دانشکده علوم کشاورزی

گروه گیاهپزشکی

(بیماری شناسی گیاهی)

عنوان:

اتیولوژی سوختگی غلاف برگ برنج در استان فارس

از:

سید محمد زارعیان جهرمی

استادان راهنما:

دکتر سید علی الهی‌نیا

دکتر فریدون پاداشت دهکائی

اسفند ۱۳۹۰

دانشکده علوم کشاورزی

گروه گیاهپزشکی

(بیماری شناسی گیاهی)

عنوان:

اتیولوژی سوختگی غلاف برگ برنج در استان فارس

از:

سید محمد زارعیان جهرمی

استادان راهنما:

دکتر سید علی الهی‌نیا

دکتر فریدون پاداشت دهکائی

استادان مشاور:

سید اکبر خداپرست

فخرالسادات خسروفر

بسم الله الرحمن الرحيم

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم به پاس زحماتشان و

خواهران مهربانم...

ستایش مخصوص خدایی است که نخستین وجود است و هیچ چیز قبل از او نبوده است و آخرش وجود است که هیچ چیز بعد از او نخواهد بود.

اکنون که به یاری پروردگار بی همتا یکی دیگر از مقاطع تحصیلی خود را به پایان رسانده ام، وظیفه خود می دانم از کسانی که در به پایان رساندن این پژوهش مرا یاری نموده اند، قدردانی نمایم.

احترام، امتنان و سپاس قلبی خود را نثار همه آموزگارانم نموده، از خداوند متعال برای ایشان سلامتی و امتنان آرزومندم.

از اساتید راهنمای محترم این پایان نامه آقایان دکتر سید علی الهی نیا و دکتر فریبرز پیدون پاداشت دهکایی به خاطر ارائه رهنمودهای ارزنده تجربیات گرانبهایشان در پیشبرد اهداف این تحقیق، صمیمانه سپاسگزاری می نمایم.

از اساتید محترم جناب آقای دکتر سید اکبر خداپرست و سرکار خانم مهندس خسرو فر به عنوان ساتید مشاور این پایان نامه که در اجرای این تحقیق همواره از نظرات ارزنده شان بهره بردم، کمال امتنان را دارم.

از استاد بزرگوار سرکار خانم دکتر صدیقه موسی نژاد و دکتر احمد روحی بخش به خاطر قبول زحمت داوری این پایان نامه سپاسگزارم.

از کلیه اساتید محترم گروه گیاهپزشکی، بخصوص مدیر محترم گروه جناب آقای قدمیاری و جناب آقای دکتر بیگلوئی نماینده محترم تحصیلات تکمیلی کمال سپاسگزاری را دارم.

از کارکنان محترم موسسه تحقیقات برنج کشور خصوصاً بخش گیاهپزشکی و آقایان دکتر مجید یعقوبی، مهندس دودابی نژاد، مهندس پور فرهنگ به خاطر کمک های بی دریغشان کمال تشکر را دارم.

از مادر و پدر دلسوزم، خواهران عزیزم که در تمام مدت تحصیل، همواره مشوق و مایه امیدم در کسب علم و دانش بوده و همیشه مهر و محبت صمیمانه شان بدرقه راهم بود صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

برای تمامی دوستان دوران تحصیل و عزیزانی که افتخار آشنایی آن ها را داشته ام، خصوصاً سید وحید طاهریان، سعید راعی، سینا نوری زاده، سراج اسکندر نژاد، آرزوی سرافرازی دارم.

از دوستانم سرکار خانم مینا حمیدی و دانشجوی دکتری آقای امیر رضا امیر میجانی که بدون کمک های ایشان قادر به پایان رساندن این پژوهش نبودم کمال تشکر را دارم.

از درگاه ایزد منان، سلامت و توفیق روز افزون همه این عزیزان را خواستارم.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده فارسی	خ
چکیده انگلیسی	د
مقدمه	۱
فصل اول: کلیات و مرور منابع	۳
۱-۱- رایزوکتونیا	۵
۱-۲- تاریخچه بیماری سوختگی غلاف برنج	۶
۱-۲-۱- قارچ عامل بیماری و مشخصات جنس *Rhizoctonia*	۷
۱-۲-۲- علائم بیماری سوختگی غلاف	۱۰
۱-۲-۳- خسارت و گسترش بیماری	۱۱
۱-۳- طبقه‌بندی واکنش‌های آناستوموزی *R. solani*	۱۱
۱-۴- جمعیت‌های سازگار رویشی (Vegetatively compatible populations = VCPs)	۱۲
۱-۵- گروه‌بندی درون گروهی (Intraspecific grouping)	۱۳
۱-۶- تاریخچه و پراکنش قارچ *Sclerotium hydrophilum*	۱۵
۱-۷- یافته‌های جدید در تاکسونومی قارچ‌های بیماریزای گیاهی	۱۶
فصل دوم: مواد و روش‌ها	
۲-۱- نمونه برداری	۱۹
۲-۲- جداسازی و خالص سازی عامل بیماری	۱۹
۲-۳- نگهداری قارچ‌ها برای مدت طولانی	۲۰
۲-۴- آزمون بیماری‌زایی	۲۱
۲-۵- تعیین برخی ویژگی‌های ریخت شناسی جدایه‌ها	۲۲
۲-۵-۱- ویژگی‌های ظاهری پرگنه	۲۲
۲-۵-۲- رنگ‌آمیزی هسته‌ها	۲۲
۲-۵-۳-اندازه‌گیری قطر پرگنه	۲۳
۲-۵-۴- اندازه‌گیری قطر سختینه قارچ *Sclerotium hydrophilum*	۲۴
۲-۵-۵- تعیین قطر ریسه قارچ *Sclerotium hydrophilum*	۲۵
۲-۵-۶- تعیین دماهای اصلی رشد قارچ *Sclerotium hydrophilum*	۲۵
۲-۶- تعیین شدت بیماریزایی جدایه‌های *Sclerotium hydrophilum*	۲۵

