

مطالعه خصوصیات مورفولوژیکی و روابط فیلوژنتیکی در گونه *Bipolaris oryzae* و تعدادی از گونه‌های جنس *Bipolaris* به دست آمده از برنج و علف‌های هرز

MORPHOLOGICAL AND PHYLOGENETIC INVESTIGATION OF *Bipolaris oryzae* AND SOME SPECIES OF *Bipolaris* OBTAINED FROM RICE AND GRASS WEEDS

عبداله احمدپور<sup>۱\*</sup>، محمد جوان نیکخواه<sup>۱\*\*</sup>، محمد رضا نقوی<sup>۲</sup> و فریدون پاداشت دهکایی<sup>۳</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۱۴)

چکیده

بیماری لکه قهوه‌ای برنج یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی است که خسارت نسبتاً قابل ملاحظه‌ای به برنج وارد می‌کند. در طی سال‌های زراعی ۱۳۹۰-۱۳۹۱، ۳۴۸ جدایه های *Bipolaris* از مزارع برنج (بذرها و برگ‌ها) و علف‌های هرز حاشیه مزارع برنج استان‌های مازندران، گیلان، گلستان، خوزستان و فارس جداسازی شد. با مطالعه خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌ها شش گونه از جنس مذکور شامل *B. oryzae*، *B. cynodontis*، *B. spicifera*، *B. bicolor*، *B. sorokiniana* و *B. neergaardii* شناسایی شد. گونه *B. oryzae* با ۳۰۳ جدایه به عنوان گونه غالب از برگ‌های دارای علائم لکه قهوه‌ای و بذرهای برنج و ۱۲ جدایه مشکوک به گونه *B. oryzae* از سوروف (*Echinochloa colona*)، پاسپالوم (*Paspalum scrobiculatum*)، ذرت، موز و گیاه گرامینه ناشناخته جداسازی شد و بقیه گونه‌های *Bipolaris* از برگ‌ها و بذرهای بدون علائم بیماری لکه قهوه‌ای برنج جداسازی شدند. تنوع مورفولوژیکی زیادی بین جدایه‌های *B. oryzae* از نظر رنگ پرگنه، شکل و ابعاد کنیدیوم‌ها دیده شد و در چهار گروه مورفولوژیکی قرار گرفتند. با این حال براساس توالی‌یابی ناحیه rDNA-ITS و ژن *gpd* جدایه‌های انتخاب شده به عنوان گونه *B. oryzae* شناسایی شدند و عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج در ایران نیز گونه مذکور تشخیص داده شد و گیاهان سوروف، پاسپالوم، ذرت، موز و گیاه گرامینه ناشناخته میزبان‌های جدیدی برای گونه مذکور معرفی می‌شوند. هم‌چنین به مطالعه روابط فیلوژنتیکی گونه‌های *Bipolaris* در مطالعه حاضر براساس توالی‌یابی ناحیه rDNA-ITS و ژن *gpd* پرداخته شده است.

واژه‌های کلیدی: قارچ، تاکسونومی قارچ، بیماری‌های برنج، برنج، فیلوژنی قارچ، *Cochliobolus*

\*: بخشی از پایان‌نامه دکتری نگارنده اول که به دانشگاه تهران ارائه خواهد شد.

\*\* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی jnikkhah@ut.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری و استاد گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲. استاد گروه بیوتکنولوژی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳. استادیار بیماری شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات برنج کشور، رشت

## مقدمه

شده است (Johnson & Percich 1992). اگرچه این بیماری در تمام مناطق کشت برنج در ایران شایع است اما اطلاعات جامعی در مورد گسترش بیماری، گونه‌های عامل بیماری و میزان خسارت حاصل از آنها وجود ندارد.

مدیریت بیماری لکه قهوه‌ای برنج از طریق کاربرد قارچکش‌ها، کوددهی مناسب و بهداشت مزرعه انجام می‌شود (Ou 1985). برخی از گزارش‌ها حاکی از آن است که این بیماری به‌ویژه در خاک‌هایی یافت می‌شود که از نظر عناصر غذایی همچون آهن، منگنز و کلسیم، پتاسیم و سیلیسیوم دچار کمبود باشند. همچنین مشخص شده است که در خاک‌هایی با غلظت بالای مواد سمی از جمله سولفید هیدروژن غلظت مشابه به علایم بیماری لکه قهوه‌ای ایجاد می‌شود و بیماری ایجاد شده تحت عنوان آکیوچی (Akiochi) خوانده می‌شود. در بسیاری از مواقع تشخیص این دو نوع بیماری با مشاهدات ظاهری مشکل یا غیر ممکن است (Ou 1985).

تا به حال ۱۲ گونه از جنس *Bipolaris* شامل گونه‌های *B. cynodontis*, *B. bicolor*, *B. australiensis*, *B. oryzae*, *B. neergaardii*, *B. maydis*, *B. hawaiiensis*, *B. spicifera*, *B. sorokiniana*, *B. setariae* و *B. victoriae* و *B. zeicola* از روی برنج در دنیا گزارش شده‌اند (Farr & Rossman 2013, Sivanesan 1987) عامل اصلی بیماری لکه قهوه‌ای برنج نیز *B. oryzae* ذکر شده است (Ou 1985, Sivanesan 1987). همچنین برنج و برنج وحشی (*Zizania palustris*) میزبان اصلی *B. oryzae* گزارش شده‌اند. به علاوه، از طریق مایه زنی مصنوعی معلوم شده است که قارچ قادر است دامنه وسیعی از تیره گندمیان شامل گندم، ذرت، جو، یولاف، ذرت خوشه‌ای، ارزن، مرغ و غیره را آلوده کند (Ou 1985). در ایران گونه‌های *B. victoriae*, *B. oryzae*

بی‌شک یکی از مهم‌ترین عواملی که می‌تواند در کاهش عملکرد برنج تأثیرگذار باشد، شیوع بیماری‌های قارچی متنوعی است که اندام‌های مختلف آن را تحت تأثیر قرار داده و باعث کاهش کمی و کیفی این گیاه می‌گردند. در این میان لکه قهوه‌ای برنج یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی است که خسارت نسبتاً قابل ملاحظه‌ای به برنج وارد می‌کند. لکه قهوه‌ای برنج توسط قارچ *Bipolaris oryzae* ایجاد می‌شود که بعد از بلاست در میان بیماری‌های برگ‌ی از بیشترین اهمیت اقتصادی برخوردار است (Ou 1985, Webster & Gunnell 1992). لکه قهوه‌ای برنج از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی بذبرود برنج می‌باشد و در تمام کشورهای که برنج کاشت می‌شود شایع است و اغلب کولتیوارهایی که در دنیا کاشته می‌شوند به بیمارگر حساس می‌باشند (Ou 1985, Webster & Gunnell 1992). بیماری لکه قهوه‌ای به دلیل بذبرود بودن، در خزانه از بذور آلوده به نشاها حمله می‌کند و باعث از بین رفتن آنها می‌شود. در مزرعه نیز از ابتدای کاشت تا زمان برداشت همواره گیاه برنج را مورد حمله قرار می‌دهد (Ou 1985).

میزان خسارت بیماری در کشورهای مختلف دنیا با توجه به شرایط آب و هوایی مختلف متفاوت می‌باشد. در ژاپن، قارچ عامل بیماری به عنوان یکی از عوامل اصلی سوختگی خوشه و سوختگی نشا در جعبه‌های نشا در نظر گرفته می‌شود (Ou 1985). اپیدمی این بیماری در سال ۱۹۴۲ میلادی در بنگال گزارش شده و میزان محصول را ۴۰-۹۰٪ کاهش داده و باعث قحطی در این منطقه شده است (Padmanabhan 1973). در آمریکا نیز خسارت قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای روی برنج وحشی در مراحل طولی شدن میانگره‌ها تا بلوغ بذور تا ۷۴٪ گزارش

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی نمونه‌های قارچی

نمونه‌برداری از مزارع برنج در استان‌های مازندران (شهرستان آمل)، گیلان (شهرستان‌های رشت و آستارا)، گلستان (شهرستان گرگان)، خوزستان (شهرستان باغ ملک) و فارس (شهرستان‌های مرودشت و کامفیروز) در سال‌های زراعی ۱۳۹۰-۱۳۹۱ به روش سلسله مراتبی (hierarchical method) انجام شد (McDonald et al. 1999). در روش سلسله مراتبی، از ۶-۸ محل داخل مزرعه که حدود ۱۰ متر با همدیگر فاصله داشتند نمونه‌برداری صورت گرفت. داخل هر محل نمونه‌برداری ۴-۸ گیاه آلوده انتخاب و از هر کدام یک نمونه برگ‌ی دارای علائم بیماری جمع‌آوری شد. به علاوه برای جداسازی گونه‌های احتمالی دیگر از جنس *Bipolaris* دخیل در ایجاد بیماری لکه قهوه‌ای برنج از مناطق ذکر شده و مناطق دیگر استان‌های مذکور به صورت تصادفی از بذور و برگ‌های برنج مزارع مختلف و علف‌های هرز حاشیه مزارع برنج نیز نمونه‌برداری شد. اندام‌های گیاهی جمع‌آوری شده هرکدام در پاکت‌های کاغذی جداگانه به آزمایشگاه منتقل شدند. جداسازی و شناسایی نمونه‌های قارچی به مشابه مطالعات قبلی انجام گردید (Ahmadpour et al. 2011, 2012 a, b). نمونه‌های میکروسکوپی با بهره‌گیری از منابع معتبر (Ellis 1971, 1976, Sivanesan 1987) شناسایی و تعیین نام شدند.

### تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک

در این تحقیق براساس خصوصیات مورفولوژیکی ۱۵ جدایه *B. oryzae*، ۵ جدایه از گونه‌های *B. sorokiniana*، *B. neergardii*، *B. cynodontis*

*Bipolaris* sp. و *B. sorghicola*، *B. indica*، *B. bicolor* به عنوان عوامل بیماری لکه قهوه‌ای ذکر شده‌اند (Khosravi 1999, Razavi 1992, Safari Motlagh et al. 2005, Shamsi et al. 2010, Nazari 2011). مطلق و همکاران (Safari Motlagh 2008, Safari Motlagh & Kaviani 2008a, Safari Motlagh et al. 2006) گونه *B. victoriae* را به عنوان گونه غالب در استان گیلان معرفی کرده است. در حالی که برخی محققین دیگر گونه *B. oryzae* را عامل اصلی بیماری لکه قهوه‌ای می‌دانند (Khosravi 1999, Razavi 1992, Shamsi et al. 2010, Nazari 2011). این حال در ایران مطالعات جامع و منسجمی در ارتباط با تعیین گونه غالب عامل یا عوامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج در مناطق مختلف کشور و روابط فیلوژنتیکی گونه‌های احتمالی دیده نمی‌شود و اغلب مطالعات انجام شده محدود به مناطق خاصی از کشور بوده است.

لذا، به منظور تدوین برنامه‌های به‌نژادی و مدیریت کنترل بیماری، آگاهی از عوامل ایجاد کننده بیماری لکه قهوه‌ای برنج و دامنه میزبانی عامل بیماری دارای اهمیت ویژه‌ای است. تحقیق حاضر با هدف جداسازی قارچ *B. oryzae* و گونه‌های احتمالی دیگر از جنس *Bipolaris* دخیل در ایجاد بیماری لکه قهوه‌ای برنج از مناطق مهم کشت برنج در ایران، مطالعه مورفولوژیکی جدایه‌ها برای شناسایی گونه‌های احتمالی، ارزیابی روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های منتخب شناسایی شده با استفاده از توالی‌یابی ناحیه ITS (ITS1-5.8S-ITS2) و ژن گلیسرآلدهید-۳ فسفات دهیدروژناز (GPD) و تعیین گونه غالب عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج از مناطق مختلف کشور انجام شده است.

انجام گردید. ماتریکس فاصله توالی‌های مرتب شده با روش پارامتر دو کیمورا (Kimura's two parameter) محاسبه شد (Kimura 1980) و با استفاده از روش NJ (Neighbor-Joining) (Saitou and Nei 1987) و با نرم‌افزار MEGA4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, v 4.0) درخت فیلوژنتیکی رسم گردید (Tamura et al. 2007). برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در درخت فیلوژنتیکی، مقدار اعتبارسنجی (Bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار با استفاده از این برنامه محاسبه شد. توالی‌های مربوط به جدایه‌های مختلف گونه‌های *Bipolaris* در بانک ژن ثبت شدند و رس‌شمار اخذ شد (جدول ۲).

### نتیجه و بحث

#### خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌ها

در این تحقیق ۳۳۶ جدایه از جنس *Bipolaris* از روی برنج (بذرها و برگ‌ها) جداسازی شد (جدول ۱). با مطالعه خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌ها شش گونه از جنس مذکور شامل *B. cynodontis*, *B. oryzae*, *B. bicolor*, *B. spicifera*, *B. sorokiniana* و *B. neergardii* گونه شناسایی شدند. گونه *B. oryzae* با ۳۰۳ جدایه گونه غالب از برگ‌های دارای علائم لکه قهوه‌ای و بذور جداسازی شد و گونه‌های *B. cynodontis* (۱۷ جدایه)، *B. spicifera* (۹ جدایه)، *B. bicolor* (۴ جدایه)، *B. sorokiniana* (۲ جدایه) و *B. neergardii* (یک جدایه) از برگ‌ها و بذورهای بدون علائم لکه قهوه‌ای جداسازی شدند (جدول ۱). به علاوه، ۱۲ جدایه مشکوک به گونه *B. oryzae* از علف‌های هرز مزارع برنج (سوروف *Echinochloa colona*) (۳ جدایه)، پاسپالوم (*Paspalum scrobiculatum*) (۴ جدایه)، ذرت (۲ جدایه)،

*B. bicolor* و *B. spicifera* از روی برنج و ۱۰ جدایه مشکوک به گونه *B. oryzae* از میزبان‌های گیاهی دیگر جهت مطالعات فیلوژنتیکی انتخاب شدند (جدول ۲). پس از استخراج دی‌ان‌ای ژنومی (Ahmadpour et al. 2012 a, b)، برای تکثیر ناحیه آی‌تی‌اس هسته‌ای و ژن گلیسرآلدئید-۳ فسفات دهیدروژناز (*GPD*) به ترتیب از ترکیب آغازگرهای ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') و *gpd1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و *gpd2* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') به عنوان آغازگرهای مستقیم (forward) و معکوس (reverse) استفاده شد (White et al. 1990, Berbee et al. 1999). واکنش PCR و توالی‌یابی محصولات تکثیر شده مشابه مطالعات قبلی انجام گردید (Ahmadpour et al. 2012 a, b).

برای اطمینان از صحت توالی‌های به دست آمده از هر نمونه، هر یک از توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی BLAST (Biological Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1997) با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد. برای مقایسه روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های توالی‌یابی شده، ۱۲ گونه از *Bipolaris*، چهار گونه از *Curvularia*، چهار گونه از *Exserohilum* و چهار گونه از *Drechslera* از بانک ژن (NCBI) اخذ شد و گونه *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler نیز به عنوان تاکسون outgroup انتخاب شد (جدول ۲) (Berbee et al. 1999, Tsukiboshi et al. 2005, Manamgoda et al. 2011). توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Clustal X v 2.0.12 هم‌ردیف شدند (Thompson et al. 1997). آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از روش فاصله (Distance method)

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های گونه‌های مختلف جنس *Bipolaris* جمع‌آوری شده از برنج و میزبان‌های دیگر از مناطق مختلف ایران در سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱

Table 1. Hosts and geographic origin of *Bipolaris* species collected from rice and other hosts during 2011–2012 in Iran

Species	No. isolates	Host	Geographical origin
<i>Bipolaris oryzae</i>	315	Rice (seed and leaf), maize, muse, <i>Echinochloa colona</i> , <i>Paspalum scrobiculatum</i> , unknown grass	Amol, Rasht, Astara, Gorgan, Baghe-e-Malek
<i>B. cynodontis</i>	17	Rice (seed and leaf)	Amol, Rasht, Astara, Gorgan, Baghe-e-Malek
<i>B. spicifera</i>	9	Rice (seed and leaf)	Amol, Rasht, Astara, Gorgan, Marvdasht
<i>B. bicolor</i>	4	Rice (leaf)	Amol, Rasht, Sari, Baghe-e-Malek
<i>B. sorokiniana</i>	2	Rice (leaf)	Amol, Sari
<i>B. neergaardii</i>	1	Rice (leaf)	Marvdasht

نیز در این گروه قرار گرفتند. در گروه دوم، جدایه‌ها دارای خصوصیات مورفولوژیکی مشابه گروه اول هستند، اما کنیدیوم‌ها اغلب به شکل سیلندری، راست تا خمیده، بندرت دوکی یا به اشکال دیگر دیده می‌شوند (شکل ۲- A-D). گروه مذکور دارای ۱۳ جدایه (شش جدایه از باغ ملک، یک جدایه از رشت و شش جدایه از آمل) می‌باشند و از جدایه‌های A54 (جدا شده از آمل) و K32 (جدا شده از باغ ملک) از گروه مذکور در مطالعات فیلوژنتیکی استفاده شد (جدول ۲). گروه سوم با هفت جدایه (سه جدایه از باغ ملک، یک جدایه از آستارا و سه جدایه از آمل) با داشتن کنیدیوم‌های چماقی معکوس تا دوکی، ۱۴-۱۰ بند کاذب و با ابعاد بزرگ‌تر (۲۲-۱۵ × ۱۲۰-۱۰۰ میکرومتر) از جدایه‌های گروه اول و دوم متمایز می‌گردند (شکل ۲ E-H) و از جدایه‌های A13 (جدا شده از آمل)، K14 (جدا شده از باغ ملک) و S32 (جدا شده از آستارا) به عنوان نماینده گروه مذکور در مطالعات فیلوژنتیکی استفاده شد (جدول ۲). در گروه چهارم جدایه‌ها دارای رنگ پرگنه زیتونی تیره و بدون ریسه‌های هوایی، کنیدیوفورهای کوتاه (کمتر از ۵۰۰ میکرومتر) و کنیدیوم‌های دوکی تا چماقی معکوس، ۱۵-۱۰ بند کاذب

موز (یک جدایه) و گیاه گرامینه ناشناخته (۲ جدایه) جداسازی شد (جدول ۱). گونه *B. oryzae* از همه مناطق نمونه‌برداری به جز استان فارس (مروودشت و کامفیروز) جداسازی شد (جدول ۱).

