مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۴، شماره ۳، سال ۱۳۸۲ (۶۵۸-۶۴۷)

مطالعه تنوع بیماری‌زایی درجمعیت قارچ *Magnaporthe grisea*، عامل بیماری بلاست برنج در استان گیلان

محمد جوان نیکخواه[1]، قربانعلی حجارود[2]، عباس شریفی تهرانی[3] و سید محمود اخوت[4]
۱، ۲، ۳، ٤، استادیار و استادان دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۱/۱۱/۱٦

خلاصه

پنجاه جدایه تک اسپور *Magnaporthe grisea*، عامل بیماری بلاست برنج متعلق به شش گروه انگشت‌نگاری DNA که از روی یازده رقم در چهارده شهرستان استان گیلان طی سالهای ۷۸-۱۳۷٦ جمع‌آوری شده بودند، از نظر بیماریزایی روی گروههای مختلفی از ارقام برنج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در مجموع ۲٦ رقم و لاین شامل گروه ارقام افتراقی استاندارد بین‌المللی، رقم CO39 همراه پنج لاین همسان تقریبی (Near isogenic lines) ایجاد شده در زمینه ژنتیکی رقم CO39 و دوازده رقم ایرانی در این آزمایش بکار رفتند. براساس واکنش هشت رقم افتراقی بین‌المللی، شش نژاد بین‌المللی از گروههای نژادی IA، IC و IF شناسایی شدند. در بین آنها، سه نژاد IC-26، IC-29 و IF-1 برای اولین بار در ایران شناسایی شد، دو نژاد IC-25 و IA-89 نژادهای غالب در گیلان بودند. در این مطالعه توانایی گروه لاینهای افتراقی در تمایز نژادها، در مقایسه با ارقام افتراقی بین‌المللی مورد ارزیابی قرار گرفت. این لاینها پنجاه جدایه آزمایش شده را فقط در دو نژاد مختلف قرار دادند. براساس واکنش ارقام ایرانی، جدایه‌های گروهبندی شده در شش نژاد بین‌المللی (براساس واکنش ارقام افتراقی بین‌المللی) در هفت فرم بیماریزایی قرار گرفتند. همچنین وقتی مجموع ۲٦ رقم و لاین بکار رفته در این آزمایش، به عنوان یک گروه میزبان افتراقی برای تفکیک نژادها بکار رفتند، پنجاه جدایه فوق به سیزده فرم بیماریزایی تفکیک شدند. براساس نتایج بدست آمده بکارگیری سیستم تعیین نژاد بین‌المللی نتوانست طیف بیماریزایی جدایه‌ها را به خوبی بیان کند، چون وقتی ارقام ایرانی بر تعداد ارقام افتراقی افزوده شدند، نژادهای بین‌المللی شناسایی شده بیشتر تفکیک شدند و تعداد آنها به سیزده فرم بیماریزایی رسید. در بین ارقام ایرانی بکار رفته در این آزمایش، ارقام محلی بینام، حسن‌سرایی، علی‌کاظمی و دمسیاه بطور کامل در مقابل تمام جدایه‌ها سازگار بودند، در حالیکه ارقام سنگ طارم (رقم محلی)، خزر و نعمت (دو رقم اصلاح شده) در مقابل تمام جدایه‌های آزمایش شده ناسازگار تشخیص داده شدند. لذا فراوانی فنوتیپ‌های بیماریزایی روی ارقام ایرانی آزمایش شده، بین صفر (۰/۰) تا یک (۱/۰) متغیر بود. رقم سنگ طارم به عنوان یک رقم اصلاح نشده و محلی در مقابل تمام جدایه‌ها ناسازگار بوده، بطوریکه فراوانی فنوتیپ بیماریزایی برای این رقم صفر بود. در نتیجه، با توجه به مقاوم بودن این رقم در مقابل اغلب نژادهای آزمایش شده در گیلان، برای برنامه‌های اصلاحی جهت تولید ارقام مقاوم می‌توان از آن به عنوان یک والد مناسب استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: بیماری بلاست، *Magnaporthe grisea*، تنوع بیماریزایی، ارقام افتراقی، برنج.

مکاتبه کننده: محمد جوان نیکخواه

مقدمه

بلاست مهمترین بیماری برنج در ایران و بسیاری از نقاط برنج‌خیز دنیا می‌باشد که توسط *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr [آنامورف: *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.] ایجاد می‌شود (۹، ۱۸، ۲۱). جدایه‌های قارچ از نظر بیماری‌زایی روی ارقام برنج متفاوت بوده گروه‌های مختلفی را تشکیل می‌دهند. براساس تعداد زیادی از گزارشها، این تنوع ممکن است به خاطر تولید مداوم افراد جدید با قدرت بیماری‌زایی متفاوت از گذشته باشد (۱۷). به اعتقاد مک واتاناکارن و همکاران (۲۰۰۰) اصلاح موفقیت‌آمیز ارقام برنج برای مقاومت پایدار در مقابل *M. grisea* بر پایه شناخت دقیق میزان تنوع بیماری‌زایی جمعیت‌های آن استوار است. در طی سالیان گذشته، ارقام اصلاح شده مقاوم برنج در مقابل بیماری بلاست، چند سال پس از معرفی شدن حساس شدند. محققین پیدایش نژادهای بیماریزای جدید در جمعیت قارچ را علت اساسی حساس شدن ارقام مقاوم دانسته‌اند (۱۷، ۲۲).

مطالعه روی تنوع بیماری‌زایی قارچ از اوایل دهه بیست قرن بیستم میلادی با مشاهده تفاوت جدایه‌ها در بیماری‌زایی روی رقم خاص شروع گردید و ساساکی برای اولین بار این تفاوت را در ۱۹۲۲ مشاهده و گزارش نمود (۱۷). از آن زمان مطالعه روی تنوع بیماریزایی جدایه‌ها شروع گردید و در سالهای بعد محققین جدایه‌هایی را که دارای الگوی بیماری‌زایی مشابهی روی تعداد معینی از ارقام بودند، در گروه‌های مشخصی به نام نژادهای فیزیولوژیک گروه‌بندی کردند. اتکنیز و همکاران (۱۹۶۷) که شامل یک گروه از محققین ژاپنی-آمریکایی بودند، جهت یکسان‌سازی آزمایشهای شناسایی نژادهای فیزیولوژیک قارچ در دنیا، یک گروه شامل هشت رقم رامیناد اس‌تی‌آر۳[1]، زنیت[2]، ان-پی-۱۲۵[3]، یوسن[4]، دولار[5]، کانتو ۵۱[6]، شاتیائوتی سائو[7] و کالورو [8] را به عنوان دسته ارقام افتراقی استاندارد بین‌المللی، انتخاب و معرفی نمودند. این ارقام مورد استقبال محققین در سراسر دنیا قرار گرفت و بطور وسیع از آنها استفاده گردید.

در ایران تقریبا تمام کارهای انجام شده برای مطالعه تنوع بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ در نقاط مختلف، بر پایه استفاده از هشت رقم برای شناسایی نژادهای فیزیولوژیک فوق بوده است. ایزدیار (۱۳۶۱) برای اولین بار دوازده نژاد بیماریزا متعلق به گروه‌های نژادی بین‌المللی IA و IG را از گیلان گزارش نمود. در سالهای بعد محققین دیگر نژادهای دیگری را از سایر مناطق برنجکاری کشور شناسایی و گزارش نمودند (۲، ۳، ۴، ۶، ۷).