۲-۶-۱- آماده کردن بوته‌های برنج برای مایه‌زنی	۲۶
۲-۶-۲- تکثیر قارچ عامل بیماری	۲۷
۲-۶-۳- مایه‌زنی گیاه برنج در شرایط گلخانه‌ای	۲۸
۲-۷- ارزیابی میزان حساسیت ارقام برنج به قارچ *Sclerotium hydrophilum*	۳۰
۲-۸- بررسی بیماری‌زایی قارچ *Sclerotium hydrophilum* روی میزبان‌های زراعی و علف هرزی	۳۰
۲-۹- تعیین بهترین محیط کشت برای بررسی گروه‌های سازگار رویشی (VCG) قارچ *Sclerotium hydrophilum*	۳۲
۲-۱۰- آزمون سازگاری رویشی در جمعیت قارچ *Sclerotium hydrophilum*	۳۳
۲-۱۰-۱- آزمایش سازگاری رویشی در محیط PSA	۳۳
۲-۱۱- تعیین گروه آناستوموزی جدایه‌های قارچ *Rhizoctonia solani* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی AG1-IA، AG1-IB و AG2-2IIIB	۳۴
۲-۱۱-۱- تهیه توده میسیلیومی	۳۴
۲-۱۱-۲- استخراج DNA	۳۵
۲-۱۱-۳- ارزیابی غلظت DNA موجود در عصاره	۳۶
۲-۱۱-۴- انواع محلول‌ها و بافرهای مورد استفاده در استخراج و الکتروفورز DNA	۳۷
۲-۱۱-۴-۱- محلول EDTA (۰/۵ مولار PH 8.0)	۳۸
۲-۱۱-۴-۲- محلول Tris-HCL (۱ مولار)	۳۸
۲-۱۱-۴-۳- محلول NaCl (۵ مولار)	۳۸
۲-۱۱-۴-۴- محلول SDS 10%	۳۸
۲-۱۱-۴-۵- بافر TE 1X	۳۸
۲-۱۱-۴-۶- محلول اشباع بافری فنل- کلرفرم-ایزو آمیل الکل	۳۹
۲-۱۱-۴-۷- بافر استخراج DNA	۳۹
۲-۱۱-۵- تعیین گروه آناستوموزی جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی AG1-IA، AG1-IB و AG2-2IIIB	۳۹
۲-۱۱-۶- ارزیابی محصول PCR	۴۰
۲-۱۲- شناسایی عامل بیماری بر اساس توالی‌یابی ناحیه ITS	۴۱
۲-۱۲-۱- استخراج DNA به روش چلکس	۴۱
۲-۱۲-۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)	۴۲
۲-۱۲-۳- الکتروفورز	۴۳
۲-۱۲-۴- توالی یابی	۴۳
فصل سوم: نتایج و بحث	
۳-۱- نمونه‌برداری، جداسازی و خالص سازی	۴۵
۳-۲- بررسی خصوصیات ریخت شناسی جدایه‌ها	۴۹
۳-۲-۱- رنگ‌آمیزی هسته‌ها	۴۹
۳-۲-۲- خصوصیات ظاهری پرگنه *Sclerotium hydrophilum*	۵۰
۳-۲-۲-۱- خصوصیات ظاهری پرگنه *Rhizoctonia solani*	۵۰
۳-۲-۳- بررسی میزان سرعت رشد و اندازه قطر پرگنه	۵۰

