاه پمپاژ روی گیاهچه‌ها صورت گرفت. گلدان‌های شاهد نیز با ژلاتین مایه‌زنی شدند. گلدان‌ها بعد از مایه‌زنی به مدت ۲۴ ساعت درون اتاقکی با دمای ۲۴ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۵ قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت گلدان‌ها به گلخانه منتقل و روزانه آبیاری شدند. بعد از هفت روز، بیماری‌زا یا غیر بیماری‌زا بودن جدایه‌ها روی گیاهان تحت آزمایش بررسی شد.

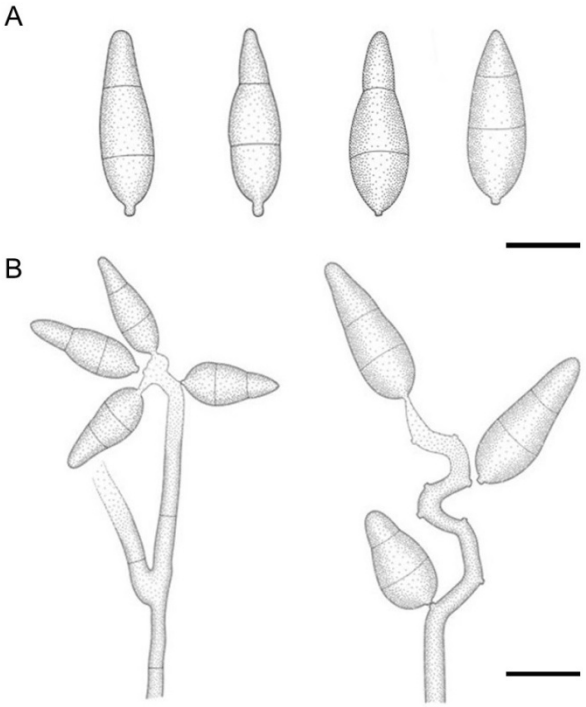
تعیین ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی در جمعیت‌های قارچ *Pyricularia oryzae* به روش Multiplex PCR

بررسی و ردیابی آلل‌های تیپ آمیزشی تعداد ۱۴۱ جدایه قارچ عامل بلاست با استفاده از دو جفت‌آغازگر اختصاصی معرفی شده توسط Tredway *et al.* (2005) درواکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام گرفت.

مخلوط واکنش PCR با حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۷/۳ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، پنج میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میلی‌مولار از هر نوکلئوتید، ۱۰پیکومول از هر آغازگر، یک واحد *Taq* DNA پلیمراز و دو میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰-۵۰ نانوگرم تهیه شد. واسرشت‌سازی اولیه (primary denaturation) در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه (یک چرخه)، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال (annealing) در ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، بسط (extension)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱-*Pyricularia oryzae* (جدایه IR0013): A)کنیدیوم، B)کنیدیوفور (مقیاس= ۱۰ میکرومتر).

Fig. 1.*Pyricularia oryzae* (IR0013): A) Condia, B) Conidiophiores (Scale bar= 10 µm).

۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ده دقیقه (یک چرخه) انجام گردید. پس ازتکثیر ناحیه مورد نظر، محصولات PCR در ژل آگارز دو درصد به همراه نشانگر اندازه DNA Gene Ruler™ DNA ladder mix) ارزیابی شدند (Notteghem & Silue 1992).

آزمون های سازگاری جنسی جدایه‌های *Pyricularia oryzae* در شرایط آزمایشگاه

بعد از تعیین تیپ آمیزشی هر جدایه به روش PCR، جدایه‌های مخالف تیپ آمیزشی در مقابل یکدیگر کشت شدند. همچنین چهار جدایه آزمایشگر[1] با تیپ آمیزشی مخالف با پتانسیل بالای تولید مثل جنسی و تولید اندام‌های جنسی بیشتر انتخاب شدند و جدایه‌ها با این چهار جدایه با تیپ آمیزشی مخالف تلاقی داده شدند. به منظور مشاهده فرم جنسی و بررسی باروری جدایه‌های قارچ *P. oryzae* ازمحیط کشت آرد برنج-آگار استفاده شد. بعد از سه هفته تشتک‌های پتری از نظر تشکیل مرحله‌ی جنسی مورد بررسی قرار گرفتند (Nottéghem 1990).

