

مطالعه تنوع ژنتیکی گونه‌های Bipolaris عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج در استان گیلان، براساس روش PCR-RFLP

• محمدرضا صفری مطلق، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت
• محمدجوان نیکخواه، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۴

Email: ssafarimotlagh@yahoo.com

چکیده

بیماری لکه قهوه‌ای، یکی از مهمترین بیماری‌های بذرزاد برنج است. دو گونه از قارچ به عنوان عامل بیماری شامل *Bipolaris oryzae* و *Bipolaris victoriae* قبلاً از استان گیلان، گزارش شده بودند. مطالعه ۳۴۲ جدایه به دست آمده از شالیزارهای استان گیلان، دو گونه دیگر شامل *B. indica* و *B. bicolor* را به عنوان عوامل ایجاد کننده بیماری به گونه‌های قبلی اضافه نمود. اساس شناسایی، صفات مورفولوژیک قارچ مانند رنگ کلنی، شکل، رنگ و ابعاد کنیدیوم و کنیدیوفور، فرآیند تشکیل کنیدیوم و نحوه جوانه‌زنی آنها بود. گونه *B. victoriae* از بیشترین فراوانی در استان گیلان برخوردار بود و بعد از آن به ترتیب گونه‌های *B. oryzae*، *B. bicolor* و *B. indica* قرار داشتند. آزمایش بیماری‌زایی جدایه‌های این چهار گونه، روی نشاهای برنج در محیط دسیکاتور انجام گرفت که نشان داد که این قارچ روی برنج، بیماریزا بوده و موجب بروز علائم مشخص بیماری لکه قهوه‌ای برنج می‌گردد. از این ۳۴۲ جدایه، ۱۸۰ جدایه به وسیله PCR-RFLP، مورد مطالعه قرار گرفتند. برای انجام این کار از دو دسته آغازگر وسه آنزیم برشی استفاده گردید. ابتدا DNA کل جدایه‌های مزبور استخراج و در یک برنامه حرارتی در دستگاه ترموسایکلر، تکثیر و سپس با آنزیم‌های برشی، برش داده شدند. بر اساس تجزیه کلاستر به روش UPGMA ۴ گروه انگشت‌نگاری DNA مشخص شدند که به ترتیب گونه‌های *B. victoriae* با ۸۵٪، *B. oryzae* با ۱۰٪، *B. bicolor* با ۳٪ و *B. indica* با ۲٪ فراوانی را در بر گرفتند. سطوحی از پلی‌مورفیسم در بین DNA جدایه‌های مختلف قارچی مشاهده گردید که این پلی‌مورفیسم، هم در درون گونه‌ها و هم در بین گونه‌های قارچی وجود داشت. الگوی باندهای DNA نتوانست همبستگی مستقیم بین پلی‌مورفیسم و شرایط آب و هوایی یا مناطق جغرافیایی را نشان دهد. از این رو، به کارگیری روش PCR-RFLP برای تفکیک قارچ‌ها در سطح گونه‌ای، مفید بوده و نتایج درخشانی را برای ارزیابی‌های بعدی از جمله معرفی ارقام مقاوم فراهم می‌کند.

کلمات کلیدی: برنج، لکه قهوه‌ای، Bipolaris، تنوع ژنتیکی، PCR-RFLP

Pajouhesh & Sazandegi: No 70 pp: 25-35

Study of genetic variation of Bipolaris species, the causal agent of rice brown spot disease in Guilan province based on PCR-RFLP

By: M. R. Safari Motlagh, Associated Prof. of Plant Pathology, College of Agriculture, Azad Univ., Rasht. M. J. Nikkhah, Associated Prof. of Plant Pathology., College of Agriculture. Tehran Univ., Karaj.

Brown spot is one of the most important seedborne diseases of rice. Two species of fungus including *B. oryzae* and *B. victoricae* were previously record as the causal agent of disease in Guilan province. The study on 342 isolates of its fungus collected from rice fields of Guilan, revealed that besides the above species two other species including *B. indica* and *B. bicolor*, were reported as causal agent of the disease. The basis of identification, was morphological characteristics such as color of the colonies, shape, color and size of conidia and conidiophores, the process of conidium formation and pattern of conidium germination. *B. victoricae* was the most abundant species in Guilan, and *B. oryzae*, *B. bicolor* and *B. indica* were the subsequent species, respectively. Pathogenicity test on these four species was applied on seedlings of rice in dessicator, which revealed the pathogenicity of the species and their ability to cause brown spot on rice. 180 isolates of 342 isolates were studied by PCR-RFLP. In order to do PCR-RFLP, two groups of primers and three restriction enzyme were applied. At first, the DNA of all isolates was isolated, and was amplified in thermocycler. Cluster analysis using UPGMA method gaved four DNA fingerprinting groups in relation to *B. victoricae*, *B. oryzae*, *B. bicolor* and *B. indica* with the abundance of 85%, 10%, 3% and 2%, respectively. Levels of polymorphism was observed between DNA of different isolates as this polymorphism was observed either between or within species. The pattern of DNA bands couldn't show the direct correlation between polymorphism and climates or geographical areas. Therefore, application PCR-RFLP is useful for identification of the fungi at the species level and can provide good results for further studies including introduction of resistant varieties.

Key words: Rice-Brown Spot-Bipolaris-Genetic Variation-PCR-RFLP

مقدمه

بیماری لکه قهوه‌ای، از مهمترین بیماری‌های قارچی برنج است که در کلیه مراحل رشد گیاه از خزانه تا مزرعه، محصول را مورد حمله قرار می‌دهد (۱۱). قارچ‌های عامل بیماری تمامی اندام‌های هوایی گیاه از جمله برگ، خوشه، سنبل و سنبلچه را مورد حمله قرار می‌دهند، ریشه‌های جوان و ساقه‌ها نیز به ندرت ممکن است آلوده شوند که مهمترین علائم ایجادشده، لکه‌های قهوه‌ای رنگ، گرد تا بیضوی، گاهی کشیده باهاله زردرنگ است (۲۸). آلودگی صددرد، سوختگی نشاها و نیز پوک شدن دانه‌ها از علائم بارز بیماری است (۱۰). عامل این بیماری ابتدا توسط Bredade Haan و *Helminthosporium oryzae* نامیده شد (۱۸). امروزه گونه‌های گرامینه‌ای *Helminthosporium* به سه جنس به اسامی *Drechslera*, *Bipolaris*, *Exserohilum* براساس صفات مورفولوژیکی مثل ویژگی‌های ظاهری کلنی، کنیدیوم، کنیدیوفور، چگونگی هیلوم و طریقه جوانه‌زنی کنیدیوم، تفکیک گردیده اند (۳۰). این فرم‌های غیرجنسی با سه فرم جنسی از رده آسکومیست‌ها در ارتباط هستند که بترتیب عبارتند از: *Pyrenophora*, *Cochliobolus*, *Setosphaeria* (۲۲). از روش‌های پیشرفته مولکولی مبتنی بر DNA برای شناسایی عوامل مختلف بیماریزای گیاهی استفاده گردیده است (۱۹). از جمله این روش‌ها، PCR^۱ (واکنش زنجیره ای پلیمرز) و RFLP^۲ (چند شکل طولی رشته‌های برش یافته) است (۱۲). یکی از انواع واکنش PCR، PCR^۳-RAPD می باشد که برای انجام آن نیازی به اطلاعات اولیه در مورد توالی نوکلئوتیدی قطعه DNA هدف نیست (۲۰). از روش RAPD-PCR برای تشخیص قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری لکه چشمی گندم (۲۶)، *Microdochium nivale* و تعداد دیگری از قارچ‌های بیماریزای