با مطالعه خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌های گونه *B. oryzae* (۳۰۳ جدایه) جدا شده از برنج چهار گروه مورفولوژیکی قابل تشخیص است. در گروه اول، جدایه‌ها دارای رنگ پرگنه زیتونی خاکستری تا خاکستری با ریسه-های هوایی فراوان، کنیدیوفورهای طویل (تا ۸۰۰ میکرومتر)، کنیدیوم‌های دوکی شکل، به بندرت سیلندری، چماقی یا چماقی معکوس (Obclavate) به ابعاد ۲۰-۱۵ × ۱۰۰-۷۰ میکرومتر، (۱۲-)(۱۰-۷) (-۶) بند کاذب، قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای با برآمدگی (پاپیل) مشخص می‌باشند و اغلب جدایه‌ها در این گروه قرار گرفتند (۲۸۰ جدایه از ۳۰۳ جدایه) (شکل ۱ A-E). از جدایه‌های S23، S41 (جدا شده از آستارا)، K62، K34A (جدا شده از باغ ملک)، A41، A21 (جدا شده از آمل) و R11، R31 و R82 (جدا شده از رشت) به عنوان نماینده این گروه در مطالعات فیلوژنتیکی استفاده شد (جدول ۲). به علاوه جدایه‌های جدا شده از گیاهان دیگر (۱۲ جدایه)

جدول ۲. منبع و رس شماره‌های جدایه‌های *Bipolaris* مورد استفاده در آنالیزهای فیلوژنتیکی

Table 1. Source and accession numbers of *Bipolaris* isolates included in phylogenetic analysis

Species	Isolate/Strain	Source	GenBank ITS	GenBank <i>gpd</i>
<i>Bipolaris australiensis</i>	Alcorn 8320b	Berbee <sup>a</sup>	AF081450	AF081408
<i>B. bicolor</i>	CBS 690.96	Olivier et al. <sup>b</sup>	AF120260	-
<i>B. cynodontis</i>	BRIP16821	Goh & Hyde <sup>c</sup>	AF163093	JX276427
<i>B. hawaiiensis</i>	Alcorn 7612(b)-6	Berbee et al. <sup>a</sup>	AF071324	AF081378
<i>B. heveae</i>	Cyn-1	Tsukiboshi et al. <sup>d</sup>	AB179834	AY004811
<i>B. sacchari</i>	Macko HS4	Berbee et al. <sup>a</sup>	AF071318	AF081372
<i>B. sorghicola</i>	MAFF 511378	Berbee et al. <sup>a</sup>	AF071332	AF081387
<i>B. sorokiniana</i>	ICMP 6233	Manamgoda et al. <sup>e</sup>	JX256418	AF081385
<i>B. spicifera</i>	BRIP12529	Goh & Hyde <sup>c</sup>	AF163076	JN600979
<i>B. victoriae</i>	Macko HVW	Berbee et al. <sup>a</sup>	AF158109	AF158112
<i>B. zeicola</i>	Nelson CcA	Berbee et al. <sup>a</sup>	AF158110	AF081382
<i>B. oryzae</i>	MFLUCC 10-0714	Manamgoda et al. <sup>e</sup>	JX256414	JX276428
<i>B. oryzae</i>	Alcorn WKIC	Berbee <sup>a</sup>	-	AF081381
<i>B. oryzae</i>	13590-SS1	Krupinsky et al. <sup>f</sup>	-	AY277280
<i>B. oryzae</i>	86	Tomaso-Peterson <sup>g</sup>	GU222690	-
<i>B. oryzae</i>	K52B	This study	KC315916	KC333428
<i>B. oryzae</i>	K32	This study	KC315917	KC333429
<i>B. oryzae</i>	K14	This study	KC315918	KC333430
<i>B. oryzae</i>	K34A	This study	KC315919	KC333431
<i>B. oryzae</i>	K62	This study	KC315920	KC333432
<i>B. oryzae</i>	S32	This study	KC315921	KC333433
<i>B. oryzae</i>	S41	This study	KC315922	KC333434
<i>B. oryzae</i>	S23	This study	KC315923	KC333435
<i>B. oryzae</i>	A13	This study	KC315924	KC333436
<i>B. oryzae</i>	A54	This study	KC315925	KC333437
<i>B. oryzae</i>	A41	This study	KC315926	KC333438
<i>B. oryzae</i>	A21	This study	KC315927	KC333439
<i>B. oryzae</i>	R11	This study	KC315928	KC333440
<i>B. oryzae</i>	R82	This study	KC315929	KC333441
<i>B. oryzae</i>	R31	This study	KC315930	KC333442
<i>B. oryzae</i>	Bi w	This study	KC315935	KC333448
<i>B. oryzae</i>	TU81	This study	KC315936	-
<i>B. oryzae</i>	TU8	This study	KC315937	-
<i>B. oryzae</i>	BP2	This study	KC315938	-
<i>B. oryzae</i>	FP17	This study	KC315939	-
<i>B. oryzae</i>	BoM	This study	KC315940	-
<i>B. oryzae</i>	BoP	This study	KC315941	-
<i>B. oryzae</i>	BoS	This study	KC315942	-
<i>B. oryzae</i>	ZGO3	This study	KC315943	-
<i>B. oryzae</i>	ZGO1	This study	KC315944	-
<i>B. cynodontis</i>	A63	This study	KC315930	KC333443
<i>B. spicifera</i>	R12	This study	KC315931	KC333444
<i>B. sorokiniana</i>	A41	This study	KC315932	KC333445
<i>B. neergaardii</i>	F1	This study	KC315933	KC333446
<i>B. bicolor</i>	K81	This study	KC315934	KC333447
<i>Curvularia clavata</i>	DAOM 148084	Berbee et al. <sup>a</sup>	AF071336	AF081391
<i>C. cymbopogonis</i>	Alcorn 88109-1	Yun et al. <sup>a</sup>	AF071351	AF081403
<i>C. gudauskasii</i>	DAOM 165085	Berbee et al. <sup>a</sup>	AF071338	AF081393
<i>C. lunata</i>	UAMH9 1349	Berbee et al. <sup>a</sup>	AF071339	AF081394
<i>Exserohilum minor</i>	ATCCf 62323	Berbee et al. <sup>a</sup>	AF071341	AF081396
<i>E. monoceras</i>	DAOM 208988	Berbee et al. <sup>a</sup>	AF071340	AF081395
<i>E. rostratum</i>	ATCCf 32197	Berbee et al. <sup>a</sup>	AF071342	AF081379
<i>E. turcicum</i>	94/1823	Goh & Hyde <sup>c</sup>	AF163067	-
<i>Drechslera biseptata</i>	CBS 108940	Zhang & Berbee <sup>a</sup>	AY004788	AY004817
<i>D. erythrospila</i>	CBS 10894	Zhang & Berbee <sup>a</sup>	AY004782	AY004813
<i>D. tritici-repentis</i>	DAOM 208990	Berbee et al. <sup>a</sup>	AF071348	AF081369
<i>D. tuberosa</i>	DAOM 169286	Berbee et al. <sup>a</sup>	AF071347	AF081370
<i>Alternaria alternata</i>	Simmons 34-016	Berbee et al. <sup>a</sup>	AF071346	AF081400

<sup>a</sup> Dept. Botany, University of British Columbia, 6270 University Blvd, Vancouver, BC V6T 1Z4, Canada.