به منظور شناسایی دقیق‌تر نژادهای فیزیولوژیک و تعیین تنوع ژنهای غیربیماری‌زایی[9] در قارچ، تحقیقات به سمت دستیابی به لاینهای افتراقی همسان تقریبی[10] برنج هدایت گردید. مک‌کیل و بونمن (۱۹۹۲) در زمینه ژنتیکی رقم CO39 (خیلی حساس به بیماری بلاست) از گروه برنجهای تیپ Indica پنج لاین NILs ایجاد و معرفی کردند. این لاینها به جز در دارا بودن یک ژن مقاومت اصلی در سایر خصوصیات با هم مشابه هستند. در حال حاضراز این لاینها در نقاط مختلف دنیا استفاده می‌شود بطوریکه چن و همکاران (۲۰۰۱) با استفاده از هر دو گروه NILs فوق از بین ۷۹۲ جدایه جمع‌آوری شده از ۱۳ استان چین ۳۴۴ نژاد تشخیص دادند. همچنین تینلای و همکاران (۲۰۰۰) تنوع بیماری‌زایی جدایه‌های جمع‌آوری شده از نقاط مختلف کشور بوتان را با استفاده از هر دو گروه از لاینهای فوق بررسی کرده و ۵۳ نژاد را تشخیص دادند. به عقیده مک‌واتاناکارن و همکاران (۲۰۰۰) و لینگ و همکاران (۱۹۹۵) با توجه به مشخص بودن ژنهای مقاومت اصلی[11] در گروه NILs شناسایی دقیق‌تر نژادهای مبهم براساس نوع واکنش هر جدایه در مقابل NILs امکان‌پذیر است.

این تحقیق برای دستیابی به اهدافی نظیر شناسایی نژادهای فیزیولوژیک قارچ، تعیین تنوع بیماریزایی جدایه‌های متعلق به گروههای انگشت‌نگاری DNA[12]، ارزیابی قدرت ارقام ایرانی در

1 . Raminad Str.3
2 . Zenith
3 . NP-125
4 . Usen
5 . Dular
6 . Kanto 51
7 . Sha-tiao-tsao-S
8 . Caloro
9. Avirulence gene
10. Near Isogenic Lines=NILs
11. Major resistance gene
12. Clonal lineages

تفکیک جدایه‌های قارچ از نظر بیماری‌زایی و مقایسه ارقام ایرانی با هم از نظر میزان تحمل به بیماری در شرایط گلخانه انجام گردید.

مواد و روشها

جدایه‌های قارچ

در این تحقیق پنجاه جدایه تک اسپور مورد استفاده قرار گرفتند. این جدایه‌ها از میان شش گروه انگشت‌نگاری (ژنوتیپ) قارچ که قبلا به کمک تکنیک مولکولی rep-PCR و آغازگرهای Pot2 در جمعیت قارچ در گیلان شناسایی شده بودند (۵)، انتخاب شدند. جدایه‌ها طوری انتخاب شدند که حداکثر تنوع را از نظر میزبان، محل جمع‌آوری و زمان نمونه‌برداری نشان دهند. پنجاه جدایه فوق طی سالهای ۷۸-۱۳۷۶ از روی یازده رقم در چهارده شهرستان استان گیلان جمع‌آوری شده بودند.

ارقام

سه گروه از ارقام برنج در این تحقیق بکار رفتند:

۱- گروه ارقام افتراقی استاندارد بین‌المللی: شامل هشت رقم رقم رامیناد اس‌تی‌آر۳، زنیت، ان-پی-۱۲۵، یوسن، دولار، کانتو ۵۱، شاتیائوتی سائو و کالورو بودند. از این ارقام در سطح بین‌المللی برای شناسایی نژادهای فیزیولوژیک قارچ استفاده می‌شود.

۲- گروه لاین‌های افتراقی NILs: شامل پنج لاین C101LAC، C101A51، C104PKT، C101PKT و C105TTP-4L23 همراه با رقم والد CO39 بودند. این لاین‌ها از بخش ژنتیک مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (IRRI)[1] تهیه و در مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج در رشت تکثیر شدند.

۳- گروه ارقام ایرانی: این گروه شامل دوازده رقم بینام، حسن‌سرایی، سنگجو، خزر، علی‌کاظمی، سنگ‌طارم، حسنی، هاشمی، دمسیاه، دم‌زرد، نعمت و ندا بودند که در اکثر نقاط گیلانکشت می‌شدند.

آماده‌سازی نشاها

برای کشت ارقام، ظروف پلاستیکی به ابعاد ۱۰×۲۵×۳۰ سانتی‌متر با خاکی که از اطراف مزارع برنج تهیه شده بود، پرگردید. قبل از پرکردن، پنج قسمت خاک با یک قسمت ماسه بادی شسته شده و یک قسمت کود دامی کاملا پوسیده مخلوط گردید و به ازای هر کیلوگرم خاک یک گرم سولفات آمونیوم و یا اوره با آن مخلوط شد. بذور ابتدا وادار به جوانه‌زنی شدند و سپس روی خطوطی به فاصله ۲ سانتی‌متر در ظروف فوق کشت گردیدند. روی هر خط به ازای هر رقم ۱۵ تا ۱۷ بذر کشت شد. نشاها در مرحله ۴ تا ۵ برگی یعنی ۲۵-۲۱ روز بعد از کشت، برای مایه‌زنی (اسپورپاشی) مورد استفاده قرار گرفتند. یک هفته قبل از مایه‌زنی، نشاهای اضافی و ضعیف روی هر خط حذف و ده نشای مناسب و قوی به ازای هر رقم در هر خط باقی ماندند. همزمان با آن ۰/۲ گرم سولفات آمونیوم و یا اوره بصورت محلول در آب به خاک هرظرف اضافه گردید. به ازای هر جدایه دو تکرار از ارقام بطور همزمان برای ۲۶ لاین و رقم مایه‌زنی شدند. در بیشتر موارد هر مایه‌زنی دوبار تکرار گردید.

آماده سازی اسپور قارچ و مایه‌زنی

برای تولید اسپور، ابتدا میسلیوم قارچ روی محیط غذایی PDA حاوی ۴۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات استرپتومایسین درون تشتک پتری کشت شدند. بعد از ۱۰تا ۱۴ روز که پرگنه قارچ محیط کشت درون تشتک پتری را پوشاند، سطح آن به آرامی و به کمک اسکالپل خراشیده شد. میسلیوم‌های خرد شده روی محیط غذایی RBAS[2] (۲۰ گرم سبوس برنج + ۱۵ گرم آگار+ ۵ گرم ساکاروز) درون تشتک‌های پتری منتقل و پخش شدند (۵). به منظور تولید اسپور، تشتک‌ها به مدت یک هفته در شرایط دمایی آزمایشگاه زیر نور مداوم لامپهای فلورسنت ۱۸ وات (با فاصله تقریبی ۳۰ سانتی‌متر) نگهداری شدند (۸). آنگاه با شستن سطح محیط توسط آب مقطر سترون و عبور دادن آب از پارچه ململ چند لایه، سوسپانسیونی معادل ۷۵ میلی‌لیتر با غلظت $۱۰^{۵}$ ×۵-۱ اسپور در میلی‌لیتر برای هر جدایه بدست آمد. غلظت اسپور توسط لام گلبول شمار[3] اندازه‌گیری شد. برای مایه‌زنی، ۱۰ میکرولیترتوئین۲۰[4] به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون به آن اضافه گردید. مایه‌زنی بطور همزمان برای تمام ۲۶ رقم و لاین در ساعتهای بین ۵ تا ۷ بعد از ظهر انجام