[1]Tester

نتایج

جداسازی و شناسایی جدایه‌های قارچی

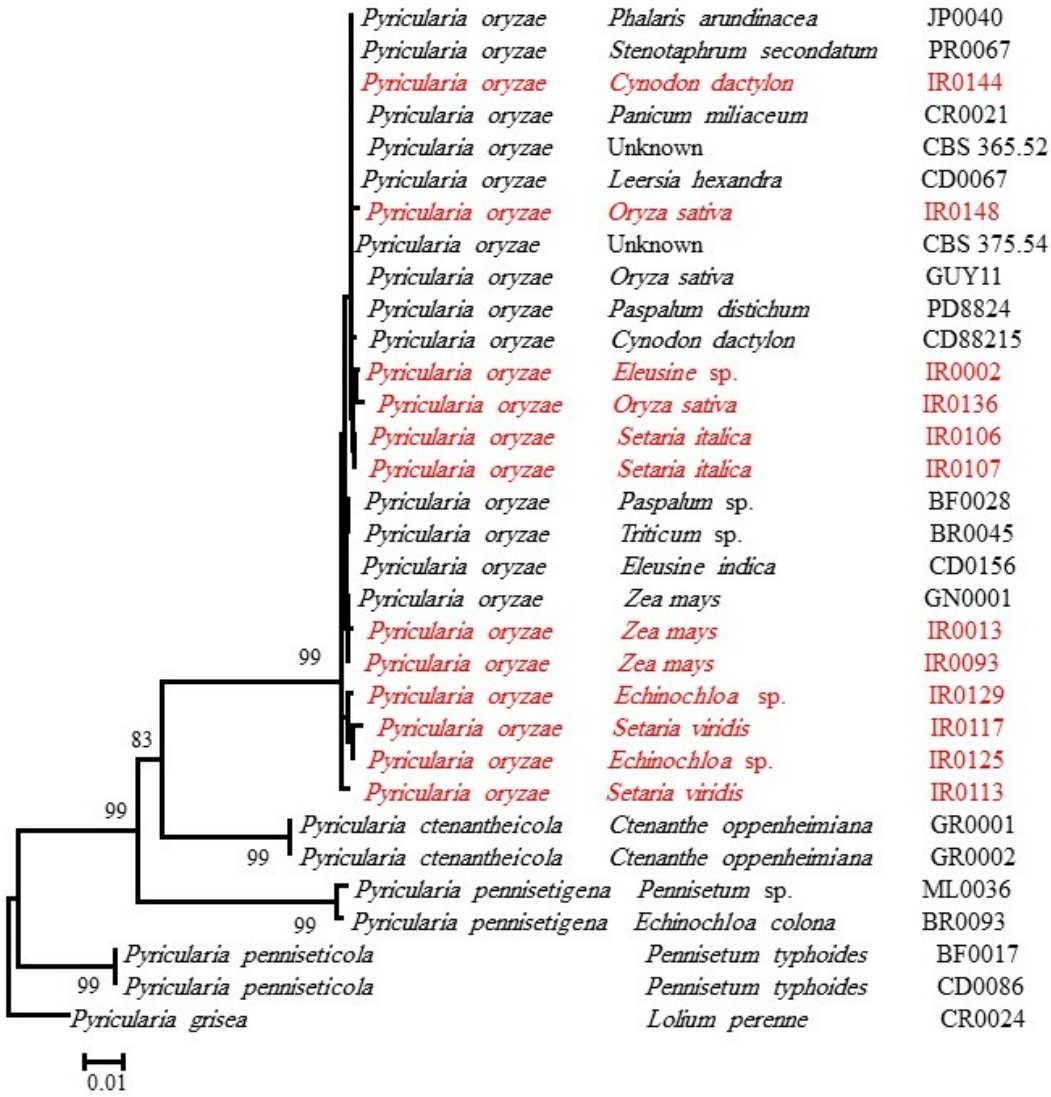
در این تحقیق تعداد ۱۴۱ جدایه از میزبان‌های برنج (۶۰ جدایه)، ذرت (۱۲ جدایه)، ارزن (۵ جدایه)، سوروف (۳۳ جدایه) و چسبک (۳۱ جدایه)، به دست آمد. پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ خاکستری می‌باشد. کنیدیوفورها منفرد به رنگ قهوه‌ای روشن و طول آنها تقریبا ۲۵۰ – ۱۰۰ میکرومتر می‌باشد (شکل ۱، B). سلول کنیدیوم‌زا زانویی و زائده‌دار می‌باشد. کنیدیوم ها گلابی شکل وارونه، به رنگ قهوه‌ای روشن، دارای دو دیواره عرضی و ابعاد۱۰-۷× ۲۵-۱۶ میکرومتر می‌باشند (شکل ۱،A) (Ellis 1971&1976).

تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک

درخت فیلوژنتیکی اجماعی ترسیم شده با روش ML براساس توالی نواحی ژنی اکتین، کالمودولین و *Rpb1* نشان می‌دهد که جدایه‌های *P. oryzae* بدست آمده از میزبان‌های مختلف با مقدار اعتبارسنجی (۹۹ درصد) در یک گروه مونوفیلتیک قرار می گیرد، و نسبت به گونه نزدیک *P. grisea* به خوبی تفکیک شده است. درون این گروه تنوع در ارتباط با میزبان‌های جدا شده دیده می شود. اما این تنوع نیازمند تایید براساس یک نشانگر مولکولی است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی استنباط شده براساس نواحی ژنی اکتین، کالمودولین و *Rpb1* با روش ML (maximum likelihood) بـرای ۳۲ تاکسون. مقدار اعتبار سنجی بالای ۸۰ درصد روی هرشـاخه نوشـته شـده اسـت. گونـه *Pyricularia grisea* CR0024 بـه عنـوان outgroup انتخاب شده است.

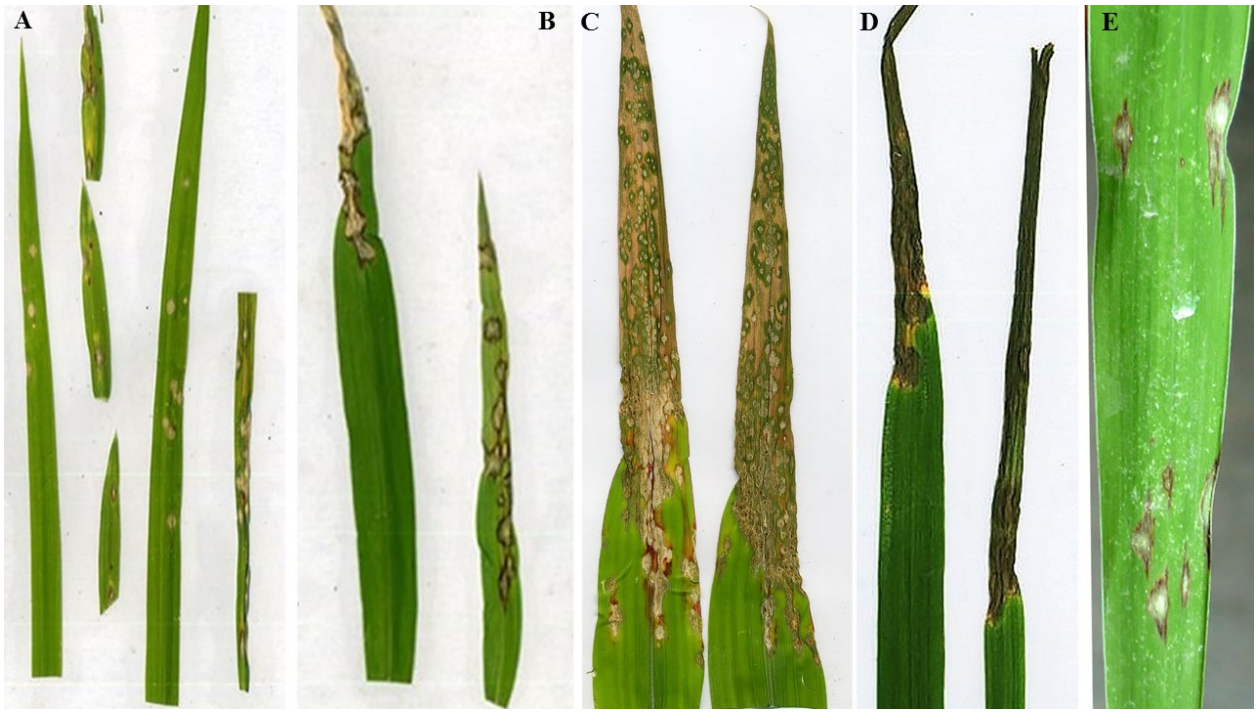
Fig. 2.Maximum likelihood (ML) tree inferred from combined *ACT*, *CAL*, and *Rpb1* sequences for 32 taxa. Bootstrap support values from ML analyses larger than >80% are shown above internodes. *Pyricularia grisea* CR0024 is as outgroup.

آزمون بیماری‌زایی

علائم ایجاد شـده توسـط گونـه *P. oryzae* روی گیـاه برنج، هفت روز پس از مایـه زنـی بـه صـورت لکـه هـای دوکی کشیده و سفید رنگ با حاشیه قهوه‌ای در سطح برگ ظاهر گردید (شکل ۳، A). جدایه‌های حاصل از میزبانهایی همچون سوروف، ارزن دم روبـاهی، چسـبک و ذرت روی برنج مایه‌زنی شد ولـی هـیچ کـدام تولیـد علائـم نکردنـد (جدول ۲). علائم ایجاد شـده روی گیـاه ارزن دم‌روبـاهی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳-علائم بلاست ناشی از گونه *Pyricularia oryzae* روی بوته‌های A) *Oryza sativa*، B) *Setaria italica*، C) *Zea mays*، D) *Echinochloa cruss-galli* و E) *Setaria viridis*.