<sup>b</sup> Dept. Plant Pathology, Cornell University, 334 Plant Science Building, Ithaca, NY 14853, USA

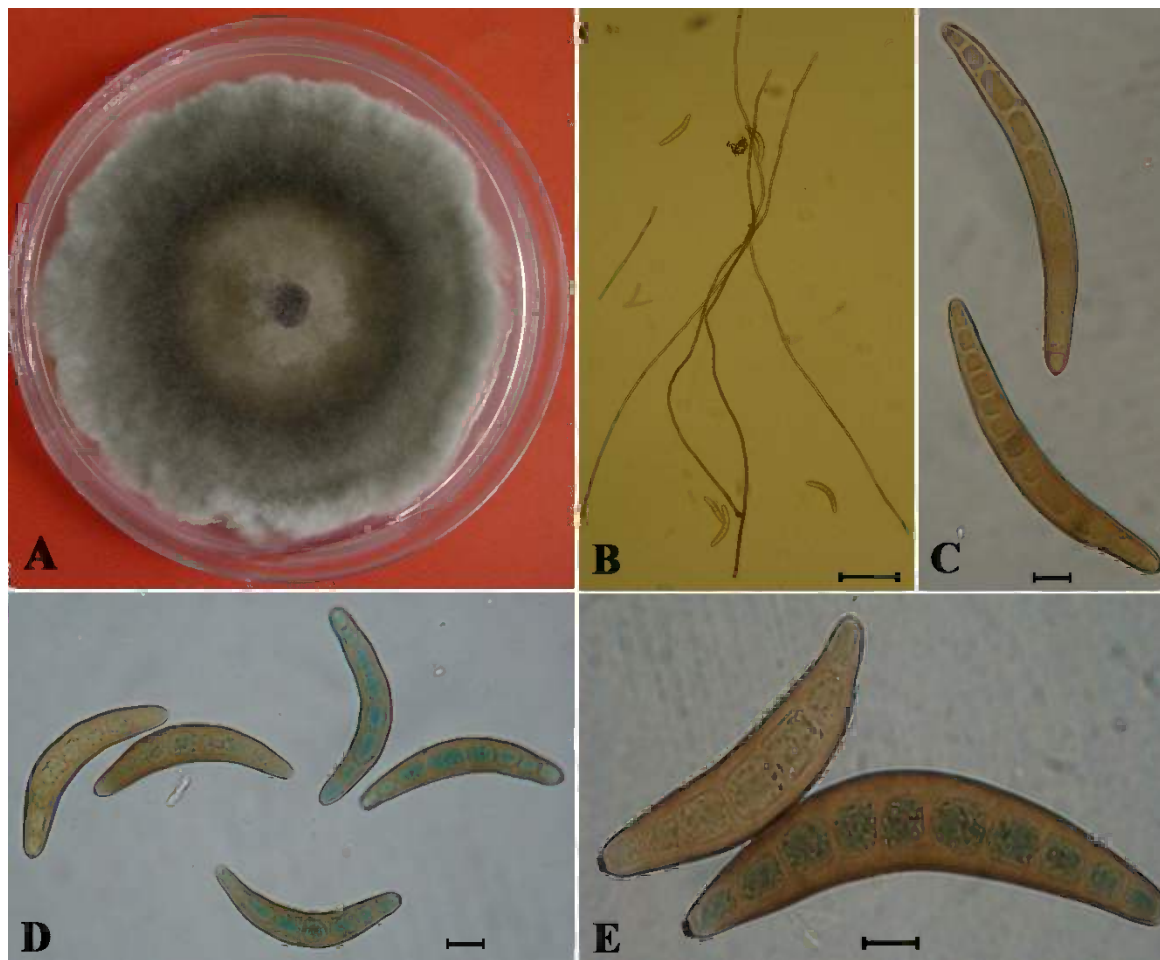
<sup>c</sup> Dept. Ecology & Biodiversity, The University of Hong Kong, Pokfulam Road, Hong Kong SAR, China.

<sup>d</sup> National Institute of Floricultural Science, Laboratory of Plant Pathology; Fujimoto 2-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8519, Japan.

<sup>e</sup> Dept. Microbiology, Mae Fah Lunah University, Muang 333, Chiang Rai 57100, Thailand

<sup>f</sup> Dept. Botany and Plant Pathology, Oregon State University, 2082 Cordley Hall, Corvallis, OR 97333, USA

<sup>g</sup> Dept. Plant Pathology, Mississippi State University, P.O. Box 9655, Mississippi State, MS 39762, USA



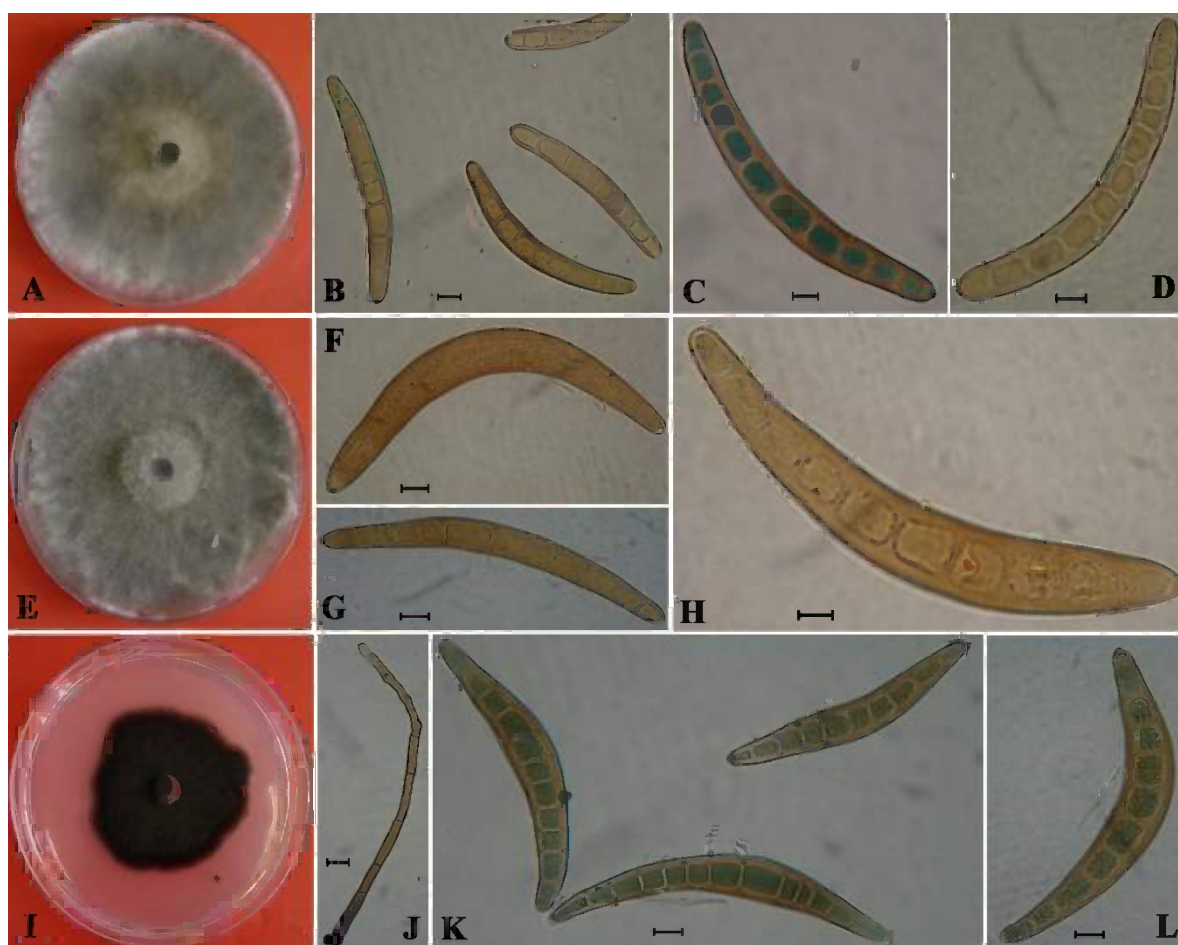
شکل ۱. رنگ پرگنه، کنیدیوفورها و کنیدیومها در جدایه A41 گونه *Bipolaris oryzae* (گروه یک): (A) رنگ پرگنه، (B) کنیدیوفورها (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)، (C-E) کنیدیومها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 1. Colony color, conidiophores and conidia in the isolate A41 of *Bipolaris oryzae* (group 1): A) Colony color, B) Conidiophore (Bar= 100  $\mu$ m), C-E) Conidia (Bar= 10  $\mu$ m).