1. International Rice Research Institute=IRRI

2. Rice Bran Agar Sucrose

3. Hemacytometer

4. Tween 20

گردید. برای این منظور نشاها به اتاق مخصوصی که از قبل برای این کار در نظر گرفته شده بود منتقل و با افشانه[1] بطور یکنواخت اسپورپاشی شدند. سپس نشاها به مدت ۲۴ ساعت به اتاقک مرطوب با رطوبت ۱۰۰٪ و دمای ۲۶°C-۲۴ منتقل شدند. آنگاه نشاها به درون گلخانه منتقل و برای هر جدایه، نشاها زیر مکعب‌های چوبی پوشانده شده با پلاستیک قرار داده شدند. به کمک دستگاه مه‌پاش[2] رطوبت درون اتاقک گلخانه در سطح ۹۵ تا ۱۰۰٪ تأمین گردید.

ارزیابی بیماری

ارزیابی بیماری ۷ تا ۱۰ روز پس از مایه‌زنی نشاها انجام گردید. برای این منظور، برگهای جوانی که هنگام مایه‌زنی در معرض اسپورهای قارچ قرار گرفته بودند، مورد ارزیابی قرار گرفتند. تیپ آلودگی براساس مقیاس صفر تا ۵ ارزیابی گردید که در آن واکنش میزبان به شش کلاس مختلف تقسیم گردید (۸، ۱۰). ارقامی که واکنش‌های نوع صفر تا دو را نشان دادند به عنوان مقاوم گروه‌بندی شده و با حرف «R» مشخص شدند. ارقام با واکنش نوع ۳ نسبتا حساس محسوب و با حروف «Ms» مشخص شدند. ارقامی که واکنش‌های نوع ۴ و ۵ را بروز دادند در گروه حساس قرار گرفته و با حرف «S» مشخص گردیدند. در تشخیص نژادها واکنش‌های صفر تا ۲ به عنوان مقاومت و واکنش‌های ۳، ۴ و ۵ به عنوان حساسیت در نظر گرفته شدند. برای نامگذاری و تفکیک نژادها از روش اتکینز و همکاران (۱۹۶۷) و لینگ و او (۱۹۶۹) استفاده به عمل آمد.

گروه‌بندی جدایه‌ها براساس تجزیه و تحلیل خوشه‌ای[3]

برای این کار نوع واکنش هر یک از ۲۶ رقم و لاین بکار رفته در این آزمایش بصورت حساس، نسبتا حساس و مقاوم ارزیابی شدند و جدول ماتریکس داده‌ها به صورت S، Ms و R تشکیل گردید. براساس این ماتریکس، میزان شباهت بین جدایه‌ها بصورت تعیین فاصله اقلیدسی[4] محاسبه گردید. براساس این روش، تفاوت بین هر جفت از جدایه‌ها از صفر (در صورتیکه تمام داده‌ها مشابه باشند) و۱۰۰٪ (در صورتیکه تمام داده‌ها متفاوت باشند) محاسبه شد. تجزیه کلاستر از نوع ترتیبی[5] با استفاده از روش وارد[6] (۱۹) در نرم‌افزار کامپیوتری Spss 7.5 انجام شد.

محاسبه تعداد واقعی نژادها

تعداد واقعی نژادها در یک جمعیت براساس تعداد نژادهای نادر[7] شناسایی شده در بین نمونه‌های انتخاب شده از آن جمعیت تخمین زده شد (۱۲). برای این منظور از فرمول $S = S_{obs} + (a^2/2b)$ استفاده شد. S_{obs} تعداد نژادهای شناسایی شده در جمعیت، a تعداد نژادهای یک جدایه‌ای و b ، تعداد نژادهای دو جدایه‌ای هستند.

نتایج

واکنش ارقام افتراقی استاندارد بین‌المللی

براساس واکنش ارقام افتراقی بین‌المللی، پنجاه جدایه بکار رفته در این آزمایش به شش نژاد فیزیولوژیک از گروه‌های نژادی IA، IC و IF تفکیک شدند. نژاد IC-25 با دارا بودن ۶۶٪ از جدایه‌ها نژاد غالب منطقه را تشکیل داد و نژاد IA-89، ۲۲٪ از جدایه‌ها را به خود اختصاص داد. مابقی جدایه‌ها (۱۲٪) متعلق به چهار نژاد IA-81، IC-26، IC-29 و IF-1 بودند (جدول ۲). دو نژاد IC-26 وIC-29 هر یک دارای دو جدایه و دو نژاد IA-81 و IF-1 نیز هر یک دارای یک جدایه بودند. به نژادهای تکجدایه‌ای در اصطلاح یکتایی[8] و نژادهای دوجدایه‌ای دوتایی[9] اطلاق می‌گردد (۱۶، ۱۹). نژادهای یک و دوجدایه‌ای نادر محسوب شده (۱۵، ۱۸) و با استفاده از تعداد این نژادها بر اساس ۵۰ جدایه آزمایش شده، تعداد واقعی نژادهای موجود در منطقه هفت نژاد تخمین زده شد. در بین ارقام، چهار رقم ان پی ۱۲۵، کانتو۵۱، شاتیائوتی سائو و کالورو با اکثر قریب به اتفاق جدایه‌ها سازگاری نشان دادند، بطوریکه ۱۰۰٪ جدایه‌ها با رقم شاتیائوتی سائو ۹۸٪ با رقم ان پی ۱۲۵ و ۹۶٪ جدایه‌ها با هر یک از دو رقم کانتو۵۱ و کالورو سازگار بودند. این نشان می‌دهد که اکثر جدایه‌های ایرانی *M. grisea* با ژنهای مقاومت *pi-k*[5] و *pi-k* سازگار بودند. برخلاف چهار رقم فوق، دو رقم زنیت و

1. Sprayer
2. Mister
3. Cluster analysis
4. Squared Euclidean Distance
5. Hierarchical
6. Ward's method
7. Rare pathotypes
8. Singlton
9. Doublton

یوسن در مقابل تمام جدایه‌ها ناسازگاری نشان داده و مقاوم بودند. رقم زنیت دارای ژنهای شناخته شده مقاومت *pi-z* ، *pi-l* و *pi-a* و رقم یوسن نیز دارای ژن مقاومت *pi-a* هستند (۱۶، ۱۹). آزمایش نشان داد که تمام جدایه‌ها در مقابل ژنهای فوق ناسازگار بودند. به عبارتی، جدایه‌ها فاقد ژنهای بیماریزایی برای غلبه بر ژنهای مقاومت فوق بوده و یا ژنهای *avr* مقابل هر یک از ژنهای مقاومت فوق در جدایه‌ها فعال نبود. یکی ار ارقام مقاوم دولار بودکه‌درمقابل تمام جدایه‌ها به جز یک جدایه از ژنوتیپ D ناسازگار بود، این رقم دارای ژن مقاومت $pi\text{-}k^a$ است. رقم رامیناد اس.تی.آر نیز در مقابل ۲۴٪ از جدایه‌ها سازگار بود.

