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 دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۲، شماره ۱، ۱۳۹۰ (۱۹۰-۱۷۹)

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های *Magnaporthe grisea* به دست آمده از تعدادی علف هرز تیره Poaceae روی گیاه برنج و تعیین نژاد جدایه‌های بیماری‌زا

وحید زرین‌نیا[۱]*، محمد جوان نیکخواه[۲]، حمیدرضا زمانی‌زاده[۳]، رحیم مهرابی[۴] و وحید خسروی[۵]
۱، ۳، دانشجوی سابق دکتری و دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ۲، دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ۴، استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، بخش پاتولوژی غلات، کرج، ۵، مربی پژوهش مؤسسه تحقیقات برنج کشور، مازندران
(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۱۸ - تاریخ تصویب: ۸۸/۹/۹)

چکیده

سی و هفت جدایه *Magnaporthe grisea* جمع‌آوری شده از میزبان‌های مختلف از تیره Poaceae شامل پنجه کلاغی (*Digitaria singuinalis*)، چسبک (*Setaria italica*) و سوروف (*Echinochloa* sp.) به منظور تعیین بیماری‌زایی آنها روی برنج آزمایش شدند. برای این منظور از دو رقم حساس محلی به نام‌های طارم و بینام استفاده گردید. خصوصیات بیماری‌زایی جدایه‌های مذکور روی گیاهچه‌های این دو رقم در مرحله ۴ و ۵ برگی بررسی شد. برای این منظور غلظت زاد مایه به میزان 5×10^4 اسپور در میلی‌لیتر به وسیله لام هماسیتومتر تعیین و اسپورپاشی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد در حجمی معادل ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مورد نظر که با Tween 20 به نسبت یک درصد مخلوط شده بود، انجام گرفت. همچنین برای اسپورپاشی به ازای هر جدایه ۶۰ گیاهچه از هر کدام از ارقام ذکر شده استفاده گردید. اولین ارزیابی علایم ۱۰ روز پس از تلقیح انجام شد و دو ارزیابی دیگر نیز با فواصل ۵ روز جهت جلوگیری از خطا در یادداشت‌برداری از علایم انجام گرفت. ارقام مورد بررسی یا در مقابل جدایه‌های قارچ *M. grisea* مقاوم بودند و یا لکه‌هایی با تعداد و شدت خسارت کمتر نسبت به شاهد مثبت که یک جدایه بیماری‌زا روی برنج بود، ایجاد نمودند. پس از تعیین جدایه‌هایی که علایم تیپ حساس تا نیمه حساس را در میزبان مورد بررسی بروز دادند، تعداد ۵ جدایه از بین آنها به وسیله هشت رقم افتراقی استاندارد بین‌المللی و ۵ لاین near- isogenic تعیین نژاد شدند. بر اساس واکنش هشت رقم افتراقی استاندارد بین‌المللی و۵ لاین near- isogenic در مقابل جدایه‌های مذکور، به ترتیب ۴ نژاد به نام‌های IA-17, IA-127, IA-27, IB-58 از دو گروه نژادی IA و IB و چهار نژاد تحت عنوان A، B، C، D شناسایی گردید.

واژه‌های کلیدی: ارقام افتراقی، ارقام حساس، Poaceae، *Magnaporthe grisea*، نژاد بیماری‌زا.

* نویسنده مسئول: وحید زرین‌نیا تلفن: ۰۹۱۲-۴۳۹۷۳۶۰ E-mail: zarrinnia@srbiau.ac.ir

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

مقدمه

بیماری بلاست به عنوان یکی از مهمترین بیماریهای برنج در سراسر جهان است. این بیماری در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۳۰ در لاهیجان مشاهده شد و بتدریج از دیگر نقاط کشور مانند: میانه، لنجانات، اصفهان، قصر شیرین، گیلان ومازندران گزارش گردید (Behdad, 1990). در مورد خسارت حاصل از این بیماری در ایران اطلاعات دقیقی وجود ندارد و تنها گزارش در این ارتباط خسارت این بیماری در رودسر است که میزان آن در سال ۱۳۵۵ حدود ۲۰ درصد بر آورد شده است (Behdad, 1990). عامل ایجادکننده این بیماری یک قارچ آسکومیستی از خانواده Magnaporthaceae به نام *Magnaporthe grisea* (Herbert) Yaegashi and Udagawa (anamorph *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.) است. اگرچه Couch & Kohn (2002) با بررسی توالی‌های ژنی مربوط به نواحی اکتین، بتا توبولین و کالمودلین مشخص کردند که گونه *M. oryzae* به عنوان یک گونه جدید و مجزا از گونه *M. grisea* است و بر اساس آن گونه *M. grisea* نامی متعلق به جدایه‌های به دست آمده از میزبان پنجه کلاغی[1] (*Digitaria sp.*) و گونه *M. oryzae* به عنوان یک گونه جدید و مربوط به جدایه‌های به دست آمده از میزبان برنج و سایر گراس‌ها است. همچنین مطالعات بیانگر این مطلب است که این دو گونه قادر به آمیزش با یکدیگر نیز نمی‌باشند. این عامل بیماری‌زا همچنین روی تمام قسمت‌های هوایی بوته (بندرت غلاف برگ) شامل یقه برگ، ساقه و گره‌های ساقه و اغلب در گره گردن خوشه خسارت وارد می‌نماید. آلودگی گردن خوشه یا بلاست گردن در مناطقی که این بیماری وجود دارد مخرب‌ترین خسارت روی برنج است (Behdad, 1990). مشخصات زخم‌ها روی پهنک برگ بر حسب محیط و مقاومت میزبان متفاوت می‌باشد. زخم‌ها در ابتدا اغلب سفیدفام تا خاکستری با حاشیه‌های نکروز هستند. شکل آنها متغیر بوده اما به طور مشخص لوزی شکل می‌باشند. اگرچه در ایران تاکنون گزارشی از خسارت این عامل بیمارگر روی سایر گراس‌ها وجود ندارد اما علاوه بر برنج، این عامل بیمارگر به عنوان یک عامل بیماری‌زا روی ۵۰ جنس از خانواده غلات شناخته شده است (Harmon *et al.*, 2000). تا قبل از سال ۱۹۷۱ این عامل بیمارگر تنها روی گیاه *Stenotaphrum secundatum* (Walter) Kuntz به عنوان یک گیاه گرما دوست که در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری رشد می‌کند، گزارش شد (Malca & Owen, 1957)، و دومین گزارش نیز در سال ۱۹۷۱ هنگام وقوع یک اپیدمی خطرناک از این عامل بیمارگر روی گیاه چچم پرگل[2] (*Lolium multiflorum* Lam.) در مراتع ایالت می‌میلی‌لیترپی در آمریکا صورت پذیرفت (Ashizawa *et al.*, 1999; Ahn & Ou, 1982). خسارت این عامل بیمارگر روی گیاه چچم دائمی[3] نیز اولین بار در سال ۱۹۹۱ از ایالت پنسیلوانیا در آمریکا و در تمام مناطقی که این محصول کاشته شده بود، گزارش شده است (Bain *et al.*, 1972; Dernoeden, 1996; Uddin *et al.*, 1999; Schumann & Jackson, 1999). از سویی دیگر، خسارت این بیماری روی گونه‌ای از گیاه فستوکا یا علف بره نی‌مانند[4] (*Festuca arundinacea* Schreb.) نیز اولین بار از آمریکا در سال ۱۹۹۶ زمانی که یک اپیدمی شدید از این بیماری در کارولینای شمالی اتفاق افتاد، گزارش گردید. اگرچه، قارچ *M. grisea* بیمارگری است باطیف میزبانی گسترده که ۵۰ جنس گیاهی در دامنه آن قرار می‌گیرد (Dernoeden, 1996)، اما با این وجود هرکدام از نژادهای قارچ مذکور دارای طیف میزبانی محدود بوده و صرفاً یک تا چند جنس را در بر می‌گیرند (Kang et al., 2000). علت محدود بودن طیف میزبانی این است که تعامل ژن‌های ناپرآزاری (*AVR*) عامل بیماری‌زا و مقاومت میزبانی (*R*) به عنوان یک فاکتور تعیین‌کننده در تعیین اختصاصیت میزبانی عامل بیمارگر عمل می‌کند. نمونه‌ای از این تعامل را می‌توان در میزبان علف عشق خمیده[5] (*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees) مشاهده کرد که پرآزاری جدایه قارچ *M. oryzae* در این