Fig. 3. Blast symptoms caused by *Pyricularia oryzae* on A) *Oryza sativa*, B) *Setaria italica*, C) *Zea mays*, D) *Echinochloa cruss-galli*, E) *Setaria viridis*.

جدول ۱. منبع و شماره دسترسی جدایه‌های *Pyricularia oryzae* مورد استفاده در آنالیز فیلوژنتیکی.

Table 1. *Pyricularia oryzae* strains used in this study, with collection details and GenBank accessions.

Species	Culture collection no	Geographic origin	Host	GenBank accessions[a]		
				CAL	Actin	RPB1
Pyricularia oryzae	IR0125	Golestan, Iran	*Echinochloa* sp.	MH188335	----------	MH188330
Pyricularia oryzae	IR0129	Golestan, Iran	*Echinochloa* sp.	MH188345	----------	MH188331
Pyricularia oryzae	IR0107	Mazandaran, Iran	*Setaria italica*	MH188337	----------	MH188327
Pyricularia oryzae	IR0106	Mazandaran, Iran	*Setaria italica*	MH188336	----------	MH188326
Pyricularia oryzae	IR0148	Khorasan razavy, Iran	*Oryza sativa*	MH188346	----------	MH188334
Pyricularia oryzae	IR0117	Mazandaran, Iran	*Setaria viridis*	MH188338	----------	MH188329
Pyricularia oryzae	IR0113	Mazandaran, Iran	*Setaria glauca*	MH188344	----------	MH188328
Pyricularia oryzae	IR0136	Golesatn, Iran	*Oryza sativa*	MH188339	----------	MH188332
Pyricularia oryzae	IR0013	Mazandaran, Iran	*Zea mays*	MH188342	---------	MH188324
Pyricularia oryzae	IR0093	Golestan, Iran	*Zea mays*	MH188343	---------	MH188325

[a]Genbank accessions representing the following DNA regions: ACT=Actin; CAL=Calmodulin; RPB1=RNA polymerase II second largest subunit region. [b]*Pyricularia grisea* was included as outgroup in phylogenetic analysis.

توسط گونه *P. oryzae* در شرایط گلخانه، لکه‌ها چهار روز بعد از مایه زنی به صورتی نقاط گرد با حاشیه تیره مشخص شد و پس از گذشت هفت روز به صورت لکه های دوکی شکل با حاشیه تیره قابل تشخیص بود (شکل۳، B). جدایه‌های های بدست آمده از میزبانهای دیگر روی ارزن دم روباهی مایه زنی شد که به جز جدایه جدا شده از

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. نتایج بیماریزایی جدایه‌های *Pyricularia oryzae* روی برنج، ارزن دم روباهی، ذرت، سوروف و چسبک.

Table 2. Pathogenicity results of *Pyricularia oryzae* isolates on *Oryza sativa*, *Setaria italica*, *Zea mays*, *Echinochloa cruss-galli*, and *Setaria viridis*.

Fungal strain	Host of origin	*O. sativa*	*S. italica*	*Z. mays*	*E. crus-galli*	*S. viridis*
IR0065	*O. sativa*	6	1	1	1	1
IR0103	*S. italica*	1	6	1	1	5
IR0013	*Z. mays*	1	1	6	5	1
IR0030	*E. crus-galli*	1	1	5	6	1
IR0018	*S. viridis.*	1	5	1	1	6

Lesion types are as follows: type 1, no signs of infection; type 2, small brown lesions; type 3, small lesions with yellow centers and brown margins; type5, diamond-shaped lesions; type 6, large diamond-shaped lesions (Silue *et al.* 1992).

چسبک هیچ کدام توانایی بیماریزایی روی ارزن را نداشتند. علائم ایجاد شده روی گیاه ذرت با جدایه *P. oryzae* بدست آمده از ذرت در شرایط گلخانه، اولین علائم بیماری سه روز پس از مایه‌زنی بصورت لکه‌های کوچک و خاکستری در سطح برگ ظاهر شدند. پس از گذشت سه الی چهار روز، لکه‌های کشیده و دوکی شکل کوچکی به آسانی قابل رویت بودند (شکل ۳، C). با گذشت یک هفته بعد از مایه‌زنی، بسیاری از برگهای آلوده به طور کامل خشک و از بین رفتند و روی برگهای باقی مانده لکه های دوکی شکل کشیده قابل مشاهده بود. جدایه حاصل از سوروف نیز علائمی را روی برگهای ذرت ایجاد کردند که لکه ها کشت داده شد اما اسپور و یا میسلیومی تولید نشد که این احتمال می رود که حاصل واکنش مقاومت گیاه نسبت به قارچ باشد. علائم ایجاد شده توسط جدایه حاصل از سوروف روی سوروف، چهار روز پس از مایه-زنی به صورت لکه‌های دوکی شکل، کشیده و سفید رنگ با حاشیه تیره در سطح برگ بوته‌های تحت تیمار ظاهر شدند (شکل ۳، D). با گذشت یک هفته بعد از مایه‌زنی، لکه ها کشیده‌تر می‌شوند. جدایه های حاصل از میزبانهایی همچون ارزن دم روباهی، گندم و برنج روی سوروف مایه‌زنی شد ولی هیچ کدام تولید علائم نکردند.