همانطور که اشاره گردید کل جدایه‌های جمع‌آوری شده از نقاط مختلف استان گیلان قبلا براساس انگشت‌نگاری DNA در شش ژنوتیپ یا گروه انگشت‌نگاری مختلف گروه‌بندی شدند (۵). پنجاه جدایه بکار رفته در این آزمایش از ژنوتیپ‌های A، B، C، D، E و F انتخاب شدند. در این آزمایش جدایه‌های ژنوتیپ F (بزرگترین ژنوتیپ شناسایی شده در گیلان) در پنج نژاد و جدایه‌های ژنوتیپ A (دومین ژنوتیپ غالب در گیلان) در سه نژاد قرار گرفتند. حتی جدایه‌های ژنوتیپ کوچک E نیز در دو نژاد قرار گرفتند (جدول ۳). در بین نژادها، سه نژاد IC-26، IC-29 و IF-1 برای اولین باردرایران شناسایی شده‌اند.

واکنش لاینهای‌افتراقیNILs در مقابل جدایه‌های *M. grisea*

برخلاف ارقام افتراقی استاندارد، لاینهای NILs با زمینه ژنتیکی رقم CO39 تنوع چندانی از نظر واکنش در مقابل جدایه‌های آزمایش شده نشان ندادند و پنجاه جدایه به دو نژاد A و B تفکیک شدند (۱۴). نژاد A، ۹۸٪ از جدایه‌ها را شامل گردید و نژاد B فقط ۲٪ از جدایه‌ها را در خود جای داد (جدول ۳). در واقع فقط یک جدایه از ژنوتیپ D با ژن مقاومت *pi-3(t)* سازگار بود و توانست بر آن غلبه یابد. نکته جالب در این آزمایش آن بود که نژاد B یکتایی بود و جدایه تشکیل دهنده آن نیز در آزمایش روی ارقام افتراقی استاندارد در یک نژاد یکتایی به نام IA-81 گروه‌بندی گردید. این جدایه با غلبه بر ژن مقاومت *pi-3(t)*، باعث بروز واکنش سازگاری در لاین C104 PKT گردید. همین جدایه در بین ارقام استاندارد، با رقم دولار که حامل ژن مقاومت $pi\text{-}k^a$ بود، نیز سازگار بود. رقم CO39 که والد پنج لاین NILs هست نیز در این آزمایش با جدایه فوق واکنش نیمه حساس نشان داد.

واکنش ارقام ایرانی در مقابل جدایه های قارچ *M. grisea*

دوازده رقم ایرانی بکار رفته در این آزمایش واکنش‌های نسبتا متفاوتی در مقابل جدایه‌های قارچ نشان دادند. براساس واکنش این ارقام پنجاه جدایه قارچ در هفت فرم بیماری‌زایی مشخص قرار گرفتند که به ترتیب با اسامی GL1، GL2،GL3، GL4، GL5، GL6 و GL مشخص شدند (جدول ۴). حروف GL برگرفته از کلمه GUILAN بودند.

در نتیجه این آزمایش، چهار رقم بینام، حسن‌سرایی، علی‌کاظمی و دمسیاه در مقابل تمام جدایه‌ها سازگار بودند و واکنش آنها به صورت حساس و یا نیمه حساس بود. به عبارتی این ارقام علاوه بر جدایه‌های جمع‌آوری شده از روی خود این ارقام، در مقابل سایر جدایه‌ها نیز سازگار بودند. در مقابل، سه رقم خزر، سنگ‌طارم و نعمت در مقابل تمام جدایه‌ها ناسازگار بودند. خزر یک رقم اصلاح شده مقاوم و پرمحصول می‌باشد که از تلاقی ارقام خارجی بدست آمده است. براساس مشاهدات مزرعه‌ای، این رقم نسبت به بلاست برگی مقاوم ولی نسبت به بلاست گردن خوشه نسبتا حساس است. سنگ‌طارم که یک رقم محلی و اصلاح نشده محسوب می‌گردد، در مقابل تمام جدایه‌ها مقاوم بود. نعمت و ندا نیز دو رقم اصلاح شده هستند که در سالهای اخیر به کشاورزان معرفی شده و واکنش آنها در مقابل جدایه‌ها از نوع مقاوم بود. به استثناء یک جدایه که واکنش رقم ندا در مقابل آن نیمه حساس بود. ارقام اصلاح نشده و محلی دم‌زرد، هاشمی، سنگجو و حسنی نیز فقط در مقابل ۲ تا ۲۲٪ از جدایه‌ها ناسازگار بودند (جدول ۴).

فرم بیماری‌زایی GL1 با دربرگرفتن ۶۸٪ از جدایه‌ها در بین فرمهای بیماری‌زایی غالب بود و جدایه‌های ژنوتیپ‌های A، C، E و F در این فرم قرار گرفتند. در این فرم بیماری‌زایی فقط چهار رقم سنگ طارم، خزر، نعمت و ندا در مقابل جدایه‌ها مقاوم بودند و سایر ارقام واکنش‌های حساس تا نیمه‌حساس را بروز دادند (جدول ۴). فرم بیماریزایی GL3 با ۲۰٪ از جدایه‌ها دومین فرم غالب بود که جدایه‌هایی از ژنوتیپهای A، C، D و F در آن قرار گرفتند. فرم بیماری‌زایی GL2 دوتایی و فرمهای بیماری‌زایی GL4، GL5، GL6 و GL7 همگی یکتایی بودند و بعنوان فرمهای بیماری‌زایی نادر محسوب شدند. در نتیجه، تعداد واقعی فرمهای بیماری‌زایی در منطقه ۱۵ فرم تخمین زده شد.

جدول ۱- واکنش هشت رقم افتراقی استاندارد بین‌المللی در مقابل جدایه‌های *Magnaporthe grisea*

رقم	نوع ژن مقاومت شناسایی شده	نژادهای فیزیولوژیک					
		IA-89	IA-81	IC-25	IC-26	IC-29	IF-1
Raminad Str.3	_	S	S	R	R	R	R
Zenith	pi-z, pi-I, pi-a	R	R	R	R	R	R
NP-125	_	S	S	S	S	S	R
Usen	pi-a	R	R	R	R	R	R
Dular	pi-k[a]	R	S	R	R	R	R
Kanto 51	pi-k	S	S	S	S	R	S
Sha-tiao-tsao-S	pi-k[5]	S	S	S	S	S	S
Calora	pi-k[5]	S	S	S	R	S	S
تعداد جدایه ها		۱۱	۱	۳۳	۲	۲	۱
فراوانی جدایه ها (درصد)		۲۲	۲	۶۶	۴	۴	۲

جدول ۲- تنوع نژادهای فیزیولوژیک در ژنوتیپ‌های شناسایی شده در جمعیت *Magnaporthe grisea* در گیلان

ژنوتیپ *	تعداد جدایه	تعداد نژاد	تعداد جدایه در نژاد					
			IA-81	IA-89	IC-25	IC-26	IC-29	IF-1
A	۱۱	۳	-	٦	٤	-	۱	-
B	۱	۱	-	-	۱	-	-	-
C	۲	۱	-	-	۲	-	-	-
D	۱	۱	۱	-	-	-	-	-
E	٦	۲	-	-	۵	۱	-	-
F	۲۹	۵	-	۵	۲۱	۱	۱	۱

* شش ژنوتیپ قارچ *Magnaporthe grisea* که براساس انگشت‌نگاری DNA جدایه‌های مختلف قارچ، جمع‌آوری شده از نقاط مختلف استان گیلان به کمک تکنیک rep-PCR شناسایی شدند (۵). سه ژنوتیپ A، B، C در تجزیه تحلیل مولکولی تعداد ۴-۷ جدایه را به خود اختصاص داده بودند در حالیکه بیشترین تعداد جدایه‌ها در ژنوتیپهای A و F قرار گرفتند. به همین خاطر بیشتر جدایه‌های بکار رفته در این آزمایش متعلق به این دو ژنوتیپ بودند.