1. Finger grass

2. Annual rye grass
3. Perennial rye grass
4. Reed fescue
5. Love grass

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

میزبان به وسیله ژن *PWL2* کنترل می‌شود. از سویی دیگر ژن‌های *AVR* جدایه‌های قارچ *M. grisea* مربوط به میزبان‌های غیر از برنج به وسیله ژن‌های مقاومت در گیاه برنج شناخته می‌شود. لذا این فرایند امکان آلوده شدن برنج توسط جدایه‌های *M. grisea* به دست آمده از سایر میزبان‌ها را متوقف می‌کند (Sweigard *et al.*, 1995). Murakami *et al.* (2000) بر اساس تفاوت در بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *M. grisea* روی میزبان‌های مختلف آن را به چند تیپ بیماری‌زایی تقسیم کردند. این تیپ‌ها عبارتند از:

۱. *Oryza* pathotype: بیماری‌زا روی برنج (*Oryza sativa* L.)،
۲. *Setaria* pathotype: بیماری‌زا روی میزبان ارزنی ایتالیایی[1] (*Setaria italica* (L.) Beauv)
۳. *Panicum* pathotype: بیماری‌زا روی میزبان ارزن[2] (*Panicum miliaceum* L.)
۴. *Eleusine* pathotype بیماری‌زا روی میزبان چمن غاز[3] (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.)
۵. *Digitaria* pathotype: بیماری‌زا روی میزبان (*Digitaria singuinalis* (L.) Scope.)

این تقسیم‌بندی فقط براساس تفاوت در بیماری‌زایی جدایه‌ها روی میزبان‌های مختلف انجام گردید و اگر روش استانداردی برای مایه‌زنی و ارزیابی بیماری وجود داشته باشد، می‌توان از این خصوصیت در تقسیم‌بندی قارچ به فرم‌های اختصاصی نیز استفاده نمود. با توجه به اینکه تاکنون در ایران هیچ تحقیقی در مورد بررسی توان بیماری‌زایی جدایه‌های علف‌های هرز روی میزبان برنج انجام نگرفته است، لذا هدف این تحقیق بررسی توان بیماری‌زایی جدایه‌های به دست آمده از روی علف‌های هرز پنجه کلاغی، چسبک و سوروف و همچنین گزارش در مورد حضور مقاومت غیر میزبانی در برنج و در مقابل بعضی از جدایه‌های به دست آمده از روی علف‌های هرز می‌باشد.

1. Italian millet
2. Common millet
3. Crab grass

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچ *M. grisea*

جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران فراهم گردید که هم اکنون نیز در این کلکسیون موجود است. این جدایه‌ها برای نگهداری طولانی مدت روی کاغذ صافی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند (جدول ۱).

آماده‌سازی نشاءهای برنج

به منظور انجام آزمایش بیماری‌زایی از دو رقم حساس برنج به نام‌های طارم و بینام استفاده گردید. برای کشت ارقام مذکور ابتدا بذور بمدت ۲۴ ساعت داخل آب قرار گرفتند و خیسانده شدند و سپس به وسیله هیپوکلریت سدیم رقیق شده (با ۱٪ کلر فعال) برای مدت ۱ ساعت ضدعفونی و سپس با آب مقطر استریل ۴ بار شستشو گردیدند. در مرحله بعد، بذور برای مدت ۲۴ ساعت دوباره خیسانده شد و سپس به درون تشتک پتری که حاوی کاغذ صافی مرطوب بود، منتقل گردید. بذور سپس برای مدت ۴۸ ساعت در ژرمیناتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از گذشت این مدت بذوری که به خوبی جوانه زده بودند جدا و برای کاشت آماده گردیدند. جهت کشت ارقام برنج از گلدان‌های پلاستیکی با ابعاد ۱۰×۲۵×۳۵ استفاده شد. درون هر گلدان با خاکی که شامل ۵ قسمت خاک مزرعه، ۱ قسمت کود دامی کاملاً پوسیده و ۱ قسمت ماسه بود پر گردید. همچنین به ازاء هر یک کیلوگرم خاک یک گرم کود فسفات آمونیوم ($(NH4)_2PO_4$) و یا اوره به خاک اضافه گردید و به خوبی بهم زده شد. به منظور کاشت دو رقم مذکور ابتدا خاک گلدان‌ها ۲۴ ساعت قبل از اینکه درون آنها بذور برنج کاشته شود، مرطوب شدند. سپس درون هر گلدان پلاستیکی شیارهایی با فاصله ۲ سانتی‌متر و با عمق یک برابر و نیم بذر ایجاد گردید و به ازای هر شیار ۱۷ تا ۲۰ بذر کاشته شد. بین دورقم مذکور نیز شیارها به گونه‌ای ایجاد شدند که درون یک گلدان دو رقم با فاصله ۸ سانتی‌متری از هم کاشته شدند. بعد از کاشت بذور درون شیارها روی آنها با خاک نرم پوشانده و به آرامی آبیاری شد و سپس گلدان‌ها به درون گلخانه انتقال یافتند. ۲۵ تا ۳۰ روز

بعد که نشاها به مرحله ۴ تا ۵ برگی رسیدند هر گلدان از نظر تعداد نشا در هر ردیف بررسی شده و نشاهای ضعیف و رشد نکرده حذف گردید. در نهایت درون هر ردیف ۱۵ نشا و در کل ۶۰ نشا به ازای هر رقم باقی ماند. همچنین به گیاهچه‌های برنج در مرحله دو برگی به منظور رشد بهتر کود اوره به نسبت ۱ در هزار و به مقدار ۵۰ میلی‌لیتر به ازای هر گلدان اضافه گردید.