۳-۲-۴- قطر سختینه *Sclerotium hydrophilum*	۵۳
۳-۲-۵- قطر سلول‌های ریسه *Sclerotium hydrophilum*	۵۳
۳-۲-۶- تعیین دمای بهینه رشد *Sclerotium hydrophilum*	۵۴
۳-۳- شدت بیماری‌زایی جدایه‌های *Sclerotium hydrophilum*	۵۶
۳-۴- واکنش ۴۴ رقم برنج در مقابل *Sclerotium hydrophilum*	۶۵
۳-۵- برخی از میزبان‌های ثانویه زراعی و علف‌هرزی *Sclerotium hydrophilum*	۶۹
۳-۶- محیط کشت مناسب برای بررسی گروه‌های رویشی (VCG) *Sclerotium hydrophilum*	۷۲
۳-۷- گروه‌های سازگار رویشی در جدایه‌های *Sclerotium hydrophilum* جدا شده از استان فارس	۷۴
۳-۸- تعیین گروه آناستوموزی جدایه‌های *Rhizoctonia solani*	۷۶
۳-۹- شناسایی مولکولی *Sclerotium hydrophilum* جدا شده از غلاف برگ برنج در استان فارس، بر اساس توالی‌یابی ناحیه ITS rDNA	۷۷
نتیجه‌گیری کلی	۷۹
پیشنهادها	۸۰
منابع	۸۲

فهرست جدول‌ها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱- درجات واکنش آناستوموزی در *Rhizoctonia solani*	۱۳
جدول ۱-۲- گروه‌های آناستوموزی، فرم‌های جنسی و غیر جنسی و میزبان‌های گیاهی رایزوکتونیاهای چند هسته‌ای	۱۴
جدول ۱-۳- روابط بین گروه‌های آناستوموزی و شکل‌های غیر جنسی رایزوکتونیاهای دو هسته‌ای	۱۵
جدول ۲-۱- محلول رنگی سافرانین- ا	۲۲
جدول ۲-۲- مقادیر مختلف حجمی بافر استخراج DNA به روش ویلند	۳۹
جدول ۲-۳- حجم مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز	۴۲
جدول ۳-۱- فهرست جدایه‌های قارچ جدا شده از غلاف برگ در استان فارس	۴۷
جدول ۳-۲- جدایه‌های استان گیلان و جدایه‌های تهیه شده از موسسه تحقیقات برنج کشور	۴۹
جدول ۳-۳- تجزیه آماری مربوط به رشد پرگنه جدایه‌های مختلف پس از ۴۸ ساعت	۵۱
جدول ۳-۴- مقایسه میانگین قطر پرگنه جدایه‌های مختلف (سانتی‌متر)	۵۲
جدول ۳-۵- معادلات رگرسیونی بین قطر پرگنه جدایه‌های مختلف در دماهای مختلف	۵۶
جدول ۳-۶- خلاصه نتایج تجزیه واریانس شدت بیماریزایی و اندازه لکه‌های ناشی از جدایه‌های مختلف *S. hydrophilum* روی ارقام مختلف برنج در زمان‌های مختلف بعد از مایه‌زنی.	۵۷
جدول ۳-۷- مقایسه میانگین و گروه‌بندی آماری تاثیر اثر متقابل رقم و جدایه‌های مختلف بر اندازه طول لکه، دو روز پس از مایه‌زنی (سانتی‌متر)	۵۷
جدول ۳-۸- مقایسه میانگین و گروه‌بندی آماری تاثیر اثر متقابل رقم و جدایه‌های مختلف بر اندازه عرض لکه، دو روز پس از مایه‌زنی (سانتی‌متر).	۵۸
جدول ۳-۹- مقایسه میانگین و گروه‌بندی آماری تاثیر اثر متقابل رقم و جدایه‌های مختلف بر اندازه طول لکه، چهار روز پس از مایه‌زنی (سانتی‌متر).	۶۰
جدول ۳-۱۰- مقایسه میانگین و گروه‌بندی آماری تاثیر اثر متقابل رقم و جدایه‌های مختلف بر اندازه عرض لکه، چهار روز پس از مایه‌زنی (سانتی‌متر).	۶۲
جدول ۳-۱۱- مقایسه میانگین و گروه‌بندی آماری تاثیر اثر متقابل رقم و جدایه‌های مختلف بر اندازه زول لکه، هفت روز پس از مایه‌زنی (سانتی‌متر).	۶۳
جدول ۳-۱۲- مقایسه میانگین و گروه‌بندی آماری تاثیر اثر متقابل رقم و جدایه‌های مختلف بر اندازه عرض لکه، هفت روز پس از مایه‌زنی (سانتی‌متر).	۶۴
جدول ۳-۱۳- تجزیه آماری مربوط به اندازه لکه ناشی از جدایه Sp1 بر روی رقم‌های مختلف برنج در سه زمان.	۶۶
جدول ۳-۱۴- ارقام برنج استفاده شده برای بررسی حساسیت و مقاومت به قارچ *S. hydrophilum*	۶۷
جدول ۳-۱۵- شماره و تعداد جدایه‌های سازگار موجود در هر گروه سازگار رویشی.	۷۵
جدول ۳-۱۶- مشخصات جدایه‌های توالی یابی شده و طول قطعه تکثیر شده به تفکیک هر باز	۷۸