جدول ۳- واکنش لاینهای افتراقی برنج در مقابل پنجاه جدایه *Magnaporthe grisea* در گیلان

لاینهای افتراقی NILs	نوع ژن مقاومت	نژادهای شناسایی شده	
		A	B
C101LAC	Pi-1(t)	R	R
C101A51	Pi-2(t)	R	R
C104PKT	Pi-3(t)	R	S
C101PKT	Pi-4[a]	R	R
C105TTP-4L23	Pi-4[b]	R	R
رقم CO39[۲]	نامعلوم	R	Ms
تعداد جدایه	-	۴۹	۱

۱: در هر لاین فقط یک ژن مقاومت اصلی قرار داده شده و لاین‌ها فقط در نوع ژن مقاومت با هم تفاوت دارند و از نظر سایر خصوصیات ژنتیکی و فنوتیپی شبیه هستند.

۲: لاین‌های NILs در زمینه ژنتیکی این رقم که بسیار به بیماری بلاست حساس است، ایجاد شده‌اند.

جدول ۴- واکنش ارقام ایرانی در مقابل جدایه‌های *Magnaporthe grisea*

رقم	نوع رقم	فرم بیماری‌زایی *						
		GL1	GL2	GL3	GL4	GL5	GL6	GL7
بینام	محلی	S	S	S	S	S	S	S
حسن‌سرایی	محلی	S	S	S	S	S	S	S
سنگجو	محلی	S	S	S	S	S	R	R
خزر	اصلاح شده	R	R	R	R	R	R	R
علی‌کاظمی	محلی	S	S	S	S	S	S	S
سنگ‌طارم	محلی	R	R	R	R	R	R	R
حسنی	محلی	S	R	S	R	S	R	R
هاشمی	محلی	S	R	S	S	R	S	S
دمسیاه	محلی	S	S	S	S	S	S	S
دم‌زرد	محلی	S	R	S	S	S	S	S
نعمت	اصلاح شده	R	R	R	R	R	R	R
ندا	اصلاح شده	R	R	R	R	R	R	S

* برای نامگذاری فرمهای بیماری‌زایی از قاعده خاصی پیروی نشد و اسامی آنها به صورت اختیاری انتخاب شدند. برای نامگذاری از دو حرف کلمه GUILAN که با یک شماره همراه بود، استفاده گردید. از آنجائیکه ارقام ایرانی بکار رفته در این بخش از آزمایش به عنوان ارقام افتراقی محسوب نمی‌شد، از اصطلاح فرم بیماری‌زایی به جای نژادهای فیزیولوژیک استفاده گردید.

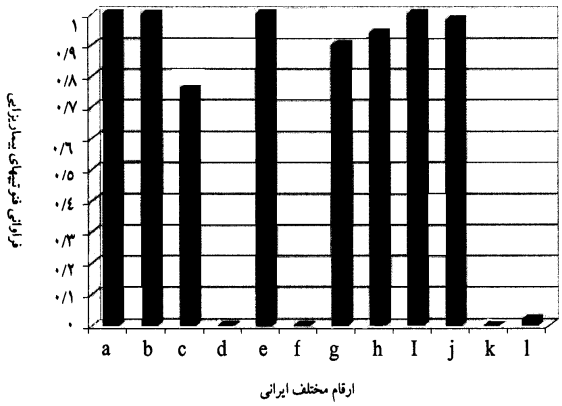
۴-گروهبندی جدایه‌های *M. grisea* براساس واکنش مجموع ۲۶ رقم و لاین

براساس واکنش مجموع ۲۶ رقم و لاین بکار رفته در این آزمایش (در حالتیکه همه ۲۶ رقم و لاین دارای ارزش یکسان بوده و به عنوان یک گروه واحد ارقام افتراقی بکار رفتند)، پنجاه جدایه آزمایش شده به سیزده فرم بیماری‌زایی تفکیک شدند. بطوریکه جدایه‌های هر کدام از دو ژنوتیپ A و F در چندین فرم بیماری‌زایی قرار گرفتند. یعنی برای ژنوتیپ A چهار و برای ژنوتیپ F یازده فرم بیماری‌زایی شناسایی شدند. فرم‌های بیماری‌زایی با دو حرف BL که با یک شماره همراه بود نامگذاری شدند. این دو حرف از روی کلمه BLAST اقتباس شده بود. در بین ۲۶ رقم و لاین، پنج رقم شاتیائوتی سائواس، بینام، حسن‌سرایی، علی‌کاظمی و دمسیاه در مقابل تمام جدایه‌ها سازگار بودند. در حالیکه پنج رقم زنیت، یوسن، خزر، سنگ‌طارم و نعمت و چهار لاین C101LAC، C101151، C101PKT و C105TTP-4L23 در مقابل تمام جدایه‌ها مقاوم بودند. براساس واکنش مجموع ۲۶ رقم و لاین تک‌جدایه ژنوتیپ D در یک فرم بیماریزایی مشخص و جدا قرار گرفت، همانطور که با بکارگیری هشت رقم استاندارد بین‌المللی نیز در یک نژاد جداگانه قرار گرفت.

۵- فراوانی فنوتیپ‌های بیماری‌زایی[1] جدایه‌های *M. grisea*

فراوانی فنوتیپ‌های بیماری‌زایی (مجموع تعداد واکنش‌های سازگار تقسیم بر کل جدایه‌های آزمایش شده روی یک رقم معین) برای ۲۶ رقم و لاین بکار رفته در این آزمایش محاسبه گردید و دامنه آن بسته به نوع رقم از صفر (۰/۰۰) تا یک (۱/۰۰) بود. صفر بیانگر آنست که یک رقم در مقابل تمام جدایه‌ها مقاوم و یک نشان می‌دهد که در مقابل تمام جدایه‌ها حساس است. برآورد فراوانی فنوتیپ بیماری‌زایی معیاری برای مقایسه ارقام مختلف در مقاومت به بلاست برگی در شرایط گلخانه است (۱۶، ۱۹). در نتیجه، در بین ۲۶ رقم، نه رقم در مقابل تمام جدایه‌ها مقاوم بودند که از بین آنها سه رقم ایرانی بودند. همچنین برای پنج رقم فراوانی فنوتیپهای بیماری‌زایی ۱/۰۰ محاسبه گردید که در مقابل تمام جدایه‌ها حساسیت نشان دادند. فراوانی فنوتیپ‌های بیماری‌زایی تا حدودی در بین ارقام ایرانی فرق می‌کرد، بطوریکه برای تعدادی از ارقام ۱/۰۰ و برای تعدادی دیگر صفر محاسبه گردید. بقیه ارقام که همگی محلی محسوب می‌شدند، دامنه فراوانی بیماری‌زایی در آنها از ۰/۷۶ تا ۰/۹۸ متفاوت بود (شکل ۱).