آماده‌سازی زاد مایه قارچ

جهت آماده‌سازی زاد مایه قارچ، در ابتدا جدایه‌های قارچی که روی کاغذ صافی نگهداری شده بودند از یخچال ۲۰- درجه سانتی‌گراد خارج و به محیط RBAS [(۲۰ گرم سبوس برنج (Rice Brain) + ۱۵ گرم آگار (Agar) + ۵ گرم سوکروز (Sucrose)] منتقل شدند (Javan-Nikkhah, 2002). بعد از گذشت ۱۰ تا ۱۵ روز زمانی که پرگنه‌های قارچی روی سطح محیط را گرفتند ظروف پتری به اتاق نوری که دارای دو لامپ مهتابی ۲۵۰ وات با فاصله ۴۰ سانتی‌متری از ظروف پتری بود و میانگین شدت نوری ۵۱۱ lux را فراهم می‌کرد منتقل گردید. در تمام این مدت دوره‌های نوری و تاریکی به شرح ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به منظور افزایش میزان اسپوردهی به کار گرفته شد. همچنین سطح محیط‌های کشت نیز به منظور افزایش در میزان اسپوردهی به وسیله اسکالپل خراش داده شد.

جدول ۱- فهرست جدایه‌های *Magnaporthe grisea* که در بررسی‌های بیماری‌زایی و تعیین نژاد مورد استفاده قرار گرفت.

ردیف	نام جدایه	میزبان	محل نمونه‌برداری	زمان جمع‌آوری
۱	Unk7	Unknown	جاده اسالم	۸۳/۵/۸
۲	Ech1	*Echinochloa sp.*	نور	۸۴/۶/۲۱
۳	Dig18	*Digitaria sanguinalis*	صومعه‌سرا	۸۳/۵/۸
۴	Dig5	*Digitaria sanguinalis*	صومعه‌سرا	۸۴/۶/۲۱
۵	Set4	*Setaria italica*	صومعه‌سرا	۸۳/۵/۱
۶	Set7	*Setaria italica*	صومعه‌سرا	۸۳/۵/۱
۷	Set1	*Setaria italica*	صومعه‌سرا	۸۳/۵/۱۵
۸	Set8	*Setaria italica*	صومعه‌سرا	۸۳/۵/۱۵
۹	Unk6	Unknown	صومعه‌سرا	۸۳/۵/۱۹
۱۰	Set9	*Setaria italica*	صومعه‌سرا	۸۳/۵/۹
۱۱	Dig3	*Digitaria sanguinalis*	جاده اسالم	۸۳/۵/۸
۱۲	Set6	*Setaria italica*	صومعه‌سرا	۸۳/۵/۱۹
۱۳	Dig11	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۸۴/۶/۲۱
۱۴	Set6	*Setaria italica*	صومعه‌سرا	۸۳/۵/۱۹
۱۵	Dig11	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۸۳/۵/۱۹
۱۶	Dig17	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۸۳/۵/۱۹
۱۷	Dig2	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۸۳/۵/۱۹
۱۸	Dig10	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۸۳/۵/۱۹
۱۹	Dig9	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۸۳/۵/۱۹
۲۰	Dig22	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۸۳/۵/۱۹
۲۱	Dig1	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۸۳/۵/۱۹
۲۲	Unk2	Unknown	صومعه‌سرا	۸۳/۵/۱۹
۲۳	Unk4	Unknown	صومعه‌سرا	۸۳/۵/۱۹
۲۴	Unk1	Unknown	صومعه‌سرا	۸۳/۵/۱۹
۲۵	Unk5	Unknown	صومعه‌سرا	۸۳/۵/۱۹
۲۶	Dig13	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۸۳/۵/۲۱
۲۷	Dig19	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۸۳/۵/۲۱
۲۸	Dig14	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۱۳۸۲
۲۹	Dig15	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۱۳۸۲
۳۰	Dig16	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۱۳۸۲
۳۱	Dig12	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۱۳۸۲
۳۲	Dig4	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۱۳۸۲
۳۳	Dig8	*Digitaria sanguinalis*	نور	۸۴/۶/۲۱
۳۴	Dig7	*Digitaria sanguinalis*	کردی کلا	۸۴/۶/۲۱
۳۵	Dig6	*Digitaria sanguinalis*	کردی کلا	۸۴/۶/۲۱
۳۶	Dig21	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۱۳۸۲
۳۷	Dig20	*Digitaria sanguinalis*	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور (آمل)	۱۳۸۲

مایه‌زنی گیاهان

برای این منظور جدایه‌های قارچی که به مرحله اسپوردهی رسیده بودند خرد شده و به داخل ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون وارد و به خوبی بهم زده شدند. در مرحله بعدی سوسپانسیون حاصل از درون یک پارچه ململ دولایه گذرانده شد و سپس از لحاظ تعداد اسپور به وسیله لام هماسیتومتر مورد بررسی قرار گرفت تا غلظت اسپورها به میزان $۴-۵۰\cdot۱۰^{۴}$ اسپور در میلی‌لیتر به ازای هر جدایه باشد. در مرحله بعد گیاهچه‌هایی که از ۲۴ ساعت گذشته در اتاقک مرطوب بودند خارج و در ساعت ۶ الی ۷ بعد از ظهر و در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد اسپورپاشی شدند. برای اسپورپاشی از حجمی معادل ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مورد نظر که با Tween 20 به نسبت یک درصد مخلوط شده بود، استفاده گردید. بعد از اسپورپاشی، هر گلدان که شامل ۶۰ گیاهچه از هر دو رقم حساس طارم و بینام بودند به داخل اتاقک مرطوبی که اطراف آن توسط پلاستیک به منظور حفظ رطوبت تا سطح ۹۵ درصد پوشانده شده بود، وارد شدند. همچنین به منظور اطمینان از مناسب بودن شرایط محیطی برای جوانه‌زنی اسپورهای قارچی، یک میلی‌لیتر از آب موجود روی سطح برگ‌ها، ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی به صورت تصادفی جمع‌آوری و وضعیت اسپورها در آن مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان به مدت ۱۰ روز تا زمان ظهور علایم در اتاقک مزبور قرار گرفتند و در تمام این مدت رطوبت مورد نیاز درون اتاقک‌ها به وسیله مه پاش دستی فراهم گردید. همچنین رطوبت درون گلخانه نیز به وسیله دستگاه مه‌پاش همواره تا سطح ۹۵ درصد تأمین شد. بعد از گذشت این مدت هر گلدان از درون اتاقک مرطوب خارج شد و تمام برگ‌های آن از نظر ظهور علایم بیماری مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام اصول کخ برگ‌های دارای علایم جمع‌آوری گردید و قارچ *M. grisea* دوباره از آنها جداسازی شد.

ارزیابی بیماری‌زایی

ارزیابی بیماری ۷ تا ۱۰ روز پس از مایه‌زنی نشاها انجام گردید. تیپ آلودگی با استفاده از مقیاس صفر تا پنج بر اساس مدل Valent *et al.* (1991) ارزیابی شد (شکل ۱). در این روش واکنش میزبان به شش کلاس مختلف تقسیم شده است.

تیپ صفر= هیچ نشانه‌ای از بیماری روی برگ‌ها تشکیل نشود.

تیپ ۱= لکه‌های قهوه‌ای تا سیاه کوچک‌تر از نیم میلی‌متر و بدون اسپور روی برگ‌ها تشکیل شود

تیپ ۲= لکه‌های قهوه‌ای با ابعاد نیم تا ۱ میلی‌متر و بدون اسپور روی برگ‌ها تشکیل شود.