گیاهی استفاده شده است (۲۹). جدایه‌هایی از *B. sorokiniana* در گیاه گندم جهت تعیین میزان تغییر پذیری ژنتیکی درون گونه ای به وسیله روش RAPD مورد بررسی قرار گرفتند و براین اساس سطح بالایی از تغییر پذیری ژنتیکی میان جدایه‌ها وجود داشت (۲۷). تنوع ژنتیکی میان بعضی از پاتوژن‌های ایجاد کننده بیماری‌های هلمینتوسپوریومی ذرت، برنج و گندم به وسیله دو روش PCR^۴-RFLP و PCR^۵-RFLP مورد ارزیابی قرار گرفته و سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در درون گونه‌ها و نیز بین گونه‌های مختلف مشاهده گردید (۳۴). همچنین از روش دیگری به نام PCR^۶-RFLP برای شناسایی قارچ‌های بیماری‌زا استفاده شده است که در این روش فرآورده‌های واکنش PCR توسط آنزیم‌های برشی، برش یافته و سپس قطعات حاصل روی ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار می‌گیرند (۳۲). از این روش برای شناسایی اختصاصی قارچ *Gaeumannomyces graminis* عامل بیماری پاخوره غلات و نیز تعیین اختلاف جدایه‌هایی از قارچ *Ampelomyces* هیپریپارازیت سفیدک‌های سطحی استفاده شده است (۳۳). در ایران بیماری لکه قهوه‌ای، اولین بار در سال ۱۳۳۵ از مزارع برنج سواحل دریای خزر گزارش گردید (۱). پس از آن مطالعاتی توسط محققین دیگر برای شناسایی مورفولوژیکی جنس‌ها و گونه‌های قارچ و تاثیر بیماری روی رشد گیاهچه برنج، و واکنش برخی از ارقام برنج نسبت به آن انجام شد (۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹). از آنجائی که اسپوره‌های قارچ‌های عامل این بیماری از تنوع شکل، رنگ و اندازه زیادی برخوردار بوده به طوریکه گاهی میزان تنوع خصوصیات مورفولوژیکی همچون ابعاد کنیدیوم و کنیدیوفور که اساس تقسیم‌های تاکسونومیکی بر پایه مورفولوژی این صفات استوار است، حتی در داخل یک گونه بسیار چشمگیر است و نیز با توجه به این نکته که بیماری لکه

و رنگ کنیدیوم و محل خروج لوله‌های تندشی در زمان جوانه زنی کنیدیوم مطالعه شدند.

آزمایش بیماری‌زایی

آزمایش بیماری‌زایی در محیط دسیکاتور انجام گرفت و از هر گونه پنج جدایه به عنوان نماینده بررسی شد. برای این منظور ابتدا مقداری از بذور برنج پس از استریل شدن در اتوکلاو در ماسه سترون در تشتک‌های پتری قرار داده شدند (در دودسیکاتور، یکی به عنوان شاهد و دیگری به عنوان تیمار)، پس از اضافه کردن آب مقطر سترون به هر یک از تشتک‌ها و قرار دادن دسیکاتورها با درب بسته در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتیگراد، پس از ۱۸-۱۶ روز که نشاهای داخل دسیکاتور به مرحله دو برگی رسیدند مایه زنی با استفاده از سوسپانسیون اسپوری به میزان $10^4 \times 4$ اسپور در میلی لیتر آب مقطر به همراه توئین - ۲۰ به میزان ۱٪ برای افزایش جذب سطحی انجام شد.

ارزیابی‌های مولکولی

تهیه میسلیم

برای این منظور ابتدا میسلیم قارچ تأمین گردید که این کار با استفاده از کشت کاغذ صافی حاوی کلنی قارچ روی محیط کشت PDA، انتقال دیسک‌هایی از کلنی رشد کرده قارچ به محیط کشت مایع (حاوی عصاره ۲۰۰ گرم سیب زمینی، ۱۷ گرم سوکروز و آب مقطر) انجام گرفت. ارلن‌های حاوی محیط کشت مایع به شیکر (با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه) انتقال یافته و پس از حدود یک هفته، میسلیم‌های قارچ به دست آمدند، پس از آن حذف آب از این میسلیم‌ها انجام شد. برای اینکار از ابزار و وسایلی همچون پمپ خلأ، ارلن با لوله جانبی، قیف بوختر و کاغذ صافی استفاده گردید. بدین ترتیب که ابتدا قیف بوختر بر روی ارلن قرار داده شد، سپس سطح قیف بوختر با الکل ۹۶ درجه ضدعفونی گردید و یک کاغذ صافی استریل بر روی سطح این قیف قرار گرفت. لوله‌ای از پمپ خلأ به ارلن اتصال یافت، پس از روشن کردن پمپ، قطعات میسلیم رشد کرده در محیط کشت مایع در ارلن، با استفاده از پنس استریل به سطح کاغذ صافی واقع در روی قیف بوختر انتقال یافتند. پمپ خلأ به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه روشن بود و باعث حذف آب از میسلیم‌ها و جمع شدن آن در ارلن خلأ گردید. همچنین برای حذف کامل آب از میسلیم‌ها، عمل آبیگری مجدد با قرار دادن میسلیم‌های بدست آمده در لابلای کاغذ صافی‌های استریل انجام گرفت.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از روش Rapid mini-preparation of fungal DNA استفاده گردید (۲۱). برای این منظور ابتدا حدود ۳۰۰ میلی‌گرم از میسلیم‌های موجود با ترازوی حساس توزین گردید. سپس میسلیم‌های وزن‌شده در داخل‌هاون‌های چینی قرار داده شده و با استفاده از ازت مایع و کوبیدن با دسته‌هاون، کاملاً به صورت پودر درآمدند و با استفاده از کاردک، این پودر به داخل تیوب‌های ۱/۵ ml انتقال داده شدند و بر روی درب هریک از این تیوب‌ها، شماره جدایه مورد نظر نوشته شد. لازم به ذکر است که پس از قراردادن پودر میسلیم در تیوب‌ها، این تیوب‌ها بلافاصله به فریزر با دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انتقال