1. Virulence Phenotypes



شکل ۱- فراوانی فنوتیپهای بیماریزای قارچ *Magnaporthe grisea* روی ارقام ایرانی، این ارقام شامل a- بینام، b- حسن سرایی، c- سنگجو، d – خزرe – علی کاظمی f – سنگ طارم، g – حسنی، h – هاشمی، i – دمسیاه، j –دم زرد، k – نعمت و l – ندا هستند.

تجزیه و تحلیل فراوانی جدایه‌های سازگار نشان داد که این جدایه‌ها گرایش خاصی به طرف میزبان‌هایی که از آنها جدا شده بودند، نشان ندادند. به عبارت دیگر ارتباط اختصاصی بین میزبان و جدایه‌های آزمایش شده مشاهده نگردید و اغلب جدایه‌ها قادر بودند، تعداد زیادی از ارقام حساس را که از آنها جدا نشده بودند، آلوده نمایند.

۶- گروه‌بندی جدایه‌های قارچ *M. grisea* براساس بیماریزایی و تجزیه و تحلیل خوشه‌ای

براساس سه واکنش R، Ms و S ارقام (۲۶ رقم و لاین) در مقابل ۵۰ جدایه آزمایش شده، تجزیه خوشه‌ای به کمک روش وارد (۱۸) انجام گردید و جدایه‌ها دو به دو مقایسه شدند. در نهایت جدایه‌ها در هشت کلاستر (شکل ۲) با شماره‌های یک تا هشت قرار گرفتند. این تجزیه و تحلیل نشان داد که به کمک تجزیه خوشه‌ای نیز می‌توان جدایه‌های قارچ را براساس الگوی بیماری‌زایی مشخص روی تعداد معینی از ارقام گروه‌بندی کرد ولی باید توجه داشت که در جدایه‌های تشکیل دهنده هر کلاستر تشابه الگوی بیماری‌زایی صددرصد نبوده بلکه حداکثر است. در حالیکه جدایه‌های تشکیل دهنده هر نژاد و یا فرم بیماری‌زایی از نظر بیماری‌زایی روی تعداد معینی از ارقام صد در صد مشابه هستند.

بحث

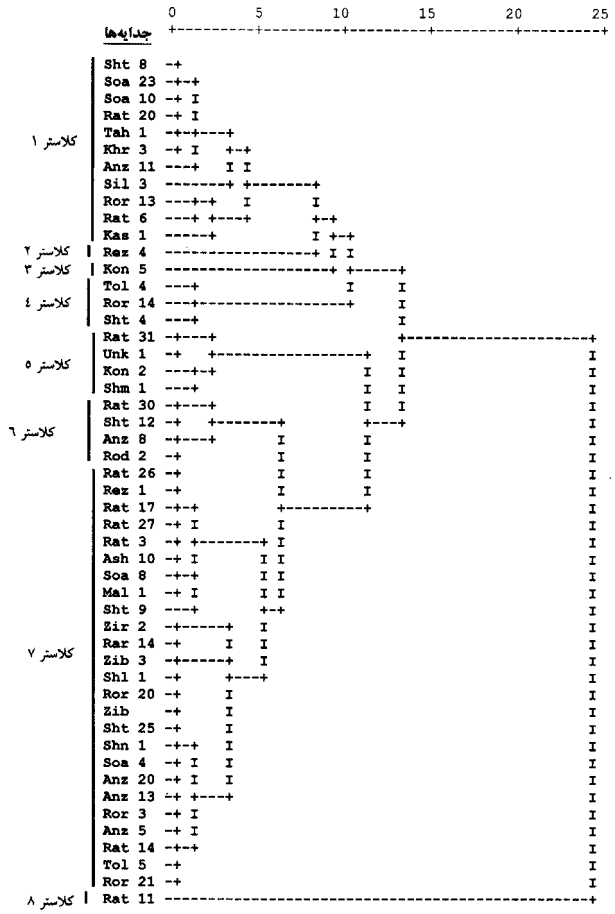
دانستن تعداد نژادهای فیزیولوژیک *M. grisea* و نحوه گسترش آنها در هر منطقه می‌تواند برای برنامه‌های اصلاح ارقام برنج جهت بدست آوردن رقم مقاوم در مقابل آن بسیار مهم باشد (۲۲). لاین‌های اصلاح شده که در برنامه‌های اصلاح ارقام ایجاد می‌شوند باید در منطقه‌ای که نژادهای قارچ تنوع کافی را نشان می‌دهند، ارزیابی و انتخاب شوند (۱۶، ۲۲). با مورد آزمایش قرار دادن پنجاه جدایه انتخاب شده از شش ژنوتیپ A، B، C، D، E و F که قبلا با انگشت‌نگاری DNA جدایه‌های قارچ شناسایی شده بودند (۵)، روی ۲۶ رقم و لاین برنج در شرایط کنترل شده گلخانه معلوم گردید که جمعیت قارچ از نظر بیماری‌زایی در مزارع گیلان نسبتا متنوع هستند. در این آزمایش سعی گردید حتی‌الامکان از هر ژنوتیپ، جدایه یا جدایه‌هایی انتخاب شوند که از روی ارقام متنوع در مناطق مختلف گیلان طی سالهای ۷۸-۱۳۷۶ جمع‌آوری شده بودند.

به کمک هشت رقم افتراقی استاندارد بین‌المللی در مجموع شش نژاد فیزیولوژیک شناسایی گردید که نژاد IC-25 نژاد غالب منطقه بود. دو نژاد IA-81 و IA-89 قبلا از گیلان گزارش شده بودند (۱) ولی چهار نژاد IC-25، IC-26، IC-29 و IF-1 برای گیلان و ایران جدید بودند. اگر چه تعداد جدایه‌های بکار گرفته شده در این آزمایش زیاد نبود ولی با وجود آن تعدادی از نژادهای شناسایی شده برای منطقه جدید بودند. از آنجائیکه تعدادی نژاد یک و دوجدایه‌ای که نادر محسوب می‌شوند (۱۶، ۱۹)، شناسایی گردیدند، می‌توان ادعا کرد که باید تعداد اینگونه نژادهای کم‌جمعیت در منطقه زیادتر از این باشند، که با بررسی تعداد بیشتری از جدایه‌ها و افزودن بر تعداد ارقام افتراقی، مسلما نژادهای جدید دیگری نیز شناسایی خواهند شد.

نکته بعدی در مورد ژنهای مقاومت شناخته شده در ارقام افتراقی استاندارد است. در دو رقم زنیت و یوسن ژن مقاومت شناسایی شده *pi-a* است که در هر دو مشترک می‌باشد. تمام جدایه‌های بکار رفته در این آزمایش و حتی آزمایش‌های قبلی (۱، ۲، ۳ ، ۴) در مقابل دو رقم یاد شده ناسازگاری نشان دادند. می‌توان نتیجه گرفت که باید ژن غیر بیماریزای مقابل ژن مقاومت *pi-a* در جدایه‌های ایرانی وجود داشته باشد که تقابل این دو ژن باعث بروز واکنش ناسازگاری شده است. در واقع ممکن است پدیده ژن برای ژن[1] در بروز این واکنش دخالت

1. Gene for gene

داشته باشد. برای رقم دولار با ژن مقاومت $pi\text{-}k^a$ نیز چنین وضعیتی در مقابل ۹۸٪ از جدایه‌ها مشاهده گردید. ولی همین رقم در مقابل یک جدایه سازگاری نشان داد و لکه‌های بیماری بطور واضحی روی آن تشکیل گردیدند.