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱- علائم سوختگی غلاف برگ برنج. (الف) علائم بیماری بر روی برگ با حاشیه مشخص. (ب) لکه‌های روی غلاف در ناحیه نزدیک سطح آب	۱۰
شکل ۲-۱- مناطق نمونه‌برداری شده از شالیزارهای دارای علائم سوختگی در استان فارس	۲۰
شکل ۲-۲- آزمون بیماری‌زایی برای بررسی و تأیید بیماری‌زا بودن جدایه‌های قارچ‌های جدا شده از غلاف برگ برنج در استان فارس	۲۱
شکل ۲-۳- رنگ‌آمیزی هسته‌ها توسط محلول رنگی سافرانین-اُ	۲۳
شکل ۲-۴- پرگنه قارچ خالص سازی شده در محیط کشت PDA و اندازه‌گیری قطر پرگنه پس از گذشت ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۱±۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور تاریک	۲۴
شکل ۲-۵- نشاء کاری برنج در گلدان‌های یکبار مصرف پر شده از خاک مزرعه	۲۶
شکل ۲-۶- کشت قرص‌های قارچ در لوله‌های آزمایش و قرار دادن در دمای اتاق بر روی شیکر دورانی (۹۲ دور بر دقیقه)	۲۷
شکل ۲-۷- مایه‌زنی گیاه برنج در شرایط گلخانه‌ای	۲۸
شکل ۲-۸- قرار دادن توپ میسیلیومی قارچ عامل بیماری در زیر غلاف برگ و قرار دادن پوششی از پارافیلم بر روی آن	۲۹
شکل ۲-۹- اندازه‌گیری طول و عرض لکه‌ها در تاریخ‌های مشخص توسط خط‌کش معمولی	۲۹
شکل ۲-۱۰- کشت ۴۴ رقم مختلف برنج برای مایه‌زنی با جدایه Sp1 در شرایط گلخانه	۳۰
شکل ۲-۱۱- تلقیح میزبان‌های علف‌هرزی (الف). تلقیح گیاه سویا به عنوان گیاه زراعی (ب)	۳۱
شکل ۲-۱۲- بررسی گروه‌های رویشی بر روی محیط کشت‌های مختلف. CMA (الف). PSA (ب)	۳۲
شکل ۲-۱۳- الگوی قرار گرفتن قرص‌های میسیلیومی هر جدایه بر روی محیط کشت PSA در پتری دیش ۹ سانتی‌متری	۳۳
شکل ۲-۱۴- محل قرار گرفتن دیسک‌های هر جدایه بر روی محیط کشت	۳۴
شکل ۲-۱۵- لوله‌های فالکون حاوی محیط کشت PDB در شیکر دورانی	۳۵
شکل ۲-۱۶- غلظت DNA میسلیوم قارچ *Rhizoctoni solani* بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد	۳۷
شکل ۳-۱- وجود علائم سوختگی غلاف برگ برنج نزدیک سطح آب	۴۶
شکل ۳-۲- رنگ‌امیزی هسته‌ها. *R. solani* تعداد زیاد هسته‌ها در هر سلول (الف). *S. hydrophilium*	۴۹
شکل ۳-۳- پرگنه قارچ *S. hydrophilum* در محیط غذایی PDA نگه‌داری شده در دمای ۱±۲۸ درجه سانتی‌گراد. پس از گذشت ۳ روز (الف). پرگنه *R. solani* پس از گذشت ۷ روز (ب)	۵۱
شکل ۳-۴- میانگین قطر سختینه در جدایه‌های مختلف قارچ *S. hydrophilum*	۵۳
شکل ۳-۵- میانگین قطر هیف در جدایه‌های مختلف قارچ *S. hydrophilum*	۵۴
شکل ۳-۶- رابطه رگرسیونی بین قطر پرگنه جدایه Ka2 در دماهای مختلف	۵۴
شکل ۳-۷- رابطه رگرسیونی بین قطر پرگنه جدایه S2 در دماهای مختلف	۵۵
شکل ۳-۸- رابطه رگرسیونی بین قطر پرگنه جدایه S352 در دماهای مختلف	۵۵