نظر می‌رسد که گونه *B. oryzae* عامل اصلی لکه قهوه‌ای برنج در ایران باشد. در ایران عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج به گونه *B. victoriae* نسبت داده شده است و گونه مذکور با ۷۵-۸۵٪ گونه غالب در نظر گرفته شده است و گونه *B. oryzae* ۱۰-۱۵٪ از کل جدایه‌ها را شامل شده است و گونه‌های *B. bicolor* و *B. indica* به ترتیب با فراوانی ۳ و ۲٪ گزارش شده‌اند (Safari Motlagh 2008, Safari Motlagh & Kaviani 2008a, Safari Motlagh et al. 2005, Safari Motlagh et al. 2006).

و به ابعاد ۲۶-۱۵ × ۱۵۰-۱۰۰ میکرومتر می‌باشند و از گروه‌های قبلی کاملاً متمایز هستند (شکل ۲ I-L). این گروه دارای سه جدایه از باغ ملک بود و جدایه K52B از گروه مذکور در مطالعات مولکولی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲).

از روی برگ‌ها و بذرها با علائم لکه قهوه‌ای تنها گونه *B. oryzae* جداسازی شد و بقیه گونه‌ها از برگ‌ها و بذور بدون علائم لکه قهوه‌ای جداسازی گردیدند. بنابراین به



شکل ۲. رنگ پرگنه، کنیدیوفور و کنیدیوم‌ها در جدایه‌های گونه *Bipolaris oryzae* (گروه‌های دو، سه و چهار): A-D) A52 (گروه دو)، E-H) S32 (گروه سه)، I-L) K52B (گروه چهار) (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 1. Colony color, conidiophore and conidia in *Bipolaris oryzae* isolates (groups 2, 3 and 4): A-D) the isolate A52 (group 2), E-H) the isolate S32 (group 3), I-L) the isolate K52B (group 4) (Bar= 10 µm).

*B. spicifera*, *B. sorokiniana*, *B. neergaardii* و *B. bicolor* قبلاً از روی برنج گزارش شده‌اند (Ahmadpour et al. 2011, 2012 b, Ershad 2009). مشخصات مورفولوژیکی گونه *B. victoriae* بیان شده توسط صفری مطلق و همکاران (Safari Motlagh 2008, Safari Motlagh & Kaviani 20008a, Safari Motlagh et al. 2006) با سایر محققین مطابقت ندارد و ویژگی‌های بیان شده بسیار شبیه به گونه *B. oryzae* است. در گونه *B. victoriae* طول

محققین دیگر گونه *B. oryzae* را عامل اصلی بیماری لکه قهوه‌ای گزارش کرده‌اند (Khosravi 1999, Razavi 1992, Shamsi et al. 2010, Nazari 2011). تا به حال ۱۲ گونه از جنس *Bipolaris* از روی برنج در دنیا گزارش شده است (Farr & Rossman 2013, Sivanesan 1987) و عامل اصلی بیماری لکه قهوه‌ای برنج نیز *B. oryzae* ذکر شده است (Ou 1985, Sivanesan 1987). براساس مطالعه حاضر نیز عامل اصلی بیماری لکه قهوه‌ای گونه مذکور می‌باشد. گونه‌های *B. cynodontis*، *B. oryzae*

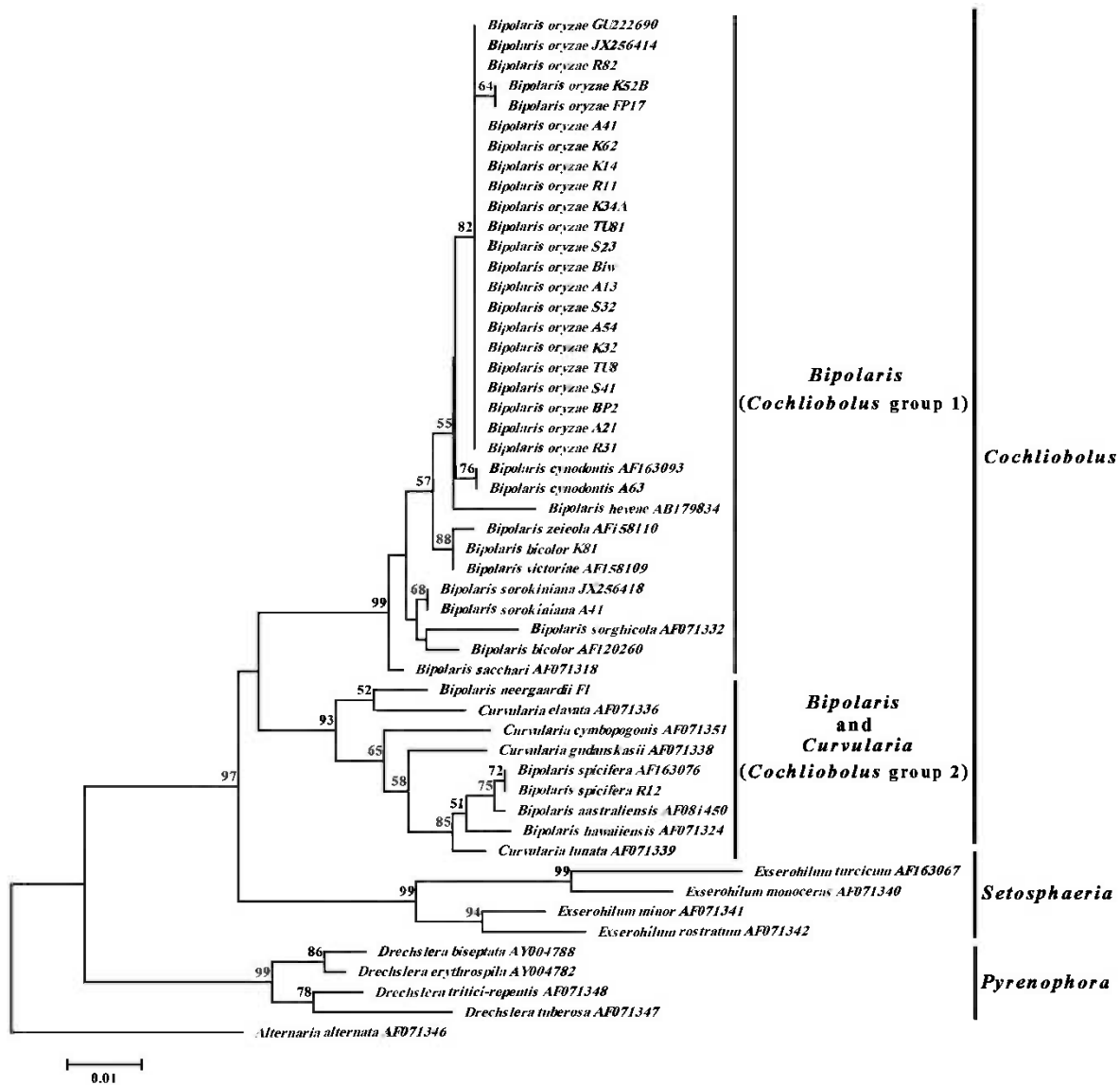


هر چند که گونه‌های دیگری از جنس *Bipolaris* از برنج قابل جداسازی است و اهمیت هریک از گونه‌های دیگر در ایجاد بیماری روی برنج در دست بررسی است. نعیمی و همکاران (Naeimi et al. 2011) گزارش کرده‌اند که *B. sorokiniana* قادر به آلودگی گیاهان برنج بوده و باعث پوسیدگی طوقه و لکه‌های قهوه‌ای تیره روی برگ‌ها و غلاف ساقه می‌گردد. همچنین گزارش‌هایی از ایجاد علائم شبیه بیماری لکه قهوه‌ای برنج با گونه *B. cynodontis* دیده می‌شود (Zehhar et al. 2008).

### تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک

درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با روش NJ براساس توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA و ژن *gpd* نشان می‌دهد که جنس‌های *Cochliobolus*، *Pyrenophora* و *Setosphaeria* مونوفیلیتیک می‌باشند (شکل‌های ۳ و ۴) و خاندان‌های (*Drechslera/Pyrenophora* clades) *Cochliobolus*، *Curvularial*، *Bipolaris* و *Exserohilum/Setosphaeria* به ترتیب با مقدار اعتبارسنجی (Bootstrap) ۹۹، ۹۷ و ۹۹ درصد براساس ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA (شکل ۳) و با مقدار اعتبارسنجی ۸۷، کمتر از ۵۰ و ۷۰ درصد با ژن *gpd* حمایت می‌شوند (شکل ۴). خاندان *Bipolaris/Curvularial/Cochliobolus* به دو گروه یا زیرخانان تقسیم می‌شود و در گروه یک *Cochliobolus* تنها گونه‌های *Bipolaris* قرار می‌گیرند و در گروه دو *Cochliobolus* گونه‌های *Curvularia* و تعدادی از گونه‌های *Bipolaris* قرار می‌گیرند (شکل‌های ۳ و ۴). در این تحقیق طول توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA و ژن *gpd* توالی‌یابی شده در جدایه‌های مختلف گونه‌های *Bipolaris* به ترتیب بین

کنیدیفورها کوتاه (کمتر از ۳۰۰ میکرومتر) بوده و کنیدیوم‌ها اغلب راست به‌ندرت خمیده، دوکی شکل با ۸-۱۰ بند کاذب و بدون پاییل می‌باشند (Sivanesan 1987). گونه *B. oryzae* با کنیدیوم‌های اغلب خمیده و تعداد بند کاذب بیشتر (۷-۱۴ بند کاذب) و وجود پاییل مشخص از گونه *B. victoriae* متمایز می‌شود (Sivanesan 1987). مطالعات ما نشان می‌دهد که گونه *B. victoriae* در ایران از فراوانی کمتری برخوردار بوده و به نظر می‌رسد بیشتر روی گیاهان گندم، جو، چاودار، یولاف و احتمالاً علف‌های حاشیه مزارع گیاهان مذکور وجود دارد (Ahmadpour et al. 2011, 2012 b). در دنیا نیز تنها یک گزارش از گونه مذکور روی برنج از کشور بولیوی دیده می‌شود (Farr & Rossman 2013, Sivanesan 1987). به علاوه، گونه *B. oryzae* به گونه *B. leersiae* نیز شبیه است (Sivanesan 1987). برخی از محققین گونه اخیر را مترادف گونه *B. oryzae* می‌دانند (مکاتبات شخصی با دکتر تاکائو تسوکیوشی از کشور ژاپن). اخیراً گونه *B. oryzae* از میزبان‌های مختلف دیگر از جمله گندم، ذرت، برنج وحشی (*Zizania palustris*)، گونه‌های *Panicum* (*Panicum colonum*)، *Panicum maximum* و *Panicum virgatum*)، *Cordia* در *Leersia hexandra* و *Eleusine indica trichotoma* Farr & Rossman 2013, (Sivanesan 1987, Krupinsky et al. 2004). در مطالعه حاضر نیز از روی سوروف، پاسپالوم، ذرت، موز و گیاه گرامینه ناشناخته جداسازی شد که می‌تواند در اتخاذ راهکارهای مدیریتی بیماری حائز اهمیت باشد. آزمایش‌های بیماری‌زایی گیاهان مذکور در شرایط گلخانه در دست بررسی است. براساس نتایج مطالعه حاضر عامل اصلی لکه قهوه‌ای برنج در ایران گونه *B. oryzae* می‌باشد.



شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی استنباط شده از ناحیه ITS و 5.8S rDNA از ۵۱ تاکسون با روش NJ (neighbor-joining). اعداد بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی (bootstrap) از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. طول شاخه‌ها با تعداد تغییرات باز که به صورت مقیاس بار نشان داده شده است، متناسب می‌باشد. گونه *Alternaria alternata* (AF071346) به عنوان outgroup انتخاب شده است.

Fig. 6. A neighbor-joining tree inferred from the ITS regions and 5.8S rDNA sequences from 51 taxa. The numbers above the branches show the bootstrap values in 1000 replicates. The length of branches is proportional to the number of base changes, indicated by the scale bar. *Alternaria alternata* (AF071346) is an outgroup.

ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA و ژن *gpd* به ترتیب با مقدار اعتبارسنجی ۸۲ و ۹۹ درصد تشکیل گروه مونوفیلتیک با گونه *B. oryzae* (JX256414, AY277280, AF081381, JX276428, GU222690

۵۶۴-۵۳۱ و ۵۶۴-۵۳۱ جفت باز متغیر بود. با توجه به درخت NJ رسم شده همه جدایه‌های گونه *B. oryzae* روی برنج (۱۵ جدایه) و جدایه‌های مشکوک به گونه مورد نظر روی میزبان‌های دیگر (۱۰ جدایه) براساس

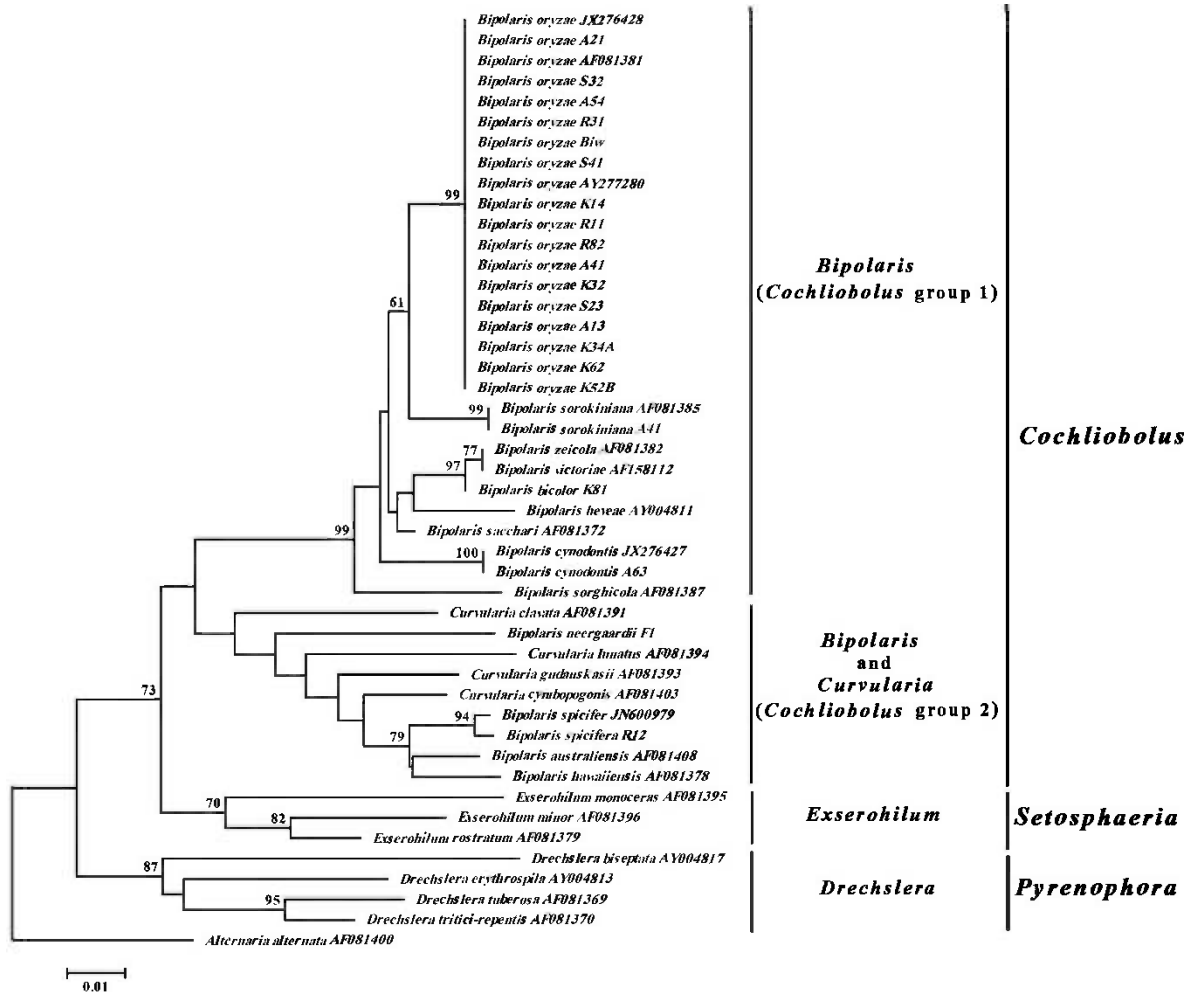
خمیده)، کوتاه و با تعداد بند کاذب کمتر از هفت می‌باشند. هم‌چنین در گروه دو *Cochliobolus* گونه‌های *Curvularia* نیز قرار گرفتند (شکل‌های ۳ و ۴). تا به حال توالی‌یابی ناحیه rDNA-ITS و ژن *gpd* در گونه *B. neergaardii* انجام نشده است. این اولین گزارش از توالی‌یابی نواحی مورد نظر در گونه مذکور است. گونه‌های *Bipolaris* که در گروه اول *Cochliobolus* قرار می‌گیرند بیمارگرهای مهم گیاهان زراعی محسوب می‌شوند و در گروه دوم *Cochliobolus* هم تعدادی از گونه‌های *Bipolaris* و گونه‌های *Curvularia* با بیمارگرهای متوسط هستند. این گروه‌بندی براساس توالی نواحی ITS, *TEF*, *GPD*, *Brn1* و *MAT* نیز دیده می‌شود (Turgeon 1998, Berbee et al. 1999, Kodsueb et al. 2006, Sun et al. 2011, Manamgoda et al. 2003). نتایج این مطالعه با نتایج محققین دیگر نیز هم سو بود (Berbee et al. 1999, Kodsueb et al. 2006, Manamgoda et al. 2011).