قهوه‌ای برنج در سال‌های اخیر به ویژه در مراحل نشاکاری و خوشه دهی، خسارت زیادی به محصول برنج در استان گیلان وارد نموده، انجام تحقیق مزبور ضروری گردید که اهداف آن شامل بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین چهارگونه از قارچ Bipolaris براساس روش PCR-RFLP بود که این بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای و همچنین تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها را در برمی گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

نمونه‌برداری از خرانه‌ها و مزارع آلوده در سه مرحله نشاء، برگ و خوشه برنج انجام گرفت. برای نمونه‌برداری از روش Zia و همکاران (۳۵) استفاده گردید. بدین معنی که در هر مزرعه از منطقه برنجکاری ۵ نمونه برگ یا خوشه آلوده بطور تصادفی به ازای هر ۵۰ متر فاصله انتخاب گردیدند. هر شهرستان استان گیلان به عنوان یک منطقه محسوب شده و در هر منطقه با توجه به وسعت ۶-۲ مزرعه انتخاب شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده از اندام‌های آلوده گیاهی، به طور جداگانه در کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شدند و با چسباندن برچسب روی کیسه‌ها، محل و تاریخ جمع‌آوری آنها مشخص گردید. سپس به آزمایشگاه انتقال یافته و در یخچال در دمای ۴-۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس عملیات آزمایشگاهی در روز بعد با استفاده از این نمونه‌ها انجام شد.

جداسازی، خالص سازی و نگهداری جدایه‌های قارچی

جداسازی قطعات آلوده از برگ و خوشه انجام گرفت، بدین معنی که پس از جداسازی قطعات از حد فاصل بین بافت آلوده و سالم در برگ و نیز بذره‌های آلوده در خوشه، ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۰/۰۵٪ و شستشو با آب مقطر انجام شد و پس از آبیگری قطعات جدا شده روی محیط کشت، کشت داده شدند. برای این کار از محیط‌های کشت مختلفی شامل PDA^۵ (سیب زمینی، دکستروز، آگار)، WA^۶ (آب - آگار)، TWA^۷ + Wheat straw (آب معمولی آگار + کاه استریل گندم) به ترتیب برای جداسازی و رشد کلنی قارچ، خالص سازی و تک اسپور کردن و شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های قارچی استفاده گردید (۳۰). برای نگهداری جدایه‌های قارچی، پس از رشد کلنی قارچ روی محیط کشت PDA در تشتک‌های پتری، کاغذ صافی استریل روی این محیط قرار داده شد و پس از انتقال به انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتیگراد و گذشت ۵-۴ روز و رشد کلنی قارچ روی سطح کاغذ صافی، کاغذ صافی از محیط کشت جدا و به قطعات کوچکی تقسیم گردید و به شیشه‌های استریل و سپس به فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافت.

شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های قارچی

برای شناسایی مورفولوژیکی، پس از کشت قطعاتی از کلنی قارچ روی محیط کشت TWA + Wheat straw و انتقال تشتک‌های پتری به انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲ تا ۳ هفته (بسته به نوع جدایه)، اسلایدهای میکروسکوپی با استفاده از اسیدلاکتیک ۲۵٪ از اسپورهای تولید شده تهیه و با استفاده از میکروسکوپ Olympus CH-۲ مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور ویژگی‌هایی چون رنگ و شکل کلنی، نحوه رشد میسلیم‌ها، رنگ و ابعاد کنیدیوفور، طول، عرض، تعداد دیواره عرضی

جدول ۱- دسته اول از آغازگرهای تصادفی به کار رفته در مطالعه جدایه‌های قارچ *Bipolaris spp.*

آغازگر	ردیف نوکلئوتیدی ۵' - ۳'	غلظت (OD)
A-۱	CCCAAGGTCC	۱۵ u/ml
A-۲	GGTGCGGGAA	۱۳ u/ml
A-۶	GAGTCTCAGG	۹ u/ml
A-۸	ACGCACAACC	۱۴ u/ml
B-۶	GTGACATGCC	۱۱ u/ml
B-۷	AGATGCAGCC	۱۰/۵ u/ml
OPC۱۳	AAGCCTCGTC	۱۳ u/ml

جدول ۲- دسته دوم از آغازگرهای تصادفی به کار رفته در مطالعه جدایه‌های قارچ *Bipolaris spp.*

کد	نوالی نوکلئوتیدی ۵' - ۳'	غلظت
A	GGT-CTC-CTA-G	۱۰ u/ml
B	CGG-AGA-GCG-A	۱۴ u/ml
C	CCG-GCA-TAG-A	۱۲ u/ml
D	TGG-GCT-CGC-T	۱۴ u/ml
E	ACT-TGT-GCG-G	۱۸ u/ml
F	CCC-ACT-GAC-G	۱۴ u/ml
G	CTG-AGG-AGT-G	۱۶ u/ml
H	GGT-CAA-CCC-T	۱۸ u/ml
I	GCG-GGA-GAC-C	۱۲ u/ml
J	CCT-CAC-CTG-T	۱۴ u/ml

جدول ۳- خصوصیات مواد مصرف شده برای هر واکنش RAPD-PCR

نوع ماده	میزان مصرف
dd water	۱۵/۶۵ μ l
۱۰ X PCR buffer	۲/۵ μ l
dNTPs	۱ μ l
MgCl ₂	۱ μ l
BSA (بویین سرم آلبومین)	۰/۴ μ l
Primer	۱/۲۵ μ l
Taq DNA Polymerase	۰/۳ μ l
DNA template (قالب DNA)	۱ μ l
حجم نهایی ۲۵ μ l	

Arlequin 2.00 و Popgene 1.31 و NTSYS-pc 2.02 انجام شد.

۲- *B. indica*

۳- *B. indica*

۴- *B. bicolor*

نتیجه و بحث

شناسایی جدایه‌های قارچی بر اساس صفات مورفولوژیک

در مجموع از مزارع برنج نمونه برداری شده، ۶۰۰ جدایه به دست آمد که ۳۴۲ جدایه متعلق به جنس *Bipolaris* Shoemaker بودند. در مورد جدایه‌های متعلق به جنس *Bipolaris*، براساس صفات مورفولوژیکی همچون شکل ظاهری کلتی، مورفولوژی کنیدیوم‌ها و کنیدیوفور، فرآیند تشکیل کنیدیوم و نحوه جوانه زدن کنیدیوم‌ها، ۴ گروه مختلف تشخیص داده شدند که هر گروه معرف یک گونه خاص از جنس *Bipolaris* بود که عبارت بودند از ۱- گونه *B. oryzae* که حدود ۱۰٪ از جدایه‌های موجود را در بر گرفت. کنیدیوفورها به ابعاد $۷-۴ \times ۵۸۰-۴۳۰$ میکرومتر، کنیدیوم‌های آن خمیده، قلیقی تا دوکی شکل، زرد کم رنگ تا قهوه‌ای تیره به ابعاد $۲۶-۱۰ \times ۱۲۵-۱۲۵$ میکرومتر بوده، دارای ۱۲-۵ دیواره عرضی و هیلوم کنیدیوم کوچک، تیره یا روشن، اغلب بر آمده و به طور جزئی پاپیل دار بودند (۱۶، ۲۸، ۳۰) (شکل ۱ ضمیمه).