علائم ایجاد شده توسط گونه *P. oryzae* روی چسبک، چهار روز پس از مایه‌زنی به صورت لکه‌های دوکی شکل، کشیده و سفید رنگ با حاشیه تیره در سطح برگ بوته‌های تحت تیمار ظاهر شدند (شکل ۳، E). با گذشت یک هفته بعد از مایه‌زنی لکه ها کشیده‌تر می‌شوند. جدایه های حاصل از میزبان‌های دیگر روی چسبک مایه‌زنی شد ولی هیچ کدام به جز جدایه بدست آمده از ارزن دم‌روباهی روی چسبک تولید علائم نکردند (جدول ۲).

تعیین ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی

تکثیر نواحی از ایدیومورف *Mat 1-1* و ایدیومورف *Mat 1-2* به ترتیب با استفاده از جفت آغازگرهای L1 و L2 و جفت آغازگرهای T1 و T2 در روش multiplex-PCR انجام شد. جفت آغازگرهای L1 و L2 و جفت آغازگرهای T1 و T2 به ترتیب قطعه‌هایی به طول حدود ۵۵۲ bp و ۳۹۰bp تکثیر نمودند. در همه جدایه‌ها باند DNA اختصاصی تکثیر گردید و در هیچ یک از آن‌ها هر دو باند به طور همزمان مشاهده نشد. تیپ آمیزشی *Mat1-1*، تیپ غالب در جدایه های حاصل از برنج و ارزن دم روباهی را تشکیل می دادند و تیپ آمیزشی *Mat1-2* تیپ غالب در جدایه های حاصل از سوروف و ذرت را تشکیل می داد. درصد فراوانی تیپ آمیزشی در بین جدایه های بدست آمده ازمیزبانهای مختلف در جدول ۳ آورده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. درصد تیپ آمیزشی جدایه های *Pyricularia oryzae* بدست آمده از میزبان‌های مختلف.

Table 3. Mating type percentage of *Pyricularia oryzae* isolates from different hosts in Iran

Host	Frequency of mating	*Mat1-1*	*Mat1-2*
Oryza sativa	42.6	100	0
Echinochloa crus-galli	23.4	7.7	92.3
Zea mays	8.5	0	100
Setaria viridis	22	40	60
Setaria italica	3.5	100	0

تعیین وضعیت سازگاری جنسی در شرایط آزمایشگاه

بعد از تعیین تیپ آمیزشی هر جدایه با استفاده از واکنش multiplex-PCR، جدایه‌های با تیپ آمیزشی مخالف در مقابل یکدیگر کشت شدند. جدایه های با تیپ آمیزشی مخالف در مرحله اول در مقابل یکدیگر قرار گرفتند. جدایه های بدست آمده از میزبان های مختلف با *Mat 1-2* در مقابل جدایه با *Mat 1-1* قرار گرفت. نتایج این آزمایش عدم تولید پرتیسوم و ایجاد لاین‌های عدم سازگاری بین جدایه‌ها بود. در مرحله بعد تعداد چهار جدایه با تیپ آمیزشی ((*Mat1-1*)Br48، -(*Mat1-1*) Guy11 (*1*، (*Mat1-2*)Br114-5، (*Mat1-1*)KA9) مشخص از کشور فرانسه فراهم شد. نتایج حاصل از تلاقی بین جدایه‌های ایرانی با جدایه استاندارد منجر به تولید پرتیسوم بین جدایه‌های حاصل از برنج (*Mat1-1*) و جدایه های استاندارد (*Mat1-2*)، جدایه های حاصل از ارزن دم روباهی (*Mat1-1*) و چسبک (*Mat1-2*) با جدایه های استاندارد گردید (شکل ۴). هیچ کدام یک از جدایه های بدست آمده از سوروف و ذرت در مقابل جدایه های استاندارد تولید پرتیسوم نکردند. با توجه به عدم ردیابی و شناسایی هر دو الل تیپ آمیزشی قارچ عامل بلاست روی گیاه برنج و پتانسیل کم تولید مثل جنسی در طبیعت و آزمایشگاه، به نظر می‌رسد وجود تنوع زیاد در ارقام مختلف برنج و مساعد بودن شرایط آب و هوایی برای تکثیر غیرجنسی و طبیعتا بروز نوترکیبی غیرجنسی از طریق پدیده شبه‌جنسی در کنار سازگاری رویشی مهمترین عوامل در بروز تغییرات ژنتیکی قارچ عامل بلاست در مزارع برنج محسوب می‌شوند.

