جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال دوازدهم، شماره ششم، بهمن- اسفند ۱۳۸۴
www.magiran.com/jasnr

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]

[۱]عضو هیأت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت؛ [۲]دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران؛ [۳]اساتید 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 victoriae* و *Bipolaris* sp. شناسایی شدند. گونه *Bipolaris oryzae* ۱۵ درصد، گونه *Bipolaris victoriae* 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 وموکهوپودهیای، 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 وهمکاران،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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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 (ایتووکوریبایاشی، ۱۹۲۷). درسلر، قارچ را متعلق به جنس جدید *Cochliobolus* دانست و داستور 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 بوسیلهٔ ایتو (۱۹۳۰) به‌صورت یک جنس به نام *Drechslera* و زیر جنس *Eu-Helminthosporium* بوسیلهٔ شوماکر به‌صورت یک جنس به نام *Bipolaris*، ارتقا یافت (شوماکر، ۱۹۵۹). خصوصیات دیگری همچون منشأ بوجود آمدن[1]، جهت رشد از لوله‌های تندشی کنیدیومی از سلول‌های انتهایی، آنتوژنی دیواره عرضی[2] 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 وساجس، 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 ایجاد کننده 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 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، به‌طوری‌که با افزایش میزان قند بیشتر از ٤ 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 به‌طور 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، ۱۳٦۲). در این زمینه مطالعاتی توسط(ترابی، ۱۳٦۳؛ ذاکری،۱۳۵۹؛ رضوی،۱۳۷۲؛ خسروی، ۱۳۷۸) در مورد این بیماری انجام شده است. خسروی عوامل ایجادکننده این بیماری در مازندران را *Bipolaris oryzae*، *Bipolaris sorgichola* و *Bipolaris sp.*، 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*، *Bipolaris tetramera* و *Exserohilum rostratum* 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

1- Point of origin
2- Septum

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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 خسارات زیادی به بار آورده و نیز به‌دلیل آنکه، یک بررسی منسجم در مورد عوامل ایجادکننده این بیماری، انجام نشده بود، به‌منظور 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 بجار 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) به‌عنوان محیط کشت عمومی قارچ‌ها و بررسی کلنی‌های جدایه‌های مختلف، ازمحیط آب ـ آگار برای خالص‌سازی قارچ‌ها (تهیه تک‌اسپور و نوک ریسه)و از محیط آب شیر ـ آگار و ساقه گندم[1] برای اسپورزایی و تشخیص جنس و گونه‌های قارچ عامل بیماری و همچنین بررسی جوانه‌زدن اسپور آنها استفاده گردید. (سیوانسان، ۱۹۸۷؛ دینگرا و سینکلیر، ۱۹۹٤). 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 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 اندازهٔ 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 بوسیلهٔ باکتری، مقداری سولفات استرپتومایسین به محیط اضافه گردید (۲ میلی‌گرم در هر ارلن حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط مایع)، از آنجایی‌که قارچ عامل بیماری روی محیط کشت PDA، اسپور نمی‌دهد، پس از ۳- ۲ روز از رشد قارچ بر روی PDA، مقداری از میسلیوم 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 درجه‌سانتی‌گراد 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- ٤ 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، ۱۳٦۳).

1- (Tap Water Agar) TWA+wheat straw

نگهداری قارچ جدا شده: به‌منظور نگهداری جدایه‌های قارچی، پس از خالص‌سازی، به لوله‌های آزمایش حاوی PDA مورب انتقال یافته و سپس در انکوباتور در درجه حرارت ۳۰- ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤- ۳ روز نگهداری شدند و آنگاه به یخچال با درجه حرارت ٥- ٤ درجه‌سانتی‌گراد انتقال یافتند که بعد از ٦- ٥ ماه تجدید کشت انجام گرفت.