صفری مطلق و انوری (Safari Motlagh & Anvari 2010) و صفری مطلق و کاویانی (Safari Motlagh & Kaviani 2008b) برای تمایز گونه‌های جنس *Bipolaris* جدا شده از برنج از روش RAPD-PCR و هضم محصولات تکثیر شده با آنزیم‌های برشی استفاده کرده‌اند. ضریب تشابه بین جدایه‌های گونه‌های مختلف جنس *Bipolaris* با روش RAPD-PCR بیش از ۷۰٪ بود.

به نظر نمی‌رسد که روش مذکور بتواند گونه‌های جنس *Bipolaris* را از هم تمایز دهد. برای تمایز گونه‌های جنس *Bipolaris* از ترادفیابی بخش‌هایی از rDNA (ITS1, 5.8S, ITS2)، ژن گلیسرآلدهید-۳ فسفات دهیدروژناز (*gpd*)، ژن *Brn1* (ژن مسئول در فرآیند سنتز ملانین) و هضم نواحی rDNA ITS1-5.8S-ITS2 (ITS PCR-RFLP)

دادند و با هم گروه‌بندی شدند (شکل‌های ۳ و ۴) و میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی بین جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق بیش از ۹۹ درصد بود. جدایه‌های مختلف گونه *B. oryzae* در گروه یک *Cochliobolus* قرار گرفتند. گونه‌هایی که در این گروه قرار می‌گیرند معمولاً دارای کنیدیوم‌های بزرگ، خمیده و قایقی تا دوکی شکل هستند. جدایه‌های توالی‌یابی شده از گونه‌های *B. sorokiniana* (به ترتیب با مقدار اعتبارسنجی ۶۸ و ۹۹ درصد براساس ناحیه rDNA ITS1-5.8S-ITS2 و ژن *gpd*)، *B. cynodontis* (به ترتیب با مقدار اعتبارسنجی ۷۶ و ۱۰۰ درصد براساس ناحیه rDNA ITS1-5.8S-ITS2 و ژن *gpd*)، *B. bicolor* در گروه یک *Cochliobolus* قرار گرفتند (شکل‌های ۳ و ۴). همه گونه‌های مذکور دارای کنیدیوم‌های راست تا خمیده، دوکی شکل و با تعداد بیش از هفت بند کاذب می‌باشند. جدایه (K81) گونه *B. bicolor* براساس ناحیه rDNA ITS1-5.8S-ITS2 با گونه‌های *B. victoriae* و *B. zeicola* گروه‌بندی شد و دور از گونه *B. bicolor* (AF120260) قرار گرفت و براساس ژن *gpd* نیز با گونه‌های *B. victoriae* و *B. zeicola* گروه‌بندی شد. تنها یک توالی از گونه *B. bicolor* براساس ناحیه rDNA ITS1-5.8S-ITS2 در بانک ژن وجود دارد و توالی ژن *gpd* گونه مذکور نیز وجود ندارد. بنابراین برای تعیین دقیق حدود و ثغور گونه مذکور نیاز به توالی‌های بیشتر و معتبر هست.

به علاوه، جدایه‌های توالی‌یابی شده از گونه‌های *B. spicifera* (به ترتیب با مقدار اعتبارسنجی ۷۲ و ۹۴ درصد براساس ناحیه rDNA ITS1-5.8S-ITS2 و ژن *gpd*) و *B. neergaardii* در گروه دو *Cochliobolus* قرار گرفتند (شکل‌های ۳ و ۴) و گونه‌هایی که در گروه مذکور قرار می‌گیرند دارای کنیدیوم‌های راست (به ندرت



شکل ۴. درخت فیلوژنتیکی استنباط شده از ژن گلیسرآلدهید-۳- فسفات دهیدروژناز (*gpd*) از ۴۶ تاکسون با روش NJ (neighbor-joining). اعداد بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی (bootstrap) از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. طول شاخه‌ها با تعداد تغییرات باز که به صورت مقیاس بار نشان داده شده است، متناسب می‌باشد. گونه *Alternaria alternata* (AF081400) به عنوان outgroup انتخاب شده است.

Fig. 6. A neighbor-joining tree inferred from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) gene from 46 taxa. The numbers above the branches show the bootstrap values in 1000 replicates. The length of branches is proportional to the number of base changes, indicated by the scale bar. *Alternaria alternata* (AF081400) is an outgroup.

روی خصوصیات مورفولوژیکی گونه‌های جنس مذکور تاثیر می‌گذارد. در گونه *B. oryzae* چهار تیپ رنگ پرگنه گزارش شده است و از نظر بیماری‌زایی از یکدیگر متفاوت هستند (Kumar et al. 2011). در مطالعه حاضر نیز اختلاف

استفاده شده است (Goh et al. 1998, Berbee et al. 1999, Kodsueb et al. 2006, Sun et al. 2003). تغییرپذیری خصوصیات مورفولوژیکی در گونه‌های جنس *Bipolaris* در شرایط آزمایشگاهی گزارش شده است (Alcorn 1983, 1988). در محیط‌های کشت نوع ماده غذایی، pH، دما و نور

### سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر فراهم کردن اعتبارات مالی این تحقیق کمال تشکر را دارند.

### منابع

جهت ملاحظه به صفحات (51-53) متن انگلیسی مراجعه شود.

آشکاری بین مورفولوژی جدایه‌ها (رنگ پرگنه، شکل، اندازه و تعداد بندهای کاذب کیندیوم‌ها) دیده شد. بنابراین برای تعیین دقیق حدود و ثغور گونه‌های جنس *Bipolaris* نیاز به روش‌های مولکولی نیز است. مطالعات ما نشان می‌دهد که هر دو تیپ آمیزشی در یک مزرعه و امکان تولیدمثل جنسی بین جدایه‌های گونه *B. oryzae* وجود دارد (داده‌ها چاپ نشده است) و می‌تواند در تغییرپذیری ژنتیکی جمعیت‌های قارچ تأثیر بسزایی داشته باشد. هر چند که مرحله جنسی قارچ در طبیعت یک‌بار دیده شده است (Dickson 1956). مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *B. oryzae* در ایران در دست بررسی است.

## MORPHOLOGICAL AND PHYLOGENETIC INVESTIGATION OF *Bipolaris oryzae* AND SOME SPECIES OF *Bipolaris* OBTAINED FROM RICE AND GRASS WEEDS \*

A. AHMADPOUR<sup>1\*</sup>, M. JAVAN-NIKKHAH<sup>1\*\*</sup>, M. R. NAGHAVI<sup>2</sup>  
and F. PADASHT DEHKAEI<sup>3</sup>

(Received 7.4.2013; Accepted : 4.1.2014)

### Abstract

Brown spot disease is an important disease of rice in the world and Iran. A collection of 348 *Bipolaris* isolates was made from cultivated rice paddies and weeds in Mazandaran, Guilan, Golestan, Khuzistan and Fars provinces, during 2011 and 2012. Six species of *Bipolaris* viz. *B. oryzae*, *B. cynodontis*, *B. spicifera*, *B. bicolor*, *B. sorokiniana* and *B. neergaardii* were identified using morphological and molecular data. *Bipolaris oryzae* was known as dominant species and the causal agent of rice brown disease in Iran. Based on morphological characteristics, *B. oryzae* isolates were grouped into four different morphological groups. Maize, muse, *Echinochloa colona*, *Paspalum scrobiculatum* and an unknown grass are introduced new hosts for *B. oryzae* in Iran. Moreover, phylogenetic relationships of some *Bipolaris* species based on sequencing of rDNA-ITS region and *gpd* gene have been studied.

**Keywords:** Fungus, Taxonomy of fungi, Diseases of rice, Rice, Fungal Phylogeny, *Bipolaris*, *Cochliobolus*

See Persian text for figures and tables (Pages ۱۲۳- ۱۳۵).

---

\*: A Part of PhD. Thesis of the First Author, Submitted to University College of Agric. and Natur. Resour., Univ. of Tehran, Karaj, Iran.

\*\* : Corresponding Author, Email: [jnikkhah@ut.ac.ir](mailto:jnikkhah@ut.ac.ir)

1. PhD. Student and Assoc. Prof. of Plant Protec., Univ. College of Agric. and Natur. Resour., Univ. of Tehran, Karaj, Iran.