شکل ۳-۹- ایجاد لکه روی غلاف برگ ذرت. الف- هفت روز بعد از مایه زنی. ب- ۱۴ روز پس از مایه زنی. ج- مایه زنی سویا. د- عدم ایجاد آلودگی و تولید لکه بعد از ۱۴ روز ۶۹
شکل ۳-۱۰- الف-ایجاد لکه هفت روز پس از مایه‌زنی گیاه سوروف *E.cruss galli-cruss galli*، ب- ۱۴ روز پس از مایه‌زنی ۷۰
شکل ۳-۱۱- الف- ایجاد لکه پس از گذشت هفت روز پس از مایه‌زنی گیاه پیزر *S. maritimus* ، ب- ۱۴ روز پس از مایه‌زنی. ۷۰
شکل ۳-۱۲- الف- ایجاد لکه پس از گذشت هفت روز پس از مایه‌زنی گیاه جگن *S.joncoides*، ب- ۱۴ روز پس از مایه‌زنی. ۷۱
شکل ۳-۱۳- الف- ایجاد لکه پس از گذشت هفت روز پس از مایه‌زنی گیاه سورگوم *S. halepense*، ب- ۱۴ روز پس از مایه‌زنی. ۷۱
شکل ۳-۱۴- بررسی گروه‌های سازگار رویشی قارچ *S. hydrophilum* روی محیط کشت PDA. ۷۲
شکل ۳-۱۵- مقایسه محیط کشت‌های مختلف در آزمون سازگاری رویشی قارچ *S. hydrophilum* ۷۳
شکل ۳-۱۶- واکنش ناسازگار رویشی بین چهار گروه مختلف رویشی (الف). واکنش سازگار رویشی بین ایزوله‌های مختلف یک گروه رویشی (ب). ۷۴
شکل ۳-۱۷- وجود خط و ناحیه بازدارنده مشخص بین جدایه‌های ناسازگار و عدم وجود ناحیه ممانعت کننده از رشد در جدایه‌های یک گروه سازگار رویشی. ۷۵
شکل ۳-۱۸- باند اختصاصی ۲۶۵bp تکثیر شده در جدایه‌های *R. solani* و جدایه‌های به عنوان کنترل مثبت AG1-IA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی زیر گروه AG1-IA (L: نشانگر اندازه ۱۰۰bp، DNA samples: جدایه‌های استان فارس، - Control: جدایه‌های استانداردبه ترتیب گروه‌های آناستوموزی AG1-IB و AG2-2IIIB). ۷۶
شکل ۳-۱۹- عدم تکثیر و مشاهده باند توسط آغازگر AG1-IB (الف)، AG2-2IIIB (ب) ۷۷

اتیولوژی سوختگی غلاف برگ برنج در استان فارس

سید محمد زارعیان جهرمی

گونه‌های مختلف ریزوکتونیا و شبه ریزوکتونیا از عوامل ایجاد کننده سوختگی غلاف برگ برنج در اکثر مناطق برنج کاری ایران محسوب می‌شود. به منظور شناسایی عوامل سوختگی غلاف برگ برنج نمونه‌برداری از غلاف‌های آلوده شش منطقه برنج‌کاری در استان فارس بعمل آمد و در نهایت ۶۸ جدایه از این مناطق جمع‌آوری شد. شناسایی به کمک رنگ‌آمیزی هسته‌ها، اندازه‌گیری قطر سلول‌های ریسه و سختینه و روش‌های ملکولی انجام شد که در نهایت ۶۳ جدایه مربوط به قارچ *Sclerotium hydrophilum* و پنج جدایه *R. solani* شناسایی شد. بهترین دمای رشد قارچ *S. hydrophilum* ۳۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. بهترین محیط کشت به منظور ارزیابی سازگاری رویشی قارچ *S. hydrophilum*، محیط کشت‌های PSA و OMA تشخیص داده شد. با بررسی سازگاری رویشی ۶۳ جدایه از قارچ *S. hydrophilum* هشت گروه سازگار رویشی در بین جمعیت‌های این قارچ در استان فارس شناسایی شدند. به منظور تشخیص جدایه‌ای با بیشترین میزان آلودگی، آزمون بیماری‌زایی ۳۳ جدایه از قارچ *S. hydrophilum* بر روی سه رقم برنج خزر، هاشمی و لنجانی بلند انجام شد که در نهایت جدایه Sp1 دارای بیشترین میزان آلودگی بود. جدایه Sp1 بر روی ۴۴ رقم مختلف برنج مایه‌زنی شد که در نهایت اکثر ارقام برنج دارای حساسیت نسبتاً بالایی به این جدایه از خود نشان دادند. به منظور تعیین گروه آناستوموزی پنج جدایه قارچ *R. solani* از آغازگرهای اختصاصی زیر گروه AG-1 و AG-2 استفاده شد که در نهایت تمامی جدایه‌ها در گروه آناستوموزی AG1-IA قرار گرفتند. به منظور تایید شناسایی نهایی قارچ *S. hydrophilum* بررسی ناحیه ITS rDNA برای نه جدایه از این قارچ صورت گرفت که پس از مشابهت یابی نهایتاً تمامی توالی‌ها با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن شباهت بالا و گاهاً ۱۰۰ درصدی با قارچ *S. hydrophilum* داشتند.

کلمات کلیدی: آغازگر، سازگاری رویشی، ناحیه ITS rDNA، *Rhizoctonia solani*، *Sclerotium hydrophilum*.