بررسی و شناسایی قارچ‌ها: پس از جداسازی و خالص‌سازی 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 اندازه‌گیری کنیدیوفر و کنیدی و ... از میکروسکوپ دوچشمی Olympus CH-2 استفاده شد. برای رشد اولیه تمام کشت‌ها به‌مدت یک هفته در حرارت ٢٦ درجه سانتی‌گراد 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 ٢٦ درجه سانتی‌گراد (اپتیمم ۳۰- ۲۵ درجه سانتی‌گراد) 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 میسلیوم‌ها 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 بیماری‌زایی: اثبات بیماری‌زایی 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 داده شد آنگاه مقداری بذر رقم خزر به‌مدت ۱۰ دقیقه در آب گرم ٥٧- ٥٢ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری ضدعفونی 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 به‌عنوان آلوده و دیگری به عنوان شاهد انجام گرفت. به هر تشتک پتری، مقداری آب مقطر سترون اضافه شد، به‌طوری‌که در تمام مدت آزمایش آبدار بودند. پس از ۱۷- ١٦ 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 ٢٦ درجه سانتی‌گراد، رطوبت بیش از ۹۰ درصد و تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی، قرار داده شدند. روش مایه‌زنی بدین ترتیب بود که بر روی همه نشاها در دو دسیکاتور شاهد و آلوده، ابتدا بوسیلهٔ افشانه‌های کوچک دستی، آب مقطر پاشیده شد (در زیر هود سترون) سپس سوسپانسیون لازم برای مایه‌زنی فراهم گردید. لازم به ذکر است با توجه به اینکه در این بیماری میسلیوم نیز به‌عنوان مایه تلقیح عمل می‌کند (شرف وهمکاران، ١٩٤٧). برای تهیه سوسپانسیون، از مجموع اسپور و میسلیوم به‌عنوان مایه تلقیح استفاده گردید. در تمامی آزمایش‌ها از سوسپانسیونی شامل ٤×١٠^{٤} (اسپور+ میسلیوم) در میلی‌لیتر آب مقطر سترون استفاده گردید که برای شمارش آنها از لام گلبول‌شمار[1] استفاده شد. همچنین برای افزایش جذب سطحی توئین-۲۰[2] به نسبت ۱درصد، بکار رفت.

نتایج و بحث

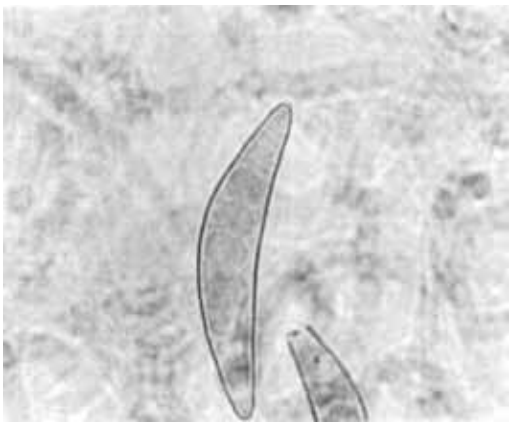
صفات مورفولوژیکی و وضعیت تاکسونومیکی جدایه‌های *Bipolaris*: از نظر شکل ظاهری کلنی، مورفولوژی کنیدی و کنیدیوفر، فرآیند تشکیل کنیدی، نحوه جوانه زدن، کنیدی‌ها در ۳ گروه مختلف قرار گرفتند

1- Hemacytometer
2- Tween-20

که صفات هر گروه بر اساس مشخصات ظاهری و مورفولوژی به‌طور جداگانه مطالعه شد. گروه اول دارای مشخصات زیر بودند: **کلنی:** پخش یکنواخت، ریسه‌ها با رشد هوایی زیاد و رشد سریع، خاکستری رنگ تا خاکستری تیره، **ریسه‌ها:** منشعب، پنبه‌ای، قهوه‌ای روشن تا کمرنگ، **کنیدیوفر:** منفرد یا در گروه‌های کوچک، راست تا مارپیچی، گاهی زانودار[1]، قهوه‌ای تیره که به طرف نوک کمرنگ‌تر می‌شود، با دیواره عرضی[2] به ابعاد ۷- ٤ ×۵۸۰- ٤۳۰ میکرومتر (متوسط ۵ ×۵۰۰ میکرومتر)، **کنیدی:** کنیدی‌ها معمولاًخمیده، قایقی‌شکل، دوکی تا گرزی وارونه، گاهی اوقات سیلندری، زرد کمرنگ تا قهوه‌ای تیره، صاف و دارای ۱۲- ۵ دیواره عرضی به ابعاد ۲٦- ۱۰ × ۱۲۵- ٤٦/۵ میکرومتر (متوسط ۱٦/۵×۹٤)، هیلوم کوچک و تیره یا روشن، اغلب برآمده و به‌طور جزئی پاپیل‌دار 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).