ویژگی‌های ریخت‌شناختی فرم جنسی قارچ *Pyricularia oryzae*

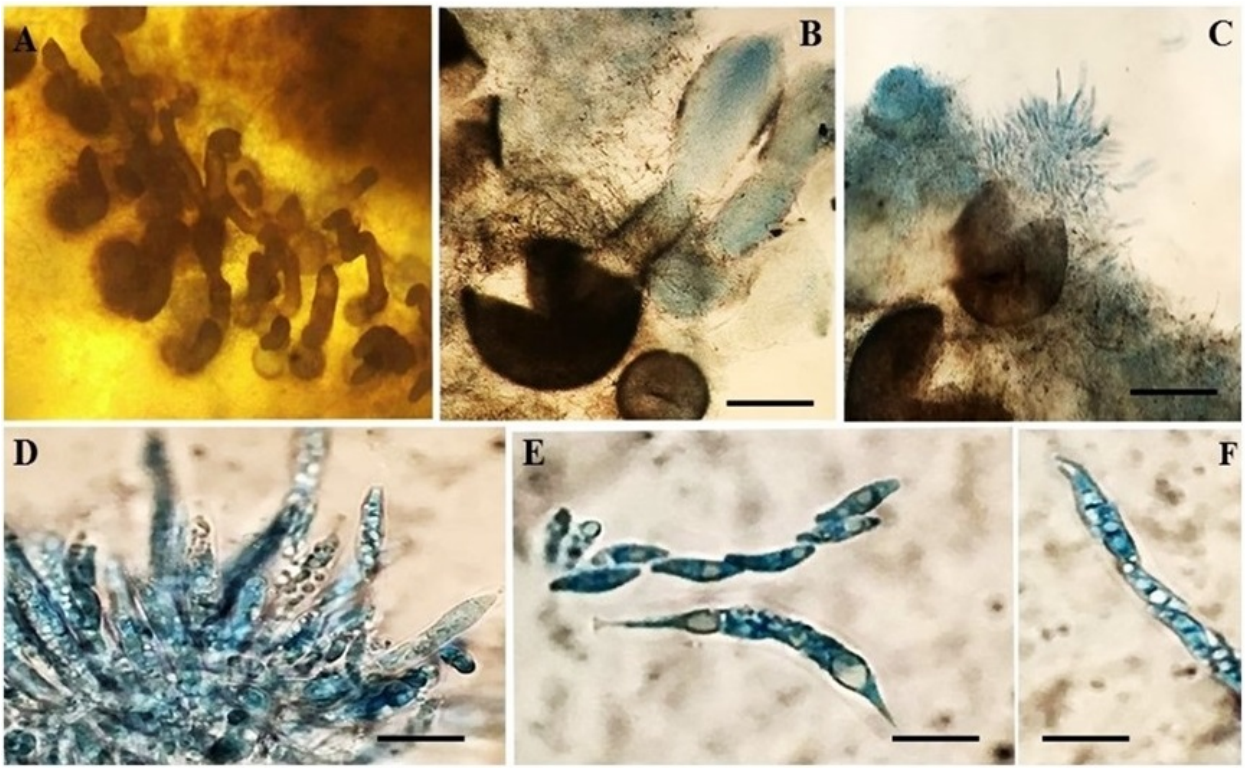
پریتسیوم‌ها به صورت نقاط تیره روی محیط کشت آردبرنج-آگار بعد از گذشت سه هفته مشاهده شد. پریتسیوم‌ها قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره، کروی تا بیضوی با گردن بلند یا و به ابعاد ۲۰۰-۱۰۰ × ۶۰۰-۳۰۰ میکرومتر اندازه‌گیری شدند (شکل ۴، A-C). آسک‌ها استوانه‌ای یا چماقی وارونه، پایه‌دار یا بدون پایه و در انتها گرد و به ابعاد ۷-۱۰ ×۸۰-۵۵ میکرومتر بودند. آسک‌ها حاوی آسکوسپورهای چهارسلولی و کروی و به تعداد هشت عدد در داخل آسک‌ها مشخص بودند (شکل ۴، D). آسکوسپورها در حالت بلوغ، چهارسلولی، دوکی‌شکل، شفاف و بدون غلاف ژلاتینی و زائده هستند و معمولا دارای فرورفتگی کم در محل دیواره عرضی می‌باشند و به ابعاد ۸-۴ × ۲۵-۱۷ میکرومتر اندازه‌گیری شدند (شکل ۴،E-F). آسکوسپورها بعد از انتقال به محیط کشت آب-گار دو درصد جوانه زدند.