۲- گونه *B. victoriae* که حدود ۸۵٪ از جدایه‌ها را شامل گردید. کنیدیوفورها به ابعاد $۹-۳۴۰ \times ۵۰$ میکرومتر، کنیدیوم‌های آن دوکی یا دوکی وارونه، قهوه‌ای روشن تا تیره، به ابعاد $۲۴-۹ \times ۱۴۳-۳۲$ میکرومتر دارای ۱۳-۴ دیواره عرضی بوده، هیلوم کوچک ولی دارای برآمدگی یا پاپیل نبودند (۱۶، ۲۵، ۳۰) (شکل ۲ ضمیمه).

۳- گونه *B. indica* که حدود ۲٪ از جدایه‌ها را در بر گرفت. کنیدیوفورها به ابعاد $۱۰-۷ \times ۳۵۰-۲۶۰$ میکرومتر، کنیدیوم‌های آن راست، به میزان کم چمقایی تا بیضوی بوده، هیلوم در برخی کنیدیوم‌ها بر آمده ولی در تعدادی دیگر اینطور نبود. رنگ آن زیتونی کمرنگ تا تیره به ابعاد $۲۵-۱۲ \times ۶۹-۳۵$ میکرومتر، دارای ۸-۴ دیواره عرضی بودند (۳۰) (شکل ۳ ضمیمه). ۴- گونه *B. bicolor* که حدود ۳٪ از جدایه را در بر می گرفت. کنیدیوفور به ابعاد $۱۰-۵ \times ۴۰۰-۳۰۰$ میکرومتر، کنیدیوم‌های آن راست تا خمیده، استوانه‌ای و ترجیحاً در قسمت وسط وسیع‌تر و دارای ۸-۳ دیواره عرضی بوده، به ابعاد $۱۷-۹ \times ۵۹۰-۳۱$ میکرومتر، در بسیاری از حالات سلول‌های مرکزی کنیدیوم‌های بالغ اغلب قهوه‌ای تیره بوده، اما سلول‌های انتهایی شفاف یا خیلی رنگ پریده بودند. ابعاد هیلوم ۵-۳ میکرومتر بود (۳۰) (شکل ۴ ضمیمه). لازم به ذکر است که کنیدیوم‌های هر چهار گونه، از سلول‌های انتهایی جوانه می‌زدند.

آزمایش بیماری‌زایی

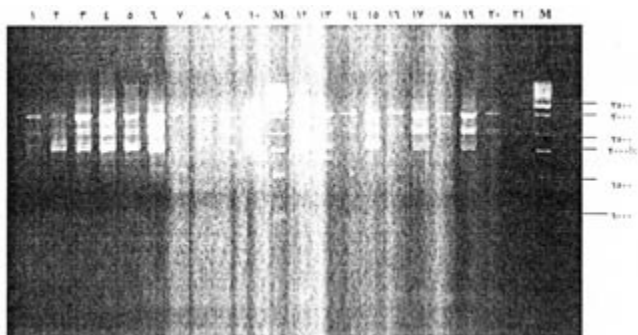
اولین علائم در مورد سه گونه *B. victoriae*، *B. oryzae* و *B. indica* ۴ روز و در مورد گونه *B. bicolor* ۲ روز پس از مایه زنی به صورت نقاط سر سنجاقی ظاهر شده که بتدریج به صورت لکه‌های قهوه‌ای، کشیده، بیضوی تا گرد، گاهی باهاله زرد در آمدند. در راستای انجام اصول کخ، قارچ‌های مایه زنی شده، مجدداً از گیاهان آلوده جدا و با پاتوژن اولیه مطابقت داده شدند. همچنین هفت روز پس از مایه زنی با ۴ گونه از قارچ مزبور، نتایج زیر حاصل گردید (جدول ۴). بدین ترتیب در زمینه مقایسه شدت بیماری‌زایی گونه‌های مایه زنی شده، تقسیم‌بندی زیر قابل ذکر است:

۱- *B. oryzae*

ارزیابی جدایه‌های چهار گونه از *Bipolaris* براساس روش PCR-RFLP

در این بررسی، تنوع ژنتیکی موجود بین جدایه‌های *B. oryzae*، *B. indica*، *B. victoriae* و *B. bicolor* با استفاده از دو دسته آغازگر تصادفی و ۳ آنزیم برشی به کمک روش PCR-RFLP مورد ارزیابی قرار گرفت. اساس کار بر مطالعه و آنالیز پلی مورفیسم DNA در جدایه‌های قارچی قرار داشت، از هفت آغازگر دسته اول، چهار آغازگر A۰۱، A۰۸، A۰۷ و B۰۶ و از ده آغازگر دسته دوم، دو آغازگر A و J، DNA اکثر جدایه‌های قارچی را تکثیر نمودند. همچنین از سه آنزیم برشی به کار رفته، آنزیم Hind III، باندهای برش یافته بیشتری را تولید کرد. بیشترین باند تولید شده در آغازگر A و کمترین آن در آغازگر B۰۶ بوده است، در حالی که بیشترین باندهای پلی مورفیک در آغازگر J و کمترین آن در دو آغازگر B۰۶ و A۰۸ مشاهده گردید (جدول ۵). پس از انجام عملیات الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲٪، سطوحی از پلی مورفیسم بین DNA جدایه‌های قارچی به کار رفته مشاهده گردید (شکل ۱). همچنین، تجزیه کلاستر با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc ۲،۰۲، انجام گرفت (شکل ۲).

براساس تجزیه کلاستر، پنج گروه یا دسته، قابل تشخیص بودند. در گروه اول و دوم، جدایه‌های گونه *B. oryzae*، در گروه سوم، جدایه گونه *B. indica*، در گروه چهارم، جدایه‌های گونه *B. victoriae* و در نهایت در گروه پنجم، جدایه گونه *B. bicolor* جای داشتند. جدایه‌های گونه



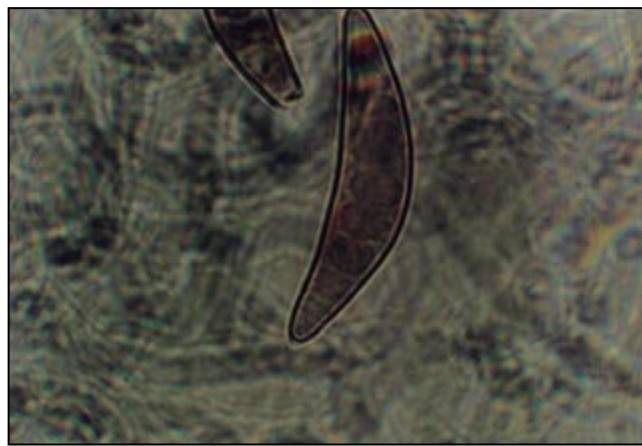
شکل ۱- الگوی باندهای حاصل در اثر به کارگیری آنزیم برشی Hind III روی فرآورده‌های PCR که با استفاده از آغازگر A تکثیر شده بودند.