تیپ ۳= لکه‌های ۱ تا ۳ میلی‌متری گرد و بیضوی با مرکزی خاکستری و احاطه شده با حلقه قهوه‌ای روی برگ‌ها تشکیل شود این لکه‌ها کم و بیش اسپور دارند.

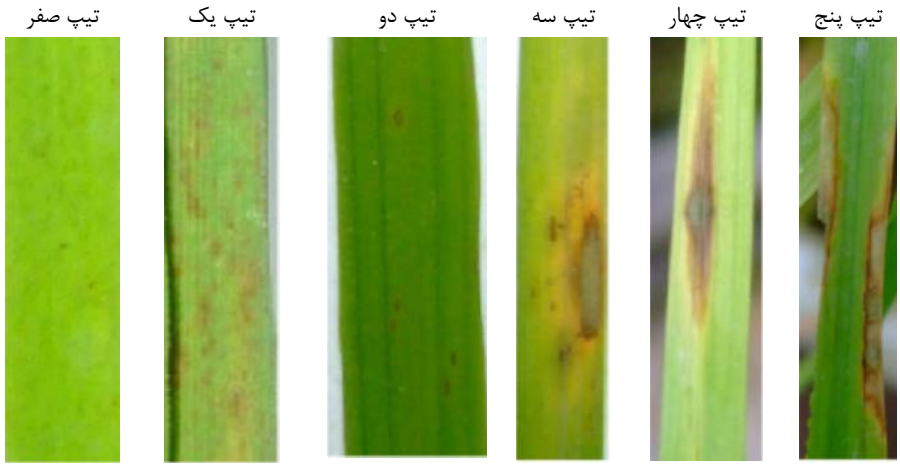
تیپ ۴= لکه‌های مشخص دوکی شکل که به طول ۳ میلی‌متر یا بیشتر، مرکز آنها خاکستری و نکروزه با حاشیه متمایل به قرمز و یا آب سوخته روی برگ‌ها تشکیل شوند. لکه‌ها پیوسته نبوده و یا به طور جزئی بهم متصل شده‌اند، این لکه‌ها اسپور دار هستند.

تیپ ۵= لکه‌ها به طور مشخص دوکی شکل بوده و بهم پیوسته باشند و در نتیجه بخش‌های بالایی برگ بطرف نوک در یک یا دو نقطه از بین رفته باشد.

همچنین جدایه‌هایی که بیش از یک تیپ از علایم بیماری را در گیاه میزبان نشان دادند تحت عنوان "Mesothetic" شناخته شدند. ارقامی که در مقابل جدایه‌ها واکنش‌های نوع صفر تا ۲ را نشان می‌دهند به عنوان ارقام مقاوم گروه‌بندی شده و با حرف R مشخص می‌شوند. ارقامی که واکنش نوع ۳ را بروز می‌دهند به عنوان نیمه حساس در نظر گرفته شده و با علامت «MS یا MR» مشخص می‌شوند. ارقامی که واکنش‌های نوع ۴ یا ۵ را بروز می‌دهند نیز در گروه ارقام حساس قرار گرفته و با حرف (S) مشخص می‌شوند. از آنجایی که در این تحقیق هدف بررسی مقاومت ارقام نبود لذا جدایه‌هایی که تیپ‌های صفر تا دو را در ارقام مورد مطالعه بروز دادند جدایه‌های بی آزار و یا غیر بیماری‌زا روی برنج و جدایه‌هایی که تیپ‌های ۳ تا ۵ را روی دو رقم مورد مطالعه بروز دادند به عنوان پر آزار در نظر گرفته شدند.

تعیین نژاد جدایه‌های بیماری‌زای *M. grisea* با استفاده از ارقام افتراقی استاندارد

در این مرحله جدایه‌هایی از قارچ *M.grisea* تعیین نژاد شدند که تیپ بیماری‌زایی ۳ تا ۵ را روی دو رقم



شکل ۱- علایم بیماری *Magnaporthe grisea* روی ارقام افتراقی برنج بر اساس تیپ‌های تعریف شده در روش Valent *et al.* (1991).

حساس بینام و طارم ایجاد کردند. برای این منظور از هشت رقم افتراقی استاندارد بین‌المللی با نام‌های: A (Raminad Str.3), B (Zenith), C (NP-125), D (Usen), E (Dular), F (Kanto 51), G (Sha-tiao-tsao), H (Caloro) استفاده گردید (Atkins, 1962; Atkins *et al.*, 1967). از آنجایی که ارقام افتراقی مورد نظر به صورت بین‌المللی مورد استفاده قرار می‌گیرند، لذا حرف I بر گرفته از کلمه International را به عنوان پیشوند در هنگام تعیین نوع گروه نژادی اضافه می‌نماییم. به منظور تعیین نوع نژاد باید واکنش ارقام از A تا H به ترتیب مشخص و با جدول تعیین نژاد ارقام تطبیق داده شود به این گونه که اگر جدایه مورد بررسی در مقابل رقم Raminad Str.3 واکنش حساسیت بروز دهد بدون در نظر گرفتن واکنش دیگر ارقام در گروه IA قرار گرفته و سپس واکنش سایر ارقام مورد بررسی قرار می‌گیرد. از سویی دیگر اگر رقم Raminad. Str. 3 مقاوم و رقم Zenith حساس باشد نژاد مورد نظر بدون در نظر گرفتن واکنش سایر ارقام در گروه IB قرار می‌گیرد و سپس واکنش ارقام دیگر بررسی می‌شود. همچنین اگر تمام ارقام به استثناء Caloro واکنش مقاومتی از خود بروز دهند نژاد مورد نظر در گروه IH قرار می‌گیرد (Ling & Ou, 1969).

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های *M. grisea* روی لاین‌های نزدیک به ایزوژن (NILs)

لاین‌های نزدیک به ایزوژن NILs (Near- Isogenic Lines) از روی رقمی به نام CO39 (از تیپ برنج‌های indica) که بسیار حساس به قارچ بلاست می‌باشد به دست آمده‌اند. قابل ذکر است که ارقام مذکور هر کدام دارای یک ژن مقاومت اصلی (Major gene) می‌باشند (Javan-Nikkhah, 2002). پنج لاین نزدیک به ایزوژن و نوع ژن مقاومتی را که حمل می‌کنند شامل C101LAC (*pi-1(t)*)، C101A51 (*pi-2(t)*)، C104PKT (*pi-3(t)*)، C101PKT (*pi-ta*)، C105TTP-4L23 (*pi-ta, pi-*) هستند. این لاین‌ها از مؤسسه تحقیقات برنج در آمل فراهم شده و هم‌اکنون نیز در این مؤسسه موجود می‌باشند.