Summary

The etiology of rice sheath blight disease in Fars province

Sayed Mohammad Zareiyan Jahromy

Several species of *Rhizoctonia* and *rhizoctonai*-like fungi are amongst the pathogenic factors of rice sheath blight over the rice fields of Iran. In order to diagnose the pathogenic factors of rice sheath blight, sampling of infected sheaths was conducted in six regions of rice fields in Fars province, Iran and finally 68 isolates were collected. The identification was conducted by means of nuclear staining, hyphae and sclerotia diameter measurement and molecular methods which resulted in the identification of 63 isolates of *S. hydrophilum* and five isolates of *R. solani* . The optimum temperature for *S. hydrophilum* was 30^{c}. The optimum culture media to evaluate the vegetative compatibility group of *S. hydrophilum* were PSA and OMA. Through vegetative compatibility evaluation of 63 isolates of *S. hydrophilum*, 8 vegetative compatible groups were identified in Fars. In order to identify an isolate with the highest infection amount, a pathogenicity test was conducted in 33 isolates of *S. hydrophilum* in three varieties of rice (Khazar, Hashemi and Lenjani) which at last introduced the sp1 isolate as the most infectious. Sp1 isolate was inoculated in 44 rice varieties which showed that most of the varieties were relatively high sensitive to this isolate. In order to determine the anastomosis group of 5 isolates of *R. solani*, the specific primers of subgroups AG-1 and AG-2 were used by which all the isolates were placed in the AG1-IA anastomosis group. In order to verify the final identification of *S. hydrophilum*, evaluation of ITS rDNA domain in 9 isolates of this fungus was carried out that after alignment, it was distinguished that all the sequences were highly similar with the registered sequences in gene bank and even 100% similar with *S. hydrophilum*.

Key words: Primer, Vegetative compatibility, ITS rDNA regien, *Rhizoctonia solani* ،*Sclerotium hydrophilum*

مقدمه

تمام منابع غذایی انسان به طور مستقیم یا غیر مستقیم به گیاهان وابسته است و در این میان گیاهان خانواده غلات از جمله برنج نقش عمده‌ای را در تامین نیاز غذایی انسان ایفا می‌کند. برنج (*Oryzae sativa* L.) به عنوان یک غذا، منبع مهم کالری برای درصد بزرگی از جمعیت جهان به ویژه در قاره آسیا است، یعنی جایی که ۹۰٪ برنج جهان کشت و به وسیله ۶۰٪ جمعیت جهان مصرف می‌شود. امروزه در حدود ۱۰٪ از کل زمین‌های زراعی جهان ۱۴۴ میلیون هکتار در ۱۱۰ کشور به تولید برنج اختصاص دارد و بعد از گندم از لحاظ سطح زیر کشت دومین مرتبه را دارد [Webster & Gunnell, 1992]. وجود ساعات آفتابی و میزان تشعشع خورشیدی بالا و دمای مناسب در طول فصل رشد از مشخصات مناطق با پتانسیل بالای تولید برنج می‌باشد [Ushida, 1981] که وجود این شرایط برخی نقاط ایران را مستعد کشت این محصول کرده است. با این وجود ایران تنها ۰/۴ درصد مساحت زیر کشت برنج جهان را در اختیار دارد که تقریباً ۷۶/۶ درصد آن در استانهای مازندران و گیلان می‌باشد [عبادی، ۱۳۷۸]. استان فارس به لحاظ شرایط آب و هوایی از مناطق بسیار مستعد برنجکاری در کشور و حتی دنیاست از لحاظ سطح زیر کشت مقام چهارم و از لحاظ تولید شلتوک مقام سوم در بین استانهای برنج خیز کشور را داراست [اداره کل آمار و اطلاعات وزارت کشاورزی، ۱۳۷۷].

موسسه تحقیقات بین المللی برنج (IRRI) در فیلیپین از مهمترین مراکز تحقیقاتی برنج در دنیا می‌باشد که تحقیقات دامنه داری روی برنج انجام می‌دهد. در طی سه دهه گذشته در IRRI با به کار گیری اصول نوین زراعت، ایجاد ارقام جدید و پر محصول و ترویج روش‌های به زراعی توانسته‌اند بازده این محصول را از ۱/۵ تن در هکتار در زمان جنگ جهانی دوم به ۱۰ تن در هکتار افزایش دهند. در کنار این تحقیقات، تحقیق و ترویج روش‌های حفاظت محصول و کاهش خسارت ناشی از عوامل مختلف نیز انجام گرفته و در حال توسعه است [جوان نیکخواه، ۱۳۷۴].

بر اساس آمارهای جهانی، آفات، بیماری‌های گیاهی و علف‌های هرز حدود یک سوم تولید محصولات کشاورزی دنیا را نابود می‌کند خسارات وارده به غلات و بخصوص به برنج در کشورهای توسعه یافته و توسعه نیافته تفاوت‌های چشمگیری داشته ولی در مجموع بین یک سوم تا یک چهارم تولید را شامل می‌شوند [Agrios, 2005]. گیاه برنج مورد حمله حدود هفتاد پاتوژن قارچی، باکتریایی، ویروسی، شبه مایکوپلاسمایی و نماتدی قرار می‌گیرد که در این میان عوامل بیماریزایی قارچی بالاترین فراوانی را دارا هستند.

در ایران مهمترین بیماری ایجاد کننده خسارت در برنج بیماری بلاست برنج می‌باشد و بیماری سوختگی غلاف در رتبه دوم قرار دارد که عامل آن قارچ *Rhizoctonia solani* می باشد این قارچ روی غلاف برگ برنج تولید لکه های بیضی شکل با حاشیه

مشخص می‌کند. همچنین عوامل قارچی دیگری نیز ایجاد لکه بر روی غلاف برگ برنج می‌کند که از جمله آنها قارچ‌های *Rhizoctonina oryza-sativae* عامل لکه موجی غلاف برگ برنج و *Sclerotium hydrophilum* عامل لکه غلاف برگ برنج که از بیماری‌زایی کمتری نسبت به عامل اول، برخوردار می‌باشند.