2. Prof. of Biotechnol., Univ. College of Agric. and Natur. Resour., Univ. of Tehran, Karaj, Iran.

3. Assist. Prof. of Plant Protec., Rice Res. Instit. of Iran, Rasht, Iran.

## References

- AHMADPOUR, A., DONYADOOST-CHELAN, M., HEIDARIAN, Z. and JAVAN-NIKKHAH, M. 2011. New species of *Bipolaris* and *Curvularia* on grass species in Iran. **Rostaniha** 12: 39–49. (In Farsi with English Summary).
- AHMADPOUR, A., HEIDARIAN, Z., DONYADOOST-CHELAN, M., JAVAN-NIKKHAH, M. and TSUKIBOSHI, T. 2012a. A new species of *Bipolaris* from Iran. **Mycotaxon** 120: 301–307.
- AHMADPOUR, A., M., HEIDARIAN, Z. KARAMI, S., JAVAN-NIKKHAH, M., TSUKIBOSHI, T. and ZHANG, M. 2012b. New species of *Bipolaris* and *Curvularia* on grass species in Iran. **Rostaniha** 13: 69–82. (In Farsi with English Summary).
- ALCORN, J. L. 1983. Generic concepts in *Drechslera*, *Bipolaris* and *Exserohilum*. **Mycotaxon** 17: 1–86.
- ALCORN, J. L. 1988. The taxonomy of [ *Helminthosporium* ] species. **Annu. Rev. Phytopathol.** 26: 37–56.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER W. and LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25: 3389–3402.
- BERBEE, M. L., PIRSEYEDI, M. and HUBBARD, S. 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia** 91: 964–977.
- DELA PAZ, M. A. G., GOODWIN, P. H., RAYMUNDO, A. K., ARDALES, E. Y. and VERA CRUZ, C. M. 2006. Phylogenetic analysis based on ITS sequence and conditions affecting the type of conidial germination of *Bipolaris oryzae*. **Plant Pathol.** 55: 756–765.
- DICKSON, J.G. 1956. **Diseases of Field Crops**. McGraw–Hill Pub., New York, Pp. 159–163.
- ELLIS, M. B. 1971. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, England.
- ELLIS, M. B. 1976. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, 507 p, Kew, England.
- ERSHAD, D. 2009. **Fungi of Iran**. 3<sup>rd</sup> ed., Agricultural Res., Education & Extention Org. Pub., Tehran, 531 p.
- FARR, D. F. and ROSSMAN, A. Y. 2013. Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory, ARS, USDA. [http://nt.ars-grin.gov/fungal\\_databases/](http://nt.ars-grin.gov/fungal_databases/)
- GOH, T. K., HYDE, K. D. and LEE, D. K. L. 1998. Generic distinction in the *Helminthosporium*-complex based on restriction analysis of the nuclear ribosomal RNA gene. **Fungal Divers** 1: 109–113.
- JOHNSON, D. R. and PERCICH, J. A. 1992. Wild rice domestication, fungal brown spot disease and the future of commercial production in Minnesota. **Plant Dis.** 76: 1193–1198.
- KHOSRAVI, V. 1999. **Investigation on important seedborne fungal diseases of dominant rice cultivars in Mazandaran region**. MSc. Thesis, Tehran Univ., 102 p.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.** 16: 111–120.
- KODUSEB, R., DHANASEKARAN, V., APTROOT, A., LUMYONG, S., MCKENZIE, E.H.C., HYDE, K. D. and JEEWON, R. 2006. The family Pleosporaceae: intergeneric relationships and phylogenetic perspectives based on sequence analyses of partial 28S rDNA. **Mycologia** 98: 571–583.
- KRUPINSKY, J. M., BERDAHL, J. D., SCHOCH, C. L. and ROSSMAN, A. Y. 2004. Leaf spot on switch grass (*Panicum virgatum*), symptoms of a new disease caused by *Bipolaris oryzae*. **Can. J. Plant Pathol.** 26: 371–378.
- KUMAR, P., ANSHU, V. and KUMAR, S. 2011. Morpho-pathological and molecular characterization of *Bipolaris oryzae* in rice (*Oryza.sativa*). **J. Phytopathol.** 159: 51–56.
- MANAMGODA, D. S., CAI, L., BAHKALI, A.H., CHUKEATIROTE, E. and HYDE, K. D. 2011. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. **Fungal Divers** 51: 3–42.
- McDONALD, B. A., ZHAN, J. and BURDON, J. J. 1999. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. **Phytopathology** 89: 639–645.
- NAEIMI, S., KHOSRAVI, V. and TSUKIBOSHI, T. 2011. Occurrence of rice infection by *Bipolaris sorokiniana* in Iran. **Iran. J. Plant Pathol.** 47: 123–125. (In Farsi with English Summary).
- NAZARI, S. 2011. **Study on species of *Bipolaris* associated with rice plant and determination of genetic diversity of the common species by using rep-PCR in Mazandaran province**. MSc. Thesis, Tehran

Univ., 103 p.

- OU, S. H. 1985. **Rice Diseases**. 2<sup>ed</sup>, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK, 380 p.
- PADMANABHAN, S. Y. 1973. The great Bengal famine. **Annu. Rev. Phytopathol.** 11: 11–24.
- RAZAVI, S. E. 1992. **The study of distribution, phenotypic traits taxonomy and pathogenicity of different isolates of *Helminthosporium* and related form genera from rice in Fars and Kohgiluyeh and Boyerahmad provinces**. MSc. Thesis, Shiraz Univ., Shiraz, Iran. 130 p.
- SAFARI MOTLAGH, M. R. 2008. Study of population structure of *Bipolaris* spp., the causal agent of rice brown spot disease in Guilan province., based on RAPD-PCR. **J. Agric. Sci. Natur. Resour.** 15: 54–64. (In Farsi with English Summary).
- SAFARI MOTLAGH, M. R. and ANVARI, M. 2010. Genetic variation in a population of *Bipolaris oryzae* based on RAPD-PCR in north of Iran. **Afr. J. Biotechnol.** 9: 5800–5804.
- SAFARI MOTLAGH, M. R. and KAVIANI, B. 2008a. Characterization of new *Bipolaris* spp.: the causal agent of rice brown spot disease in the North of Iran. **Intl. J. Agric. Biol.** 10: 638–642.
- SAFARI MOTLAGH, M. R. and KAVIANI, B. 2008b. Study of genetic variation in population of *Bipolaris victoriae*, the causal agent of rice brown spot disease, in Guilan province of Iran. **Afr. J. Biotechnol.** 7: 4027-4030.
- SAFARI MOTLAGH, M. R., PADASHT, F. and HEDJAROUD, G.A. 2005. Rice brown spot disease in Guilan province and the study of the reaction of some cultivars to the disease. **J. Sci. Technol. Agric. Nat. Resour.** 9: 171–183 (In Farsi with English Summary).
- SAFARI MOTLAGH, M. R., ZAMANIZADEH, H. R., HEDJARAUD, G. A. and OKHOVVAT, M. 2006. Identification of the causal agent fungi of rice brown spot disease in Guilan province. **J. Agric. Sci. Natur. Resour.** 12: 136–45 (In Farsi with English Summary).
- SAITOU, N. and NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4: 406–425.
- SHAMSI, A., ELAHINIA, S. A., KHODAPARAST, S. A. and MOOSANEJAD, S. 2010. Fertility status and mating type of *Cochliobolus miyabeanus*, the causal agent of rice brown spot disease in Guilan province. **Iran. J. Plant Path.** 45: 89–97. (In Farsi with English Summary).
- SHIMIZU, K., TANAKA, C., PENG, Y. L. and TSUDA, M. 1998. Phylogeny of *Bipolaris* inferred from nucleotide sequences of *Brn1*, a reductase gene involved in melanin biosynthesis. **J. Gen. Appl. Microb.** 44: 251–258.
- SIVANESAN, A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. **Mycol. Pap.** 158: 1–261.
- SUN, G. Y., OIDE, S., TANAKA, E., SHIMIZU, K., TANAKA, C. and TSUDA, M. 2003. Species separation in *Curvularia* “*geniculata*” group inferred from *Brn1* gene sequences. **Mycoscience** 44: 239–244.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. and KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.** 24: 1596–1599.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. and HIGGINS, D.G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.** 25: 4876–4882.
- TSUKIBOSHI, T., CHUNG, W. H. and YOSHID, S. 2005. *Cochliobolus heveicola* sp. nov. (*Bipolaris heveae*) causes brown stripe of bermudagrass and zoysia grass. **Mycoscience** 46: 17–21.
- TURGEON, B.G. 1998. Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. **Annu. Rev. Phytopathol.** 36: 115–137.
- WEBSTER, R. K. and GUNNELL, P. S. 1992. **Compendium of Rice Diseases**. APS press, USA.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. B. and TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322, *In* M. Gelfand, D. Sninsky, and T. White, (Eds.), **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Pub., San Diego, California.
- ZEHAR, G., TOUHAMI, A. O. and DOUIRA, A. 2008. First report of *Bipolaris cynodontis* on *Oryza sativa* in Morocco. **Phytopathol. Mediterr.** 47: 73–76.