نتایج

ارزیابی خصوصیات بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *M. grisea* روی دو رقم حساس و محلی طارم و بینام

تمام جدایه‌های مورد بررسی در این آزمایش واکنش‌های متفاوتی از مقاوم تا حساس بر اساس مدل Valent *et al.* (1991) بروز دادند. از میان جدایه‌های مورد بررسی تنها چند جدایه علایم تیپ ۴ را بروز می‌دادند و این در حالی است که تیپ ۵ علایم تنها در مورد جدایه Dig12 دیده شد. همچنین در طی بررسی‌ها، علایم تیپ ۲ و ۳ به عنوان عمومی‌ترین علایم مشاهده گردید. در مورد بعضی از جدایه‌ها امکان تعیین نوع واکنش فراهم نشد به این خاطر که علایم شبیه به تیپ ۳ بود اما مرکز خاکستری در آنها مشاهده نمی‌شد. به علاوه، فاقد اسپور بودند و عامل بیماری‌زا نیز به

روش‌های معمول از آنها جداسازی نگردید. همچنین در مورد تیپ سه علایم نیز باید ذکر کرد که شکل آنها از لکه‌های بیضوی با مرکز خاکستری تا لکه‌هایی بدون شکل منظم با حاشیه قهوه‌ای و مرکز خاکستری متغیر بود. قابل ذکر است که در تمام بررسی‌های صورت گرفته واکنش دو رقم طارم و بینام در مقابل جدایه‌های مورد بررسی مشابه بود. شرح علایم مذکور در جدول ۲ مشخص گردیده است.

جدول ۲- واکنش دو رقم حساس برنج طارم و بینام به جدایه‌های *Magnaporthe grisea* به‌دست آمده از علف‌های هرز

نام جدایه	میزبان	علایم بیماری
Unk7	Unknown	+/+
Ech1	*Echinochloa crus-galli*	-/-
Dig18	*Digitaria sanguinalis.*	+/+
Dig5	*Digitaria sanguinalis.*	+/+(M)
Set7	*Setaria italica*	-/-
Set1	*Setaria italica*	-/-
Set2	*Setaria italica*	-/-
Dig23	*Digitaria sanguinalis.*	-/-
Set8	*Setaria italica*	-/-
Unk6	Unknown	-/-
Set9	*Setaria italica*	-/-
Dig3	*Digitaria sanguinalis.*	+/+
Set6	*Setaria italica*	-/-(M)
Dig11	*Digitaria sanguinalis.*	+/+(M)
Dig17	*Digitaria sanguinalis.*	-/-
Dig2	*Digitaria sanguinalis.*	-/-
Dig10	*Digitaria sanguinalis.*	-/-
Dig9	*Digitaria sanguinalis.*	-/-
Dig22	*Digitaria sanguinalis.*	+/+(M)
Dig1	*Digitaria sanguinalis.*	+/+(M)
Unk4	Unknown	+/+(M)
Unk2	Unknown	-/-
Unk1	Unknown	+/+
Unk5	Unknown	-/-(M)
Dig13	*Digitaria sanguinalis.*	+/+
Dig19	*Digitaria sanguinalis.*	-/-
Dig14	*Digitaria sanguinalis.*	-/-(M)
Dig15	*Digitaria sanguinalis.*	-/-
Dig16	*Digitaria sanguinalis.*	+/+(M)
Dig12	*Digitaria sanguinalis.*	+/+
Dig4	*Digitaria sanguinalis.*	+/+
Dig8	*Digitaria sanguinalis.*	+/+
Dig7	*Digitaria sanguinalis.*	-/-
Dig6	*Digitaria sanguinalis.*	-/-
Dig21	*Digitaria sanguinalis.*	+/+
Dig20	*Digitaria sanguinalis.*	-/-
Set4	*Setaria italica*	-/-(M)

+/- به ترتیب از سمت راست به چپ توانایی و ناتوانی جدایه‌ها در ایجاد علایم بیماری روی ارقام طارم و بینام.

(M) جدایه‌هایی که بیش از یک تیپ از علایم بیماری را در گیاه میزبان نشان دادند "Mesothetic".

واکنش ارقام افتراقی استاندارد بین‌المللی در مقابل جدایه‌های بیماری‌زای *M. grisea*

به منظور تعیین نژاد جدایه‌های مورد بررسی در این آزمایش از ۵ جدایه استفاده گردید. معیار انتخاب این جدایه‌ها تیپ علایم حاصل از آنها روی دو رقم حساس طارم و بینام بود. این جدایه‌ها شامل دو جدایه با تیپ علایم ۴ و ۵ به همراه ۳ جدایه دیگر می‌شد که علایم تیپ ۳ را در میزبان خود بروز دادند. هشت رقم افتراقی استاندارد بین‌المللی به نام‌های (Raminad Str.3), (Zenith), (NP-125), (Usen), (Dular), (Kanto 51), (Caloro), (Sha-tiao-tsao) علایم متفاوتی را از نوک سوزن در ارقام مقاوم تا ظهور علایم تیپیک بیماری بلاست در ارقام حساس بروز دادند. به این صورت که رقم Usen که دارای ژن مقاومت *Pi-a* است در تمام موارد مقاوم بود و واکنش تیپ ۱ را با علامت نوک سوزنی که بیانگر واکنش فوق حساسیت بود نشان داد. لذا به عنوان یک رقم مقاوم در مقابل تمام جدایه‌ها به حساب آمد. این واکنش نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه بر اساس نظریه ژن برای ژن فاقد ژن‌های بیماری‌زایی لازم برای شکستن ژن مقاومت میزبانی*Pi-a* هستند. از سویی دیگر واکنش جدایه‌ها در مقابل رقم Zenith که دارای ژن‌های مقاومتی *pi-a*، *pi-z* و *pi-i* است قابل توجه بود. از این جهت که بر خلاف سایر مطالعات صورت گرفته توسط Javan-Nikkhah (2002) که در آنها این رقم در مقابل تمام جدایه‌های قارچ *M. grisea* جمع‌آوری شده از روی برنج واکنش مقاومتی از خود بروز داده بود اما در مقابل جدایه‌های Dig8 و Dig12 واکنش حساسیت در این رقم دیده شد. از سویی دیگر رقم Caloro نیز در مقابل تمامی جدایه‌ها به جز جدایه Dig21 از خود واکنش حساسیت بروز داد و این امر بیانگر توانایی جدایه‌های مورد بررسی در شکستن مقاومت ژن $pi\text{-}k^5$ می‌باشد و سایر ارقام نیز واکنش‌هایی را از تیپ ۲، ۳، ۴ و ۵ نشان دادند. لذا بر اساس نظریه ژن برای ژن جدایه‌هایی که واکنش‌های تیپ ۱ و ۲ را در ارقام برمی‌انگیختند به عنوان جدایه‌های بی آزار و رقم مقابل آنها را مقاوم (R) و جدایه‌هایی که واکنش تیپ‌های ۳، ۴ و ۵ را در گیاهان مورد بررسی ایجاد می‌کردند به عنوان جدایه‌های پر آزار و رقم مقابل آنها

حساس (S) در نظر گرفته شد. بر اساس مطالعه مذکور ۵ جدایه مورد بررسی در این آزمایش شامل ۴ نژاد از دو گروه نژادی IA و IB تحت نام‌های IB-58, IA-27, IA-127, IA-17 شناسایی شدند. قابل ذکر است که جدایه‌های Dig8 و Dig12 هر دو از یک گروه نژادی با عنوان IA-17 قرار گرفتند. همچنین جدایه‌های Dig 4، Dig 3 و Dig 21 نیز به ترتیب تحت عنوان نژادهای IA-27، IA-127، IB-58 قرار گرفتند (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج مربوط تعیین نژاد جدایه‌های قارچ *Magnaporthe grisea* با استفاده از ارقام افتراقی استاندارد بین‌المللی