شکل ۲- فنوگرام ایجاد شده بر اساس روش وارد (۱۹) برای ۵۰ جدایه قارچ *Magnaporthe grisea*، متعلق به شش کلون شناسایی شده بین جدایه‌های جمع‌آوی شده از نقاط مختلف گیلان. این فنوگرام بر اساس مقایسه الگوی بیماریزایی (حساس، نیمه حساس و مقاوم) ایزوله‌ها روی ۲۶ رقم و لاین افتراقی برنج ایجاد گردید. تجزیه کلاستر از نوع hierarchical cluster analysis به صورت تعیین فاصله اقلیدسی در نرم‌افزار SPSS7.5 انجام گردید.

در این آزمایش از لاینهای افتراقی NILs نیز بعنوان میزبان‌های افتراقی برای تفکیک نژادهای فیزیولوژیک استفاده گردید. این لاینها فقط در حمل یک ژن مقاومت اصلی با هم تفاوت دارند. به کمک این لاینها پنجاه جدایه آزمایش شده در دو نژاد A و B قرار گرفتند. یکی از نژادها یک‌جدایه‌ای و دیگری بقیه جدایه‌ها را در خود جای داد. برخلاف انتظاری که از این لاینها می‌رفت، نتوانستند نژادهای شناسایی شده به کمک ارقام استاندارد را بیشتر تفکیک کنند. آزمایش نشان داد که اکثریت قریب به اتفاق جدایه‌ها ژن *avr* مقابل تمام ژنهای مقاومت موجود در این لاینها را دارند. به استثناء یک جدایه که فاقد ژن *avr* مقابل ژن مقاومت *pi-3(t)* بود و لذا واکنش این جدایه با لاین حامل این ژن (C104 PKT) بصورت سازگاری بروز کرد. همین جدایه در آزمایش روی ارقام افتراقی استاندارد نیز توانست بر ژن مقاومت رقم دولار غلبه نماید. می‌توان نتیجه گرفت که این تک جدایه از نظر ژنتیکی با بقیه جدایه‌ها تفاوت دارد.

جدایه‌هایی که در طبیعت از روی ارقام معین بدست آمده بودند، در این آزمایش نیز همان رقم را در مرحله برگی آلوده کردند به جز جدایه‌های جداشده از رقم خزر که از گردن خوشه آلوده جدا شده بودند، نتوانستند روی این رقم در مرحله برگی بیماریزا باشند ولی روی سایر ارقام بیماریزا بودند. در این مطالعه ارتباط پیچیده‌ای بین ژنوتیپ‌های شناسایی شده به کمک rep-PCR و نژادها مشاهده گردید. در ژنوتیپ F که پرجمعیت‌ترین ژنوتیپ شناسایی شده در شمال ایران بود و در اکثر مناطق برنجکاری گیلان و مازندران جدایه‌های آن یافت شدند (۵)، هیچ ارتباط خاصی با نژادها خاصی نداشت. جدایه‌های این ژنوتیپ در پنج نژاد از شش نژاد بین‌المللی شناسایی شده به کمک ارقام استاندارد قرار گرفتند که بیشترین آنها در نژاد IC-25 گروه‌بندی شدند (جدول۱). در میان ۱۳ فرم بیماری‌زایی شناسایی شده براساس واکنش ۲۶ رقم و لاین، جدایه‌های این ژنوتیپ در فرمهای بیماری‌زایی مختلف قرار گرفتند بطوریکه تعدادی از این فرمها تک‌جدایه‌ای بودند. تمام جدایه‌های ژنوتیپ A نیز در یک نژاد معین قرار نگرفتند بلکه جدایه‌های آن به سه نژاد بین‌المللی تقسیم شدند. با در نظر گرفتن واکنش ۲۶ لاین و رقم نیز جدایه‌های ژنوتیپ A به سه فرم بیماری‌زایی تفکیک شدند. در عوض تک‌جدایه ژنوتیپ D که در این آزمایش استفاده شد بطور مستقل یک نژاد مجزا را تشکیل داد. اینکه واقعا سایر جدایه‌های این ژنوتیپ نیز در همین نژاد قرار بگیرند نیاز به بررسی تعداد بیشتری ازجدایه‌ها دارد. در هر صورت، می‌توان نتیجه گرفت جدایه‌های هر ژنوتیپ گرچه از نظر الگوی

DNA روی ژل بسیار به هم شباهت دارند و با هم در یک گروه ژنتیکی قرار می‌گیرند ولی از نظر بیماری‌زایی ممکن است متنوع باشند و حتی مثل جدایه‌های ژنوتیپ F خیلی متنوع باشند. در هرصورت‌دانستن‌تعداد نژادهای موجود در هر ژنوتیپ قارچ، برای ارزیابی لاینهای اصلاحی در حال معرفی بسیار ضروری است.

جدایه‌های آزمایش شده براساس تجزیه و تحلیل خوشه‌ای تیپ‌های بیماری‌زایی در هشت کلاستر قرار گروه‌بندی شدند که کلاستر ۷ با بیشترین تعداد جدایه‌ها بزرگترین کلاستر بود (شکل ۲). نکته قابل توجه در این تجزیه و تحلیل، جدایه‌های ژنوتیپ F بودند که در هفت کلاسترپخش بودند. در واقع اغلب کلاسترها را جدایه‌های این ژنوتیپ اشغال کردند. نتیجه بدست آمده تا حدود زیادی گروه‌بندی جدایه‌ها را براساس نژاد تأئید نمود و معلوم گردید که جدایه‌های این ژنوتیپ از نظر بیماری‌زایی تنوع زیادی دارند. در عوض هر شش جدایه ژنوتیپ E در کلاستر ۷ قرار گرفتند. جدایه‌های این ژنوتیپ از نظر بیماری‌زایی شباهت زیادی به جدایه‌های ژنوتیپ F نشان دادند، بطوریکه اغلب آنها همراه با تعداد زیادی از جدایه‌های ژنوتیپ F نژاد IC-25 را تشکیل دادند و در تجزیه کلاستر نیز همراه با جدایه‌های ژنوتیپ F در کلاستر ۷ قرار گرفتند. حتی وقتی ۲۶ لاین و رقم به عنوان معیار برای تفکیک نژادها بکار رفتند تمام جدایه‌های این ژنوتیپ همراه با جدایه‌های ژنوتیپ F در فرم بیماری‌زایی Bl-2 قرار گرفتند.

نتایج بدست آمده از این تحقیق می‌تواند در ارزیابی ارقام برنج برای رسیدن به مقاومت پایدار در آینده بکارگرفته شود. علاوه بر آن ۱۲ رقم ایرانی برای اولین بار با استفاده از جدایه‌های متنوع مورد ارزیابی قرار گرفتند و رقم سنگ طارم به عنوان یکی از ارقام محلی بود که در مقابل تمام جدایه ها مقاوم بود. این رقم به عنوان یک والد می تواند در برنامه های اصلاحی بکار گرفته شود.

سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از طرح بلاست برنج به شماره ۱/۳۰۸/ ۷۱۸ می‌باشد که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران در آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی مؤسسه تحقیقات برنج در رشت انجام گردید. بدینوسیله نگارندگان از همکاریهای آن معاونت محترم و مسولین موسسه و زحمات بیدریغ سرکارخانم فتانه بخشی‌زاد به خاطر همکاری در انجام آزمایشات گلخانه‌ای کمال قدردانی را به عمل می‌آورند.