با توجه به مشاهده لکه‌های مشابه و بروز خسارت ناشی از آن و عدم بررسی جامع عوامل ایجاد کننده این لکه‌ها در برنجکاری‌های استان فارس، این پژوهش جهت تشخیص عوامل اصلی ایجاد کننده لکه بر روی غلاف برگ برنج صورت گرفت و همچنین بررسی دیگر جنبه‌های قارچ‌های عامل بیماری مانند میزبان‌های زراعی و علف هرزی، گروه‌های سازگار رویشی، حساسیت برخی ارقام ایرانی، تعیین شدت بیماریزایی جدایه‌های بیمارگر در استان فارس انجام گرفت.

کلیات و مرور منابع

۱-۱- رایزوکتونیا

" من این نوشته را برای توصیف قارچ جدیدی که آن را *Rhizoctonia* (از ریشه یونانی به معنای مرگ ریشه‌ها) می‌نامم پیشنهاد می‌کنم، زیرا این قارچ به سرعت به ریشه گیاهان نهان‌زاد حمله و آنرا نابود می‌کند." این عبارت را دکاندول[1] قارچ شناس فرانسوی در سال ۱۸۱۵ میلادی با مطالعه بیماری پوسیدگی بنفش ریشه هویج برای قارچ عامل آن بیان کرد. دکاندول این قارچ را هم‌ردیف برخی قارچ‌های ماکروسکوپی قرار داد که نشان دهنده این بود که درک درستی از موقعیت تاکسونومیکی این قارچ نداشته است. جولیوس کوهن[2] آلمانی چهل و سه سال بعد از آن قارچی را روی غده‌های بیمار سیب زمینی مشاهده کرد و پس از مطالعه لکه-های چربی روی غده و سختینه‌ها[3] و ریسه‌های تیره رنگ چسبیده به غده، آن را *Rhizoctonia solani* Kühn نامید [Lee, 2004; Ogoshi, 1969].

در میان گونه‌های رایزوکتونیا، *Rhizoctonia solani* به عنوان یک بازیدیومیست[4] خاکزاد که گیاهان زراعی و غیر زراعی متعددی را مورد حمله قرار می‌دهد گونه‌ای است که به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است [Sneh, 1991]. و این به دلیل اقتصادی بودن و دامنه میزبانی وسیع این گونه می‌باشد [Ogoshi, 1996]. با این حال هنوز جنبه‌های مختلفی از این قارچ ناشناخته مانده است و از آن به عنوان *Rhizoctonia solani* complex یا A large species complex یاد می‌شود [Cubeta & Vilgalys, 1997]. این قارچ هیچ گونه اسپور غیر جنسی (کنیدیوم) تولید نمی‌کند و تنها گاهی اوقات قارچ قادر به تولید اسپورهای جنسی (بازیدیوسپور) می‌باشد. برخلاف بسیاری از بازیدیومیست‌ها، در این قارچ بازیدیوم‌ها در بازیدیوکارپ احاطه نشده-اند [Adam, 1988]. جدایه‌های گونه *R. solani* فاقد قوس اتصال (Clamp connection)، کنیدی، رایزومورف و سختینه‌های متمایز شده و تلئومورف غیر از جنس *Thanatephorus* می‌باشند [Parmeter *et al.*, 1969].

1 - De Candolle
2 - Kuhn
3 - Sclerote
4 - Basidiomycetes

۱-۲- تاریخچه بیماری سوختگی غلاف برنج

بیماری سوختگی غلاف برگ برنج اولین بار توسط میاک در سال ۱۹۱۰ از ژاپن گزارش گردید وی نام عامل آن را *Sclerotium irregular* نامید. ساوادا[1] بعدا در سال ۱۹۱۲ بیان کرد که این قارچ همان قارچ *Hypochnus sasakii* است که پیش از این توسط شیرادی[2] در سال ۱۹۰۶ معرفی شده بود. رین کینگ[3] در سال ۱۹۱۸ و پالو[4] ۱۹۲۶ بیماری مشابهی را از فیلیپین گزارش کردند و عامل آنرا *Rhizoctonia solani* Kühn نامیدند. ابتدا تصور می‌شد این بیماری مخصوص کشورهای آسیایی است ولی بعدا از کشورهای برزیل، سورینام، ونزویلا، ماداگاسکار و آمریکا نیز گزارش شد [Ou, 1985].