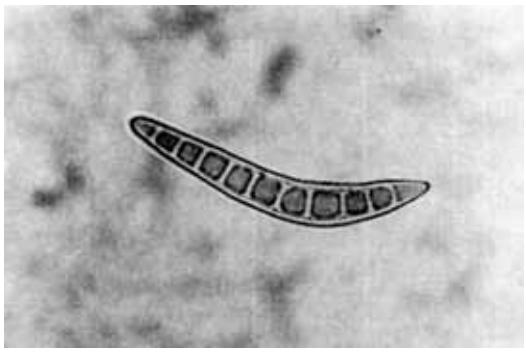
صفات اختصاصی‌تری همچون رنگ، شکل کلنی، شکل، ابعاد و رنگ کنیدی و کنیدیوفر به مشخصات گونه *B. oryzae* نزدیکتر می‌باشد (الیس، ۱۹۷۱؛ او، ۱۹۸۵؛ سیوانسان، ۱۹۸۷). لازم به ذکر است که گونه فوق‌الذکر *(B. oryzae)*، ۱۵ درصد از جدایه‌های موجود را تشکیل می‌دهد. مشخصات گروه دوم جدایه‌ها، **کلنی:** پخش یکنواخت، خاکستری تا خاکستری تیره، **ریسه‌ها:** 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- ۵×۳٤۰- ۵۰ میکرومتر، **کنیدیوم:** کنیدیوم‌ها به‌طور جزیی خمیده، به‌طور وسیع دوکی یا دوکی گرزی وارونه، قهوه‌ای روشن تا تیره، صاف، دارای ۱۳- ٤ (اغلب ۱۰- ۸) دیواره عرضی، به ابعاد ۲٤-۹×۱٤۳- ۳۲ میکرومتر، هیلوم کوچک بوده ولی دارای برآمدگی یا پاپیل 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 اختصاصی‌تر آن از جمله ابعاد کنیدی، کنیدیوفر و ویژگی‌های هیلوم، تعلق آن را به گونه *Bipolaris victoriae*، نزدیکتر می‌سازد (نلسون، ۱۹٦۱؛ 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، **ریسه‌ها:** منشعب، زرد کمرنگ تا قهوه‌ای روشن، **کنیدیوفر:** منفرد یا گروهی، راست تا مارپیچی، در بالا زانودار، قهوه‌ای روشن تا تیره، صاف، دیواره‌دار، به ابعاد ٦/۵- ۵×٤۵۳- ۱٦۵ میکرومتر، کنیدی‌ها به‌طور جزیی خمیده، دوکی. گرزی تا سیلندری، قهوه‌ای روشن، صاف، با ۱۰- ۱ دیواره عرضی، به ابعاد ۲۰- ۸/۵ × ۹۵- ۳۲ میکرومتر، کوچک، تیره، برآمده یا پاپیل‌دار نمی‌باشد. گروه سوم جدایه‌ها نیز از نظر فرآیند تشکیل کنیدی و جوانه‌زدن کنیدی مشابه با گروه اول می‌باشند (شکل ٤). صفات کلی در گروه سوم مشابه گروه اول می‌باشد و با مشخصات *Bipolaris* Shoemaker مطابقت می‌کند ولی خصوصیات اختصاصی‌تر 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.

1- Geniculate
2- Septate



شکل ۱ـ کنیدی قارچ *B. oryzae*
با بزرگنمایی تقریبی ٤٦٠ برابر

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



شکل۳ـ کنیدی قارچ *Bipolaris victoriae*
با بزرگنمایی تقریبی ٤٦٠ برابر

شکل٤ـ کنیدی قارچ *Bipolaris* sp. در حال جوانه‌زدن
از دو قطب با بزرگنمایی تقریبی ۲۳۰ برابر

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، درحالی‌که علائم یک گونه متشابه بودند (ایری، ۱۹۹٦). 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 در مراحل بعدی، *Bipolaris* sp. و سپس *Bipolaris victoriae* قرار می‌گیرد. با این حال به نظر می‌رسد که تفاوت‌های اساسی از نظر شدت بیماری‌زایی بین این سه گونه، وجود ندارد. گونه‌های گرامینه‌ای *Drechslera*، *Bipolaris*، *Exserohilum*، *Curvularia* و فرم‌های جنسی آنها مورد بررسی قرار گرفته‌اند (سیوانسان، ۱۹۸۷). بزرگترین جنس در این گروه *Bipolaris* است که ۵۲ گونه دارد، درحالی‌که *Drechslera* و *Exserohilum*، به‌ترتیب ۲۳ و ۲۰ گونه دارند.