رقم	نوع ژن مقاومت شناسایی شده	نژادهای فیزیولوژیک			
		IA-27	IA-17	IA-127	IB-58
Raminad Str.3	---	R	R	S	R
Zenith	*pi-z, pi-i, pi-a*	R	R	R	S
Np-125	---	S	S	R	R
Usen	*pi-a*	R	R	R	R
Dular	*pi-k*^{a}	R	R	R	R
Kanto 51	*pi-k*	S	S	R	S
Sha-tiao-tsao-S	*pi-k*^{5}	R	R	R	S
Caloro	*pi-k*^{5}	S	S	S	R

واکنش لاین‌های نزدیک به ایزوژن (NILs) برنج به جدایه‌های بیماری‌زای *M. grisea*

بر اساس نظریه ژن برای ژن واکنش بین یک گیاه و عامل بیمارگر زمانی به سمت مقاومت (عدم ظهور بیماری) سوق می‌یابد که یک ژن مقاومتی (*R* gene) در گیاه در مقابل یک ژن غیر بیماری‌زایی (*Avr* gene) در عامل بیمارگر قرار گیرد. همچنین این واکنش زمانی به سمت بیماری‌زایی سوق می‌یابد که ژن بیماری‌زایی برای غلبه بر ژن مقاومت وجود داشته باشد. ارقام NILs همه دارای یک ژن مقاومتی هستند به جز لاین C105TTP-4L23 که دارای دو ژن مقاومتی می‌باشد. بر اساس استفاده از لاین‌های NILs جدایه‌های مورد بررسی شامل چهار نژاد A، B، C و D شدند. به‌گونه‌ای که نژاد A شامل جدایه‌های Dig21 و Dig8، نژاد B شامل جدایه Dig3، نژاد C شامل جدایه Dig4 و نژاد D شامل جدایهDig12 بود. در این بررسی جدایه‌هایی که در روش استفاده از ارقام افتراقی بین‌المللی در گروه‌های تک نژادی قرار گرفته بودند همچون جدایه‌های شماره‌های Dig3 وDig4 در این بررسی نیز در گروه‌های تک نژادی قرار گرفتند. دو جدایه Dig8 و Dig12 که در بررسی ارقام افتراقی استاندارد بین‌المللی هردو در یک گروه قرار می‌گرفتند با استفاده از لاین‌های نزدیک به ایزوژن در گروه‌های مجزا واقع شدند و این در حالی است که جدایه Dig8 در این آزمایش با جدایه شماره Dig21 در یک گروه نژادی قرار گرفت. از سویی دیگر نژاد D که شامل جدایه Dig12 است (جدول ۴) در این آزمایش نیز قادر شد بر تمامی مقاومت های تک ژنی موجود در ارقام مورد بررسی غالب شود. نتیجه این واکنش شبیه واکنش این جدایه روی ارقام افتراقی است اگرچه در آنجا تنها رقم Usen که دارای ژن *pi-a* بود به عنوان رقم مقاوم در مقابل این عامل بیمارگر به حساب آمد.

جدول ۴- واکنش پنج لاین نزدیک به ایزوژن (NILs) در مقابل جدایه‌های *Magnaporthe grisea*

لاین	نوع ژن مقاومت	نژادهای شناسایی شده			
		A	B	C	D
C101LAC	*pi-1(t)*	R	R	S	S
C101A51	*pi-2(t)*	S	R	R	S
C104PKT	*pi-3(t)*	S	R	S	S
C101PKT	*pi-4*^{a}	R	R	R	S
C105TTP-L23	*pi-4*^{b}	S	S	S	S
تعداد جدایه	-	۲	۱	۱	۱

بحث

قارچ *M. grisea* یک گونه بیماری‌زا با طیف میزبانی گسترده است که بیش از ۵۰ جنس گیاهی در دامنه آن قرار می‌گیرد (Ou, 1987). اما قابل توجه آن است که هرکدام از نژادهای قارچ مذکور دارای یک طیف میزبانی محدود بوده و صرفاً یک تا چند جنس را در بر می‌گیرد (Kang *et al*., 2000; Correa-Victoria *et al*., 1994). اگرچه تاکنون مطالعات پیوسته و کاملی روی طیف میزبانی این قارچ انجام نشده است (Zeigler, 1995)، اما با این وجود مطالعاتی که روی طیف میزبانی و میزان تغییرپذیری در نژادهای این قارچ انجام شده خود مورد توافق همه محققین نبوده واختلافات فاحشی در آن وجود دارد (Valent & Chumley, 1987; Latterell & Rossi, 1986; Urashima *et al*., 1999; Uddin *et al*., 1999; Murakami & Mayama, 2000; Viji *et al*., 2001; Kusaba *et al*., 1998; Latterell *et al*., 1960; Kolmer & Ellingboe, 1988). برای مثال، Igarashi *et al*. (1990) و Viji *et al*. (2001) گزارش کردند که جدایه‌های قارچ *M. grisea* که از روی برنج به دست آمده‌اند خسارت شدیدی روی گندم وارد می‌سازند و این در حالی است که Urashima *et al*. (1993) گزارش دادند که جدایه‌های بیماری‌زا روی میزبان گندم روی برنج بیماری‌زا نیستند. Malca & Owen (1957) گزارش دادند که قارچ *M. grisea* که به میزبان پنجه کلاغی خسارت می‌زند قادر است که به میزبان (*S.secundatum* (Walter) Kuntz)[1] نیز خسارت بزند اما آنها در این حال بیان کردند که قدرت بیماری‌زایی این قارچ روی گیاه مذکور که در واقع غیر میزبان است به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته است. Latterell *et al*. (1960) و Bain *et al*. (1972) درگزارش‌های اولیه خود از بیماری بلاست روی چچم[2] (*Lolium* sp.) بیان کردند که جدایه‌های قارچ *M. grisea* به دست آمده از این گیاه علایم بیماری مذکور را روی گیاهانی همچون یولاف، گندم، جو، ریش پری[3] (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) و ذرت ایجاد می‌کند. از سویی دیگر Trevathan (1982) گزارش کرد که جدایه‌های به دست آمده از گیاه پنجه کلاغی، سویا، فرفیون، علف هفت‌بند و (*S. secundatum* (Walter) Kuntz) قادر به بیماری‌زایی روی گیاه چاودار می‌باشند. Urashima *et al*. (1993) نیز دریافتند که جدایه‌های به دست آمده از گیاهانی همچون برنج و چاودار قادر به بیماری‌زایی روی گیاهانی همچون چمن مرتعی[4] (*Poa pratensis* L.)، چچم پرگل، چچم دائمی و فستوکا یا علف بره‌قرمز[5] (*Festuca rubra* L.) می‌باشند. Couch *et al*. (2005) جدایه‌های *M. oryzae* به دست آمده از میزبان‌های علف‌های هرزی همچون ارزن جویباری (*Panicum repens* L.)، چمن بران[6] (*Leersia hexandra* Sw.)، چسبک یا ارزنی سبز[7] (*Setaria viridis* (L.) Beauv.) را به منظور بررسی خصوصیات بیماری‌زایی روی ار قام حساس برنج مایه‌زنی کردند و نتایج بیماری‌زایی را نیز بر اساس متد Valent *et al*. (1991) که از صفر تا ۵ بر اساس خصوصیات زخم‌ها تقسیم‌بندی می‌شد، مشخص کردند. در این تحقیق جدایه‌های به دست آمده از میزبان چمن بران قادر به ایجاد لکه‌های تیپ ۳ تنها روی ارقام خیلی حساس برنج بودند و این در حالی است که جدایه‌های به دست آمده از میزبان‌های چسبک و ارزن جویباری قادر به بیماری‌زایی روی برنج نبودند. اگرچه تنها دو جدایه به دست آمده از میزبان چسبک قادر شدند تعداد مختصری زخم روی دو رقم خیلی حساس برنج ایجاد نمایند. در این تحقیق نیز بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *M. grisea* به دست آمده از میزبان‌های پنجه کلاغی، چسبک و سوروف روی دو رقم برنج محلی وحساس به نام‌های طارم و بینام مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تعدادی از جدایه‌های به دست آمده از گیاه پنجه کلاغی قادر به بیماری‌زایی روی هر دو رقم برنج بودند و این در حالی است که جدایه‌های به دست آمده از میزبان چسبک قادر به بیماری‌زایی روی دو رقم مذکور نبودند. نتایج این تحقیق با نتایج به دست آمده توسط Couch *et al*. (2005) منطبق بود. از سویی دیگر