ساکسنا و کاوبی[5] در سال ۱۹۷۲ در شمال هند بیماری شبیه به سوختگی غلاف مشاهده کردند که بازیدیوسپورهای هوازاد باعث ایجاد سوختگی برگ با علائم لکه نواری روی غلاف و برگ برنج می‌شد، عامل این بیماری *Thanathephorus cucumeris* (Frank) Donk تشخیص و معرفی گردید. رایچر و گوچ[6] در سال ۱۹۳۸ نوعی بیماری به نام لکه غلاف[7] برنج را از آمریکا گزارش کردند که علائم آن خیلی شبیه به سوختگی غلاف بود، اما عامل آنرا *R. oryzae* Rayker & Goach تشخیص دادند. هشیا و مکینو[8] در سال ۱۹۶۹ گزارش کردند که قارچ عامل سوختگی غلاف برگ برنج در مناطق گرم و معتدل ایجاد بیماری می‌کند در حالی که *R. oryzae* محدود به مناطق گرم و نیمه گرم می‌باشد [Ou, 1985]. بیماری سوختگی غلاف برگ برنج ابتدا در سال ۱۳۶۰ توسط ترابی و بینش (۱۳۶۳) از مازندران گزارش شد سپس در گیلان مشاهده گردید ولی میزان آلودگی آن بسیار کم و ناچیز بود [ایزدیار و برادران، ۱۳۷۲]. این بیماری در ارقام پر محصول مقاوم به بیماری بلاست برنج در سال ۱۳۶۰ در استان مازندران و گیلان و مشاهده آن در ارقام محلی، اهمیت ویژه‌ای پیدا نمود و به عنوان یک بیماری مهم برنج در ایران به حساب آمد[ترابی و بینش، ۱۳۶۳].

---

[1] - Sawada
[2] - Shirai
[3] - Reinking
[4] - Palo
[5] - Saskena and Chubey
[6] - Rayker and Goach
[7] - Sheat spot
[8] - Hashiba and Makino

۱-۲-۱- قارچ عامل بیماری و مشخصات جنس *Rhizoctonia*

قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج از گروه آناستوموزی AG-IA با فرم جنسی *Thanathephorus cucumeris* (Frank) Donk می‌باشد [Lee & Rush, 1983] و قادر است ۱۸۸ گونه از ۲۳ خانواده گیاهی را آلوده نماید [Ou, 1985].

بر خلاف تعدادی از قارچ‌های این شاخه، در این قارچ بازیدیوکارپ وجود ندارد. اندام‌های بارده جنسی قارچ و بازیدیوسپورها (-مرحله جنسی[1])، اولین بار توسط پریلیوکس و دلاکروس در سال ۱۸۹۱ مشاهده شد[Jiang Wu, 2003]. میسلیوم *R. solani* در کشت‌های جوان بی‌رنگ و در کشت‌های مسن‌تر به صورت زرد تا قهوه‌ای پر رنگ است. هیف‌ها دارای دیواره عرضی از نوع بشکه‌ای[2] یا دولیپور برجسته هستند، همچنین هیف‌های جوان دارای چندین هسته می‌باشند، هیف‌ها در قاعده انشعابات دارای فرورفتگی و کمی بالاتر از این فرورفتگی‌ها دیواره عرضی تشکیل می‌شود[Sneh *et al.*, 1991].

صفاتی مانند سلول‌های مونیلوئیدی، هیف‌هایی با قطر بیش از ۵ میکرومتر و معمولا به قطر ۸-۱۲ میکرومتر، سختینه، رشد سریع و بیماری‌زایی ممکن است در بعضی جدایه‌ها موجود باشد. هیف‌های جوان معمولا با زاویه ۴۵ یا ۹۰ درجه منشعب می‌شوند[-Webster & Gunnell, 1992].

قارچ *R. solani* دارای سه نوع میسیلیوم می‌باشد؛ هیف‌های رونده، میسلیوم لپ مانند و میسلیوم نوع سوم شامل سلول‌های گرد و کوچک که در تشکیل سختینه دخالت دارند و همچنین ممکن است سطح پتری یا دیواره لوله را بپوشانند. هیف‌های رونده در فواصلی انشعابات متورم کوتاه ایجاد می‌کنند ولی میسلیوم‌های لپ مانند از نظر شکل و اندازه متنوع بوده و احتمالا شکل و اندازه لکه‌ها را در غلاف برگ سبب می‌شوند. روی ساقه برنج آلوده هیف‌های رونده ممکن است قسمت زیادی از ساقه را بپوشانند اما تنها میسیلیوم‌های لپ مانند فقط روی زخم‌ها یافت می‌شوند و میخ‌های رخنه[3] را ایجاد می‌کنند. هیمنیوم‌های *T. cucumeris* *cucumeris* برآمده به رنگ کرم تا سفید خاکستری فام و متشکل از شبکه تار عنکبوت مانند از ریسه‌های تغییر یافته‌اند که قطعات سست بازیدیوم به صورت خوشه از آن خارج می‌شوند. اندازه بازیدیوم قارچ ۱۰-۱۵×۷-۹ میکرومتر، استریگما ۴-۷×۲-۳ میکرومتر به تعداد چهار عدد و بازیدیوسپورها به ابعاد ۸-۱۱×۵-۶/۵ میکرومتر هستند [Ou, 1985].

[1] - Teleomorph
[2] - Dolipore
[3] - Penetration Peg