بحث

براساس بررسی‌های ریخت‌شناختی و فیلوژنی مشخص شد که جدایه‌های حاصل از میزبان‌های مختلف متعلق به گونه *P. oryzae* می باشد. اطلاعات حاصل از آزمون بیماریزایی نشان داد، جدایه‌های حاصل از میزبان‌های

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- تشکیل فرم جنسی *Pyricularia oryzae*در تلاقی بین جدایه‌های IR0111(Mat 1-1) و Guy11(Mat 1-2) روی محیط کشت آردبرنج-آگار: A-C) پریتسیوم‌ها با گردن بلند (مقیاس= ۱۰۰ میکرومتر)، D) آسک (مقیاس= ۱۰ میکرومتر)، E-F) آسکوسپور (مقیاس= ۱۰ میکرومتر).

Fig. 1. The sexual state of *Pyricularia oryzae* between IR0111 (*Mat 1-1*) and GUY11 (*Mat 1-2*) isolates on rice flour + agar. A-C) perithecia with long neck (Bar= 100 µm), D) Asci (Bar= 10 µm), E-F) Ascospores (Bar= 10 µm).

متفاوت تنها توانایی تولید علائم شدید روی میزبان جدا شده را دارند و علائمی با شدت کمتر را روی دیگر میزبان‌ها ایجاد می‌کنند. مطالعات قبلی براساس توالی یابی چندژنی یا کل ژنوم نشان می‌دهد گونه *P. oryzae* به چندین کلاد تقسیم می‌شود که هر کدام دامنه محدودی از گونه‌های گیاهی را آلوده می‌کنند (Couch *et al.* 2005, Gladieux *et al.* 2017).در بسیاری از منابع آزمون بیماریزایی تخصص میزبانی در این کلاد را تایید می نماید. استرین‌های حاصل از برنج دامنه محدودی از میزبان را دارند و فقط در برخی منابع ذکر شده است که این استرین‌ها توانایی آلودگی چاودار و *Lolium* را به صورت محدود دارند (Tosa & Chuma, 2014, Klaubauf *et al.* 2014). استرین‌های بدست آمده از *Elusine*، *Setaria* و گندم نیز تخصص میزبانی دارند و توانایی آلودگی برنج را ندارند (Kato *etal.* 2000, Couch *et al.*2005, Murata *et al.* 2014). در تحقیق حاضر مشخص گردید که جدایه‌های قارچ *P. oryzae* هتروتال بوده و از نظر جنسی نر بارور و یا هرمافرودیت می‌باشند. جدایه هایی که پریتسیوم را در سمت جدایه استاندارد تولید کردند، به عنوان نر بارو و جدایه های که به صورت مساوی و در هر دو سمت تولید پریتیسوم کردند، به عنوان هرمافرودیت تشخیص داده شد. مک واتاناکارن و همکاران (Mekwatanakarn *et al.*

www.SID.ir

Archive of SID

1999) وضعیت باروری و پراکنش ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی ۳۴۱ جدایه تک اسپور شده این قارچ را در تایلند مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که ۶۷ درصد از این جدایه‌ها کاملاً نابارور بودند و هیچ پریتسیومی در تلاقی با جدایه‌های استاندارد تشکیل ندادند. تیپ آمیزشی ۲۴/۶ درصد از جدایه‌ها *Mat1-2* و تیپ آمیزشی ۸/۸ درصد از جدایه‌ها *Mat1-1* تشخیص داده شد.

حضور هر دو تیپ آمیزشی در یک جمعیت قارچ بیانگر پتانسیل وقوع تولید مثل جنسی در آن جمعیت می‌باشد. بنابه دلایل مختلف از جمله شرایط محیطی نامناسب، عدم حضور و بلوغ همزمان هر دو تیپ آمیزشی، عدم آمادگی یک تیپ آمیزشی و جدایی میزبانی به عنوان مهمترین عامل، تولید مثل جنسی را تحت تأثیر قرار داده و احتمال آن را در طبیعت کاهش می‌دهد. در این حالت انتخاب از طریق عوامل مختلف از جمله ارقام مقاوم و یا کاربرد قارچ‌کش‌ها روی یکی از ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی منجر به تکثیر بیش از حد تیپ‌های آمیزشی دیگر شده و فراوانی آن نسبت به تیپ آمیزشی مخالف بیشتر می‌شود (Gladieux *et al.* 2017). براساس نتایج بدست آمده جدایی ایدیومورف‌های آمیزشی به لحاظ میزبانی (فراوانی تیپ آمیزشی *Mat 1-1* روی برنج و روی ارزن دم روباهی غالب است و فراوانی تیپ آمیزشی *Mat 1-2* روی سوروف، چسبک و گیاه زارعی ذرت غالب می‌باشد) و عدم تولید آسکوکارپ در آزمایشگاه بین جدایه‌های ایرانی با دو تیپ آمیزشی بیانگر وجود جمعیت‌های کلونال و تاثیر سایر عوامل در بروز تنوع ژنتیکی این قارچ در ایران می باشد.