1. St. Agustinegrass
2. Ryegrass
3. Pearal millet
4. Kentucky bluegrass
5. Red fescue
6. Cut grass
7. Green foxtail

جدایه به دست آمده از میزبان سوروف علایم مشکوکی را روی هر دو رقم ایجاد کردند. به این صورت که لکه‌های حاصل قهوه‌ای تیره با اندازه ۲ تا ۳ میلی‌متر بود اما مرکز خاکستری نداشتند، تعداد کمی داشتند و همچنین هیچ‌گونه اسپوری در آنها مشاهده نشد و عامل بیماری‌زا نیز به روش معمول از آنها جداسازی نگردید. در بررسی‌های صورت گرفته روی قارچ *M. grisea* در ایران تقریباً تمام کارهای انجام شده برای شناسایی نژادهای فیزیولوژیک قارچ *M. grisea* مبتنی بر استفاده از هشت رقم افتراقی استاندارد بین‌المللی است.

Izadyar (1982) در آزمایشی روی ۲۳ جدایه جمع‌آوری شده از نقاط مختلف استان گیلان دوازده نژاد بیماری‌زای مختلف متعلق به گروه‌های بین‌المللی IA و IG را گزارش نمود. Neekbakht & Fatemi (1993) تعداد ۱۴ نژاد فیزیولوژیک را از روی جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق برنجکاری جنوب کشور شناسایی کردند و ادعا نمودند که همه نژادها برای ایران و دنیا جدید می‌باشند. این نژادها متعلق به گروه‌های نژادی IA، ID، IC و IE بودند و فراوانترین و شایع ترین نژادها متعلق به گروه نژادی IA بوده است. Izadyar & Padasht (1998) چهار نژاد فیزیولوژیک جدید را برای این قارچ در گیلان گزارش نمودند. در مازندران، Bahrami & Foroutan (1993) با مورد آزمایش قرار دادن ۱۵ جدایه دو نژاد IA-81 و IC-17 را تشخیص دادند. همچنین Bahrami & Izadyar (1998) سه نژاد بیماری‌زای جدید به اسامی IA-66، IC-27، IC-2 را در مازندران شناسایی نمودند. Javan-Nikkhah (2002) با بررسی جدایه‌های به دست آمده از استان گیلان شش نژاد بیماری‌زا متعلق به سه گروه نژادی IF، IC و IA را تعیین کرد که در بین آنها چهار نژاد IC25، IC26، IC29، IF1 نژاد جدید برای ایران بودند. جدایه‌های نماینده مورد بررسی در این تحقیق نیز با استفاد از هشت رقم افتراقی استاندارد بین‌المللی و ۵ لاین نزدیک به ایزوژن (NILs) تعیین نژاد شده و در نهایت جدایه‌های مزبور توسط هر دو روش به چهار نژاد تقسیم شدند. به گونه‌ای که با استفاده از ارقام بین‌المللی استاندارد دوجدایه Dig12 و Dig8 هر دو در یک گروه و جدایه‌های Dig4 و Dig3 و Dig21 نیز هرکدام در غالب نژادهای مجزا قرار گرفتند. از سویی دیگر Bargnil (2007) در بررسی دیگر جدایه‌های مورد مطالعه در تحقیق مذکور را با استفاده از متد RAPD-PCR مورد بررسی قرار داد که بر اساس نتایج حاصل از آن تحقیق جدایه‌های به دست آمده از گیاه پنجه کلاغی در یک گروه و جدایه‌های به دست آمده از میزبان سوروف نیز در گروهی دیگر قرار گرفت. با مقایسه نتایج به دست آمده از آزمایش بیماری‌زایی و نتایج برگ نیل مشخص گردید که دو جدایه Dig12 و Dig8 نیز در بررسی‌های مولکولی دارای بیش از ۸۰ درصد شباهت ژنتیکی هستند. همچنین سایر جدایه‌ها نیز، هم بر اساس آزمایش تعیین نژاد و هم آزمایش مولکولی در گروه‌های مجزا قرار گرفتند. از سویی اگرچه در بررسی‌های مربوط به آزمایش تعیین نژاد با استفاده از لاین‌های نزدیک به ایزوژن باز هم جدایه‌های در چهار گروه قرار گرفته بودند. از سویی دیگر نتایج آزمون تعیین نژاد با استفاده از لاین‌های افتراقی استاندارد بین‌المللی و لاین‌های نزدیک به ایزوژن (NILs) و مقایسه آنها با نتایج Bargnil (2007) نشان داد که استفاده از ارقام استاندارد بین‌المللی در تعیین نژادها نقش مؤثرتر داشته و نتایج به دست آمده از این روش به واقعیت نزدیک‌تر است.

REFRENCES

1. Ahn, S. W. & Ou, S. H. (1982). Quantitative resistance of rice to blast disease. *Phytopathology*, 72, 279-282.
2. Ashizawa, T., Zenbayashi, K. & Koizumi, S. (1999). Effect of partial resistance on rice blast control with cultivar mixtures. *Phytopathology*, 89, S3
3. Atkins, J. G. (1962). Prevalence and distribution of pathogenic races of *Piricularia oryzae* in the USA. *Phytopathology*, 52, 2. [Abstract].
4. Atkins, J. G., Robert, A. L., Adair, C. R., Goto, K., Kozaka, T., Yanagida, R., Yamada, M. & Matsumoto, S. (1967). An international set of rice varieties for differentiating races of *Piricularia oryzae*. *Phytopathology*, 57, 291-307.
5. Bahrami, M. & Foroutan, A. R. (1993). Identification of physiologic races of blast disease agent,

Pyricularia oryzae in Mazandaran provinces. In: Proceedings of *the 11th Iranian Plant Protection Congress*, 28 Aug-2 Sept.,University of Guilan, Rasht, Iran, p. 62.