باند ۱: Bi۲۱۳، باند ۲: Bi۲۱۱، باند ۳: Bi۲۰۸، باند ۴: Bi۱۶۷، باند ۵: Bi۶۲، باند ۶: Bi۱۵۸، باند ۷: Bi۱۳، باند ۸: Bi۱۷، باند ۹: Bi۴۹، باند ۱۰: Bi۵۶، باند ۱۱: ۱Kb (DNA Ladder marker)، باند ۱۲: Bi۲۲۰، باند ۱۳: Bi۲۱۹، باند ۱۴: Bi۲۱۵، باند ۱۵: Bi۲۲۲، باند ۱۶: Bi۲۱۲، باند ۱۷: Bi۱۷۷، باند ۱۸: Bi۲۳۸، باند ۱۹: Bi۱۵۹، باند ۲۰: Bi۲۸۰، باند ۲۱: Bi۲۵۷، باند ۲۲: ۲Kb DNA Ladder (marker). باندهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۱۸ متعلق به گونه *B. oryzae*، باندهای ۹ و ۱۰ به ترتیب متعلق به گونه‌های *B. indica* و *B. bicolor* و بقیه باندها متعلق به گونه *B. victoriae* هستند.

اعداد کنار ژل نشان دهنده تعداد جفت بازها در مارکر هستند.



شکل ۳- کنیدیوم قارچ *Bipolaris indica* با بزرگنمایی تقریبی ۴۶۰ برابر



شکل ۱- کنیدیوم قارچ *Bipolaris oryzae* با بزرگنمایی تقریبی ۴۶۰ برابر



شکل ۴- کنیدیوم و کنیدیوفر قارچ *Bipolaris bicolor* با بزرگنمایی تقریبی ۲۳۰ برابر



شکل ۲- کنیدیوم و کنیدیوفر قارچ *Bipolaris victoriae* با بزرگنمایی تقریبی ۲۳۰ برابر

این رو تجزیه واریانس مولکولی و FST یا شاخص تثبیت در سطح احتمال ۱٪ معنی دار است (از آنجائیکه تعداد جدایه‌های یافت شده متعلق به دو گونه *B. indica* و *B. bicolor* محدود بوده امکان ارزیابی بیشتری آنها وجود نداشت).

بدین ترتیب مشخص شد که درصد تنوع ژنتیکی درون جدایه‌های دو گونه از قارچ *Bipolaris* به استثنای لوکوس ۳ (آغازگر A۰۸)، از درصد تنوع ژنتیکی بین آنها، بیشتر بوده است (جدول ۶). FST در سه لوکوس اول، در سطح احتمال ۱٪ و در لوکوس چهارم و پنجم در سطح احتمال ۵٪ معنی دار بود ولی، در لوکوس ۶، معنی دار نبوده است. بیشترین درصد تنوع بین جدایه‌ها در لوکوس ۳ (آغازگر A۰۸) و کمترین درصد تنوع بین جدایه‌ها در لوکوس ۶ (آغازگر J) دیده شده است. بیشترین درصد تنوع درون جدایه‌ها، در لوکوس ۶ (آغازگر J) و کمترین درصد تنوع درون جدایه‌ها در لوکوس ۳ (آغازگر A۰۸)، مشاهده گردید. علت این مسأله که درصد تنوع درون جدایه‌های دو گونه از قارچ مزبور در آغازگر A۰۸ کمتر از

oryzae خود به دو گروه تقسیم شده و در گروه‌های ۱ و ۲ قرار داشتند. در این گروه بندی، ضریب تشابه جدایه‌های *B. oryzae*، ۷۹/۸٪، ضریب تشابه گونه *B. indica*، ۷۹/۵٪، ضریب تشابه جدایه‌های *B. victoriae*، ۸۵/۴٪ و ضریب تشابه گونه *B. bicolor*، ۷۵/۶٪ بود. علاوه بر آن جدایه‌های گونه *B. victoriae* خود با ضریب تشابه ۸۵/۴٪ به دو گروه دیگر تقسیم گردید. همچنین، گروه اول جدایه‌های گونه *B. oryzae*، با ضریب تشابه ۷۹/۸٪، خود در دو گروه جای گرفتند و این در حالی بود که گروه دوم از جدایه‌های این گونه، با ضریب تشابه حدود ۹۰٪، در دو گروه، تقسیم‌بندی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری بیشتری با دو نرم افزار Popgene ۱/۳۲ و Arlequin ۲/۱۰۰، بر اساس داده‌های مربوط به جدایه‌هایی از دو گونه از قارچ یعنی *B. victoriae* و *B. oryzae* انجام گرفت. بدین ترتیب مشخص شد که درصد تنوع ژنتیکی درون جدایه‌های دو گونه از قارچ *Bipolaris*، یعنی *B. oryzae* و *B. victoriae*، ۳۵/۶۵٪ بوده که بیشتر از درصد تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های این دو گونه از قارچ به میزان ۳۴/۶۵٪ است، از

جدول ۴- مقایسه کمی برگ های آلوده و سالم گیاه برنج پس از مایه زنی با ۴ گونه از قارچ *Bipolaris*

	گونه های قارچ			
	<i>B. oryzae</i>	<i>B. victoriae</i>	<i>B. indica</i>	<i>B. bicolor</i>
تعداد کل برگ	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
برگ های بیمار	۱۵	۱۳	۱۱	۱۰
برگ های مرده	۳	۲	۲	۱
برگ های سالم	۲	۵	۷	۹

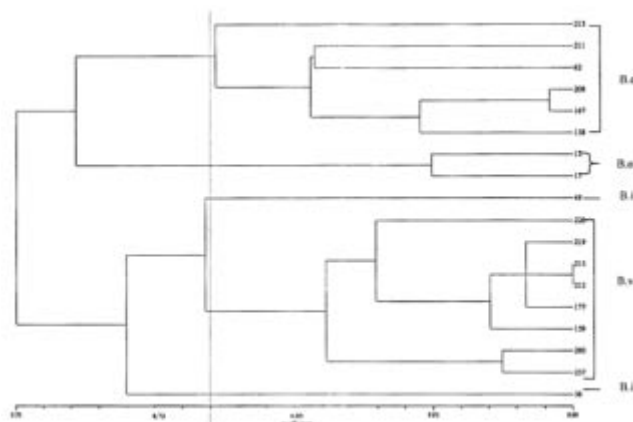
جدول ۵- ارتباط بین نوع آغازگر به کار رفته و مشخصات باندهای حاصل بر اساس PCR-RFLP