سپاسگزاری

هزینه انجام این تحقیق از محل اعتبار طرح شماره ۷۱۱۰۰۲۲/۶/۲۹ تامین شده است. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر فراهم آوردن اعتبارات مالی این تحقیق کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

Adreit H., Santoso, Andriantsimialona D., Utami D. W.,NottéghemJ. L., Lebrun M. H., and Tharreau D. 2007. Microsatellite markers for population studies of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Molecular Ecology Notes 7:667–670.

Chiapello H. et al. 2015. Deciphering Genome Content and Evolutionary Relationships of Isolates from the fungus *Magnaporthe oryzae* attacking different host plants. Genome Biology and Evolution 7:2896–2912.

Couch B. C., Fudal I., Lebrun M. H., Tharreau D., Valent B.,van Kim P., Notte´ghem J. L., and Kohn L. 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. Genetics170:613–630.

Edgar R. C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC Bioinformatics 5:113.

Ellis M. B. 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

Ellis M. B. 1976. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

Gladieux P., Condon B., Ravel S., Soanes D., Maciel J. L. N., Nhani Jr A., Terauchi R., Lebrun M. H., Tharreau D., Mitchell T., Pedley K. F., Valent B., Talbot N. J., and Farman M. 2017. Gene flow between divergent cereal- and grass-specific lineages of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. M Bio 9: e01219–17.

Kang S., Chumley F. G., and Valent, B. 1994. Isolation of the mating-type genes of the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea* using genomic subtraction. Genetics 138:289–296.

www.SID.ir

Archive of SID

Kato H., Yamamoto M., Yamaguchi-Ozaki T., Kadouchi H., Iwamoto Y., Nakayashiki H., Tosa Y., Mayama S., and Mori N. 2000. Pathogenicity, mating ability and DNA restriction fragment length polymorphisms of *Pyricularia* populations isolated from Gramineae, Bambusideae and Zingiberaceae plants. Journal of General Plant Pathology 66:30–47.

Klaubauf S., Tharreau D., Fournier E., Groenewald J. Z., Crous P. W., de Vries R. P., and Lebrun M. H. 2014. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae*)*. Studies in Mycology 79:85–120.

Mekwatanakarn P., Kositratana W., Phromraka T., and Zeigler R. S. 1999. Sexually fertile of *Magnaporthe grisea* rice pathogen in Thailand. Plant Disease 83:939–943.

Mousanejad S., Javan-Nikkhah M., and Mohammadi Goltape E. 2005.Characterization of Vegetative Compatibility Groups in *Magnaporthe grisea* Poulation in Guilan Province, Iran. Iranian, Journal of Agriculture Science 36:305–317.

Murata N., Aoki T., Kusaba M., Tosa Y., and Chuma I. 2014. Various species of *Pyricularia* constitute a robust clade distinct from *Magnaporthe salvinii* and its relatives in Magnaporthaceae. Journal of General Plant Pathology 80:66–72.

Nottéghem J. L. 1990. Results and orientation of ec projections on rice blast resistance to blast. Cirad research program on the rice blast disease initiated in 1971.

Nottéghem J. L., and Silue D. 1992. Distribution of the mating type alleles in *Magnaporthe grisea* population pathogenic on rice. Phytopathology 82:421–424.

Pordel A., Javan-Nikkhah M., and Khodaparast S. A. 2015. Revision of *Pyricularia oryzae* and occurrence of new hosts for the pathogen Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 52:67–83.

Silue D., NottéghemJ. L., and Tharreau D. 1992. Evidence of a Gene-for-Gene relationship in the *Oryza sativa-Magnaporthe grisea* pathosystem. Genetics 82:577–580.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30:2725–2729.

Tosa Y., and Chuma I. 2014. Classification and parasitic specialization of blast fungi. Journal of General Plant Pathology 80:202–209.

Tredway L., Stevenson P. K. L., and Burpee L. L. 2005. Genetic structure of *Magnaporthe grisea* populations associated with St. Augustinegrass and tall fescue in Georgia. Phytopathology 95:463–471.

Valent B., and Chumely F. G. 1991. Molecular genetic analysis of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Annual Review of Phytopathology 29:433–467.

www.SID.ir