مراجع مورد استفاده REFERENCES

۱. ایزدیار، م. ۱۳۶۱. معرفی تعدادی از نژادهای فیزیولوژیک قارچ بلاست برنج *Pyricularia oryzae* (Cav.) در استان گیلان. نشریه بیماریهای گیاهی ۱۸: ۵۷-۵۲

۲. ایزدیار، م. و ف. پاداشت. ۱۳۷۷. معرفی چهار نژاد فیزیولوژیک جدید قارچ *Magnaporthe grisea* در استان گیلان. چکیده مقالات پنجمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. ص ۱۶۷.

۳. بهرامی، م. و م. ایزدیار. ۱۳۷۷. معرفی نژادهای فیزیولوژیک جدید *Pyricularia oryzae*، عامل بیماری بلاست برنج در استان مازندران. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۷۳.

۴. بهرامی، م. و ع. فروتن. ۱۳۷۲. شناسایی نژادهای فیزیولوژیک قارچ *Pyricularia oryzae*، عامل بیماری بلاست برنج در استان مازندران. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۶۶.

۵. جوان نیکخواه، م. ۱۳۸۰. تحقیق روی تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr عامل بیماری بلاست برنج، با استفاده از خصوصیات مولکولی، بیماریزایی و سازگاری رویشی در استان گیلان. رساله دکتری در رشته بیماری شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. ۱۶۸ صفحه.

۶. جوان نیکخواه، م. و ق. حجارود. ۱۳۷۹. مطالعه نژادهای فیزیولوژیک قارچ *Magnaporthe grisea* عامل بیماری بلاست در گیلان. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۲۴۵.

۷. نیکبخت م. و ج. فاطمی. ۱۳۷۲. وقوع نژادهای فیزیولوژیکی *Pyricularia oryzae* در جنوب ایران، در سالهای ۶۹-۱۳۶۷. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص۷۶.

8. Atkins, J. G., A. L. Robert, C. R. Adair, K. Goto, T. Kozaka, R. Yanagida, M. Yamada & S. Matsumoto. 1967. An international set of rice varieties for differentiating races of *Piricularia oryzae*. Phytopathology 57: 291-307.
9. Barr, M. E. 1977. *Magnaporthe*, *Telimenella* and *Hyponectria* (Physosprellaceae). Mycologia 69: 952-966.
10. Bonman, J. M., T. I. Vergel de Dios, J. M. Bandong, & E. J. Lee. 1987. Pathogenic variability of monocondial isolates of *Pyricularia oryzae* in Korea and in the Philippine. Plant Disease 41: 124-130.
11. Chen, H. L., B. T. Chen, D. P. Zhang, Y. F. Xie & Q. Zhang. 2001. Pathotypes of *Pyricularia grisea* in rice fields of central and southern China. Plant Disease 85: 843-850.
12. Coleowell, R. K. & J. A. Coddington. 1995. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. In: Biodiversity Measurement and Estimation. D. L. Hawksworth, ed. The Royal Society and Chpman and Hall, London. pp 101-118.
13. Ling, K. C. & S. H. Ou. 1969. Standardization of the international race numbers of *Pyricularia oryzae.* Phytopathology 59: 339-342.
14. Ling, Z. Z.; T. V. Mew; J. Wang; C. Lei & N. Huang. 1995. Development of near- isogenic lines as international differentials of the blast pathogen. International Rice Research Notes 20 (1):13.
15. Mackill, D. J. & J. M. Bonman. 1992. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. Phaytopathology 82: 746-749.
16. Mekwatanakarn, P.; W. Kositratana; M. Levy & R. S. Zeigler. 2000. Pathotype and avirulence gene diversity of *Pyricularia grisea* in Thailand as determined by rice near- isogenic lines for major resistance genes. Plant Disease 84: 60-70.
17. Ou, S. H. 1985. Rice diseases (2nd edn.). Commonwealth Agric. Bureaux. 380 pp.
18. Rosman, A. Y.; R. J. Howard & B. Valent. 1990. *Pyricularia griea*, the correct name for the rice blast disease fungus. Mycologia 82:509-512.
19. Thinlay; R. S. Zeigler & M. R. Finckh. 2000. Pathogenic variability of *Pyricularia grisea* from the high- and mid-elevation zones of Bhutan. Phytopathology 90: 621-628.
20. Ward, J. H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. J. American Stat. Assoc. 58:236-245.
21. Yaegashi, H. & S. Udagawa. 1987. The taxonomical identity of the perfect state of *Pyricularia grisea* and its allies. Canadian Journal of Botany 56: 180-183.
22. Zeigler, R. S.; J. Thome; M. Levy & F. Correa- Victoria. 1994. Lineage exclusion: A proposal for linking blast population analysis to resistance breeding. In: Rice Blast Disease. R. S. Zeigler, S. A. Leong, P. S. Teng, eds. Commonwealth Agricultural Bureau International, Wallingford , UK. pp 267-292.

A Study of Pathogenic Diversity in Population of *Magnaporthe grisea*, Causal Agent of Rice Blast Disease in Guilan Province, Iran

M. JAVAN-NIKKHAH[1], GH. HEDJAROUDE[2], A. SHARIFI-TEHRANI[3] AND S. M. OKHOVVAT[4]

1, 2, 3, 4, Assistant Professor and Professors, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran

Accepted Feb. 5, 2003

SUMMARY

Fifty monoconidial isolates of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea,*belonging to six rep-PCR *Pot2* lineages collected from 11 rice cultivars in 14 cities in Guilan province were analyzed for virulence during 1997-99. Differential varieties were international standard cultivars set, indica CO39 with five near-isogenic lines (NILs) for resistance genes in the background of CO39 and twelve selected Iranian cultivars. These isolates were classified into six pathogenic races based on their virulence to eight international differential varieties. These international races belonged to three race groups IA, IC, and IF. The races IC-26, IC-29 and IF-1 were newly identified in Iran and the IC-25 with 33 isolates was being the most common race in Guilan. In this study, the differentiating ability of the set of NILs was evaluated by comparison with those international differentials and Iranian cultivars. The set of five NILs was able to differentiate 50 isolates into two pathotypes (races) in which one isolate represented pathotype ″ A ″ and 49 were grouped into pathotype ″ B ″. However, the differentiating ability of NILs was not sufficient as compared with that of international differential set and Iranian cultivars. Reaction patterns of twelve Iranian cultivars to 50 isolates belonging to different international races (based on their virulence to the international differentials) could be classified into seven pathogenicity forms. Based on all 26 cultivars and NILs as a differential set, the fifty isolates differentiated into 13 pathogenicity forms. The results revealed that the international race system did not fully describe the virulence spectrum of the isolates, since several races could be further differentiated into different pathotypes when Iranian cultivars were taken to be used as differentials. Among Iranian cultivars examined, local cultivars Binam, Hasansaraii, Alikazemi and Domsiah were fully compatible, whereas, Sangtaroom (another local cultivar), Khazar and Nemat (two improved cultivars) were fully incompatible to all isolates tested. Therefore, the frequency of virulent phenotypes on the 12 Iranian cultivars tested ranged from 0.0 to 1.0. Sangtaroom as an unimproved and local cultivar was incompatible to all isolates, so that its virulence phenotype was 0.0. As a result, due to resistance of this cultivar to all identified races in Guilan province, it can be used as a useful parent in breeding programs in future.

Key words: Blast disease, *Magnaporthe grisea*, Pathogenic diversity, Differential cultivars.