آغازگر	ردیف نوکلئوتیدی ۵' - ۳'	تعداد باندهای تولید شده	تعداد باندهای پلی مورفیک	دامنه باندهای تولید شده (بر حسب bp)
A۰۱	CCCAAGGTCC	۲۳	۲۲	۸۵۰-۳۵۰۰
A۰۸	ACGCACAACC	۱۵	۱۱	۸۰۰-۳۰۰۰
B۰۶	GTGACATGCC	۱۲	۱۱	۱۳۰۰-۳۰۰۰
B۰۷	AGATGCAGCC	۲۷	۲۰	۱۲۰۰-۳۱۰۰
A	GGTCTCCTAG	۳۳	۲۵	۶۰۰-۲۷۰۰
J	CCTCACCTGT	۳۰	۲۶	۱۰۰۰-۲۸۰۰

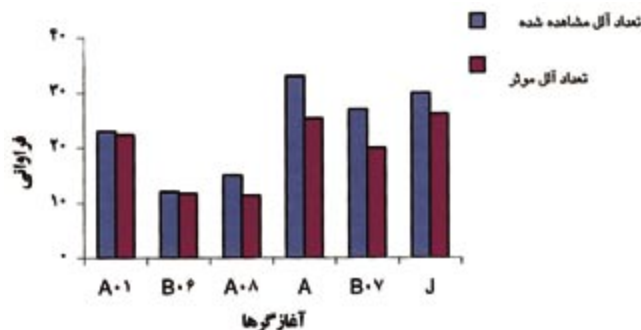
آغازگر J برای ارزیابی میزان پلی مورفیسم، در این قارچ مناسب تر است. مشخص گردید که بر اساس شاخص نی (۲۴)، جدایه‌های این دو گونه از *Bipolaris* ۸۰/۰۷٪ همانندی ژنتیکی و ۲۲/۲۳٪ فاصله ژنتیکی دارند. گونه‌های *Helminthosporium* روی گندمیان که امروزه تحت عنوان سه جنس *Bipolaris*، *Drechslera* و *Exserohilum* نامیده می‌شوند (۳۰)، از تنوع چشمگیری برخوردار است، این امر دقت و اعتبار اطلاعات ذخیره شده را کاهش داده و اهمیت توجه به مورفولوژی کنیدیوم و کنیدیوفور که اساس تاکسونومی مورفولوژیک بر آن استوار است را دو چندان می‌سازد، به ویژه با توجه به این نکات که مورفولوژی کنیدیوم و کنیدیوفور بسیار تحت تاثیر عوامل محیطی همچون، حرارت، رطوبت و pH محیط کشت قرار دارد، بطوریکه با افزایش میزان قند بیشتر از ۴٪ و ازت بیشتر از ۰/۲٪ طول، عرض و تعداد دیواره عرضی اغلب کنیدیها کاهش می‌یابد (۱۵، ۳۱). و نیز دامنه تنوع و تغییر صفات مورفولوژیکی حتی در داخل یک گونه بسیار زیاد بوده و این امر، کار محقق را در هنگام تفکیک به خصوص در سطح

درصد تنوع بین آنها بود، کمتر بودن تعداد آللهای مؤثر این آغازگر بوده است که نتوانسته تنوع درون جدایه‌های هر یک از دو گونه از قارچ را به خوبی آغازگرهای دیگر، مشخص نماید. میانگین تنوع ژنی برای جدایه‌های گونه *B. oryzae*، ۴/۴۲۸۵۷۱ ± ۲/۴۱۴۸۹ و برای جدایه‌های گونه *B. victoriae*، ۵۶۵۴۴۷/۰ ± ۳۶۸۱۸۳/۰ برآورد گردید (۱۷) که در نتیجه این میانگین در گروه اول بیشتر بود و تفاوت معنی داری وجود داشت. تعداد لوکوس‌های پلی مورفیک در جدایه‌های گونه *B. oryzae* ۴۰ لوکوس و درصد لوکوس‌های پلی مورفیک ۴۶/۵۱ درصد برآورد گردید. همچنین برای جدایه‌های گونه دوم یعنی *B. victoriae*، تعداد لوکوس‌های پلی مورفیک ۲۲ و درصد پلی مورفیک ۲۵/۵۸ درصد تعیین شد. بر پایه این اطلاعات مشخص گردید که بیشترین تعداد آلل مشاهده شده در آغازگر A بوده و بیشترین تعداد آلل مؤثر در آغازگر J قرار داشته است. کمترین آلل مشاهده شده در آغازگر B۰۶ و کمترین آلل مؤثر در آغازگر A۰۸ مشاهده گردید (شکل ۳)، از این رو در این روش

گونه‌ها دشوار می‌سازد، از این رو انجام تحقیقات مولکولی که می‌تواند مکمل روش‌های سنتی تشخیص باشد، ضروری به نظر می‌رسد. در مورد تنوع ژنتیکی گونه‌های *Bipolaris* تحقیقات زیادی در دنیا انجام نگرفته و در ایران نیز این اولین تحقیق در مورد تنوع قارچ مزبور است. در این تحقیق در مجموع چهار گروه انگشت نگاری DNA که معرف چهار گونه از *Bipolaris* بودند مشخص گردیدند. در میان این چهار گروه، گونه *B. victoriae* با دارا بودن ۸۵٪ از کل جدایه‌ها بزرگترین گروه را تشکیل داد و در تمامی مزارع برنج کاری گیلان و از ارقام غالب برنج همچون حسنی، هاشمی، علی کاظمی، خرز، سپید رود و حتی ارقام برنج هیبرید موسسه تحقیقات برنج کشور و نیز خوشه، برگ و نشا برنج جداسازی گردید. دومین گروه، گونه *B. oryzae* با ۱۰٪ فراوانی بود که از نظر منطقه انتشار، وسعت کمتری داشته و همچنین بیشتر از ارقام محلی همچون علی کاظمی و هاشمی جداسازی شدند و روی ارقام پر محصول مانند خرز و سپیدرود کمتر وجود داشته ولی از نظر منشا تفاوت چشمگیری با گروه قبل نداشته و از خوشه، برگ و نشا برنج جدا گردیدند. سومین گروه، گونه *B. bicolor* با ۳٪ فراوانی قرار داشت که از نظر منطقه انتشار، رقم نمونه و منشا محدود به منطقه امیربکنده و برگ رقم هاشمی بود. *B. indica* چهارمین گروه را با حدود ۲٪ فراوانی تشکیل داد که محدود به منطقه گلشن و خوشه رقم محلی نامعلومی بود. با استفاده از روش PCR-RFLP، امکان تفکیک و تمایز این چهار گونه از قارچ فراهم گردید و این گونه‌ها در گروه‌های مجزایی قرار گرفتند و درستی و انطباق مطالعات مولکولی و روش‌های مورفولوژیکی فراهم گردید. همچنین سطوحی از تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های دو گونه غالب یعنی *B. victoriae* و *B. oryzae* درون جدایه‌های هر یک از این دو گونه مشاهده گردید که درصد تنوع ژنتیکی درون جدایه‌ها بیشتر از در صد تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های این دو گونه بود. همچنین ارتباط معنی داری بین گونه قارچ و منطقه جغرافیایی یا شرایط آب و هوایی بدست نیامد، فقط برخی از جدایه‌های قارچی که میزان بالایی از تشابه ژنتیکی را نشان می‌دادند از نظر منشا نمونه از جمله خوشه یکسان بودند (شکل ۲). در این مطالعه میزان تنوع ژنتیکی درون جدایه‌های