6. Bahrami, M. & Izadyar, M. (1998). Introduction of new races of rice blast disease (*Pyricularia oryzae*). In: Proceedings of *the 13th Iranian Plant Protection Congress*, 23-27Aug., Junior College of Agriculture, Karaj, Iran, p. 73.
7. Bain, D. C., Patel, B. N. & Patel, M. V. (1972). Blast of ryegrass in Mississippi. *Plant Disease Report*, 56, 210.
8. Bargnil, M. (2007). *Study on population structure of fungus Magnaporthe grisea (Hebert) Barr isolated from Poaceae weeds and determination of its mating type and fertility status by PCR*. M. Sc. Thesis. University of Tehran, Iran.
9. Behdad, E. (1990). *Disease of field crops in Iran*. (3rd ed.). Neshate Esfahan publishing, Esfahan. (In Farsi).
10. Couch, B. C. & Kohn, L. M. (2002). A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*, 94, 683-693.
11. Couch, B. C., Fudal, I., Lebrun, M. H., Tharreau, D., Valent, B., van Kim, P., Nottéghem, J. L. & 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. *Genetics*, 170, ±
12. Correa-Victoria, F. J., Zeigler, R. S. & Levy, M. (1994). Virulence characteristics of genetic families of *Pyricularia grisea* in Colombia. In: R. S. Zeigler, S. A. Leong and P. S. Teng (Eds.). *Rice Blast Disease*, (pp. 211-229). CAB International, Oxon, U.K.
13. Dernoeden, P. H. (1996). Perennial ryegrass and gray leaf spot. *Golf Course Manage*, 64, 49-52.
14. Harmon, P., Kane, R., Ruhl, G. & Latin, R. (2000). First report of gray leaf spot on perennial ryegrass in Indiana. *Plant Disease*, 84, 492.
15. Igarashi, S. (1990). Update on wheat blast (*Pyricularia oryzae*) in Brazil. In: Proceedings of *the International conference wheat for the nontraditional warm areas*. D. A. Saunders, Ed. (Pp. 25-33). United Nations Development Programme International Maize and Wheat Improvement Center, Mexico.
16. Izadyar, M. (1982). Pathogenic races of *Pyricularia oryzae* in Guilan province of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, ± ,Q) DUL
17. Izadyar, M. & Padasht, F. (1998). Introduction of 4 new physiologic races of *Magnaporthe grisea* fungus in Guilan province. In: Proceedings of *the 5th Iranian Congress of Crop Production and Plant Breeding*, 31 Aug-4 Sept., Seed and Plant Improvement Institute (S.P.I.I), Karaj, Iran, p. 167.
18. Javan-Nikkhah, M. (2002). *Investigation on genetic diversity of populations of Magnaporthe grisea (Hebert) Barr, the rice blast fungus, using molecular, pathogenicity and vegetative compatibility characters in Guilan Province*. Ph. D. thesis. University of Tehran, Iran.
19. Kang, S., Mullins, E., Dezwan, T. M. & Orbach, M. J. (2000). Pathogenesis and genome organization of the rice blast fungus. In: J. W. Kronstad (Eds.). *Fungal pathology*. (pp. 195-235). Kluwer Academic Publishers.
20. Kolmer, J. A. & Ellingboe, A. H. (1988). Genetic relationships between fertility and pathogenicity and virulence to rice in *Magnaporthe grisea*. *Canadian Journal of Botany*, 66, 891-897.
21. Kusaba, M., Don, L. D., Urashima, A. S., Eto, Y., Tosa, Y., Nakayashiki, H., Yamamoto, M. & Mayama, S. (1998). Natural infection of wild grass species with rice blast fungus suggested by DNA fingerprinting. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 64, 125-128.
22. Latterell, F. M. & Rossi, A. E. (1986). Longevity and pathogenic stability of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, 76, 231-235.
23. Latterell, F. M., Tullis, E. C. & Collier, J. W. (1960). Physiologic races of *Pyricularia oryzae* Cav. *Plant Disease Report*, 44, 679-683.
24. Ling, K. C. & Ou, S. H. (1969). Standardization of the international race numbers of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, 59, 339-342.
25. Malca, I. & Owen, J. H. (1957). The gray leaf spot disease of St. Augustinegrass. *Plant Disease Reporte*, 41, 871-875.
26. Murakami, J., Tosa, Y. & Mayama, S. (2000). Analysis of host species specificity of *Magnaporthe grisea* toward wheat using a genetic cross between isolates from wheat and foxtail millet. *Phytopathology*, 90, 1060-1067.
27. Neekbakht, M. & Fatemi, J. (1993). Differential response of local rice varieties to prevalent races of *Pyricularia oryzae* under greenhouse conditions. In: Proceedings of *the 11th Iranian Plant Protection Congress*, 28 Aug-2 sept., University of Guilan, Rasht, Iran, p. 71. (In Farsi).
28. Ou, S. H. (1987). *Rice diseases*. 7KH&RP P RQZ HDOWK 0 \ FRORJ LFDO,QVWLWXW 6XUH 3S ±
29. Schumann, G. L. & Jackson, N. (1999). First report of gray leaf spot (*Pyricularia grisea*) on perennial

ryegrass (*Lolium perenne*) in New England. *Plant Disease*, 83, 1073.
30. Sweigard, J. A., Carroll, A. M., Kang, S., Farrall, L. & Chumley, F. G. (1995). Identification, cloning, and characterization of PWL2, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. *Plant Cell*, 7, 1221-1233.
31. Trevathan, L. E. (1982). Pathogenicity on ryegrass and cultural variability of Mississippi isolates of *Pyricularia grisea*. *Plant Disease*, 66, 592-594.
32. Uddin, W., Soika, M. D., Moorman, F. E. & Viji, G. (1999). A serious outbreak of blast disease (gray leaf spot) of perennial ryegrass in golf course fairways in Pennsylvania. *Plant Disease*, 83, 783.
33. Urashima, A. S., Hashimoto, Y., Don, L. D., Kusaba, M., Tosa, Y., Nakayashiki, H. & Mayama, S. (1999). Molecular analysis of the wheat blast population in Brazil with a homolog of retrotransposon MGR583. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 65, 429-436.
34. Urashima, A. S., Igarashi, S. & Kato, H. (1993). Host range, mating type, and fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. *Phytopathology*, 77, 1211-1216.
35. Valent, B. & Chumley, F. G. (1987). Genetic analysis of host species specificity in *Magnaporthe grisea*. In: C. J. Arntzen and C. Ryan, (Eds.). *Molecular strategies for crop production*. (pp. 83-93.). Alan R. Liss, Inc., New York.
36. Valent, B., Farral, L. & Chumley, F. G. (1991). *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. *Genetics*, ±
37. Vincelli, P. (1999). Gray leaf spot: An emerging disease of perennial ryegrass. *Turfgrass Trends*, 7, 1-8.
38. Viji, G., Wu, B., Kang, S., Uddin, W. & Huff, D. R. (2001). *Pyricularia grisea* causing gray leaf spot of perennial ryegrass turf: population structure and host specificity. *Plant Disease*, 5, 817-826.
39. Yaegashi, H. (1978). Inheritance of pathogenicity in crosses of *Pyricularia* isolates from weeping lovegrass and finger millet. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 44, 626-632.
40. Zeigler, R. S., Cuoc, L. X., Scott, R. P., Bernardo, M. A., Chen, D. H., Valent, B. & Nelson, R. J. (1995). The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. *Phytopathology*, 85, 443-451.