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

	گونه‌های قارچ			شاهد
	B. oryzae	*B. victoriae*	*Bipolaris* sp.	
تعداد کل	۱۹	١٤	۲۰	۱۰
بیمار	١٤	۱۱	١٦	۰
مرده	۲	۱	۱	۰
سالم	۳	۲	۳	۱۰

بدین‌ترتیب مشاهده می‌شود کـه در نتیجـه تحـول در مفهوم تاکسونومیکی به‌کار رفته، پیچیدگی‌هـای زیـادی در گونه‌های گرامینه‌ای *Helminthosporium* حاصل شده است. این تکثر، دقت و اعتبـار اطلاعـات ذخیـره شـده را کاهش می‌دهد. به‌طوری‌که در بسیاری از موارد تردیدهایی بـرای بیولوژیسـت‌هـا در مـورد چگـونگی ایجـاد یـک طبقه‌بندی در جهت همبستگی‌های طبیعی و معیـار معتبـر برای تمـایز گونـه‌هـای *Helminthosporium* بوجـود آمده است (آلکورن، ۱۹۸۸). از آنجایی که شکل و انـدازه کنیدیوم‌ها در تفکیک گونه‌های گرامینه‌ای این قارچ به‌ویژه در سطح گونه‌ها حـائز اهمیـت فـراوان اسـت، توجـه بـه جزئیات اسپورهای جدایه‌های مختلـف دقـت فراوانـی را می‌طلبد. خصوصاً با توجه به ایـن نکتـه کـه مورفولـوژی کنیدیوم‌های این قارچ بسیار تحت تـأثیر عوامـل محیطـی همچـون رطوبـت و حـرارت و pH محـیط کشـت قـرار گرفته، به‌طوری‌که طول کنیدی و تعداد دیواره عرضی آنها تغییر می‌یابد (ترینـر و مارتینسـون، ۱۹۷۸). همچنـان کـه گفته شد شکل و اندازه کنیـدیوم در ایـن قـارچ، بـا نـوع ماده‌غذایی و شرایط محیطی در ارتباط می‌باشد، برخـی از موادغـذایی روی انـدازه و شـکل اسـپور اثـر دارنـد، به‌طوری‌که بـا افـزایش میـزان قنـد بیشـتر از ٤ درصـد و غلظت بالای ازت (بیشتر از ۰/۲ درصد)، طول، عـرض و تعداد دیواره عرضی کنیدی اغلب آنهـا، کـاهش مـی‌یابـد (الیوت، ۱۹٤۹). بـدین‌ترتیـب اهمیـت توجـه و دقـت در استاندارد بودن محیط‌های کشت و مطابقت آن با آنچه کـه در کلیدهای تشـخیص عامـل بیمـاری ذکـر شـده اسـت، مشخص می‌گردد، زیرا که با کوچک‌ترین تغییر در اجزای سازنده محـیط‌هـای کشـت، تغییراتـی در شـکل و انـدازه کنیدی‌ها بوجود آمده و میزان تنوع را به‌نحو چشـم‌گیـری افزایش می‌دهد. همچنین درجه رنگین شـدن هیلـوم‌هـای کنیدیومی در این قارچ و جنس‌های وابسته، متنوع است.