شکل ۲- فنوگرام ایجاد شده براساس روش UPGMA برای ۲۰ جدایه از *Bipolaris*. عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج، به کمک تکنیک PCR-RFLP



شکل ۳- مقایسه آللهای مشاهده شده و مؤثر در ۶ آغازگر به کار رفته در PCR-RFLP برای جدایه‌هایی از دو گونه *Bipolaris*

جدول ۶- ارزیابی نتایج پلی مورفیسم در لوکوسها در درون و بین جدایه‌های دو گونه از قارچ *Bipolaris*.

لوکوس	بین جدایه‌های دو گونه			درون جدایه‌های هر گونه			FST
	درجه آزادی	Va	درصد تنوع	درجه آزادی	Vb	درصد تنوع	
آغازگر ۱ = A01	۱	۰/۲۳۲۱۴	۴۶/۴۲۸۵۷	۱۴	۰/۲۶۷۸۶	۵۳/۵۷۱۴۳	۰/۴۶۴۲۹**
آغازگر ۲ = B06	۱	۰/۱۹۶۴۳	۳۹/۲۸۵۷۱	۱۴	۰/۳۰۳۵۷	۶۰/۷۱۴۲۹	۰/۳۹۲۸۶**
آغازگر ۳ = A08	۱	۰/۳۴۸۲۱	۶۹/۶۴۲۸۴	۱۴	۰/۱۵۱۷۹	۳۰/۳۵۷۱۴	۰/۶۹۶۴۳**
آغازگر ۴ = A	۱	۰/۰۴۴۶۴	۸/۹۲۸۵۷	۱۴	۰/۴۵۵۲۶	۹۱/۰۷۱۴۳	۰/۰۸۹۲۹*
آغازگر ۵ = B07	۱	۰/۰۶۲۵۰	۱۲/۵۰	۱۴	۰/۴۳۷۵۰	۸۷/۵۰	۰/۱۲۵۰۰*
آغازگر ۶ = J	۱	۰/۰۰۸۹۳	۱/۷۸۵۷۱	۱۴	۰/۴۹۱۰۷	۹۸/۲۱۴۲۹	۰/۰۱۷۸۶ NS

جدول ۷ - شاخص‌های تنوع استاندارد و مولکولی برای جدایه‌های گونه *B. oryzae*.

تنوع ژنی	تعداد مکان‌های پلی‌مورفیک	تعداد لوکوس به کار رفته	تعداد لوکوس	هاپلو تیپ‌ها در نمونه	تعداد هاپلو تیپ‌ها	تعداد کپی‌های ژنی
۱/۰۰۰۰ ± ۰/۰۶۲۵	۵	۶ لوکوس با کمتر از ۵ درصد اطلاعات گمشده	۶	۸	۸	۸

جدول ۸ - شاخص‌های تنوع استاندارد و مولکولی برای جدایه‌های گونه *B. victoriae*.

تنوع ژنی	تعداد مکان‌های پلی‌مورفیک	تعداد لوکوس به کار رفته	تعداد لوکوس	هاپلو تیپ‌ها در نمونه	تعداد هاپلو تیپ‌ها	تعداد کپی‌های ژنی
۱/۰۰۰۰ ± ۰/۰۶۲۵	۶	۶ لوکوس با کمتر از ۵ درصد اطلاعات گمشده	۶	۸	۸	۸

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری مسؤولین محترم موسسه تحقیقات برنج کشور، معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، همچنین آقایان دکتر سید اکبر خداپرست استاد یار محترم دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان و مهندس عبادی عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات برنج، تشکر می‌نمایم.

پاورقی‌ها

- 1 - Polymerase Chain Reaction
- 2 - Restriction Fragment Length Polymorphism
- 3 - Random Amplified Polymorphic DNA
- 4 - PCR based RFLP
- 5 - Potato Dextrose Agar
- 6 - Water Agar
- 7 - Tap Water Agar+ Wheat straw
- 8 - Gene flow

منابع مورد استفاده

- ۱- بهداد، ا. ۱۳۶۲؛ بیماری‌های گیاهان زراعی ایران. چاپخانه نشاط اصفهان. ۴۴۲ صفحه.
- ۲- 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، کرج. ۵ - ۱ شهریور. صفحه ۸۴.
- ۳- پاداشت، ف. و ایزدی‌ار، م. ۱۳۷۷؛ بررسی بیماری لکه قهوه‌ای برنج در گیلان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج. ۵ - ۱ شهریور. صفحه ۸۳.

گونه *B. oryzae* در مقایسه با میزان تنوع درون جدایه‌های گونه *B. victoriae* بیشتر بود. مطالعات انجام شده (۳۴) نشان داد که گونه‌های *Drechslera*، *Bipolaris* و *Exserohilum* از نظر ژنتیکی از یکدیگر متمایزند. در یک تحقیق دیگر سطوحی از تنوع ژنتیکی در درون جدایه‌هایی از گونه *B. sorokiniana* در گیاه گندم مشاهده گردید، به طوری که تعداد رشته‌های پلی‌مورفیک حتی برای یک جدایه وقتی از رقم‌های متفاوت گندم به دست آمدند، متغیر بود. یکی از دلایل تنوع ژنتیکی کمتر در بین جدایه‌ها در مقایسه با تنوع درون آنها، احتمالاً می‌تواند ناشی از همپوشانی زیاد جدایه‌های قارچی باشد که در نتیجه پدیده جریان ژن^۸ حاصل شده است. به نظر می‌رسد که در نتیجه کاشت مداوم محصول برنج و آلودگی آن توسط گونه‌های مختلف *Bipolaris* برخی از جدایه‌های قارچی با یکدیگر اختلاط یافته و در نتیجه جمعیت‌هایی با مخلوطی از ژنوتیپ‌های متفاوت را به وجود آورده‌اند. بر طبق نظر بوردن و سیلک (۱۳) قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، اغلب در نتیجه موتاسیون و نوترکیبی به صورت منبع عمده‌ای از تنوع ژنتیکی عمل می‌نمایند. در داخل یک گونه جریان ژنی بین جدایه‌ها، تکمیل کننده این مراحل بوده که به صورت پروپاگول‌هایی از یک منطقه اپیدمی به منطقه دیگر گسترش یافته و از بخشی به بخش دیگر می‌روند. جریان ژن همراه با نیروهای تکاملی دیگر، می‌توانند منجر به گسترش ژن‌های منفرد، ژنوتیپ‌ها و حتی استقرار جمعیت‌های مختلف در مناطق متفاوت گردند (۲۳). بر پایه تنوع ژنتیکی بالایی که درون گونه‌ها وجود داشته، پیشنهاد می‌گردد که جریان ژنی قابل توجهی بین جدایه‌های درون گونه‌های وجود دارد. اما جدایه‌های بیشتر و از مناطق جغرافیایی متفاوت به همراه تعداد بیشتری از آغازگرها، بایستی آزمایش گردند تا این فرضیه، تأیید گردد. در هر صورت نتایج این تحقیق، نشان‌دهنده اهمیت روش‌های مولکولی در شناسایی دقیق قارچ‌های بیماری‌زا و طبقه‌بندی آنها است، به ویژه با توجه به این نکته که از این یافته می‌توانیم در تولید ارقام مقاوم به قارچ استفاده نماییم.

- Press. San Diego. 482 pp.
- 21-Liu, D., Coloe, S., Baird, R., and Pedersen, J. 2000; Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.35 :471.
- 22-Luttrell, E. S. 1977; Correlation between conidial and ascigerous state characters in *Pyrenophora*, *Cochliobolus* and *Setosphaeria*. *Rev. Mycol.* 41: 271-79.
- 23-McDermott, J. M. and McDonald, B. A. 1993; Gene flow in plant pathosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 353-373.
- 24 -Nei, M. 1978; Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89:583-590.
- 25 -Nelson, R.R. and Kline, D.M. 1961; The pathogenicity of certain species of *Helminthosporium* to species of the graminea. *Plant Disease Reporter*, 45: 644-648.
- 26-Nicholson, P., and Parry, D. W. 1996; Development and use of a PCR assay to detect *Rhizoctonia cerealis*, the cause of sharp eye spot in wheat. *Plant Pathology*, 45: 872 883.
- 27-Oliveira, A. M. R., Matsumura, A. T. S., Prestes, A. M., and Van Der Sane, S. T. 2002; Intraspecific variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates determined by random-amplified polymorphic DNA (RAPD). *Genetics and Molecular Research*, 1(4): 350-358.
- 28-Ou, S. H. 1985; Rice diseases. Commonwealth Mycological Institute. 2nd ed. 380 pp.
- 29-Parry, D. W., and Nicholson, P. 1996; Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology*, 45: 383-391.
- 30-Sivanesan, A. 1987; Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their telemorphs. CAB International Mycological Institute. 261 pp.
- 31-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.
- 32-Ward, E. 1995; Improved polymerase chain reaction (PCR) detection of *Gaeumannomyces graminis* including a safeguard against false negatives. *European Journal of Plant Pathology*, 101: 561-566.
- 33-Ward, E., and Akrofi, A. Y. 1994; Identification of fungi in the *Gaeumannomyces - Phialophora* complex by RFLPs of PCR-amplified ribosomal DNAs. *Mycol. Res.* 98: 219-224.
- 34-Weikert-Oliveira, R.C.B., Resende, M. A., Valerio, H. M., Caligorne, R.B., and Pavia, E. 2002; Genetic variation among pathogens causing *Helminthosporium* diseases of rice, maize and wheat. *Fitopatologia Brasileira*, 27(6): 238-246.
- 35-Xia, J. Q., Correl, J. C., Lee, F. N., Marchetti, M. A., and Rhoads, D. D. 1993; DNA fingerprinting to examine microgeographic variation in the *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*) population in two rice fields in Arkansas. *Phytopathology*, 83: 1029-1035.
- ۴- 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.
- ۵- خسروی، و ۱۳۷۸؛ بررسی مهمترین بیماری‌های قارچی بذرزاد برنج در ارقام غالب منطقه مازنداران. پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. ۱۰۲ صفحه.
- ۶- ذاکری، ز. ۱۳۶۶؛ بررسی علل غیر طبیعی بودن و تغییر شکل (آنومالی) گیاهچه‌های برنج در اثر قارچ‌های بذرزاد. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد ۲۳. شماره (۴ - ۱): ۲۷ - ۱۹.
- ۷- رضوی، س. ا. ۱۳۷۲؛ مطالعه پراکندگی، خواص فنوتیپی، تاکسونومی و بیماری‌زایی جداساده‌های مختلف شبه جنس *Helminthosporium* و شبه جنسهای وابسته به آن از گیاه برنج در استانهای فارس، کهگیلویه و بویراحمد. پایان نامه فوق لیسانس در رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز. ۱۳۰ صفحه.
- ۸- صفری مطلق، م. ر. ۱۳۷۹؛ اتیولوژی بیماری لکه قهوه‌ای برنج در گیلان. پایان نامه فوق لیسانس در رشته بیماری‌شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. ۹۴ صفحه.
- ۹- فروتن، و. و بامدادیان، ط. ۱۳۷۲؛ خلاصه مقالات اولین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشگاه تهران دانشکده کشاورزی. ۲۳۶ صفحه.
- 10-Aluko, M. O. 1975; Crop loss caused by brown leaf spot disease of rice in Nigeria. *Plant Disease Report*, 59: 609-613.
- 11-Bhattachary, D. and Mukhopudhyay, N.K. 1986; Surface adherence and penetraability of mycobacillin as affected by adjuvants. *Indian Phytopathology*. 39(3): 390-394.
- 12-Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., and Davis, R. W. 1980; Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- 13-Burdon, J. J. and Silk, J. 1997; Source and patterns of diversity in plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, 87: 664-669.
- 14-Davis, L., Kuehle, M., and Battey, J. 1994; Basic methods in molecular biology. 2nd ed. 777 pp.
- 15 -Elliot, E. S. 1949; The effect of the sugar concentration on conidial size of some species of *Helminthosporium*. *Phytopathology*, 39: 935-958.
- 16-Ellis, M. B. 1971; Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew, England, 608 pp.
- 17-Excoffier, L. and Slatking, M. 1995; Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol. Biol. Evol.* 12: 921-927.
- 18-Gangopadhyay, S., and Padmanabhan, S. Y. 1987; Breeding for disease resistance in rice. Oxford & IHB Publishing Co. Calcutta. 340 pp.
- 19-Henson, J. M., and French, R. 1993; The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31: 81-109.
- 20-Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. 1989; PCR protocols: a Guide to Methods and Applications, Academic