طبـق نظـر لـوترل (۱۹۷۷) تفـاوت‌هـای بـین چنـین هیلـوم‌هـایی اهمیـت تاکسـونومیکی کمتـری دارنـد. امـا مطالعات انجام گرفته توسط چولیل و هوگ (۱۹۸۲) نشان داد که شدت رنگدانه‌دار شدن هیلوم‌ها، هماننـد ابعادشـان می‌تواند تاکسونومی استرین‌های وابسته را تحت تأثیر قرار دهد. تفاوت در مورفولوژی هیلـوم‌هـای کنیـدیومی، بـین اسـترین‌هـای ژاپنـی و آمریکـایی، موجـب تردیـد بـرای نیسیکادو شد که آنها با وجود اینکه، بیماری‌زایی مشابهی دارند به گونه‌های مختلف تعلق دارنـد (چولیـل و هـوگ، ۱۹۸۲). علاوه بر آن، کلیدهایی ماننـد سیوانسـان، اسـاس تمایز به ویـژه در سـطح گونـه‌هـا را بـر ابعـاد کنیـدی 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 گونـه بسـیار وسیع بوده و این امر، کـار محقـق را در تمـایز و تفکیـک دقیق جدایه‌های قارچ به‌ویـژه در سـطح گونـه‌هـا دشـوار می‌سازد. از این رو انجام تحقیقات مولکـولی بـا تکیـه بـر روش‌های تفکیکی دقیق مبتنی بر DNA قارچ، ضـروری به‌نظر می‌رسد. اکفمیا در ۱۹۲٤، اولین علائم قابـل رؤیـت را در حدود ۲٤ سـاعت پـس از مایـه‌زنـی بـا قـارچ *B. oryzae* مشاهده نمود (او، ۱۹۸۵). همچنین مشاهده شـد که رنگ سلول‌هـای آلـوده در ۱۷ تـا ۲۰ سـاعت پـس از مایه‌زنی تغییر پیدا می‌کنـد (سـاتو، ٦٥- ۱۹٦٤). مطالعـات انجام شده نشان داد که تغییرپـذیری پاتوژنیـک بـه تنـوع اسـترین و مورفولـوژی کنیـدیوم، همبسـتگی نـدارد (گانگوپادهیای و پادمانابهان، ۱۹۸۷) و این درحالی اسـت کـه در مطالعـات انجـام شـده تـوسط رضـوی درجـه بیماری‌زایی گونه *B. oryzae* از دو گـونه دیگـر یعنـی *B. tetramera* و *E. rostratum*، بیشـتر بـوده اسـت (رضوی، ۱۳۷۲). بر این اساس مشـاهده مـی‌شـود کـه در زمینه مقایسه شدت بیماری‌زایی گونـه‌هـای مختلـف بـین محققین اختلاف نظر وجود داشته است. اما این‌گونه به‌نظر می‌رسد که گرچه تفاوت‌هایی بین شدت علائم ایجاد شده توسـط گونـه‌هـای مختلـف قـارچ *Bipolaris* مشـاهده می‌گردد، اما آنها، تفاوت‌های اساسی و معنی‌داری نیسـتند که بر اساس آنها بتوان مستقیماً میزان شدت بیماری‌زایی را با نوع گونه، ارتباط داد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت و جناب آقای دکتر محمد جوان نیکخواه استادیار محترم دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱.بهداد، الف. ۱۳٦۲. بیماری‌های گیاهان زراعی ایران. چاپخانه نشاط اصفهان. ٤٤۲ صفحه.

۲.پاداشت، ف.، روحانی، ح. و منصوری، ش. ۱۳۷۹. ضدعفونی بذور برنج بوسیلهٔ چند میکروارگانیسم آنتاگونیست علیه بیماری پوسیدگی طوقه. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. صفحه ۲٤۹.

۳.پاداشت، ف. و ایزدیار، م. ۱۳۷۷. بررسی بیماری لکه قهوه‌ای برنج در گیلان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. خلاصه مقاله، صفحه ۸۳.

٤.پاداشت، ف.، فردوس، ب. و دریغ گفتار، ف. ۱۳۷۷. بررسی رابطه بیماری لکه‌قهوه‌ای برنج با عناصر موجود در گیاه و خاک. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. خلاصه مقاله، صفحه ۸٤.

۵.ترابی، م. ۱۳٦۳. مقایسه چند روش آزمایشگاهی به منظور جداسازی قارچ *Drechslera oryzae* از بذور آلوده برنج. مجله بیماری‌های گیاهی. جلد۲۰، شماره (٤-۱): ۷-۱.

٦.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. ۲۳٦ 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.Bhattacharry, D., and Mukhopudhyay, N.K. 1986. Surface adherence and penetrability of mycobacillin as affected by adjuvants. Indian Phytopathology. 39(3): 390-394.

13.Chidambram, 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. Dematiuceous Hyphomycetes. CMI, Kew. England. 608 p.

17.Gangopadhyay, S., and Padmanabhan, S.Y. 1987. Breeding for disease resistance in rice. Oxford and IBH Pubilishing Co. Calcatta. 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 Institue. 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. Nutirition during spore production and the inoculum potential of *Helminthosporium maydis* race T. Phytopathology. 68: 1049-1053.

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 12(6), Feb - Mar 2006
www.magiran.com/jasnr

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

M.R. Safari Motlagh[1], H.R. Zamanizadeh[2], GH. A. Hedjaraude[3] and M. Okhovvat[3]
[1]Faculty member of Agricultural College of Islamic Azad University, [2]Associate Prof., Dept., of Plant protection of Azad Univ., Science and Research Campus, Tehran, [3]Prof., 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